

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-508022
(P2010-508022A)

(43) 公表日 平成22年3月18日(2010.3.18)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	2 G 0 5 4
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 B 0 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く

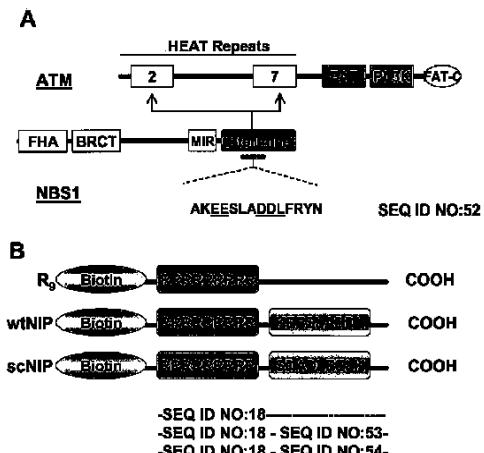
(21) 出願番号	特願2009-534698 (P2009-534698)	(71) 出願人	506319259 サザン リサーチ インスティチュート アメリカ合衆国 アラバマ 35205, バーミンガム, ナインス アベニュー サウス 2000
(86) (22) 出願日	平成19年10月30日 (2007.10.30)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成21年6月18日 (2009.6.18)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/022886	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02008/054726	(72) 発明者	カリビュー, マイケル ジェイ. アメリカ合衆国 ノースカロライナ 28 365, マウント オリーブ, ウォー ラー ロード 1094
(87) 國際公開日	平成20年5月8日 (2008.5.8.)		
(31) 優先権主張番号	60/863,457		
(32) 優先日	平成18年10月30日 (2006.10.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】放射線療法および化学療法に対して癌細胞を感受性にするためのNBS1-ATMのターゲティング

(57) 【要約】

米国で新規に癌診断を受けた推定130万人の患者のうちの2/3が、最終的にその治療レジメンの一部としていくつかの放射線療法形態を受けている。放射線療法は、多数の癌、特に、転移していない局在性癌の最も重要な且つ強力な治療の1つと考えられている。放射線療法によって治療される腫瘍のうち、ほんのわずかの腫瘍(リンパ腫およびセミノーマが含まれる)しか反応性が高くない。多数の他の固形腫瘍(黒色腫、膠芽細胞腫、および前立腺癌など)は、典型的には、照射に非常に高い耐性を示し、高線量の照射後でさえも進行する傾向がある。本発明は、新規の放射線増感剤、その作製方法、および使用に関する。照射および化学療法に対して癌細胞を感受性にする工程における使用のための組成物および方法を本明細書中に提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

N B S 1 のカルボキシ末端アミノ酸配列またはその保存的変異体を含む単離されたペプチドであって、ここでポリペプチドが全長 N B S 1 を含まない、単離されたペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが、配列番号 1 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、N B S 1 のカルボキシ末端への A T M の結合を阻害する、請求項 1 または請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが、N B S 1 のカルボキシ末端の 4 ~ 30 個の連続するアミノ酸を含む、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記ポリペプチドが、N B S 1 (配列番号 1) のアミノ酸 734 ~ 744 を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記ポリペプチドが、N B S 1 のアミノ酸 734 ~ 754 内に保存的アミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 請求項 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

前記ポリペプチドが、配列番号 3 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 請求項 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記ポリペプチドが、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 5 、配列番号 6 、配列番号 7 、配列番号 8 、配列番号 9 、および配列番号 10 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 請求項 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

細胞内在化配列をさらに含む、請求項 1 ~ 請求項 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記細胞内在化が、ポリアルギニン、アンテナペディア、T A T 、H I V - T a t 、ペネトラチン (Penetratin) 、A n t p - 3 A (A n t p 変異体) 、ブフォリン I I (Buforin I I) 、トランスポータン (Transportan) 、M A P (両親媒性モデルペプチド) 、K - F G F 、K u 7 0 、ブリオン、p V E C 、P e p - 1 、S y n B 1 、P e p - 7 、H N - 1 、B G S C (B i s - グアニジニウム - スペルミジン - コレステロール) 、およびB G T C (B i s - グアニジニウム - T r e n - コレステロール) からなる群から選択されるタンパク質のアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

前記ポリペプチドが、配列番号 35 、配列番号 36 、配列番号 37 、配列番号 38 、配列番号 39 、配列番号 40 、配列番号 41 、および配列番号 42 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 請求項 10 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

腫瘍特異的ターゲティング配列をさらに含む、請求項 1 ~ 請求項 11 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

前記腫瘍特異的ターゲティング配列が、R G D モチーフ、N G R モチーフ、またはG S L モチーフを含む、請求項 12 に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

前記ポリペプチドが、配列番号 11 または配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を含む、

10

20

30

40

50

請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5】

請求項 1 のポリペプチドをコードする単離核酸。

【請求項 1 6】

コードされたポリペプチドが、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 5 、配列番号 6 、配列番号 7 、配列番号 8 、配列番号 9 、および配列番号 10 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 5 に記載の単離核酸。

【請求項 1 7】

配列番号 4 3 、配列番号 4 4 、配列番号 4 5 、配列番号 4 6 、配列番号 4 7 、配列番号 4 8 、配列番号 4 9 、および配列番号 5 0 の核酸を含む、請求項 1 6 に記載の単離核酸。

【請求項 1 8】

前記核酸が発現調節配列に作動可能に連結する、請求項 1 5 ~ 請求項 1 7 のいずれか 1 項に記載の単離核酸。

【請求項 1 9】

発現調節配列に作動可能に連結された、請求項 1 5 ~ 請求項 1 7 のいずれか 1 項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 2 0】

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項 1 9 に記載のベクター。

【請求項 2 1】

前記ベクターがアデノウイルスベクターである、請求項 2 0 に記載のベクター。

【請求項 2 2】

請求項 1 5 ~ 請求項 1 7 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む細胞。

【請求項 2 3】

請求項 1 9 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 2 4】

請求項 1 5 ~ 請求項 1 7 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む生物。

【請求項 2 5】

請求項 1 9 に記載のベクターを含む生物。

【請求項 2 6】

薬学的に許容可能なキャリア中に請求項 1 ~ 請求項 1 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む組成物。

【請求項 2 7】

薬学的に許容可能なキャリア中に請求項 1 5 ~ 請求項 1 7 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む組成物。

【請求項 2 8】

薬学的に許容可能なキャリア中に請求項 1 9 ~ 請求項 2 1 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む組成物。

【請求項 2 9】

放射線療法に対する組織の感受性を増加させる方法であつて、

a) N B S 1 の A T M との相互作用を阻害する組成物を組織に投与する工程、および

b) 前記組織に照射する工程

を含む、方法。

【請求項 3 0】

前記組織が良性腫瘍を含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記組織が癌を含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

被験体において癌を治療する方法であつて、

a) N B S 1 の A T M との相互作用を阻害する組成物を癌に投与する工程、および

b) 前記癌に照射する工程

10

20

30

40

50

を含む、方法。

【請求項 3 3】

放射線感受性薬を同定する方法であって、

a) N B S 1 および A T M ポリペプチドを含むサンプルを候補薬剤と接触させる工程、および

b) N B S 1 と A T M ポリペプチドとの間の相互作用を検出する工程を含み、

コントロールと比較した場合、前記 N B S 1 と A T M ポリペプチドとの間の相互作用の減少が、前記候補薬剤が放射線感受性であることを示す、方法。

【請求項 3 4】

前記 N B S 1 と A T M ポリペプチドとの間の相互作用を、蛍光偏光を使用して検出する 10
、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 N B S 1 または A T M ポリペプチドがフルオロフォアを含む、請求項 3 4 に記載の
方法。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 請求項 1 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをポジティブコントロール
として使用する、請求項 3 3 ~ 請求項 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

被験体の癌を治療する方法であって、

a) N B S 1 の A T M との相互作用を阻害する組成物を癌に投与する工程、および 20

b) 前記癌に抗新生物薬を投与する工程

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連する出願への相互参照)

本願は、2006年10月30日出願された米国仮特許出願第 60 / 863,457 号の利益を主張する。米国仮特許出願第 60 / 863,457 号は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【背景技術】

【0 0 0 2】

米国で新規に癌診断を受けた推定 130 万人の患者のうちの 2 / 3 が、最終的にその治療レジメンの一部としていくつかの放射線療法形態を受けている。放射線療法は、多数の癌、特に、転移していない局在性癌の最も重要且つ強力な治療の 1 つと考えられている。放射線療法によって治療される腫瘍のうち、ほんのわずかの腫瘍（リンパ腫およびセミノーマが含まれる）しか反応が高くない。しかし、多数の他の 固形腫瘍（黒色腫、膠芽細胞腫、および前立腺癌など）は、典型的には、照射に非常に高い耐性を示し、高線量の照射後でさえも進行する傾向がある。治療レジメンは、しばしば、放射線腫瘍医が正常組織の損傷（治療プロトコールにおける線量および照射数が制限される応答）を考慮する場合により複雑となる。治療の失敗の理由は、しばしば、複合的で多様である（Pawlik and Keyomarsi, 2004）。腫瘍要因（位置、サイズ、および不適切な血管供給（低酸素症））は全て、電離放射線（IR）に対する新生物の応答性の欠如で役割を果たし得る。おそらく、放射線感受性の調節に関連し、照射耐性細胞表現型となり得る細胞的および遺伝的要因（差分的組織特異的遺伝子発現など）が最も重要である。科学者は、長きに渡って IR に対する腫瘍細胞感受性を増大させるための種々の方法を開発してきている。これらには、低酸素性放射線増感剤、高濃度酸素、より最近では、放射線感受性に関する多数の遺伝的要因のターゲティングが含まれる（Choudhury, 2006）。しかし、分子生物学分野および生化学分野、癌遺伝学および分子放射線生物学において数十年に及び科学の飛躍的進歩が認められるにもかかわらず、有効且つ特異的な放射線増感剤の進歩は限定的である。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本発明の目的によれば、本明細書中に具体化され、広く記載されているように、本発明は、新規の放射線増感剤、その作製方法、および使用に関する。

【0004】

開示の方法および組成物のさらなる利点を、以下の説明で一部記載し、その説明から一部が理解されるか、開示の方法の実施および組成物によって確認する事ができる。開示の方法および組成物の利点は、添付の特許請求の範囲で特に指摘した要素および組み合わせによって理解および達成されるであろう。上記の一般的説明および以下の詳細な説明は共に例示および解説のみを目的とし、特許請求の範囲に記載の発明を制限しないと理解すべきである。

10

【0005】

添付の図面は、本明細書中に組み込まれ、その一部を構成し、開示の方法および組成物のいくつかの実施形態を例示し、その説明と共に、開示の方法および組成物の原理を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】図1は、NBS1阻害ペプチドの構築を示す。図1Aは、ATMおよびNBS1の機能ドメインおよびその相互作用の略図を示す。NBS1のC末端は、ATM活性化およびDNA損傷部位の補充に必要である。これは、少なくとも2つのアミノ酸残基組(736~737(EE)および741~743(DDL)からなり、これらは、進化的に保存されており、ATM結合に必要である。NBS1は、ATM中の2組のHeat反復(Heat反復2(a.a.248~522)およびHeat反復7(a.a.1436~1770)に結合する。図1Bは、構築されたR₉、wtNIP、およびscNIPペプチドのアミノ酸配列を示す。

20

【図2A】図2は、ペプチド内在化および細胞傷害性を示す。図2Aは、HeLa細胞を10μMのR₉、wtNIP、またはscNIPで1時間処理し、フルオレセイン抱合ストレプトアビジンでの染色後に免疫蛍光顕微鏡法によって分析したことを示す。図2Bは、HeLa細胞を表示用量のタキソールおよびNIPペプチドで処理したことを示す。処理の24時間後、細胞生存を、標準的なMTTアッセイによって定量した。

30

【図2B】図2は、ペプチド内在化および細胞傷害性を示す。図2Aは、HeLa細胞を10μMのR₉、wtNIP、またはscNIPで1時間処理し、フルオレセイン抱合ストレプトアビジンでの染色後に免疫蛍光顕微鏡法によって分析したことを示す。図2Bは、HeLa細胞を表示用量のタキソールおよびNIPペプチドで処理したことを示す。処理の24時間後、細胞生存を、標準的なMTTアッセイによって定量した。

30

【図3】図3は、wtNIPがNBS1-ATM結合を阻害することを示す。NIPペプチドで処理したHeLa細胞を照射した(0または6Gy)。ウサギNBS1抗体を使用して免疫沈降を行い、ATM、NBS1、またはMRE11に対するモノクローナル抗体を使用して、ウェスタンブロッティングを行った。

40

【図4A】図4は、wtNIPが-H2AXフォーカス形成を阻害することができることを示す。図4Aは、HeLa細胞を10μMのR₉、wtNIP、またはscNIPで1時間処理し、0または6Gyで照射し、30分後に回収し、その後に免疫蛍光顕微鏡法を使用して照射誘導-H2AXフォーカスを検出したことを示す。図4Bは、任意の単位で示した、Image Pro 5.1ソフトウェアを使用して各画像について決定した核あたりの平均-H2AX核フォーカスを示す。エラーバーは、+/-1SDを示し、グラフは3つの独立した実験の平均である。

【図4B】図4は、wtNIPが-H2AXフォーカス形成を阻害することができることを示す。図4Aは、HeLa細胞を10μMのR₉、wtNIP、またはscNIPで1時間処理し、0または6Gyで照射し、30分後に回収し、その後に免疫蛍光顕微鏡法

50

を使用して照射誘導 - H 2 A X フォーカスを検出したことを示す。図 4 B は、任意の単位で示した、Image Pro 5.1 ソフトウェアを使用して各画像について決定した核あたりの平均 - H 2 A X 核フォーカスを示す。エラーバーは、+ / - 1 SD を示し、グラフは 3 つの独立した実験の平均である。

【図 5 A】図 5 は、wt NIP ペプチドへの曝露によって IR 誘導性 NBS1 リン酸化が無効になることを示す。図 5 A は、HeLa 細胞を $10 \mu M$ の R₉、wt NIP、または scNIP で 1 時間処理し、0 または 6 Gy で照射し、120 分後に回収し、その後に抗 Ser 343 NBS1 抗体を使用した免疫蛍光顕微鏡法を使用して照射誘導 NBS1 フォーカス形成を検出したことを示す。図 4 B は、3 つの独立した実験における少なくとも 25 個の細胞集団から決定した核あたりの平均 NBS1 フォーカス数を示す。エラーバーは、+ / - 1 SD を示し、グラフは 3 つの独立した実験の平均である。
10

【図 5 B】図 5 は、wt NIP ペプチドへの曝露によって IR 誘導性 NBS1 リン酸化が無効になることを示す。図 5 A は、HeLa 細胞を $10 \mu M$ の R₉、wt NIP、または scNIP で 1 時間処理し、0 または 6 Gy で照射し、120 分後に回収し、その後に抗 Ser 343 NBS1 抗体を使用した免疫蛍光顕微鏡法を使用して照射誘導 NBS1 フォーカス形成を検出したことを示す。図 4 B は、3 つの独立した実験における少なくとも 25 個の細胞集団から決定した核あたりの平均 NBS1 フォーカス数を示す。エラーバーは、+ / - 1 SD を示し、グラフは 3 つの独立した実験の平均である。

【図 6 A】図 6 は、wt NIP が細胞放射線感受性を増大させることを示す。図 6 A は、細胞を限界希釈で播種し、 $10 \mu M$ の R₉、wt NIP、または scNIP で照射前に 1 時間処理し、24 時間ペプチドに曝露し続け、10 ~ 12 日後に回収し、クリスタルバイオレットで染色したことを示す。A (HeLa)、C (M059J)、および D (GM9607) には、表示の線量での照射後の生存曲線を示す。エラーバーは、+ / - 1 SEM を示し、グラフは 3 つの独立した実験の平均である。図 6 B は、HeLa 細胞における NIP 媒介性放射線感受性のクローニング原性アッセイの代表的なプレートを示す。
20

【図 6 B】図 6 は、wt NIP が細胞放射線感受性を増大させることを示す。図 6 A は、細胞を限界希釈で播種し、 $10 \mu M$ の R₉、wt NIP、または scNIP で照射前に 1 時間処理し、24 時間ペプチドに曝露し続け、10 ~ 12 日後に回収し、クリスタルバイオレットで染色したことを示す。A (HeLa)、C (M059J)、および D (GM9607) には、表示の線量での照射後の生存曲線を示す。エラーバーは、+ / - 1 SEM を示し、グラフは 3 つの独立した実験の平均である。図 6 B は、HeLa 細胞における NIP 媒介性放射線感受性のクローニング原性アッセイの代表的なプレートを示す。
30

【図 6 C】図 6 は、wt NIP が細胞放射線感受性を増大させることを示す。図 6 A は、細胞を限界希釈で播種し、 $10 \mu M$ の R₉、wt NIP、または scNIP で照射前に 1 時間処理し、24 時間ペプチドに曝露し続け、10 ~ 12 日後に回収し、クリスタルバイオレットで染色したことを示す。A (HeLa)、C (M059J)、および D (GM9607) には、表示の線量での照射後の生存曲線を示す。エラーバーは、+ / - 1 SEM を示し、グラフは 3 つの独立した実験の平均である。図 6 B は、HeLa 細胞における NIP 媒介性放射線感受性のクローニング原性アッセイの代表的なプレートを示す。

【図 6 D】図 6 は、wt NIP が細胞放射線感受性を増大させることを示す。図 6 A は、細胞を限界希釈で播種し、 $10 \mu M$ の R₉、wt NIP、または scNIP で照射前に 1 時間処理し、24 時間ペプチドに曝露し続け、10 ~ 12 日後に回収し、クリスタルバイオレットで染色したことを示す。A (HeLa)、C (M059J)、および D (GM9607) には、表示の線量での照射後の生存曲線を示す。エラーバーは、+ / - 1 SEM を示し、グラフは 3 つの独立した実験の平均である。図 6 B は、HeLa 細胞における NIP 媒介性放射線感受性のクローニング原性アッセイの代表的なプレートを示す。
40

【図 7】図 7 は、R₉、wt NIP、または scNIP ペプチドの分解を示す。HeLa 細胞を、 $10 \mu M$ の R₉、wt NIP、または scNIP で 1 時間処理し、表示の時点で回収し、その後に、抗ストレプトアビジン抗体で染色して免疫蛍光顕微鏡法によって分析した。
50

【図 8 A】図 8 は、wtNIP が前立腺癌細胞株 DU - 145 における -H2AX フォーカス形成を阻害することを示す。図 8 A は、DU - 145 細胞を 10 μM の R₉、wtNIP、または scNIP で 1 時間処理し、0 または 6 Gy で照射し、30 分後に回収し、その後に免疫蛍光顕微鏡法を使用して照射誘導性 -H2AX フォーカスを検出したことを示す。図 8 B は、Image Pro 5.1 ソフトウェアを使用して各画像について決定し、任意の単位で示した核あたりの平均 -H2AX 核フォーカスを示す。エラーバーは、+/-1SD を示し、グラフは 3 つの独立した実験の平均である。

【図 8 B】図 8 は、wtNIP が前立腺癌細胞株 DU - 145 における -H2AX フォーカス形成を阻害することを示す。図 8 A は、DU - 145 細胞を 10 μM の R₉、wtNIP、または scNIP で 1 時間処理し、0 または 6 Gy で照射し、30 分後に回収し、その後に免疫蛍光顕微鏡法を使用して照射誘導性 -H2AX フォーカスを検出したことを示す。図 8 B は、Image Pro 5.1 ソフトウェアを使用して各画像について決定し、任意の単位で示した核あたりの平均 -H2AX 核フォーカスを示す。エラーバーは、+/-1SD を示し、グラフは 3 つの独立した実験の平均である。

【図 9 A】図 9 は、wtNIP ペプチドへの暴露が、前立腺癌細胞株 DU - 145 における IR 誘導性 NBS1 リン酸化を無効にすることを示す。図 9 A は、DU - 145 細胞を 10 μM の R₉、wtNIP、または scNIP で 1 時間処理し、0 または 6 Gy で照射し、120 分後に回収し、その後に抗 Ser 343 NBS1 抗体を使用した免疫蛍光顕微鏡法を使用して照射誘導 NBS1 フォーカス形成を検出したことを示す。図 9 B は、3 つの独立した実験における少なくとも 25 個の細胞集団から決定した核あたりの平均 NBS1 フォーカス数を示す。エラーバーは、+/-1SD を示し、グラフは 3 つの独立した実験の平均である。

【図 9 B】図 9 は、wtNIP ペプチドへの暴露が、前立腺癌細胞株 DU - 145 における IR 誘導性 NBS1 リン酸化を無効にすることを示す。図 9 A は、DU - 145 細胞を 10 μM の R₉、wtNIP、または scNIP で 1 時間処理し、0 または 6 Gy で照射し、120 分後に回収し、その後に抗 Ser 343 NBS1 抗体を使用した免疫蛍光顕微鏡法を使用して照射誘導 NBS1 フォーカス形成を検出したことを示す。図 9 B は、3 つの独立した実験における少なくとも 25 個の細胞集団から決定した核あたりの平均 NBS1 フォーカス数を示す。エラーバーは、+/-1SD を示し、グラフは 3 つの独立した実験の平均である。

【図 10】図 10 は、結合したか遊離のテキサスレッド標識 NBS1 ペプチドを使用した蛍光偏光を示す。

【発明を実施するための形態】

【0007】

詳細な説明

開示の方法および組成物を、以下の本明細書中に含まれる特定の実施形態および実施例の詳細な説明ならびに図面およびその上記および下記の説明を参照することによってより容易に理解することができる。

【0008】

開示の方法および組成物のために使用することができるか、これらと併せて使用することができるか、その調製で使用することができるか、その製品である材料、組成物、および成分を開示する。これらおよび他の材料を本明細書中に開示し、これらの材料の組み合わせ、小集団、相互作用、群などを開示する場合、これらの化合物の種々の個別および集合的な組み合わせおよび置換の特定の言及を明確に開示しないかもしれないが、それぞれ本明細書中で特に意図および記載されると理解される。例えば、ペプチドを開示および考察し、多数の分子（ペプチドが含まれる）に合わせて作製することができる多数の修正形態を考察する場合、特に別の記載がない限り、可能なペプチドのありとあらゆる組み合わせおよび置換ならびに修正形態を特に意図する。したがって、分子クラス A、B、および C を分子クラス D、E、および F と同様に開示する場合、分子 A - D の組み合わせ例が開示され、それぞれが個別に引用されない場合でさえも、それぞれ個別および集合的である

10

20

30

40

50

ことが意図される。したがって、この例では、各組み合わせ A - E、A - F、B - D、B - E、B - F、C - D、C - E、および C - F は特に意図され、A、B、および C ; D、E、および F ; ならびに例示的組み合わせ A - D の開示からこれらが開示されると見なすべきである。同様に、これらの任意の小集団または組み合わせも特に意図および開示される。したがって、例えば、小集団 A - E、B - F、および C - E が特に意図され、A、B、および C ; D、E、および F ; ならびに例示的組み合わせ A - D から開示されると見なすべきである。この概念を、本出願の全ての態様（開示の組成物の作製方法および使用方法における工程が含まれるが、これらに限定されない）に適用する。したがって、実施することができる多数のさらなる工程が存在する場合、これらのさらなる各工程を開示の方法の任意の特定の実施形態または実施形態の組み合わせを使用して実施することができ、それぞれのかかる組み合わせが特に意図され、開示されると見なすべきであると理解される。

10

【0009】

開示の方法および組成物が記載の特定の方法、プロトコール、および試薬に制限されず、これらは変化し得ると理解される。本明細書中で使用した専門用語は特定の実施形態の説明のみを目的とし、本発明の範囲を制限することを意図せず、該範囲は、添付の特許請求の範囲にのみ制限されるとも理解される。

20

【0010】

開示の方法および組成物を、以下の本明細書中に含まれる特定の実施形態および実施例の詳細な説明ならびに図面および上記および下記のその説明を参照することによってより容易に理解することができる。

20

A. 組成物

1. ATM 媒介性 DNA 損傷応答

放射線療法および化学療法に対する細胞（癌細胞など）の感受性を増加させるための ATM の活性化を阻害するための組成物および方法を本明細書中に開示する。放射線療法はまた、非悪性容態（三叉神経痛、重症甲状腺眼症（severe thyroid eye disease）、翼状片）の治療、瘢痕ケロイド成長の防止、および異所性骨化の防止）で適用される。

30

【0011】

現代の分子放射線腫瘍学では、生物学的ターゲティングには、細胞増殖、DNA 修復、および細胞死に関連する細胞応答機構の深い理解が必要である。照射（IR）誘導性 DNA 損傷に対する細胞応答が簡潔に組織化されたシグナル伝達ネットワークによって調節されることが周知である。このネットワークは、多数の遺伝子産物（センサー、トランスデューサー、およびエフェクターが含まれる）から構成される。DNA 二本鎖切断（DSB）を、形質導入キナーゼの活性化を誘発するセンサー分子によって検出する。次いで、これらのトランスデューサーは、エフェクター分子をリン酸化してシグナル伝達カスケードを調製し、それにより、細胞周期チェックポイントを調節するか、DNA 修復機構に影響を及ぼすか、アポトーシス経路を誘発する。ネットワーク中の 1 つの中心的要素は、ATM タンパク質であり、その変異は、毛細管拡張性失調症（A-T）と命名されたヒト常染色体劣性疾患に寄与する（Shiloh, 2003）。A-T は、進行性神経変性、一般免疫不全（variable immunodeficiency）、リンパ性悪性疾患の発症に対する極めて高い素因、および IR に対する過敏症によって特徴づけられる。A-T 患者由来の細胞は、種々の異常（細胞周期チェックポイントの欠損、染色体不安定性、および過敏な IR 応答が含まれる）を示す。疾患を担う遺伝子は、1995 年にクローンングされており、毛細管拡張性失調症変異（ATM）と呼ばれている（Savitskyら, 1995）。ATM 遺伝子は、その巨大なサイズおよび P1-3 キナーゼに類似するそのカルボキシル末端中の配列の存在が顕著である。遺伝子ファミリー（酵母における Tel1、Mec1、および Rad3、ショウジョウバエにおける Mei-41、ならびに脊椎動物における ATR および DNA-PK）は、サイズおよびカルボキシル末端キナーゼ配列が類似しており、これらは全て DNA 損傷応答の調節に関与する（Abraha

40

50

m, 2001)。ATM遺伝子は、370-KDタンパク質キナーゼをコードし、上記PI3キナーゼで保存されており、タンパク質-タンパク質相互作用ドメインとして機能することができるいくつかの機能ドメイン(FATドメインが含まれる)からなる。キナーゼドメインは、セリン/トレオニンをリン酸化し、その後にグルタミン(S/T-Qコンセンサス配列)をリン酸化することができ、FATカルボキシ末端ドメイン(FATC)はタンパク質の活性および安定性を調節することができる。以前の研究により、DNA損傷後、セリン1981(FATドメイン内のセリン部位の1つ)上のATMの細胞間自己リン酸化がATMの不活性二量体を活性単量体に解離することが証明された(Bakkenist and Kastan, 2003)。しかし、マウス研究により、Ser1987(マウスで保存されるセリン残基)でセリンがアラニンに変異したATMはATM媒介性DNA損傷応答の修復に関して完全に機能的であることが明らかとなった(Pellegrini et al., 2006)。したがって、ATM活性化におけるSer1981の自己リン酸化の役割が除外された。

【0012】

ATM活性化のための他のモデルは、ATM活性化がNBS1およびMre11の非存在下で減少し、その両方がRad50と複合体(いわゆるMRN複合体)を形成するという事実に基づく。MRN複合体は高度に保存されており、各染色体切断機構局面に影響を及ぼし、鎖切断を検出するためのDNA損傷センサーと見なされる(Difilippantonio et al., 2005; Dupre et al., 2006)。NBS1の保存されたC末端モチーフは、ATMのいくつかのHeat反復に結合する(キナーゼを活性化するために不可欠な相互作用)(Falk et al., 2005)。研究により、MRN複合体がDNA二本鎖切断を検出し、ATMを損傷DNA分子に補充することが示されている(Lee and Paul, 2004; Lee and Paul, 2005; Difilippantonio et al., 2005)。活性化ATMは多数の下流標的をリン酸化して、最適な細胞応答を容易にすることができます。最近の10年間にわたり、DNA損傷に対する最適な細胞応答に不可欠な多数のタンパク質がATM酵素基質として認識されている。この継続的に成長するATM基質リストの好例は、ATMによってE3ユビキチンリガーゼCOP1をリン酸化することができ、その後の機能がDNA損傷に応答してp53を安定化することであるという最新の所見である(Dornan et al., 2006)。

【0013】

ATMが照射に対する細胞応答の中心となるので、その活性化または活性の遮断によって事実上任意の腫瘍型で照射に対する感受性をさらに高めることができます。1995年の遺伝子クローニング以来、多数の研究者がATMをターゲティングするためにいくつかの方法を使用している。これらの方法には、アンチセンスRNA、小さな干渉RNA(siRNA)、およびATMの小分子インヒビターのスクリーニングが含まれる。Zhangらは、CB3AR細胞に反対方向でATMの全長cDNAを首尾よくサブクローニングし、放射線感受性を有意に増加させることを示した。アンチセンス構築物により、照射感受性が約3倍になり、これはA-T細胞に類似する。トランスフェクトした細胞における染色体切断数および見かけの照射耐性DNA合成数が増加した(Zhang et al., 1998)。さらに、膠芽細胞腫細胞および前立腺癌細胞におけるアンチセンスATMによって付与された放射線感受性は、非トランスフェクション細胞の4倍であることが示されている(Guh et al., 2000; Fan et al., 2000)。

【0014】

最近のsiRNAの開発により、前立腺癌細胞中でATM機能を阻害することができるsiRNAが生成された。Collinsらは、ヒト癌細胞中でATMをターゲティングするsiRNAをコードする外因性プラスミドをデザインし、供給した。DU-145細胞およびPC-3細胞の両方は、これらのプラスミドでトランスフェクトした場合、臨床的に関連する放射線量で放射線感受性の増加を示した(Collins et al., 2003)。最近になって、ATM特異的siRNAでのHeLa細胞の安定なトランスフェクションにより、電離放射線に対する感受性が10倍になった。p53欠損細胞におけるATMサイレ

10

20

30

40

50

ンシングによって細胞サイクルチェックポイントに妥協し、ドキソルビシンと組み合わせた場合、化学的感受性が3.1倍に増大したことも示されている(Mukhopadhyayら, 2005)。siRNAがin vivoで有望な結果を示したが、臨床研究への移行は緩やかであった。

【0015】

DNA-PKインヒビターLY294002周辺の化合物の組み合わせライブラリーのスクリーニングにより、Hicksらは化合物(KU55933)がATMキナーゼを選択的に阻害することを報告した。その研究は、HeLa細胞における放射線感受性の有意な増加を示し、その増加がエトボシドに対する感受性の35.5倍ほどになることを示した(Hicksら, 2004)。しかし、化合物のin vivo放射線増感効果および毒性は報告されていない。上記で引用した方法の適用におけるいくつかの障害が存在し、以下が含まれる：1) 遺伝子のサイズが巨大であるので、臨床的状況におけるアンチセンスストラテジーまたはsiRNA技術によるATM遺伝子の遺伝子操作が面倒であること、2) これらの方法が腫瘍特異的ターゲティングを保証しておらず、それにより、治療指数の増加が不確定であること、および3) より重要には、遺伝子変異の多面発現効果により、直接ターゲティングしたATMキナーゼ活性の結果が複雑になり得、これらの試薬のみの効果によって放射線増感が付与されているかどうか不明であること。

10

2. 小阻害ペプチド

NBS1-ATM相互作用がATMのIR誘導性活性化および放射線感受性の制限に重要であるので、シグナル伝達経路を選択的に破壊する放射線増感剤の開発アプローチを本明細書中に開示する。1つの提供した方法は、NBS1-ATM相互作用を遮断するための非機能性小ペプチドの使用である。例えば、野生型C末端NBS1配列を含む小ペプチドは、NBS1-ATM相互作用およびATM活性化を阻害することができる。同様に、ATMのheat反復配列を含む小ペプチドはNBS1-ATM相互作用およびATM活性化を阻害することができる。

20

【0016】

用語「ペプチド」および「ポリペプチド」は、本明細書中で、2つ以上のアミノ酸のポリマーをいう同義語として使用し、特定の長さまたは作製方法を示すことを意味しない。

【0017】

したがって、NBS1のカルボキシ末端アミノ酸配列またはその保存的変異体(本明細書中でNIPともいう)を含む単離ポリペプチドを本明細書中に提供する。例えば、提供したペプチドは、配列番号1のアミノ酸734~754を含むことができる。提供したペプチドは、NBS1(配列番号1)のC末端のほとんどの4~30アミノ酸(アミノ酸734~754が含まれる)内に保存的アミノ酸置換を含むことができる。この文脈では、ペプチドは、1、2、または3個の保存的アミノ酸置換を含むことができる。いくつかの態様では、ペプチドは、アミノ酸配列×EExxxDDLx(xは任意のアミノ酸である)(配列番号55)を含む。

30

【0018】

ペプチドは、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、または配列番号10と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

40

【0019】

ATMのNBS1結合配列またはその保存的変異体を含む単離ポリペプチドも本明細書中に提供する。例えば、ポリペプチドは、NBS1に結合するATMのheat反復配列またはそのフラグメントを含むことができる。例えば、提供したポリペプチドは、配列番号56を含むことができる。提供したポリペプチドは、配列番号57を含むことができる。ポリペプチドは、NBS1に結合する配列番号56と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列またはそのフラグメントを含むことができる。ポリペプチドは、N

50

S 1 に結合する配列番号 5 7 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列またはそのフラグメントを含むことができる。

【 0 0 2 0 】

本明細書中で開示される場合、提供したポリペプチドは、N B S 1 のカルボキシ末端へのA T Mの結合を阻害することができる。同様に、本明細書中で開示される場合、提供したポリペプチドは、放射線療法および化学療法に対する細胞（癌細胞など）の感受性を増大させることができる。したがって、1つの態様では、本明細書中に提供した単離ポリペプチドは、被験体への投与に適切な薬学的組成物中に存在する。

【 0 0 2 1 】

1つの態様では、本明細書中に提供したポリペプチドは、N B S 1 のカルボキシ末端のほとんどのアミノ酸を含む任意のポリペプチドであり得るが、ペプチドは全長N B S 1 ではない。したがって、提供したポリペプチドは、N B S 1 のC末端のほとんどの4 ~ 3 0 アミノ酸（N B S 1 のC末端のほとんどの4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0 個のアミノ酸またはそのフラグメントが含まれる）を含むことができる。例えば、提供したポリペプチドは、N B S 1（配列番号1）のアミノ酸7 3 4 ~ 7 5 4 を含むことができる。提供したポリペプチドは、N B S 1（配列番号1）のC末端のほとんどの4 ~ 3 0 アミノ酸（アミノ酸7 3 4 ~ 7 5 4 が含まれる）内に保存的アミノ酸置換を含むことができる。この文脈では、ペプチドは、1、2、または3個の保存的アミノ酸置換を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、および配列番号1 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、または配列番号1 0 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、または配列番号1 0 と少なくとも 9 6 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、または配列番号1 0 と少なくとも 9 7 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、または配列番号1 0 と少なくとも 9 8 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、または配列番号1 0 と少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

【 0 0 2 2 】

別の態様では、ポリペプチドは、例えば、C末端のほとんどの1、2、3、4、5、6、7、8、9、または1 0 個のアミノ酸を含まない。したがって、ペプチドは、N B S 1 のアミノ酸7 3 4 ~ 7 5 3、7 3 4 ~ 7 5 2、7 3 4 ~ 7 5 1、7 3 4 ~ 7 5 0、7 3 4 ~ 7 4 9、7 3 4 ~ 7 4 8、7 3 4 ~ 7 4 7、7 3 4 ~ 7 4 6、7 3 4 ~ 7 4 5、7 3 4 ~ 7 4 4 を含むことができる。したがって、ペプチドは、いくつかの態様では、N B S 1 のアミノ酸7 5 4、7 5 3、7 5 2、7 5 1、7 5 0、7 4 9、7 4 8、7 4 7、7 4 6、7 4 5 を含まない。

【 0 0 2 3 】

N B S 1 のC末端は、A T M活性化およびD N A損傷部位の補充に必要である。これは、少なくとも2つのアミノ酸残基組（7 3 6 ~ 7 3 7（E E）および7 4 1 ~ 7 4 3（D D L）からなり、これらは、進化的に保存されており、A T M結合に必要である。したがって、N B S 1 は、アミノ酸配列×E E × × × D D L ×（×は任意のアミノ酸配列である）（配列番号5 5）を含むことができる。

【 0 0 2 4 】

さらなる態様では、本明細書中に提供したポリペプチドは、A T MのN B S 1 結合ドメ

10

20

30

40

50

インを含む任意のポリペプチドであり得るが、ペプチドは全長 A T M ではない。したがって、本明細書中に提供したポリペプチドは、A T M の H e a t 反復 2 および / または 7 を含む任意のポリペプチドであり得る。したがって、本明細書中に提供したポリペプチドは、配列番号 5 1 に開示の A T M 配列のアミノ酸 2 4 8 ~ 5 2 2 を含む任意のポリペプチドであり得る。したがって、本明細書中に提供したポリペプチドは、配列番号 5 6 のアミノ酸を含む任意のポリペプチドであり得る。したがって、本明細書中に提供したポリペプチドは、A T M (配列番号 5 1) のアミノ酸 1 4 3 6 ~ 1 7 7 0 を含む任意のポリペプチドであり得る。したがって、本明細書中に提供したポリペプチドは、配列番号 5 7 のアミノ酸を含む任意のポリペプチドであり得る。提供したポリペプチドは、A T M の H e a t 反復 2 および / または 7 内に保存的アミノ酸置換を含むことができる。この文脈では、ペプチドは、1、2、または 3 個の保存的アミノ酸置換を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号 5 6 または配列番号 5 7 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号 5 6 または配列番号 5 7 と少なくとも 9 6 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号 5 6 または配列番号 5 7 と少なくとも 9 7 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号 5 6 または配列番号 5 7 と少なくとも 9 8 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号 5 6 または配列番号 5 7 と少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

10

20

30

40

【0025】

提供したポリペプチドは、融合タンパク質をさらに構成することができるか、そうでなければ、さらなる N 末端、C 末端、または中間のアミノ酸配列（例えば、リンカーまたはタグ）を有することができる。本明細書中で使用される場合、「リンカー」は、2 つの異なるポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントを連結または分離するために使用することができるアミノ酸配列または挿入物であり、そのほかの点では、リンカーは組成物の不可欠な機能に寄与しない。本明細書中に提供したポリペプチドは、例えば、アミノ酸 G L S、A L S、または L L A を含むアミノ酸リンカーを有することができる。本明細書中で使用される場合、「タグ」は、提供したポリペプチドを検出または精製するために使用することができる個別のアミノ酸配列をいい、そのほかの点では、タグは組成物の不可欠の機能に寄与しない。提供したポリペプチドは、さらに、ポリペプチドの不可欠な活性に寄与しない N 末端、C 末端、または中間のアミノ酸を欠失することができる。

30

3. 融合タンパク質

本明細書中に開示のポリペプチドは、融合タンパク質であり得る。キメラタンパク質としても公知の融合タンパク質は、本来は個別のタンパク質をコードした 2 つ以上の遺伝子の連結によって作製されたタンパク質である。この融合遺伝子の翻訳により、それぞれの元のタンパク質に由来する機能性を有する単一のポリペプチドが得られる。組換え融合タンパク質を、生物学的調査または治療で使用する組換え D N A テクノロジーによって人工的に作製することができる。大規模変異（典型的には、染色体転座）によって 2 つの異なる遺伝子由来のコード配列の一部を含む新規のコード配列が作製される場合にキメラ変異タンパク質が天然に生じる。

【0026】

融合タンパク質の機能性は、多数のタンパク質機能ドメインがモジュラーであるという事実によって可能になる。言い換えれば、所与のドメイン（チロシンキナーゼドメインなど）に対応するポリペプチドの線状部分をその本来の酵素能力を破壊することなく残りのタンパク質から除去することができる。したがって、任意の本明細書中に開示の機能ドメインを使用して、融合タンパク質をデザインすることができる。

【0027】

組換え融合タンパク質は、融合遺伝子の遺伝子操作によって作製されたタンパク質である。これは、典型的には、第 1 のタンパク質をコードする c D N A 配列から終止コドンを除去し、その後にライゲーションまたは重複伸長 P C R によって第 2 のタンパク質の c D

50

N A配列をインフレームで付加することを含む。次いで、そのD N A配列を、単一のタンパク質として細胞によって発現する。タンパク質を、両方の元のタンパク質の全長またはいずれかの一部のみを含むように操作することができる。

【0028】

2つの物質(*entitles*)がタンパク質である場合、しばしばリンカー(また「スペーサー」)ペプチドも添加し、それにより、タンパク質が独立して折り畳まれて予想通りに挙動する可能性がより高くなる。特にリンカーがタンパク質を精製することができる場合、タンパク質またはペプチド融合物中のリンカーを、時折、2つの個別のタンパク質を遊離することができるプロテアーゼまたは化学物質の切断部位で操作する。この技術を、しばしば、ニッケル樹脂またはコバルト樹脂(アフィニティクロマトグラフィ)を使用して単離することができるGSTタンパク質、FLAGペプチド、またはヘキサ-hisペプチド(*aka*: 6xhis-タグ)の融合によるタンパク質の同定および精製のために使用する。疾患の発症を研究するためのキメラタンパク質を、毒素または毒素に結合した抗体を使用して製造することもできる。

10

【0029】

あるいは、配列内リボゾーム進入部位(IRES)エレメントを使用して、多重遺伝子、すなわち多シストロン性のメッセージを作製することができる。IRESエレメントは、5'メチル化Cap依存性翻訳のリボゾームスキャニングモデルを迂回して、内部部位での翻訳を開始することができる(Pelletier and Sonenberg, 1988)。ピコルナウイルスファミリーの2つのメンバー(ポリオおよび脳心筋炎)由来のIRESエレメントが記載されており(Pelletier and Sonenberg, 1988)、哺乳動物メッセージ由来のIRESも記載されている(Macejak and Sarnow, 1991)。IRESエレメントを、異種読み取り枠に連結することができる。それぞれIRESによって分離される複数の読み取り枠を共に転写して、多シストロン性メッセージを作製することができる。IRESエレメントによって、各読み取り枠は、有効な翻訳のためにリボゾームに接近可能である。1つのメッセージを転写するための1つのプロモーター/エンハンサーを使用して、複数の遺伝子を効率的に発現することができる(米国特許第5,925,565号および同第5,935,819号; PCT/US99/05781号)。IRES配列は当該分野で公知であり、脳心筋炎ウイルス(EMCV)(Ghattas, I.R.ら, Mol. Cell. Biol., 11:5848-5849(1991); BiPタンパク質(Macejak and Sarnow, Nature, 353:91(1991));ショウジョウバエのアンテナペディア遺伝子(エクソンdおよびe)(Ohら, Genes & Development, 6:1643-1653(1992));ポリオウイルス(Pelletier and Sonenberg, Nature, 334:320325(1988))(Mountford and Smith, TIG, 11:179-184(1985)も参照のこと)に由来するIRES配列が含まれる。

20

30

30

4. 内在化配列

細胞に有效地に侵入するために、NBS1ペプチドを内在化配列またはタンパク質形質導入ドメインに連結することができる。最近の研究により、いくつかの細胞貫通ペプチド(HIVウイルスのTATトランス活性化ドメイン、アンテナペディア、および原形質膜を介して分子および小ペプチドを容易に輸送することができるトランスポータン(transportan)が含まれる)が同定されている(Schwarzeら, 1999; Derossiら, 1996; Yuanら, 2002)。より最近では、ポリアルギニンは原形質膜を介したペプチドおよびタンパク質の輸送をさらにより効率的にすることが示されており、このことがポリアルギニンをペプチド媒介性輸送のための魅力的なツールにしている(Fuchs and Raines, 2004)。ノナルギニン(R₉、配列番号18)は、最も効率的なポリアルギニンベースのタンパク質形質導入ドメインの1つといわれており、その最大取り込みはTATまたはアンテナペディアよりも有意に高い。ポリアルギニンベースの内在化配列の使用によるペプチド媒介性細胞傷害性がより低いこと

40

50

も示されている。R₉媒介性膜輸送は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合およびエンドサイトーシスパッケージング(endocytic packaging)によって容易になる。一旦内在化すると、ヘパランをヘパラナーゼによって分解してR₉を放出し、これが細胞質に漏出する(Deshayesら, 2005)。研究により、最近、ポリアルギニン誘導体が全長p53タンパク質を口腔癌細胞に輸送し、その成長および転移を抑制することが示されている。それにより、ポリアルギニンは強力な細胞貫通ペプチドと考えられている(Takenobuら, 2002)。

【0030】

したがって、提供したポリペプチドは、細胞内在化輸送体または細胞内在化配列を含むことができる。細胞内在化配列は、当該分野で公知であるか新規に発見された任意の内在化配列またはその保存的変異体であり得る。細胞内在化輸送体および細胞内在化配列の制限されない例には、ポリアルギニン(例えば、R₉)、アンテナペディア配列、TAT、HIV-Tat、ペネトラチン(Penetration)、Antp-3A(Antp変異体)、ブホリンII(ブホリンII)、トランスポータン、MAP(両親媒性モデルペプチド)、K-FGF、Ku70、プリオン、pVEC、Pep-1、SynB1、Pep-7、HN-1、BGSC(ビス-グアニジニウム-スペルミジン-コレステロール、およびBGTC(ビス-グアニジニウム-Tren-コレステロール)が含まれる(表1を参照のこと)。

10

【0031】

【表1-1】

20

表1. 細胞内在化輸送体

名称	配列	配列番号
ポリアルギニン	RRRRRRRRR	配列番号 18
Antp	RQPKIWFPNRRKPKWKK	配列番号 19
HIV-Tat	<u>GRKKRRQRPPQ</u>	配列番号 20
ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK	配列番号 21
Antp-3A	RQIAIWFQNRRMKWAA	配列番号 22
Tat	RKKRRQRRR	配列番号 23
ブホリンII	TRSSRAGLQFPVGRVHRLRK	配列番号 24
トランスポータン	GWTLNSAGYLLGKINKALAALA KKIL	配列番号 25
両親媒性モデル ペプチド(MAP)	KLALKLALKALKAAALKLA	配列番号 26
K-FGF	AAVALLPAVLLALLAP	配列番号 27
Ku70	VPMLK- PMLKE	配列番号 28

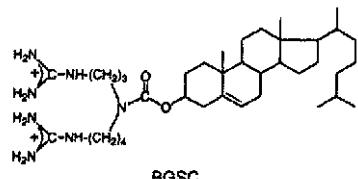
30

【0032】

【表1-2】

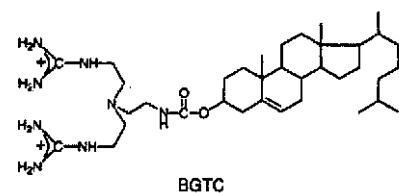
プリオン	MANLGYWLLALFVTMWTDVGL CKKRPKP	配列番号 29
pVEC	LLIILRRRIRKQAHAAHSK	配列番号 30
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	配列番号 31
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	配列番号 32
Pep-7	SDLWEMMMVSLACQY	配列番号 33
HN-1	TSPLNIHNGQKL	配列番号 34

BGSC(ビスーグアニジニウム-スペルミジン-コレステロール)



10

BGTC(ビスーグアニジニウム-Tren-コレステロール)



20

したがって、提供したポリペプチドは、アミノ酸配列

【0033】

【化1】

配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22,

配列番号23, 配列番号24, 配列番号25, 配列番号26, 配列番号27, 配列番号28,

配列番号29, 配列番号30, 配列番号31, 配列番号32, 配列番号33, または

配列番号34.

30

をさらに含むことができる。Buccici, M. ら2000. Nat. Med. 6, 1362-1367; Derossi, D. ら1994. Biol. Chem. 269, 10444-10450; Fischer, P. M. ら2000. J. Pept. Res. 55, 163-172; Frankel, A. D. & Pabo, C. O. 1988. Cell 55, 1189-1193; Green, M. & Loewenstein, P. M. 1988. Cell 55, 1179-1188; Park, C. B. ら2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8245-8250; Pooga, M. ら、1998. FASEB J. 12, 67-77; Oehlke, J. ら1998. Biophys. Acta. 1414, 127-139; Lin, Y. Z. ら1995. J. Biol. Chem. 270, 14255-14258; Sawada, M. ら2003. Nature Cell Biol. 5, 352-357; Lundberg, P. ら2002. Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90; Elmquist, A. ら2001. Exp. Cell Res. 269, 237-244; Morris, M. C ら2001. Nature Biotechnol. 19, 1173-1176; Rousselille, C. ら2000. Mol. Pharmacol. 57, 679-686; Gao, C. ら2002. Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-4065; Hong, F. D. & Clayman, G. L. 2000. Cancer Res. 60, 6551-6556)を

40

50

参照のこと。提供したポリペプチドは、さらに、B G S C (ビス - グアニジニウム - スペルミジン - コレステロール) または B G T C (ビス - グアニジニウム - Tren - コレステロール) を含むことができる (Vignerion, J. P. ら 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 9682 - 9686)。前記引例は、細胞内在化ベクターおよび細胞内在化配列の教示についてその全体が本明細書中で参照により援用される。現在公知であるか、その後に同定される任意の他の内在化配列を、本発明のペプチドと組み合わせることができる。

【0034】

例えば、ポリペプチドは、NBS1 のカルボキシ末端のほとんどのアミノ酸およびポリアルギニン内在化配列を含むことができる。したがって、例えば、ポリペプチドは、アミノ酸配列である配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、または配列番号 42 を含むことができる。

10

20

30

40

5. 腫瘍特異的ターゲティング

好みしい放射線増感剤は、腫瘍細胞のみを感受性にし、正常細胞を容赦する。これを達成するための 1 つのアプローチは、内在化および腫瘍特異的ターゲティング能力の両方を有するポリペプチド (例えば、修飾タンパク質または融合タンパク質) を使用することである。腫瘍脈管構造が周辺の正常組織の脈管構造と異なるので、形態学および生化学の両方において、この相違は、腫瘍進行の重要な決定要因および新規の抗癌療法のための強力な標的として近年注目を集めている。生化学的に、腫瘍血管は、多数の血管形成関連分子 (一定のインテグリン、内皮細胞成長因子受容体、プロテアーゼ、細胞表面プロテオグリカン、および細胞外基質成分など) の発現によって腫瘍血管自体を残りの血管と区別する (Ruoslathi, 2000)。マウスに注射した場合に腫瘍脈管構造にホーミングする (home) ペプチドのファージディスプレイライブリーの *in vivo* スクリーニングにより、腫瘍ホーミングのためのいくつかのモチーフが示唆されている。これらには、環状ペプチド C D C R G D C F C (配列番号 12) 中の R G D および環状腫瘍ホーミングペプチド C N G R C (配列番号 11) 中の N G R が含まれる。N G R 含有ペプチドは、細胞傷害性薬剤、アポトーシス促進性ペプチド、および腫瘍壞死因子 の腫瘍脈管構造への送達に有用であることが証明されている (Ellerby ら, 1999; Arap ら, 1998; Arap ら, 2002; Curnis ら, 2002)。第 3 のモチーフ G S L も、種々の腫瘍型を使用したスクリーニングで頻繁に単離された (Arap ら, 1998)。R G D、N G R、および G S L モチーフペプチドを保有するファージの腫瘍ホーミングは、腫瘍型と無関係であり (Arap ら, 1998; Pasqualini ら, 2000; Pasqualini ら, 1997)、むしろ、ホーミングは腫瘍脈管構造の血管形成特性に依存する。N G R 腫瘍ホーミングペプチドの受容体はインテグリンではない。その代わりに、腫瘍脈管構造中の N G R モチーフペプチドの受容体としてアミノペプチダーゼ N (APN または C D 13) が同定されている (Pasqualini ら, 2000)。N G R 含有ペプチドは、細胞傷害性薬剤、アポトーシス促進性ペプチド、および腫瘍壞死因子 の腫瘍脈管構造への送達に有用であることが証明されている (Ellerby ら, 1999; Arap ら, 1998; Arap ら, 2002; Curnis ら, 2002)。より興味深いことに、N G R ペプチドは原発性および転移性の前立腺腫瘍に結合することができるが、正常な前立腺組織に結合しないことが示されている (Pasqualini ら, 2000)。N G R ペプチドはまた、細胞質内在化能力を示す (Arap ら, 1998)。

【0035】

特定の組織をターゲティングすることができる任意の分子を、(例えば、NIP を含む融合タンパク質中の) 本発明のポリペプチドのターゲティング分子として使用することができる。例えば、ターゲティング分子は、ヒト上皮細胞ムチン (Muc-1; 乳癌細胞および膵臓癌細胞上に存在する Muc-1 糖タンパク質の 20 アミノ酸コア反復)、Harras 癌遺伝子産物、p53、癌胎児性抗原 (CEA)、raf 癌遺伝子産物、gp100 / pme117、GD2、GD3、GM2、TF、sTN、MAGE-1、MAGE-

50

3、BAGE、GAGE、チロシナーゼ、gp75、Melan-A/Mart-1、gp100、HER2/neu、EBV-LMP1および2、HPV-F4、6、7、前立腺特異抗原(PSA)、HPV-16、MUM、-フェトプロテイン(AFP)、CO17-1A、GA733、gp72、p53、ras癌遺伝子産物、HPV E7、ウィルムス腫瘍抗原-1、テロメラーゼ、黒色腫ガングリオシド、または簡潔な膜貫通配列と相互作用する分子(例えば、抗体またはアブタマー)であり得る。

【0036】

生体内の癌細胞への治療薬の選択的送達は、癌特異的バイオマーカーのターゲティングを集中的に研究する別の研究分野である(E. Mastrobattista, G. A. Koning, and G. Storm, "Immonoliposomes for the Targeted Delivery of Antitumor Drugs," *Adv Drug Delivery Reviews* 1999, 40:103-27; J. Sudimack and R. J. Lee, "Targeted Drug Delivery Via Folate Receptor," *Adv Drug Delivery Reviews* 2000, 41:147-62; S. P. Vyas and V. Sihorkar, "Endogenous Carriers and Ligands in Non-Immunogenic Site-Specific Drug Delivery," *Adv Drug Delivery Reviews* 2000, 43:101-64)。葉酸受容体(E. Mastrobattista, G. A. Koning, and G. Storm, "Immonoliposomes for the Targeted Delivery of Antitumor Drugs," *Adv Drug Delivery Reviews* 1999, 40:103-27; J. Sudimack and R. J. Lee, "Targeted Drug Delivery Via Folate Receptor," *Adv Drug Delivery Reviews* 2000, 41:147-62)、CA-125(E. Mastrobattista, G. A. Koning, and G. Storm, "Immonoliposomes for the Targeted Delivery of Antitumor Drugs," *Adv Drug Delivery Reviews* 1999, 40:103-27)、およびHER2/neu抗原(D. B. Kirpotin, J. W. Park, K. Hong, S. Zaliksky, W. L. Li, P. Carter, C. C. Benz, and D. Papadajopoulos, "Sterically Stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro," *Biochemistry* 1997, 36:66-75)に対するモノクローナル抗体を使用した免疫リポソーム媒介性ターゲティングが記載されている。

【0037】

したがって、本明細書中に提供したポリペプチドは、腫瘍特異的ターゲティング配列をさらに含むことができる。例えば、腫瘍特異的ターゲティング配列は、RGDモチーフ、NGRモチーフ、またはGSLモチーフを含むことができる。1つの態様では、腫瘍特異的ターゲティング配列は、腫瘍血管内皮細胞をターゲティングする。したがって、ポリペプチドは、配列番号11または配列番号12に記載のアミノ酸配列を含むことができる。

6. エフェクター

本明細書中に提供した組成物は、エフェクター分子をさらに含むことができる。「エフェクター分子」は、標的細胞または標的組織に作用して所望の効果が得られる物質を意味する。効果は、例えば、標的細胞または標的組織の標識、活性化、抑制、または死滅であり得る。したがって、エフェクター分子は、例えば、小分子、薬品(pharmaceutical drug)、毒素、脂肪酸、検出可能なマーカー、抱合タグ(conjugating tag)、ナノ粒子、または酵素であり得る。

【0038】

10

20

30

40

50

ターゲティングペプチドに抱合することができる小分子および薬品の例は、当該分野で公知である。エフェクターは、標的細胞を死滅させる細胞傷害性小分子または薬物であり得る。小分子または薬物を、任意の重要な細胞機能または経路に対して作用するようにデザインすることができる。例えば、小分子または薬物は、細胞周期を阻害することができるか、タンパク質分解を活性化することができるか、アポトーシスを誘導することができるか、キナーゼ活性を調整することができるか、細胞骨格タンパク質を改変することができる。任意の公知または新規に発見された細胞傷害性小分子または薬物は、ターゲティングペプチドとの使用が意図される。

【0039】

エフェクターは、ターゲティングされた細胞を死滅させる毒素であり得る。毒素の非限定的な例には、アブリン、モデッシン (modecin)、リシン、およびジフテリア毒素が含まれる。他の公知または新規に発見された毒素は、提供した組成物との使用が考慮される。

【0040】

提供した組成物に抱合することができる脂肪酸（すなわち、脂質）には、ペプチドをリポソームに有効に組み込むことが可能な脂肪酸が含まれる。一般に、脂肪酸は、極性脂質である。したがって、脂肪酸は、リン脂質であり得る。提供した組成物は、天然または合成のリン脂質のいずれかを含むことができる。リン脂質を、飽和または不飽和の一置換または二置換の脂肪酸およびその組み合わせを含むリン脂質から選択することができる。これらのリン脂質は、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルセリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジン酸、パルミトイロオイルホスファチジルコリン、パルミトイロオイルホスファチジルセリン、パルミトイロオイルホスファチジルエタノールアミン、パルミトイロオイルホスファチジルグリセロール、パルミトイロオイルホスファチジン酸、パルミテライドイルオレオイル (palmiteola idoylooleoyl) ホスファチジルコリン、パルミテライドイルオレオイルホスファチジルセリン、パルミテライドイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン、パルミテライドイルオレオイルホスファチジルグリセロール、パルミテライドイルオレオイルホスファチジン酸、ミリストレオイルオレオイルホスファチジルコリン、ミリストレオイルオレオイルホスファチジルセリン、ミリストレオイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (ethanoamine)、ミリストレオイルオレオイルホスファチジルグリセロール、ミリストレオイルオレオイルホスファチジン酸、ジリノレオイルホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルセリン、ジリノレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジリノレオイルホスファチジルグリセロール、ジリノレオイルホスファチジン酸、パルミチクリノレオイル (palmiticlineoleoyl) ホスファチジルコリン、パルミチクリノレオイルホスファチジルセリン、パルミチクリノレオイルホスファチジルエタノールアミン、パルミチクリノレオイルホスファチジルグリセロール、パルミチクリノレオイルホスファチジン酸であり得る。これらのリン脂質はまた、ホスファチジルコリン (リソホスファチジルコリン (lysophophatidylidylcholine))、ホスファチジルセリン (リソホスファチジルセリン)、ホスファチジルエタノールアミン (リソホスファチジルエタノールアミン)、ホスファチジルグリセロール (リソホスファチジルグリセロール)、およびホスファチジン酸 (リソホスファチジン酸) のモノアシル化誘導体であり得る。これらのリソホスファチジル誘導体中のモノアシル鎖は、パルミトイロ、オレオイル、パルミトレオイル、リノレオイル、ミリストイル、またはミリストレオイルであり得る。リン脂質は合成でもあり得る。合成リン脂質は、種々の供給元 (AVANTI Polar Lipids (Albaster, Ala.); Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.)) などから容易に購入することができる。これらの合成化合物は多様であり得、天然に存在するリン脂質で見出されない変化した脂肪酸側鎖を有し得る。脂肪酸は、PSまたはPCのいずれかまたは両方でC14、C16、C18、またはC20鎖長の不飽和脂肪酸側鎖を

10

20

30

40

50

有することができる。合成リン脂質は、構成要素としてジオレオイル(18:1)-PS；パルミトイール(16:0)-オレオイル(18:1)-PS、ジミリストイル(14:0)-PS；ジパルミトレオイル(16:1)-PC、ジパルミトイール(16:0)-PC、ジオレオイル(18:1)-PC、パルミトイール(16:0)-オレオイル(18:1)-PC、およびミリストイル(14:0)-オレオイル(18:1)-PCを有することができる。したがって、例として、提供した組成物は、パルミトイール16:0を含むことができる。

【0041】

検出可能なマーカーには、標的組織または標的細胞を標識または染色するために使用することができる任意の物質が含まれる。検出可能なマーカーの非限定的な例には、放射性同位体、酵素、蛍光色素、および量子ドット(Qdot(登録商標))が含まれる。他の公知または新規に発見された検出可能なマーカーは、提供した組成物との使用が考慮される。

10

【0042】

エフェクター分子は、発熱ナノシェルなどのナノ粒子であり得る。本明細書中で使用される場合、「ナノシェル」は、1つ以上の導電性シェルレイヤーに囲まれた個別の誘電性または半導体のコア区分を有するナノ粒子である。米国特許第6,530,944号は、金属ナノシェルの作製および使用方法の教示についてその全体が本明細書中で参照により援用される。ナノシェルを、近赤外線(約800~1300nm)などの照射を使用して励起することができる高導電性金属などの物質でコーティングした誘電性または不活性の物質(ケイ素など)のコアを使用して形成することができる。励起の際、ナノシェルは放熱する。得られた高熱は、周辺の細胞または組織を死滅させることができる。ナノシェルのシェルおよびコアを合わせた直径は、数十~数百ナノメートルの範囲である。近赤外線は、その組織貫通能力が利点である。ナノ粒子コーティングおよび標的細胞の選択に応じて、他の照射型も使用することができる。例には、X線、磁場、電場、および超音波が含まれる。本明細書中に記載のように使用した照射レベルは、エネルギーが誘電体の金属表面によってより効率的に集中するナノ粒子表面以外に高熱を誘導するのに不十分であるので、特に癌療法で使用するための高熱(加熱プローブ、マイクロ波、超音波、レーザー、灌流、高周波エネルギー、および放射加熱の使用など)についての既存の方法の問題点は回避される。特に、赤外拡散光子画像検査法(infrared diffuse photon imaging method)を使用して、画像化を増強するためにこの粒子を使用することもできる。ターゲティング分子は、抗体もしくはそのフラグメント、特定の受容体のリガンド、またはターゲティングすべき細胞表面に特異的に結合する他のタンパク質であり得る。

20

【0043】

エフェクター分子は、放射性同位体であり得る。例えば、エフェクター分子は、移植に適切な任意の放射性同位体を含む「シード(seed)」またはワイヤーなどの物質であり得る。放射性シードを組織に移植するために多数のデバイスが使用されている。例えば、Wappleに付与された米国特許第2,269,963号；Scottに付与された米国特許第4,402,308号；Mickに付与された米国特許第5,860,909号；およびRydelに付与された米国特許第6,007,474号を参照のこと。典型的な前立腺癌の治療プロトコールでは、特殊なニードルを有する移植デバイスを、前立腺に放射性シードが送達されるように直腸と陰嚢との間の皮膚を介して前立腺に挿入する。シードが移植される前立腺中の他の部位にニードルを再配置するか、新規のニードルを使用することができる。典型的には、20~40本のニードルを使用して、前立腺あたり約50~150個のシードを送達させる。超音波プローブを使用して、ニードルの位置を追跡することができる。

30

【0044】

現在市販されている放射性シードは、放射性同位体をカプセル化したカプセルの形態を取っている。例えば、Symmetra(登録商標)I-125(Bebig GmbH

40

50

, Germany) ; I o G o l d (商標) I - 1 2 5 および I o G o l d (商標) P d - 1 0 3 (North American Scientific, Inc., Chatsworth, Calif.) ; Best (登録商標) 1 - 1 2 5 および Best Pd - 1 0 3 (Best Industries, Springfield, Va.) ; Brachyseed (登録商標) I - 1 2 5 (Draximage, Inc., Canada) ; Intersource (登録商標) Pd - 1 0 3 (International Brachytherapy, Belgium) ; Oncoseed (登録商標) 1 - 1 2 5 (Nycomed Amersham, UK) ; STM 1 2 5 0 I - 1 2 5 (Sourcetech Medical, Carol Stream, Ill.) ; Pharmaseed (登録商標) I - 1 2 5 (Syncor, Woodland Hills, Calif.) ; Prostaseed (商標) I - 1 2 5 (Urocor, Oklahoma City, Okla.) ; および I - plant (登録商標) I - 1 2 5 (Implant Sciences Wakefield, Mass.) を参照のこと。
 10 これらのシードのカプセルは、チタンまたはステンレススチールなどの生体適合性物質でできており、放射性同位体の浸出を防止するためにしっかりと密封することができる。カプセルを、移植デバイスで使用されるニードルの1つの内径に適合するように順々に小さくすることができる。ほとんどのかかるニードルが約18ゲージであるので、カプセルは、典型的には、直径が約0.8mmであり、長さが約4.5mmである。近接照射療法のシードで最も一般的に使用される2つの放射性同位体は、ヨウ素(I-¹²⁵)およびパラジウム(Pd-¹⁰³)である。これらは共に低エネルギー照射で放射し、腫瘍治療に理想的な半減期特性を有する。例えば、I-¹²⁵シードは、60日毎に50%の比率で崩壊するので、典型的な開始用量を使用して、その放射能は10ヶ月でほぼ消費される。Pd-¹⁰³シードは、なおさらに急速に崩壊し、17日毎にそのエネルギーの半分が喪失され、わずか3ヶ月後にほとんど不活性になる。
 20

【0045】

放射性近接照射療法シードは、他の成分も含むことができる。例えば、標準的なX線画像化技術を使用してその適切な配置の追跡を補助するために、かかるシードは放射線不透過性マーカーを含むことができる。マーカーは、典型的には、原子番号の高い(すなわち、「high Z」)元素またはかかる元素を含む合金もしくは混合物からできている。これらの例には、白金、イリジウム、レニウム、金、タンタラム、鉛、ビスマス合金、インジウム合金、はんだ、または低融点の他の合金、タンゲステン、および銀が含まれる。多数の放射線不透過性マーカーは、現在、以下が販売されている：白金/イリジウムマーカー(Draximage, Inc. and International Brachytherapy)、金ロッド(gold rod)(Bebig GmbH)、金/銅合金マーカー(North American Scientific)、パラジウムロッド(Syncor)、タンゲステンマーカー(Best Industries)、銀ロッド(Nycomed Amersham)、銀スフェア(International Isotopes Inc. and Urocor)、および銀ワイヤー(Implant Sciences Corp.)が含まれる。他の放射線不透過性マーカーには、種々の物質を含浸させたポリマーが含まれる(例えば、米国特許第6,077,880号を参照のこと)。
 30 40

【0046】

多数の異なる米国特許は、近接照射療法に関するテクノロジーを開示している。例えば、米国特許第3,351,049号は、近接照射療源としての低エネルギーX線放射侵入型インプラントの使用を開示している。さらに、米国特許第4,323,055号；米国特許第4,702,228号；米国特許第4,891,165号；米国特許第5,405,309号；米国特許第5,713,828号；米国特許第5,997,463号；米国特許第6,066,083号；および同第6,074,337号は、近接照射療法デバイスに関するテクノロジーを開示している。

【0047】

10

20

30

40

50

エフェクター分子を、開示のペプチドに共有結合することができる。エフェクター分子を、開示のペプチドのアミノ末端に結合することができる。エフェクター分子を、開示のペプチドのカルボキシ末端に結合することができる。エフェクター分子を、開示のペプチド内のアミノ酸に結合することができる。本明細書中に提供した組成物は、さらに、エフェクター分子および開示のペプチドに連結したリンカーを含むことができる。開示のペプチドを、ペプチドでナノシェルをコーディングするために使用することができるウシ血清アルブミン (B S A) (Tkachenko ら, (2 0 0 3) J Am Chem Soc, 125, 4700 - 4701 を参照のこと) などのコーティング分子に抱合することもできる。

【 0 0 4 8 】

10

開示のペプチドにエフェクター分子を架橋するために使用することができるタンパク質架橋剤は、当該分野で公知であり、その有用性および構造に基づいて定義されており、この架橋剤には、 D S S (スペリン酸ジスクシンイミジル) 、 D S P (ジチオビス (スクシンイミジルプロピオナート)) 、 D T S S P (3 , 3 ' - ジチオビス (スルホスクシンイミジルプロピオナート)) 、 S U L F O B S O C O E S (ビス [2 - (スルホスクシンイムドオキシカルボニルオキシ (sulfosuccinimidooxy carbonyloxy)) エチル] スルホン) 、 B S O C O E S (ビス [2 - (スクシンイムドオキシカルボニルオキシ) エチル] スルホン) 、 S U L F O D S T (ジスルホスクシンイミジルタートラート) 、 D S T (ジスクシンイミジルタートラート (Disuccinimidyl tartrate)) 、 S U L F O E G S (エチレングリコールビス (スクシンイミジルスクシナート)) 、 E G S (エチレングリコールビス (スルホスクシンイミジルスクシナート)) 、 D P D P B (1 , 2 - ジ [3 ' - (2 ' - ピリジルジチオ) プロピオンアミド] プタン) 、 B S S S (ビス (スルホスクシンイミジル) スペラート) 、 S M P B (スクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル) プチラート) 、 S U L F O S M P B (スルホスクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル) プチラート) 、 M B S (3 - 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) 、 S U L F O M B S (3 - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル) 、 S I A B (N - スクシンイミジル (4 - ヨードアセチル) アミノベンゾアート) 、 S U L F O S I A B (N - スルホスクシンイミジル (4 - ヨードアセチル) アミノベンゾアート) 、 S M C C (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 - カルボキシラート) 、 S U L F O S M C C (スルホスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシラート) 、 N H S L C S P D P (スクシンイミジル - 6 - [3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオンアミド] ヘキサノアート) 、 S U L F O N H S L C S P D P (スルホスクシンイミジル - 6 - [3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオナート) 、 N H S B R O M O A C E T A T E (N - ヒドロキシスクシンイミジルプロモアセタート) 、 N H S I O D O A C E T A T E (N - ヒドロキシスクシンイミジルヨードアセタート) 、 M P B H (4 - (N - マレイミドフェニル) 酪酸ヒドラジドヒドロクロリド) 、 M C C H (4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボン酸ヒドラジドヒドロクロリド) 、 M B H (m - マレイミド安息香酸ヒドラジドヒドロクロリド) 、 S U L F O E M C S (N - (- マレイミドカプロイルオキシ) スルホスクシンイミド) 、 E M C S (N - (- マレイミドカプロイルオキシ) スクシンイミド) 、 P M P I (N - (p - マレイミドフェニル) イソシアナート) 、 K M U H (N - (- マレイミドウンデカン酸) ヒドラジド) 、 L C S M C C (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 (6 - アミドカプロアート)) 、 S U L F O G M B S (N - (- マレイミドブトリルオキシ (butryl oxy)) スルホスクシンイミドエステル) 、 S M P H (スクシンイミジル - 6 - (- マレイミドプロピオンアミドヘキサノアート)) 、 S U L F O K M U S (N - (- マレイミドウンデカノイルオキシ) スルホスクシンイミドエステル) 、 G M B S (N - (- マレイミドブチロキシ (butyryl oxy)) スクシンイミ

20

30

40

50

ド)、DMP(ピメルイミド酸ジメチル塩酸塩)、DMS(スペルイミド酸ジメチル塩酸塩)、MHBH(ウッド試薬)(メチル-p-ヒドロキシベンズイミダートヒドロクロリド、98%)、DMA(アジポイミド酸ジメチル塩酸塩)が含まれる。

7.併用療法

癌に投与することができるNIPおよび任意の公知または新規に発見された物質を含む組成物を本明細書中に提供する。例えば、提供した組成物は、さらに、1つ以上の以下のクラスを含むことができる：抗生物質(例えば、アミノグリコシド、セファロスポリン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、エリスロマイシン、フルオロキノロン、マクロライド、アゾライド(Azolide)、メトロニダゾール、ペニシリン、テトラサイクリン、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、バンコマイシン)、ステロイド(例えば、アンドラン(Andrane)(例えば、テストステロン)、コレスタン(例えば、コレステロール)、コール酸(例えば、コール酸)、コルチコステロイド(例えば、デキサメタゾン)、エストラン(例えば、エストラジオール)、プレグナン(例えば、プロゲステロン)、麻薬性および非麻薬性鎮痛薬(例えば、モルヒネ、コデイン、ヘロイン、ヒドロモルフォン、レボルファノール、メペリジン、メタドン、オキシドン、プロポキシフェン、フェンタニル、メタドン、ナロキソン、ブブレノルフィン、ブトルファノール、ナルブフィン、ペントゾシン)、抗炎症薬(例えば、アルクロフェナク；ジプロピオン酸アルクロメタゾン；アルゲストンアセトニド；アミラーゼ；アムシナファル；アムシナフィド；アンフェナクナトリウム；塩酸アミブリロース；アナキンラ；アニロラク；アニトラザフェン；アパゾン；バルサラジドニナトリウム；ベンダザック；ベノキサプロフェン；塩酸ベンジダミン；ブロメライン；ブロペラモール；ブデソニド；カルプロフェン；シクロプロフェン；シントゾン；クリプロフェン；プロピオン酸クロベタゾール；酪酸クロベタゾン；クロピラック；プロピオン酸クロチカゾン；コルメタソンアセタート；コルトドキソン；デカノアート；デフラザコルト；デラテストリル；デポテストステロン；デソニド；デスオキシメタゾン；ジプロピオン酸デキサメタゾン；ジクロフェナックカリウム；ジクロフェナックナトリウム；ジフロラゾンジアセタート；ジフルミドンナトリウム；ジフルニサル；ジフルプレドナート；ジフタロン；ジメチルスルホキシド；ドロシノニド；エンドリソン；エンリモマブ(Enlimomab)；エノリカムナトリウム(Enolicam Sodium)；エピリゾール；エトドラク；エトフェナマート；フェルビナク；フェナモール；フェンブフェン；フェンクロフェナック；フェンクロラック；フェンドサール；フェンピパロン；フェンチアザク；フラザロン；フルアザコート；フルフェナム酸；フルミゾール；酢酸フルニソリド；フルニキシン；フルニキシンメグルミン；フルオコルチンブチル；酢酸フルオロメトロン；フルクアゾン；フルルビプロフェン；フルレトフェン；プロピオン酸フルチカゾン；フラプロフェン；フロブフェン；ハルシノニド；プロピオン酸ハロベタゾール；酢酸ハロブレドン；イブフェナック；イブプロフェン；イブプロフェンアルミニウム；イブプロフェンピコノール；イロニダップ；インドメタシン；インドメタシンナトリウム；インドプロフェン；インドキソール；イントラゾール；酢酸イソフルブレドン；イソキセパック；イソキシカム；ケトプロフェン；塩酸ロフェミゾール；ロモキシカム(Lomoxicam)；ロテブレドノールエタボナート；メクロフェナム酸ナトリウム；メクロフェナム酸；メクロリソングブチラート；メフェナム酸；メサラミン；メセクラゾン；メステロロン；メタンドロステノロン；メテノロン；酢酸メテノロン；メチルブレドニゾロンサルプタナート(Methylprednisolone Suleptanate)；モミフルマート(Momiflumate)；ナブメトン；ナンドロロン；ナプロキセン；ナプロキセンナトリウム；ナプロキソール；ニマゾン；オルサラジンナトリウム；オルゴテイン；オルパノキシン；オキサンドロラン(Oxandrolane)；オキサプロジン；オキシフェンブタゾン；オキシメトロン；塩酸パラニリン；ペントサンポリ硫酸ナトリウム；フェンブタゾングリセリン酸ナトリウム(Phenbutazone Sodium Glycerate)；ピルフェニドン；ピロキシカム；桂皮酸ピロキシカム；ピロキシカムオラミン；ピルプロフェン；ピブレドナザート(Prednazate)；プリフェロン(Prifelone)；プロドール酸

10

20

30

40

50

；プロクアゾン；プロキサゾール；クエン酸プロキサゾール；リメキソロン；ロマザリット；サルコレックス (Salcolex)；サルナセジン (Salnaceditin)；サルサラート；サンギナリンクロリド；セクラゾン；セルメタシン；スタノゾロール；スドキシカム；スリンダク；スプロフェン；タルメタシン；タルニフルマート；タロサラート；テブフェロン；テニダップ；テニダップナトリウム；テノキシカム；テシカム；テシミド；テストステロン；テストステロンブレンド；テトリダミン；チオピナック；ピバリン酸チキソコルトール；トルメチン；トルメチンナトリム；トリクロニド；トリフルミダート；ジドメタシン；ゾメピラックナトリウム）、または抗ヒスタミン剤（例えば、エタノールアミン（ジフェンヒドロミン（diphenhydramine）カルビノキサミンなど）、エチレンジアミン（トリペレンナミン、ピリラミンなど）、アルキルアミン（クロルフェニラミン、デックスクロルフェニラミン、プロムフェニラミン、トリプロリジンなど）、他の抗ヒスタミン薬（アステミゾール、ロラタジン、フェノキソフェナジン、プロフェニラミン（Bropheniramine）、クレマスチン、アセトアミノフェン、ブソイドエフェドリン、トリプロリジンなど）。

【0049】

多数の抗癌薬を、本発明の方法および組成物と組み合わせて利用可能である。以下は、現在開示されているDOC1活性増強方法または発現増強方法と併せて使用することができる抗癌（抗新生物）薬のリストである。

【0050】

抗新生物薬：アシビシン；アクラルビシン；塩酸アコダゾール；アルクニン (Acronine)；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アムボマイシン (Ambovincin)；酢酸アメタントロン；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスピラギナーゼ；アスペルリン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バチマstattt；ベンゾデパ；ビカルタミド；塩酸ビサントレン；ビスナフィドジメシラート；ビセレシン；硫酸ブレオマイシン；ブレキナルナトリウム；プロピリミン；ブルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カラセミド；カルベチマー (Carbetimer)；カルボプラチン；カルムスチン；塩酸カルビシン；カルゼレシン；セデフィンゴール；クロラムブシル；シロレマイシン (Cirrolemycin)；シスプラチン；クラドリビン；クリスナトールメシラート；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；塩酸ダウノルビシン；デシタビン；デキソルマプラチン；デザグアニン；デザグアニンメシラート；ジアジクオン；ドセタキセル；ドキソルビシン；塩酸ドキソルビシン；ドロロキシフェン；クエン酸ドロロキシフェン；ドロモスタノロンプロピオナート；デュアゾマイシン；エダトレキサート；塩酸エフロミチン (Efломithine Hydrochloride)；エルサミトルシン；エンロプラチン；エンプロマート；エピプロピジン；塩酸エビルビシン；エルプロゾール；塩酸エソルビシン；エストラムスチン；リン酸エストラムスチンナトリウム；エタニダゾール；エチオン化油I131；エトポシド；エトポシドホスファート；エトブリニン；塩酸ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フロクスウリジン；リン酸フルダラビン；フルオロウラシル；フルロシタビン；ホスキドン；ホストリエシンナトリウム；ゲムシタビン；塩酸ゲムシタビン；金Au 198；ヒドロキシ尿素；塩酸イダルビシン；イフォスファミド；イルモホシン；インターフェロン - 2a；インターフェロン - 2b；インターフェロン - n1；インターフェロン - n3；インターフェロン - Ia；インターフェロン - Ib；イプロプラチン (Iproplatin)；塩酸イリノテカん；酢酸ランレオチド；レトロゾール；酢酸ロイプロリド；塩酸リアロゾール；ロメトレキソールナトリウム；ロムスチン；塩酸ロソキサントロン；マソプロコール；メイタンシン；塩酸メクロレタミン；酢酸メゲストロール；メレンゲストロールアセタート；メルファラン；メノガリル；メルカプトプリン；メトトレキサート；メトトレキサートナトリウム；メトブリニン；メツルデパ；ミチンドミド；ミトカルシン (Mitocarcin)；ミトクロミン (Mitocromin)；ミトギリン (Mitogillin)；ミトマルシン (Mitomalcin)；マイトマイシン；ミトスペル (Mitosper)。

10

20

30

40

50

；ミトタン；塩酸ミトキサントロン；ミコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマプラチン (Ormaplatin)；オキシスラン；パクリタキセル；ペガスパルガーゼ；ペリオマイシン (Peliomycin)；ペントムスチン；硫酸ペロマイシン；ペルホスファミド；ピボプロマン；ピボスルファン；塩酸ピロキサントロン；ブリカマイシン；プロメスタン；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；ブレドニムスチン；塩酸プロカルバジン；ピューロマイシン；塩酸ピューロマイシン；ピラゾフリン；リボプリン；ログレチミド；サフムゴール (Safmgol)；塩酸サフィンゴール；セムスチン；シムトラゼン；スバルホサートナトリウム；スバルソマイシン；塩酸スピロゲルマニウム；スピロムスチン (Spiromustine)；スピロプラチン (Spiroplatin)；ストレプトニグリン；ストレプトゾシン；塩化ストロンチウム Sr 10 89；スロフェヌル；タリソマイシン；タキサン；タキソイド；テコガランナトリウム (Tecogalan Sodium)；テガフル；塩酸テロキサントロン；テモポルフィン；テニボシド；テロキシロン (Teroxirone)；テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテパ；チアゾフリン；チラパザミン；塩酸トポテカン；クエン酸トレミフェン；トレストロンアセタート；トリシリビンホスファート；トリメトレキサート；トリメトレキサートグルクロナート；トリプトレリン；塩酸ツブロゾール；ウラシルマスター；ウレデパ；バブレオチド；ベルテポルフィン；硫酸ビンプラスチン；硫酸ビンクリスチン；ビンデシン；硫酸ビンデシン；硫酸ビネビジン；硫酸ビングリシナート；硫酸ビンロイロシン；酒石酸ビノレルビン；硫酸ビンロシジン；硫酸ビンゾリジン；ボロゾール；ゼニプラチン (Zeniplatin)；ジノスタチン；塩酸ゾルビシン。
20 他の抗新生物化合物には以下が含まれる：20-epi-1, 25-ジヒドロキシビタミンD3；5-エチニルウラシル；アビラテロン；アクラルビシン；アシルフルベン；アデシペノール；アドゼレシン；アルデスロイキン；ALL-TKアンタゴニスト；アルトレタミン；アンバムスチン；アミドックス；アミホスチン；アミノレブリン酸；アムルビシン；アストルサクリン (atrsacrine)；アナグレリド；アナストロゾール；アンドログラホリド；血管形成インヒビター；アンタゴニストD；アンタゴニストG；アンタレリックス；抗背側化形態形成タンパク質-1 (anti-dorsalizing morphogenetic protein)；抗アンドロゲン (前立腺癌)；抗エストロゲン；アンチネオプラスチック；アンチセンスオリゴヌクレオチド；アフィジコリングリシナート；アポトーシス遺伝子モジュレーター；アポトーシスレギュレーター；アブリノ酸；アラ-CDP-DL-PTBA；アルギニンデアミナーゼ；アスラクリン；アタメスタン；アトリムスチン；アキシナスタチン1；アキシナスタチン2；アキシナスタチン3；アザセトロン；アザトキシン；アザチロシン；バッカチンII誘導体；バラノール；バチマstattt；BCR/ABL アンタゴニスト；ベンゾクロリン；ベンゾイルスタウロスボリン；ラクタム誘導体；-アレチン；ベタクラマイシンB；ベツリン酸；bFGFインヒビター；ビカルタミド；ビサントレン；ビスアジリジニルスペルミン (bisaziridinyl spermine)；ビスナフィド；ビストラテンA；ビセレシン；ブレフラート；プロピリミン；ブドチタン (budotitane)；ブチオニンスルホキシミン；カルシポトリオール；カルホスチンC；カンブトセシン誘導体；カナリアポックスIL-2；カペシタビン；カルボキシアミド-アミノ-トリアゾール；カルボキシアミドトリアゾール；Carrest M3；CARN 700；軟骨由来インヒビター；カルゼレシン；カゼインキナーゼインヒビター (ICOS)；カスタノスペルミン；セクロピンB；セトロレリックス；クロリン (chlorin)；クロロキノキサリンスルホンアミド；シカプロスト；シス-ポルフィリン；クラドリビン；クロミフェンアナログ；クロトリマゾール；コリスマイシンA；コリスマイシンB；コンブレタスタチンA4；コンブレタスタチンアナログ；コナゲニン；クランベシジン816；クリスナトール；クリプトフィシン8；クリプトフィシンA誘導体；クラシンA；シクロペントアントラキノン (cyclopentanthraquinone)；シクロプラタム (cyclop latam)；シペマイシン；シタラビンオクホスファート；細胞溶解因子；シトスタチン；ダクリキシマブ (dacliximab)；デシタビン；デヒドロジデムニンB；デ

スロレリン；デックスイフォスファミド (dexifosfamide)；デクスラゾキサン；デクスペラパミル；ジアジクオン；ジデムニンB；ジドックス；ジエチルノルスペルミン；ジヒドロ-5-アザシチジン；ジヒドロタキソール, 9-；ジオキサマイシン；ジフェニルスピロムスチン；ドコサノール；ドラセトロン；ドキシフルリジン；ドロロキシフェン；ドロナビノール；デュオカニシンSA (duocannycin SA)；エプセレン；エコムスチン；エデルホシン；エドレコロマブ；エフロルニチン；エレメン；エミテフル；エピルビシン；エプリステリド；エストラムスチンアナログ；エストロゲンアゴニスト；エストロゲンアンタゴニスト；エタニダゾール；エトボシドホスファート；エキセメスタン；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フィルグラスチム；フマステリド；フラボピリドール；フレゼラスチン；フルアステロン；フルダラビン；塩酸フルオロダウノルニシン (fluorodauunorunicin hydrochloride)；ホルフェニメックス；ホルメスタン；ホストリエシン；ホテムスチン；ガドリニウムテキサフィリン；硝酸ガリウム；ガロシタビン；ガニレリックス；ゼラチナーゼインヒビター；ゲムシタビン；グルタチオンインヒビター；ヘプスルファム；ヘレグリン；ヘキサメチレンビスアセトアミド；ヒペリシン；イバンドロン酸；イダルビシン；イドキシフェン；イドラマントン；イルモホシン；イロマstattt；イミダゾアクリドン (imidazoacridone)；イミキモド；免疫賦活ペプチド；インスリン様成長因子-1受容体インヒビター；インターフェロンアゴニスト；インターフェロン；インターロイキン；ヨーベングアン；ヨードドキソルビシン；イボメアノール, 4-；イリノテカン；イロプラクト (iroplact)；イルソグラジン；イソベンガゾール (isobengazole)；イソホモハリコンドリンB (isohomohalicondrin B)；イタセトロン；ジャスプラキノリド；カハラリドF；ラメラリンNトリアセタート；ランレオチド；レイナマイシン；レノグラスチム；硫酸レンチナン；レプトルスタチン；レトロゾール；白血病阻害因子；白血球インターフェロン；ロイプロリド+エストロゲン+プロゲステロン；リュープロレリン；レバミソール；リアロゾール；直鎖ポリアミンアナログ；親油性ジサッカリドペプチド；親油性白金化合物；リッソクリナミド7；ロバプラチン (lobaplatin)；ロンブリシン；ロメトレキソール；ロニダミン；ロソキサントロン；ロバスタチン；ロキソリビン；ルルトテカン；ルテチウムテキサフィリン；リソフィリン (lysophyline)；溶解性ペプチド；メイタンシン；マンノスタチンA；マリマstattt；マソプロコール；マスピン；マトリライシンインヒビター；マトリックスメタロプロテイナーゼインヒビター；メノガリル；メルバロン；メテレリン；メチオニナーゼ (methioninase)；メトクロプラミド；MIFインヒビター；ミフェプリストン；ミルテホシン；ミリモスチム；不適正二本鎖RNA；ミトグアゾン；ミトラクトール；マイトイシンアナログ；ミトナフィド；マイトイシン (mitoxatin) 線維芽細胞成長因子-サボリン；ミトキサントロン；モファロテン；モルグラモスチム；モノクローナル抗体；ヒト絨毛性ゴナドトロピン；モノホスホリル脂質A+ミオバクテリウム細胞壁sk；モピダモール；多剤耐性ジーニー (genie) インヒビター；多発性腫瘍抑制因子1ベースの療法；マスター抗癌薬；ミカペルオキシドB；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ミリアポロン；N-アセチルジナリン；N置換ベンズアミド；ナファレリン；ナグレスチブ (nagrestib)；ナロキソン+ベンタゾシン；ナパビン (napavine)；ナフテルビン；ナルトグラスチム；ネダプラチン；ネモルビシン；ネリドロン酸；中性エンドペプチダーゼ；ニルタミド；ニサマイシン；一酸化窒素モジュレーター；ニトロキシド (nitroxide) 抗酸化剤；ニトルリン (nitrolynn)；O6-ベンジルグアニン；オクトレオチド；オキセノン；オリゴヌクレオチド；オナプリストン；オンダンセトロン；オンダンセトロン；オラシン；経口サイトカインインデューサー；オルマプラチン；オサテロン；オキサリプラチン；オキサウノマイシン；パクリタキセルアナログ；パクリタキセル誘導体；パラウアミン (palaumin)；パルミトイールリゾキシン；パミドロン酸；パナキシトリオール；パノミフェン；パラバクチン；パゼリップチン；ペガスパルガーゼ；ペルデシン；ペントサンポリ硫酸ナトリウム；ペントスタチン；ペントロゾール (pentrozole)；ペルフ

10

20

30

40

50

ルブロン；ペルホスファミド；ペリリルアルコール；フェナジノマイシン；酢酸フェニル；ホスファターゼインヒビター；ピシバニル；塩酸ピロカルピン；ピラルビシン；ピリトレキシム；プラセチン(placetin) A；プラセチン B；プラスミノゲンアクチベーターインヒビター；白金複合体；白金化合物；白金-トリアミン複合体；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；プロピルビス-アクリドン；プロスタグラニン J 2；プロテアゾームインヒビター；プロテイン A ベースの免疫モジュレーター；タンパク質キナーゼ C インヒビター；タンパク質キナーゼ C インヒビター(微細藻類)；タンパク質チロシンホスファターゼインヒビター；プリンヌクレオシドホスホリラーゼインヒビター；ブルプリン；ピラゾロアクリジン；ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレン抱合体；r a f アンタゴニスト；ラルチトレキシド；ラモセトロン；r a s フェネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビター；r a s インヒビター；r a s - G A P インヒビター；脱メチル化レテリップチン；レニウム R e 1 8 6 エチドロネート；リゾキシン；リボザイム；R I I レチニアミド；ログレチミド；ロヒツキン(rohitukine)；ロムルチド；ロキニメクス；ルビギノン B 1；ルボキシル；サフィンゴール；サイントピン；S a r C N U ；サルコフィトール A ；サルグラモスチム；S d i 1 模倣物；セムスチン；老化由来インヒビター 1；センスオリゴヌクレオチド；シグナル伝達インヒビター；シグナル伝達モジュレーター；単鎖抗原結合タンパク質；シゾフィラン；ソブゾキサン；ナトリウムボロカプタート(sodium borocaptate)；フェニル酢酸ナトリウム；ソルベロール(solverol)；ソマトメジン結合タンパク質；ソネルミン(sonermin)；スバルフォス酸(sparfosic acid)；スピカマイシン D ；スピロムスチン；スプレノペンチン；スponギスタチン 1；スクアラミン；幹細胞インヒビター；幹細胞分裂インヒビター；スチピアミド；ストロメライシンインヒビター；スルフモシン(sulfmosine)；スーパーアクティブ(superactive) 血管作用性腸管ペプチドアンタゴニスト；スラジスタ(suradista)；スラミン；スワインソニン；合成グリコサミノグリカン；タリムスチン；タモキシフェンメチオジド；タウロムスチン；タザロテン；テコガランナトリウム；テガフル；テルラピリリウム(tellurapyrylium)；テロメラーゼインヒビター；テモポルフィン；テモゾロミド；テニボシド；テトラクロロデカオキシド(tetrachlorodecaoxide)；テトラゾミン；タリプラスチン；サリドマイド；チオコラリン；トロンボポイエチン；トロンボポイエチン模倣物；チマルファシン(thymalasin)；サイモポイエチン受容体アゴニスト；サイモトリナン；甲状腺刺激ホルモン；ズエチルエチオプルプリン(tin ethyl etiopurpurin)；チラバザミン；チタノセンジクロリド(titanocene dichloride)；トポテカン；トブセンチン；トレミフェン；全能性幹細胞因子；翻訳インヒビター；トレチノイン；トリアセチルウリジン；トリシリビン；トリメトレキサート；トリプトレリン；トロピセトロン；ツロステリド；チロシンキナーゼインヒビター；チルホスチン；U B C インヒビター；ウベニメクス；尿生殖洞由来成長阻害因子；ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト；バブレオチド；バリオリン B ；ベクター系(赤血球遺伝子療法)；ベラレソール；ベラミン(veramine)；ベルジン(verdin)；ベルテポルフィン；ビノレルビン；ビンキサルチン(vinxaltrine)；ビタキシン(vitaxin)；ボロゾール；ザノテロン；ゼニプラチン；ジラスコルブ；ジノスタチンスチマラマー。

【 0 0 5 1 】

本明細書中に提供した組成物は、1つ以上のさらなる放射線増感剤をさらに含むことができる。公知の放射線増感剤の例には、ゲムシタビン、5-フルオロウラシル、ペントキシフィリン、およびビノレルビンが含まれる(Zhangら, 1998; Lawrenceら, 2001; Robinson and Shewach, 2001; Strunzら, 2002; Collisら, 2003; Zhangら, 2004)。

8. タンパク質変異体

本明細書中で特定のタンパク質について言及する場合、変異体、誘導体、およびフラグメントを意図する。タンパク質変異体および誘導体は、当業者に十分に理解されており、

10

20

30

40

50

アミノ酸配列修飾物を含むことができる。例えば、アミノ酸配列修飾物は、典型的には、以下の3つのクラスの1つ以上に分類される：置換変異体、挿入変異体、または欠失変異体。挿入には、アミノ末端および/またはカルボキシル末端融合物ならびに1つまたは複数のアミノ酸残基の配列内挿入物が含まれる。挿入は、通常、例えば、約1～4個の残基上のアミノ末端融合物またはカルボキシル末端融合物よりも小さな挿入物であろう。欠失は、タンパク質配列からの1つ以上のアミノ酸残基の除去によって特徴づけられる。これらの変異体を、通常、タンパク質をコードするDNA中のヌクレオチドの部位特異的変異誘発、それによる変異体をコードするDNAの产生、その後の組換え細胞培養物中のDNAの発現によって調製する。既知の配列を有するDNA中の所定の部位に置換変異を作製する技術は周知であり、例えば、M13プライマー変異誘発およびPCR変異誘発が含まれる。アミノ置換は、典型的には、1残基のアミノ酸置換であるが、一度に多数の異なる位置で起こり得、挿入は、通常、約1～10アミノ酸残基上に存在するであろう。欠失または挿入を、好ましくは、隣接対で作製する（すなわち、2残基の欠失または2残基の挿入）。置換、欠失、挿入、またはその任意の組み合わせを、最終構築物に到達するように組み合わせることができる。変異は、読み取り枠外の配列に存在してはならず、好ましくは、mRNAの二次構造のかかる変化が望ましくない限り、mRNAの二次構造を產生することができる相補領域を作製しないであろう。置換変異体は、少なくとも1つの残基が除去され、その場所に異なる残基が挿入されている変異体である。かかる置換を、一般に、以下の表2にしたがって作製し、これを、保存的置換という。

【0052】

【表2】

10

20

30

40

50

表2: アミノ酸置換

元の残基	置換例
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Pro	Gly
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

例えば、あるアミノ酸残基の生物学的および/または化学的に類似する別のアミノ酸残基への置換は、保存的置換として当業者に公知である。例えば、保存的置換は、ある疎水性残基の別の疎水性残基への置換またはある極性残基の別の極性残基への置換であろう。置換には、表2に示す組み合わせが含まれる。それぞれ明確に開示した配列の保存的に置換されたバリエーションは、本明細書中に提供したポリペプチドの範囲内に含まれる。

【0053】

典型的には、保存的置換は、得られたポリペプチドの生物活性にほとんど影響を及ぼさないか全く影響を及ぼさない。特定の例では、保存的置換は、ペプチドの生物学的機能に実質的に影響を及ぼさないペプチド中のアミノ酸置換である。ペプチドは、1つ以上のアミノ酸置換（例えば、2～10個の保存的置換、2～5個の保存的置換、4～9個の保存的置換（2、5、または10個の保存的置換など））を含むことができる。

【0054】

例えば、部位特異的変異誘発またはPCRなどの標準的な手順を使用したポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の操作によって、1つ以上の保存的置換を含むポリペプチドを产生することができる。あるいは、標準的なペプチド合成方法の使用によって、1つ以上の保存的置換を含むポリペプチドを产生することができる。アラニンスキンを使用して、タンパク質中のどのアミノ酸残基がアミノ酸置換を許容することができるのかを同定することができる。一例を挙げれば、アラニンまたは他の保存的アミノ酸（以下に列挙のアミノ酸など）を1つ以上の元のアミノ酸と置換した場合、タンパク質の生物活性は25%を超えて減少せず、例えば、せいぜい20%、例えば、せいぜい10%である。

10

【0055】

保存的置換についてのさらなる情報を、他にもあるが、Ben-Bassatら（J. Bacteriol. 169: 751-7, 1987）、O'Reganら（Gene 77: 237-51, 1989）、Sahin-Tothら（Protein Sci. 3: 240-7, 1994）、Hochuliら（Bio/Technology 6: 1321-5, 1988）、ならびに遺伝学および分子生物学の標準的なテキストに見出すことができる。

20

【0056】

置換変異誘発または欠失変異誘発を使用して、N-グリコシル化部位（Asn-X-Thr/Ser）またはO-グリコシル化部位（SerまたはThr）を挿入することができる。システインまたは他の不安定性残基の欠失も望ましいかもしれない。潜在的タンパク質分解部位（例えば、Arg）の欠失または置換を、例えば、1つの塩基性残基の欠失またはそのグルタミニル残基もしくはヒスチジル残基への置換によって行う。

【0057】

一定の翻訳後誘導は、発現したポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミニル残基およびアスパラギニル残基を、頻繁に、翻訳後に対応するグルタミル残基およびアスパリル残基に脱アミド化する。あるいは、これらの残基を、弱酸性条件下で脱アミド化する。他の翻訳後修飾には、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリル残基もしくはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のo-アミノ基のメチル化（T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco pp 79-86 [1983]）、N末端アミンのアセチル化、いくつかの例では、C末端カルボキシルのアミド化が含まれる。

30

【0058】

開示の組成物に組み込むことができる多数のアミノ酸およびペプチドのアナログが存在することが理解される。例えば、表3に示したアミノ酸と異なる機能的置換を有する多数のDアミノ酸またはアミノ酸が存在する。天然に存在するペプチドと反対の立体異性体およびペプチドアナログの立体異性体を開示する。これらのアミノ酸を、tRNA分子への最適なアミノ酸の補充および部位特異的方法でペプチド鎖へアナログアミノ酸を挿入するために例えばアンバーコドンを使用する遺伝子構築物の操作によってポリペプチド鎖に容易に組み込むことができる（Thorsenら, Methods in Molec. Biol. 77: 43-73 (1991), Zoller, Current Opinion in Biotechnology, 3: 348-354 (1992); Ibbá, Biotechnology & Genetic Engineering Review 50

40

50

ews 13: 197 - 216 (1995), Cahillら, TIBS, 14 (10) : 400 - 403 (1989); Benner, TIB Tech, 12: 158 - 163 (1994); Ibba and Hennecke, Biotechnology, 12: 678 - 682 (1994) (その全てが、少なくともアミノ酸アナログに関連する材料について本明細書中で参照により援用される)。

【0059】

ポリペプチドに類似しているが、天然のペプチド結合を介して連結されていない分子を产生することができる。例えば、アミノ酸またはアミノ酸アナログの結合には、 CH_2N $\text{H} \cdots$ 、 $\cdots \text{CH}_2\text{S} \cdots$ 、 $\cdots \text{CH}_2 \cdots \text{CH}_2 \cdots$ 、 $\cdots \text{CH} = \text{CH} \cdots$ (シスおよびトランス)、 $\cdots \text{COCH}_2 \cdots$ 、 $\cdots \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2 \cdots$ 、および $\cdots \text{CHH}_2\text{SO} \cdots$ が含まれ得る (これらおよびその他を、Spatola, A. F. in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (March 1983), Vol. 1, Issue 3, Peptide Backbone Modifications (general review); Morley, Trends Pharm Sci (1980) pp. 463 - 468; Hudson, D. ら, Int J Pept Prot Res 14: 177 - 185 (1979) ($\cdots \text{CH}_2\text{NH} \cdots$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2 \cdots$); Spatolaら、Life Sci 38: 1243 - 1249 (1986) ($\cdots \text{CH} \text{H}_2 \cdots \text{S}$); Hann J. Chem. Soc Perkin Trans. I 307 - 314 (1982) ($\cdots \text{CH} \cdots \text{CH} \cdots$ 、シスおよびトランス); Almquistら、J. Med. Chem. 23: 1392 - 1398 (1980) ($\cdots \text{COCH}_2 \cdots$); Jennings-Whiteら、Tetrahedron Lett 23: 2533 (1982) ($\cdots \text{COCH}_2 \cdots$); Szelkeら、European Appln, EP 45665 CA (1982): 97: 39405 (1982) ($\cdots \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2 \cdots$); Holladayら、Tetrahedron. Lett 24: 4401 - 4404 (1983) ($\cdots \text{C}(\text{OH})\text{CH}_2 \cdots$) ; および Hruby Life Sci 31: 189 - 199 (1982) ($\cdots \text{CH}_2 \cdots \text{S} \cdots$) (それぞれ、本明細書中で参照により援用される)に見出すことができる)。ペプチドアナログが結合原子の間に1つを超える原子 (b-アラニンおよびg-アミノ酪酸など)を有することができると理解される。

【0060】

アミノ酸アナログおよびペプチドアナログは、しばしば、強化されたか望ましい性質 (より経済的な产生、より高い化学的安定性、強化された薬理学的性質 (半減期、吸収、力価、効力など)、特異性の変化 (例えば、広範な生物活性)、抗原性の減少、より高い生物学的障壁 (例えば、腸、血管、血液脳関門) を通過する能力など)を有する。

【0061】

D型アミノ酸を使用して、より安定なペプチドを生成することができる。これは、D型アミノ酸がペプチダーゼなどによって認識されないからである。コンセンサス配列の1つ以上のアミノ酸の同型のD型アミノ酸との体系的置換 (例えば、L-リジンのD-リジンとの置換)を使用して、より安定なペプチドを生成することができる。システイン残基を使用して、2つ以上のペプチドを環状化するか結合することができる。これは、ペプチドを特定の高次構造に制約するのに有利であり得る (Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992) (本明細書中で参照により援用される)。

【0062】

本明細書中に開示の遺伝子およびタンパク質の任意の変異体、修飾物、または誘導体を定義するための1つの方法が、特定の公知の配列に対する配列同一性 (本明細書中で相同性ともいう)に関する変異体、修飾物、および誘導体の定義によると理解される。記載ま

10

20

30

40

50

たは公知の配列に対して少なくとも 65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 % の配列同一性を有する本明細書中に開示の核酸およびポリペプチドの変異体を特に開示する。当業者は、どのようにして 2 つのタンパク質または核酸の配列同一性を決定するかを容易に理解している。例えば、配列同一性を、配列同一性がその最も高いレベルとなるような 2 つの配列のアラインメント後に計算することができる。

【0063】

配列同一性の別の計算方法を、公開されたアルゴリズムによって行うことができる。比較に最適な配列アラインメントを、Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981) の局所的配列同一性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970) の配列同一性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 2444 (1988) の方法に類似の検索、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実施 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI の GAP, BESTFIT, FASTA, および TFASTA)、または目視 (inspection) によって行うことができる。これらの引例は、配列同一性の計算方法についてその全体が本明細書中で参照により援用される。

10

20

【0064】

核酸についての同型の配列同一性を、例えば、Zuker, M. Science 244: 48-52, 1989, Jaeger ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7706-7710, 1989, Jaeger ら、Methods Enzymol. 183: 281-306, 1989 (少なくとも核酸アラインメントに関連する材料について本明細書中で参照により援用される) に開示のアルゴリズムによって得ることができる。

【0065】

したがって、提供したポリペプチドは、NBS1 の C 末端と少なくとも 65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。したがって、1 つの態様では、提供したポリペプチドは、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、および配列番号 10 と少なくとも 65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

9. 核酸

本明細書中に提供したポリペプチドをコードする単離核酸も提供する。例えば、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、および配列番号 10 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする単離核酸を開示する。したがって、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、または配列番号 50 に記載の核酸配列を含む単離核酸を開示する。

40

【0066】

開示の核酸は、例えば、ヌクレオチド、ヌクレオチドアノログ、またはヌクレオチド置換物からできている。これらおよび他の分子の非限定的な例は、本明細書中に考察されている。例えば、ベクターが細胞中で発現する場合、発現した mRNA は、典型的には、A、C、G、および U でできているであろうと理解される。

50

【0067】

「単離核酸」または「精製核酸」は、本発明のDNAが由来する生物の天然に存在するゲノム中の遺伝子に隣接する遺伝子を含まないDNAを意味する。したがって、この用語には、例えば、ベクター（自律複製するプラスミドまたはウイルスなど）に組み込まれたか、原核生物または真核生物のゲノムDNA（例えば、導入遺伝子）に組み込まれたか、個別の分子（例えば、PCR、制限エンドヌクレアーゼ消化、または化学合成もしくはin vitro合成によって產生されたcDNA、ゲノム、またはcDNAフラグメント）として存在する組換えDNAが含まれる。これには、さらなるポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも含まれる。用語「単離核酸」は、RNA（例えば、単離DNA分子によってコードされるmRNA分子、化学合成されたmRNA分子、または少なくともいくつかの細胞成分から分離されているか実質的に含まれないmRNA分子（例えば、他の型のRNA分子またはポリペプチド分子））もいう。

【0068】

したがって、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、および配列番号10のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離核酸を提供する。したがって、提供した核酸は、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、または配列番号50の核酸配列を含むことができる。

【0069】

本明細書中に提供した核酸を、発現調節配列に作動可能に連結することができる。核酸が発現調節配列に作動可能に連結された、1つ以上の本明細書中に提供した核酸を含むベクターも提供する。in vitroまたはin vivoのいずれかで核酸を細胞に送達するために使用することができる多数の組成物および方法が存在する。これらの方針および組成物を、以下の2つのクラスに大まかに分類することができる：ウイルスベースの送達系および非ウイルスベースの送達系。例えば、核酸を、多数の直接送達系（エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム沈降、プラスミド、ウイルスベクター、ウイルス核酸、ファージ核酸、ファージ、コスミドなど）または細胞もしくはカチオン性リポソームなどのキャリア中の遺伝子材料の導入によって送達することができる。適切なトランスフェクション手段（ウイルスベクター、化学的トランスフェクタント、または物理機械的方法（エレクトロポレーションおよびDNAの直接拡散など）が含まれる）は、例えば、Wolff, J. A., et al., Science, 247, 1465-1468, (1990)；およびWolff, J. A. Nature, 352, 815-818, (1991)に記載されている。かかる方法は、当該分野で周知であり、本明細書中に記載の組成物および方法との使用に容易に適用可能である。一定の場合、巨大なDNA分子で特異的に機能するように方法を修正するであろう。さらに、これらの方法を使用して、キャリアのターゲティング特性の使用によって一定の疾患および細胞集団を標的することができる。

10. ベクター

ポリペプチドが全長NBS1を含まない、NBS1のカルボキシ末端アミノ酸配列またはその保存的変異体をコードする核酸を含むベクターを本明細書中に提供する。ATMのNBS1結合配列またはその保存的変異体をコードする核酸を含むベクターも本明細書中に提供する。例えば、ポリペプチドは、NBS1に結合するATMのheat反復配列またはそのフラグメントを含むことができる。好ましいベクターは、低酸素症腫瘍組織を標的する。したがって、ベクターは、低酸素症-標的アデノウイルスベクターであり得る。

【0070】

導入ベクターは、遺伝子を細胞（例えば、プラスミド）に送達させるために使用される任意のヌクレオチド構築物または一般的な遺伝子送達ストラテジーの一部（例えば、組換えレトロウイルスまたはアデノウイルスの一部）であり得る（Ramr, Cancer Res. 53: 83-88, (1993)）。

【0071】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用される場合、プラスミドまたはウイルスベクターは、分解することなく開示の核酸（配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、または配列番号50など）を細胞に輸送する媒介物（agent）であり、送達される細胞中で遺伝子を発現するプロモーターが含まれる。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ウイルスまたはレトロウイルスのいずれかに由来する。ウイルスベクターは、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、AIDSウイルス、神経栄養性ウイルス（neuronal trophic virus）、シンドビスウイルス、および他のRNAウイルス（HIV骨格を有するこれらのウイルスが含まれる）である。ベクターとしての使用を適切にするこれらのウイルスの性質を共有する任意のウイルスファミリーも開示する。レトロウイルスには、マウスモロニーマウス白血病ウイルス（MMLV）およびベクターとしてMMLVの所望の性質を発現するレトロウイルスが含まれる。レトロウイルスベクターは、他のウイルスベクターより大きな遺伝子負荷量（すなわち、導入遺伝子またはマークー遺伝子）を保有することができ、この理由のために、一般的に使用されているベクターである。しかし、これらは、非増殖細胞で有用ではない。アデノウイルスベクターは、比較的安定であり、操作しやすく、力価が高く、エアロゾール処方物中に送達させることができ、非分割細胞にトランスフェクトすることができる。ポックスウイルスベクターは、巨大であり、いくつかの遺伝子挿入部位を有し、熱安定性であり、室温で保存することができる。ウイルス抗原によって惹起される宿主生物の免疫応答を抑制するように操作されたウイルスベクターも開示する。この型のベクターは、インターロイキン8または10のコード領域を保有することができる。

10

20

30

40

50

【0072】

ウイルスベクターは、化学的または物理的に遺伝子を細胞に導入する方法よりも高い処理能力（遺伝子導入能力）を有することができる。典型的には、ウイルスベクターは、非構造初期遺伝子、構造後期遺伝子、RNAポリメラーゼI I I 転写物、複製およびキャプシド形成に必要な逆末端反復、ならびにウイルスゲノムの転写および複製を調節するためのプロモーターを含む。ベクターとして操作する場合、ウイルスは、典型的には、1つ以上の初期遺伝子を除去するか、遺伝子または遺伝子／プロモーターカセットを除去したウイルスDNAの代わりにウイルスゲノムに挿入する。この構築物型は、約8kbまでの外来遺伝子材料を保有することができる。除去した初期遺伝子の必要な機能を、典型的には、初期遺伝子の遺伝子産物をトランスで発現するように操作された細胞株によって供給する。

【0073】

レトロウイルスは、レトロウイルス科のウイルスファミリーに属する動物ウイルス（任意の型、亜科、属、または向性が含まれる）である。レトロウイルスベクターは、一般に、Verma, L M ., *Retroviral vectors for gene transfer*. In *Microbiology - 1985*, American Society for Microbiology, pp. 229 - 232, Washington, (1985)（本明細書中で参照により援用される）に記載されている。遺伝子療法のためのレトロウイルスベクターの使用方法の例は、米国特許第4,868,116号および同第4,980,286号；PCT出願WO90/02806号およびWO89/07136号；およびMulligan, (Science 260: 926 - 932 (1993))（その教示が本明細書中で参照により援用される）に記載されている。

【0074】

レトロウイルスは、本質的に、核酸カーゴ（nucleic acid cargo）にパッケージングしたパッケージである。核酸カーゴは、パッケージングシグナルを備え、それにより、複製された娘分子が確実にパッケージコート内に有効にパッケージングされる。パッケージシグナルに加えて、シスで複製および複製されたウイルスのパッケージングに必要な多数の分子が存在する。典型的には、レトロウイルスゲノムは、タンパク質コートの作製に関するgag、pol、およびenv遺伝子を含む。このgag、pol

1、およびenv遺伝子は、典型的には、標的細胞に導入されるべき外来DNAと置換される。レトロウイルスベクターは、典型的には、パッケージコートへの組み込みのためのパッケージングシグナル、gag転写単位の開始をシグナル伝達する配列、逆転写に必要なエレメント（逆転写のtRNAプライマーに結合するためのプライマー結合部位が含まれる）、DNA合成中にRNA鎖の切り替えをガイドする末端反復配列、第2のDNA合成鎖の合成のためのプライミング部位としての機能を果たすプリンリッチ配列5'～3'LTRおよび宿主ゲノムに挿入するためのレトロウイルスのDNA状態（DNA state）を挿入することができるLTRの末端付近の特異的配列を含む。gag、pol、およびenv遺伝子の除去によって約8kbの外来配列をウイルスゲノムに挿入することが可能であり、逆転写が可能になり、複製の際に新規のレトロウイルス粒子にパッケージング可能になる。この核酸の量は、各転写物のサイズに応じて、1つから多数の遺伝子の送達に十分である。

10

【0075】

ほとんどのレトロウイルスベクターにおいて複製機構およびパッケージングタンパク質（gag、pol、およびenv）が除去されているので、典型的には、パッケージング細胞株にベクターを配置することによってベクターを生成する。パッケージング細胞株は、複製およびパッケージング機構を含むが、いかなるパッケージングシグナルも欠くレトロウイルスでトランスフェクトまたは形質転換された細胞株である。最適なDNAを保有するベクターをこれらの細胞株にトランスフェクトする場合、目的の遺伝子を含むベクターは、ヘルパー細胞によってシスで提供される機構によって新規のレトロウイルス粒子に複製およびパッケージングされる。必要なシグナルを欠くので、この機構のためのゲノムはパッケージングされない。

20

【0076】

複製欠損アデノウイルスの構築物は、記載されている（Berknerら, J. Virology 61: 1213-1220 (1987); Massieら, Mol. Cell. Biol. 6: 2872-2883 (1986); Haj-Ahmadら, J. Virology 57: 267-274 (1986); Davidsonら, J. Virology 61: 1226-1239 (1987); Zhang 'Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis' Biotechnology 15: 868-872 (1993)）。これらのウイルスのベクターとしての使用の利点は、これらのウイルスが最初の感染細胞内で複製することができるが新規の感染性ウイルス粒子を形成することができないので、他の細胞型に拡大することができる範囲が制限されるという点である。組換えアデノウイルスは、気道上皮、肝細胞、血管内皮、CNS実質、および多数の他の組織部位への直接in vivo送達後に高効率遺伝子導入を達成することが示されている（Morsy, J. Clin. Invest. 92: 1580-1586 (1993); Kirshenbaum, J. Clin. Invest. 92: 381-387 (1993); Roessler, J. Clin. Invest. 92: 1085-1092 (1993); Moullier, Nature Genetics 4: 154-159 (1993); La Salle, Science 259: 988-990 (1993); Gomez-Foix, J. Biol. Chem. 267: 25129-25134 (1992); Rich, Human Gene Therapy 4: 461-476 (1993); Zabner, Nature Genetics 6: 75-83 (1994); Guzman, Circulation Research 73: 1201-1207 (1993); Bout, Human Gene Therapy 5: 3-10 (1994); Zabner, Cell 75: 207-216 (1993); Caillaud, Eur. J. Neuroscience 5: 1287-1291 (1993); およびRagot, J. Gen. Virology 74: 501-507 (1993)）。組換えアデノウイルスは、特定の細胞表面受容体への結合によって遺伝子形

30

40

50

質導入が実現され、その後、野生型または複製欠損アデノウイルスと同一の様式での受容体媒介性エンドサイトーシスによってウイルスを内在化する (Chardonnnet and Dales, *Virology* 40: 462-477 (1970); Brown and Burlingham, *J. Virology* 12: 386-396 (1973); Svensson and Persson, *J. Virology* 55: 442-449 (1985); Seth, ら, *J. Virol.* 51: 650-655 (1984); Seth, ら, *Mol. Cell. Biol.* 4: 1528-1533 (1984); Varga ら, *J. Virology* 65: 6061-6070 (1991); Wickham ら, *Cell* 73: 309-319 (1993))。

【0077】

10

ウイルスベクターは、E 1 遺伝子が除去されたアデノウイルスを基本としたウイルスであり得、これらのビリオン (viroon) を、ヒト 293 細胞株などの細胞株中で生成する。1つの態様では、E 1 遺伝子および E 3 遺伝子の両方を、アデノウイルスゲノムから除去する。

【0078】

20

別のウイルスベクター型は、アデノ随伴ウイルス (AAV) に基づく。この欠損パルボウイルスは、多数の細胞型に感染することができ、ヒトに対して非病原性を示す。AAV 型ベクターは、約 4 ~ 5 kb を輸送することができ、野生型 AAV は第 19 染色体に安定に挿入されることが公知である。一例として、このベクターは、Avigen、San Francisco、CA によって產生された P4.1C ベクターであり得、これは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子、HSV-tk、および / またはマーカー遺伝子 (緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする遺伝子など) を含むことができる。

【0079】

別の AAV ウイルス型では、AAV は、異種遺伝子に作動可能に連結された細胞特異的発現を指示するプロモーターを含む少なくとも 1 つのカセットに隣接する逆末端反復 (ITR) 対を含む。この文脈における異種は、AAV または B19 パルボウイルスを起源としない任意のスクレオチド配列または遺伝子をいう。

【0080】

30

典型的には、AAV および B19 コード領域が欠失されると、安全で非毒性のベクターが得られる。AAV ITR またはその修飾物は、感染性および部位特異的組み込みを付与するが、細胞傷害性を示さず、プロモーターは細胞特異的発現を指示する。米国特許第 6,261,834 号は、AAV ベクターに関する材料について本明細書中で参照により援用される。

【0081】

したがって、開示のベクターは、実質的な毒性を示さずに哺乳動物染色体に組み込むことができる DNA 分子を提供する。

【0082】

40

ウイルスおよびレトロウイルス中の挿入遺伝子は、通常、プロモーターおよび / または所望の遺伝子産物の発現の調節を補助するためのエンハンサーを含む。プロモーターは、一般に、転写開始部位に関して比較的固定された位置に存在する場合に機能する DNA 配列である。プロモーターは、RNA ポリメラーゼの基本的相互作用に必要なコアエレメントおよび転写因子を含み、上流エレメントおよび応答エレメントを含むことができる。

【0083】

巨大なヒトヘルペスウイルスを使用した分子遺伝学的実験により、巨大な異種 DNA フラグメントをクローニングし、増殖させ、ヘルペスウイルスの感染に許容状態の細胞中に確立することができる手段が得られた (Sun ら, *Nature genetics* 8: 33-41, 1994; Cotter and Robertson, *Curr Opin Mol Ther* 5: 633-644, 1999)。これらの巨大な DNA ウィルス (単純ヘルペスウイルス (HSV) およびエプスタイン・バーウィルス (EBV)) は、150 kb を超えるヒト異種 DNA フラグメントを特定の細胞に送達させる能力を有

50

する。E B V 組換え体は、感染B細胞中にエピソームDNAとして巨大なDNA片を保持することができる。330kbまでのヒトゲノムインサートを保持した各クローンは遺伝的に安定なようである。これらのエピソームの維持には、E B Vの感染中に構成性に発現される特定のE B V核タンパク質(E B N A 1)が必要である。さらに、これらのベクターをトランスフェクションのために使用することができ、それにより、大量のタンパク質をin vitroで一過性に生成することができる。ヘルペスウイルスアンプリコン系を使用して、220kbを超えるDNA片をパッケージングして細胞に感染し、エピソームとしてDNAを安定に保持することもできる。

【0084】

他の有用な系には、例えば、複製および宿主制限非複製ワクシニアウイルスベクターが含まれる。

【0085】

開示の組成物を、種々の方法で標的細胞に送達させることができる。例えば、組成物を、エレクトロポレーション、リポフェクション、またはリン酸カルシウム沈降によって送達させることができる。送達機構の選択は、ターゲティングした細胞型および送達が、例えば、in vivoまたはin vitroのいずれでおこるかに一部依存するであろう。

【0086】

したがって、組成物は、開示のポリペプチド、核酸、またはベクターに加えて、例えば、リポソーム(カチオン性リポソーム(例えば、DOTMA、DOPPE、DC-コレステロール)またはアニオン性リポソームなど)などの脂質を含むことができる。リポソームは、さらに、必要に応じて、特定の細胞のターゲティングを容易にするためのタンパク質を含むことができる。化合物およびカチオン性リポソームを含む組成物を、標的器官に向かう(afferent to)血液に投与することができるか、気道の標的細胞に向かう気道に吸入することができる。リポソームについては、例えば、Brighamら、Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. 1: 95-100 (1989); F elgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417 (1987); 米国特許第4,897,355号を参照のこと。さらに、化合物を、特定の細胞型(マクロファージなど)にターゲティングすることができるマイクロカプセル成分として投与することができるか、特定の速度または投薬量にするためにマイクロカプセルからの化合物の拡散または化合物の送達をデザインする。

【0087】

被験体の細胞への外因性DNAの投与および取り込みを含む上記の方法(すなわち、遺伝子形質導入またはトランスフェクション)では、細胞への組成物の送達は種々の機構を経由し得る。一例として、送達は、リポソーム(市販のリポソーム調製物(リポフェクチン、リポフェクタミン(GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD)、SUPERFECT(Qiagen, Inc. Hilden, Germany)、およびTRANSFECTAM(Promega Biotech, Inc., Madison, WI)など)および当該分野で標準的な手順に従って開発された他のリポソームを使用)を経由し得る。さらに、開示の核酸またはベクターを、エレクトロポレーション(Genetronics, Inc. (San Diego, CA)から利用可能なテクノロジー)およびSONOPORATION装置(Imarx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ)によってin vivoで送達させることができる。

【0088】

宿主細胞ゲノムに組み込まれるべき細胞に送達される核酸は、典型的には、組み込み配列を含む。これらの配列は、しばしば、特に、ウイルスベースの系を使用する場合、ウイルス関連配列である。これらのウイルス組み込み系を、非核酸ベースの送達系(リポソームなど)を使用して送達すべき核酸に組み込むこともでき、その結果、送達系に含まれる核酸が宿主ゲノムに組み込まれるようになり得る。

10

20

30

40

50

【0089】

他の一般的な宿主ゲノムへの組み込み技術には、例えば、宿主ゲノムでの相同組換えが促進されるようにデザインされた系が含まれる。これらの系は、典型的には、宿主細胞ゲノム内の標的配列と十分な相同性を有する発現すべき核酸に隣接する配列に依存する。この系により、ベクター核酸と標的核酸との間で組換えが起こり、送達された核酸が宿主ゲノムに組み込まれる。相同組換えを促進するために必要なこれらの系および方法は、当業者に公知である。

【0090】

当該分野で周知の種々の機構（例えば、裸のDNAの取り込み、リポソーム融合、遺伝子銃によるDNAの筋肉内注射、およびエンドサイトーシスなど）によって *in vivo* および／または *ex vivo* で組成物を被験体の細胞に送達させることができる。

10

【0091】

ex vivo 法を使用する場合、当該分野で周知の標準的プロトコールに従って、細胞または組織を除去し、体外に保持することができる。組成物を、任意の遺伝子導入機構（例えば、リン酸カルシウム媒介遺伝子送達、エレクトロポレーション、微量注入、またはプロテオリポソームなど）によって細胞に導入することができる。次いで、形質導入された細胞を、細胞または組織型についての標準的方法によって、（例えば、薬学的に許容可能なキャリア中で）融合するか、被験体中の同位置に移植して戻すことができる。被験体への種々の細胞の移植または注入についての標準的方法は公知である。

20

【0092】

細胞に送達される核酸は、典型的には、発現調節系を含む。例えば、ウイルス系およびレトロウイルス系中の挿入遺伝子は、通常、プロモーターおよび／または所望の遺伝子産物の発現の調節を補助するためのエンハンサーを含む。プロモーターは、一般に、転写開始部位に関して比較的固定された位置に存在する場合に機能するDNA配列である。プロモーターは、RNAポリメラーゼの基本的相互作用に必要なコアエレメントおよび転写因子を含み、上流エレメントおよび応答エレメントを含むことができる。

20

【0093】

哺乳動物宿主細胞中でベクター由来の転写を調節するプロモーターを、種々の供給源（例えば、ポリオーマ、サルウイルス40（SV40）、アデノウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルスなどのウイルスのゲノム、または異種哺乳動物プロモーター（例えば、アクチンプロモーター）から得ることができる。SV40ウイルスの初期プロモーターおよび後期プロモーターを、SV40ウイルス複製起点も含むSV40制限フラグメントとして得ることが都合が良い（Fiersら, *Nature*, 273: 113 (1978)）。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターを、HindIII E制限フラグメントとして得ることが都合が良い（Greenway, PJ.ら, *Gene* 18: 355-360 (1982)）。勿論、宿主細胞または関連種由来のプロモーターも本明細書中で有用である。

30

【0094】

エンハンサーは、一般に、固定されていない転写開始部位からの距離で機能するDNA配列をいい、転写単位に対して5' (Laimins, L.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 993 (1981)) または3' (Lusky, M. L.ら, Mol. Cell. Bio. 3: 1108 (1983)) のいずれかであり得る。さらに、エンハンサーは、イントロン内 (Banerji, J. L.ら, Cell 33: 729 (1983)) およびコード配列内 (Osborne, T. F. ら, Mol. Cell. Bio. 4: 1293 (1984)) に存在し得る。エンハンサーは、通常、長さが10bpと300bpとの間であり、シスで機能する。エンハンサーは隣接プロモーター由来の転写を増加させるように機能する。エンハンサーはまた、しばしば、転写調節を媒介する応答エレメントを含む。プロモーターはまた、転写調節を媒介する応答エレメントを含むことができる。エンハンサーは、しばしば、遺伝子発現の調節を決定する。哺乳動物遺伝子由来の多数のエンハンサー配列が現在公知である一方で（グロビン、エラスター

40

50

ゼ、アルブミン、-フェトタンパク質、およびインスリン)、典型的には、一般的発現のために真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用するであろう。例は、複製起点の後期側(b p 1 0 0 - 2 7 0)のS V 4 0 エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーター-エンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーである。

【0095】

プロモーターおよび/またはエンハンサーを、その機能を惹起する光または特定の化学的事象のいずれかによって特異的に活性化することができる。系を、テトラサイクリンおよびデキサメタゾンなどの試薬によって調節することができる。線などの照射またはアルキル化化学療法薬への曝露によってウイルスベクターの遺伝子発現を増強する方法も存在する。

10

【0096】

一定の実施形態では、プロモーターおよび/またはエンハンサー領域は、転写されるべき転写単位領域の発現を最大にするための構成性プロモーターおよび/またはエンハンサーとして作用することができる。一定の構築物では、特定の期間に特定の細胞型のみで発現する場合であっても、プロモーターおよび/またはエンハンサー領域は全ての真核細胞型で活性である。このプロモーター型は、CMVプロモーター(650塩基)である。他のかかるプロモーターは、S V 4 0 プロモーター、サイトメガロウイルス(全長プロモーター)、およびレトロウイルスベクターLTRである。

20

【0097】

全ての特異的調節エレメントをクローン化し、これを使用して黒色腫細胞などの特定の細胞型で選択的に発現する発現ベクターを構築することができる。グリア細胞線維性酸性タンパク質(glial fibrillary acidic protein)(G F A P)プロモーターを使用して、グリア起源の細胞中で遺伝子が選択的に発現されている。

20

【0098】

真核宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または有核細胞)中で使用される発現ベクターは、m R N A 発現に影響を及ぼすことができる転写終結に必要な配列を含むこともできる。これらの領域は、組織因子タンパク質をコードするm R N Aの非翻訳部分中のポリアデニル化セグメントとして転写される。3'非翻訳領域には、転写終結部位も含まれる。転写単位は、ポリアデニル化領域も含むことができる。この領域の1つの利点は、転写された単位をプロセシングしてm R N Aのように輸送される可能性が増大するという点である。発現構築物中のポリアデニル化シグナルの同定および使用は十分に確立されている。相同ポリアデニル化シグナルを、導入遺伝子構築物中で使用することができる。一定の転写単位では、ポリアデニル化領域は、S V 4 0 初期ポリアデニル化シグナルに由来し、約400塩基からなる。転写された単位は、他の標準的配列を単独で含むか、上記の配列と組み合わせて、構築物由来の発現または構築物の安定性を改善する。

30

【0099】

ウイルスベクターは、マーカー産物をコードする核酸配列を含むことができる。このマーカー産物を使用して、遺伝子が細胞に送達され、一旦送達されると、発現するかどうかを決定する。例示的マーカー遺伝子は、-ガラクトシダーゼをコードする大腸菌lacZ 遺伝子および緑色蛍光タンパク質である。

40

【0100】

いくつかの実施形態では、マーカーは選択マーカーであり得る。哺乳動物細胞に適切な選択マーカーの例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(D H F R)、チミジンキナーゼ、ネオマイシン、ネオマイシンアナログG 4 1 8、ハイグロマイシン(h y d r o m y c i n)、およびピューロマイシンである。かかる選択マーカーが哺乳動物宿主細胞に首尾よく導入される場合、形質転換された哺乳動物宿主細胞は、選択圧下におかれた場合に生存することができる。2つの広範に使用されている異なる選択レジーム(r e g i m e) カテゴリーが存在する。第1のカテゴリーは、細胞の代謝および補足培地と無関係に成長する能

50

力を欠く変異細胞株の使用に基づく。2つの例は以下である：チャイニーズハムスター卵巣（C H O）D H F R - 細胞およびマウスL T K - 細胞。これらの細胞は、チミジンまたはヒポキサンチンなどの栄養素を添加することなく成長する能力を欠く。これらの細胞が完全なヌクレオチド合成経路に必要な一定の遺伝子を欠くので、これらの細胞は、補足培地中に失われたヌクレオチドを供給しない限り、成長できない。培地への補足の代替方法は、各遺伝子を欠く細胞にインタクトなD H F R 遺伝子またはT K 遺伝子を導入し、それにより、その成長要件を変更することである。D H F R 遺伝子またはT K 遺伝子で形質転換されなかった各細胞は、非補足培地中で成長することができないであろう。

【0101】

第2のカテゴリーは、優性選択（dominant selection）であり、これは、任意の細胞型で使用される選択スキームをいい、変異細胞株の使用を必要としない。これらのスキームは、典型的には、宿主細胞の成長を停止させるための薬物を使用する。新規の遺伝子を有する細胞は、薬物耐性を伝達するタンパク質を発現し、選択を生き延びるであろう。かかる優性選択の例は、薬物ネオマイシン（Southern P. and Berg, P., J. Molec. Appl. Genet. 1: 327 (1982)）、ミコフェノール酸（Mulligan, R. C. and Berg, P. Science 209: 1422 (1980)）、またはハイグロマイシン（Sugden, B.ら, Mol. Cell. Biol. 5: 410-413 (1985)）を使用する。この3つの例は、真核生物調節下で、それぞれ適切な薬物G 418またはネオマイシン（ジェネシン）、x g p t（ミコフェノール酸）、またはハイグロマイシンに対する耐性を伝達するための細菌遺伝子を使用する。他には、ネオマイシンアログG 418およびピューロマイシン（p u r a m y c i n）が含まれる。

11. アデノウイルス媒介性腫瘍遺伝子療法

腫瘍ウイルス療法は、癌治療の新規のプラットフォームを示す。魅力的な特徴には、腫瘍選択的ターゲティングおよび現在の治療に対する交差耐性がないことが含まれる。サブグループCにおけるヒトアデノウイルス（Ad）（例えば、Ad 5）は、若年小児において無症候性または軽度の呼吸器感染を引き起こす病原体であり、終生免疫（l i f e l o n g i mm u n i t y）を誘導する。その結果、腫瘍遺伝子療法のためのアデノウイルスペクターは、魅力的で非常に興味深い。抗癌療法のための2つのAdベクター型（複製欠損および複製コンピテント）が開発されている（Ad a m a n d N a s z, 2001; Glassgowら, 2006）。広範な種々の腫瘍ターゲティング機構（免疫調節遺伝子療法、腫瘍抑制因子遺伝子療法、および化学遺伝子療法）を有する非常に多数の非複製抗腫瘍アデノウイルスペクターがデザインされている。腫瘍細胞中で選択的に複製され、それにより、腫瘍が溶解するような複製コンピテントベクターがデザインされている。両ベクター型において臨床試験から抗腫瘍効果の証拠が報告されているにもかかわらず、実質的な臨床上の利点を得るために有効性を改善しなければならない。従来の放射線療法を使用した組み込み遺伝子療法のアプローチはあまり調査および開発されていないが、標的療法に有望である。異なる腫瘍ターゲティング機構を同時に使用するかかる組み合わせにより、相乗的な抗腫瘍効果が得られ、最大の抗腫瘍効果を得ることができる。したがって、低酸素症腫瘍組織中でw t N I Pを発現する低酸素症誘導性アデノウイルスペクターを本明細書中に開示する。この遺伝子治療ベクターは、以下の2つの特徴を有する：1)腫瘍選択性ターゲティングおよび低酸素症特異的ターゲティング、および2)腫瘍放射線増感。

12. 細胞

1つ以上の本明細書中に提供したベクターを含む細胞も提供する。本明細書中で使用される場合、「細胞」、「細胞株」、および「細胞培養物」を、交換可能に使用することができ、全てのかかる名称には子孫が含まれる。開示の細胞は、本明細書中に提供したベクターをクローン化または増殖するために使用される任意の細胞であり得る。したがって、細胞は、任意の初代細胞培養物または株化細胞株に由来し得る。本方法を、任意の細胞（原核細胞または真核細胞（細菌、植物、および動物など）が含まれる）に適用することが

10

20

30

30

40

50

できる。当業者は、細胞型を、ベクターおよび所望の用途の選択に基づいて選択することができる。細胞は、単離細胞または生物中の細胞であり得る。

【0102】

動物内での本明細書中に開示の任意の核酸分子またはベクターでの細胞のトランスフェクションプロセスによって產生された動物を開示する。動物が哺乳動物である、動物内での本明細書中に開示の任意の核酸分子またはベクターでの細胞のトランスフェクションプロセスによって產生された動物を開示する。哺乳動物が、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、または靈長類である、動物内での本明細書中に開示の任意の核酸分子またはベクターでの細胞のトランスフェクションプロセスによって產生された動物も開示する。

10

13. 薬学的に許容可能なキャリア

開示の組成物を、投与、送達、またはインヒビターおよびその使用の他の態様を補助するためにキャリアおよび他の組成物と組み合わせるか、抱合するか、カップリングすることができる。便宜上、かかる組成物を、本明細書中でキャリアという。キャリアは、例えば、小分子、薬品、脂肪酸、検出可能なマーカー、抱合タグ、ナノ粒子、または酵素であり得る。

【0103】

開示の組成物を、治療的に、薬学的に許容可能なキャリアと組み合わせて使用することができる。「薬学的に許容可能な」は、生物学的またはその他で望ましくないわけではない材料を意味する。すなわち、この材料を、いかなる望ましくない生物学的影響を生じることがないか、薬学的組成物中に含まれる薬学的組成物の任意の他の成分と有害な様式で相互作用することなく組成物と共に被験体に投与することができる。当業者に周知のように、キャリアを、必然的に、有効成分の任意の分解を最少にし、被験体における任意の副作用を最小にするように選択するであろう。

20

【0104】

したがって、薬学的に許容可能なキャリア中に1つ以上の本明細書中に提供したポリペプチド、核酸、ベクターを含む組成物を提供する。したがって、薬学的に許容可能なキャリア中に2つ以上の任意の本明細書中に提供したNBS1ポリペプチドの組み合わせを含む組成物を提供する。例えば、薬学的に許容可能なキャリア中に

30

【0105】

【化2】

配列番号 3, 配列番号 4, 配列番号 5,

配列番号 6, 配列番号 7, 配列番号 8, 配列番号 9, 配列番号 10, 配列番号 43,

配列番号 44, 配列番号 45, 配列番号 46, 配列番号 47, 配列番号 48,

配列番号 49, または 配列番号 50

を含む組成物を提供する。

【0106】

適切なキャリアおよびその処方物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A. R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995に記載されている。典型的には、適量の薬学的に許容可能な塩を処方物中で使用して、処方物を等張にする。薬学的に許容可能なキャリアの例には、生理食塩水、リングル液、およびデキストロース溶液が含まれるが、これらに限定されない。溶液のpHは、好ましくは、約pH 5 ~ 約pH 8、より好ましくは、約pH 7 ~ 約pH 7.5である。さらに、キャリアは、徐放性調製物（抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックス（マトリックスは、造形品（例えば、フィルム、リポソーム、または微粒子）の形態である）など）を含む。一定のキャリアが、例えば、投与される組成物の投与経路および濃度に依存し得ることがより好ましいことが当業者に明らかであろう。

40

50

【0107】

薬学的キャリアは、当業者に公知である。これらは、最も典型的には、ヒトへの薬物投与のための標準的なキャリアであろう（滅菌水、生理食塩水、および生理学的pHの緩衝液などの溶液が含まれる）。組成物を、筋肉内または皮下に投与することができる。他の化合物を、当業者によって使用される標準的手順にしたがって投与することができる。

【0108】

薬学的組成物は、選択した分子に加えて、キャリア、増粘剤、希釈剤、緩衝液、防腐剤、および界面活性剤などを含むことができる。薬学的組成物は、抗菌薬、抗炎症薬、および麻酔薬などの1つ以上の有効成分を含むこともできる。

【0109】

非経口投与用調製物は、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液、および乳濁液を含む。非水溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（オリーブ油など）、および注射用有機エステル（オレイン酸エチルなど）である。水性キャリアには、水、アルコール／水溶液、乳濁液、または懸濁液（生理食塩水および緩衝化媒質が含まれる）が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リングルデキストロース、デキストロース、および塩化ナトリウム、乳酸加リングル液、または固定油が含まれる。静脈内ビヒクルには、流動物および栄養補充液、および電解質補充液（リングルデキストロースベースのものなど）などが含まれる。例えば、抗菌薬、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどの防腐剤および他の添加物も存在し得る。

10

【0110】

局所投与用処方物には、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴薬、座剤、スプレー、液体、および粉末が含まれ得る。従来の薬学的キャリア、水性基剤、粉末基剤、または油性基剤、および増粘剤などが必要であるか望ましいかも知れない。

20

【0111】

経口投与用組成物には、粉末または顆粒、水性媒質または非水性媒質の懸濁液または溶液、カプセル、サシェ、または錠剤が含まれる。増粘剤、香味料、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が望ましいかも知れない。

【0112】

いくつかの組成物を、無機酸（塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアノ酸、硫酸、およびリン酸など）および有機酸（ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、およびフマル酸など）との反応または無機塩基（水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウムなど）および有機塩基（モノ、ジ、トリアルキルおよびアリールアミンならびに置換エタノールアミンなど）との反応によって形成された薬学的に許容可能な酸付加塩または塩基付加塩として投与することができる場合がある。

30

【0113】

材料は、（例えば、微粒子、リポソーム、または細胞に組み込まれた）溶液、懸濁液中に存在し得る。これらを、抗体、受容体、または受容体リガンドを介して特定の細胞型にターゲティングすることができる。以下の引例は、特定のタンパク質を腫瘍組織にターゲティングするためのこの技術の使用例である（Senterら, Bioconjugate Chem., 2: 447-451, (1991); Bagshawe, K. D., Br. J. Cancer, 60: 275-281, (1989); Bagshaweら, Br. J. Cancer, 58: 700-703, (1988); Senterら, Bioconjugate Chem., 4: 3-9, (1993); Battelliら, Cancer Immunol. Immunother., 35: 421-425, (1992); Pietersz and McKenzie, Immunol. Rev. 129: 57-80, (1992); and Rofflerら, Biochem. Pharmacol., 42: 2062-2065, (1991)）。「ステルス(stealth)」などのビヒクルおよび他の抗体を、リポソーム（結腸癌に対する脂質媒介性薬物ターゲティング）、細胞特異的リガンドによるDNAの受容体媒介性ターゲティ

40

50

ング、リンパ球指向性腫瘍ターゲティング、および *in vivo* でのマウスグリオーマ細胞の高特異的治療レトロウイルスターゲティングが含まれる) に抱合する。以下の引例は、腫瘍組織に特定のタンパク質をターゲティングするためのこのテクノロジーの使用例である (Hughesら, *Cancer Research*, 49: 6214 - 6220, (1989); および Litzinger and Huang, *Biochemical and Biophysical Acta*, 1104: 179 - 187, (1992))。一般に、受容体は、構成性またはリガンド誘導性のエンドサイトーシス経路に関与する。これらの受容体は、クラスリンコーティングピット中に凝集し、クラスリンコーティング小胞を介して細胞に侵入し、酸性化エンドソームを通過して受容体が分類され、細胞表面に再利用されるか、細胞内で保存されるようになるか、リソソーム中で分解される。内在化経路は、種々の機能 (栄養取り込み、活性化タンパク質の除去、高分子の排除、ウイルスおよび毒素の日和見性侵入 (opportunistic entry)、リガンドの解離および分解、ならびに受容体レベルの調節など) に携わる。多数の受容体は、細胞型、受容体濃度、リガンド型、リガンド結合価、およびリガンド濃度に応じて、1つを超える細胞内経路をたどる。受容体媒介性エンドサイトーシスの分子機構および細胞機構は概説されている (Brown and Greene, *DNA and Cell Biology* 10: 6, 399 - 409 (1991))。

10

【0114】

キャリア分子を、開示のインヒビターに共有結合することができる。キャリア分子を、開示のペプチドのアミノ末端に結合することができる。キャリア分子を、開示のペプチドのカルボキシ末端に結合することができる。キャリア分子を、開示のペプチド内のアミノ酸に結合することができる。本明細書中に提供した組成物は、さらに、キャリア分子および開示のインヒビターを連結するリンカーを含むことができる。開示のインヒビターを、インヒビターでナノシェルの微粒子、ナノ粒子をコーディングするために使用することができるウシ血清アルブミン (BSA) (Tkaachenkoら, (2003) *J Am Chem Soc*, 125, 4700 - 4701 を参照のこと) などのコーティング分子に抱合することもできる。

20

【0115】

インヒビターにキャリア分子を架橋するために使用することができるタンパク質架橋剤 (開示のペプチドなど) は、当該分野で公知であり、その有用性および構造に基づいて定義されており、この架橋剤には、DSS (スペリン酸ジスクシンイミジル)、DSP (ジチオビス (スクシンイミジルプロピオナート))、DTSSP (3,3'-ジチオビス (スルホスクシンイミジルプロピオナート))、SULFO BSO COES (ビス [2-(スルホスクシンイムドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン)、BSO COES (ビス [2-(スクシンイムドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン)、SULFO DST (ジスルホスクシンイミジルタートラート)、DST (ジスクシンイミジルタートラート)、SULFO EGGS (エチレングリコールビス (スクシンイミジルスクシナート))、EGS (エチレングリコールビス (スルホスクシンイミジルスクシナート))、DPDPB (1,2-ジ [3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ブタン)、BSSS (ビス (スルホスクシンイミジル)スペラート)、SMPB (スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチラート)、SULFO SMPB (スルホスクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチラート)、MBS (3-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)、SULFO MBS (3-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル)、SIAB (N-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート)、SULFO SIA B (N-スルホスクシンイミジル (4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート)、SMCC (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-カルボキシラート)、SULFO SMCC (スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート)、NHS LC SPDP (スクシンイミジル-6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアート)、SUL

30

40

50

F O N H S L C S P D P (スルホスクシンイミジル - 6 - [3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオンアミド) ヘキサノアート) 、 S P D P (N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオナート) 、 N H S プロモ A C E T A T E (N - ヒドロキシスクシンイミジルプロモアセタート) 、 N H S ヨード A C E T A T E (N - ヒドロキシスクシンイミジルヨードアセタート) 、 M P B H (4 - (N - マレイミドフェニル) 酪酸ヒドラジドヒドロクロリド) 、 M C C H (4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボン酸ヒドラジドヒドロクロリド) 、 M B H (m - マレイミド安息香酸ヒドラジドヒドロクロリド) 、 S U L F O E M C S (N - (- マレイミドカプロイルオキシ) スルホスクシンイミド) 、 E M C S (N - (- マレイミドカプロイルオキシ) スクシンイミド) 、 P M P I (N - (p - マレイミドフェニル) イソシアナート) 、 K M U H (N - (- マレイミドウンデカン酸) ヒドラジド) 、 L C S M C C (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 (6 - アミドカプロアート)) 、 S U L F O G M B S (N - (- マレイミドブトリルオキシ) スルホスクシンイミドエステル) 、 S M P H (スクシンイミジル - 6 - (- マレイミドプロピオンアミドヘキサノアート)) 、 S U L F O K M U S (N - (- マレイミドウンデカノイルオキシ) スルホスクシンイミドエステル) 、 G M B S (N - (- マレイミドブチロキシ) スクシンイミド) 、 D M P (ピメルイミド酸ジメチル塩酸塩) 、 D M S (スペルイミド酸ジメチル塩酸塩) 、 M H B H (ウッド試薬) (メチル - p - ヒドロキシベンズイミダートヒドロクロリド、 98%) 、 D M A (アジポイミド酸ジメチル塩酸塩) が含まれる。
10

i . ナノ粒子、微粒子、および微小気泡

用語「ナノ粒子」は、ナノメートルで測定されるサイズを有するナノスケールの粒子（例えば、少なくとも一方の直径が約 100 nm 未満のナノスケールの粒子）をいう。ナノ粒子の例には、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラーレン様材料、無機ナノチューブ、デンドリマー（共有結合金属キレートなど）、ナノファイバー、ナノホム（*nanohom*）、ナノオニオン（*nano-onion*）、ナノロッド（*nanorod*）、ナノロープ（*nanorope*）、および量子ドットが含まれる。ナノ粒子は、例えば、光子（高周波および可視光子が含まれる）の吸収および/または放射ならびにプラズモン共鳴によって検出可能なシグナルを生成することができる。
20

【 0116 】

ミクロスフィア（または微小気泡）を、本明細書中に開示の方法と共に使用することができる。発色団を含むミクロスフィアは、広範な種々の適用（光結晶、生体標識、およびマイクロ流体チャネル中での流れの視覚化が含まれる）で利用されている。例えば、Y. Lin, ら, *Appl. Phys. Lett.* 2002, 81, 3134; D. Wang, ら, *Chem. Mater.* 2003, 15, 2724; X. Gao, ら, *J. Biomed. Opt.* 2002, 7, 532; M. Han, ら, *Nature Biotechnology* 2001, 19, 631; V. M. Pai, ら, *Mag. & Magnetic Mater.* 1999, 194, 262 (それぞれ、その全体が本明細書中で参照により援用される) を参照のこと。発色団の光安定性およびミクロスフィアの単分散度は共に重要であり得る。
30

【 0117 】

ナノ粒子（例えば、シリカナノ粒子、金属ナノ粒子、金属酸化物ナノ粒子、または半導体ナノ結晶など）を、ミクロスフィアに組み込むことができる。ナノ粒子の光学的性質、磁性、および電子的性質により、ミクロスフィアに会合しながら観察することができ、ミクロスフィアを同定し、空間的にモニタリングすることができる。例えば、コロイド状に合成した半導体ナノ結晶の高光安定性、良好な蛍光効率、および広範な放射波長可変性により、優れた発色団の選択が可能になる。有機色素と異なり、異なる色（すなわち、異なる波長）を放射するナノ結晶を、単色光源を使用して同時に励起することができる。コロイド状に合成した半導体ナノ結晶（例えば、コア - シェル C d S e / Z n S および C d S / Z n S ナノ結晶など）を、ミクロスフィアに組み込むことができる。ミクロスフィア
40

は、単分散シリカミクロスフィアであり得る。

【0118】

ナノ粒子は、金属ナノ粒子、金属酸化物ナノ粒子、または半導体ナノ結晶であり得る。金属ナノ粒子または金属酸化物ナノ粒子の金属には、チタン、ジルコニウム、ハフニウム、バナジウム、ニオビウム、タンタラム、クロム、モリブデン、タンゲステン、マンガン、テクネチウム、レニウム、鉄、ルテニウム、オスミウム、コバルト、ロジウム、インジウム、ニッケル、パラジウム、白金、銅、銀、金、亜鉛、カドミウム、スカンジウム、イットリウム、ランタン、ランタニド系列およびアクチニド系列の元素（例えば、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、プロメチウム、サマリウム、ユーロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、イッテルビウム、ルテチウム、トリウム、プロトアクチニウム、およびウラン）、ホウ素、アルミニウム、ガリウム、インジウム、タリウム、ケイ素、ゲルマニウム、スズ、鉛、アンチモン、ビスマス、ポロニウム、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウム、およびバリウムが含まれ得る。一定の実施形態では、金属は、鉄、ルテニウム、コバルト、ロジウム、ニッケル、パラジウム、白金、銀、金、セリウム、サマリウムであり得る。金属酸化物は、任意のこれらの材料または材料の組み合わせの酸化物であり得る。例えば、金属は金であり得るか、金属酸化物は酸化鉄、酸化コバルト、酸化亜鉛、酸化セリウム、または酸化チタンであり得る。金属および金属酸化物ナノ粒子の調製物は、例えば、米国特許第5,897,945号および同第6,759,199号（それぞれ、その全体が本明細書中で参照により援用される）に記載されている。

10

20

30

【0119】

例えば、開示の組成物を、シリカナノ粒子（S N P）上に固定することができる。その有利な表面積・体積比、製造の簡潔さ、および蛍光標識、磁性ナノ粒子（Y a n g , H . H . ら、2005）、および半導体ナノ結晶（L i n , Y . W . , ら、2006）を結合することができることによって、S N Pはバイオセンシングおよび触媒のために広く使用されている。

【0120】

ナノ粒子はまた、例えば、発熱ナノシェルであり得る。本明細書中で使用される場合、「ナノシェル」は、1つ以上の導電性シェル層に囲まれた個別の誘電性または半導体コア区分を有するナノ粒子である。米国特許第6,530,944号は、金属ナノシェルの作製および使用方法の教示についてその全体が本明細書中で参照により援用される。

30

【0121】

ターゲティング分子を、開示の組成物および/またはキャリアに結合することができる。例えば、ターゲティング分子は、抗体もしくはそのフラグメント、特定の受容体のリガンド、またはターゲティングすべき細胞表面に特異的に結合する他のタンパク質であり得る。

i i . リポソーム

「リポソーム」は、この用語を本明細書中で使用する場合、内部の水性空間を取り囲む外側の脂質二重層または多重層を含む構造をいう。リポソームを使用して、細胞への送達のために任意の生物活性因子（b i o l o g i c a l l y a c t i v e a g e n t）をパッケージングすることができる。

40

【0122】

リポソーム形成のための材料および手順は、当業者に周知である。適切な媒質中の分散の際、広範な種々のリン脂質が膨潤し、水和し、脂質二重層を分離する水性媒質を有する多重膜の同心円状の二重層小胞を形成する。これらの系を、多重膜リポソームまたは多重膜脂質小胞（m u l t i l a m e l l a r l i p i d v e s i c l e s）（「M L V」）といい、10 nm ~ 100 μMの範囲内の直径を有する。これらのM L Vは、最初に、B a n g h a m ら、J . M o l . B i o l . 1 3 : 2 3 8 - 2 5 2 (1 9 6 5) に記載された。一般に、脂質または親油性物質は、有機溶媒に溶解する。回転蒸発によって真空中などで溶媒を除去する場合、脂質残渣は、容器の壁にフィルムを形成する。次いで、

50

典型的には電解質または親油性の生物活性材料を含む水溶液をフィルムに添加する。搅拌の際に巨大なMLVが產生される。より小さなMLVが望ましい場合、より大きな小胞を、超音波処理、孔サイズが漸減するフィルターによる連続濾過に供するか、他の機械的剪断形態によって小さくする。例えば、加圧射出によってMLVのサイズおよび膜数の両方を減少させることができる技術も存在する (Barenholz, ら, FEBS Lett. 99: 210-214 (1979))。

【0123】

リポソームは、MLVのより広範な超音波処理によって調製された単層小胞の形態を取ることもできる。単層小胞は、水溶液を囲む単一の球状脂質二重層からなる。単層小胞(「ULV」)は、小さく、20~200nmの範囲内の直径を有し得る一方で、より大きなULVは、200nm~2μmの範囲内の直径を有し得る。いくつかの公知の単層小胞の作製技術が存在する。Papahadjopoulos, ら, Biophys Acta Biophys Acta 135: 624-238 (1968)では、リン脂質の水性分散物の超音波処理により、水溶液を囲む脂質二重層を有する小さなULVを產生している。Schneiderの米国特許第4,089,801号は、超音波処理し、その後に両親媒性化合物を含む水性媒質を添加し、遠心分離して生体分子脂質層系を形成する、リポソーム前駆体の形成を記載している。

10

【0124】

小さなULVを、Batzriら, Biophys Acta 298: 1015-1019 (1973)に記載のエタノール注入技術およびDeamer, Biophys Acta 443: 629-634 (1976)のエーテル注入技術によって調製することもできる。これらの方法は、緩衝液への脂質の有機溶液の迅速な注入を含み、これにより、単層リポソームが迅速に形成される。別のULV作製技術は、Wederら、in 'Liposome Technology', ed. G. Gregoriadis, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla., Vol. I, Chapter 7, pg. 79-107 (1984)で教示されている。この界面活性剤除去方法は、搅拌または超音波処理によって界面活性剤を使用して脂質および添加物を可溶化して所望の小胞を生成する工程を含む。

20

【0125】

Papahadjiopoulos, らの米国特許第4,235,871号は、有機溶液中の脂質および水性緩衝液中にカプセル化すべき薬物の油中水滴型乳濁液の形成を含む逆相蒸発技術による巨大ULVの調製を記載している。有機溶媒を加圧下で除去して混合物を得て、これを水性媒質中での搅拌または分散の際に巨大ULVに変換する。Suzukiらの米国特許第4,016,100号は、薬剤および脂質の水性リン脂質分散物の凍結融解による単層小胞中への薬剤の別のカプセル化方法を記載している。

30

【0126】

MLVおよびULVに加えて、リポソームはまた、多小胞(multivesicular)であり得る。Kimら, Biophys Acta 728: 339-348 (1983)に記載のように、これらの多小胞リポソームは、球状であり、内部粒状構造を含む。外膜は、脂質二重層であり、内部領域は二層隔膜によって分離された小区画を含む。なおさらに別のリポソーム型は、オリゴラメラ小胞(oligolamellar vesicle)(「OLV」)であり、これは、いくつかの周辺脂質層に囲まれた巨大な中心区画を有する。直径が2~15μmのこれらの小胞は、Calloら, Cryobiology 22(3): 251-267 (1985)に記載されている。

40

【0127】

Mezei, らの米国特許第4,485,054号および同第4,761,288号はまた、脂質小胞の調製方法を記載している。より最近では、Hsuの米国特許第5,653,996号がエアゾール化を利用したリポソームの調製方法を記載しており、Yiournas, らの米国特許第5,013,497号が高速剪断混合チャンバーを利用したリ

50

ポソームの調製方法を記載している。ULV (Wallach, らの米国特許第4,853,228号) またはOLV (Wallachの米国特許第5,474,848号および同第5,628,936号) を生成するために特定の出発物質を使用する方法も記載されている。

【0128】

上記脂質小胞およびその調製方法についての包括的概説は、'Liposome Technology', ed. G. Gregoriadis, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla., Vol. I, II & III (1984) に記載されている。本発明での使用に適切な種々の脂質小胞を記載したこの引例および上記引例は、本明細書中で参照により援用される。

10

【0129】

提供した組成物に抱合することができる脂肪酸(すなわち、脂質)には、プロプロテインコンバターゼインヒビターをリポソームに有効に組み込むことが可能な脂肪酸が含まれる。一般に、脂肪酸は、極性脂質である。したがって、脂肪酸は、リン脂質であり得る。提供した組成物は、天然または合成のリン脂質のいずれかを含むことができる。リン脂質を、飽和または不飽和の一置換または二置換の脂肪酸およびその組み合わせを含むリン脂質から選択することができる。これらのリン脂質は、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルセリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジン酸、パルミトイ10ルオレオイルホスファチジルコリン、パルミトイ1ルオレオイルホスファチジルセリン、パルミトイ1ルオレオイルホスファチジルエタノールアミン、パルミトイ1ルオレオイルホスファチジルグリセロール、パルミトイ1ルオレオイルホスファチジン酸、パルミテライドイルオレオイルホスファチジルコリン、パルミテライドイルオレオイルホスファチジルセリン、パルミテライドイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン、パルミテライドイルオレオイルホスファチジルグリセロール、パルミテライドイルオレオイルホスファチジン酸、ミリストレオイルオレオイルホスファチジルコリン、ミリストレオイルオレオイルホスファチジルセリン、ミリストレオイルオレオイルホスファチジルグリセロール、ミリストレオイルオレオイルホスファチジン酸、ジリノレオイルホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルセリン、ジリノレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジリノレオイルホスファチジルグリセロール、ジリノレオイルホスファチジン酸、パルミチクリノレオイルホスファチジルコリン、パルミチクリノレオイルホスファチジルセリン、パルミチクリノレオイルホスファチジルエタノールアミン、パルミチクリノレオイルホスファチジルグリセロール、パルミチクリノレオイルホスファチジン酸であり得る。これらのリン脂質はまた、ホスファチジルコリン(リソホスファチジルコリン)、ホスファチジルセリン(リソホスファチジルセリン)、ホスファチジルエタノールアミン(リソホスファチジルエタノールアミン)、ホスファチジルグリセロール(リソホスファチジルグリセロール)、およびホスファチジン酸(リソホスファチジン酸)のモノアシル化誘導体であり得る。これらのリソホスファチジル誘導体中のモノアシル鎖は、パルミトイ1ル、オレオイル、パルミトレオイル、リノレオイル、ミリストイル、またはミリストレオイルであり得る。リン脂質は合成でもあり得る。合成リン脂質は、種々の供給元(AVANTIPolar Lipids (Albaster, Ala.); Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.)) など) から容易に購入することができる。これらの合成化合物は多様であり得、天然に存在するリン脂質で見出されない変化した脂肪酸側鎖を有し得る。脂肪酸は、PSまたはPCのいずれかまたは両方でC14、C16、C18、またはC20鎖長の不飽和脂肪酸側鎖を有することができる。合成リン脂質は、構成要素としてジオレオイル(18:1)-PS; パルミトイ1ル(16:0)-オレオイル(18:1)-PS、ジミリストイル(14:0)-PS; ジパルミトレオイル(16:1)-PC、ジパルミトイ1ル(16:0)-PC、ジオレオイル(18:1)-PC、パルミトイ1ル(16:0)-オレオイル(18:1)-PC、およびミリストイル(14:0)-オレオイル

20

30

40

50

(18:1) - PCを有し得る。したがって、例として、提供した組成物は、パルミトイ^ル16:0を含むことができる。

i i i . i n v i v o / e x v i v o

上記のように、組成物を薬学的に許容可能なキャリア中で投与することができる、当該分野で周知の種々の機構（例えば、裸のDNAの取り込み、リポソーム融合、遺伝子銃によるDNAの筋肉内注射、およびエンドサイトーシスなど）によってin vivoおよび/またはex vivoで被験体の細胞に送達させることができる。

【0130】

ex vivo法を使用する場合、当該分野で周知の標準的プロトコールに従って、細胞または組織を除去し、体外に保持することができる。組成物を、任意の遺伝子導入機構（例えば、リン酸カルシウム媒介遺伝子送達、エレクトロポレーション、微量注入、またはプロテオリポソームなど）によって細胞に導入することができる。次いで、形質導入された細胞を、細胞または組織型についての標準的方法によって、（例えば、薬学的に許容可能なキャリア中で）融合するか、被験体中の同位置に移植して戻すことができる。被験体への種々の細胞の移植または注入についての標準的方法は公知である。

B. 方法

1. 治療方法

NBS1のATMとの相互作用を阻害する組成物を組織に投与する工程および組織に照射する工程を含む、放射線療法に対する組織の感受性を増加させる方法を本明細書中に提供する。組織は、放射線療法が望ましい任意の組織（癌または良性腫瘍（benign growth）が含まれる）であり得る。

i. 癌

したがって、NBS1のATMとの相互作用を阻害する組成物を癌に投与する工程および癌に照射する工程を含む、被験体の癌を治療する方法を本明細書中に提供する。

【0131】

NBS1のATMとの相互作用を阻害する組成物を被験体に投与する工程および癌に化学療法薬を投与する工程を含む、被験体の癌を治療する方法も本明細書中に提供する。したがって、開示の方法の化学療法薬は、例えば、任意の本明細書中に開示の新生物薬（neoplastic drug）であり得る。

【0132】

開示の方法の癌は、無秩序の成長、浸潤、または転移を受けた被験体中の任意の細胞であり得る。いくつかの態様では、癌は、現在放射線療法を使用している任意の新生物または腫瘍であり得る。あるいは、癌は、標準的方法を使用した放射線療法に十分な感受性を示さない新生物または腫瘍であり得る。したがって、癌は、肉腫、リンパ腫、白血病、癌腫、芽腫、または胚細胞腫瘍であり得る。開示の組成物を使用して治療することができる代表であるが制限されない癌のリストには、リンパ腫、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、菌状息肉症、ホジキン病、骨髄性白血病、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、頭頸部癌、頭頸部の扁平上皮癌、腎臓癌、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌など）、神経芽細胞腫/膠芽細胞腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、皮膚癌、肝臓癌、黒色腫、口腔、咽頭、喉頭、および肺の扁平上皮癌、結腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳癌、上皮癌、腎癌、尿生殖器癌、肺癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血器癌（hematopoietic cancer）；睾丸癌；結腸癌および直腸癌、前立腺癌、および膵臓癌が含まれる。

a. 頭頸部癌

提供した組成物および方法を使用して、頭頸部癌を治療することができる。頭頸部癌患者では、一次治療および術後治療として照射を使用することができる。時折、化学療法と組み合わせて照射を行う。放射線療法の最も有益な結果の1つは、声帯癌患者における咽頭保存である。その位置のために、鼻咽喉癌を、主に放射線療法で治療する。腫瘍が再発するようなことがあれば、多数の患者は、首尾よく再治療することができる。術後、辺縁陽性またはクローズマージン（close margin）を有する巨大な広範囲にわたる侵襲性腫瘍を有する患者および陽性リンパ節を有する患者は、局所的（local）ま

10

20

30

40

50

たは局所性 (regional) の再発リスクが高い。放射線療法は、これらの腫瘍の局所制御の機会が増大し、しばしば、頭頸部腫瘍患者の生存率を改善する。

b. 皮膚癌

提供した組成物および方法を使用して、皮膚癌を治療することができる。皮膚癌を、照射を使用して最初または術後に治療することができる。一般に、一次治療は、手術による美容的結果が適切でないかもしれない領域でのみ使用される。最も一般的には、これらの領域には、鼻、耳、上唇および唇交連、瞼、および眼角の周辺領域が含まれる。同様に、術後照射により、高リスク患者の局所制御が増大する。

c. 中枢神経系腫瘍

提供した組成物および方法を使用して、中枢神経系癌を治療することができる。これらの腫瘍では、腫瘍が手術不可能な位置にあるので、一次放射線療法を必要とし得る。しかし、最も一般的には、術後照射を使用する。放射線療法は、多数の高悪性度のグリオーマ患者およびいくらかの低悪性度のグリオーマ患者の生存率を改善する。新規の原体照射療法および定位放射線療法は、三次元技術を使用して治療ビームをより正確に集中させ、より高い線量の照射を安全且つ正確に照射可能である。これらの技術は、脳腫瘍の治療で特に有望であり得る。

d. 尿生殖器癌

提供した組成物および方法を使用して、尿生殖器癌を治療することができる。選択された浸潤性膀胱癌患者では、化学療法と共に使用する照射は、膀胱およびその機能の保存を補助することができる。前立腺癌を、最初または術後に照射で治療することができる。根治的前立腺適除および一次放射線療法による前立癌患者の無病生存率の機会は病期間で同一のようである。最近、アンドロゲン遮断 (androgen blockade) が局所制御を強化し、生存率を改善することが見出された。放射線療法は、特に、原体照射療法または放射性シード移植片 (radioactive seed implant) を使用する場合、前立腺癌患者の罹患率の低下に関連する。照射を使用して、しばしば、他の療法を用いてもよく起こるインポテンスおよび失禁の発症を回避することが可能である。

【0133】

前立腺適除し、局所的再発のリスクが高い患者（辺縁陽性または高レベルの前立腺特異抗原（PSA）を有する腫瘍患者など）では、照射によって局所制御および生存率を改良することができる。早期精巣セミノーマ患者は、根治的精巣摘除術後に低線量照射で治療した場合生存率が非常に高い。

e. 婦人科腫瘍

提供した組成物および方法を使用して、婦人科腫瘍を治療することができる。早期（Ⅰ期）子宮頸癌を、放射線療法を使用して、手術と同程度の有効性で治療することができる。後期（Ⅱ期およびⅢ期）腫瘍は、照射での治療が最適である。組織学的特徴が好ましくない多数の子宮頸癌および子宮内膜癌を、術後照射で制御することがより良い。一定の卵巣癌患者は、術後に投与される腹腔内放射性リンから恩恵を受けることができる。しばしば非常に広範に手術する必要があり、しばしば患者が高齢者であるので、腫瘍および外陰癌を、頻繁に、放射線療法で治療する。

f. 乳癌

提供した組成物および方法を使用して、乳癌を治療することができる。照射により、原発性乳癌の管理が劇的に変化した。乳腺腫瘍摘出および放射線療法を使用した乳房温存（breast conservation）は、早期乳癌の最適な治療法である。ほとんどの患者で美容的結果が良好であり、生存率を犠牲にしない。乳腺腫瘍摘出のみを使用して管理することができる低リスクの患者の同定が試みられているが、これまでのところ、全患者群で、照射を加えた方がより良く局所制御される。局所的に進行した乳癌を有する多数の患者は、放射線療法を使用した局所制御で改善が認められ、照射後の生存率が増加する。

g. 胃腸管腫瘍

10

20

30

40

50

提供した組成物および方法を使用して、胃腸管腫瘍を治療することができる。食道癌は、通常、患者が治療を模索するまでに進行している。化学療法と共に使用した放射線療法は、ほとんどの食道癌患者で手術と同様に有効なようである。選択された患者では、術前化学放射線療法により、最良の結果を得ることができる。胃癌患者も、しばしば、進行性疾患を示す。いくつかの研究により、これらの患者における最良の治療は、腫瘍が切除可能である場合は術後化学放射線療法であり、切除不可能である場合は化学放射線療法のみであることが示唆されている。同様に、術後化学放射線療法または化学放射線療法のみは、切除可能および切除不可能な膵臓癌の好ましい治療である。

【0134】

局所的に進行した結腸癌を有する一定の高リスク患者は、補助放射線療法を使用して局所制御および生存率をより良好にすることができます。しばしば化学療法と共に行われる術前放射線療法により、進行性直腸癌または下部（low-lying）直腸癌をダウンステージする（downstage）ことができ、括約筋の切除および温存が可能になる。高リスク外科患者では、放射線療法も術後に有益であり得る。優れた結果および括約筋保存が可能であるので、肛門癌および肛門周囲癌は、通常、複合照射および化学療法で治療する。

h. 肺癌

提供した組成物および方法を使用して、肺癌を治療することができる。肺癌は、可能ならいつでも外科的に治療すべきである。術後照射により、一定の高リスク外科患者における局所制御が改善され、生存率を改善することができる。切除不可能な肺癌を、時折、術前照射によって切除可能にすることができます。切除が可能でない場合、照射および化学療法を組み合わせたアプローチが好ましい。化学療法を、放射線療法の前または同時に施すことができる。

i. 肉腫

提供した組成物および方法を使用して、肉腫を治療することができる。機能を温存した広範囲局所切除は、軟組織肉腫に適用される。術前照射または術後照射を受ける高リスク患者は、局所制御および生存率の改善を示す。腫瘍の萎縮により、術前照射によって手術をより制限して局所制御を改善することができ、患肢温存も可能である。

j. リンパ腫

提供した組成物および方法を使用して、リンパ腫を治療することができる。いくらかの非ホジキンリンパ腫患者またはホジキンリンパ腫患者を、放射線療法を使用して最もに治療することができる。多数の低悪性度非ホジキンリンパ腫患者を照射のみで治療することができ、優れた局所制御が得られる。I期またはII期の高悪性度非ホジキンリンパ腫を有するいくらかの患者は、化学療法後に照射を使用して、より良好な生存率が得られる。早期疾患を有する選択された患者におけるホジキンリンパ腫を、照射のみまたは化学療法と組み合わせて治療すべきである。放射線療法は、より進行したホジキンリンパ腫の制御を補助することもできる。

k. 小児癌

提供した組成物および方法を使用して、小児癌を治療することができる。小児癌患者は、中枢神経系腫瘍（上衣腫、星状細胞腫、髓芽腫、胎児性腫瘍、脳幹部神経膠腫、頭蓋咽頭腫、松果体部腫瘍、小脳星状細胞腫、視神経膠腫、網膜芽細胞腫、脊髄腫瘍）、神経芽細胞腫、リンパ腫、ユーリング肉腫、横紋筋肉腫、およびウィルムス腫瘍の照射から恩恵を受けることができる。

1. 緩和ケア

提供した組成物および方法を、緩和ケアに使用することができる。転移癌患者では、照射により、しばしば、生活の質が改善され、生存率も改善される。照射は、骨転移の痛みを除去し、体重支持骨の病理骨折を防止することができる。一般に、照射によって得られる鎮痛により、鎮痛剤および薬物の副作用が軽減される。癌の結果としての脊髄圧迫は緊急事態であり、しばしば、放射線療法のみで有効に治療することができる。背部痛、四肢の脆弱性、または腸もしくは膀胱調節に関連する問題を有する患者を直ちに評価して、脊

10

20

30

40

50

髓圧迫を除外すべきである。上大静脈症候群（別の潜在的な緊急事態）は、通常、放射線療法に対して十分に応答する。患者は、通常、呼吸困難、起坐呼吸、ならびに頸部および上肢における静脈系鬱血を示す。同様に、癌に起因する気道圧迫を、しばしば、放射線療法によって有効に治療することができる。短期間の照射により、脳転移患者における生存期間の中央値および生活の質を改善することができる。唯一の臨床的疾患が単一の脳転移である場合、手術と全脳照射との組み合わせアプローチまたは定位照射と全脳照射との組み合わせアプローチのいずれかにより、生存率の中央値が最も劇的に改善される。

i i . 良性疾患

提供した組成物および方法を使用して、良性疾患を治療することができる。例えば、放射線療法を使用して、以下を治療することができる：エナメル芽細胞腫、動脈瘤様骨囊腫、血管線維腫、動静脈奇形、化学感受体腫、脊索腫、頭蓋咽頭腫、硬性線維腫、グレーブス眼病、前立腺癌のホルモン管理に関連する女性化乳房、血管腫、異所性骨形成、脾機能亢進、ケロイド、ケラトアカントーマ、髄膜腫、ペーロニ病、下垂体腺腫、翼状片、自己免疫疾患または臓器移植術のための全リンパ照射、三叉神経痛、甲状腺眼症、および血管再狭窄の防止。

a . 三叉神経痛

したがって、N B S 1 の A T M との相互作用を阻害する組成物を三叉神経に投与する工程および三叉神経に照射する工程を含む、被験体の三叉神経痛を治療する方法を本明細書中に提供する。

【 0 1 3 5 】

三叉神経痛は、眼、唇、鼻、頭皮、額、および顎に激痛発作を引き起こす三叉神経の神経障害である。三叉神経痛は、最も痛みのある容態と見なされ、かなり多数が有効な治療が発見される前に自殺していたので、以前は自殺疾患（s u i c i d e d i s e a s e ）と呼ばれていた。推定 1 5 0 0 0 人に 1 人が三叉神経痛を発症するが、この数は、頻繁な誤診により、さらに著しく多い可能性がある。

【 0 1 3 6 】

三叉神経は、第 V 脳神経（下顎輪郭より上の顔に由来するタクティジョン（t a c t i o n ）（圧力）、サーモセプション（t h e r m o c e p t i o n ）（温度）、および侵害受容（疼痛）などの感覚データ担う混合脳神経）であり、咀嚼筋（咀嚼に関与するが、顔の表情には関与しない筋肉）の運動機能も担う。この疼痛症候群の考えられる原因を説明するための理論がいくつか存在する。血管が橋とのその連結付近の三叉神経を圧迫する可能性が高いという説明が有力である。上小脳動脈は、最も引用されている原因（c u l p r i t ）である。かかる圧迫は、神経の防護髄鞘（p r o t e c t i v e m y e l i n s h e a t h ）を損傷し、迷走および過活動するように神経を機能させる。これにより、神経に支配された任意の領域が最も小さな刺激で疼痛発作を起こし、刺激終了後に疼痛シグナルを遮断する神経の能力を妨害し得る。この損傷型は、動脈瘤（血管のアウトパウチング（o u t p o u c h i n g ））；腫瘍；小脳橋角中のクモ膜囊胞、または乗用車事故または舌の貫通などの外傷にも起因し得る。2 ~ 4 % の T N 患者（通常、若年）は、多発性硬化症の証拠があり、多発性硬化症は、三叉神経または脳の他の関連部分のいずれかを損傷し得る。構造上の原因が存在しない場合、この症候群を特発性と呼ぶ。帯状疱疹後に起こる疱疹後神経痛は、三叉神経が影響を受ける場合に類似の症状を生じ得る。

【 0 1 3 7 】

ナイフまたはN o v a l i s シェーブビーム（N o v a l i s s h a p e d b e a m ）などの類似の放射線外科デバイスを使用して、神経を損傷させて疼痛シグナル伝達を防止することができる。この手順に切開は関与しない。このデバイスは神経根を衝撃するため照射を使用し、この時点で血管圧迫がしばしば見出される地点での選択的損傷を狙う。この選択肢を、特に、長期の全身麻酔に医学的に適合しないか、凝血防止のために投薬（例えば、ワルファリン）を受けている患者に使用する。

【 0 1 3 8 】

したがって、開示の組成物を使用して、放射線外科手順前に神経の放射線感受性を増感

10

20

30

40

50

させることができる。

b . 翼状片

ストロンチウムの局所適用は、外科的に切除した眼の翼状片の局所再発の防止に役立ち得る。表層の低線量照射治療は、外科的に切除したケロイドの局所再発の防止に役立ち得る。放射線療法をしばしば使用して、下垂体腺腫が最小の罹患率で首尾よく治療される。低線量照射は、しばしば、他の治療型が失敗した選択された患者でグレーブス眼病を改善することができる。同様に、他の治療に対する応答に失敗したケラトアカントーマは、通常、照射に十分に応答する。血管腫も低線量照射に十分に応答する。放射線療法は、高リスクデスマトイドおよびペーロニ病の制御に役立ち得る。いくらかの術後整形外科患者では、低線量照射は異所性骨形成の防止に役立ち得る。最後に、奇形が手術不可能である場合、中枢神経系の動脈奇形を、定位放射線療法を使用して除去することができる。

10

【0139】

N B S 1 の A T M との相互作用を阻害する組成物を結膜に投与する工程および結膜に照射する工程を含む、被験体の翼状片の治療方法も本明細書中に提供する。

【0140】

翼状片は、結膜の良性腫瘍ということができる。あるいは、翼状片は、頸部、瞼、膝、肘、足首、または指に生じる任意の翼様の三角形の膜をいう (J Pediatr Orthop B 2004, 13: 197 - 201)。例は、脚に発症する膝窩翼状片症候群 (popliteal pterygium syndrome) である。

20

【0141】

結膜に関連する場合、翼状片は、一般に、強膜の鼻側から成長する。翼状片は、紫外線曝露 (例えば、日光)、低い湿度、および埃に関連し、これらによって発症すると考えられる。鼻側の翼状片の支配は、おそらく、角膜を通して側面に沿って通過する太陽光の結果であり、この太陽光が屈折して周辺領域に集中するようになる。日光は、眼の側面から妨害されることなく通過し、角膜通過後に縁内側に集中する。しかし、反対側では、鼻の影が側面 / 側頭部の縁に集中した日光の強度が内側で減少する。

20

【0142】

結膜中の翼状片は、コラーゲンの弾性線維様分解 (elastotic degeneration) および線維性血管増殖によって特徴づけられる。これは、翼状片の頭部 (head of the pterygium) と呼ばれる進行部分を有し、この頭部は、頸部 (neck) によって翼様片の本体に連結している。時折、翼様片の頭部に隣接して鉄分の沈着線が認められ、これを、ストッカー線と呼ぶ。線の位置は、成長パターンを示し得る。良性腫瘍である場合、瞳孔を覆って視界を妨げる範囲に成長しない限り、治療の必要はない。いくらかの患者は、成長が非常に見苦しくなる場合に手術を選択することもできる。正確な原因は不明であるが、風、日光、または砂への過剰な曝露に関連する。側面が保護された防護サングラスおよびつば広帽の着用ならびに終日の人工涙液の使用は、その形成の防止またはさらなる成長の停止に役立ち得る。サーファーおよび他の水上競技の選手について、水からの紫外線を 100 % 遮断する遮光保護具を装着すべきである。

30

【0143】

時折、翼様片は、長時間日向で過ごした中高年の患者での偶発的所見として見出される。翼状片は、サーフィン、ウェークボード、およびカイトボードを行う若年の男性および女性でも認められ、これは、水から反射した紫外線に対する過剰な曝露に起因する。スキーヤーおよびスノーボーダーは、雪上で眼を防御しているので、水上競技の選手も紫外線に留意してその眼を防護する必要がある。

40

【0144】

患者の症状を人工涙液で治療することができる一方で、翼状片を軽減し、さらに進行を防止するための信頼できる医学的治療は存在しない。外科的除去によってのみ限局的治療を行う。完全な外科的矯正後でさえも翼状片は再発し得るので、長期追跡が必要である。

c . 甲状腺眼症

N B S 1 の A T M との相互作用を阻害する組成物を眼に投与する工程および眼に照射す

50

る工程を含む、被験体の重症甲状腺眼症の治療方法も本明細書中に提供する。

【0145】

甲状腺眼症は、しばしば、活動亢進甲状腺を発症する患者で起こる。眼窩中の筋肉および他の組織の腫脹により、眼が前に押し出され、より突き出すようになる。眼は、しばしば、よりじろじろとした目つきになる。より重症な場合、腫脹によって眼球を動かす筋肉が硬くなり得る。これにより、「斜視」を発症し、複視になり得る。時折、眼球後部の腫脹によって眼から脳への神経が圧迫され、失明し得る。甲状腺眼症は、甲状腺オフタモパシー (thyroid ophthalmopathy)、グレーブス眼疾患 (Graves' eye disease)、または甲状腺機能異常眼症 (dysthyroid eye disease)とも呼ばれる。

10

【0146】

甲状腺の活動亢進は、通常、「自己免疫容態」によって生じる。これは、通常は感染から身体を防御する細胞が「過ちを犯し」、甲状腺を異物と認識し、攻撃しはじめる意味する。これによって甲状腺が刺激されて、過剰な甲状腺ホルモンを産生する。攻撃過程は、眼の後部の細胞に波及し、腫脹し得る。

【0147】

放射線療法を、眼窩後部の組織に施すことができる。放射線療法は、通常、2週間にわたって10回行われる。患者の2/3は有意に有益であったが、残念ながら、1/3は有益でなく、眼窩減圧術などの他の療法が必要である。しばしば、この療法を、ステロイドおよび免疫抑制と組み合わせる。

20

d. ケロイド

NBS1のATMとの相互作用を阻害する組成物を瘢痕ケロイドに投与する工程および瘢痕ケロイドに照射する工程を含む、被験体の瘢痕ケロイドの治療方法も本明細書中に提供する。

【0148】

ケロイドは、治癒した皮膚損傷部位の組織が過成長する瘢痕型である。ケロイドは、固いもしくは弾性のある病変または光沢のある線維性小結節であり、桃色から肉色または赤色から暗褐色に変化し得る。瘢痕ケロイドは、良性且つ非伝染性であり、通常、重篤な痒み、鋭痛、および質感の変化を伴う。重症な例では、皮膚の運動に影響を及ぼし得る。ケロイドは肥厚性瘢痕と混同すべきではない。肥厚性瘢痕は、最初の創傷の境界状に成長せず、経時的に減少し得る盛り上がった瘢痕である。

30

【0149】

ケロイドは、正常な皮膚上の爪様に成長して拡大する。ケロイドは、刺すような痛みまたは前兆のない痒みを生じるが、感覚の程度は患者によって異なる。ケロイドが感染するようになる場合、ケロイドは潰瘍を起こし得る。唯一の治療法は、瘢痕を完全に除去することである。

【0150】

ケロイドは、瘢痕組織内で形成される。創傷治癒で使用されるコラーゲンは、この領域を過成長させる傾向があり、時折、最初の瘢痕よりも何倍も大きな塊を生成する。ケロイドは、通常、損傷部位で生じるが、自発的にも生じ得る。ケロイドは突き刺し部位で生じ得るが、面皰または搔爬などの単純なものからでさえも生じ得る。ケロイドは、重症座瘡または水痘瘢痕、創傷部位の感染、反復創傷領域、創縫合時の過剰な皮膚の引張り、または創傷内の異物の結果として生じ得る。

40

【0151】

電子ビーム照射を、内部臓器に影響を及ぼすのに十分に深く身体を貫通しないレベルで使用することができる。慣用電圧照射は、より貫通するが、わずかにより有効である。放射線療法は、手術直後に使用する場合、瘢痕形成を減少させる一方で、手術創が治癒する。

e. 異所性骨化

NBS1のATMとの相互作用を阻害する組成物を組織に投与する工程および組織に照

50

射する工程を含む、被験体の異所性骨化の治療方法も本明細書中に提供する。

【0152】

異所性骨化 (H O) は、骨外性軟組織内の真の骨 (true bone) の異常な形成である。古典的には、この共通の特徴を有する多数の疾患が化骨性筋炎 (嫌悪感 (disfavor) に分類される用語) のカテゴリーにまとめられていた。これは、原発性筋炎が必要な前兆ではなく、且つ、骨化は、筋膜、腱、他の間葉軟組織で頻繁に好発し、骨化が常に筋肉組織中で起こるわけではないからである。

【0153】

伝統的には、種々のHO型が臨床的状況、病变の位置、および病变が進行性または孤立性のいずれで発症するかどうかに従って分類されている。用語「外傷性化骨性筋炎」を、鈍的損傷、手術、または熱傷などの外傷の再現 (recalled trauma) 後に生じるHOに適用する。論理的には、外傷の誘発を同定することができない場合、病变を非外傷性化骨性筋炎と呼ぶ。病变は、皮下脂肪に制限される場合に骨化性脂肪織炎 (panniculitis ossificans) と分類され、内転筋中で見出される場合に乗馬骨と分類され、三角筋中に存在する場合にシューター骨 (shooter's bone) と分類されている。

【0154】

HOと脊髄損傷との間に強い関連性があり、共に複数の部位で発症し、再発するという強い傾向がある。同様に、関節周囲のHOは外傷性脳損傷患者で認められ、HOの範囲および機能的重症度は、頭蓋内損傷の重症度に直接関連する。神経障害 (neurological compromise) (破傷風、灰白髄炎、ギラン・バレー症候群、および機械的換気中の長期の薬理学的麻痺が含まれる) の多数の他の原因もHO形成に関連している。

【0155】

進行性骨化性線維異形成 (FOP) (すなわち、ミュンクマイエル病) は、筋膜面、筋肉、腱、および靭帯が進行性骨化を生じる、常染色体優性の重症に身体に障害を引き起こす疾患である。母指の先天性奇形は、FOPに関連する。HOは、いくつかの他の疾患 (オールブライト遺伝性骨異形成症 (Albright hereditary osteodystrophy)、進行性骨性異形成 (progressive osseous heteroplasia)、および原発性皮膚骨腫が含まれる) の特徴である。

【0156】

HOは、罹患軟組織内で休止している前骨芽幹細胞 (osteoprogenitor stem cell) を起源とする。適切な刺激があれば、幹細胞は骨芽細胞に分化し、オステオイド形成過程を開始し、最終的に、成熟異所骨になる。種々の骨形成タンパク質 (BMP) は、実験的に軟組織に沈着した場合にHOを刺激することができる。それにより、BMPがHOの開始に役割を果たすことが示唆される。ある程度の神経学的制御が暗示しているが、十分に理解されていない。

i i i . 放射線療法

放射線療法は、悪性細胞のDNA損傷によって作用する局所治療法である。正常細胞は、腫瘍細胞よりもこの損傷の修復能力が高い。放射線療法は、この相違を活用する。損傷細胞が治療直後に死滅しないので、放射線療法が首尾よく完了した後に腫瘍がしばしば生き残ることに留意することが重要である。

【0157】

処置・処方 (treatment prescription) は、治療目的および副作用の可能性に基づく。一連の治療は、短くて1日または長くて10週間であるが、典型的な持続時間は2週間と7週間との間であり、通常、1週間に5日間の治療からなる。患者は、最も一般的には、治療ビームとして使用すべき電子を加速させるか、治療ビームとして使用すべきX線を発生する線形加速装置によって照射する。治療は痛みを伴わず、しばしば、5分未満持続する。

【0158】

10

20

30

40

50

治療目的は、治癒または姑息的である。放射線療法で治癒する可能性がある場合、治療期間はしばしばより長く、通常、長期間にわたってより少ない1日量を照射する。このアプローチによって遅発性副作用が最小になる。治療が厳格に言えば姑息的であることを意図する場合、より短い期間にわたるより高い1日治療量からなるより短期の治療スケジュールを使用する。かかる場合、遅発性副作用は、患者の寿命内に起こりそうにない。さらに、より短期の治療プログラムは、患者の余命に負の影響を及ぼす程度が低い。

【0159】

照射は局所療法であるので、副作用は、通常、治療領域に限定される。しかし、倦怠は、1つの一般的な全身症状である。通常、照射の副作用は軽度であるが、時折、重症である。副作用を、早発性影響および遅発性影響に分類することができる。早発性影響は、治療中または治療直後に起こり、典型的には、治療から3～6週間以内に解決する。遅発性副作用は治療から数カ月後～数年後に起こり、しばしば永続する。これらの影響は、組織損傷の結果であり、壊死または瘢痕化し、稀に、発癌する。放射線療法に続発する悪性疾患の発症は、周知となっている。患者によっては多くの遺伝因子によって二次癌を生じやすいことが真実である一方で、照射も相対リスク増加の一因である。本明細書中に開示の組成物および方法は、必要な照射量の減少によってこれらの副作用を軽減することができる。

10

【0160】

放射線療法は、潜在的に多数の特定の適応症がある。放射線療法を、原発性腫瘍治療、術前療法もしくは術後療法、または併用療法もしくは強化療法の構成要素として施すことができる。

20

【0161】

放射線療法は、癌患者のほぼ2/3に適切であり、治癒目的および姑息的目的で使用する。多数の腫瘍（前立腺癌、乳癌、頭頸部癌、肺癌、脳腫瘍、胃腸の腫瘍、肝臓癌、軟組織肉腫、子宮頸癌、リンパ腫など）に、治療レジメンの一部として放射線療法を施すであろう。放射線療法には、外部ビーム照射（X線、線、陽子、および中性子など）、近接照射療法、および放射性物質の実行（implementation）が含まれる。放射線療法を、二次元放射線療法、三次元放射線療法、原体放射線療法、強度変調放射線療法（IMRT）、および画像誘導調放射線療法（IGRT）アプローチで行うことができる。ほとんどの固形腫瘍のための標準的な放射線療法は、2 Gy/日で照射し、総線量は約60 Gy（50～70 Gy）である。しかし、特定の被験体、装置、および腫瘍型に基づいて好ましい線量を選択することは、当業者の日常業務である。本発明の方法は、癌細胞の照射に対する感受性を増大させることによって既存の放射線療法を改良する。例えば、提供した方法により、癌細胞の照射に対する感受性を、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%またはそれを超えて高くすることができる。本明細書中で使用する場合、用語「感受性」および「放射線感受性」は、ある線量の照射に基づいた細胞の生存数をいう。したがって、放射線感受性の増加により、ある線量の照射での細胞の生存数が減少するか、致死に必要な線量が減少するか、その組み合わせが可能である。

30

【0162】

密封線源放射線療法またはエンドキュリー療法（endocurietherapy）としても公知の近接照射療法は、放射性線源（radioactive source）を治療を必要とする領域の内部またはその隣りに配置する放射線療法形態である。逆に、外部ビーム放射線療法（すなわち、遠隔照射療法）は、線形加速装置によって外部に生成された照射の適用である。一般に近接照射療法を使用して、局在性前立腺癌および頭頸部癌を治療する。

40

【0163】

近接照射療法には、モールド近接照射療法（Mold brachytherapy）、ストロンチウムブラーク療法（Strontium plaque therapy）、間質小線源治療、腔内小線源治療、および血管内小線源治療が含まれる。モールド近接

50

照射療法では、表在性腫瘍を、皮膚の近くに配置した密封線源を使用して治療することができる。線量計測を、しばしば、マンチェスター法（確実に全標的体積に対する線量を規定の線量の10%以内にするようにデザインした規則に基づいたアプローチ）を参照して行う。表面アプリケータは、通常、ストロンチウムブラーク療法で必要であり、厚さ1m未満の非常に表層の病変のために使用される。ブラークは、放射性ストロンチウム90粉末塩を含む中空の薄い銀ケーシングである。ストロンチウムの放射性崩壊から生成された（電子）粒子は、透過性が非常に浅い。典型的には、Sr90ブラークを、切除した翼状片のベッド上に配置する。約10~12Gyの開始用量（start dose）を、接触時期を選択することによって送達させる。電子が大気の数mmしか透過しないので、放射線防護問題はわずかに少なくなるが、他の放射線源と非常に異なる。眼の強膜上に配置したブラークを除去する必要があるが、銀ケーシングが薄くて容易に傷がつくので穩やかに行わなければならない。ストロンチウムは、カルシウムと同一の化学的クラス（すなわち、アルカリ土類金属）に属するので、任意のストロンチウム塩が眼と接触して吸収する場合に骨において共存するであろう。オペレーターは、その本体から顔をそらすようにアプリケータを保持することによって線への曝露を防止することができる。間質小線源治療では、線源を組織内に挿入する。この種の第1の治療は、マンチェスター法に従って準備したラジウム226を含むニードルを使用したが、現代の方法はイリジウム192ワイヤーを使用する傾向がある。イリジウムワイヤーを、マンチェスター法またはパリ法のいずれかを使用して準備することができる。後者は新規の核種を活用するために特にデザインされたヨウ素125シードを使用した前立腺癌治療も、間質小線源治療に分類される。放出体の詳細については、一般的に使用される放射同位体を参照のこと。腔内小線源治療は、線源を既存の体腔内に配置する。この方法は、事実上産婦人科疾患で最も一般的に適用されているが、上咽頭に対しても実施することができる。血管内小線源治療は、線源を有するカテーテルを脈管構造内に配置する。この方法を、ステント内再狭窄で最も一般的に適用されているが、この療法は、末梢脈管構造狭窄治療での使用も調査されている。

【0164】

高線量率（HDR）近接照射療法は、一般的な近接照射療法である。カテーテル形態のアプリケータを、通常、マンチェスター法またはパリ法にしたがうか患者に応じて準備する。高線量率の線源（しばしば、イリジウム192、Ir-192）を、装置によってワイヤの末端上のカテーテルに沿って駆動する一方で、患者を室内に隔離する。線源を、事前に設定した期間で予め計画した位置に配置し、その後にカテーテルに沿って進行させ、これを繰り返して必要な線量分布に増加させる。放射性線源の直接埋め込みを超えるこの治療の利点は、スタッフの被爆がより少なく、スタッフ曝露の低さによって線源の放射能をより高くでき、それにより、治療時間がより速くなることである。

【0165】

高線量率（HDR）と同様に、低線量率（LDR）は、放射性物質の埋め込みを含み、これを、一過性または恒久的に埋め込むことができる。装置を使用したLDR近接照射療法は、類似の方法で作用する。別の変形形態は、線源が、装置を使用して患者に再度駆動する活性または不活性のボールの形態であることである。

【0166】

いくつかの態様では、開示の方法は、さらに、被験体の健康な組織に放射線防護剤を投与する工程を含むことができる。一般に、放射線防護剤は、フリーラジカルを補足し、酸化による損傷を防止する組成物を含むであろう。

i.v. 化学療法

大多数の化学療法薬を、以下のように分類することができる：アルキル化剤、代謝拮抗物質、アントラサイクリン、植物アルカロイド、トポイソメラーゼインヒビター、モノクローナル抗体、および他の抗癌剤。これらの全薬物は、細胞分裂またはDNA合成に影響を及ぼす。いくつかの新規の薬剤は、DNAを直接干渉しない。これらには、新規のチロシンキナーゼインヒビターであるメシリ酸イマチニブ（グリベック（登録商標）またはグ

10

20

30

40

50

リベック（登録商標））が含まれ、これは、一定の癌型（慢性骨髓性白血病、消化管間質腫瘍）における分子の異常を直接ターゲティングする。さらに、腫瘍細胞を直接攻撃することなく腫瘍細胞の挙動を調整するいくつかの薬物を使用することができる。ホルモン治療は、この補助療法カテゴリーに分類される。

【0167】

開示の方法の化学療法薬はアルキル化剤であり得る。アルキル化剤、細胞中に存在する条件下で多数の電気陰性基にアルキル基を付加する能力により、このように命名されている。シスプラチニンおよびカルボプラチニンならびにオキサリプラチニンはアルキル化剤である。他の薬剤は、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシルである。これらは、細胞DNAの化学修飾によって作用する。

10

【0168】

開示の方法の化学療法薬は、代謝拮抗物質であり得る。代謝拮抗物質は、プリン（（アザチオプリン、メルカブトプリン））またはピリミジンになりすまし、DNAの基礎単位になる。代謝拮抗物質は、これらの物質が（細胞周期の）「S」期にDNAに組み込まれるようになるのを防止し、正常な発達および分裂を停止させる。代謝拮抗物質は、RNA合成にも影響を及ぼす。その有効性により、これらの薬物は、最も広く使用されている細胞増殖抑制剤である。

【0169】

開示の方法の化学療法薬は、植物アルカロイドまたはテルペノイドであり得る。これらのアルカロイドは、植物に由来し、微小管機能の防止によって細胞分裂を遮断する。微小管は、細胞分裂に極めて重要であり、微小管無しでは細胞分裂できない。主な例は、ビンカアルカロイドおよびタキサンである。

20

【0170】

開示の方法の化学療法薬は、ビンカアルカロイドであり得る。ビンカアルカロイドは、チューブリンの特定の部位に結合し、チューブリンの微小管へのアセンブリ（細胞周期のM期）を阻害する。これらは、マダガスカルニチニチソウ、カサランツ・ロセウス（*Catharanthus roseus*）（以前はツルニチニチソウとして公知）に由来する。ビンカアルカロイドには、以下が含まれる：ビンクリスチン、ビンプラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、およびポドフィロトキシン。ポドフィロトキシンは、2つの他の細胞増殖抑制薬であるエトポシドおよびテニポシドを産生するために使用される植物由来化合物である。これらは、細胞のG1期（DNA複製の開始）への侵入およびDNAの複製（S期）を防止する。正確なその作用機構は依然として解明されていない。この物質は、アメリカメイアップル（American Mayapple）（ポドフィルム）から最初に得られた。最近、ヒマラヤメイアップル（ポドフィルム・ヘキサンドルム（*Podophyllum hexandrum*））は、さらにより大量にこの物質を含むことが発見されが、この植物は絶滅寸前であるので、その供給量は限られている。物質の產生に関与する遺伝子を単離する研究が行われており、その結果、組換えによって得ることができる。

30

【0171】

開示の方法の化学療法薬は、タキサンであり得る。タキサンの原型は、タキソールとしても公知の天然産物のパクリタキセルであり、西洋イチイ（Pacific Yew tree）の樹皮から最初に得られた。ドセタキセルは、パクリタキセルの半合成アナログである。タキサンは、微小管の安定を増強し、後期の染色体の分離を防止する。

40

【0172】

開示の方法の化学療法薬は、トポイソメラーゼインヒビターであり得る。トポイソメラーゼは、DNAのトポロジーを維持するのに不可欠な酵素である。I型およびII型トポイソメラーゼの阻害により、適切なDNAのスーパーコイル化の混乱によってDNAの転写および複製の両方を干渉する。いくつかのI型トポイソメラーゼインヒビターには、カンプトセシン、イリノテカン、およびトポテカンが含まれる。II型インヒビターの例には、アムサクリン、エトポシド、エトポシドホスファート、およびテニポシドが含まれる

50

。これらは、エピポドフィロトキシン（アメリカメイアップル（ポドフィルム）の根中に天然に存在するアルカロイド）の半合成誘導体である。

【0173】

開示の方法の化学療法薬は、抗腫瘍抗生物質（抗新生物薬）であり得る。最も重要なこの群由来の免疫抑制薬は、ダクチノマイシンであり、腎臓移植で使用される。

【0174】

開示の方法の化学療法薬は、（モノクローナル）抗体であり得る。モノクローナル抗体は、腫瘍特異的抗原のターゲティングによって作用し、それにより、薬剤自体が結合する腫瘍細胞に対する宿主の免疫応答を増強する。例は、トラスツズマブ（ハーセプチニン）、セツキシマブ、およびリツキシマブ（リツキサンまたはマブセラ（Mabthera））である。ベバシズマブは、腫瘍細胞を直接攻撃しないが、その代わりに新規の腫瘍血管の形成を遮断するモノクローナル抗体である。

10

【0175】

開示の方法の化学療法は、ホルモン療法であり得る。いくつかの悪性疾患がホルモン療法に応答する。厳密に言えば、これは、化学療法ではない。一定の組織（乳腺および前立腺が含まれる）から生じた癌を、ホルモンバランスの適切な変化によって阻害または刺激することができる。ステロイド（しばしば、デキサメタゾン）は、腫瘍成長および関連する浮腫（組織の腫脹）を阻害し、リンパ節悪性疾患を後退させることができる。前立腺癌は、しばしば、フィナステリド（テストステロンのジヒドロテストステロンへの末梢変換を遮断する薬剤）に感受性を示す。乳癌細胞は、しばしば、エストロゲンおよび/またはプロゲステロン受容体を高度に発現する。これらのホルモンの産生（アロマターゼインヒビター）または作用（タモキシフェン）の阻害を、しばしば、治療の補足として使用することができる。連続投与した場合に、性腺刺激ホルモン放出ホルモンアゴニスト（GnRH）（ゴセレリンなど）は、逆説的な負のフィードバックを行い、その後にFSH（濾胞刺激ホルモン）およびLH（黄体形成ホルモン）の放出を阻害する。いくつかの他の腫瘍もホルモン依存性を示すが、特定の機構は依然として不明である。

20

【0176】

開示の方法の組成物は、NBS1のATMとの相互作用を阻害するペプチド（例えば、本明細書中に記載のNBS1のカルボキシ末端アミノ酸配列またはその保存的変異体（例えば、NTP）を含む単離ポリペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸）を含むことができる。本方法の組成物は、ATMのNBS1結合配列またはその保存的変異体を含む単離ポリペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸を含むことができる。例えば、ポリペプチドは、NBS1に結合するATMまたはATMのフラグメントのheat反復配列を含むことができる。

30

【0177】

1つの態様では、ポリペプチドは、NBS1のカルボキシ末端のほとんどのアミノ酸を含む任意のポリペプチドであり得る。したがって、提供したポリペプチドは、NBS1のC末端のほとんどの4~30アミノ酸（NBS1のC末端のほとんどの4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個のアミノ酸またはそのフラグメントが含まれる）を含むことができる。例えば、提供したポリペプチドは、NBS1（配列番号1）のアミノ酸734~754を含むことができる。提供したポリペプチドは、NBS1（配列番号1）のC末端のほとんどの4~30アミノ酸（アミノ酸734~754が含まれる）内に保存的アミノ酸置換を含むことができる。この文脈では、ペプチドは、1、2、または3個の保存的アミノ酸置換を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、および配列番号10と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

40

50

【0178】

別の態様では、ポリペプチドは、例えば、C末端のほとんどの1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸を含まない。

【0179】

さらなる態様では、ポリペプチドは、ATMのNBS1結合ドメインを含む任意のポリペプチドであり得る。したがって、本明細書中に提供したポリペプチドは、ATMのHeat反復2および/または7を含む任意のポリペプチドであり得る。したがって、本明細書中に提供したポリペプチドは、ATM(配列番号51)のアミノ酸248~522を含む任意のポリペプチドであり得る。したがって、本明細書中に提供したポリペプチドは、配列番号56を含む任意のポリペプチドであり得る。したがって、本明細書中に提供したポリペプチドは、ATM(配列番号51)のアミノ酸1436~1770を含む任意のポリペプチドであり得る。したがって、本明細書中に提供したポリペプチドは、配列番号57を含む任意のポリペプチドであり得る。提供したポリペプチドは、ATMのHeat反復2および/または7内に保存的アミノ酸置換を含むことができる。この文脈では、ペプチドは、1、2、または3個の保存的アミノ酸置換を含むことができる。ポリペプチドは、ATM(配列番号51)のアミノ酸248~522またはATM(配列番号51)のアミノ酸1436~1770と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号56と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、配列番号57と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

10

20

30

40

50

2.スクリーニング方法

NBS1およびATMポリペプチドを含むサンプルを候補薬剤と接触させる工程、およびNBS1とATMポリペプチドとの間の相互作用を検出する工程を含み、候補薬剤を示すコントロールと比較したNBS1とATMポリペプチドとの間の相互作用の減少が、候補薬剤が放射線感受性であることを示す、放射線感受性薬を同定する方法を本明細書中に開示する。本方法は、1つの態様では、スクリーニングアッセイ(高速処理スクリーニングアッセイなど)である。したがって、接触工程は、細胞ベースのアッセイまたは無細胞アッセイで行うことができる。例えば、NBS1とATMポリペプチドとの間の相互作用を、蛍光偏光を使用して検出することができる。したがって、NBS1および/またはATMポリペプチドは、フルオロフォアを含むことができる。本明細書中に開示のNBS1ポリペプチドを、ポジティブコントロールとして使用することができる。

【0180】

一般に、当該分野で公知の方法にしたがって、天然産物の巨大ライブラリーまたは合成(または半合成)抽出物もしくは化合物のライブラリーから候補薬剤を同定することができる。創薬分野および薬物開発分野の当業者は、試験抽出物または化合物の正確な供給源は本発明のスクリーニング手順に重要ではないことを理解するであろう。したがって、事実上、多数の化学的抽出物または化合物を、本明細書中に記載の例示的方法を使用してスクリーニングすることができる。かかる抽出物または化合物の例には、植物、真菌、原核生物、または動物ベースの抽出物、発酵プロセス、および合成化合物、ならびに既存の化合物の修飾物が含まれるが、これらに限定されない。多数の化合物(サッカリド、脂質、ペプチド、ポリペプチド、および核酸ベースの化合物が含まれるが、これらに限定されない)の無作為または有向性の(direct ed)合成(例えば、半合成または全合成)にも多数の方法を利用可能である。合成化合物ライブラリーは、例えば、Brandon Associates(Merrimack, NH)およびAldrich Chemical(Milwaukee, WI)から市販されている。あるいは、細菌、真菌、植物、および動物の抽出物の形態の天然化合物のライブラリーは、多数の供給元(Biotics(Sussex, UK)、Xenova(Slough, UK)、Harbor Branch Oceanographics Institute(Ft. Pierce, FLA.)、およびPharmaMar, U.S.A.(Cambridge, Mass.)が含まれる)から市販されている。さらに、天然および合成で产生するライブラリー

を、必要に応じて、当該分野で公知の方法にしたがって、例えば、標準的な抽出方法および分画方法によって產生する。さらに、必要に応じて、任意のライブラリーまたは化合物を、標準的な化学的方法、物理的方法、または生化学的方法を使用して容易に修飾する。さらに、創薬分野および薬物開発分野の当業者は、脱複製 (dereplication) (例えば、分類学的脱複製、生物学的脱複製、および化学的脱複製またはその任意の組み合わせ) の方法またはNBS1-ATM相互作用に及ぼすその影響が既に知られている材料の複製物または反復物の排除方法を、可能ならいつでも使用すべきであることを容易に理解する。

【 0 1 8 1 】

粗抽出物が所望の活性を有することが見出された場合、正のリード抽出物をさらに分画して認められた影響を担う化学的構成要素を単離する必要がある。したがって、抽出過程、分画過程、および生成過程の目的は、粗抽出物内のNBS1-ATM相互作用を刺激または阻害する活性を有する化学物質の慎重な特徴づけおよび同定である。化合物の混合物における活性を検出するための本明細書中に記載の同一のアッセイを使用して、有効成分を精製し、その誘導体を試験することができる。かかる異種抽出物の分画および精製方法は、当該分野で公知である。必要に応じて、治療に有用な薬剤であることが示された化合物を、当該分野で公知の方法にしたがって化学修飾する。治療的価値があると同定された化合物を、疾患または容態の動物モデルを使用してその後に分析することができる。

3. 投与方法

組成物を、局所、経口、または非経口で投与することができる。例えば、組成物を、体外、頭蓋内、腔内、肛門内、皮下、皮内、心臓内、胃内、静脈内、筋肉内、腹腔内注射、経皮、鼻腔内、または吸入剤によって投与することができる。本明細書中で使用する場合、「頭蓋内投与」は、物質の脳への直接送達（例えば、カテーテルまたはニードルを介した髄腔内、槽内、脳室内、または経蝶形骨送達が含まれる）を意味する。

【 0 1 8 2 】

組成物の非経口投与は、使用する場合、一般に、注射によって特徴づけられる。注射液を従来の形態（溶液または懸濁液、注射前に液体に含めて懸濁液にするのに適切な固体形態、または乳濁液いずれかとして）で調製することができる。より最近修正された非経口投与アプローチは、一定の投薬量が維持されるような遅延放出系または徐放系の使用を含む。例えば、米国特許第3,610,795号（本明細書中で参照により援用される）を参照のこと。

[0 1 8 3]

本明細書中で使用する場合、「局所鼻腔内投与」は、鼻孔の片方または両方を介した鼻および鼻腔への組成物の送達を意味し、核酸もしくはベクターの噴霧機構もしくは液滴機構、またはエアゾール化による送達を含むことができる。吸入による組成物の投与は、噴霧機構または液滴機構による送達を介した鼻または口腔による投与であり得る。挿管法を介して呼吸器系（例えば、肺）の任意の領域に直接送達させることもできる。

〔 0 1 8 4 〕

正確な組成物の必要量は、被験体の種、年齢、体重、および一般的な状態、治療を受けるアレルギー性障害の重症度、使用する特定の核酸またはベクター、およびその投与様式などに応じて、被験体毎に異なるであろう。したがって、各組成物についての正確な量を特定することは不可能である。しかし、当業者は、本明細書中の教示で与えられた日常的実験のみを使用して、適量を決定することができる。

[0 1 8 5]

材料は、（例えば、微粒子、リポソーム、または細胞に組み込まれた）溶液または懸濁液中に存在し得る。これらを、抗体、受容体、または受容体リガンドを介して特定の細胞型にターゲティングすることができる。以下の引例は、特定のタンパク質を腫瘍細胞にターゲティングするためのこのテクノロジーの使用例である (Senterrà, Biocognjugate Chem., 2: 447-451, (1991); Bagshawe, K. D., Br. J. Cancer, 60: 275-281, (1989); Bagshawe,

awerら, Br. J. Cancer, 58: 700 - 703, (1988); Senterら, Bioconjugate Chem., 4: 3 - 9, (1993); Battelliら, Cancer Immunol. Immunother., 35: 421 - 425, (1992); Pietersz and McKenzie, Immunology Reviews, 129: 57 - 80, (1992); およびRofflerら, Biochem. Pharmacol., 42: 2062 - 2065, (1991)。 「ステルス」などのビヒクルおよび他の抗体を、リポソーム（結腸癌に対する脂質媒介性薬物ターゲティング、細胞特異的リガンドによるDNAの受容体媒介性ターゲティング、リンパ球指向性腫瘍ターゲティング、およびin vivoでのマウスグリオーマ細胞の高特異的治療レトロウイルスターゲティングが含まれる）に抱合する。以下の引例は、腫瘍組織に特定のタンパク質をターゲティングするためのこのテクノロジーの使用例である（Hughesら, Cancer Research, 49: 6214 - 6220, (1989)；およびLitzinger and Huang, Biochimica et Biophysica Acta, 1104: 179 - 187, (1992)）。一般に、受容体は、構成性またはリガンド誘導性のエンドサイトーシス経路に関与する。これらの受容体は、クラスリンコーティングピット中に凝集し、クラスリンコーティング小胞を介して細胞に侵入し、酸性化エンドソームを通過して受容体が分類され、細胞表面に再利用されるか、細胞内で保存されるようになるか、リソソーム中で分解される。内在化経路は、種々の機能（栄養取り込み、活性化タンパク質の除去、高分子の排除、ウイルスおよび毒素の日和見性侵入、リガンドの解離および分解、ならびに受容体レベルの調節など）に携わる。多数の受容体は、細胞型、受容体濃度、リガンド型、リガンド結合価、およびリガンド濃度に応じて、1つを超える細胞内経路をたどる。受容体媒介性エンドサイトーシスの分子機構および細胞機構は概説されている（Brown and Greene, DNA and Cell Biology 10: 6, 399 - 409 (1991)）。

10

20

30

【0186】

適切なキャリアおよびその処方物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A. R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995に記載されている。典型的には、適量の薬学的に許容可能な塩を処方物中で使用して、処方物を等張にする。薬学的に許容可能なキャリアの例には、生理食塩水、リンゲル液、およびデキストロース溶液が含まれるが、これらに限定されない。溶液のpHは、約pH 5～約pH 8、約pH 7～約pH 7.5である。さらに、キャリアは、徐放性調製物（抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックス（マトリックスは、造形品（例えば、フィルム、リポソーム、または微粒子）の形態である）などを含む。一定のキャリアが、例えば、投与される組成物の投与経路および濃度に依存することがより好ましいかもしれないことが当業者に明らかであろう。

30

【0187】

薬学的キャリアは、当業者に公知である。これらは、最も典型的には、ヒトへの薬物投与のための標準的なキャリアであろう（滅菌水、生理食塩水、および生理学的pHの緩衝液などの溶液が含まれる）。組成物を、筋肉内または皮下に投与することができる。他の化合物を、当業者によって使用される標準的手順にしたがって投与するであろう。

40

【0188】

薬学的組成物は、最適な分子に加えて、キャリア、増粘剤、希釈剤、緩衝液、防腐剤、および界面活性剤などを含むことができる。薬学的組成物は、抗菌薬、抗炎症薬、および麻酔薬などの1つ以上の有効成分を含むこともできる。

【0189】

局所治療または全身治療のいずれが望ましいか、および治療すべき領域に応じて、薬学的組成物を多数の方法で投与することができる。局所（眼科的、膣、直腸、鼻腔内が含まれる）、経口、吸入、または非経口（例えば、静脈内点滴、皮下、腹腔内、または筋肉内

50

注射)で投与することができる。

【0190】

非経口投与用調製物は、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液、および乳濁液を含む。非水溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油(オリーブ油など)、および注射用有機エステル(オレイン酸エチルなど)である。水性キャリアには、水、アルコール/水溶液、乳濁液、または懸濁液(生理食塩水および緩衝化媒質が含まれる)が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リングルデキストロース、デキストロース、および塩化ナトリウム、乳酸加リングル液、または固定油が含まれる。静脈内ビヒクルには、流動物および栄養補充液、および電解質補充液(リングルデキストロースベースのものなど)などが含まれる。例えば、抗菌薬、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどの防腐剤および他の添加物も存在し得る。

10

【0191】

局所投与用処方物には、軟膏、ローション、クリーム、ゲル(例えば、ポロクサマーゲル)、点滴薬、座剤、スプレー、液体、および粉末が含まれ得る。従来の薬学的キャリア、水性基剤、粉末基剤、または油性基剤、および増粘剤などが必要であるか望ましいかもしれない。開示の組成物を、例えば、マイクロファイバー、ポリマー(例えば、コラーゲン)、ナノスフェア、エアゾール、ローション、クリーム、織物、プラスチック、組織操作足場(tissue engineered scaffold)、マトリックス材、錠剤、埋め込み容器(implanted container)、粉末、オイル、樹脂、創傷包帯、ビーズ、マイクロビーズ、遅延放出ビーズ、カプセル、注射液、静脈内点滴、ポンプデバイス、シリコンインプラント、または任意のバイオ工学処理材料中で投与することができる。

20

【0192】

1つの態様では、提供した薬学的に許容可能なキャリアは、ポロクサマーである。商標名ブルロニック(登録商標)と呼ばれるポロクサマーは、水中で透明の熱可逆性ゲルを形成する非イオン性界面活性剤である。ポロクサマーは、ポリエチレンオキシド-ポリプロピレンオキシド-ポリエチレンオキシド(PEO-PPO-PEO)トリプロック共重合体である。2つのポリエチレンオキシド鎖は親水性であるが、ポリプロピレン鎖は疎水性である。これらの疎水性および親水性は、水溶液中に入れた場合に帯電する。PEO-PPO-PEO鎖は、疎水性中心が共にミセルを形成する小さな鎖の形態を取る。ミセルは、連続して、ゲル化特性を有する傾向がある。これは、基内で共に固体(ゲル)を形成し、このゲルは、親水性末端付近に水がわずかに存在するからである。冷却する場合に液体になるが、加温した場合に硬化する。冷却した場合にシリングに吸い込んで正確な用量を測定することができるので、この特徴により、薬学的複合で有用になる。体温に加温した場合(皮膚に適用した場合)、完全な稠度に濃縮されて(特に、ダイズレシチン/パルミチン酸イソプロピルと組み合わせた場合)、適切な塗擦および接着を容易にする。容易に入手され、それによってかかる薬学的適用で使用されているので、ブルロニック(登録商標)F127(F127)は広く使用されている。F127は、EO:PO:EO比が100:65:100であり、重量比PEO:PPOは2:1である。ブルロニックゲルは水溶液であり、典型的には、20~30%のF-127を含む。したがって、提供した組成物を、F127で投与することができる。

30

【0193】

経口投与用組成物には、粉末または顆粒、水性媒質または非水性媒質の懸濁液または溶液、カプセル、サシェ、または錠剤が含まれる。増粘剤、香味料、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が望ましいかもしれない。

40

【0194】

いくつかの組成物を、無機酸(塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアノ酸、硫酸、およびリン酸など)および有機酸(ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、およびフマル酸など)との反応または無機塩基(水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウムなど)お

50

よび有機塩基（モノ、ジ、トリアルキルおよびアリールアミンならびに置換エタノールアミンなど）との反応によって形成された薬学的に許容可能な酸付加塩または塩基付加塩として投与することができる場合がある。

【0195】

組成物の投与に有効な投薬量およびスケジュールを、経験的に決定することができ、かかる決定は当業者の範囲内である。組成物投与のための投薬量範囲は所望の効果を得るのに十分な範囲であり、この効果が障害の症状に影響を及ぼす範囲である。投薬量は、副作用（望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応など）を生じるほど大量であってはならない。一般に、投薬量は、患者の年齢、容態、性別、および疾患の範囲、投与経路、またはレジメンに他の薬物が含まれるかどうかに応じて変化し、当業者が決定することができる。投薬量を、各医師が任意の反対指示（counter indication）事象で判断することができる。投薬量は変化し得、1日に1回以上を1日または数日間投与することができる。所与の医薬品（pharmaceutical product）クラスに適切な投薬量のためのガイダンスを、文献中に見出すことができる。投薬量の範囲は、本明細書中の組成物の適用、容態の重症度、およびその投与経路に大きく依存する。

【0196】

例えば、研究用実験ツールとして適用する場合、NBS1ペプチド組成物を、0.01% w/v の低用量で使用することができる。局所治療では、低投薬量は 0.02% w/v であり、高投薬量はおそらく 2% w/v であり得る。有意により高い濃度の組成物自体または他の化合物との組み合わせを、癌/腫瘍療法のような適用または急性組織損傷の直後の早期濃縮ボーラスとして使用することができる。したがって、提供したポリペプチドの上限は、例えば、腫瘍に直接送達させる初期ボーラスとして投与する場合、2~5% w/v または v/v まであり得る。非経口投与経路（例えば、筋肉内、脳内、心臓内、および脊髄内）のための投薬量の推奨される上限は、損傷の重症度に応じて、1% w/v または v/v まであり得る。この投薬量の上限は、例えば、どのようにしてポリペプチドをその作用を促進するかポリペプチドと協力して作用する他の薬剤と組み合わせるのかに応じて、処方によって変化し得る。

【0197】

提供したポリペプチドの連続送達のために、例えば、静脈内点滴と組み合わせて、容態の改善に基づいて医師によって決定された上限が 0.01 g / Kg 体重の長期間の送達を使用することができる。別の例では、局所送達される提供した核酸濃度の上限は、例えば、どのようにして核酸をその作用を促進するか核酸と協力して作用する他の薬剤と組み合わせるのかに応じて、5~10 μg / cm² であろう。これを、改善に基づいて医師によって決定された頻度で繰り返すであろう。別の例では、例えば、筋肉内、脳内、心臓内、および脊髄内に内部送達される提供した核酸濃度の上限は、50~100 μg / ml 溶液であろう。また、頻度は、改善に基づいて医師によって決定されるであろう。

【0198】

手術前に提供したポリペプチドでの領域の前準備も開示する。手術前の少なくとも 3~6 時間、10~30% のブルロニックゲルまたは目的の部位内にペプチドを透過させることができる任意のかかるキャリアと混合したポリペプチドの濃度は、10~200 μM であり得る。この手順前の馴化は、その後の手術に対する治癒応答を改善することができる（炎症応答の減少が含まれる）。

【0199】

ウイルスベクターは、臨床応用で高い可能性を示すにもかかわらず、高度な実験ツールのままである。そのようなものとして、ウイルスベクターのための期待される投薬レジメンの計算には注意が必要であり、使用するベクター型に非常に依存するであろう。例えば、レトロウイルスベクターは、癌細胞などの分裂細胞に有効に感染し、宿主細胞ゲノムに挿入され、コードタンパク質を無制限に発現し続ける。動物モデルにおけるレトロウイルスの典型的な投薬量は、10⁷~10⁹ 感染単位 / ml の範囲である。それに反して、アデノウイルスは有糸分裂後の細胞を最も有効にターゲティングするが、細胞は、宿主免疫

10

20

30

40

50

系によって迅速に排除されるか、感染細胞が増殖を再開し、その後にウイルスエピソームDNAを希釈する場合にウイルスは最終的に喪失する。実際、この一過性の感染の経時変化は、一定の臨床的状況（例えば、小さな損傷の改善）における本明細書中に記載の組成物の短期送達に有用であり得る。動物モデルでは、 $10^8 \sim 10^{11}$ 感染単位/m¹のアデノウイルスは、研究用として典型的である。動物モデル由来のデータに基づいたベクターの用量範囲を、最終的に臨床状況で使用されるように予想するであろう。薬学的に許容可能な処方物は開発中である。

【0200】

放射線増感の促進のためのポリペプチドなどの開示の組成物の投与後、治療組成物の有効性を、当業者に周知の種々の方法で評価することができる。例えば、当業者は、本明細書中に開示のポリペプチドなどの組成物は、組成物が組織損傷後の被験体の瘢痕組織形成を減少させるか、線維化組織形成を減少させるか、組織再生を改良するか、炎症を減少させることができるという所見によって被験体の放射線増感の促進に有効であることを理解する。これらの基準の測定方法は、当該分野で公知であり、本明細書中で考察されている。

10

4. 組成物の作製方法

他で特に言及しない限り、本明細書中に開示の組成物および開示の方法の実施に必要な組成物を、特定の試薬または化合物について当業者に公知の任意の方法を使用して作製することができる。

【0201】

例えば、提供した核酸を、標準的な化学合成を使用して作製することができるか、酵素的方法または任意の他の公知の方法を使用して生成することができる。かかる方法は、標準的な酵素消化およびその後のヌクレオチドフラグメント単離（例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) Chapters 5, 6を参照のこと）から純粋な合成方法（例えば、MilligenまたはBeckman System 1 Plus DNA合成機（例えば、Milligen-Bioscience, Burlington, MAのModel 8700自動化合成機またはABI Model 380B）を使用したシアノエチルホスホルアミダイト法による）の範囲であり得る。オリゴヌクレオチド作製に有用な合成方法は、Ikutaiら, Ann. Rev. Biochem. 53: 323-356 (1984)（ホスホトリエステルおよびホスファイト-トリエステル法）およびNarangら, Methods Enzymol., 65: 610-620 (1980)（ホスホトリエステル法）にも記載されている。タンパク質核酸分子を、Nielsenら, Biocoupling. Chem. 5: 3-7 (1994)に記載の方法などの公知の方法を使用して作製することができる。

20

30

【0202】

開示のポリペプチド（配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、および配列番号10など）の1つの生成方法は、タンパク質の化学的技術によって2つ以上のペプチドまたはポリペプチドを連結することである。例えば、ペプチドまたはポリペプチドを、Fmoc (9-フルオレニルメチルオキシカルボニル) またはBoc (tert-ブチルオキシカルボノイル) 化学のいずれかを使用した現在利用可能な実験装置を使用して化学合成することができる（Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA）。当業者は、開示のタンパク質に対応するペプチドまたはポリペプチドを、例えば、標準的な化学反応によって合成することができることを容易に認識することができる。例えば、ペプチドまたはポリペプチドを合成し、その合成樹脂から切断しないのに対して、ペプチドまたはタンパク質の他のフラグメントを合成し、その後に樹脂から切断し、それによって他のフラグメント上で機能的に遮断される末端基を曝露することができる。ペプチド縮合反応により、これらの

40

50

2つのフラグメントを、そのカルボキシル末端およびアミノ末端のペプチド結合を介して共有結合して、タンパク質またはそのフラグメントを形成することができる (Grant G A (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide* . W. H. Freeman and Co., N. Y. (1992); Bodansky M and Trost B., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY (少なくともペプチド合成に関連する材料について本明細書中で参照により援用される)。あるいは、ペプチドまたはポリペプチドを、本明細書中に記載のように *in vivo* で独立して合成する。一旦単離されると、これらの独立したペプチドまたはポリペプチドを類似のペプチド縮重反応によって結合して、ペプチドまたはそのフラグメントを形成することができる。

10

【0203】

例えば、クローン化したか合成のペプチドセグメントの酵素的ライゲーションにより、比較的短いペプチドフラグメントを連結してより大きなタンパク質フラグメント、ポリペプチド、または全タンパク質ドメインを生成することが可能である (Abrahmsen Lら, *Biochemistry*, 30: 4151 (1991))。あるいは、合成ペプチドの未変性化学ライゲーションを使用して、より短いペプチドフラグメントから巨大なペプチドまたはポリペプチドを合成的に構築することができる。この方法は、2工程の化学反応からなる (Dawsonら, *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science*, 266: 776-779 (1994))。第1の工程は、非保護合成ペプチド-チオエステルのアミノ末端Cys残基を含む別の非保護ペプチドセグメントとの化学選択的反応であり、これにより、最初の共有結合生成物としてチオエステル結合中間体が得られる。反応条件を変更せずに、この中間体は、自発的で急速な分子内反応を受けてライゲーション部位に未変性ペプチド結合を形成する (Buggiolini Mら (1992) *FEBS Lett.* 307: 97-101; Clark-Lewis Iら, *J. Biol. Chem.*, 269: 16075 (1994); Clark-Lewis Iら, *Biochemistry*, 30: 3128 (1991); Rajarathnam Kら, *Biochemistry* 33: 6623-30 (1994))。

20

【0204】

あるいは、非保護ペプチドセグメントを化学的に結合する。ここで、化学的ライゲーションの結果としてペプチドセグメント間に形成された結合は非天然(非ペプチド)結合である (Schnolzer Mら, *Science*, 256: 221 (1992))。この技術を使用して、タンパク質ドメインのアナログおよび大量の完全な生物活性を有する比較的純粋なタンパク質が合成する (de Lisle Milton RCら, *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, New York, pp. 257-267 (1992))。

30

【0205】

組成物および組成物を誘導する中間体の作製プロセスを開示する。これらの組成物を作製するために使用することができる種々の方法(化学合成法および標準的な分子生物学法など)が存在する。これらおよび他の開示の組成物の作製方法を詳細に開示すると理解される。有効な方法で本明細書中に開示のポリペプチドをコードする核酸および核酸の発現を調節する配列を作動可能に連結する工程を含むプロセスによって生成された核酸分子を開示する。任意の本明細書中に開示の核酸での細胞の形質転換プロセスによって產生された細胞を開示する。任意の本明細書中に開示の核酸の発現プロセスによって產生された任意の開示のペプチドを開示する。任意の本明細書中に開示の核酸分子での動物内の細胞のトランスフェクションプロセスによって產生された動物を開示する。動物が哺乳動物である、任意の本明細書中に開示の核酸での動物内の細胞のトランスフェクションプロセスによって產生された動物を開示する。哺乳動物が、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、または靈長類である、本明細書中に開示の任意の核酸分子での動物内の細胞のト

40

50

ランスフェクションプロセスによって產生された動物も開示する。本明細書中に開示の任意の細胞を動物に添加するプロセスによって產生された動物も開示する。

C . 用途

開示の組成物を、研究ツールとして種々の方法で使用することができる。例えば、開示の組成物（配列番号3、4、5、6、7、8、9、および10を含む単離ポリペプチドなど）を使用して、例えば、結合インヒビターとしての作用によるNBS1とATMとの間の相互作用を研究することができる。開示から明らかであり、そして／または当業者に理解される他の用途を開示する。開示から明らかであり、そして／または当業者に理解される他の用途を開示する。

D . 定義

本明細書中および添付の特許請求の範囲で使用される場合、文脈で明らかに別と記載されていない限り、単数形「a」、「a n」、および「t h e」には、複数形が含まれることに留意しなければならない。したがって、例えば、「a p e p t i d e」の言及には、複数のかかるペプチドが含まれ、「t h e p e p t i d e」は、1つ以上のペプチドおよび当業者に公知のその等価物などをいう。

【0206】

「任意選択的な」または「任意選択的に」は、その後に記載された事象、環境、または材料が生じても生じなくてもよく、存在しても存在しなくてもよく、記載には、事象、環境、または材料が生じるか存在する例およびこれらが生じないか存在しない例が含まれることを意味する。

【0207】

範囲を、本明細書中で、「約」一方の特定の値から、および／または「約」他方の特定の値までと示すことができる。かかる範囲を示す場合、別の実施形態には、一方の特定の値から、および／または他方の特定の値までが含まれる。同様に、先行詞「約」の使用によって値を近似で示す場合、特定の値は別の実施形態を形成すると理解されるであろう。各範囲の終点は、他の終点と関連するかおよび他の終点と無関係であるかの両方で重要であることが理解される。本明細書中に開示の多数の値が存在し、各値は、値自体に加えた「約」特定の値として本明細書中に開示されるとも理解される。例えば、値「10」を開示する場合、「約10」も開示される。値「以下」、「値以上」である値を開示する場合、当業者に適切に理解されるように、値の間の可能な範囲も開示されるとも理解される。例えば、値「10」を開示する場合、「10以下」および「10以上」も開示される。出願を通して、データは、多数の異なる形式で提供され、このデータが終点および出発点ならびにデータポイントの任意の組み合わせについての範囲を示すとも理解される。例えば、特定のデータポイント「10」および特定のデータポイント15を開示する場合、10および15を超える値、それ以上の値、それ未満の値、それ以下の値、およびそれと等しい値ならびに10と15との間が開示されると見なされると理解される。2つの特定の単位の間の各単位も開示されるとも理解される。例えば、10および15を開示する場合、11、12、13、および14も開示される。

【0208】

他で定義しない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、開示の方法および組成物が属する当業者によって一般的に理解されている意味を有する。本明細書中に記載のものと類似するか等価な任意の方法および材料を本発明の方法および組成物の実施または試験で使用することができるが、特に有用な方法、デバイス、および材料を記載する。本明細書中で引用された刊行物および引用される材料は、本明細書中で特に参照により援用される。本明細書中で、本発明が先行発明に照らしてかかる開示に先行しないと見なされると解釈されない。任意の引例が先行技術を構成すると認めない。引例の考察は、その著者が主張する事項を述べ、出願人が引用した書類の正確さおよび妥当性に取り組む権利を留保する。多数の刊行物が本明細書中で参照されているが、かかる引例は、任意のこれらの書類が当該分野の一般的知識の一部を形成すると見なさないことが明確に理解されるであろう。

10

20

30

40

50

【0209】

本明細書の説明および特許請求の範囲を通して、用語「comprise」およびこの用語の変形形態（「comprising」および「comprises」など）は、「～が含まれるが、これらに限定されない」を意味し、例えば、他の添加物、成分、整数、または工程を排除することを意図しない。

【0210】

本明細書中で使用される場合、「inhibit」、「inhibiting」、および「inhibition」は、活性、応答、容態、疾患、または他の生物学的パラメーターを減少させることを意味する。これには、活性、応答、容態、または疾患の完全な喪失が含まれ得るが、これに限定されない。これには、例えば、未変性レベルまたはコントロールレベルと比較した場合、活性、応答、容態、または疾患の10%減少も含まれ得る。したがって、減少は、未変性レベルまたはコントロールレベルと比較した場合、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%、または任意の量の減少であり得る。

10

【実施例】

【0211】

E. 実施例

(実施例1)

1. 毛細管拡張性失調症変異（ATM）媒介性DNA損傷応答を阻害して放射線感受性を増強することができるNBS1C末端ペプチドの特徴づけ。

20

i. 材料と方法

細胞培養：ヒト腫瘍細胞株HeLaおよびDU-145（ATCC, Manassas, VA）、ならびにヒトSV-40形質転換線維芽細胞株GM9607（Coriell Cell Repositories, Camden, NJ）を、DMEM-10%FBS中にて5%CO₂加湿大気下で指數関数的成長を維持した。グリア細胞株M059J（Coriell Cell Repositories）を、RPMI-15%FBS中にて5%CO₂加湿大気下で指數関数的成長を維持した。

【0212】

ペプチド合成：全ペプチドを、Agent（San Diego, CA）によって合成し、in vitroでの検出のためにN末端をビオチンタグで標識した。3つのペプチド（ポリアルギニン（R₉）内在化配列のみを含むペプチド、ヒトNBS1のアミノ酸735～744に対応する野生型NBS1阻害ペプチド（wtNIP）、およびヒトNBS1のa.a.735-744がスクランブルされたランダム配列ペプチド（scNIP））を産生した。ペプチドをDMSOに溶解し、-20°で保存し、使用前にDMEM-10%FBSで再構成した。

30

【0213】

照射：X-RAD320照射キャビネット（Precision X-ray, East Haven, CT）を、320KVおよび160mAで、

【化13】

0.8mm Sn + 0.25mm Cu + 1.5mm Al (HVL ≈ 3.7 Cu)

40

フィルターを20cmのTSDおよび線量率3.4Gy/分で使用した。全照射を、通常の大気圧および温度下で行った。

【0214】

免疫沈降およびウェスタンプロットティング：ATM、NBS1、およびMRE11の免疫共沈降のために、細胞を氷冷溶解緩衝液（10mM Tris-HCl（pH 7.5）、100mM NaCl、5mM EDTA、0.5% NP-40、5mM Na₃VO₄、1mM NaF、および1mM PMSFからなる）中で1時間溶解した。遠心分離後、上清を表示の抗体と共にインキュベートした。溶解緩衝液での十分な洗浄後、免疫

50

沈降物を、特異的抗体を使用した免疫プロットによって分析した。ウェスタンプロットティング分析のために、サンプル（細胞溶解物または免疫沈降物）を、4～12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロース膜に移し、種々の抗体で探索した。

【0215】

免疫蛍光顕微鏡法：指數関数的に成長した細胞培養物を、滅菌した22cm²カバースリップ上にプレートし、37の5%CO₂加湿大気中で24時間インキュベート後、室温でNIPペプチドにて処理する。カバースリップをPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒド-0.25% Triton X-100にて室温で15分間固定し、室温で30分間ブロッキングし、FITC抱合ストレプトアビシンまたは抗-H2AX抗体およびホスホ-NBS1抗体（Rockland Immunnochemicals, Gilbertsville, PA）と室温で1時間インキュベートした。次いで、カバースリップをVectashield Elite（Vector Labs, Burlingame, CA）上にマウントし、Leica蛍光顕微鏡で観察した。Q Imaging Retiga Exiデジタルカメラを使用して40倍で画像を取り込み、Image Pro-Plus 5.1ソフトウェアを使用して分析した。

10

【0216】

MTTアッセイ：細胞傷害性研究のために、指數関数的に成長したHeLa細胞またはDU-145細胞の培養物を回収し、完全培地中の96ウェルプレート（5000細胞/ウェル）にプレートし、一晩インキュベートした。翌日、細胞を、NIPペプチド（0、5、10、20、50、または100μM）またはポジティブコントロールとしてのタキソール（0、10、50、または100μM）で処理した。経時変化の終点で、製造者のガイドンスにしたがってMTT細胞生存アッセイ（Promega Corp., Madison, WI）を使用して、ペプチド細胞傷害性を決定した。

20

【0217】

コロニー形成アッセイ：放射線感受性を決定するために、コロニー形成アッセイを組み込んだ。細胞を、0.125%トリプシン-0.05%EDTAを使用して回収し、ペレット化し、1mlの新鮮な培地中に再溶解し、22gニードルを使用してクランプを分散させ、その後にトリパンブルー中にて血球計算板で計数した。次いで、細胞を限界希釈にて6ウェルプレートにプレートし、一晩接着させた。培養物を、PBS、R₉、wtNIP、またはscNIPで1時間処理し、照射した（0～6Gy）。培地を無ペプチド培地と置換した時に、新鮮なペプチドを4時間毎にIRの24時間後まで添加した。培養物を10～12日間インキュベートし、回収し、0.5%クリスタルバイオレットのメタノール溶液で染色した。解剖顕微鏡を使用してコロニー数を決定した。50個超の細胞集団を1コロニーとして計数し、コロニー数を未処理偽照射コントロール細胞の値の比率として示した。線形回帰分析によって生存曲線をプロットし、D₀値は、生存率を37%にする線量を示す。他の小分子インヒビターと比較したペプチドの放射線感受能力を決定するために、感受性増強比（sensitizing enhancement ratio）（SER）を、scNIPまたはwtNIPの存在下で生存率を37%に減少させるのに必要な線量に基づいて計算した。以下の式を使用した：

30

【0218】

40

【数1】

$$SER = \frac{\text{scNIP処理細胞のD}_0}{\text{wtNIP処理細胞のD}_0}$$

統計学：統計的有意性を確立するために、スチュードントt検定を組み込んだ。データを、最初に、0～6Gyの線量範囲にわって各実験群にフィッティングした。有意差を、p < 0.05で確立した。

i. 結果

C末端NBS1阻害ペプチド（NIP融合タンパク質）の内在化および細胞傷害性：C

50

末端NBS1ドメインは、ATMへの結合に重要であり、C末端の20残基を欠くNBS1短縮誘導体は、*in vitro*でATMに会合しない(Cerosaletti and Concannon, 2003, 2004; Falckら, 2005; Cerosalettiら, 2006)。さらに、NBS細胞中のATM結合ドメインを欠くNBS1導入遺伝子の発現により、ATM活性化が劇的に減少する(Difilippantonioら, 2005)。ATMとのNBS1会合の阻害によってIR後に最適以下のATM活性化が導かれるので、NBS1-ATM相互作用は、放射線増感剤開発のための新規の標的であり得る。NBS1-ATM相互作用を阻害するための1つのアプローチは、内因性のNBS1-ATM相互作用と競合することができる保存C末端配列を含む小ペプチドを使用することである(図1A)。したがって、以下の2つの機能ドメインを含むペプチドをデザインした:一方はNBS1-ATM会合を阻害する干渉ドメインであり、他方は、干渉ペプチドを細胞に輸送する内在化ドメイン。干渉ドメインのために、図1Bに示すように、保存されたNBS1のC末端モチーフを含むアミノ酸配列を使用した。この配列は、*in vitro*データに基づいた最も短いATM結合モチーフを含む。内在化ドメインのために、ポリアルギニン(R₉)配列を使用した。ポリアルギニン配列は、原形質膜を介した小ペプチドおよびタンパク質を有意に有効に輸送することが示されている(Fuchs and Raines, 2004; Deshayesら, 2005)。R₉のみおよびヒトNBS1のアミノ酸73~44に対応するwtNIPを含む3つのペプチドを生成した。NBS1のアミノ酸735~744をスクランブルしたペプチド(scNIP)を産生するためのランダム配列ジェネレーターを使用して、第3のペプチドをネガティブコントロールとしてデザインした。これらのペプチドを、*in vitro*での検出のためにそのN末端にビオチンタグで標識した。

10

20

30

40

【0219】

第1に、ペプチドの内在化を評価した。ペプチドで処理した細胞を、フルオレセイン抱合ストレプトアビシン抗体で探索して、ビオチン化ペプチドの存在を決定した。10 μM濃度のR₉、wtNIP、またはscNIPでのHeLa細胞の1時間の処理により、ペプチドが有意に細胞に取り込まれた(図2)。R₉、wtNIP、およびscNIP内在化が細胞質区画および核区画に局在化したのに対して、DMEMのみで処理したコントロール群は蛍光シグナルを示さなかった。

【0220】

ペプチドを照射研究で使用するので、ペプチドが細胞中に残存する期間が、ペプチドがIR後のDNA修復プロセスを通して確実に存在すると判断された。図7に示すように、ペプチドとのインキュベーションの直後に、全サンプル群は明らかにペプチドの存在を示した。処理から2時間以内に、細胞は、R₉、wtNIP、およびscNIPの強い分布を示し続けたが、wtNIPおよびscNIPの蛍光強度レベルは4時間以内に減少し始め、8時間まで実質的に減少した。R₉は8時間でわずかに上昇した一方で、wtNIPおよびscNIPの強度ははるかに弱かった。これは、R₉配列がより容易に転座し、分子またはペプチドにカップリングしない場合よりも長く存在し続けることを示唆する文献と一致する(Jonesら, 2005)。12時間までに、R₉ペプチドで処理した細胞は、依然として顕著な染色を示した一方で、wtNIPまたはscNIPで処理した細胞ははるかに弱い細胞質染色を示し、核染色は認められなかった。24時間以内に、R₉で処理した細胞は細胞質染色を示したが、核シグナルはもはや認められず、wtNIPまたはscNIPで処理した細胞は検出可能なペプチドの存在を示さなかった。これらのデータは、NIPペプチドが細胞中に少なくとも4時間滞在することができることを示す。これらのデータは、NIPペプチドを時間0で細胞に添加し、次いでIRを使用した処理後の最初の24時間は4~6時間毎に添加することによって最大の阻害効果を得ることを示す。

50

【0221】

次に、R₉、wtNIP、およびscNIPの*in vitro*細胞傷害性を決定した。96ウェルプレート中で成長したHeLa細胞を、ペプチド(0、5、10、20、

50、または100μM)またはパクリタキセル(0、10、20、50、または100μM)で24時間処理した。処理後、MTTアッセイを使用して、可溶化ホルマザン(細胞増殖の代謝指標)の産生を測定した。ペプチド用量が20μM未満である場合、ペプチドは、処理から72時間後まで成長阻害効果または細胞傷害効果を示さなかった(図2B)。MTTアッセイで認められた細胞傷害性に基づいて、次の全実験の作業濃度(working concentration)として10μMを選択した。10μMのR₉、wtNIP、およびscNIPのクローニング原性生存に及ぼす影響は、治療群間で有意差を示さなかった(p < 0.05)。用量および経時時間実験をいくつかの他の細胞株において行い、データによってこれらのペプチドの迅速な内在化および最小の細胞傷害性が確認されたことに注目すべきである。

10

【0222】

wtNIPはNBS1-ATM相互作用を無効にする: R₉抱合NIPペプチドがNBS1-ATM相互作用を阻害することができるかどうかを調査するために、NIPペプチドで処理した細胞において免疫共沈降実験を行った。ペプチド処理から4時間後、HeLa細胞を回収し、抗NBS1抗体を使用した免疫沈降に供した。次いで、免疫沈降物を、抗ATM、NBS1、およびMRE11抗体でプロッティングした。コントロール細胞と比較してR₉処理細胞で正常レベルのATM-NBS1会合が認められた。しかし、wtNIP処理細胞では、NBS1は、もはやATMを減少させることができなかった(図3)。さらに、wtNIPは、NBS1-ATM相互作用にのみ影響を及ぼし、NBS1のMRE11への結合を干渉しなかった。逆に、scNIPは、NBS1-ATM相互作用に影響を及ぼさなかった。IRで処理した細胞では、wtNIPは、非照射細胞と類似の影響を示した。これらの所見は、DNA損傷の非存在下または存在下で、wtNIPがNBS1-ATM相互作用を無効にすることを証明している。

20

【0223】

wtNIPはIR誘導性-H2AXおよびNBS1 pSer343フォーカス形成を阻害する: IR誘導性DNA損傷に対する最も早い応答の1つは、機能的ATMが必要な-H2AXフォーカスの形成である(Burmaら, 2001; Furutaら, 2003)。wtNIPがNBS1-ATM相互作用に対して阻害効果を示したので、IR誘導性-H2AXフォーカス形成がペプチドによって阻害されるかどうかを調査した。免疫蛍光顕微鏡法を使用して、R₉、wtNIP、またはscNIPの存在下での偽照射細胞または照射細胞中の-H2AXフォーカスの存在を検出した。R₉が-H2AXフォーカス形成を有意に阻害しない一方で、wtNIPは、6Gy IRでの処理から30分後に-H2AXフォーカス形成を阻害することができる(図4)。HeLa細胞中の平均-H2AXフォーカス/核数は、IR後にR₉(42フォーカス/核)またはscNIP(41フォーカス/核)で処理した細胞中で有意に増加したのに対して、wtNIPで処理した細胞は平均の6.9-H2AXフォーカス/核しか示さず、これは、偽照射細胞に類似する(図4)。DU-145細胞で類似の結果が認められたのに対して、R₉またはscNIP曝露はIR誘導性フォーカス形成に影響を及ぼさず、wtNIPはH2AXフォーカス/核の有意な減少を示した(図8)。したがって、IR誘導性-H2AXフォーカス形成を、wt-NIPによって阻害することができる。

30

【0224】

wtNIPがATM媒介性DNA損傷経路を阻害することができるという見解をさらに支持するために、IR誘導性NBS1フォーカス形成(DSB部位でのATM依存性プロセスであると考えられる事象)(Limら, 2000)を調査した。NBS1フォーカスは、セリン343に対するATM媒介性NBS1リン酸化の結果である。抗ホスホ-Ser343 NBS1抗体を使用して、R₉またはscNIPで処理した細胞と比較してwtNIPで処理した細胞でNBS1リン酸化が有意に阻害されることが認められた(図5Aおよび9A)。偽照射HeLa細胞中の平均フォーカス数は、R₉、wtNIP、およびscNIPについてそれぞれ6、8、および6であった。R₉またはscNIPで処理した細胞は25および31フォーカス/核を示したのに対して、wtNIPで処理した細

40

50

胞は、6 - Gy IRでの処理後にわずか6フォーカス/核しか示さなかった(図5B)。

【0225】

NBS1および-H2AXリン酸化の両方について低レベルのバックグラウンドフォーカス形成が存在し、これは、正常に成長する哺乳動物細胞培養物における有糸分裂に相關していた(McManus and Hendzel, 2005)。

【0226】

wtNIPは照射感受性を増加させる:次いで、NIPペプチドへの曝露によって細胞放射線感受性が増加するかどうかを、コロニー形成アッセイを使用して試験した。図6Aは、0~6Gyの線量範囲にわたってR₉、wtNIP、またはscNIPで処理したHeLa細胞の生存曲線を示す。R₉やscNIPはいずれも放射線感受性に影響を及ぼさないのに対して、wtNIPはIR誘導性生存率を有意に減少させることができる。

10

【0227】

2Gyでの処理後、wtNIPで処理した細胞の生存率は、R₉およびscNIPで処理した細胞の52%および49.7%と比較して31.4%であった。4Gyでは、wtNIPで処理した細胞の生存率は、R₉およびscNIPで処理した細胞の11.8%および11.2%と比較して、4.5%に減少した。6Gyへの線量の増加により、それぞれR₉またはscNIPで処理した細胞の5.3%および6.9%と比較して、wtNIPで処理した細胞の生存率は小幅に減少する(1.7%)。wtNIP処理細胞の増感剤増強比(sensitizer enhancement ratio)(増感剤の相対有効性)は、2、4、および6Gyでそれぞれ1.66、2.61、および3.12であった。

20

【0228】

照射生存曲線を、放射線感受性に及ぼすNIPの影響を定義するためのD₀に基づいて特徴づけた。D₀は、生存率37%に必要な平均致死線量を示し、細胞固有の放射線感受性の基準である。wtNIPで処理したHeLaのD₀値は、scNIPで処理した細胞の3.0と比較して1.9であった。wtNIP誘導性放射線感受性の統計的有意性を確立するために、スチューデントt検定(対応のある2サンプルの平均)を組み込んだ。データを、最初に、0~6Gyの線量範囲にわって各実験群にフィッティングした。wtNIPで処理した細胞とDMEM、R₉、またはscNIPで処理した細胞との間で、クローン原性生存率に有意差(p<0.05)が認められた。SERは1.58であった。これは、他の試験した放射線増感剤(ゲムシタビン、5-フルオロウラシル、ペントキシフィリン、ビノレルビン)およびいくつかのATM特異的放射線増感剤と類似している(SERは1.1~2.5)(Zhangら, 1998; Lawrenceら, 2001; Robinson and Shewach, 2001; Strunzら, 2002; Collisら, 2003; Zhangら, 2004)。これらの所見は、前立腺癌細胞株DU-145で確認されている(SERは1.46)。全体として見ると、wtNIPペプチドの放射線増感能力が強く証明される。

30

【0229】

wtNIPがNBS1の保存ATM結合配列を含み、この配列はATR相互作用タンパク質およびKU80(それぞれATRおよびDNA-PKcsの相互作用タンパク質)のC末端中にも保存されているので、ATRまたはDNA-PKcsも阻害することができる(Abramham, 2001)。この可能性を試験するために、欠損ATM(GM9607)またはDNA-PKcs(M059J)を使用して、細胞株においてコロニー形成アッセイを行った。wtNIPでの処理によってM059J細胞の放射線感受性が増大するにもかかわらず(図6C)(SERは1.83)、GM9607(図6D)は放射線感受性の変化を示さなかった。GM9607細胞がATMを欠損し、且つ機能的ATRおよびDNA-PKcsを有するので、これらの所見は、wtNIPがATMを特異的にターゲティングすることができるが、ATRやDNA-PKcsをターゲティングせず、放射線増感を達成することを強く示す。

40

50

【0230】

(実施例2)

2. 動物研究

これらのペプチドの *in vivo* 放射線増感効果を、マウス腫瘍異種移植片モデルおよびゼブラフィッシュ胚モデルに対して行う。腫瘍細胞中に特異的に蓄積する腫瘍ターゲティングNIPペプチドを投与する。マウス乳癌および前立腺癌の異種移植片モデルに及ぼすwtNIPペプチドおよびその保存的変異体の放射線増感効果の確認に加えて、以下の疑問に取り組む：1) どのようにしてNIPが腫瘍細胞を特異的に放射線増感させるのか、2) ペプチドが正常組織も放射線増感するのか、3) どのようにして腫瘍微小管密度が放射線増感剤増強比に影響を及ぼすのか、および4) ゼブラフィッシュ胚に及ぼすwtNIPペプチドの放射線増感効果はどれくらいか。

10

i. マウスモデル

異種移植片に対する適切なレベルのNGR（腫瘍ホーミングモチーフ）抱合融合ペプチドを得るのに必要な経時時間を決定する。次いで、マウス中で成長した異種移植片に及ぼす放射線増感ペプチドの影響を決定する。これを達成するために、ヒトの乳房腫瘍および前立腺腫瘍の異種移植片を、マウス中に構築し、マウスにペプチドを注射し、適切な期間、ペプチドに異種移植片細胞をターゲティングさせる。

【0231】

NGR--腫瘍ホーミングモチーフ：ポリアルギニン配列は、融合NIPペプチドの有効な内在化を行うことができる。しかし、このゴールに到達するための別のアプローチは、内在化および腫瘍特異的ターゲティング能力の両方を有する配列を使用することである。1つのかかるペプチドは、環状ホーミングペプチドCNGRC（配列番号11）を含むNGRモチーフである。NGR含有ペプチドは、細胞傷害性薬剤、アポトーシス促進性ペプチド、および腫瘍壞死因子の腫瘍脈管構造への送達に有用であることが証明されている（Ellerbyら, 1999; Arapら, 1998; Arapら, 2002; Curnisら, 2002）。より興味深いことに、NGRペプチドは、原発性および転移性の前立腺腫瘍に結合することができるが、正常な前立腺組織に結合することができないことが証明されている（Pasqualiniら, 2000）。したがって、NGR配列を、動物研究で使用する。3つのNGR-NIP融合ペプチド（NGRのみ、NGR-wtNIP、およびNGR-scNIPが含まれる）を合成する。NGR配列が首尾よく使用され、これは、腫瘍ホーミングおよび内在化能力を示している。

20

【0232】

MCF-7およびPC-3異種移植片の確立：MCF-7乳癌およびPC-3前立腺癌の異種移植片を確立する。特定の発熱物質を含まない4~6週齢の雄nu/nu（ヌード）マウスを入手し、層流隔離飼育器中に保持した滅菌フィルタートップケージ中に収容する。マウスにオートクレーブした飼料および水を自由に与える。マウスを、研究プロトコールでの使用前に1週間馴化させる。動物を含む全手順を、層流フード中の滅菌条件下で行う。MCF-7またはPC-3腫瘍細胞（PBS中に 2×10^6 /マウス）を、胸腺欠損ヌードマウスの側腹部に皮下注射する。全実験では、任意の治療を開始する前に、腫瘍を確立し、成長させる。

30

【0233】

ペプチドの *in vivo* 分布：一旦腫瘍が約100mm³に到達すると、動物を無作為に分類し、0.5~2mg / kg の範囲の用量のNGRのみ、NGR-wtNIP、またはNGR-scNIPペプチドにて、以下の2つの経路のうちの1つによって処理する：腹腔内注射（ip）または腫瘍内注射（it）。注射から0、6、12、または24時間後、マウスを安楽死させ、腫瘍組織および腫瘍組織周辺の正常組織を得る。ペプチド注射から24時間後までに全血を単離する。サンプルを、FITC抱合ストレプトアビシン抗体で染色した場合、蛍光標示式細胞分取（flow-activated cell sorting）（FACS）分析によって評価する。脾細胞を、マウスへのペプチド注射から24時間後までに脾適除によって分析する。これらの実験により、どれくらいの速

40

50

さでペプチドが腫瘍組織に到達することができるのか、どのくらいの期間腫瘍中に保持されるのか、およびペプチドが正常組織中にも蓄積されるのかどうかに関する情報が得られる。腫瘍組織内のペプチドの局在化を、ペプチド注射から24時間後までの腫瘍組織の切開によって分析する。腫瘍組織標本を、FITC抱合ストレプトアビシンで染色し、免疫蛍光顕微鏡法を行う。

【0234】

照射の送達：異種移植片を、23Gニードルを使用した 2×10^6 個のヒトMCF-7またはPC-3癌細胞を含む0.1mlのPBSの皮下注射によってマウスの側腹部に移植する。一旦腫瘍が 100 mm^3 に到達すると、マウスを無作為に分類し、ipまたはitでペプチドを注射する。ペプチド曝露のための用量および時間を決定する。腹腔内注射のために、ペプチドの体積は20ml/Kg未満である。腫瘍内注射のために、体積は10ml/kg未満である。ペプチドを腫瘍にターゲティングするための短期間の間隔後、マウスを、フィルタートップケージ中の動物センターから照射室に移動する。照射ユニットは、Precision X-RAD 320照射システムである。50cm離れた照射器の線量率は2.8Gy/分である一方で、25cmの距離では5.6Gy/分である。単回線量(10または20Gy)および分割線量(2Gy×5回または2Gy×10回)の両方を行う。分割照射の間隔は24時間であり、照射持続時間は4分未満である。照射手順の間、Plas Labs (Lansing, MI)の透明なプラスチック製のマウス拘束デバイス(チューブ)中でマウスの動きを短期間(5分未満)制限して、腫瘍に照射をターゲティングさせる。

10

20

30

40

【0235】

腫瘍照射反応の測定：照射後、腫瘍体積を、ダイアルカリパスを使用して、さらにわずか8週間の間、2週間毎にモニタリングする。腫瘍の 1000 mm^3 を超えた成長、発疹、または潰瘍化を行わせない。これらのエンドポイントのいずれかに到達した場合、マウスを安樂死させる。腫瘍成長を、 $*(w * l * h) / 2$ (式中、wは幅であり、lは長さであり、hは高さ(mm)である)として計算した平均腫瘍体積で報告する。腫瘍体積を時間の関数としてプロットして、放射線療法後のペプチドの増感効果を比較する。

【0236】

正常組織応答の測定：NGR-wtNIPペプチドは、腫瘍細胞を特異的にターゲティングする傾向がある。この治療薬がクリニックで有用であることを評価するための臨界エンドポイントは、どのようにしてこの治療薬が正常組織の照射応答に影響を及ぼすのかということにある。早期(皮膚)および後期(肺)応答正常組織に対する照射応答を調査する。これらの組織が多数の癌型(特に乳癌放射線療法)についての照射野に分類されるので、これらの組織を選択する。これらの組織が選択される第2の理由は、皮膚および肺の照射応答を評価するための確立された方法および標準が存在することである。マウスを、NGR融合ペプチドで処理し、その後に10Gy照射を送達させる。皮膚損傷を研究するために、拘束した非麻酔マウスの右後足に局所照射する。(血流に影響を及ぼし得る)麻酔の使用を回避するために、脚の最上領域中の拘束治具に組織アクリル系接着剤(histoacrylic glue)の小滴を適用することによって治療に正確な位置に脚を固定する。処置後、脚は、治具から容易且つ苦痛なく引き離される。マウスを、処置後11~30日間毎日観察し、処置した足の湿性剥離(moist desquamation)を示す各治療群中の動物の比率を記録する(Horsmanら, 1997)。肺照射のために、左肺に照射する場合、マウスを吸入全身麻酔(イソフルレン)下におく。右肺を、鉛を使用して照射から遮断し、ネガティブコントロールとして使用する。肺損傷を評価するために、8ヶ月生存したマウスの肺組織学を、左肺のペプチドを組み合わせた照射後に研究する。両肺を解剖し、10%ホルマリン中で24時間固定し、厚さ5μmの切片にし、スライドガラス上にマウントし、染色する。マッソン三色染料を使用して、線維症を検出する(Dileto and Travis, 1996)。

i i . ゼブラフィッシュ胚モデル

ゼブラフィッシュ(Danio rerio)は、そのヒトとの比

50

較的近い系統関係、生殖能力および接触性、胚発生期間の短さ、観察の容易さ、および直接観察できることにより、治療薬を迅速且つ有効にスクリーニングするための固有の脊椎動物モデルとして使用することができる (Stern and Zon, 2003)。ヒト遺伝子に関連する2つのゼブラフィッシュ遺伝子がクローニングされている。ゼブラフィッシュATM (zATM) (Gargal, 2004) およびゼブラフィッシュNBS1 (zNBS1、NCBI番号AAW50708) は、ヒトパートナーであるhATMおよびhNBS1と少なくとも70%の相同性を有する。いくつかの研究で、電離放射線への曝露後のゼブラフィッシュ胚生存の発達期間および線量依存性を調査した (Geigerら, 2006; Traverら, 2004; Bergmannsら, 2005)。これらの研究により、提案されたNIPペプチドの放射線増感効果を評価するためにこの系を使用するための有用な情報が得られた。

10

【0237】

胚の採取および維持：野生型成体ゼブラフィッシュを入手し、標準的な操作手順にしたがって保存する。ゼブラフィッシュを、28.5にて14時間の日中/10時間夜間サイクルで保持する。成体ゼブラフィッシュを性別によって隔離し続け、胚採取タンク (Aquatic Habitats, Apopka, FL) 中で交配させる。これらの交配由来の胚を、初期サイクルの開始直後に回収し、1 mM NaClを含むタンク水 (tank water) を含むペトリ皿に移す。防腐剤としてメチレンブルー (最終濃度0.5 mg/L) を日常的に添加する。生きている胚を洗浄し、2 ml 胚培地中で1~2細胞期 (受精から約0.5~1時間後 (hpf)) によって分類し (標準的な12ウェル培養プレートの1ウェルにつき10胚)、正常な発生を遅延させるために正常酸素圧条件下にて25で保持する。24~48 hpfのデコリオネーション (dechorionation) および72~96 hpfの再デコリオネーション後にEMが変化する。

20

【0238】

胚照射およびNGR-ペプチド曝露：2、4、6、8、または24 hpfの胚を、異なる用量 (10~50 μM) のNGR-ペプチドに1時間曝露し、その後に1回のX線照射 (5、10、または20 Gy) に曝露する。照射後、胚を25で24時間インキュベートし、デコリオネーションし、次いで、25で144時間まで維持して、形態学および生存を評価する。ここでは、ポリアルギニン抱合ペプチド (Rg、wtNIP、およびscNIP) およびNGR抱合ペプチド (NGRのみ、NGR-wtNIP、およびNGR-scNIP) の両方を実験で試験することに留意のこと。

30

【0239】

生存率アッセイおよび形態学分析：各胚の生存率を、144 hpfまでの受精点または各実験の結論から継続的に評価する。光学顕微鏡を使用して、全ての観察を行う。最初の24 hpfについて、Kimmelman (Kimmelman, 1995) によって記載された方法を使用した適切な細胞分裂の評価によって生存率を決定する。24 hpf後、心筋収縮能を、継続的生存と定義する。各治療群についての胚総数に対する生きている胚の比率として生存率を計算し、生存曲線は3つの個別の実験の平均を示す。分子としてのNIP-ペプチド前処置胚および分母 (dominator) としての非NIP-ペプチド前処置胚を使用した生存比として放射線増感剤増強比を計算する。組織学的評価のために、胚を4%パラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィンに包埋する。サンプルを切片にし、組織スライス (5 μM) をH&Eで染色し、Leica顕微鏡にて40倍で評価し、Q imaging Retiga Exiデジタルカメラを使用して撮影し、Image Pro Plus 5.1ソフトウェアで分析する。各治療群由来の少なくとも20個の胚を評価し、実験を少なくとも3回繰り返す。

40

(実施例3)

3. 高速処理スクリーニング (HTS)

高速処理スクリーニング (HTS) は、創薬分野で有意に有利であり、タンパク質-タンパク質相互作用を破壊して酵素活性を阻害する化合物について巨大ライブラリーをスクリーニングすることが可能になる (Fernandes, 1998; Sittampal

50

amら, 1997)。HTSアッセイの構築のための1つの実現可能なアプローチは蛍光偏光(FP)であり、これは、巨大分子ライブラリーをスクリーニングするための無細胞ベースアッセイである(Roehrら, 2004)。蛍光偏光(FP)アッセイは、偏光によって励起されるフルオロフォアを使用し、光に平行なフルオロフォアのみが励起される(Nasir and Jolley, 1999; Silvermanら, 1998)。分子の回転速度は分子サイズに依存し、その結果、5000Da未満のリガンドで有意に脱分極して急速な分子回転が起こり、脱分極蛍光シグナルを放射することができる。有意により大きなサイズ(5000Da超)の分子のために、フルオロフォアが光を脱分極する能力を著しく減少させて分極シグナルを増加させる(図10)(Sportsmanら, 2003; Thompsonら, 2002)。FP HTSを使用して、乳癌関連遺伝子であるBRCA1、Hsp90、およびBcl-xLのBRCTドメインをターゲティングするためのインヒビターを同定した(Howesら, 2006; Kimら, 2004; Qianら, 2004)。

10

【0240】

FPアッセイを使用して、Southern Research Institute(20K化合物)およびCB2ライブラリー(100K)で開発した化合物のライブラリーならびにこのライブラリー由来の多様な組(10Kおよび3K)をスクリーニングし、NBS1-ATM相互作用を遮断することができる化合物を同定する。ATM中でNBS1の保存C末端が一連のheat反復(HR2(a.a.248~522)およびHR7(a.a.1436~1770)に結合することが証明されているので(図1)、GST-ATMペプチド(受容体として)およびNBS1ペプチド(トレーサーとして)の混合物を使用した無細胞アッセイでの蛍光分極シグナルの変化の検出によって、FPアッセイを行う。アッセイの評価のために、統計実験をデザインする。いくつかのパラメーターを確認および最適化する(受容体濃度、トレーサー濃度、プレート型、DMSO耐性、およびインキュベーション時間が含まれる)。

20

i. アッセイの構築および最適化

GST-ATMペプチドの生成および精製: ATMのHR2およびHR7を含む精製GST融合タンパク質を生成する。GST-ATM構築物を产生するために、残基248~1770(GST-ATM)を含むグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)をコードする発現ベクターを、ヒトATM cDNAの対応するPCR生成BamH1-EcoR1フラグメントのpGEX-2T(Amersham Bioscience)への挿入によって生成する。GST-ATM融合タンパク質を標準的なGST-融合ペプチド調製方法によって精製し、タンパク質の均一性をSDS-PAGEによって分析する。

30

【0241】

NBS1-ATM結合に及ぼすテキサスレッド標識の影響: 第2の工程は、NBS1C末端ペプチド(a.a.734~754)上のテキサスレッド(TR)標識の最適な位置を決定することである。化合物の自己蛍光によって生じ得る偽陽性を排除するために、フルオレセインの代わりにTRを選択した。最初に、N末端またはC末端上のTR標識がNBS1-ATM結合に影響を及ぼし得るかどうかを試験する。NBS1保存C末端配列(QHAKEESSLADDLFRYNPYLKRR、配列番号3)(3つの重要なATMの結合部位(736~737(EE)、741~742(DD)、および745~746(RY))を含む)を、結合アッセイに使用する。TR標識がATM結合を妨害しない部位を同定するために、表3に示すペプチドのN末端(TR-NBS1)またはC末端(NBS1-TR)のいずれかにTR標識を有する2つのペプチドを合成する。次いで、漸増濃度のGST-ATMタンパク質を使用した一定濃度のTR標識タンパク質(100μM)の滴定によって、各標識ペプチドについての解離定数(K_d)を決定する。分極はタンパク質の分子量に直接関連するので、GSTタグは置いておく。結合ペプチドと遊離ペプチドとの間の分極の相違によってアッセイ範囲を定義し、 K_d 値を使用して、TR標識の最良の位置を決定する。

40

【0242】

50

【表3】

表3: FP-HTAアッセイの構築で使用したペプチド

ペプチド	配列	配列番号
TR-NBS1	TR-QHAKESLADDLFRYNPYLKRR	配列番号 3
NBS1-TR	QHAKESLADDLFRYNPYLKRR-TR	配列番号 3
非標識 wtNBS1	QHAKESLADDLFRYNPYLKRR	配列番号 3
非標識 mtNBS1	QHAKAASLAAALFAANPYLKRR	配列番号 13

NBS1-ATM結合の親和性、FPアッセイの安定性、およびDMSOの耐性：標識NBS1ペプチドがATMに結合する能力を決定するために、標識ペプチドと同一の長さの非標識wtNBS1ペプチドを使用して、競合ベースのアッセイを行う（表1）。非標識NBS1ペプチドを、至適濃度（前述で定義）のGST-ATMおよび標識NBS1に滴定して、非標識NBS1ペプチドの存在下で標識NBS1ペプチドがATMに結合する能力を決定する。アッセイの安定性は、FPスクリーニングの処理能力を決定する重要なパラメーターである。NBS1-ATM結合の経時変化研究を組み込み、シグナルの安定性を決定する。結合アッセイ物を、12時間にわたって室温でインキュベートし、アッセイプレートを、この時間にわたって4時間間隔で読み取る。この研究により、NBS1-ATM複合体の結合時間が洞察される。スクリーニングライブラリー中の全ての化合物をDMSOに溶解するので、DMSO耐性（すなわち、ペプチド-GST融合タンパク質相互作用を阻害することなく溶液中で化合物を保持するために必要な濃度）の試験は、高速処理スクリーニングのためのFPアッセイにおける最終DMSO濃度の決定で重要である。0~8%の範囲の最終濃度のDMSOを各ウェルに添加し、その後に標識NBS1ペプチドおよびGST-ATMを添加する。

【0243】

アッセイ能力指標の生物統計分析：Z'因子は、アッセイの質および適切性を評価し（0~1.0、1.0が最良のアッセイであるが、0.5~1.0が信頼できる（robust）アッセイと見なされる）、ポジティブ（p）コントロールおよびネガティブ（n）コントロールの両方の平均（ μ ）および標準偏差（ σ ）（ μ_p 、 μ_n 、 σ_p 、 σ_n ）に基づく。Z'因子を確立するために、FPアッセイを使用した競合的阻害を使用して、酵素阻害定数 K_i を確立するであろう。 K_i 値を確立するために、漸増濃度（0~500 μ M）の非標識NBS1ペプチドおよび2 μ Mの標識NBS1ペプチドを、適切な濃度のGST-ATMに添加する。GST-ATMの濃度を、前記実験の K_d 値（少なくとも1であるべきである）から確立し、この濃度は、受容体（ATM）と標識NBS1ペプチドの K_d との間の比に基づく。これらの値から、Z'因子を、以下の式にしたがって計算する：

【0244】

【数2】

$$Z' \text{因子} = 1 - \frac{3 \times (\sigma_p - \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

0.5以上のZ'因子は、FP高速処理スクリーニングにふさわしいと見なされる。

【0245】

信号雑音比（S/N）は、別の重要な能力表示である。S/Nを使用して、非特異的結合（NSB）の範囲を定量し、10以上の信号雑音比が許容可能な能力レベルである。しかし、FPでは、非特異的結合の範囲によってノイズを定量できないので、S/Nを使用することができない。FPアッセイでは、非結合トレーサーが存在し、これがNSBシグナル全体に寄与し、NSBシグナルのみよりも大きくなる。したがって、S/N値は、非結合トレーサーを除去するか、結合トレーサーと区別しなければならない他のアッセイと比較して小さい。

i i . HTSおよびヒットの検証

10

20

30

40

50

Southern Research Institute (20,000化合物) および Cambridge library (100,000化合物 + このライブラリー内の30,000および20,000の多様性組 (diversity set)) で確立された多様性ライブラリー (diversity library) を、10 μM TR 標識 NBS1ペプチドおよび至適濃度 (前述の実験で定義のとおり) の DMSO 溶液中にて室温で15分間インキュベーションする GST-ATM を使用して、10 μM でスクリーニングする。阻害ポジティブコントロールとして使用した非標識 wtNIPペプチドを使用して、384または1536ウェルプレート中でアッセイを行う。この実験から同定されたヒット (hit) を連続希釈し、アッセイを繰り返し、 K_i 値を確立する。10個のもっとも低い K_i 値の化合物を、さらなる評価のために選択する。

10

i i i . ヒット化合物の in vitro 評価

一旦 NBS1-ATM 相互作用を最良に阻害することができる化合物が同定されると、これらの化合物を、組織培養モデルで試験する。第1に、細胞傷害性を示し、そして / または放射線増感剤であることが既に公知の化合物を同定する。これらの公知の化合物を、さらなる in vitro 研究のためにさらに除外する。残りの化合物を、MTTアッセイおよびいくつかの腫瘍細胞株 (HeLa、MCF-7、およびPC-3 が含まれる) におけるコロニー形成を使用して細胞傷害性について最初に評価する。細胞傷害性をもたない化合物を、放射線増感研究のために選択する。コロニー形成アッセイを使用して放射線増感アッセイを行い、照射誘導性の生存率を評価する。IR 誘導性 H2AX および NBS1 フォーカス形成を、化合物の存在下で評価する。

20

(実施例 4)

4. 放射線増感ペプチドの遺伝子送達

低酸素性腫瘍細胞は、照射に高耐性を示し、放射線療法が失敗すると見なされている。wtNIP 放射線増感ペプチドを低酸素性腫瘍組織中で特異的に発現することができる場合、放射線療法による腫瘍コントロールの劇的増加が予想される。この目的に到達するために、低酸素性組織中の wtNIP を発現することができる低酸素症駆動アデノウイルスベクターを準備する。組織培養物および動物モデルの両方におけるウイルスの有効性を評価する。

30

【0246】

第1に、低酸素症応答プロモーターが wtNIP 発現を駆動する発現力セットを生成する。NheI コンパチブル末端：

30

【0247】

【化3】

5'CTAGAGTCGTGCAGGACGTGACATCTAGTGTGTCGTGCAGGCATCTAGT
GTCGTGCAGGACGTGCATC3' (配列番号 14),
3'TCAGCACGTCTGCACGTAGATCACAGCACGTCCGTAGATCACAGC
ACGTCCCTGCACTGTAGGATC5' (配列番号 15).

を有するマウスホスホグリセリン酸キナーゼ I の 5' 隣接配列 (-307 ~ -290) 由来の低酸素症応答エンハンサー要素に基づいて 2 つの合成オリゴヌクレオチドの相補対を生成する。

40

【0248】

2 つのオリゴをアニーリングして二本鎖 DNA を形成し、pGL3-プロモーターベクター (Promega, Madison, WI) の NheI 部位に直接クローニングする。pGL3-プロモーターベクターは SV40 基本プロモーターを有し、SV40 基本プロモーターと組み合わせた低酸素症応答エンハンサーの構造は、受容体遺伝子および腫瘍自殺遺伝子を低酸素性腫瘍中で特異的に発現するように駆動することが証明された。次いで、5' NcoI および 3' XbaI コンパチブル部位を有する小ペプチド配列に基づいて別のオリゴ対を作製する。小ペプチド発現の検出を容易にするために、ペプチドの 3' 末

50

端に連結した H i s タグ配列をデザインする。オリゴ配列は以下である：

【0 2 4 9】

【化 4】

5'CATGGAAGGAGGAAGCAGCCAAGGAGAAG/ACCACCACCACCAACCAC

CAC/-3' (配列番号 16),

3'CTTCCTCCTCGTCGGTCTCTCT/GGTGGTGGTGGTGGTGGT/GAT

C-5' (配列番号 17).

スラッシュの間の配列は、6 ヒスチジンの縦列反復である。二本鎖 D N A へのアニーリング後、フラグメントを p G L - 3 プロモーターベクターの N c o I および X b a 1 部位に直接クローン化して、元のルシフェラーゼレポーター遺伝子と置換する。得られた構築物を、配列によって確認する。K p n I および B a m H I によって放出された全発現力セットを、アデノウイルスベクターシャトルプラスミド (S t r a t a g e n e , C A) にライゲーションする。次いで、E 1 および E 3 欠失 p A d E a s y - 1 アデノウイルス骨格ベクターでの相同組換えによってシャトルベクターを組換えて、パッケージング可能な A d G e n o M を生成する。有効な組換えを達成するために、B J 5 1 8 3 コンビテント細菌をエレクトロポレーションによって形質転換し、正確なクローンプラスミド (p A d 5 - 低酸素症 - S I P 2) をアデノウイルスベクター産生のために選択する。アデノベクターを生成するために、9 1 1 アデノウイルスパッケージング細胞株を使用し、リン酸カルシウム沈殿によってトランスフェクトする。産生したベクターを、9 1 1 細胞中で増殖させる。塩化セシウム勾配遠心分離および S e p h a r o s e C L - 6 B カラム脱塩を行って、ベクター調製物を濃縮および精製する。

10

20

30

40

【0 2 5 0】

ベクターの生成後、ベクターを低酸素性ヒト癌細胞培養物中で発現させて、N I P を発現するかどうかを試験する。発現を確認後、放射線増感効果を調査する。さらに、ウイルスをマウス異種移植片モデルに注射し、i n v i v o 放射線増感効果を評価する。

【0 2 5 1】

【化 5 - 1】

B. 参考文献

Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development* 15, 2177-2196.

Adam, E. and Nasz, I. (2001). [Adenovirus vectors and their clinical application in gene therapy]. *Orv. Hetil.* 142, 2061-2070.

Arap, W., Haedicke, W., Bernasconi, M., Kain, R., Rajotte, D., Krajewski, S., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (2002). Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 1527-1531.

Arap, W., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1998). Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. *Science* 279, 377-380.

Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.

【0 2 5 2】

【化5-2】

- Berghmans, S., Murphey, R.D., Wienholds, E., Neuberg, D., Kutok, J.L., Fletcher, C.D., Morris, J.P., Liu, T.X., Schulte-Merker, S., Kanki, J.P., Plasterk, R., Zon, L.I., and Look, A.T. (2005). *tp53* mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 407-412.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276, 42462-42467.
- Cerosaletti, K. and Concannon, P. (2004). Independent roles for nibrin and Mre11-Rad50 in the activation and function of Atm. *J. Biol. Chem.* 279, 38813-38819. 10
- Cerosaletti, K., Wright, J., and Concannon, P. (2006). Active role for nibrin in the kinetics of atm activation. *Mol. Cell Biol.* 26, 1691-1699.
- Cerosaletti, K.M. and Concannon, P. (2003). Nibrin forkhead-associated domain and breast cancer C-terminal domain are both required for nuclear focus formation and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278, 21944-21951.
- Choudhury, A., Cuddihy, A., and Bristow, R.G. (2006). Radiation and new molecular agents part I: targeting ATM-ATR checkpoints, DNA repair, and the proteasome. *Semin. Radiat. Oncol.* 16, 51-58. 20
- Curnis, F., Arrigoni, G., Sacchi, A., Fischetti, L., Arap, W., Pasqualini, R., and Corti, A. (2002). Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Res.* 62, 867-874.
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* 271, 18188-18193.
- Deshayes, S., Morris, M.C., Divita, G., and Heitz, F. (2005). Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 1839-1849.
- Difilippantonio, S., Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Reina, S.M., Van Laethem, F., Yang, Y.P., Petukhova, G.V., Eckhaus, M., Feigenbaum, L., Manova, K., Kruhlak, M., Camerini-Otero, R.D., Sharan, S., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2005). Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat. Cell Biol.* 7, 675-685. 30
- Dileto, C.L. and Travis, E.L. (1996). Fibroblast radiosensitivity in vitro and lung fibrosis in vivo: comparison between a fibrosis-prone and fibrosis-resistant mouse strain. *Radiat. Res.* 146, 61-67.
- Dornan, D., Shimizu, H., Mah, A., Dudhela, T., Eby, M., O'Rourke, K., Seshagiri, S., and Dixit, V.M. (2006). ATM engages autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1 after DNA damage. *Science* 313, 1122-1126. 40
- Dupre, A., Boyer-Chatenet, L., and Gautier, J. (2006). Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 451-457.
- Ellerby, H.M., Arap, W., Ellerby, L.M., Kain, R., Andrusiak, R., Del Rio, G., Krajewski, S., Lombardo, C.R., Rao, R., Ruoslahti, E., Bredesen, D.E., and Pasqualini, R. (1999). Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nature Medicine* 5, 1032-1038.
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605-611.

【0253】

50

【化5-3】

- Fan, Z., Chakravarty, P., Alfieri, A., Pandita, T.K., Vikram, B., and Guha, C. (2000). Adenovirus-mediated antisense ATM gene transfer sensitizes prostate cancer cells to radiation. *Cancer Gene Ther.* 7, 1307-1314.
- Fernandes, P.B. (1998). Technological advances in high-throughput screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 597-603.
- Fuchs, S.M. and Raines, R.T. (2004). Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry* 43, 2438-2444.
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z.Y., Aune, G.J., Redon, C., Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Celeste, A., Chen, H.T., Nussenzweig, A., Aladjem, M.I., Bonner, W.M., and Pommier, Y. (2003). Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J. Biol. Chem.* 278, 20303-20312. 10
- Garg, R., Geng, C.D., Miller, J.L., Callens, S., Tang, X., Appel, B., and Xu, B. (2004). Molecular cloning and characterization of the catalytic domain of zebrafish homologue of the ataxia-telangiectasia mutated gene. *Mol Cancer Res.* 2, 348-353.
- Geiger, G.A., Parker, S.E., Beothy, A.P., Tucker, J.A., Mullins, M.C., and Kao, G.D. (2006). Zebrafish as a 'biosensor'? Effects of ionizing radiation and amifostine on embryonic viability and development. *Cancer Res.* 66, 8172-8181. 20
- Glasgow, J.N., Everts, M., and Curiel, D.T. (2006). Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 13, 830-844.
- Guha, C., Guha, U., Tribius, S., Alfieri, A., Casper, D., Chakravarty, P., Mellado, W., Pandita, T.K., and Vikram, B. (2000). Antisense ATM gene therapy: a strategy to increase the radiosensitivity of human tumors. *Gene Therapy* 7, 852-858.
- Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C.J., Green, S.J., Martin, N.M., Orr, A.I., Reaper, P.M., Jackson, S.P., Curtin, N.J., and Smith, G.C. (2004). Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res.* 64, 9152-9159. 30
- Horsman, M.R., Siemann, D.W., Chaplin, D.J., and Overgaard, J. (1997). Nicotinamide as a radiosensitizer in tumours and normal tissues: the importance of drug dose and timing. *Radiother. Oncol.* 45, 167-174.
- Howes, R., Barril, X., Dymock, B.W., Grant, K., Northfield, C.J., Robertson, A.G., Surgenor, A., Wayne, J., Wright, L., James, K., Matthews, T., Cheung, K.M., McDonald, E., Workman, P., and Drysdale, M.J. (2006). A fluorescence polarization assay for inhibitors of Hsp90. *Anal. Biochem.* 350, 202-213.
- Jones, S.W., Christison, R., Bundell, K., Voyce, C.J., Brockbank, S.M., Newham, P., and Lindsay, M.A. (2005). Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol.* 145, 1093-1102. 40
- Kim, J., Felts, S., Llauger, L., He, H., Huezo, H., Rosen, N., and Chiosis, G. (2004). Development of a fluorescence polarization assay for the molecular chaperone Hsp90. *J. Biomol. Screen.* 9, 375-381.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253-310.

【化5-4】

- Lee, J.H. and Paull, T.T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 304, 93-96.
- Lee, J.H. and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551-554.
- Lim, D.-S., Kim, S.-T., Xu, B., Maser, R.S., Lin, J., Petrini, J.H.J., and Kastan, M.B. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 404, 613-617.
- McManus, K.J. and Hendzel, M.J. (2005). ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 5013-5025. 10
- Nasir, M.S. and Jolley, M.E. (1999). Fluorescence polarization: an analytical tool for immunoassay and drug discovery. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* 2, 177-190.
- Pasqualini, R., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A., Ashmun, R.A., Shapiro, L.H., Arap, W., and Ruoslahti, E. (2000). Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 60, 722-727. 20
- Pasqualini, R., Koivunen, E., and Ruoslahti, E. (1997). Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat. Biotechnol.* 15, 542-546.
- Pawlik, T.M. and Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59, 928-942.
- Pellegrini, M., Celeste, A., Difilippantonio, S., Guo, R., Wang, W., Feigenbaum, L., and Nussenzweig, A. (2006). Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo. *Nature* 443, 222-225.
- Qian, J., Voorbach, M.J., Huth, J.R., Coen, M.L., Zhang, H., Ng, S.C., Comess, K.M., Petros, A.M., Rosenberg, S.H., Warrior, U., and Burns, D.J. (2004). Discovery of novel inhibitors of Bcl-xL using multiple high-throughput screening platforms. *Anal. Biochem.* 328, 131-138. 30
- Roehrl, M.H., Wang, J.Y., and Wagner, G. (2004). A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein-protein interactions by fluorescence polarization. *Biochemistry* 43, 16056-16066.
- Ruoslahti, E. (2000). Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Semin Cancer Biol.* 10, 435-442.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S.R., Simmons, A., Clines, G.A., Sartiel, A., Gatti, R.A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M.F., Jaspers, N.G.J., Taylor, A.M.R., Arlett, C.F., Miki, T., Weissman, S.M., Lovett, M., Collins, F.S., and Shiloh, Y. (1995). A Single Ataxia Telangiectasia Gene with A Product Similar to PI-3 Kinase. *Science* 268, 1749-1753. 40
- Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S.F. (1999). In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569-1572.

【化5-5】

- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3, 155-168.
- Silverman, L., Campbell, R., and Broach, J.R. (1998). New assay technologies for high-throughput screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 397-403.
- Sittampalam, G.S., Kahl, S.D., and Janzen, W.P. (1997). High-throughput screening: advances in assay technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 384-391.
- Sportsman, J.R., Daijo, J., and Gaudet, E.A. (2003). Fluorescence polarization assays in signal transduction discovery. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* 6, 195-200.
- Stern, H.M. and Zon, L.I. (2003). Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer* 3, 533-539.
- Takenobu, T., Tomizawa, K., Matsushita, M., Li, S.T., Moriwaki, A., Lu, Y.F., and Matsui, H. (2002). Development of p53 protein transduction therapy using membrane-permeable peptides and the application to oral cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 1, 1043-1049.
- Thompson, R.B., Gryczynski, I., and Malicka, J. (2002). Fluorescence polarization standards for high-throughput screening and imaging. *BioTechniques* 32, 34, 37-8, 40, 42.
- Traver, D., Winzeler, A., Stern, H.M., Mayhall, E.A., Langenau, D.M., Kutok, J.L., Look, A.T., and Zon, L.I. (2004). Effects of lethal irradiation in zebrafish and rescue by hematopoietic cell transplantation. *Blood* 104, 1298-1305.
- Yuan, J.P., Kramer, A., Eckerdt, F., Kaufmann, M., and Strebhardt, K. (2002). Efficient internalization of the polo-box of polo-like kinase 1 fused to an antennapedia peptide results in inhibition of cancer cell proliferation. *Cancer Research* 62, 4186-4190.
- Zhang, N., Chen, P., Gatei, M., Scott, S., Khanna, K.K., and Lavin, M.F. (1998). An anti-sense construct of full-length ATM cDNA imposes a radiosensitive phenotype on normal cells. *Oncogene* 17, 811-818.

C. 配列表

【0 2 5 6】

【化6】

1. 配列番号 1

mwkllpaagpaggepyrlltgveyvvgrkncailiendqsisrnhavltansvtlnlsqtdeipvlklkdnskygtfv
neekmqngfsrtlksgdgitfgvfgskfrieyeplvacsscldvsgktalnqailqlggftvnnwteecthlmvsvkvktktic
alicgrpivkpeyfteflkaveskkqppqiesfyppldepsigsknvdlsgrqerkqifgktfiflnakqhkkllssavvfggge
arliteeneehnfflapgtcvvdtgitnsqtlipdcqkkwiqsimdmlqrqglrpipeaeiglavifmtnknycdpqghpstgl
ktttppgpslsqgvsvdeklmpsapvnttvyadteseqadtwdlserpkeikvskmeqkfrmlsqdaptvkescktssnnns
mvsntlakmripnyqlspkklpsinksdkdrasqqqtnsirnyfqpstkrerdeenqemsscksarietscsllleqtqpatpsl
wknkeqhlsenepvdtnsdnnlfttdlkssivknsaskshaaeklrsnkremddvaiedevleqlfkdtkpeleidvkvqk
qeедvnrkrprmdietndfsdeavpesskisqeneigkkrelkedslwsakeisnndklqddsemlpkklltefrslvkn
stsrnpsginddygqlknfkkfkvtypgagklphiiggsdliahharknteleewlrqemevqnqhakeesladdlfrynp
ylkr

【0 2 5 7】

【化7】

2. 配列番号 2

1 ttcggcacga ggccgcgggt cacgtcgccc ccagccctga ggagccggac cgatgtggaa
 61 actgctgccc gccgcgggcc cggcaggagg agaaccatac agactttga ctggcggtga
 121 gtacgttgg ggaaggaaaa actgtgccat tctaattgaa aatgatcagt cgatcagccg
 181 aaatcatgct gtgttaactg ctaacttttc tgtaaccaac ctgagtcaaa cagatgaaat
 241 ccctgttattg acattaaaag ataattctaa gtatggtacc ttgttaatg aggaaaaaaat
 301 gcagaatggc ttttccgaa ctttgaagtc gggggatggt attactttt gagtgtttgg
 361 aagtaaattc agaatagagt atgagcctt ggttgcattgc tcttctttagt tagatgtctc
 421 tggggaaaact gctttaaatc aagctatattt gcaacttggaa ggatttactg taaacaattt
 481 gacagaagaa tgcaactcacc ttgtcatggt atcagtaaa gtaccattaa aacaatatt
 541 tgcactcatt tggacgttc caattgtaaa gccagaatattt tactgaat tccctgaaagc
 601 agttcgtcc aagaagcagc ctccacaaat tggaaagttt taccacccctc ttgatgaacc
 661 atctatttgg agtaaaaatg ttgtatgtc aggacggcag gaaagaaaaac aaatcttcaa
 721 agggaaaaca ttatatttt tgaatgccaac acagcataag aaatttggattt ccgcagttgt
 781 ctttggaggt ggggaagcta ggttgataac agaagagaat gaagaagaac ataatttctt
 841 tttggctcc ggaacgttg ttgttgatac aggaataaca aactcacaga ccttaattcc
 901 tgactgtcag aagaaatgg aatggatattt aatggatattt ctccaaaggc aaggctttag
 961 acctatttcc gaagcagaaa ttggatttgc ggttgattttc atgactacaa agaattactg
 1021 tgatcctcag ggccatccca gtacaggattt aaagacaaca actccaggac caagcccttc
 1081 acaaggcgtg tcagttgtatg aaaaactaat gccaagcgcc ccagtgaaca ctacaacata
 1141 cgtagctgac acagaatcag agcaagcaga tacatggat ttgtgtaaa ggccaaaaga
 1201 aatcaaagtc tccaaatgg aacaaaaattt cagaatgttt tcacaagacg caccctactgt
 1261 aaaggagtcc tgccaaacaa gctctaataa taatgtatg gtatcaaataa ctttggctaa
 1321 gatgagaatc cccaaactatc agctttcacc aactaaattt ccaagtataa ataaaagtt
 1381 agatagggtc ttcagcagc agcagaccaa ctccatcaga aactactttt agccgtctac
 1441 caaaaaaagg gaaagggtatg aagaaaatca agaaaatgtct tcatgcaat cagcaagaat
 1501 agaaaacgtct tggatcttt tagaacaacaa acaacctgct acaccctcat tggaaaaaa
 1561 taaggagcag catctatctg agaatgagcc tggacaca aactcagaca ataaacttatt
 1621 tacagatatac gatattttt ctattgtgaa aaattcttcc agttaatctc atgctgcaga
 1681 aaagctaaga tccaaataaa aaagggaaat ggtatgtg gcatagaag atgaagtatt
 1741 ggaacagttt ttcaggaca caaaaccaga gtttagaaattt gatgtgaaag ttcaaaaaca
 1801 ggagaagat gtcaatgtt gaaaaaggcc aaggatggat atagaaacaa atgacacttt
 1861 cagtgtatc gcatgtaccatg aaagtagccaa aatatcttca gaaaatgaaa ttggaaagaa
 1921 acgtgaactc aaggaagact cactatggtc agctaaagaa atatctaaca atgacaaaact
 1981 tcaggatgt atgtgatgtc ttccaaaaaa gctgttattt actgaattt gatcactgg
 2041 gattaaaaac tctacttcca gaaatccgtc tggcataaat gatgattatg gtcaactaaa
 2101 aaatttcaag aaattcaaaa aggtcacata tccctggagca gggaaacttc cacacatcat
 2161 tggaggatca gatctaatac ctcatcatgc tcgaaagaaat acagaacttag aagagtggct
 2221 aaggcaggaa atggaggatc aaaatcaaca tgccaaagaa ggtctcttgc ctgtatct
 2281 ttttagatac aatccttattt taaaaaggag aagataactg agatttaa aaagaagcc
 2341 tggaaaaact tccctgttccatcacttc aggccaaacaa gtttatatg atatataatg
 2401 tataagaagcg atttaaatgtt caatgtttt tggcctaaat ttattaaata aatgcacaa
 2461 aactttgtt tttttgtatg taacaattgtt ttgttctgtt ttcaggctt gtcattgtcat
 2521 cttttttca tttttaaatg tttttgtt attaaatgtt taatataatg acagttcaaa
 2581 attctaaatg tacgtaaatg aaagactaaa gtcacccttc caccattgtc ctatgtactt
 2641 ggtttccctc agaaaaaaat tcatgataact catttcttcat gatctttcc agggattttt
 2701 gagtcctatt caaatttccat tttttaaata atttccttca caaatgtatg cataacatata
 2761 gcatgttctt acacccctt tttttacttta gtagattaaa aattatagga atatcaatata
 2821 aatgttttca atattttttca tttttccattt tgctgtatgc ttacctaaac tctgggtatc
 2881 caaacaat ggtttccctc agaaaaaaat tcatgataact catttcttcat gatctttcc agggattttt
 2941 gaagaccatg tggagacttc atcaaacatg gttttatgtt tcaccagaat gggaaagaccc
 3001 gtacccctt tgggtggct tactgagctg ggtgggtgc tggatgttcc ttatgtttag
 3061 tccttagttt cctacttata aatgttccat ggttgatgtt tttttttt ctacccatata
 3121 gggagatggt aagaaacaaat gatgttttcc ttcaatctt tattgtatg tgatgttca
 3181 gtctgtgttc aaaaatataat tcatgtatc gtagatccgc aagaaggag ttccagtc
 3241 gactcactac aactgtatgtt tttttttt gatgtatgtt aatgagaaat ggaacagtga ggaatggagg
 3301 ccatatttcc atgacttccc ttgttacccat ggttttttcc tttttttt ctacccatata
 3361 tacatcactc tcacccatca aatcttgcgtt aatgtatgtt acttgcataatcccaattaa
 3421 cttacttcca agttctgttcc gcttgcgtt ggttttttcc tttttttt ctacccatata
 3481 tgaaggatctt ttttttttca gtttgcgtt ggttttttcc tttttttt ctacccatata

【化8】

3541 tctgcaattt ctactacagg cattgagacc agttagatta ttgaaatatt atagagagtt
 3601 atgaacactt aaattatgat agtggatgaa cattggatag aacatggat actttagaag
 3661 tagaattgac agggcatatt agttgatgaa atggagtcat ttgagtctct taatagccat
 3721 gtatcataat taccaagtga agctgggtgaa acatatggtc tccatttac agttaaaggaa
 3781 tataatggac agattaatat tggatctgt catgcccaca atccctttct aaggaagact
 3841 gcccatactat agcagttttt atatttgcataatttgaat ataatgaatg aggagttctg
 3901 gtacctcctg tcttacaaa tattgggtgt tgtccagttat tttccctt ttaaccattc
 3961 caatcggtgt gtagtgatgt ttcattttgg ttttaatttg tatatccctg atagctataa
 4021 ttgggtcata gaaattctt atacattcta gatgcaagtc tcttgcgat tataatgtatt
 4081 gagatattac acctagtcg tggcttgact gttttcttta tgtctttga tgaatagaag
 4141 ttttaaattt tgacaaggc aatttttattt ttttcttttgc tttgatattt tttctctcca
 4201 atttaacccc aagatttcag atattctgct ctattatata aactttatata ttttatattt
 4261 gtgatctacc ttgaatttgc atgtatgtt tgaattatgg atcagggttc ttttttccc
 4321 ccatacaagt atccagtcata tgaacactg tttattgaaa gaattatcct ttcctcatta
 4381 aattaccttg ccaattagtc tcgtgc

10

3. 配列番号 3

qhakeesladdlfrynpylkrr

4. 配列番号 4

eesladdlfry

20

5. 配列番号 5

eeddry

6. 配列番号 6

ceeaalddlc当地

7. 配列番号 7

ceeaalddl

8. 配列番号 8

vfeeggdvddldm

30

9. 配列番号 9

vfeeggdvdd

10. 配列番号 10

eeggdvdd

11. 配列番号 11

cngrc

40

12. 配列番号 12

cdcrgdclf

13. 配列番号 13

qhakaaslaaalfaanpylkrr

14. 配列番号 14

ctagagtgcaggacgtgacatctagtgctgcaggcatctagtgctgcaggacgtgcata

【化9】

15. 配列番号 15

ctaggatgtcacgtcctgcacgacactagatgcctgcacgacactagatgtcacgtcctgcacgact

16. 配列番号 16

catggaaggaggaaggcagccaaggagaag/accaccaccaccaccaccac

17. 配列番号 17

ctaggtggtggtggtggtggtggtcttccttggctgcttccttc

10

18. 配列番号 18

rrrrrrrr

19. 配列番号 19

rqpkiwfpnrrkpwkk

20. 配列番号 20

grkkrrqrppq

21. 配列番号 21

20

rqikiwfqnrrmkwkk

22. 配列番号 22

rqiaiwfqnrrmkwaa

23. 配列番号 23

rkkrrqrmt

24. 配列番号 24

trssraglqfpvgrvhrlrk

30

25. 配列番号 25

gwtlnsagyllgkinkalaalakkil

26. 配列番号 26

klalklalkalkaalkla

27. 配列番号 27

aavallpavllallap

28. 配列番号 28

40

vpmlk-pmlke

29. 配列番号 29

manlgywllalfvtmwtdvglckkrpkp

30. 配列番号 30

lliilrrrrirkqahahsk

【0 2 6 0】

【化10】

31. 配列番号 31

ketwwetwwtewsqpkkrkv

32. 配列番号 32

rggrlsysrrrfststgr

33. 配列番号 33

sdlwemmmvslacqy

10

34. 配列番号 34

tsplnihngqkl

35. 配列番号 35

rrrrrrrrqhakeesladdlfrynpylkrr

36. 配列番号 36

rrrrrrrreesladdlfry

20

37. 配列番号 37

rrrrrrrreeddry

38. 配列番号 38

rrrrrrrrrceeaalddlcaae

39. 配列番号 39

rrrrrrrrrceeaalddl

40. 配列番号 40

rrrrrrrrvfeeggdvddldmi

30

41. 配列番号 41

rrrrrrrrvfeeggdvddl

42. 配列番号 42

rrrrrrrreeggdvddl

43. 配列番号 43

caacatgcaaaagaagagtctttgctgatgtatcttttagataacaatcattttaaaaaggagaagataa

44. 配列番号 44

gaagagtctttgctgatgtatcttttagatac

40

45. 配列番号 45

gaagaggatgatagctac

46. 配列番号 46

tgtgaagaggcagccctggatgacctctgtgccgcggaa

【0 2 6 1】

50

【化11】

47. 配列番号 47

tgtgaagaggcagccctggatgacctc

48. 配列番号 48

gtatttgaagaagggtgatgtggacgatttattggacatgata

49. 配列番号 49

gtatttgaagaagggtgatgtggacgattta

10

50. 配列番号 50

gaagaagggtgatgtggacgattta

51. 配列番号 51

1 mslvlndl1i ccrqlehdra terkkevekf krlirdpeti khldrhsdsk qgkylnwdav
 61 frflqkyiqk eteclriakp nvsastqasr qkkmgeissl vkyfikcanr raprlkcqel
 121 lnyimdtvkd ssngaiyfad csnillkdil svrkywceis qqgwlelfsv yfrlylkpsq
 181 dvhrvlvari ihavtgccts qtdglnskfl dffskaiqca rgeksssgln hilaaltifl
 241 ktlavnfrir vcelgdeilp tlyiywtqhr lndslkevii elfqlqiyih hpkgaktqek
 301 gayestkwrs ilynlyd11v neishigsrg kyssgfrnia vkenlielma dichqvfned
 361 trsleisqsy tttqressdy svpckrkkie lgwevikdhl qksqndfdlv pwlqiatqli
 421 skypaslpnc elsp11mils qllpqqrhge rtpyvlrc1t evalcqdkrs nlessqksdl
 481 lklwnkiwci tfrgisseqi qaenfgllga i1qgslvevd refwklftgs acrpscpavc
 541 cltlal1ttsi vpgavkmgie qnmcevnrsf slkesimkw1 lf1qlegd1e nstevppilh
 601 snfphlvlek ilvsltmknc kaamnffqsv pecehhqdk eelsfsevee lflqtf1dkm
 661 df1tivrecg iekhqssigf svhqn1kes1 drcl11g1seq 1lnnysseit nsetlvrcsr
 721 llvgvlgcyc ymgviaeee1 yksel1f1kan1 slmqcages1 tlfknktnee frigslrnmm
 781 qlctrclsnc tkkspnkias gff1rl1tsk lmndiadick slasfikkpf drgevesmed
 841 dtngnlmeve dqssmn1fnd ypdssvsdan epgesqstig ainplaeey1 skqd11f1dm
 901 lkflclcvtt aqtntvsfra adirrk11ml1 idsstleptk shlhmy1ml1 lkelpgeeyp
 961 lpm1edvlell kplsnvc1sly rrdqdvc1kti lnhv1hv1kn1 lgqs1nmdsen trdaqgqflt
 1021 vigafwh1tk erky1fes1rm1 alvnclkt11 eadpyskwai lnm1gkdf1pv nevftqflad
 1081 nhhgvrmlaa esinrlfqdt kgdssr11ka lpl1lqqt1f enay1kaqeg mremshsaen
 1141 petldeiynr ksv11t1iav v1scsp1ce1k q1f1alcksv kengleph1v kkv1ekvset
 1201 fgyrr1edfm ash1dyl1v1e wl11q1dteyn lssfp1filln ytn1edfyrs cykvliph1v
 1261 irshfdevks ianq1gedw1k s11tdcf1pk1 lvn1lpyf1ay eg1r1dsg1maq qretatkvyd
 1321 mlk1sen11lgk q1d1h1f1is1l1 peivv1ell1mt lhepan1ssas q1std1cd1f1sg d1dp1apn1pph
 1381 fpshv1katf ay1snch1ktk lks1le11sk sp1dsy1q1kill a1ceq1aa1etn nvykkh1r1lk
 1441 iy1h1f1vs111 k1d1k1s1gl1ga waf11r1d1v1y tli1y1n1q1p1 sc1m1d1v1s1rs f1l1cc1d1l1sq
 1501 vc1qt1av1ty1ck dalen1h1hvi vgt1l1p1v1ye q1vev1q1q1v1d1 l1k1y1l1v1d1n1k d1n1e1y1t1k
 1561 l1dp1f1dh1vv f1k1d1l1r1t1q1k1 i1k1s1r1g1p1f1s1 lee1n1h1f1s1 s1v1d1a1p1l1tr leg1k1d1r1rq
 1621 lelh1kd1q1m1vd im1ras1q1d1n1p1q1 dg1m1v1k1v1n1 l1q1l1s1m1ain1 ht1ge1ke1v1lea v1g1s1c1l1g1e1v1g1p1
 1681 idf1st1ia1q1h skd1as1y1t1k1al k1f1ed1k1el1w1 tf1m1l1t1y1l1nn1 t1v1e1d1c1v1k1v1r1 sa1av1t1c1k1n1i
 1741 lat1kt1g1h1s1f1w1 e1i1y1k1m1t1d1p1m1 l1ay1l1q1p1f1r1ts1 r1k1f1l1v1p1r1f1p1r1f1l1d1 din1l1w1p1l1se
 1801 nhdi1w1k1t1l1t1 ca1f1l1d1s1g1g1t1k1 ce1l1q1l1k1p1m1 ce1v1k1t1d1f1c1q1t1 v1l1p1y1l1h1d1l1 l1q1d1t1n1e1s1w1r1n1
 1861 llst1h1v1q1g1f1f1 ts1cl1r1h1f1s1q1t1 sr1s1t1p1a1n1l1d1 s1e1s1e1h1f1r1c1c1 l1d1k1k1s1q1r1t1m1 l1v1a1v1d1y1m1r1r1q1k1
 1921 rp1ss1g1t1f1n1d1 af1w1l1d1n1y1l1e1 vak1v1q1s1c1a1 h1f1t1l1y1a1e1 y1a1d1k1k1s1m1d1d1q1 e1k1r1s1l1a1f1e1e1g1
 1981 sq1st1t1s1s1 eks1s1k1e1t1g1s1 l1q1d1l1l1e1y1r1 s1i1g1e1p1d1s1l1y1g1 c1g1g1k1m1l1q1p1i1 t1r1l1r1t1y1e1h1e1a1
 2041 mw1g1k1a1v1t1y1d1 let1a1i1p1s1t1r1 q1a1g1i1q1a1l1q1n1 l1g1c1h1l1s1v1 y1k1g1d1y1e1n1k1 w1c1p1e1e1l1h1y1
 2101 qa1a1w1r1n1m1q1w1d1 h1c1t1s1v1s1k1e1 v1g1t1y1h1e1s1l1y1n1 al1q1s1l1r1d1ref1 st1f1y1e1l1k1y1a1 rv1k1e1v1e1m1c1k1
 2161 rs1les1v1s1y1 p1t1l1s1r1l1q1a1g1 e1e1s1e1i1g1f1s1 r1s1v1t1h1r1q1l1se1 v1y1k1w1q1k1h1s1q1 l1l1k1d1s1d1f1s1f1q1
 2221 ep1m1a1l1r1t1v1i1 le1l1m1e1k1e1m1d1 ns1q1r1e1c1k1d1 l1t1k1h1l1v1e1s1 l1a1r1t1f1k1n1t1q1l1 per1a1f1q1k1q1
 2281 y1n1s1v1s1c1g1v1s1 w1q1l1e1a1q1v1f1w1 a1k1e1q1s1l1a1s1 il1k1q1m1k1l1d1 a1s1c1a1a1n1p1s1l1 k1l1t1y1t1e1c1l1r1v1
 2341 c1g1n1w1l1a1e1t1c1l1 en1p1a1v1i1m1q1t1 y1e1k1a1e1v1g1n1 y1d1g1e1s1s1e1l1r1 ng1k1m1k1a1f1l1s1 ar1f1s1d1t1q1y1q1r1
 2401 i1e1n1y1m1k1s1s1e1f1 en1k1q1a1l1k1r1a1 ke1e1v1g1l1r1h1 re1h1 k1q1t1n1r1y1t1v1k1 v1q1r1e1l1e1d1 l1a1r1a1l1k1e1d1r1k1
 2461 r1f1l1c1k1a1v1e1n1y1 in1c1l1l1s1g1e1e1h1 dm1w1v1f1r1l1c1s1 l1w1e1n1s1g1v1s1e1 v1n1g1m1m1k1r1d1g1m1k1 i1p1t1y1k1f1l1p1l1m1
 2521 y1q1l1a1a1r1a1m1g1t1k1 mm1g1g1g1f1h1e1v1 l1n1n1l1i1s1r1m1 d1h1p1h1t1f1i1 l1a1l1a1a1n1a1a1n1r1d1e1 f1l1t1k1p1e1v1a1r1
 2581 s1r1t1k1n1v1p1k1q1 ss1q1l1d1e1d1r1t1e1 a1a1n1r1i1c1t1r1 s1r1r1p1q1m1v1r1s1 v1e1a1l1c1d1a1y1i1l1 an1l1d1a1t1q1w1k1

20

30

40

【化12】

2641 qrkginipad qpitklknle dvvvptmeik vdhtgeygnl vtiqsfkaef rlaggvnlpk
 2701 iidcvgsdgk errqlvkgrd dlrqdavmqq vfqmcntllq rntetrkrkl tictykvpl
 2761 sqrsgvlewc tgvtpigefl vnnedgahkr yrpndfsafq cqkmmmevqk ksfeekyevf
 2821 mdvcqnfqpv fryfcmekfl dpaiwfekrl aytrsvatss ivgyilglgd rhvqniline
 2881 qsaelvhidl gvafeqgkil ptpetvpfrl trdivdgmgi tgvegvfrrc cektmevmrn
 2941 sqetlltive vllydplfdw tmnplkalyl qqrpedetel hptlnaddqe ckrnlsdidq
 3001 sfdkvaervl mrlqeklkvgv eegtvlsvgg qvnlliqqai dpknlsrlfp gwkawv

52. 配列番号 52

akeesladdlfrlyn

10

53. 配列番号 53

keesladdl

54. 配列番号 54

sdadleelk

55. 配列番号 55

xeexxxddlx, where x is any amino acid

56. 配列番号 56

20

rvcelgdeilptllyiwtqhrlndslkeviieielfqlqiyihhpkgaktqekgayestkwrsilynl
 ydllvneishigsrgkyssgfrniavkenlielmadichqvfndtrsleisqsyttqressdysvpckrk
 kielgwevikdhlqksqndfdlvwlqiatqliskypaslpncelspllmilsqllpqqrhgertpyvlrc
 tevalcqdkrsnlessqksdllklwnkiwctfrgisseqiqaenfgllgaiiqgslvevdre

57. 配列番号 57

hrilkiyhlfvsl11kdiksqliggawafvldvitylihyinqpscimdvslrsfs1ccdl1sqv
 cqtavtyckdalenhlhvivgtliplvyeqvevqkqvld11kylvidnkdnenlyitik11dpfpdhvvfk
 lritqqkikysrgpfslleeinhflsvsydalptrleg1kdlrrqlelhkdqmvdimrasqdnpqdgi
 klvvnllqlskmainhtgekevleavgsclgevgpipdfstiaiaghskdasytkalklfedkelqwtfimly
 lnntlvedcvkvrsaavtclknilatktghsfweiykmtdpmlaylqpfrts

30

【図1】

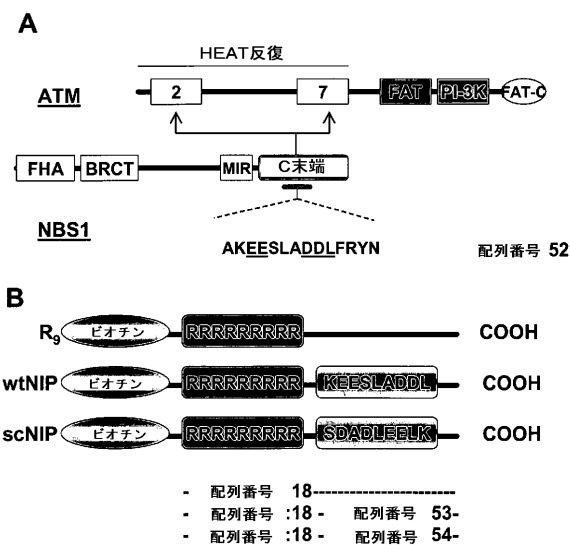


FIG. 1

【図2A】

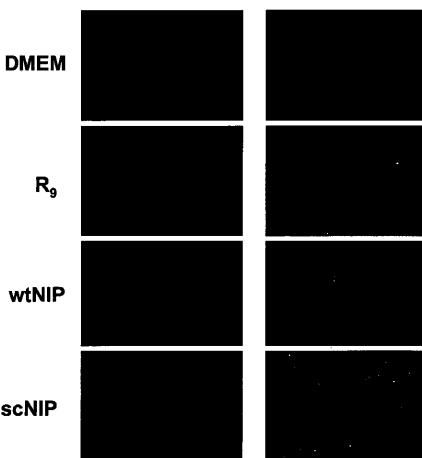


FIG. 2A

【図2B】

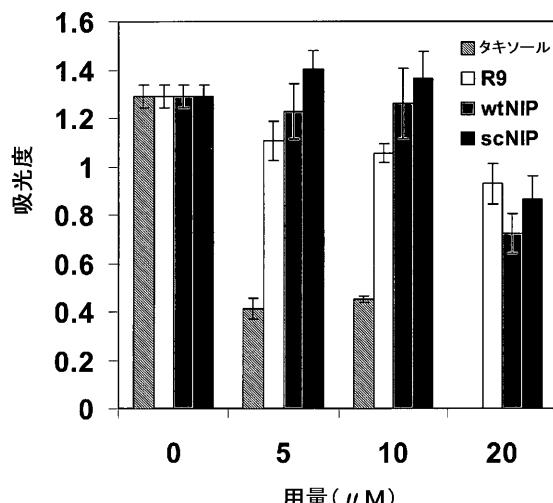


FIG. 2B

【図4A】

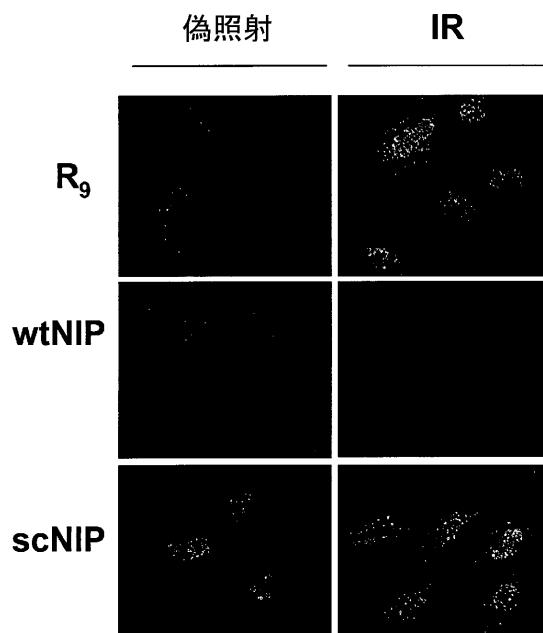


FIG. 4A

【図3】

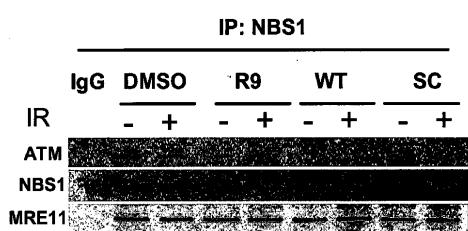


FIG. 3

【図 4 B】

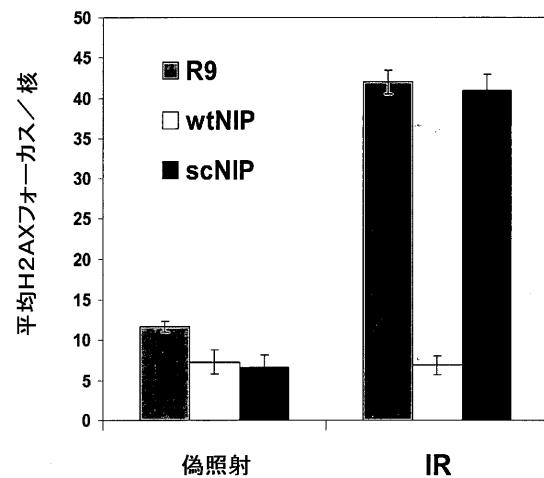


FIG. 4B

【図 5 A】

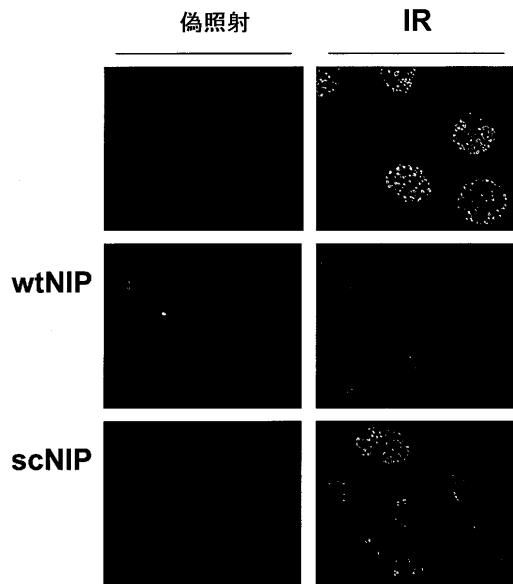


FIG. 5A

【図 5 B】

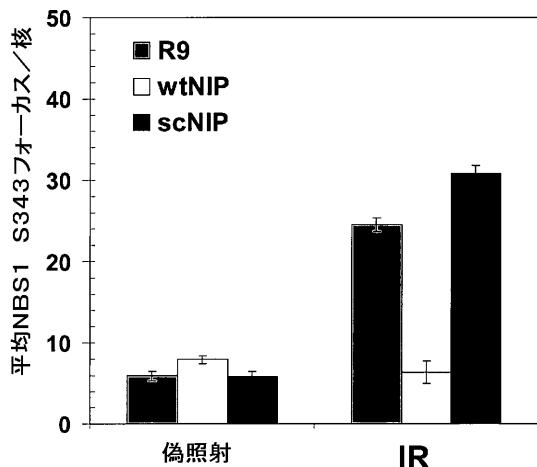


FIG. 5B

【図 6 A】

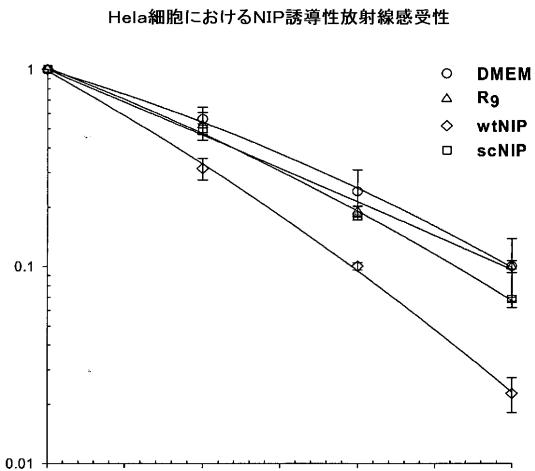


FIG. 6A

【図 6 B】

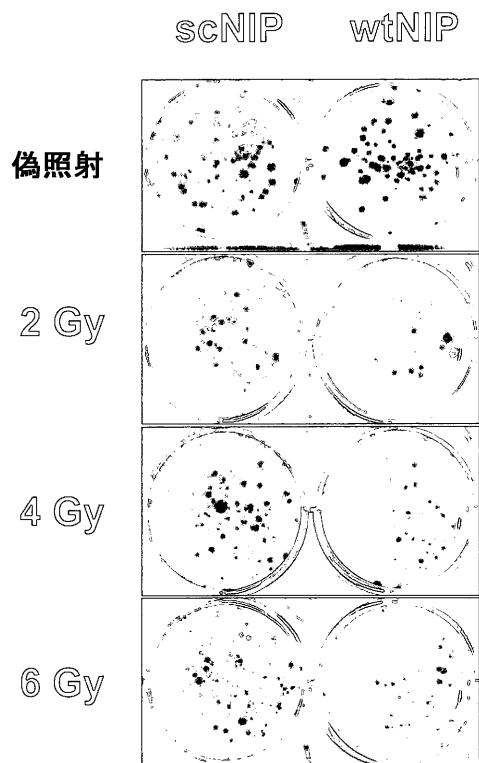


FIG. 6B

【図 6 C】

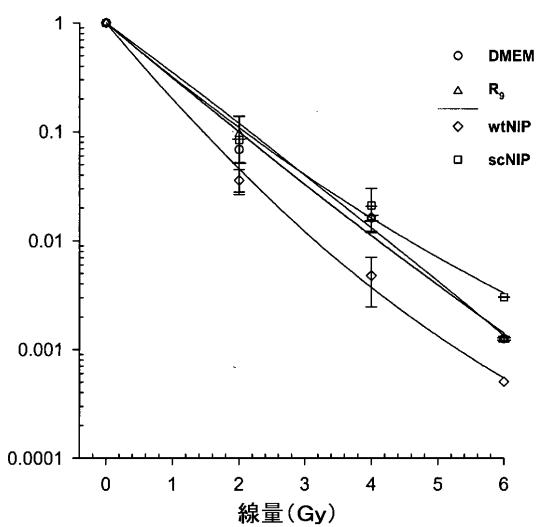


FIG. 6C

【図 6 D】

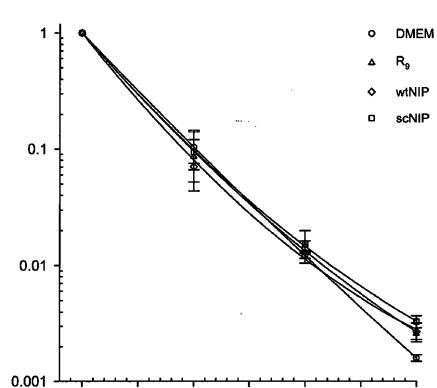


FIG. 6D

【図 7】

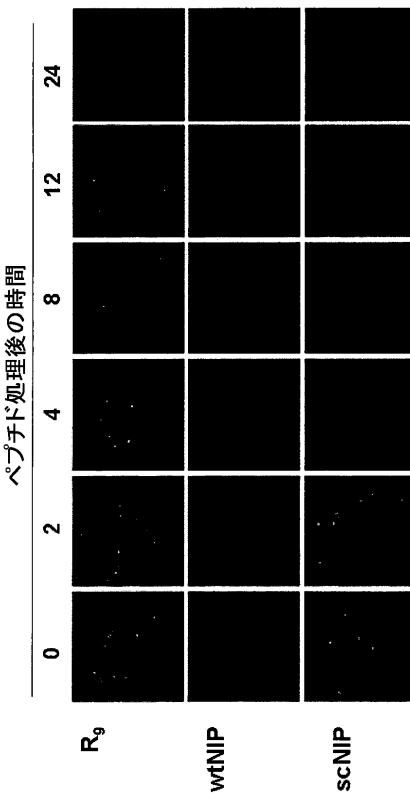


FIG. 7

【図 8 A】

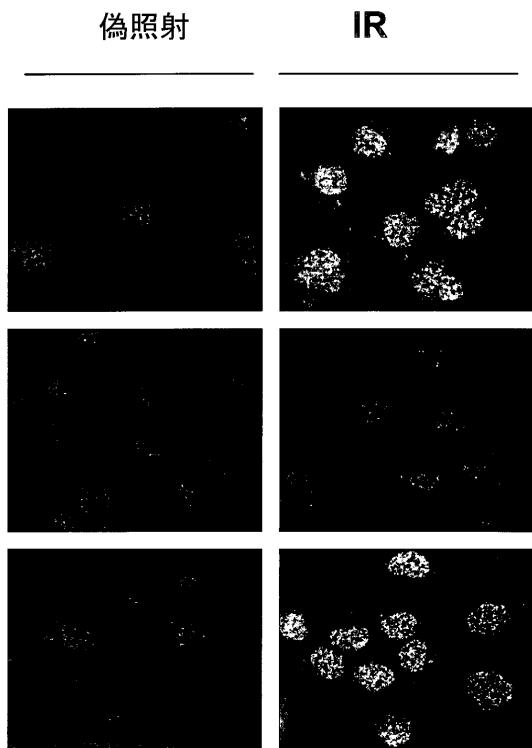


FIG. 8A

【図 8 B】

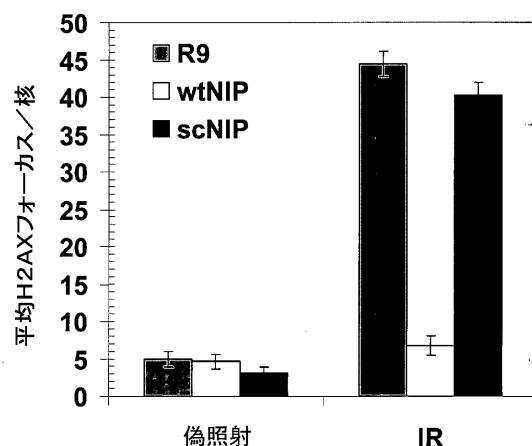


FIG. 8B

【図 9 A】

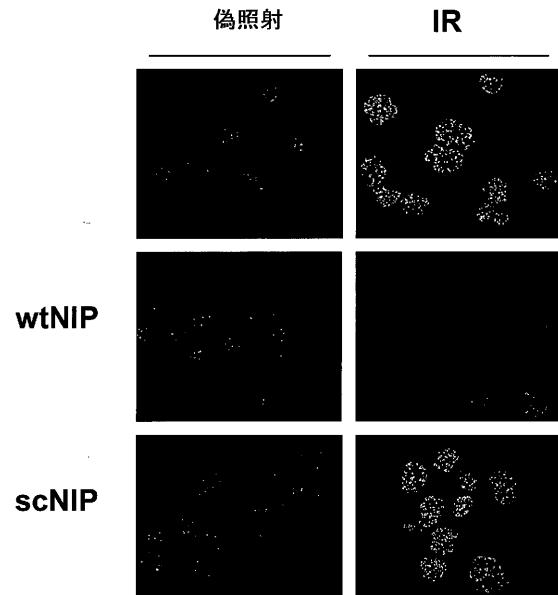


FIG. 9A

【図 9 B】

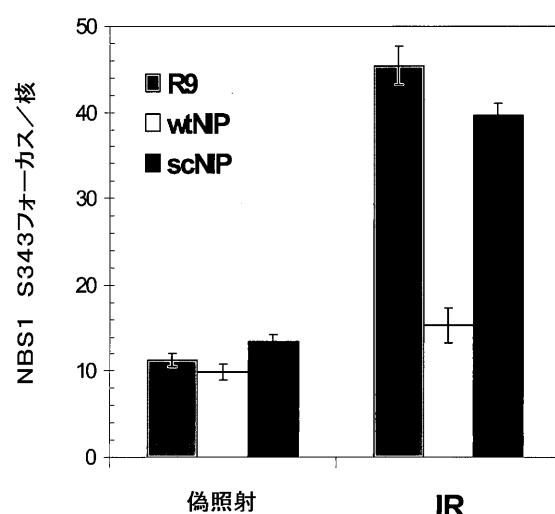


FIG. 9B

【図 10】

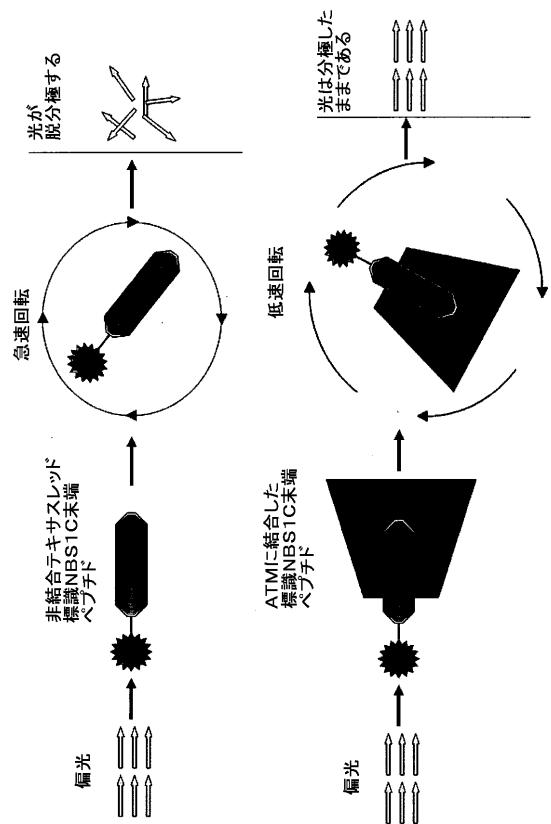


FIG. 10

【配列表】

2010508022000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/022886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/47 C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.*
X	US 2003/104427 A1 (PETRINI JOHN H J [US] ET AL) 5 June 2003 (2003-06-05) example 1; sequence 17	1-28
X	US 7 074 902 B1 (PETRINI JOHN H J [US] ET AL) 11 July 2006 (2006-07-11) example 3; sequence 24	1-28
X	US 7 122 343 B1 (PETRINI JOHN H J [US] ET AL) 17 October 2006 (2006-10-17) example 3; sequence 24	1-28
		-/-

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

28 August 2008

09/12/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sirim, Pinar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/022886

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FALCK JACOB ET AL: "Conserved modes of recruitment of ATM, ATR, and DNA-PKcs to sites of DNA damage." NATURE 31 MAR 2005, vol. 434, no. 7033, 31 March 2005 (2005-03-31), pages 605-611, XP002493388 ISSN: 1476-4687 cited in the application the whole document	1-37
X	CEROSALETI KAREN ET AL: "Independent roles for nibrin and Mre11-Rad50 in the activation and function of Atm." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 10 SEP 2004, vol. 279, no. 37, 10 September 2004 (2004-09-10), pages 38813-38819, XP002493390 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1-37
X	DESAI-MEHTA A ET AL: "Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY MAR 2001, vol. 21, no. 6, March 2001 (2001-03), pages 2184-2191, XP002493391 ISSN: 0270-7306 the whole document	1-37
A	HICKSON IAN ET AL: "Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM." CANCER RESEARCH 15 DEC 2004, vol. 64, no. 24, 15 December 2004 (2004-12-15), pages 9152-9159, XP002493670 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-28
X		29-37
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/022886

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHOWDHURY ET AL: "Radiation and New Molecular Agents Part I: Targeting ATM-ATR Checkpoints, DNA Repair, and the Proteasome" SEMINARS IN RADIATION ONCOLOGY, SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 16, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 51-58, XP005219362 ISSN: 1053-4296 cited in the application the whole document pages 53-56; figures 1,2; table 1	1-28
X		29-37
A	FUCHS STEPHEN M ET AL: "Pathway for polyarginine entry into mammalian cells." BIOCHEMISTRY, vol. 43, no. 9, 9 March 2004 (2004-03-09), pages 2438-2444, XP009104961 ISSN: 0006-2960 the whole document	1-37
P,X	CARIVEAU MICKAEL J ET AL: "Characterization of an NBS1C-terminal peptide that can inhibit ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage responses and enhance radiosensitivity" MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol. 72, no. 2, August 2007 (2007-08), pages 320-326 URL: XP002493393 ISSN: 0026-895X the whole document	1-37
P,X	CARIVEAU MICKAEL J ET AL: "Interfering with NBS1-ATM interaction to inhibit the DNA damage response and sensitize tumor cells to radiation." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 48, April 2007 (2007-04), page 923, XP001538620 & 98TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; LOS ANGELES, CA, USA; APRIL 14 -18, 2007 ISSN: 0197-016X the whole document	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/022886

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see annex

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2007/022886

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention I: claims 1-6 (all in part), claim 7 (complete), claims 8-37 (all in part)

subject-matter relating to polypeptide defined by SEQ ID NO.3 or the corresponding polyarginine (R9) fusion polypeptide defined by SEQ ID NO.35 and the corresponding nucleic acid sequence defined by SEQ ID NO.43

Inventions II-VIII: claims 1-6, 8-37 all in part

subject-matter relating to either of the polypeptides defined by SEQ ID NOs.4-10 or the corresponding polyarginine (R9) fusion polypeptides defined by either of SEQ ID NOs.36-42 and the corresponding nucleic acid sequences defined by SEQ ID NOs.44-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/022886

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003104427	A1 05-06-2003	NONE	
US 7074902	B1 11-07-2006	NONE	
US 7122343	B1 17-10-2006	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テマコード(参考)
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00 4 C 0 8 7
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1 4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 A
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K 67/027
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z
G 0 1 N	33/542	(2006.01)	G 0 1 N 33/542 A
G 0 1 N	21/78	(2006.01)	G 0 1 N 21/78 C

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

(72) 発明者 スー, ボー

アメリカ合衆国 アラバマ 35226, フーバー, ヒッコリー トレイス 5308

F ターM(参考) 2G045 FA15

2G054	AA08	CA22	CA23	CE02	EA03						
4B024	AA01	AA11	CA01	CA09	CA11	CA20	DA01	DA02	DA05	DA11	
		EA02	EA04	GA11	HA01	HA11					
4B065	AA01X	AA57X	AA87X	AA90X	AA90Y	AB01	BA01	CA24	CA44	CA46	
4C084	AA01	AA02	AA07	AA13	AA19	BA01	BA08	BA22	CA53	CA59	
		MA02	NA05	NA14	ZB261	ZC712	ZC751	ZC752			
4C087	AA01	AA02	BC83	CA12	NA05	NA14	ZB26	ZC71	ZC75		
4H045	AA10	AA30	BA10	BA41	CA40	EA20	EA50	FA10			