

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成19年1月25日(2007.1.25)

【公表番号】特表2006-514602(P2006-514602A)

【公表日】平成18年5月11日(2006.5.11)

【年通号数】公開・登録公報2006-018

【出願番号】特願2004-513322(P2004-513322)

【国際特許分類】

C 0 7 K	14/705	(2006.01)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)
C 0 7 K	14/47	(2006.01)
A 6 1 K	47/48	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 P	31/00	(2006.01)
A 6 1 P	3/10	(2006.01)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)
A 6 1 P	25/16	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)

【F I】

C 0 7 K	14/705	Z N A
C 1 2 Q	1/02	
C 0 7 K	14/47	
A 6 1 K	47/48	
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	43/00	1 2 3

【手続補正書】

【提出日】平成18年11月28日(2006.11.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 標的細胞中に特異的に過剰発現されるプロテアーゼのためのプロテアーゼ・コンセンサス部位、b) 細胞侵入ペプチドおよび/またはその非ペプチド類似体、およびc) カードを含む、カーゴのための細胞選択的送達系であって、前記細胞侵入ペプチドの細胞侵入能を抑制し、前記プロテアーゼによって切断される不活性化配列をさらに含む細胞選択的送達系。

【請求項2】

細胞侵入ペプチドおよび／またはその非ペプチド類似体がプロテアーゼ・コンセンサス部位を含む請求項1記載の細胞選択的送達系。

【請求項3】

カーゴが細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性物質である請求項1または2記載の細胞選択的送達系。

【請求項4】

細胞侵入ペプチドおよび／またはその非ペプチド類似体が、Y T A I A W V K A F I R K L R K (配列番号3)、L R S W V I S R S I R K A A (配列番号5)、L R S W I R R L I K A W K S (配列番号6)、L R S W R V I I R N G Q R (配列番号7)およびI R Q I K I W F Q N R R M K W K K (配列番号20)からなる群から選択される請求項1記載の細胞選択的送達系。

【請求項5】

プロテアーゼ・コンセンサス部位を含む細胞侵入ペプチドおよび／またはその非ペプチド類似体が、S G E S L A Y - Y T A I A W V K A F I R K L R K (配列番号4)、G P L G - L R S W V I S R S I R K A A (配列番号8)、G P L G - L R S W I R R L I K A W K S (配列番号9)、G P L G - L R S W R V I I R N G Q R (配列番号10)、およびD E E Q E R S E N - I R Q I K I W F Q N R R M K W K K (配列番号13)からなる群から選択される請求項2記載の細胞選択的送達系。

【請求項6】

前記過剰発現されるプロテアーゼが、M M P - 1、M M P - 2、およびM M P - M T 1からなる群から選択されるZn²⁺金属エンドペプチダーゼである請求項1から5のいずれかに記載の細胞選択的送達系。

【請求項7】

前記過剰発現するプロテアーゼが細菌表面プロテアーゼおよびウィルス酵素からなる群から選択される請求項1から5のいずれかに記載の細胞選択的送達系。

【請求項8】

医薬の製造における使用のための請求項1から7のいずれかに記載の細胞選択的送達系。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】細胞選択的送達系

【技術分野】

【0001】

本発明は標的細胞に送達される細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性物質のようなカーゴのための細胞選択的送達系に関する。本発明はまた医薬の製造における使用のための細胞選択的送達系にも関する。

【背景技術】

【0002】

種々の細胞エフェクタを細胞内に送達する多数の技術が開発されている。これらの技術の大部分はエレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションのように侵襲的である。リポソーム被包化や受容体依存性エンドサイトーシス(細胞内取り込み)が比較的おだやかな方法であるが、それらは残念ながら重大な欠点、特に低い送達収率を示す。

【0003】

細胞生物学における確立された視点から、親水性生体高分子の細胞インターナリゼーションは典型的エンドサイトーシス経路によってのみ実現し得ることが示されている。しかし過去10年間に数種のペプチドが見かけ上エネルギー非依存性経路によって真核細胞の

細胞膜を通過して移動することが証明された。これらのペプチドは細胞侵入ペプチド (C P P s) と定義され、それらの分子量の数倍大きい分子量を有する生体高分子の細胞内送達のために上首尾に使用されている。(リンドグレン (M . L i n d g r e n) ら、 2000 、細胞侵入ペプチド (C e l l - p e n e t r a t i n g p e p t i d e s) ; T I P S 、 21 卷、 p . 99 - 103)

【 0004 】

これらの細胞侵入ペプチドを使用する細胞送達は従来の方法にまさる幾つかの利点を有する。それは非侵襲的、エネルギー非依存性であり、広範囲の細胞型において有効であり、全ての細胞に適用できる。さらに、幾つかの種類の C P P s では細胞インターナリゼーションが 37 でも 4 でも同様に起こり、飽和することがないことが判明した。また大部分の場合に、そのインターナリゼーションはキラル受容体蛋白質を必要としないように見える。なぜならば光学異性的差別が認められないからである。

【 0005 】

最近まで、細胞膜を破壊せずに親水性生体高分子を生体細胞の細胞質 - および核コンパートメントに運搬することは遙かに遠くの目標であるように見えた。ポリペプチド類およびオリゴペプチド類は、生体膜透過性が低く、比較的速やかに分解するために、治療的価値は制限されると一般的に考えられていた。これは生医学的研究並びに製薬工業の両方ににおいて一つの障害である。

【 0006 】

非常に重要な仕事であるとはいえ、さらにより困難なことは、親水性生体高分子を血液脳障壁を通過して送達することである。この関門を越えるために幾つかの方法が推奨された。にもかかわらずそれら全てに、その効果がある分子サブセットに限定されるとか、それらの収率が低すぎるなどの制限がある。しかし最近の報告は、 C P P s が生体高分子を血液 - 脳障壁を通じて運搬し得ることを示唆している。

【 0007 】

エフェクタ類の所望の送達のためのもう一つの重要な領域は、核内輸入である。その際シグナル配列がある正電荷を担った (塩基性) 残基を含まなければならないことは一般に知られている (モロイアヌ (M o r o i a n u J .) J . C e l l B i o c h e m 1999) 。このような帶電アミノ酸は細胞膜転位のために必要であるように見える。

【 0008 】

今日では、細胞侵入ペプチド、 C P P s の送達は知られている。数種のペプチドが見かけ上エネルギー非依存性経路によって真核細胞の細胞膜を経て転位することが証明された。こうして細胞侵入ペプチドは、ペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子など薬物学的に興味深い物質類の送達ベクターとして、並びに研究ツールとして使用できるかも知れない。

【 0009 】

C P P s の中で特に興味深いのは、低い溶解 (l y t i c) 活性を有するペプチド類である。トロジャン・ペプチドとしても知られているこれら転位ペプチド (デロッシ (D . D e r o s s i) ら、 T r e n d s C e l l B i o l . 8 (1998) p . 84 - 87) は、インビボおよびインビトロの両方において、親水性生体分子および薬剤を細胞の細胞質 - および核コンパートメントに送達するためのベクターとして利用された (リンドグレン (M . L i n d g r e n) ら、 T r e n d s P h a r m a c o l . S c i . 21 卷 (2000) p . 99 - 103) 。それ自体の分子量の何倍も大きい分子量を有するポリペプチドおよびオリゴペプチドなどのカーゴと共有結合した場合でもこれらペプチドは転位することができる。

【 0010 】

有用な運搬ペプチドの例は、ある種の転写因子のホメオドメインから誘導される配列、並びにシグナル配列をベースとしたいわゆる T a t - 誘導ペプチド類である。ホメオドメインから誘導された転位ペプチドの最初のものは p A n t p と記載されるベネトラチ (配列番号 1) であった。これはドロソフィラのアンテナペディナ・ホメオドメイン蛋白質

からの第三 - ヘリックス(残基 43 - 58)の 16 残基に対応する配列を有する(デロッシラ、J. Biol. Chem. 269巻(1994) p. 10444 - 10450; プロキアンツ(A. Prochiantz)、Ann. NY Acad. Sci. 886巻(1999) p. 172 - 179 を参照されたい)。pAntpペプチドはその膜転位特性を保有し、そのため普遍的細胞内送達ベクターであると提唱されてきた(デロッシラ、Trends Cell Biol. 8巻(1998) p. 84 - 87)。

【0011】

純粹に合成されたペプチド、またはキメラ - ペプチドも文献に参照されるように(デロッシラ、Trends Cell Biol. 8巻(1998) p. 84 - 87; リンドグレンら、Trends Pharmacol. Sci. 21巻(2000) p. 99 - 103) 設計された。

【0012】

非天然ペプチドなどのトランスポータン(配列番号2)は、それ自体は3kDペプチドに過ぎないのに、約150kDaの分子量を有する抗体分子を細胞膜を経て送達することができる。トランスポータンおよびペネトラチンは非天然DNA類似体、PNA(ペプチド核酸)を培養細胞の細胞質および核内に送達することが証明された(ブーガ(Pooga)ら、1998、Nature Biotech.)。

【0013】

驚いたことに、疎水性部分に結合した際に細胞膜を通過して運搬できることが証明されたまた別の群のペプチドは、ペプドウシンと呼ばれる修飾受容体、特にG蛋白質結合受容体である(WO0181408、クリオプロス(Kulioopoulos)ら、を参照されたい)。7TM受容体の第三細胞内ループから誘導されるペプチドに疎水性部分を結合させると、前記キメラペプチド類の細胞内転位および受容体G - 蛋白質シグナリングの完全アゴニストおよび/またはアンタゴニストの細胞内転位が起きることが発見された。これらペプドウシンは膜侵入性、膜結合性キメラペプチドであり、活性をあらわすためにはそれらの同種受容体の存在を必要とし、受容体型に対して非常に選択的である。

【0014】

驚くほどの運搬能力のために、CPPsは近年、科学的関心の的になったとはいえ、種々のCPPsの転位の最も基礎的なメカニズムはいまだに知られていない。例えば、転位を許す(エネルギー的に)ためには何らかの特別の二次構造、例えば同時に起きる一過性の膜不安定化などが誘導されなければならないのか否かはこの分野ではいまだに知られていない。しかしペプチド - 膜相互作用の分子レベルでの詳細が転位プロセスのための基礎的重要なことは明らかである。

【0015】

インターナリゼーションのメカニズムおよび必要事項が両親媒性 - ヘリカルペプチドと脂質(二)層との相互作用に関して研究された。これらの研究結果のなかには、トリプトファンがペプチドのインターナリゼーションを起こすことを示唆するものが多い。しかし芳香族アミノ酸がCPP配列に優勢であるとはいえ、それらは細胞侵入に絶対に必要というわけではない。

【0016】

細胞侵入能力とは別に、CPPs間に構造または挙動の相関関係はほとんど認められていない。したがって現在までCPPsは合理的方法では設計されず、偶然に発見されていた。しかしこれまでに公表されたCPPsの配列は唯一の共通的特徴として正の正味電荷を有し、これが所定のペプチド配列におけるCPP機能性を予測するための出発点となつた。しかし正の正味電荷を有する配列が全て細胞侵入性ではあり得ないことは明らかであり、確実にCPPsを選択するためにはさらなる制限が必要であることが示唆される。

【0017】

WO0034308は伝達ドメインと細胞傷害性ドメインを含む一つ以上の融合タンパク質を含んでなるタンパク質伝達系を開示している。そのタンパク質伝達系は、高レベルの重金属、DNA損傷または制御されない細胞分裂のような独特の特性を示す異なった病

原体または細胞の一つまたは組み合わせに感染した細胞を効果的に死滅させもしくは傷害を与える。

【特許文献】 WO 0 0 3 4 3 0 8

【発明の開示】

【0018】

本発明は添付の請求項1及び従属請求項に記載の細胞選択的送達系並びに請求項8に記載の医薬の製造における使用のための細胞選択的送達系を提供する。

【0019】

本発明に関連して、アミノ酸はアミノ(-NH₂)およびカルボキシル(-COOH)基を含む任意の有機化合物である。アミノ酸はL-型でもD-型でもよい。現在、mRN Aのリボソーム翻訳中に蛋白質を合成する公知のコーデド-アミノ酸が22種類ある。それに加えて、非常に多数の非コーデドアミノ酸が定常的にあらわれており、そのうちの56例が表1Aに示される。コーデドおよび非コーデドアミノ酸は、本発明に含まれるアミノ酸配列、ペプチドフラグメント類、ペプチド類、蛋白質類および/またはポリペプチド類の一部であることは当然である。

【0020】

本発明に関連して、アミノ酸配列とはペプチドフラグメント、ペプチド、蛋白質またはポリペプチド中に精確に決められた順序で線状に配列するアミノ酸(コーデドおよび/または非コーデドアミノ酸を両方含む)である。

【0021】

用語“非ペプチド類似体”は、本発明に関連して、少なくとも1つの非コーデドアミノ酸を含み、および/または主鎖修飾を有し、その結果ペプチド結合(すなわち1つのアミノ酸のカルボキシル基と他のアミノ酸のアミノ基との間に形成されるCO-NH結合)のないアミノ酸配列を生成する、任意のアミノ酸配列である。

【0022】

さらに、本発明のアミノ酸配列はアミド化されてもよく、遊離酸として生成してもよい。

【0023】

異なる特性のリポータ基、例えばビオチンおよび種々のフルオロフォア類、例えばフルオレセイン、アミノ安息香酸およびローダミン類など、を予測CPPに結合させて、その細胞転位および効率を推定することができる。

【0024】

用語、ペプチドの“細胞侵入能力”とは、以後、細胞膜を経て真核細胞および/または原核細胞の細胞質および/または核コンパートメント、例えば細胞形質、核、リソソーム、小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアおよび/または葉緑素、などに見かけ上エネルギー非依存的に転位する能力、と同意義に用いられる。追加的に、用語、ペプチドの“細胞侵入能力”は本発明のある局面においては、細胞貫通または膜貫通輸送と同意義にも用いられ、したがって、腸/類系の上皮などの上皮膜、口腔、肺、直腸または鼻の粘膜、または哺乳動物の血液-脳障壁を通過する転位能力も表す。

【0025】

本発明により細胞侵入能力をあらわす検出された、または新たに設計され、証明されたペプチドは、本発明に関連して“細胞侵入ペプチド(CPP)”と定義され、例えば、それ自体の分子量より数倍大きい分子量をもつポリペプチドおよび/またはオリゴヌクレオチドなどの生体高分子を細胞内に送達するために使用できる。

【0026】

概して細胞侵入ペプチドおよび/またはその非ペプチド類似体を使用する細胞内送達は非侵襲的、エネルギー非依存的であり、広範囲の細胞型および/または非常に種々様々のカーゴにとって効率的であり、全ての細胞に適用でき、飽和せず、受容体非依存性である。

【0027】

本出願に開示される方法によって見いだされるかまたは新たに設計され、および/また

は証明された CPPs は親水性生体高分子を生体細胞および / または微生物の細胞質および核コンパートメントに、細胞膜を恒久的に破壊することなく輸送するのに有用であり、血液 - 脳障壁を介して親水性生体高分子を送達し、共役オリゴペプチドおよびオリゴヌクレオチドおよび薬剤類の細胞内輸送を可能にするために有用である。

【 0 0 2 8 】

こうして本発明に関連して、細胞侵入ペプチドおよび / またはその非ペプチド類似体が任意の薬物学的に興味深い物質、例えばペプチド、ポリペプチド、蛋白質、低分子物質、薬剤、モノヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、アンチセンス分子、二本鎖並びに一本鎖 DNA、RNA および / または任意の人工的または部分的人工的核酸、例えば RNA、の送達ベクターとして、並びに、タグやマーカーなど送達のための研究ツールとしておよび / または膜ポテンシャルおよび / または特性を変化させるための研究ツールとして使用できる。

【 0 0 2 9 】

したがって本発明によって見いだされまたは設計および / または生産される CPP は親水性生体分子および / または薬剤を細胞および / または組織の細胞質および核コンパートメントに送達するためのベクターとしてインビボおよびインビトロの両方に用いられる。

【 0 0 3 0 】

CPP 自体の分子量より何倍も大きい分子量を有する任意のペプチド、ポリペプチド、蛋白質、低分子物質、薬剤、ポリペプチドおよびオリゴペプチドを含むカーゴ (cargo) と共有結合した場合でも、CPP は転位することができる。

【 0 0 3 1 】

その上、CPP はそれ自体細胞内および / または細胞外エフェクタ活性を示し、細胞侵入機能的蛋白質模擬ペプチドとして働くことができ、または新たに設計され、新しい予想もできない機能をあらわすことがある。

【 0 0 3 2 】

細胞エフェクタは本明細書では細胞内および / または細胞外エフェクタであり、本発明に関連して、収縮、分泌、電気インパルス、または細胞内および / または細胞外シグナリング・カスケードの活性化または不活性化などの細胞効果を生み出す構造、または前記エフェクタによる刺激に応えて mRNA および / または蛋白質の細胞レベルのアップレギュレーションを誘発する構造と定義される。典型的エフェクタは本発明に関連して、代謝産物、アンタゴニスト、アゴニスト、受容体・リガンド、受容体結合蛋白質、活性化受容体、酵素インヒビタ、アクチベータ / インアクチベータおよび / またはステイミュレータ、キナーゼ、ホスファターゼ、エンハンサ、またはサイレンサ、転写因子、トランスポータおよび / またはトランスマッタ、ホルモン、チャネル、イオン、プリオン、およびウイルス蛋白質からなる群から選択される。

【 0 0 3 3 】

カーゴ

既述のように、CPP はカーゴに結合し、前記カーゴを細胞、種々の細胞コンパートメント、組織または器官へ運ぶ担体として機能する。カーゴは薬物学的に興味深い物質、例えばペプチド、ポリペプチド、蛋白質、小分子物質、薬剤、モノヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、アンチセンス分子、二本鎖並びに一本鎖 DNA、RNA および / または任意の人工的または一部人工的核酸、例えば RNA、低分子量分子、糖類、プラスミド、抗生物質、細胞傷害剤および / または抗ウイルス剤などからなる群から選択される。さらに、カーゴの運搬は例えばタグ類およびマーカー類を送達するための研究ツール並びに膜電位および / 膜特性を変えるための研究ツールとして有用であり、カーゴは例えばビオチンのようなマーカー分子でもよい。

【 0 0 3 4 】

カーゴを意図的に血液脳障壁を通過して運搬することに関連して、細胞内および細胞外物質類は同様に好ましいカーゴである。

【 0 0 3 5 】

本発明の好ましい実施形態において、細胞侵入ペプチドは前記カーゴにS-S架橋によって結合する。当然、カーゴをCPPに結合するための非常に種々様々の結合法があり、CPP、カーゴおよび目的とする用途の性質に応じて個々に選択される。結合モードは共有および非共有結合（ビオチン-アビシン結合など）、エステル結合、およびアミド結合、抗体結合などからなる群から選択できる。

【0036】

ある実施形態においては、不安定な結合が好ましく、ある実施形態においては安定な結合が重要である；例えば本発明によるCPPを医学的物質の運搬のために使用する際には、使用前に前記医薬組成物を保存しておく必要があるため、安定な結合が重要である。

【0037】

上記の実施形態のための例証的例は実施例2、5および6に記載される。

【0038】

実施例5において、メトトレキセート（MTX）とCPP担体との結合体が記載されている。MTXは細胞傷害性薬剤であり、それは悪性腫瘍の治療のために開発されたが、いまは乾癬のような自己免疫病の治療に使用されている。MTXは負に帯電した分子として体液中に存在するのが普通である。そのためそれが細胞膜を通過するには困難を伴う。

【0039】

本発明によるカーゴの運搬のためにCPPを使用する一つの例証的例は、実質的に配列番号3 - 7に含まれるようなMTX - CPP結合体を含む。それらは例えば実施例5に記載されるような固相ペプチド合成法を用いて合成される。その特定の例は下の表1に示される：

表1 MTX - CPPコンジュゲート

Apa- γ Glu-Gly-CPP
Apa-(γ Glu)2-5-Gly-CPP
Apa-Cys-S-S-Cys-CPP

【0040】

CPPと共に細胞膜を通過して運ばれる分子のその他の例は実施例6に記載されており、そこではsiRNAの取り込みが実質的に改善される。

【0041】

近年、小さい干渉RNA（siRNA）が、哺乳動物細胞における遺伝子発現を調節するそれらの高い感受性能力のために、注目を集めている。siRNAは、RNA誘導性サイレンシング複合体（RISC）の活性化によって相補的mRNAの特異的切断を引き起こす二本鎖RNAの短鎖（約21～23bp）である。RNA誘導性サイレンシングが内因性メカニズムであるとはいえ、合成的に合成されたsiRNA類はインビトロでもインビトロでも同じ効果を有することが証明された。

【0042】

siRNAを使用する際の公知の問題は、細胞内取り込みの低収率である。細胞侵入ペプチド類（CPP）を合成的に合成したsiRNAに結合することによって、細胞内取り込みは有意に改善する。

【0043】

本発明に含まれるカーゴ運搬のためにCPPを使用するもう一つの特定の実施形態はトランスポータン10（Tp10）のようなCPPにジスルフィド・リンカーによって結合した、GALR-1 mRNAに対するsiRNAに関するものである。例えば、図18に示され、配列番号2に記載されている。

【0044】

細胞選択 C P P s

本発明のさらに別の実施形態において、ある細胞型／組織／器官に選択的に侵入し、またはある細胞型、組織型または器官型においてのみ活性化されるカーゴを運搬する細胞侵入ペプチドおよび／またはその非ペプチド類似体が提供される。

【 0 0 4 5 】

発明者は、種々の異なる C P P s が特異的細胞系、例えばヒトメラノーマ細胞系 B o w s などによって、有意に異なる効率、および有意に異なる取り込み速度、時には 2 倍も異なる速度でインターナライズされることを示す。これは、異なる効率で異なる細胞系および組織にインターナライズされる C P P s を定義する予備的条件である。そこで本発明の重要な実施形態は、選択的輸送が要求される細胞系、細胞類、組織類および／または器官類における細胞内取り込みのための天然のまたは新たに設計される全ての C P P s を試験することによって特徴づけられる選択性 C P P s (s e l C P P s) の開発法である。他方では、ある標的細胞または標的細胞集団のために選択された C P P s の細胞選択性を人工的に高める幾つかの特殊な方法が使用される。これは以下に詳細に記載される。

【 0 0 4 6 】

一例として、癌細胞は多くの細胞表面抗原および／または蛋白質を露出し、並びにある蛋白質類を分泌する。通常、腫瘍細胞は特異的な細胞表面マーカーを発現せず、むしろ一般的受容体／マーカーを過剰発現する。これらの過剰に発現されるマーカー類および／または細胞内および／または細胞外シグナルの過剰増幅によるシグナリングは細胞周期を通じた細胞機構の制御を喪失するメカニズムの一つであると考えられる。こうして本発明の特殊な実施形態において、過剰発現する細胞表面蛋白質および／または分泌蛋白質は、 C P P アドレッシングのための標的として使用される。

【 0 0 4 7 】

本発明の一実施形態において、細胞選択 C P P (s e l C P P) は、チャンネル受容体類、チロシンキナーゼ受容体類（例えば E G E 、 I G F ）、グアニレートシクラーゼ受容体類、セリン／スレオニン・キナーゼ・受容体類、サイトカイン受容体類、グアノシン三磷酸 (G T P) - 結合蛋白質に結合した受容体 (G - 蛋白質結合受容体 : G P C R s) 、スフィンゴ糖脂質類、 C D 4 4 、神経ペプチド受容体、例えばニューロテンシン受容体類、ガラニン、およびサブスタンス P 受容体類からなる群から選択される細胞マーカーに対して生成した抗原／蛋白を含むことが予測される。

【 0 0 4 8 】

概して、細胞選択 C P P (s e l C P P) は任意の種類の薬剤または医薬物質の、種々の特異的真核および／または原核細胞標的への標的化輸送に極めて重要であることは当然である。このようなカーゴの細胞選択輸送は、例えばウィルス、細菌または寄生虫感染症によって起きる疾患のような感染症の治療または予防のための使用が想定される。

【 0 0 4 9 】

標的細胞をインビボで見いだす前に C P P s の非特異的イターナリゼーションを避けるために、別の局面において本発明は酵素 - プロドラッグ戦略の新しい変形体に関係する。その際 s e l C P P 結合物は、 C P P 類の細胞侵入 - 活性構造が、前記 s e l C P P のペプチド部分の細胞／組織または器官特異的受容体／マーカーへの結合事象または標的細胞／組織または器官によって分泌されるプロテアーゼによる前記 s e l C P P 結合体の切断によって構造識別体から C P P を放出するまでは破壊されないように、設計される。

【 0 0 5 0 】

用語 "酵素 - プロドラッグ戦略 / 療法 " は、アミノ酸または核酸プロドラッグ（それらは送達前または後に多かれ少なかれ組織、器官および／または細胞選択酵素類による活性化を要求する）の開発に焦点をおいたプロドラッグ送達の特異的アプローチを定義するために使用される。選択性の大きい差が先行技術に見いだされる。幾つかのプロドラッグでは標的組織／器官／細胞からの放出薬剤の速やかな除去が低選択性を説明し、またあるプロドラッグでは、非標的組織における切断、および細胞を経由する酵素部位への不十分な輸送が（低選択性の）主な原因であると考えられる。

【0051】

特に、多くの抗癌剤は非常に有毒であり、そのためより効果的およびより毒性の少ないプロドラッグおよび/またはソフトドラッグが必要である。そのため典型的プロドラッグ/ソフトドラッグは活性化酵素のための効率的および選択的基質でなければならないし、好ましくは細胞周期の全段階において細胞を殺す強力な細胞傷害物質および/または細胞増殖抑制物質に代謝されなければならない。初期の抗代謝産物ベースのプロドラッグの多くは、細胞膜を経由する拡散能力が限られ、客観的効果を得るには細胞間の細隙結合に依存しなければならない極性の高い活性化型を提供した。しかし本発明に記載されるプロドラッグ類は良好な分布特性を有し、それらの活性種は翻訳細胞侵入性であり、それによって得られる客観的効果はその療法の効果を最大にすることができる。

【0052】

本発明に関連して、用語“酵素-プロドラッグ戦略/療法”とは、その他に薬剤を送達する上記の方法であって、前記薬剤それ自体またはその運搬体CPPを非細胞侵入性にして、インビオ標的細胞を見つける前にCPPsの非特異的インターナリゼーションが起こるのを回避するようにし、その際前記sel CPPのペプチド部分の細胞/組織または器官特異的受容体/マーカーへの結合事象、または前記sel CPP-結合体の、標的細胞/組織又は器官によって分泌されるプロテアーゼによる前記sel CPP結合体の切断によってのみ、構造的識別体からCPPが放出され、それが標的細胞に侵入できるという方法を説明するための用語である。

【0053】

したがって本発明の特に好ましい実施形態は、a)標的細胞において特異的に過剰発現されるプロテアーゼのためのプロテアーゼ・コンセンサス部位、b)細胞侵入ペプチドおよび/またはその非ペプチド類似体、およびc)細胞増殖抑制物質および/または細胞傷害物質を含む、細胞増殖抑制物質および/または細胞傷害物質の細胞選択的送達系に関するものであり、前記細胞選択的送達系はその他に前記細胞侵入ペプチドの細胞侵入能力を抑制する不活性配列も含み、その配列は前記細胞選択的送達系によって前記標的細胞の近くに導入されると、前記標的細胞に特異的に過剰発現される前記プロテアーゼによって切断される。実施例4などを参照されたい。

【0054】

上記の概念の典型的例は基質金属プロテアーゼ(MMPs)であり、それらは Zn^{2+} 金属エンドペプチダーゼである。このファミリは結合したメンバーも分泌されたメンバーも両方共含み、それらは両方共細胞膜上または細胞外基質(ECM)に存在する蛋白質の分解を触媒する(スターンリヒト(M. D. Sternlicht)およびワーブ(Z. Werb)「基質金属プロテアーゼが細胞挙動を調節する仕方(How matrix metallo proteinases regulate cell behavior)」Annual Review of Cell and Developmental Biology, 17巻:p. 463-516, 2001)。MMPsは多種多様の悪性腫瘍の侵襲性および転移性挙動に関連があり、これら酵素は一般的に種々の腫瘍に過剰発現される(スターンリヒトおよびワーブ「基質金属プロテアーゼが細胞挙動を調節する仕方」Annual Review of Cell and Developmental Biology, 17巻:p. 463-516;ロザノフ(D. V. Rozanova)ら、「膜1型金属プロテアーゼ(MT1-MMP、別名MMP-14)」Journal of Biological Chemistry(JBC)276巻:p. 25705-14, 2001年7月13日)。MMP-MT1のような膜型MMP(MT-MMP)は発癌に強く関係している。これらの酵素は侵襲性先端に局在する。可溶性MMPs 1-3および9も腫瘍発生のアゴニストとして関係している(スミス(Smith, L. E., パークス(Parks, K. K.), ハセガワ(K. K. Hasegawa), イーストモンド(Eastmond D. A.) & グロソヴスキ(Grosovsky, A. J.) パラセントメトリック・ヘテロクロマチンの標的化破壊は染色体を不安定にする(Targeted breakage of paracentromeric

c heterochromatin induces chromosomal instability); Mutagenesis 13巻、p. 435-43 (1998)。

【0055】

これに付随して、そして実施例4および12に明確に証明されたように、本発明は次の3つの基礎的機能に基づいてsel CPPを設計する方法に関する: 1) MMP-2またはMMP-MT1による選択的切断(およびそれによる活性化)、2)ペプチド(CPPs)による細胞侵入、および3)それによって腫瘍細胞または腫瘍の血管新生に関する内皮を既知の細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性薬剤によって死滅させること(図2、3、8および9を参照されたい)。

【0056】

本発明はこうして表2または表3に含まれるアミノ酸配列から選択されるsel CPP、および、表2または表3に列挙されるアミノ酸配列および細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性薬剤を含む、細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性薬剤の複合的細胞選択的送達系に関する。配列番号3-10を参照されたい。

表2. MMP-2(ゲラチナーゼ-A)分解特異性に基づくsel CPPs

名称	配列	MMP部位	ペネトラチン	コメント
YTA-2	YTAIAWVKAFIRKLRK (配列番号3)	SGESLAY-YTA (配列番号11)	+++	核膜も染める 図2
YTA-2ps*	SGESLAY-YTAIAWVKAFIRKLRK (配列番号4)	SGESLAY-YTA (配列番号11)	+	形質膜と結合 図3

*psはプロティナーゼ分解部位を示す

表3 MMP-MT1分解特異性に基づくsel CPPs

名称	配列	MMP部位
LRSW-1	LRSWVISRSIRKAA (配列番号5)	GPLG-LRSW (配列番号12)
LRSW-2	LRSWIRRLIKAWKS (配列番号6)	GPLG-LRSW (配列番号12)
LRSW-3	LRSWRVIIRNGQR (配列番号7)	GPLG-LRSW (配列番号12)

LRSW-1ps、LRSW-2psおよびLRSW-3psはそれぞれ配列番号8、9および10を有する。

【0057】

したがって、本発明はa)標的細胞において特異的に過剰発現されるプロテアーゼのためのプロテアーゼ・コンセンサス部位を含む細胞侵入ペプチドおよび/またはその非ペプチド類似体およびc)細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性薬剤を含む、細胞増殖抑制および/または細胞傷害性薬剤の細胞選択的送達系にも関係し、前記細胞選択的送達系はその他に前記細胞侵入ペプチドの活性を抑制する不活性化配列を含み、この配列は前記細胞選択的送達系が前記標的細胞近くに導入されると標的細胞において特異的に過剰発現されるプロテアーゼによって切断される。

【 0 0 5 8 】

上記のような前記細胞選択的送達系の好ましい実施形態において、前記細胞選択的送達系に含まれる前記細胞侵入ペプチドは前記細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性薬剤の細胞内取り込みの平均速度を、 a および c) の成分のみを含む細胞選択的送達系または前記細胞の成分 c) だけの平均細胞内取り込み率に比較して、 1 細胞あたり少なくとも 1 . 5 のファクターだけ高める。

【 0 0 5 9 】

前記細胞選択的送達系の、また別の同様に好ましい実施形態において、前記細胞選択的送達系に含まれる前記細胞侵入ペプチドは、前記細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性薬剤の前記選択的細胞の 1 細胞あたりの平均取り込み率を、 a) および c) の線分だけを含む細胞選択的送達系の前記細胞への平均取り込み率、または前記細胞の c) 成分だけの平均取り込み率に比較して少なくともファクター 1 . 5 、例えば少なくとも 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 1000 または 10000 だけ高める。

【 0 0 6 0 】

上記のような細胞選択的送達系のまた別の同様に好ましい実施形態において、前記過剰発現するプロテアーゼは、 MMP - 1 、 MMP - 2 、および MMP - MT 1 からなる群から選択される Zn^{2+} 金属エンドペプチダーゼである。

【 0 0 6 1 】

もう一つの実施形態において、前記過剰発現するプロテアーゼは細菌表面プロテアーゼおよびウィルス酵素からなる群から選択される。

【 0 0 6 2 】

ここに記載される細胞選択的送達系は哺乳動物における特殊な細胞集団の細胞増殖を停止させ、細胞増殖をコントロールできないという特徴を有する医学的障害、例えば腫瘍性異常または腫瘍疾患、または免疫学的および／または代謝機能亢進などに罹患した患者を治療するための医薬組成物の製造にも使用できることは勿論である。

【 0 0 6 3 】

本発明のさらにまた別の局面は、本発明による細胞選択的送達系を使用して薬剤を製造することに関係する。

【 0 0 6 4 】

本発明の種々の局面および実施形態を以下の実施例によって説明する。本発明は特別に記載された詳細によって制限されるものではない。

【 0 0 6 5 】

略語

A	ベータ - アミロイド
AD	アルツハイマー病
APP	アミロイド前駆体蛋白質
AT 1	アンジオテンシン・受容体 AT 1 型
AT 1 A	アンジオテンシン・受容体・サブタイプ AT 1 A
AT 1 B	アンジオテンシン・受容体・サブタイプ AT 1 B
AT 2	アンジオテンシン・受容体 AT 2 型
BACE	- 部位 APP - 切断酵素
Bio	ビオチン、ビオチニル化
BSA	ウシ血清アルブミン
CPP	細胞侵入ペプチド
CTF	C - 末端フラグメント
DCC	N , N - ジシクロヘキシルカルボジイミド
DCM	ジクロロメタン
DIEA	ジイソプロピルエチルアミン
DMF	ジメチルホルムアミド

D N P	ジニトロフェニル
E O F A D	早発性アルツハイマー病
F I T C	5 - フルオレセイン・イソチオシアネート
F m o c	9 - フルオレニルメトキシカルボニル
G O P	I V I A K L K A - アミド
G P C R	G - 蛋白質結合受容体
G T P	グアノシン 5' - 三磷酸
G T P a s e	グアノシントリホスファターゼ
G T P S	グアノシン - S - 5' - 三磷酸
H K R	ヘペス - クレブス - リンゲル
H O B t	N - ヒドロキシベンゾトリアゾール
H P L C	高性能液体クロマトグラフィー
I D E	インスリン分解酵素
L O A D	遅発性アルツハイマー病
M B H A	4 - メチルベンズヒドリルアミン
N F T	神経原線維糸球
N I C D	ノッチ細胞内ドメイン
N M P	N - メチルビロリドン
N T F	N - 末端フラグメント
P A F	パラホルムアルデヒド
P B S	磷酸緩衝食塩液
P N A	ペプチド核酸
P S	プレセニリン
R N A	リボ核酸
S A P P	分泌A P P
T A C E	腫瘍壊死因子アルファ変換酵素
t - B o c	t e r t - ブトキシカルボニル
T B T U	2 - (1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 , - テトラメチルウロニウム・テトラフルオロ硼酸
T F A	三フッ化酢酸
T F A	三フッ化酢酸
T F M S A	トリフルオロメタンスルホン酸

【実施例】

【 0 0 6 6 】

実施例 1

ペプチド合成（特に他の記載がなければ、以下の諸実験の既定の方法が記載される）

ペプチドは固相ペプチド合成の t - B o c 戦略を使用してペプチド合成器（アプライド・ビオシステムス 431 A 型、 U S A ）で 0 . 1 m m o l スケールで段階的で方法によって合成される。 t e r t - ブチロキシカルボニルアミノ酸（バチエム、ブデンドルフ、スイス）をヒドロキシベンゾトリアゾール（ H o B t ）エステルとして p - メチルベンジルヒドリルアミン（ M B H A ）樹脂（バチエム、ブデンドルフ、スイス）に結合させ、 C - 末端アミデート化ペプチドを得た。ビオチンを手動で N - 末端に結合した；そのためには 3 倍過剰の H o B t および o - ベンゾトリアゾール - 1 - イル - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウム テトラフルオロ硼酸（ T B T U ）活性化ビオチン（ケミコン、ストックホルム、スイス）を D M F 中でペプチジル樹脂に加えた。上記ペプチドを、最後に p - クレゾールの存在下で O 、 30 分間、液体 H F で樹脂から切り離した。このペプチドの純度は、分析ヌクレオシル 120 - 3 C - 18 P R - H P L C カラム（ 0 . 4 × 1 0 c m ）上の H P L C によって測定したところ、 > 98 % であることが証明され、正確な分子量はプラズマ脱着質量分析（ビオイン 20 、アプライド・ビオシステムス、 U S A ）または M A L D I - T O F (V a a g e r S T R - E 、アプライド・ビオシステムス、

U S A) を使用して、記載されるようにして得た (ランゲル (L a n g e l , U . ,) 、 ランド (L a m d , T .) & バルトファイ (B a r t f a i , T .) 、 ガラニン受容体およびサブスタンス P 受容体に対するキメラペプチドリガンドの設計 (D e s i g n o f chimeric peptide ligands to galanin receptors and substance P receptors) 。 I n t J P e p t P r o t e i n R e s 39 卷、 p . 516 - 22 (1992)) 。

【 0 0 6 7 】

細胞培養 (特に他の記載がなければ、下の実験の既定の方法を述べる)

ネズミ線維芽細胞 C 3 H 1 0 T 1 / 2 、 マウス神経芽細胞腫 N 2 A 細胞および C O S - 7 細胞を 1 0 c m ペトリ皿中で、 1 0 % ウシ胎児血清 (F C S) 、 2 m M L - グルタミン、 1 0 0 U / m l ベニシリンおよび 0 . 1 m g / m l ストレプトマイシンを補充したダルベッコ改良イーグル培地 (D M E M) 中で 3 7 度 5 % C O 2 気流中で増殖させた。細胞を播種し、 5 日ごとに再培養した。播種した際 C O S - 7 および 1 0 T 1 / 2 細胞をトリプシン化し、その一方、 N 2 A 細胞は培地をその細胞に加えて、機械的力で懸濁した。実験開始前に細胞を融合するまで増殖させ、その後播種し、培地で 2 倍に希釈し、その後 2 4 ウェルプレートに加えた (約 6 0 0 0 0 細胞 / ウェル) 。

【 0 0 6 8 】

カーゴ送達効率の高処理量スクリーニング (H T S)

C P P - S - S - カーゴ構成物 (カーゴは 2 - アミノ安息香酸フルオロフォアで標識化され、 C P P は 2 - ニトロトリプシン消光剤で標識化されている) を使用することによって、還元性細胞内メジウムに起因するジスルフィド結合の細胞内分解、および目に見える蛍光の増加による前記構成物の細胞内取り込みを実時間でモニターすることができる。

【 0 0 6 9 】

懸濁細胞または付着細胞内のペプチド取り込みおよび流出の研究

細胞をトリプシン (インビトロゲン、 スイス) で分離し、 培養培地に溶解し、 遠心分離した (1 0 0 0 × g 、 室温で 1 0 分間) 。 細胞を再懸濁し、 計数し、 その一部を 3 0 0 0 0 0 細胞 / チューブの割合で氷上の H K R 中に取った。 A b z - 標識化ペプチドを懸濁細胞と共に、 3 7 度の水浴中で振とうしながら 1 5 および 3 0 分間インキュベートした。 取り込みまたは流出を停止するために、 トリプシン溶液を 3 分間加えた。 細胞を 4 度、 1 0 0 × g 、 1 0 分間回転した。 ペレットを H K R 中に再懸濁して蛍光を検出し、 または流出サンプルでは再び無ペプチド H K R と共にインキュベートした。 蛍光をスペクトラマックス・ジェミニ X S (モレキュラーデバイセス、 カリフォルニア) 上で 3 2 0 / 4 2 0 n m で読んだ。 細胞内濃度を A b z 標識化ペプチドの標準曲線から計算した。 C a c o - 2 細胞の平均細胞量を、 クールター 2 5 6 チャンネライザー (クールター・エレクトロニックス社、 カリフォルニア) を使用して測定した。 その他に、 同じアッセイの変法を使用した： 細胞を 2 4 ウェルプレートに 1 0 0 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で前日に播種した。 細胞を 5 μ M ペプチド濃度で 3 7 度 3 0 分間インキュベートした。 トリプシン処理し、 洗浄し、 塩酸中で溶解した。 蛍光を懸濁アッセイについて記載したように測定した。

【 0 0 7 0 】

材料および方法

細胞

ヒトメラノーマ細胞 B o w e s を標準細胞培養法を使用して M E M に培養し、 実験を行う前の日に 2 4 ウェルプレートに 1 0 0 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で播種した。

【 0 0 7 1 】

結果および検討

表4 30分間、37°Cで5 μMの濃度で添加した場合の、ボーウ細胞へ侵入する種々のCPPsの能力を定量的測定を示す例

フルオレセニルペプチド	細胞ライセートに添加したフルオレセンの%
ペネトラクチン	10.5
pVEC	4.6
YTA-2ps	3.5
LRSW-3	1.9
TP10	1.8
LRSW-1	1.4

表4はペプチドが実際に細胞侵入ペプチドであることを証明するための好ましい方法から得たデータを示す：懸濁細胞または付着細胞におけるペプチド取り込みおよび流出研究（以下を参照されたい）。これまでに約50のペプチドをスクリーニングした。陰性対照では膜非侵入性糖ポリマーであるフルオレセイニル・デキストランと同じやり方で細胞に加える。デキストランの細胞溶解物に認められたパーセンテージは常に0.5%未満である。YTA-2ps、LRSW-1およびLRSW-3は新たに設計された人工ペプチドの例である。

【0072】

実施例2

基質金属プロテイナーゼ-2（MMP-2）のYTA-2psの特異的切断の測定法；上に、そして図10に示したように、発明者らは選択的CPP（YTA-2）のCPP部分が37でも4でも細胞に効率よく入ることを示した（データは示されず）。それに加えて“インアクチベータ”は細胞膜を介する転位に関してペプチドをより不活性にした。この方法の開発における次の工程は活性MMP-2によるYTA-2psの特異的切断をチェックすることである。それは蛍光／消光剤アッセイによって行われる。ここではMMP-2基質YTA-2psは切断で蛍光強度を高める。正しい切断は質量分析によってさらにチェックされる。

【0073】

実施例3

材料および方法

TP10およびYTA-2の合成および精製

上記ペプチド類をパーキン・エルマー／アプライド・ビオシステム社、431A型ペプチド合成器で、既述のプロトコルによるt-Boc戦略を用いて段階的に合成した（ランゲル、ランドラ、1992）。システインまたはグルタミン酸を手動で結合させた。TP10配列はブーガ、1998、FASEB.J.に与えられている（配列番号2）。YTA-2配列は表2に与えられ、配列番号3として記載されている。あらかじめペプチド類をPEIに結合させ、それらを逆相HPLC（ギンコテク（Gynkotek））C18カラム上で、ACN/H₂O勾配で精製し、MALDI-TOF質量分析計（アプライド・ビオシステム社、Voyager STR型）を用いて分析した。得られた質量値は計算値と一致した。

【0074】

細胞培養

ネズミ線維芽細胞C3H 10T1/2、マウス神経芽細胞腫N2A細胞およびCOS-7細胞を10cmペトリ皿中で、10%ウシ胎児血清（FCS）、2mM L-グルタミン、100U/mlベニシリンおよび0.1mg/mlストレプトマイシンを補充したダルベッコ改良イーグル培地（DMEM）に増殖させた。細胞を播種し、5日目ごとに培養しなおした。播種したときにCOS-7および10T1/2細胞をトリプシン化し、そ

の一方でN 2 A細胞を、それら細胞に培地を加えることによって機械的に懸濁した。実験開始前に、細胞を融合するまで増殖させ、その後播種し、培地で2倍に薄め、その後24ウェルプレートに加えた(約60000細胞/ウェル)。

【0075】

実施例4

s e l C P P

序文

基質金属プロテアーゼ類(MMPs)はZn²⁺金属エンドペプチダーゼ類である。このファミリは膜結合メンバーおよび分泌メンバーの両方を含む。その両方共細胞質膜上または細胞外基質(ECM)内のどちらかに局在する蛋白質類の分解を触媒する(スタンリヒト-01)。

【0076】

MMPsはECMを分解できるので、MMPsは細胞の移動、再形成および炎症性反応に影響を与える。しかしこれらの酵素は侵襲性および炎症性疾患、例えば癌、リウマチ性関節炎、多発性硬化症および細菌性髄膜炎などの基礎的原因にも関係する(レッパート-01)。

【0077】

転移や血管新生などの侵襲性プロセスの一つの特徴は、通常は細胞移動に対する物理的障壁であるECMおよび基底膜の分解である。MMPsは種々様々の悪性腫瘍の侵襲性および転移性拳動に関連しており、これらの酵素は種々の腫瘍に過剰発現するのが普通である(スタンリヒト-01、ロザノフ-01)。異なるMMPsの数が腫瘍の進行につれて増加し(ヘキストラ-01)、ある種の腫瘍の侵襲力と相関関係にある(ホーンベック-01)ことが見いだされている。さらに、MMPsの発現はトランスジェニックマウスの転移腫瘍数と相関関係にある(ストレンリヒト-01)。

【0078】

MMP-MT1のような膜型MMPs(MT-MMP)は発癌に密接に関係している。これらの酵素は侵襲先端に局在する。可溶性MMPs1-3および9も腫瘍発生のアゴニストとして関係している(ロザノフ-01およびナベシマ-02)。MMP-MT1は血管形成中の内皮細胞の誘導および移動中にもアップレギュレートする(ガルヴェズ-01)。その上、MMP-MT1(またはMMP14とも呼ばれる)はその"シェダーゼ(shedase)"活性によるproMMP-2の活性化に関係し、それによって侵襲先端にMMP-2を放出する(ソンニ-02)。MMP-2は腫瘍血管新生に重要な役割を有するようにみえる(チェン-01)。

【0079】

s e l C P P s

選択的CPPsの概念はMMPs酵素活性の組織特異性に基づく。

アプローチはCPPをガラニンのような任意の受容体リガンドに結合することによって、エンドサイトシス取り込みを用いてそのCPPの特異性および活性化を調べることである。

【0080】

表5 s e l C P P s の配列

名称	配列	取り込み	細胞内
YTA-2 SelCPP1 (配列番号3)	ビオチン-YTAIAWVKA FIRKLRK-アミド	+++	Lovo, b 末端, Caco
YTA2-ps	ビオチン-SGESLAY- YTAIAWVKA FIRKLRK-アミド (配列番号4)	+	Lovo, b 末端, Caco
LRSW-1	LRSWVISRSIRKAA-アミド (配列番号5)	nd	合成
LRSW-2	LRSWIRRLIKAWKS-アミド (配列番号6)	nd	合成
LRSW-3	LRSWRVII RNGQR-アミド (配列番号7)	nd	合成
SelCPP2 (図7)	coum-DEEQERSEN- IRQIKIWFQNRRMKWK*K-アミド (配列番号13)	++	b 末端, Caco, SHS5Y

* フルオレセン標識 (IRQIKIWFQNRRMKWKK = 配列番号20)

【0081】

MMP活性化 s e l C P P

典型的s e l C P P (図8)は3つの部分、すなわちトランスポータ (C P P)、特異的プロテアーゼ部位およびインアクチベータから作られる。インアクチベータはC P Pを不活性化するために付加され、インアクチベータが切り離される前にはそれが細胞に入ることができないようにする。C P Pはトキシン、例えば公知の非侵入性細胞増殖停止物質および/または細胞傷害物質を担う。諸配列の好ましい実施形態およびペプチド類の標識化については表5を参照されたい。

【0082】

上記の概念は次の3つの基礎的機能に基づく: a) MMP-2またはMMP-MT1による選択的切断(およびそれによる活性化)、b) トキシンを担うペプチド(C P P)による細胞侵入およびそれによるc) 近くの、好ましくは腫瘍細胞または、腫瘍血管新生に含まれる内皮の死滅(略図が図8に示される)。

【0083】

上記の概念を証明する例証的例として、発明者らは選択的C P P (YTA-2)のC P P部分が37(図10及び11)および4(データは示されず)の両方において細胞に効率的に侵入できることを証明することに成功した。その上“インアクチベータ”(図9参照)は細胞膜を転位する際のペプチドをより不活性にする。MMP2によるYTA-2の正しい切断も質量分析によって確認されている(データは示されず)。細胞増殖停止物質および/または細胞傷害物質(MTX)のC P P-部分への付着および効率は実施例5を参照されたい。

【0084】

MMP14(またはMMP-MT1)の切断のための新しい配列が4種類ある: LRSW1-3およびpenMMP14。後者はMMP14を発現する細胞(BowesおよびCaco-2)に取り込まれることが証明されている。図7を参照されたい。

【0085】

それに加えて、67kDa蛋白質蛍光標識化ストレプトアビシンは、ビオチニル化Y T

A-2に結合したとき、陷入した（図2-1および2-2を参照）。これは、YTA-2が大きいカーゴ分子を細胞内に運搬できることを示す。

【0086】

表6 研究室の細胞株での MMP 2 及び MMP 14 の発現

細胞	MMP 2 発現 (実験)	MMP 14 発現 (文献)
Caco-2	-	+
Lovo	-	+
SHS5Y	+ (不活性に遊離)	未決定
Bowes	+ (不活性に遊離)	+
PC 12	+ (不活性に遊離)	未決定
Rinm5F	-	未決定

これまでに取り込みを試験した全ての *se1CPP* を質量分析で確認する。さらに細胞培養培地および細胞溶解物中の安定性を測定する。さらに、これらのペプチドの選択性をインピトロ細胞アッセイで、例えば CPP 部分の活性化のためのプロテアーゼを発現しない細胞と混合した選択的にプロテアーゼを発現する細胞で試験する（表6）。

【0087】

実施例5

細胞内薬剤送達の実施例：

メトトレキセートおよび細胞侵入ペプチド (MTX- CPP) の結合物

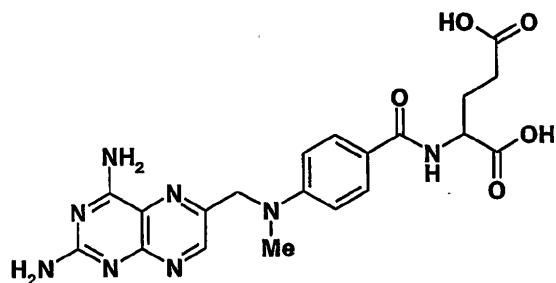
序文

メトトレキセート (MTX) は細胞傷害性薬剤であり、悪性腫瘍の治療のために開発されたものであるが、現在は乾癬のような自己免疫病の治療に使用されている。MTXは葉酸拮抗物質（式1）であり、葉酸トランスポータによって細胞に入る。MTXの標的は葉酸要求酵素である。

乾癬治療におけるMTXの使用は、全身投与時のその副作用によって抑制される。最も重大な副作用は肝毒性である。そこで、MTXの局所的投与組成物が非常に好ましい。

【0088】

式1. MTXの構造



【0089】

生物学的液において、MTXは負電荷を有する分子として存在する。そのため、それは、葉酸トランスポータによってのみ細胞膜を通過することができる。本発明は先ず第一に

- 1) 容易に、かつ受容体 / 担体 - 非依存的に細胞内および皮膚内に侵入する
- 2) 乾癬の顕著な特徴であるケラチノサイト過剰増殖を抑制する
- 3) 不都合な副作用（ヒスタミン放出など）がない

M T X - C P P 結合体を生成する手段を明らかにする。

【 0 0 9 0 】

M T X - C P P 結合体は全て、固相ペプチド合成戦略を用いて合成される。これには次の 2 つの理由が考えられる：

- 1) M T X (C A S 番号 5 9 - 0 5 - 2) は 2 つの構造単位： 4 - デオキシ - 4 - アミノ - N 1 0 - メチルプロロイン酸 (A p a 、 C A S 番号 1 9 7 4 1 - 1 4 - 1) および - グルタメートに分けることができる
- 2) M T X はその - カルボキシル基上の置換に対して比較的非感受性である。

【 0 0 9 1 】

表1 M T X - C P P コンジュゲート

Apa- γ Glu-Gly-CPP
Apa-(γ Glu)2·5·Gly-CPP
Apa-Cys-S·S·Cys-CPP

表1に示すように、数種の M T X - C P P 結合体が設計される。上記結合体の C P P 部分は細胞内で分解すると予想される。

【 0 0 9 2 】

M T X - C P P 結合物の固相合成

M T X は B o c 化学作用の標準的切断条件のもとでは不安定であるため、 F m o s - 化学作用を使用した (フッ化水素、 0 、 3 0 分) 。 F m o c - G l u - O t B u と A p a との結合は標準カップリング法 (H O B t / T B T U) を使用して行われた。結合物を試薬 K (8 2 . 5 % T F A : 5 % フェノール : 5 % チオアニソール : 2 . 5 % 1 , 2 - エタンジチオール) を用いて樹脂から切り離した。

【 0 0 9 3 】

細胞培養物

全ての細胞は 3 7 で 5 % C O 2 中で培養された。プラスチック実験器具はコーニング社 (アクトン、 M A) から入手した。ヒト新生児表皮ケラチノサイト (H E K n) 、全ての増殖培地の成分および、その増殖のために必要なトリプシン化試薬はカスケード・バイオロジックス (商標) (ポートランド、オレゴン) から入手した。 H E K n 細胞を、ヒトケラチノサイト増殖補充キット (H K G S) およびペニシリン、ストレプトマイシンおよびアンフォテリシン B を補充したエピライフ (E p i l i f e) (商標) 培地に培養した。 H E K n 細胞を 1 週間に一度分割し、 T 7 5 あたり 3 0 0 0 0 0 細胞を播種した。増殖培地を 1 ~ 2 日ごとに交換した。

【 0 0 9 4 】

B o w e s ヒトメラノーマ細胞をアメリカ培養コレクション (マナッサス、 V A) から得た。 B o w e s 細胞を、グルタマックス - I 、非必須アミノ酸、ピルビン酸、ペニシリン、ストレプトマイシン (図には " M E M " として示される) および 1 0 % ウシ胎児血清 (F B S) を補充したイーグル最小必須培地に培養した。 B o w e s 細胞のための全ての培地成分はインビトロゲン・コーポレーション (ペイスリー、英国) からのものであった。トリプシン / E D T A は P A A ラボラトリーズ社 (リンツ、オーストリア) からのものであった。細胞を 1 週間に 1 回継代培養し、 T 7 5 あたり 2 0 0 0 0 0 細胞を播種した。生育性のアッセイでは、実験前日に、 2 4 ウエルプレートに 1 ウエルにつき 5 0 0 0 0 細胞 (3 0 0 μ l 中) を播種した。

【 0 0 9 5 】

K 5 6 2 ヒト赤白血病細胞をアメリカ培養コレクション (マナッサス、 V A) から入手した。 K 5 6 2 細胞をグルタマックス - I 、ペニシリン、ストレプトマイシン (図 1 4 ~

図17には“RPMI”として示される)およびウシ胎児血清(7.5%)を補充したP
R M I - 1 6 4 0 培地に培養した。K 5 6 2 のための全ての培地成分はインビトロゲン・
コーポレーション(ペイスリー、英国)から入手した。トリプシン/EDTAはPAAラ
ボラトリーズ社(リンツ、オーストリア)からのものであった。細胞を2日目または3日
目(そのとき細胞密度は1 0 0 0 0 0 0 細胞/m¹に達した)ごとに継代培養し、1 0 0
0 0 0 細胞/m¹を播種した。生育性を試験するためには24ウェル・プレートに1ウェ
ルにつき3 0 0 0 0 細胞/3 0 0 μ lを播種した。

【0096】

細胞の生育性の測定

結合物のストック溶液(1 mM)を滅菌水で調製し、MTXのストック溶液を10%D
MSO水溶液で調製した。曝露のために、薬剤を曝露培地(無血清OPTIMEMまたは
MEM中1%FBSまたはMEM中10%FBSまたはRPMI中7.5%FBS)で希
釀し、所望濃度(Bowes細胞の場合)または10×最終濃度(K562細胞の場合)
にした。1ウェルにつき、それぞれの曝露混合物300 μ l(Bowesの場合)または
30 μ l(K562の場合)を使用した。Bowes細胞を使用するいくつかの実験で、
曝露混合物を2時間後に除去し、あらかじめ温めた薬剤不含有曝露培地に代えた。1~2
日後、細胞の生育性をセルタイタ・グロ(CellTiter-Glo)(商標)ルミネ
セント細胞生育性アッセイ(プロメガ、マディソン、ウィスコンシン)を使用して試験した。
プレートを室温で平衡化した(約30分間)。セルタイタ・グロ(商標)試薬300
 μ lを各ウェルに付加し、10分間インキュベートした。300 μ lを白色ポリスチレン
製フルオロヌンク(FluororNunc)(商標)プレート(ヌンクA/S、ロスカイ
ルド、デンマーク)に移し、ルミネセンスを二重走査ミクロプレート・スペクトロフルオ
ロメータ(SPECTRAMax(商標)GEMINI XS、モレキュラー・デバイセ
ス、サニーベイル、カリホルニア)で記録した。

【0097】

結果

これまでに得られた結果は、CPPへのMTXの結合はCPPの細胞侵入性を破壊しないことを明らかに示した(図13にはApaa-Glu-Gly-Evo165がヒト上皮ケラチノサイトに侵入することが示される)。(Evo165のアミノ酸配列は配列番号14(31925)から明らかで、変異体Evo165b~Evo165fは配列番号15~19(31925~31930)から明らかである)。また発明者らは、CPPへのMTXの結合がMTXの毒性作用を破壊しないことも見いだした。MTXの-カルボキシル基はMTXの-カルボキシル基よりもCPPへの結合に適していることに注目されたい(図14に見られるように、Apaa-Glu-Gly-pVECはApaa-Glu-Gly-pVECより毒性が大きいことが証明されている)。さらに言えることは、これまでに試験された全ての結合物によって例示されるように、種々の異なるCPPsがMTX-CPP結合物において有用であることである:図14のApaa-Glu-Gly-pVEC、図16のApaa-Glu-Gly-Evo165および図16および図17のApaa-Glu-Gly-YTA2。

【0098】

実施例6

CPPを使用するsiRNA取り込みの改善

近年、小さい干渉RNAが、哺乳動物細胞における遺伝子発現を調節する高い選択能
力のために多くの注目を集めている。siRNAは、RNA誘導性サイレンシング複合体
(RISC)の活性化によってそれらの相補的mRNAの特異的切断を誘起する二本鎖RNAの短い鎖(約20bp)である。RNA誘導性サイレンシングは内性メカニズムであるが、合成によって合成されたsiRNAはインビトロでもインビトロでも同じ効果を有す
ることが示された。

【0099】

残念ながらsiRNAを使用する際の典型的問題は、細胞への取り込み率が低いこと

である。本発明による細胞侵入ペプチド(CPP)を合成的に合成した siRNA に結合することによって、発明者らはインビトロおよびインビボの両方で細胞内取り込みを改善することができた。

【 0100 】

CPP トランスポータン 10 (Tp 10) がジスルフィド - リンカーを介して結合しているガラニン受容体 - 1 (GALR - 1) mRNA に対して、 siRNA が設計された。その CPP の特性は、 siRNA の細胞内取り込みを高め、それによって siRNA を薬物的使用により適したものにすることが判明した。図 21 に、その作用メカニズムの略図が与えられる。

【 0101 】

材料および方法 :

Bowes 細胞を 24 ウエルプレートで一晩増殖させた (100000 細胞 / ウエル) 。それら細胞を 200 μ l の 1 μ M 蛍光標識ペプチド (pVEC) 、または蛍光標識した siRNA - ペプチド (図 19 による) で 37 度 30 分間処理した。細胞を 3 倍希釈の標準トリプシン / EDTA にさらし、外側細胞膜にくっついた全てのペプチドを除去した。細胞をその後 0.1 % トリトン - X で溶解し、スペクトロマックス・ゲメニ XS (spectromax Gemini XS) 蛍光リーダを使用してペプチド / siRNA の取り込みを測定した。

【 0102 】

結果 :

図 19 からわかるように、結合していない siRNA に比較して、 CPP - 結合 DNA (siRNA) の取り込みには明らかな差が認められた。取り込みは細胞侵入ペプチドによる膜の破壊によるものではなかった。さらに、非結合の pVEC および siRNA の混合物は細胞内に陷入しなかった。

当業者には公知のように、 siRNA は細胞内で低濃度 (pM レベル以下) でも良い効率を有したから、この取り込みは標的 mRNA の siRNA 媒介性分解を十分活性化する可能性があると考えられる。

【 0103 】

実施例 7

生体活性細胞侵入ペプチドを特徴づける一般的方法

トランスウェル (商標) 実験

ヒト結腸癌細胞系 Caco - 2 (ATCC via LGC 、スエーデン) を 10 % ウシ胎児血清、ピルビン酸ナトリウム 1 mM 、非必須アミノ酸 1 × 100 、 100U / ml ペニシリンおよび 100 μ g / ml ストレプトマイシンを補充した、グルタマックス (インビトロゲン、スエーデン) を含むダルベッコ改良必須培地に、 5 % CO₂ を富化した空気中で 37 度増殖させた。

【 0104 】

トランスウェル (商標) 透明カップ (0.4 μ m 孔、コーニング・コスタ、オランダ) にウシ血漿フィブロネクチン 0.5 μ g / ml (インビトロゲン、スエーデン) を塗布した。 100000 Caco - 2 細胞を 12 ウエル トランスウェル (商標) (1.13 cm² フィルタ面積) の各カップに播種し、少なくとも 10 日間培養した。下方 (1.5 ml) および上方 (0.5 ml) チェンバ両方の培地を 2 ~ 3 日ごとに交換した。細胞融合を位相差顕微鏡で検査し、ミリセル - ERS (ミリポア、スエーデン) で、交流を使用して TEEER を測定した。細胞層侵入性の対照として、 FITC 標識デキストラン 4,4 kDa (シグマ - アルドリッヒ、スエーデン) の通過を、 10 mM EGTA 処理を行って、または行わずに測定した。ペプチド類の添加前、下方ウェルの培地を HEPES 干渉クレブス - リンゲル溶液 (HKR) に取り替えた。実験を開始する前に抵抗は 600 / cm² に達したので、 500 を超える数値は高抵抗と考えられる。

【 0105 】

磷酸緩衝食塩液 (PBS) に溶解した 10 μ M 濃度のホルオロフォア標識ペプチドを上

方トランスウェル（商標）チェンバに加えた。各時点に、 $150\mu\text{l}$ サンプルを下方チェンバから集め、蛍光をスペクトロマックス・ゲミニXS（モレキュラーデバイス、カリホルニア）を用いて $320/420\text{nm}$ （Abz）および $492/520\text{nm}$ （フルオレセイン）で測定した。

【0106】

細胞侵入研究および蛍光顕微鏡

細胞を 24-ウェルプレート 中の丸いガラスカバースリップ（ 12mm 、GTF、スエーデン）上に約50%融合するまで増殖させた。培地を無血清培地に代え、ビオチニル化ペプチド溶液を加えた。細胞を37または4で30分間インキュベートした。細胞をPBSで2回洗い、4%パラホルムアルデヒド溶液で室温で（暗所）15分間固定し、その後 0.5w/v トリトンX-100を含む 30mM HEPES緩衝液中で氷上で3分間、浸透性にした。非特異的結合部位を3%（w/v）ウシ血清アルブミンを含むPBS中で4で一晩ブロックした。ペプチド類をアビジン-FITCまたはストレプトアビジン-TRITC（モレキュラープローブス、オランダ）で染めることによって可視化した。細胞核をヘキスト33258（ $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）で5分間染色し、その後カバースリップをPBSで3回洗い、PBS中25%グリセロール中に固定する。画像をライカ（Leica）DMIRE2蛍光顕微鏡（ライカ・マイクロシステム、スエーデン）でとり、フォトショップ（Photoshop）6.0ソフトウェア（アドープシステムズ社（Adobe Systems）、カリホルニア）で処理した（図20～図22などを参照されたい）。

【0107】

懸濁細胞におけるペプチドの取り込みおよび流出の研究

細胞をトリプシン（インピトロゲン、スエーデン）で脱着し、培養培地に溶解し、遠心分離した（ $1000\times g$ 、10分間、室温）。細胞を再懸濁し、数え、氷上のHKR中に 300000 細胞/チューブづつ取り分けた。Abz標識化ペプチドを懸濁液中の細胞と一緒に37で15分間および30分間振とうしながらインキュベートした。取り込みまたは流出を停止するために、トリプシン溶液を3分間加えた。細胞を $1000\times g$ で4で10分間スピンドウンした。蛍光検出のためにペレットをHKRに再懸濁し、または流出サンプルで、無ペプチドHKRと共に再びインキュベートした。蛍光をスペクトロマックス・ゲミニXS（モレキュラーデバイス、カリホルニア）で $320/420\text{nm}$ で読んだ。細胞内濃度をAbz-標識ペプチドの標準曲線から計算した。Caco-2細胞の平均細胞容量をクールター256チャネライザー（クールタ・エレクトロニックス社、カリホルニア）を使用して測定した。

【0108】

質量分析により検出されるペプチドの分解/細胞内取り込み

35mm 細胞培養皿における8%融合細胞を、種々の時点において、無血清培地に溶解した $10\mu\text{M}$ ペプチドで処理した。細胞をPBSで3回洗い、細胞を氷上で 0.1HCl で15分間処理することによって細胞溶解物を調製した。溶解物を 13000g で5分間遠心分離し、凍結した。充填する前に、それらのサンプルをC18 Zip Tipカラム（ミリポア、スエーデン）を用いて精製し、その後Voyager-DR STR装置で分析した（アプライド・ビオシステムズ、フラミンガム）。

【0109】

膜侵害アッセイ

2-デオキシグルコース・アッセイ

細胞を 12-ウェルプレート に播種し、播種の5日後に実験に使用した。先ず最初に、2-デオキシ-D-[1-3H]-グルコースの $0.5\mu\text{Ci}$ を無糖緩衝液中で各ウェル（アマーシャム・ファルマシア・ビオテク、英国）に加えた。37で20分間インキュベーション後、ペプチドを無血清培地に加え、最終濃度5、10および $20\mu\text{M}$ にした。陽性対照として、細胞をPBS中1%トリトンX-100で処理した（漏出の上限を確認するため）。1、5、15および30分に、 $150\mu\text{l}$ 培地サンプルを集め、エマルジファ

イアセーフ・シンチレーション・カクテル（パッカード、オランダ）を加え、放射能をパッカード3255液体シンチレーションカウンタで測定した。各ウェルからの相対的放射性流出を未処理細胞のパーセンテージとして計算した。

【0110】

ラクテート・デヒドロゲナーゼ・アッセイ

ラクテート・デヒドロゲナーゼ漏出を、プロメガ社（プロメガ、マジソン、ウィスconsin）の CycloTox-ONE（商標）ホメオゲナス・メンプラン・インテグリティ・（Homeogeneous Membrane Integrity）アッセイを用いて試験し、メーカーの説明書によってラクテート・デヒドロゲナーゼ活性を計算した。

【0111】

ヒスタミン放出アッセイ

細胞培養

RBL-2H3細胞をアメリカ培養コレクション（マナッサス、ヴァージニア）から入手した。細胞を、グルタマックス-I、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび加熱不活性化ウシ胎児血清（10%）を補充したイーグル最小必須培地に培養した。全培地成分はインビトロゲン・コーポレーション（ペイスリー、英国）から得た。トリプシン/EDTAはPAAラボラトリーズ社（リンツ、オーストリア）から得た。細胞を1週間に2回分割し、T75あたり約1.2百万個の細胞を播種した。ヒスタミン放出アッセイでは、実験の前日に、24ウェル-プレートに1ウェルごとに125000~250000個の細胞（1ml中）を播種した。

【0112】

ヒスタミン放出

次の溶液を使用した：アッセイ緩衝液（10mM HEPES、140mM NaCl、5mM KCl、0.6mM MgCl₂、1mM CaCl₂、5.5mM グルコース、pH 7.4）、1M NaOH、10mg/ml o-フタルジアルデヒド（OPT）-メタノール溶液、3M HClおよび0.1%トリトンX-100。全ての化学物質はシグマ-アルドリッヒ（セントルイス、マサチューセッツ）からのものである。1mMペプチド保存溶液を水で調製し、アッセイ緩衝液を使用してさらに希釈した。細胞をアッセイ緩衝液で2回洗い、その後ペプチドをアッセイ緩衝液300μlに所望濃度で加えた。総細胞ヒスタミンを測定するために、幾つかのウェルを0.1%トリトンX-100にさらした。37度20分間インキュベートした後、曝露培地を1.5mlポリプロピレンチューブに移し、短時間遠心分離した（2分間、3000rpm）。

【0113】

OPTを使用するヒスタミン測定

OPTはシグマ-アルドリッヒ社、セントルイス、ミズーリ州、から入手した。上澄液200μlを黒色未処理マイクロウェル-プレート（NUNC）に移し、40μlの1M NaOHおよび10μlのOPT溶液を加え、4分間振とうすることによってヒスタミンを測定した。反応を停止するために、20μlの3M HClを加えた。30秒後、蛍光強度を355nm励起フィルタおよび455nm発光フィルタを使用して測定した（SPEKTRAMAX（商標）GEMINI XS、モレキュラデバイス、サニーベイル、カリホルニア）。放出されたヒスタミンを総細胞ヒスタミンのパーセンテージとしてあらわした。

【0114】

ELISAを使用するヒスタミン測定

ヒスタミン用のELISAキットはIBL社（ハンブルグ、ドイツ）から入手した。アッセイはメーカーの説明書にしたがって実施した。吸光度測定はASYSHiith社（ユーゲンドルフ、オーストリア）からのディジスキャン（Digi-scan）・マイクロプレート・リーダーを使用して行った。

【0115】

文献リスト

1. Lindgren, M., Hallbrink, M. , Prochiantz, A. & Langel, U. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 21,99-103 (2000).
2. Derossi, D. , Chassaing, G. & Prochiantz, A. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell. Biol.* 8,84-87 (1998).
3. Derossi, D., Joliot, A. H. , Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269,10444-10450 (1994).
4. Prochiantz, A. Homeodomain-derived peptides. In and out of the cells. *Ann N Y Acad Sci* 886,172-9 (1999).
5. Sandberg, M. , Eriksson,L.,Jonsson, J., Sjostrom, M. & Wold, S. New chemical descriptors relevant for the design of biologically active peptides. A multivariate characterization of 87 amino acids. *J. Med. Chem.* 41,2481-2491 (1998).
6. Altschul,S. F. , Gish, W., Miller, W. , Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment searchtool. *J Mol Biol* 215,403-10. (1990).
7. Ma, H. & Diamond, S. L. Nonviral gene therapy and its delivery systems. *Curr PharmBiotechnol* 2,1-17. (2001).
8. Garnett, M. C. Gene-delivery systems using cationic polymers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 16,147-207 (1999).
9. Somiari, S. et al. Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* 2,178-87. (2000).
10. Lee,R. J. & Huang, L. Lipidic vector systems for gene transfer. *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* 14,173-206 (1997).
11. Ropert, C. Liposomes as a gene delivery system. *Braz J Med Biol Res* 32,163-9. (1999).
12. Luo, D. & Saltzman, W. M. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nat Biotechnol* 18,893-5.
13. Feigne, P. L. et al. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* 8,511-2. (1997).
14. Gebhart, C. L. & Kabanov, A. V. Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Control Release* 73,401-16. (2001).
15. Boussif,O. et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *ProcNatl Acad Sci U S A* 92,7297-301. (1995).
16. Abdallah, B. et al. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 7,1947-54. (1996).
17. Schatzlein, A. G. Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress. *Anticancer Drugs* 12,275-304. (2001).
18. Remy-Kristensen, A., Clamme, J. P., Vuilleumier, C. , Kuhry, J. G. & Mely, Y. . Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine /DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1514,21-32. (2001).
19. Rozanov, D.V. et al. Mutation analysis of membrane type-1 matrixmetalloprote inase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys (574), the active site Glu (240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-pro teolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinomacells. *J Biol Chem* 276,25705-14. (2001).
20. Smith, L. E. , Parks, K. K. , Hasegawa, L. S. , Eastmond, D. A. & Grosovsky,

A. J.

Targeted breakage of paracentromeric heterochromatin induces chromosomal instability.

Mutagenesis 13,435-43. (1998).

21. Tang, W. et al. Development and evaluation of high throughput functional assay methods for HERG potassium channel. *J Biomol Screen* 6,325-31. (2001).

22. Hallbrink, M. et al. Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta* 1515,101-9. (2001).

23. Vidal, P. et al. Interactions of primary amphipathic vector peptides with membranes. Conformational consequences and influence on cellular localization. *J Membr Biol* 162,259-64. (1998).

24. Kilk, K. et al. Cellular internalization of a cargo complex with a novel peptide derived from the third helix of the islet-1 homeodomain. Comparison with the penetratin peptide. *Bioconjug Chem* 12,911-6. (2001).

25. Magzoub, M., Kilk, K., Eriksson, L. E., Langel, U. & Graslund, A. Interaction and structure induction of cell-penetrating peptides in the presence of phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1512,77-89. (2001).

26. Inoue, A. , Takahashi, M. , Hatta, K. , Hotta, Y. & Okamoto, H. Developmental regulation of islet-1 mRNA expression during neuronal differentiation in embryonic zebrafish. *Dev Dyn* 199,1-11. (1994).

27. Langel, U. , Land, T. & Bartfai, T. Design of chimeric peptide ligands to galanin receptors and substance P receptors. *Int J Pept Protein Res* 39,516-22. (1992).

28. McKenzie, F.R. *Signal Transduction* (Milligan,E., Ed.), Oxford University Press, Oxford, NY, Tokyo.(1992).

29. Lowry, O. H. , Rosenbrough, n. Y. , Farr, A. L. & Randall,R. J. *J.Biol. Chem.* 193,265- 275(1951).

30. Cassel, D. & Selinger, Z. (1976) 452 (2), 538-51.452, 538-551 (1976).

31. Sternlicht MD, Werb Z. , Annu Rev Cell Dev Biol 2001; 17: 463-516 How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.

32. Leppert D, Lindberg RL, Kappos L, Leib SL., *Brain Res Brain Res Rev* 2001 Oct ; 36 (2-3): 249-57Matrixmetalloproteinases : multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis.

33. Rozanov DV, Deryugina EI, Ratnikov BI, Monosov EZ, Marchenko GN, Quigley JP, Strongin AY., *J Biol Chem* 2001 Jul 13; 276 (28): 25705-14, Mutation analysis of membrane type-1 matrixmetalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys (574), the active site Glu (240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self- proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells.

34. Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J, *Oncologist* 2001 ; 6 (5): 415-27, Matrixmetalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives.

35. Hornebeck W, Emonard H, Monboisse JC, Bellon G. , *Semin Cancer Biol* 2002 Jun ; 12 (3): 231-41, Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression.

36. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T, *Pathol Int* 2002 Apr; 52 (4): 255-64

Matrixmetalloproteinases in tumour invasion: role for cell migration.

37. Galvez BG, Matias-Roman S, Albar JP, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG, *J Biol Chem* 2001 Oct 5; 276 (40): 37491-500, Membrane type 1-matrix metalloproteinase is a

ctivated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial m otility and matrix remodeling.

38. Sounni NE, Baramova EN, Munaut C, Maquoi E, Frankenne F, Foidart JM, Noel A. , IntJ Cancer 2002 Mar 1; 98(1) : 23-8, Expression of membrane type 1 matrixmetalloproteinase (MT1-MMP) in A2058 melanoma cells is associated with MMP-2 activation and increased tumour growth and vascularization.
39. Chen CC, Chen N, Lau LF. , J Biol Chem 2001 Mar 30 ; 276 (13): 10443-52, The angiogenic factorsCyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts.
40. LaakkonenP, Porkka K, Hoffman JA, Ruoslahti E, Nat Med 2002Jul ; 8 (7): 751-5, A tumour-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels.
41. Pooga M. , etal., 1998,FASEB J. 1998 Jan; 12(1) : 67-77, Cell penetration by transportan.
42. Pooga M. , etal., Nat Biotechnol. 1998 Sep; 16 (9): 857-61, Cell-penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo.
43. Moroianu J. , J. Cell Biochem, 1999, Suppl. 32-33: 76-83, Nuclear import and export pathways.
44. Dayhoff, Schwartz, and Orcutt (1978) Atlas Protein Seq. Struc. 5: 345-352
45. Henikoff and Henikoff (1992) Proc Natl Acad Sci U S A 89 (22): 10915-9.
46. Simon RJ etal., PNAS (1992) 89 (20), 9367-9371 and Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13 (4), 132-134.

【図面の簡単な説明】

【0 1 1 6】

【図1】細胞内に拘束されているs e l C P Pが、特異的受容体による認識事象によってその拘束をゆるめられ、インターナリゼーションが起きる。

【図2】キメラs e l C P Pの略図である。

【図3】非共有結合s e l C P P - A B複合体と、エピトープ配列を露出する選択された細胞とのインキュベーション。ペプチドXはA Bと細胞表面蛋白質のペプチドX配列との競合的相互作用に導く。

【図4】不活性化されたs e l C P Pの例。L o V o細胞におけるY T A - 2 (A)とY T A - 2 p s (B)とのインターナリゼーションの比較。両方とも37でT R I T Cアビジンによって検出されるビオチニル化ペプチドである。

【図5】プロテアーゼ活性化s e l C P P、フルオロフォア／クエンチャー（消滅）システムによる検出の例。基質金属プロテイナーゼ-2のY T A - 2 p sの特異的切断の確認法（M M P - 2）。

【図6】L o V o細胞（ヒト結腸癌）、37、における10 μ Mペプチドの転位。

【図7】不活性化されたs e l C P Pの別の例。B o w e s (A)および(B)およびC a c o - 2 (C)および(D)におけるP e n M M P 1 4の取り込み。左側はフルオレセイン標識化ペプチド(A)および(C)の取り込みで、左はクマリン標識(B)および(D)である。

【図8】組織-（腫瘍）選択的取り込み(b)に導く、任意の組織／器官／細胞特異的プロテアーゼを代表する基質金属プロテアーゼ(a)によるs e l C P P活性化の図式。

【図9】組織-（腫瘍）選択的取り込み(b)に導く、基質金属プロテアーゼ(a)によるs e l C P P活性化の図式。

【図10】ヒト結腸腺癌、L o V o細胞におけるビオチニル化Y T A - 2のインターナリゼーション。A)ストレプトアビジン-F I T Cで検出 B)ヘキストによる核染色を比較。

【図11】LoVo細胞におけるYTA-2ps(B)と比較したYTA-2(A)のインターナリゼーション。両方とも37℃でTRITC-アビジンによって検出された。C)およびD)はストレプトアビジンTRITCおよび核染色で検出されるCaco-2細胞中のYTA-2。

【図12】蛍光標識化ペプチド(F)の取り込み。図は加えたペプチドの取り込み%で示される。

【図13】培養ヒト上皮ケラチノサイトへのAp-a-Glu-Gly-Evo165の侵入。免疫蛍光的検出。

【図14】Bowes細胞の生育性に与える種々のMTX-pVEC結合体の影響。10%FBS-MEM中で24時間曝露。

【図15】Bowes細胞の生育性に与えるAp-a-Glu-Gly-Evo165の影響(アッセイにはCell-Titer Glo(商標)を使用)。

【図16】Bowes細胞の生育性に与えるMTX、Ap-a-Glu-Gly-YTA2およびYTA2の影響(アッセイにはCell-Titer Glo(商標)を使用)。

【図17】K562細胞生育性に与えるMTX、Ap-a-Glu-Gly-YTA2およびYTA2の影響。7.5%FBS-RPMIに2日間曝露。

【図18】ジスルフィド結合でTp10-PNAに結合したsiRNA。構成物および細胞内の理論的作用メカニズムの略図。

【図19】Bowes細胞への1μMペプチド-DNA構成物の取り込み、37℃、30分間、24ウェルプレート。

【図20】十分に研究されたCPPによる細胞侵入の例。生きているCaco-2細胞内への1μMフルオ-ペプチドのペプチドインターナリゼーション。

【図21】37℃およびT/Eにおけるフルオ-ストレプトアビジンのYTA-2による蛋白質インターナリゼーション。Cell CPPの送達特性を示す。

【図22】4℃およびT/Eによるフルオ-ストレプトアビジンのYTA-2による蛋白質インターナリゼーション。Cell CPPの送達特性および温度依存性を示す。

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

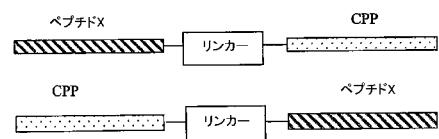
【補正方法】変更

【補正の内容】

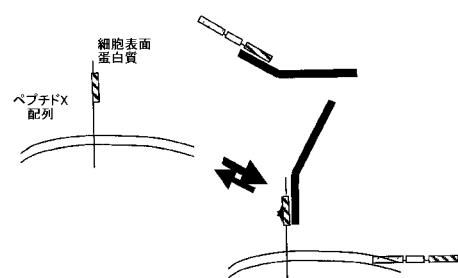
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

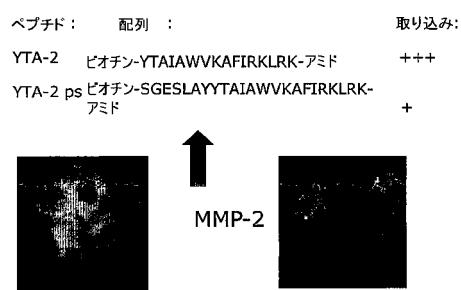


【図5】

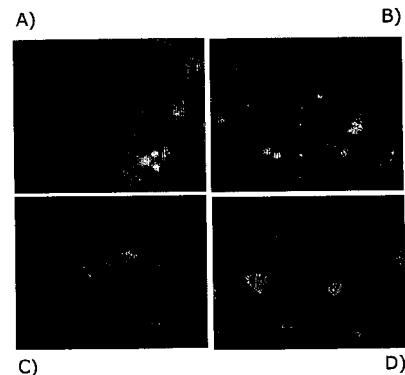


【図6】

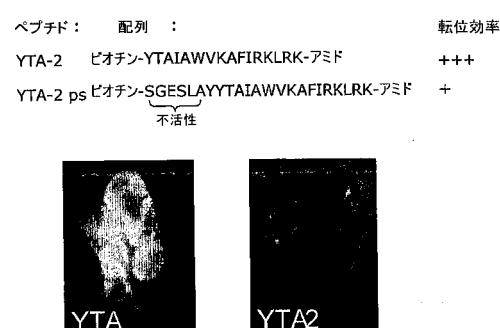
YTA-2



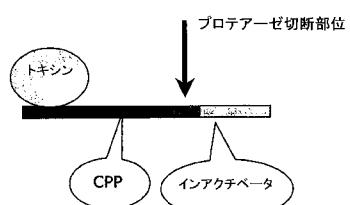
【図7】



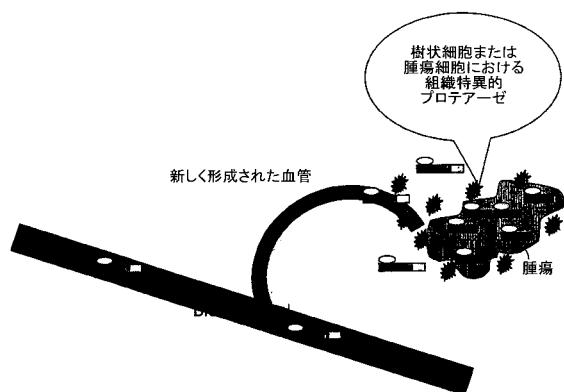
YTA-2



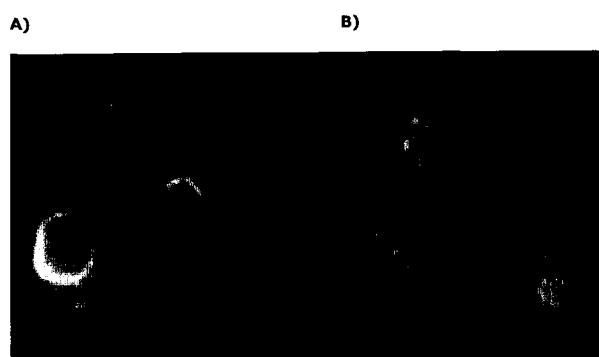
【図8】



【図9】

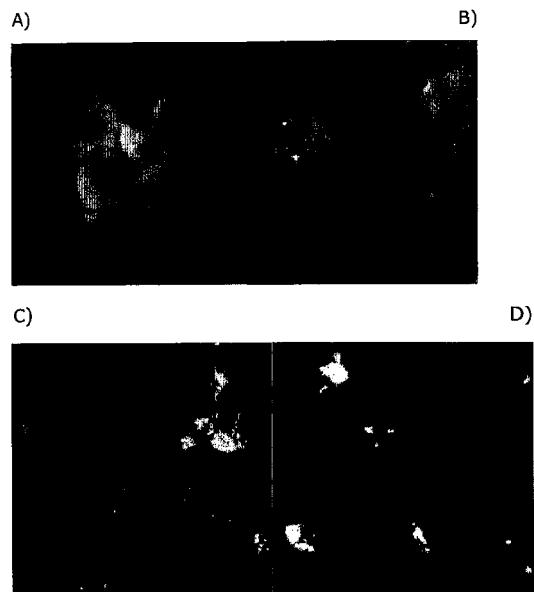


【図10】

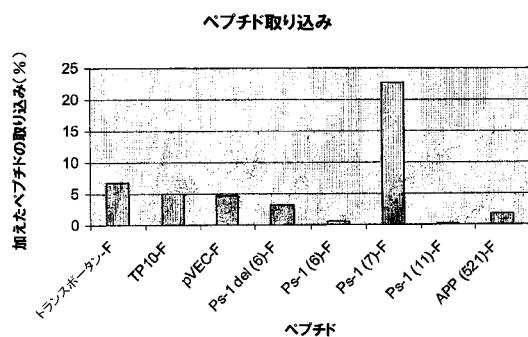


B)

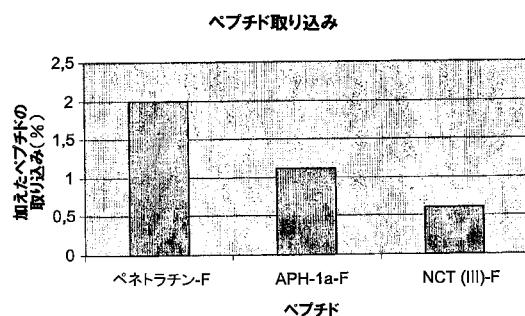
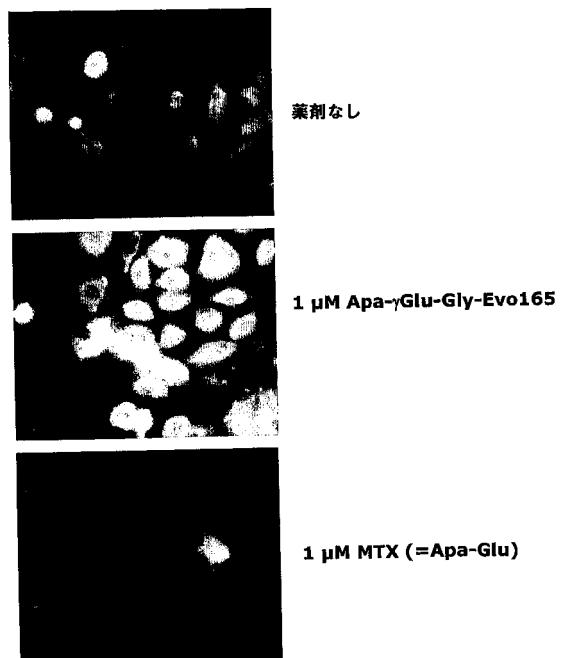
【図11】



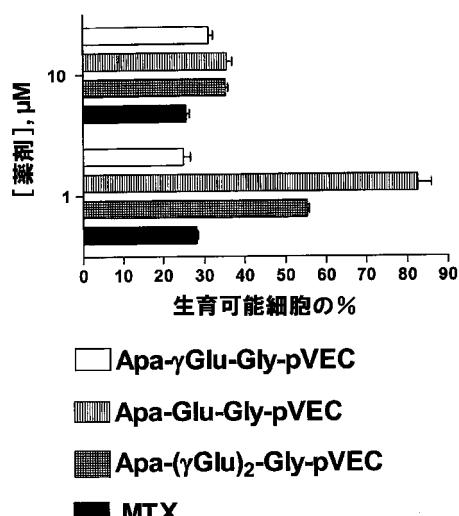
【図12】



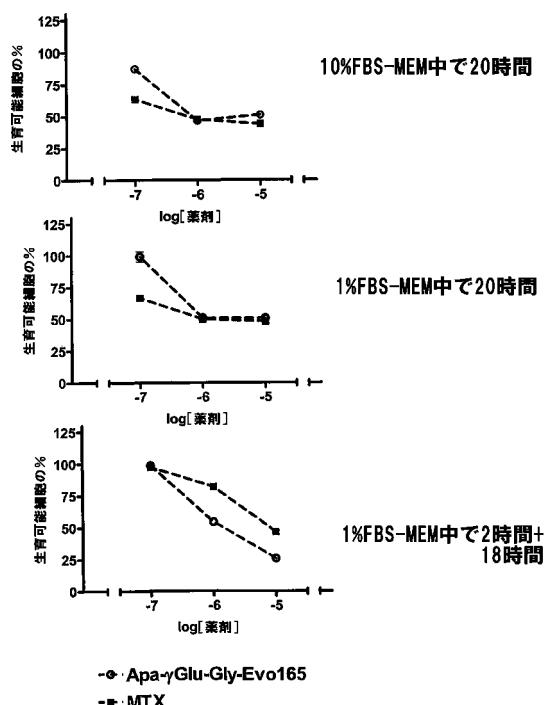
【図13】



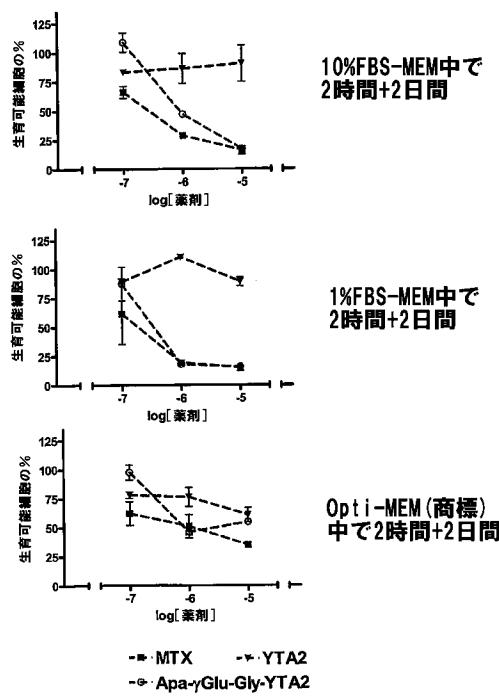
【 図 1 4 】



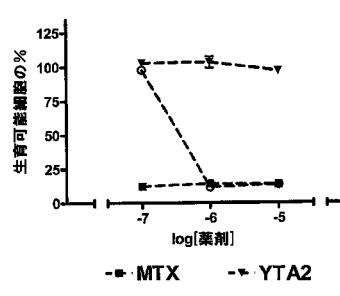
【 図 1 5 】



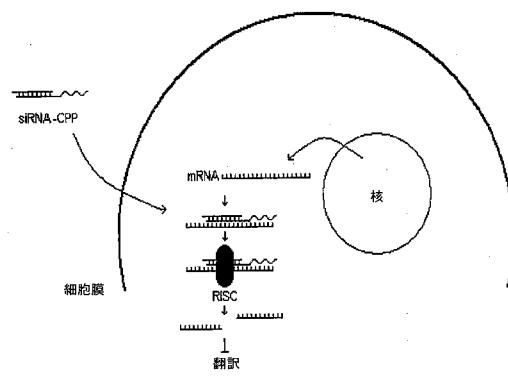
【図16】



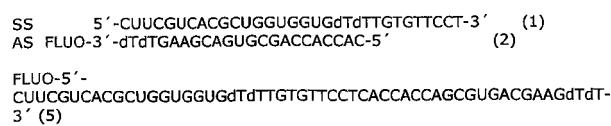
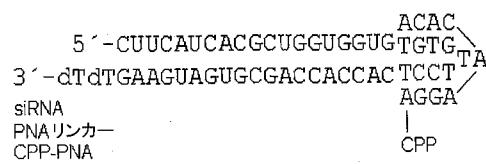
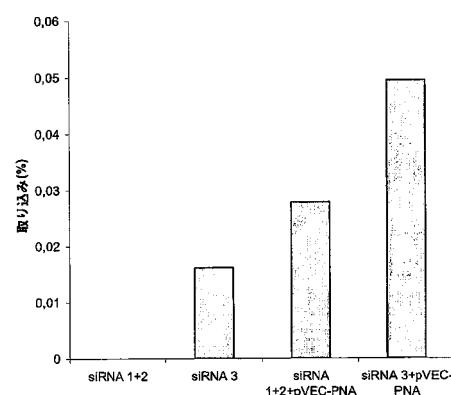
【図17】



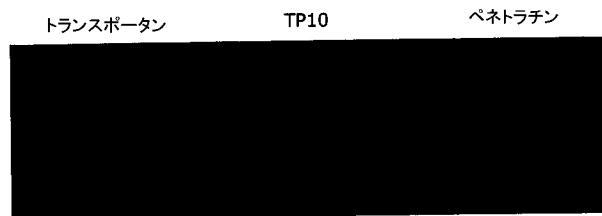
【図18】



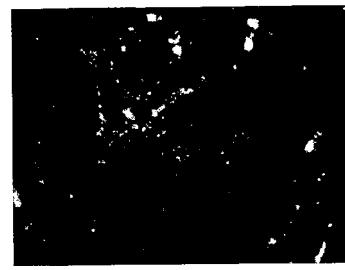
【図19】



【図20】



【図21】



【図22】

