

(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2009-502135

(P2009-502135A)

(43) 公表日 平成21年1月29日(2009.1.29)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 12 N 15/09</b> (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 02 4
<b>A 61 K 45/00</b> (2006.01)	A 61 K 45/00	4 C 07 6
<b>A 61 K 38/00</b> (2006.01)	A 61 K 37/02	4 C 08 4
<b>A 61 K 47/48</b> (2006.01)	A 61 K 47/48	4 C 08 5
<b>A 61 K 47/42</b> (2006.01)	A 61 K 47/42	4 C 08 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁)		最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2008-522923 (P2008-522923)	(71) 出願人 500106802
(86) (22) 出願日	平成18年7月19日 (2006.7.19)	ザ・ボード・オブ・トラスティーズ・オブ ・ザ・ユニバーシティ・オブ・イリノイ アメリカ合衆国、イリノイ州 61801
(85) 翻訳文提出日	平成20年3月19日 (2008.3.19)	、アーバナ、ライト・ストリート 506
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/028022	、ヘンリー・アドミニストレーション・ビ ルディング 352
(87) 國際公開番号	W02007/012004	(74) 代理人 100058479
(87) 國際公開日	平成19年1月25日 (2007.1.25)	弁理士 鈴江 武彦
(31) 優先権主張番号	60/700,297	(74) 代理人 100108855
(32) 優先日	平成17年7月19日 (2005.7.19)	弁理士 蔵田 昌俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人 100091351
(31) 優先権主張番号	11/244,105	弁理士 河野 哲
(32) 優先日	平成17年10月6日 (2005.10.6)	(74) 代理人 100088683
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 中村 誠
(31) 優先権主張番号	60/818,510	
(32) 優先日	平成18年7月6日 (2006.7.6)	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	

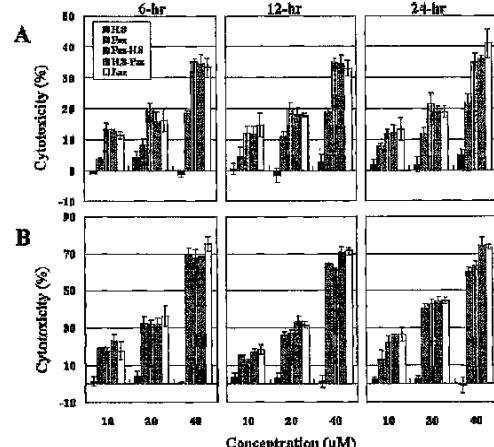
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液脳関門を越えるための、および脳癌細胞内への輸送因子、並びにその使用方法

## (57) 【要約】

本発明は、脳癌細胞内へ、および / または血液脳関門を越えて積荷化合物を送達するための方法および材料を開示する。積荷化合物の送達は、Lazなどのナイセリア外膜タンパクに由来するタンパク質輸送ペプチドを用いて達成される。また、本発明は、ペントペプチドAAEAPで構成される合成輸送ペプチドを提供する。本発明は、癌および具体的には脳癌、並びにその他の脳関連された状態を治療するための方法をさらに開示する。さらに、本発明は、癌、特に脳癌のイメージングおよび診断の方法を提供する。

【選択図】 図 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ナイセリア (Neisseria) 由来 Laz、Lip もしくは Pan 1 の変異体、誘導体または構造的同等物であり、かつ哺乳動物脳癌細胞内への、または血液脳関門を越える連結された分子の侵入を促進する単離された輸送ペプチド。

**【請求項 2】**

Laz の H.8 領域 (配列番号 24) と少なくとも 90% のアミノ酸同一性を有する、請求項 1 に記載の輸送ペプチド。

**【請求項 3】**

前記ペプチドが配列番号 24 である、請求項 1 に記載の輸送ペプチド。

10

**【請求項 4】**

前記輸送ペプチドが血流におけるペプチドの半減期を延長し、または最適化するために修飾されている、請求項 1 に記載の輸送ペプチド。

**【請求項 5】**

Ala-Ala-Glu-Ala-Pro (配列番号 25) の少なくとも 4 つの不完全なリピートまたは完全なリピートからなる領域を含み、かつ全長あたり少なくとも約 50% の AAEAP (配列番号 25) ペンタペプチドリピートを有する輸送ペプチド。

**【請求項 6】**

前記リピートの領域が同数の Ala-Ala-Glu-Ala-Pro (配列番号 25) のリピートを含むペプチドと少なくとも約 90% 同一である、請求項 5 に記載の輸送ペプチド。

20

**【請求項 7】**

合成された、請求項 5 に記載の輸送ペプチド。

**【請求項 8】**

前記輸送ペプチドが血流における前記ペプチドの半減期を延長し、または最適化するために修飾されている、請求項 5 に記載の輸送ペプチド。

**【請求項 9】**

少なくとも 1 つの積荷化合物と輸送ペプチドとを含む複合体であって、前記輸送ペプチドは、請求項 5 に記載のペプチドであり、かつ前記輸送ペプチドは、前記積荷化合物に連結されている複合体。

**【請求項 10】**

少なくとも 1 つの積荷化合物と輸送ペプチドとを含む複合体であって、前記輸送ペプチドは、請求項 1 に記載のペプチドであり、かつ前記輸送ペプチドは、積荷化合物に連結されている複合体。

30

**【請求項 11】**

前記積荷化合物がアズリン、プラスチアニン、ルスチアニン、シュードアズリン、オーラシアニンおよびアズリン様タンパク質からなる群より選択されるクプレドキシンである、請求項 10 に記載の複合体。

**【請求項 12】**

前記積荷化合物が緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) 由来アズリンである、請求項 11 に記載の複合体。

40

**【請求項 13】**

前記複合体が血流におけるペプチドの半減期を延長し、または最適化するために修飾されている、請求項 10 に記載の複合体。

**【請求項 14】**

クプレドキシンに由来する輸送ペプチドをさらに含む、請求項 10 に記載の複合体。

**【請求項 15】**

前記積荷化合物がタンパク質、リボタンパク質、多糖体、核酸、色素、微小粒子、ナノ粒子、毒素および薬物からなる群より選択される、請求項 10 に記載の複合体。

**【請求項 16】**

前記積荷化合物がタンパク質であり、かつ前記輸送ペプチドが前記積荷化合物に連結さ

50

れて融合タンパク質を形成する、請求項10に記載の複合体。

【請求項17】

前記積荷化合物が毒素である、請求項15に記載の複合体。

【請求項18】

前記積荷化合物が鬱病、情動障害、慢性痛、てんかん、アルツハイマー病、脳卒中／神経保護、脳および脊髄損傷、脳癌、脳のHIV感染症、種々の運動失調を生じる障害、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ハンチントン病、脳に影響を及ぼす小児期先天性遺伝子エラー、パーキンソン病および多発性硬化症からなる群より選択される状態の治療のための治療薬である、請求項10に記載の複合体。

【請求項19】

前記積荷化合物が検出可能な物質である、請求項10に記載の複合体。

【請求項20】

前記検出可能な物質が蛍光定量法、顕微鏡観察、X線CT、MRIおよび超音波からなる群より選択される方法によって検出可能である、請求項19に記載の複合体。

【請求項21】

薬学的に適切な担体中に請求項10に記載の複合体を含む医薬組成物。

【請求項22】

前記薬学的に許容される担体が静脈内投与に適している、請求項21に記載の医薬組成物。

【請求項23】

前記薬学的に許容される担体が脳室内注射または脳内注射に適している、請求項21に記載の医薬組成物。

【請求項24】

細胞を請求項10に記載の複合体と接触させることを含む方法。

【請求項25】

前記細胞が中枢神経系の腫瘍由来である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記細胞が星細胞腫、グリア芽細胞腫、髄膜腫、乏突起細胞腫(oligodendrolioma)、オリゴ星細胞腫、神経膠腫、上衣細胞腫、脊髄腫瘍、神経節細胞神経膠腫、神経細胞腫および髄芽腫からなる群より選択される癌細胞である、請求項24に記載の方法。

【請求項27】

癌患者を治療する方法であって、前記患者に対して治療上有効量の請求項10に記載の複合体を投与することを含む方法。

【請求項28】

前記複合体が静脈内、局所的、皮下、筋肉内および腫瘍内からなる群より選択される様式で投与される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

別の癌治療薬を同時投与することをさらに含む、請求項27に記載の方法。

【請求項30】

患者の癌のイメージングのための方法であって、前記患者に請求項19に記載の複合体を投与することと、前記患者内における積荷化合物の位置を検出することとを含む方法。

【請求項31】

前記積荷化合物がX線造影剤であり、かつ前記積荷化合物の位置がX線CTによって検出される、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記積荷化合物が磁気共鳴映像造影剤であり、かつ前記積荷化合物の位置がMRIによって検出される、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

前記積荷化合物が超音波造影剤であり、かつ前記積荷化合物の位置が超音波画像診断によって検出される、請求項30に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 3 4】**

癌を診断するための方法であって、細胞を請求項19に記載の前記複合体と接触させることと、前記積荷分子の細胞の位置を検出することとを含む方法。

**【請求項 3 5】**

請求項1に記載の輸送ペプチドを含む試薬を含むキット。

**【請求項 3 6】**

薬学的に許容される担体を含む試薬をさらに含む、請求項35に記載のキット。

**【請求項 3 7】**

前記試薬の投与のための媒体をさらに含む、請求項35に記載のキット。

**【請求項 3 8】**

請求項1に記載の輸送ペプチドをコードする核酸分子。

**【請求項 3 9】**

請求項5に記載の輸送ペプチドをコードする核酸分子。

**【請求項 4 0】**

請求項10に記載の複合体をコードする核酸分子。

**【請求項 4 1】**

脳に関連した状態をもつ患者を治療または診断するための方法であって、請求項1に記載の輸送ペプチドおよび少なくとも1つの積荷化合物を前記患者に対して同時投与することを含む方法。

**【請求項 4 2】**

クプレドキシンに由来する輸送ペプチドがさらに同時投与される、請求項41に記載の方法。

**【請求項 4 3】**

脳に関連した状態をもつ患者を治療または診断するための方法であって、請求項5に記載の輸送ペプチドおよび少なくとも1つの積荷化合物を前記患者に対して同時投与することを含む方法。

**【請求項 4 4】**

クプレドキシンに由来する輸送ペプチドがさらに同時投与される、請求項43に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【発明の開示】****【0 0 0 1】****関連出願**

本出願は、特許法 §§ 119および120の下で、2006年7月6日に出願された「Transport Agents for Crossing the Blood-Brain Barrier and into Brain Cancer Cells, and Methods of Use Thereof」の表題の米国仮特許出願第60/818,510号；2005年7月19日に出願された米国仮特許出願第60/700,297号および2005年10月6日に出願された米国特許出願第11/244,105号に対する優先権を主張する。これらの出願の全ての内容は、参照により本明細書に完全に援用される。

**【0 0 0 2】****政府対象の記載**

本出願の主題は、国立衛生研究所(NIH)、ベセズダ、メリーランド、U.S.A.からの研究助成金(助成金番号ES 04050-18)によって支援された。政府は、本発明に対して一定の権利を有し得る。

**【0 0 0 3】****背景**

脳のための新薬の開発は、体のその他の部分の新薬より非常に遅いペースで進行してきた。この遅い進行は、主に、大部分の薬物が、脳に入るための血液脳関門(BBB)を形成する脳毛細管壁を超えることができないことによるものである。高分子薬物のほぼ100%および低分子薬物の98%以上は、BBBを超えない。ほんの数種類の薬物、高脂溶性および400

10

20

30

40

50

~500ダルトン未満の分子量のみが、実際に BBB を超える。そして、 BBB を超える低分子のうち、ごくわずかな割合のみが、薬学的に有意な量で BBB を超える。( Pardridge, Molecular Innovations 3 : 90-103 (2003) )

鬱病、情動障害、慢性痛およびてんかんなどの数種類の脳の病気のみが、 BBB を超えることができる低分子薬物に反応する。アルツハイマー病、脳卒中/神経保護、脳および脊髄損傷、脳癌、脳のHIV感染症、種々の運動失調を生じる障害、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 、ハンチントン病、脳に影響を及ぼす小児期先天性遺伝子エラー、パーキンソン病および多発性硬化症などのはるかに多くの脳の病気は、従来の脂溶性の低分子量薬物に反応しない。有効な低分子薬物が利用できる脳のいくつかの病気でさえ、さらなる研究および新しくそして改善された薬物の開発を必要とする。同上。

10

#### 【 0 0 0 4 】

脳の癌は、特に治療するのが困難である。脳における癌についての一般的形態は、多形性グリア芽細胞腫 (GBM) および退形成性星細胞腫 (AA) である。GBM患者の平均の生存期間は、およそ10~12月であり、その一方で、AA患者の平均生存期間は、3~4年である。GBM患者については、外科手術により、ほんの数月だけ患者の寿命が延長する。( Kufe et al., Cancer Medicine, §§ 23 and 83 (6<sup>th</sup> ed. BC Decker, 2003) )。GBMの治療が外科手術および局部的放射線照射によるものとなる多くの場合、本来の腫瘍縁の2~4cm以内に再発を生じる。同上。

#### 【 0 0 0 5 】

BBB を超えず脳内に入らない薬物を投与するための現在のアプローチは、開頭術によるもの、すなわち頭部にドリルで穴が開けて、脳室内 (ICV) または脳内 (IC) 注射によって薬物を投与することによる方法を含む。IC投与では、針の先端の沈着部位に薬物が残る。ICV投与では、薬物は、同側脳質の上衣面に限ってのみ散布し、脳実質内に深く侵入しない。したがって、ICVおよびIC投与法は、脳体積の1%未満に到達するにすぎず、このような限定された浸透によって治療され得る脳の病気は、ほとんど存在しない。同上。

20

#### 【 0 0 0 6 】

対照的に、血管を介する薬物送達の経路は、脳のニューロンの実質的に100%を治療することができるであろう。あらゆるニューロンは、それ自体の血管によって灌流されているので、血管を介して (tranvascularly) 投与された薬物は、BBB を超えた後で、脳のあらゆるニューロンに到達することができる。しかし、薬物が BBB を超えることを可能にする薬物標的システムが存在しないので、血管を介した投与経路は、大多数の候補薬に利用できない。

30

#### 【 0 0 0 7 】

大部分の薬物およびその他の分子は BBB を超えることができないという事実にもかかわらず、いくつかの細菌および真菌/ウイルスの病原体は、BBB を超えて感染を引き起こすことが公知である。( Nassif, et al., Trends Microbiol. 10 : 227-232 (2002) )。このような細菌病原体は、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) および大腸菌 (*Escherichia coli* K-1) などの細胞外に存在するもの、あるいはリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) または結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) などの細胞内に存在するもののいずれかであり得る。大部分の細胞内病原体は、感染した白血球内部に隠れることによって脳髄膜に侵入する一方で、細胞外病原体は、最初に血流中で汎発して、次いで大脳内皮の内腔側と直接相互作用することによって中枢神経系に入り、これにより脳微小血管の内皮細胞の密着結合を崩壊させる。( Nassif et al., 同上 ; Drevets & Leenen, Microbes Infect. 2 : 1609-1618 (2000) ; Kim, Subcell Biochem. 33 : 47-59 (2000) )。この相互作用により、病原体は脳髄膜に侵入して髄膜炎を生じさせることができる。BBB を超えるためのインビトロでの一層および二層のモデルを使用すること、並びにこのようなモデルの一層または二層を通過できない細菌突然変異体を単離すると、様々な細菌タンパク質が侵入の全体およびBBB の横断に関係していた。( Huang and Jong, Cell. Microbiol. 3 : 277-287 (2001) )。例えば、ibeA、ibeB、asiA、yijP およびompAなどの大腸菌K-1遺伝子、Opc、OpaなどのIV型線毛のタンパク質をコード

40

50

する髄膜炎菌遺伝子、並びにHIV表面タンパク質gp120などのウイルスタンパク質は全て、感染を生じさせるための効果的な侵入および BBB の横断を可能にすることが示唆されている。細胞外の細菌病原体の場合、このようなタンパク質は、髄膜の侵入のための付着およびその後の BBB の破壊を可能にすると考えられている。

（Nassif et al., 同上；Huang & Jong, 同上）。単一の細菌表面タンパク質が密着結合の破壊を促進して、BBB の横断を可能にすることは、証明されていない。

#### 【0008】

アズリン様遺伝子は、*Neisseria gonorrhoeae* および *N. meningitidis* などの多くの淋菌および髄膜炎菌に存在する。（Gotschlich & Seiff, FEMS Microbiol Lett. 43 : 253-255 (1987) ; Kawula, et al., Mol. Microbiol. 1 : 179-185 (1987) ）。アズリンは、多数の病原細菌によって産生され、このような遺伝子の間で有意な配列相同意がある。（Yamada, et al., Cell. Microbiol. 7 : 1418-1431 (2005) ）。「H.8」と称されるタンパク質エピトープは、病原性のナイセリア (*Neisseria*) 種間で保存されており、H.8と命名されたモノクローナル抗体の結合によって検出される。2つの異なった淋菌遺伝子、laz および lip は、H.8モノクローナル抗体と交差反応するタンパク質をコードする。（Hayashi & Wu, J. Bioenerg. Biomembr. 22 : 451-471 (1990) ）。

10

#### 【0009】

多くの病原体は、アズリン様タンパク質を有するが、ナイセリアは、それに付着された H.8 領域を有することにおいて特有である。Laz および Lip は、淋菌外表面タンパク質であり、シグナルペプチドリポタンパク質共通配列を含み、この配列は、細菌酵素シグナルペプチダーゼ II によって認識され、これがその配列をプロセスして脂肪酸およびグリセロールを有するシステイン残基の N 末端のアシル化を生じる。（Hayashi & Wu, 同上；Yamada, et al., Cell. Microbiol. 7 : 1418-1431 (2005) ）。約 6.3 kDa の Lip リポタンパク質は、ほぼ完全にモチーフ Ala-Ala-Glu-Ala-Pro (AAEAP (配列番号 25)) の 5 残基ペプチドの繰り返しからなり、一方、約 17 kDa の Laz リポタンパク質は、不完全な AAEAP (配列番号 25) の繰り返しを含む N 末端の 39 アミノ酸の領域を含む。（Gotschlich & Seiff, 同上；Kawula, et al., 同上；Woods et al., Mol. Microbiol. 3 : 43-48 (1989) ）。Laz におけるこの 39 アミノ酸の N 末端領域の他に、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) アズリンに対して高度に相同意である 127 アミノ酸領域がある。（Cannon, Clin. Microbiol. Rev. 2 : S1-S4 (1989) ）。Laz は、酸化的ストレスおよび銅毒性に対する防御に関与し、エキソビオでの初代培養ヒト子宮腔部上皮アッセイ法での生存率を増大させる。（Wu, et al. Infect. Immun. 73 : 8444-8448 (2005) ）。

20

#### 【0010】

第三の淋菌 (*N. gonorrhoeae*) 外膜タンパク質である Pan 1 および AAEAP (配列番号 25) の 5 残基ペプチドの繰り返しモチーフを有する。（Hoehn and Clark, Infection and Immunity, (60) : 4704-4708 (1992) ）。Lip のサイズは、異なるナイセリア株では変化する。FA 1090 株において、Lip は、AAEAP (配列番号 25) の 13 回の繰り返しおよび繰り返しの部分ではない 16 アミノ酸を有する長さ 71 アミノ酸である。R10 株において、Lip は、14 回の AAEAP (配列番号 25) の繰り返しを有する長さ 76 アミノ酸である。（Cannon, 同上）。

精製された Lip ペプチドは、不死化したヒト子宮頸管内上皮細胞によるケモカインであるインターロイキン-8 (IL-8) およびサイトカインである IL-6 の放出、並びに toll 様受容体 2 をトランスフェクトしたヒト胚腎臓 293 細胞による IL-8 の産生および転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を誘導することができる強力な炎症性メディエーターである。（Fisette, et al., J. Biol. Chem. 278 : 46252-46260 (2003) ）。

30

#### 【0011】

脳および脊髄の深刻な障害をもつ世界中の多くの患者を考慮すると、必要なことは、親水性分子および高分子が BBB を超えることができる輸送系である。好ましくは、この送達系は、高度の特異性を有して、一般に漏出性の BBB をもたらすことなく薬物を脳にターゲットすることができるであろう。さらに、良好な送達系は、一般に害のないものであり、望ましくない副作用を伴わずに患者にその系を繰り返し使うことができるであろう。場合

40

50

によっては、良好な送達系は、脳の全ての領域に同程度に薬物を送達するであろう。その他の場合には、送達系は、脳癌細胞に特異的に薬物を送達するであろう。

#### 【0012】

##### 発明の要約

本発明は、付着され、もしくは結合された積荷化合物の脳癌細胞内への、および／または血液脳関門を越えた血液脳関門を越えた輸送を促進することができるナイセリア外膜タンパクに由来する輸送ペプチドを提供する。また、輸送ペプチドとその積荷化合物との複合体も提供し、同様に脳癌を診断し、および治療するための、並びに脳に関連した他の状態を診断し、および治療するための、複合体および輸送ペプチドの両者の使用方法を提供する。最後に、本発明は、輸送ペプチドおよび／もしくは複合体を含むキット、並びに／または前述のものをコードする核酸を提供する。

10

#### 【0013】

本発明の一つの側面は、ナイセリア由来のLaz、LipもしくはPan 1の変異体、誘導体または構造的同等物であり、かつ哺乳動物脳癌細胞内への、または血液脳関門を越えた連結された分子の侵入を促進する単離された輸送ペプチドである。LazのH.8領域（配列番号24）は、これらの輸送ペプチドに対して少なくとも90%のアミノ酸同一性を有していてもよい。一部の態様において、輸送ペプチドは、配列番号24である。その他の態様において、輸送ペプチドは、血流におけるペプチドの半減期を延長し、または最適化するように修飾されていてもよい。

20

#### 【0014】

本発明のもう一つの側面は、Ala-Ala-Glu-Ala-Pro（配列番号25）の少なくとも4つの不完全なリピートまたは完全なリピートからなる領域を含み、かつ全長あたり少なくとも約50%のAAEAP（配列番号25）ペントペプチドリピートを有する輸送ペプチドである。一部の態様において、不完全または完全なリピートの領域は、同数のAla-Ala-Glu-Ala-Pro（配列番号25）のリピートを含むペプチドと少なくとも約90%同一である。一部の態様において、これらの輸送ペプチドは、合成である。その他の態様において、これらの輸送ペプチドは、血流におけるペプチドの半減期を延長し、または最適化するように修飾されていてもよい。

30

#### 【0015】

本発明のもう一つの側面は、Ala-Ala-Glu-Ala-Pro（配列番号25）の少なくとも4つの不完全または完全なリピートからなる領域を含む輸送ペプチドに連結された少なくとも1つの積荷化合物を含む複合体であって、この領域がペプチドの約50%以上を含む複合体である。本発明のもう一つの側面は、化合物が、ナイセリア由来のLaz、LipもしくはPan 1の変異体、誘導体または構造的同等物に連結された少なくとも1つの積荷を含む複合体であり、これは、哺乳動物脳癌細胞への連結された分子の、または血液脳関門を越えた侵入を促進する。一部の態様において、積荷化合物は、アズリン、プラストシアニン、ルスチシアニン、シュードアズリン、オーラシアニンおよびアズリン様タンパク質などのクプレドキシン、および特に緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）由来のアズリンである。その他の態様において、複合体は、血流におけるペプチドの半減期を延長し、または最適化するように修飾されている。加えて、この複合体は、クプレドキシンに由来する輸送ペプチドを含む。

40

#### 【0016】

この複合体の積荷化合物は、タンパク質、リポタンパク質、多糖体、核酸、色素、微小粒子、ナノ粒子、毒素および薬物であってもよい。一部の態様において、積荷化合物は、タンパク質であり、かつ複合体は、融合タンパク質である。その他の態様において、積荷化合物は、毒素である。積荷化合物は、鬱病、情動障害、慢性痛、てんかん、アルツハイマー病、脳卒中／神経保護、脳および脊髄損傷、脳癌、脳のHIV感染症、種々の運動失調を生じる障害、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病、脳に影響を及ぼす小児期先天性遺伝子エラー、パーキンソン病および多発性硬化症のための治療薬であってもよい。積荷化合物は、蛍光定量法、顕微鏡観察、X線CT、MRIおよび超音波によって検出可能な

50

ものなどの検出可能な物質であってもよい。

【0017】

一部の態様において、複合体は、薬学的に適切な担体中にある。薬学的に適切な担体は、静脈内投与ためのものであってもよい。その他の態様において、薬学的に許容される担体は、脳室内または脳内注射に適している。

【0018】

本発明のもう一つの側面は、ナイセリア由来のLaz、LipもしくはPan 1の変異体、誘導体または構造的同等物に連結された少なくとも1つの積荷化合物を含む複合体であって、哺乳動物脳癌細胞への連結された分子の、または血液脳関門を越えた侵入を促進するものと細胞を接触させることを含む方法である。細胞は、中枢神経系の腫瘍、具体的には星細胞腫、グリア芽細胞腫、髄膜腫、乏突起細胞腫(oligodentrogloma)、オリゴ星細胞腫、神経膠腫、上衣細胞腫、脊髄腫瘍、神経節細胞神経膠腫、神経細胞腫および髄芽腫由来であってもよい。

10

【0019】

本発明のもう一つの側面は、癌患者を治療する方法であって、治療上有効量の本発明の複合体が患者に投与される方法である。一部の態様において、複合体は、静脈内に、局所的に、皮下に、筋肉内に、または細胞もしくは腫瘍に投与される。その他の態様において、複合体は、別の癌治療と共に同時投与される。

【0020】

本発明のもう一つの側面は、患者の癌のイメージングのための方法であって、患者に対して検出可能な積荷化合物との複合体を投与することと、患者内の積荷化合物の位置を検出することとを含む方法である。場合によっては、積荷化合物は、X線CTによって検出されるX線造影剤である。その他の場合において、積荷化合物は、MRIによって検出される磁気共鳴映像造影剤である。その他の場合において、積荷化合物は、超音波画像診断によって検出される超音波造影剤である。

20

【0021】

本発明のもう一つの側面は、本発明の複合体と接触させた細胞を、検出可能な積荷化合物と接触させることと、積荷化合物を検出することとを含む癌を含む方法である。

【0022】

本発明のもう一つの側面は、ナイセリア由来のLaz、LipもしくはPan 1の変異体、誘導体または構造的同等物であり、かつ哺乳動物脳癌細胞への連結された分子の、または血液脳関門を越えた侵入を促進する単離された輸送ペプチドと共に試薬を含むキットである。一部の態様において、キットは、薬学的に許容される担体を含む試薬をさらに含む。その他の態様において、キットは、試薬の投与のための媒体を含む。

30

【0023】

本発明のもう一つの側面は、核酸分子である。一部の態様において、核酸は、ナイセリア由来のLaz、LipもしくはPan 1の変異体、誘導体または構造的同等物であり、かつ哺乳動物脳癌細胞への連結された分子の、または血液脳関門を越えた侵入を促進する単離された輸送ペプチドをコードする。その他の態様において、核酸は、Ala-Ala-Glu-Ala-Pro(配列番号25)の少なくとも4つの不完全な、または完全なリピートからなる領域を含む輸送ペプチドであって、この領域がペプチドの約50%以上を含む輸送ペプチドをコードする。その他の態様において、核酸は、輸送ペプチドに連結された少なくとも1つのタンパク質積荷化合物を含む融合タンパク質を含む複合体をコードする。

40

【0024】

本発明のもう一つの側面は、脳に関連した状態がある患者を治療または診断するための方法であって、本発明の輸送ペプチドと少なくとも1つの積荷化合物とを前記患者に同時投与することを含む方法である。その他の態様において、クプレドキシンに由来する輸送ペプチドが、輸送ペプチドおよび/または積荷化合物と共に同時投与される。

【0025】

配列の簡単な説明

50

配列番号1は、淋菌laz遺伝子、Genbankアクセッション番号Y00530のゲノムDNAコード配列である。

【0026】

配列番号2は、緑膿菌アズリン遺伝子のゲノムDNAコード配列である。

【0027】

配列番号3は、淋菌laz遺伝子のH.8領域のゲノムDNAコード配列である。

【0028】

配列番号4は、淋菌のLazをコードする遺伝子(laz)をPCR増幅するためのフォワードプライマーである。

【0029】

配列番号5は、淋菌のLazをコードする遺伝子(laz)をPCR増幅するためのリバースプライマーである。

【0030】

配列番号6は、pUC18-lazの3.1kbの断片をPCR増幅するためのフォワードプライマーである。

【0031】

配列番号7は、pUC18-laz.の3.1kbの断片をPCR増幅するためのリバースプライマーである。

【0032】

配列番号8は、pUC19-paz.の0.4kbの断片をPCR増幅するためのフォワードプライマーである。

【0033】

配列番号9は、pUC19-paz.の0.4kbの断片をPCR増幅するためのリバースプライマーである。

【0034】

配列番号10は、pUC19-paz.の3.3kbの断片をPCR増幅するためのフォワードプライマーである。

【0035】

配列番号11は、pUC19-paz.の3.3kbの断片をPCR増幅するためのリバースプライマーである。

【0036】

配列番号12は、pUC18-laz.の0.13kbの断片をPCR増幅するためのフォワードプライマーである。

【0037】

配列番号13は、pUC18-laz.の0.13kbの断片をPCR増幅するためのリバースプライマーである。

【0038】

配列番号14は、pGEX-5X-3由来のGSTコードする遺伝子をPCR増幅するためのフォワードプライマーである。

【0039】

配列番号15は、pGEX-5X-3由来のGSTコードする遺伝子をPCR増幅するためのリバースプライマーである。

【0040】

配列番号16は、pUC18-laz.TS由来のlazのシグナルペプチドおよびH.8コードする領域をPCR増幅するためのフォワードプライマーである。

【0041】

配列番号17は、pUC18-laz.由来のlazのシグナルペプチドおよびH.8コードする領域をPCR増幅するためのリバースプライマーである。

【0042】

配列番号18は、pUC18-laz.由来のH.8コードする領域をPCR増幅するためのフォワード

10

20

30

40

50

ライマーである。

【0043】

配列番号19は、pUC18-laz.由来のH.8コードする領域をPCR増幅するためのリバースプライマーである。

【0044】

配列番号20は、pGEX-5X-3-H.8.由来のGST-H.8融合領域をPCR増幅するためのフォワードプライマーである。

【0045】

配列番号21は、pGEX-5X-3-H.8.由来のGST-H.8融合領域をPCR増幅するためのリバースプライマーである

配列番号22は、淋菌株F62 Lazタンパク質、Genbankアクセスション番号Y00530のアミノ酸配列である。

【0046】

配列番号23は、緑膿菌アズリンのアミノ酸配列である。

【0047】

配列番号24は、淋菌F62 Lazタンパク質由来のH.8領域のアミノ酸配列である。

【0048】

配列番号25は、ヘプタペプチド(peptapeptide)モチーフのアミノ酸配列である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0049】

本態様の詳細な説明

定義

本明細書に使用される「細胞」という用語は、具体的に「単一細胞」と記述されない限り、本用語の単数または複数の両方を含む。

【0050】

本明細書に使用される「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、交換可能に使用され、アミノ酸残基の重合体をいう。本用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工の化学物質類似体であるアミノ酸重合体に適用される。また、本用語は、天然に存在するアミノ酸重合体にも適用される。また、「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、グリコシリ化、脂質付着、硫酸化、グルタミン酸残基の-カルボキシリ化、ヒドロキシリ化およびADPリボシリ化を含むが、限定されない修飾も含む。ポリペプチドが必ずしも完全に直鎖状であるわけではないことが認識されるであろう。例えば、ポリペプチドは、ユビキチン結合の結果として分枝していてもよく、これらは、一般に天然のプロセシングイベントおよび天然に存在しないヒト操作によってもたらされるイベントを含む翻訳後イベントの結果として（枝分れの有無にかかわらず）環状であってもよい。環状の、分枝の、および分枝の環状のポリペプチドは、同様に非翻訳天然プロセスによって、および完全な合成法によって合成されてもよい。合成ペプチドは、細胞成分を用いずに作製されたものである。ペプチドを作製するための合成法は、当該技術分野において周知であり、市販されている。さらに、本発明は、本発明のタンパク質のメチオニンを含むアミノ末端変異体およびメチオニンのないアミノ末端変異体の使用を想定する。

【0051】

本明細書に使用される「状態」という用語には、身体機能の性能を妨げ、または変更させる、生きている動物またはその一部の正常状態の機能障害を構成する、正常型からの解剖的および生理学的異常を含む。

【0052】

本明細書に使用される「細胞増殖を阻害する」という用語は、細胞分裂および/または細胞増殖の緩徐化または中止を意味する。また、この用語には、細胞発生の阻害または細胞死の増大を含む。

【0053】

10

20

30

40

50

本明細書に使用される「罹患する」という用語は、状態の症候を現在示すこと、観察可能な症候さえないと状態を有すること、状態から回復中および状態から回復したことを含む。

#### 【0054】

本明細書に使用される「治療」という用語は、状態もしくは治療される状態と関連する症候の進行または重症度を防げ、低下させ、止め、または逆転させることを含む。したがって、「治療」という用語には、適切な場合、医学的、治療的および/または予防的な投与を含む。

#### 【0055】

「治療上有効量」は、治療される被験体に対して、特定の状態の既存の症候の発症を防げ、低下させ、止め、もしくは逆転させるために、または部分的もしくは完全に軽減するために有効な量である。治療上有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。

#### 【0056】

本明細書に使用される「実質的に純粋な」という用語は、本発明のタンパク質またはその他の細胞産物を修飾するために使用されたときに、例えば実質的にその他のタンパク質および/または活性な阻害性化合物を含まないか、または純粋な形態の、増殖培地または細胞内容物から単離されたタンパク質をいう。「実質的に純粋な」という用語は、単離された画分の乾燥重量の少なくとも約75%の量の、または少なくとも「75%実質的に純粋な」因子をいう。より具体的には、「実質的に純粋な」という用語は、乾燥重量の少なくとも約85%の、または少なくとも「85%実質的に純粋な」活性化合物の化合物をいう。最も具体的には、「実質的に純粋な」という用語は、乾燥重量の少なくとも約95%の、または少なくとも「95%実質的に純粋な」活性化合物の化合物をいう。また、「実質的に純粋な」という用語は、例えば合成タンパク質が合成反応の試薬および副産物から単離されている場合に、合成でつくられた本発明のタンパク質または化合物を修飾するために使用してもよい。

#### 【0057】

本明細書に使用される「医薬品等級」という用語は、本発明のペプチドまたは化合物をいうときに、通常、合成試薬および副産物を含むその天然の状態において見いだされるままの物質を伴う成分から実質的に、もしくは本質的に単離され、および製剤としてのその使用を損なうであろう成分から実質的に、または本質的に単離されたペプチドまたは化合物である。たとえば、「医薬品等級」ペプチドは、任意の発癌物質から単離されてもよい。ある場合には、「医薬品等級」は、組成物が、患者に対する静脈内投与のために適さないになってしまふであろう任意の物質から実質的に、もしくは本質的に単離されたペプチドまたは化合物を特定するために、「静脈内医薬品等級」などの意図された投与方法によって修飾してもよい。たとえば、「静脈内医薬品等級」ペプチドは、SDSなどの洗浄剤およびアジドなどの抗細菌薬から単離されてもよい。

#### 【0058】

「単離された」、「精製されて」または「生物学的に純粋である」という句は、通常その天然の状態において見いだされるままの物質を伴う成分を実質的に、または本質的に含まない物質をいう。したがって、本発明に従った単離されたペプチドは、好ましくは、通常これらのインサイチュー環境においてペプチドに付随する物質を含まない。「単離された」領域とは、該領域が由来するポリペプチドの全部の配列を含まない領域をいう。「単離された」核酸、タンパク質またはこれらのそれぞれの断片は、ヌクレオチド配列決定、制限消化、部位特異的変異誘発および核酸断片のための発現ベクターへのサブクローニング、並びに実質的に純粋な量のタンパク質またはタンパク質断片を得ることなど（しかし、限定されない）、当業者がこれを操作し得るように、そのインビオの環境から実質的に除去されている。

#### 【0059】

ペプチドに関して本明細書に使用される「変異体」という用語は、野生型ポリペプチドと比較して、置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸を有し得るアミノ酸配列変

10

20

30

40

50

異体をいう。変異体は、野生型ペプチドの切り詰め型であってもよい。「付加」は、野生型のタンパク質内からの1つまたは複数のアミノ酸の除去であるが、一方、「切りつめ」は、野生型のタンパク質の1つまたは複数の末端からの1つまたは複数のアミノ酸の除去である。したがって、変異体ペプチドは、ポリペプチドをコードする遺伝子の操作によって作製されてもよい。変異体は、ポリペプチドの基本的組成または特徴を変化させるが、少なくともその基本的活性のいくつかは、変化させないことによって作製してもよい。たとえば、ナイセリア輸送ペプチドの「変異体」は、それがBBBを越えて、および/または脳癌細胞に侵入する能力を保持した変異ナイセリア輸送ペプチドであってもよい。場合によっては、変異体ペプチドは、-(3,5-ジニトロベンゾイル)-Lys残基などの非天然アミノ酸で合成される (Ghadiri & Fernholz, J. Am. Chem. Soc., 112:9633-9635 (1990))。一部の態様において、変異体は、野生型ペプチドと比較して、置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸を20、19、18、17または16を越えて有さない。一部の態様において、変異体は、野生型ペプチドと比較して、置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸を15、14、13、12または11を越えて有さない。一部の態様において、変異体は、野生型ペプチドと比較して、置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸を10、9、8または7を越えて有さない。一部の態様において、変異体は、野生型ペプチドと比較して、置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸を、6つを越えて有さない。一部の態様において、変異体は、野生型ペプチドと比較して、置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸を5つまたは4つを越えて有さない。一部の態様において、変異体は、野生型ペプチドと比較して、置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸を3つ、2つまたは1つを越えて有さない。本明細書に使用される「アミノ酸」という用語は、任意の天然に存在するか、もしくは天然に存在しない、または合成のアミノ酸残基、すなわち1、2、3つ以上の炭素原子、典型的には1つの( )炭素原子によって直接連結された少なくとも1つのカルボキシル残基および少なくとも1つのアミノ残基を含む任意の部分を含むアミノ酸部分を意味する。

#### 【0060】

ペプチドに関して本明細書に使用される用語「誘導体」は、被験体ペプチドに由来するペプチドをいう。誘導体化には、ペプチドがなおもその基本的活性の一部を保持するようにペプチドを化学修飾することを含む。たとえば、ナイセリア輸送ペプチドの「誘導体」は、それがBBBを越えて、および/または脳癌細胞に侵入する能力を保持した化学修飾されたナイセリア輸送ペプチドであってもよい。関心対象の化学修飾には、ペプチドのアミド化、アセチル化、硫酸化、ポリエチレングリコール(PEG)修飾、リン酸化またはグリコシル化を含むが、限定されない。加えて、誘導体ペプチドは、別のペプチド、薬物分子またはその他の治療的もしくは薬学的薬剤または検出可能プローブなどの化学物質に対するポリペプチドまたはその断片の融合物であってもよい。

#### 【0061】

「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」という用語は、2つの配列を整列させたときに、候補配列のアミノ酸残基と同一であるポリペプチドのアミノ酸残基の割合として定義される。%アミノ酸同一性を決定するためには、配列を整列させ、必要な場合は、ギャップを導入して最大%配列同一性を達成し；保存的置換は、配列同一性の一部とみなさない。パーセント同一性を決定するアミノ酸配列整列法は、当業者に周知である。BLAST、BLAST 2、ALIGN2またはMegalign(DNASTA(登録商標))ソフトウェアなどのたいてい一般公開されているコンピュータソフトウェアを使用してペプチド配列を整列させる。具体的な態様において、長い計算量フィルタ、予想10、ワードサイズ3、存在11および伸長1のデフォルトパラメーターを使用してBlastp(National Center for Biotechnology Information, Bethesda MDから入手可能)を使用する。

#### 【0062】

アミノ酸配列を整列させたときに、所与のアミノ酸配列Bへの、Bとの、またはBに対する所与のアミノ酸配列Aの%アミノ酸配列同一性(所与のアミノ酸配列Bへ、Bと、またはBに対して一定の%アミノ酸配列同一性を有し、または含む所与のアミノ酸配列A)と表す

10

20

30

40

50

こともできる)は:

$$\% \text{ アミノ酸配列同一性} = X / Y * 100$$

(式中、Xは、AおよびBの配列整列プログラムの、またはアルゴリズムの整列による同一マッチとして記録されるアミノ酸残基の数であり、およびYは、Bにおけるアミノ酸残基の総数である。)

として算出することができる。

#### 【0063】

アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと同じではない場合、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性は、Aに対するBの%アミノ酸配列同一性と同じではないだろう。より長い配列をより短い配列と比較するときは、より短い配列が「B」配列となる。たとえば、切断されたペプチドを対応する野生型ポリペプチドと比較するときに、切断されたペプチドが「B」配列である。

10

#### 【0064】

##### 一般

本発明は、血液脳関門(BBB)を越えて、および/または脳癌細胞内に積荷化合物を送達するための方法および材料、並びに哺乳動物脳の癌、および脳および中枢神経系のその他の状態の治療のための材料および方法に関連する。本明細書に開示したとおり、モチーフAAEAP(配列番号25)の繰り返し構成されるペプチド領域は、結合されたか、または融合されたペプチドおよびその他の積荷化合物を、血液脳関門を越えて、および/または哺乳動物脳癌細胞内に輸送することができるということが、今回分かる。より具体的には、淋菌タンパク質LazのH.8領域は、結合されたか、または融合されたタンパク質およびその他の積荷化合物を、BBBを越えて、および/または脳癌細胞内に輸送するために使用することができる。加えて、Lipタンパク質の一部または全体およびPan 1タンパク質の一部または全体などの(両方とも淋菌由来)、AAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートの使用におけるH.8領域に類似のペプチドも、BBBを越えた、および/または脳癌細胞内へのタンパク質およびその他の積荷化合物の輸送に使用することができると考えられる。本発明によって送達される積荷化合物には、タンパク質、リボタンパク質、多糖体、アンチセンス核酸を含む核酸、色素、蛍光タグおよび放射性タグ、微小粒子またはナノ粒子、毒素、無機および有機分子、小分子、並びに薬物を含むが、限定されない。一部の態様において、薬物および/または毒素は、腫瘍細胞を死滅させる。その他の態様において、積荷化合物は、脳の種々の状態を治療する。

20

#### 【0065】

緑膿菌アズリンなどの多くのクプレドキシンタンパク質は、多くのタイプの哺乳動物癌細胞に特異的に侵入して死滅させる能力を有することが知られている(Yamada et al., Cell. Biol. 7:1418-1431 (2005); Hiraoka et al., PNAS 101:6427-6432 (2004); Hiraoka et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 338:1284-1290 (2005))。緑膿菌アズリンは、グリア芽細胞腫細胞などの脳癌細胞に対して細胞毒がないことも分かる。実施例2を参照されたい。驚くべきことに、淋菌およびその他のナイセリア種由来のアズリン様タンパク質であるLazタンパク質は、グリア芽細胞腫細胞などの脳癌細胞、並びにその他の腫瘍に特異的に侵入して死滅させることができることが今回分かる。実施例2および7を参照されたい。さらにまた、Lazタンパク質のH.8領域は、そのN末端またはC末端に融合したときに、緑膿菌アズリンに対してグリア芽細胞腫細胞に侵入して死滅させる能力を与えることができることが今回分かる。実施例2および3を参照されたい。

30

#### 【0066】

また驚くべきことに、H.8領域は、グリア芽細胞腫細胞に侵入する能力をそのタンパク質に与えるために、アズリンなどの同時投与されたタンパク質に対して物理的に付着する必要がないことが今回分かる。実施例5を参照されたい。H.8およびGSTのN末端に融合されたH.8は、両方ともアズリン単独と比較して、グリア芽細胞腫細胞内への物理的に独立したアズリンの侵入を増加したが、GSTのC末端に融合されたH.8は、効果がなかった。さらに、H.8およびGSTのN末端に融合されたH.8は、アズリンと共に同時投与されたときに、両

40

50

方ともグリア芽細胞腫細胞に対するアズリンの細胞障害性を増強した。実施例5を参照されたい。

【0067】

驚くべきことに、LazのH.8ドメインは、それが融合されたタンパク質に対し、生きたマウスの血液脳関門を越えて脳に局在化させる能力を与えることが分かる。実施例6を参照されたい。

【0068】

最後に、H.8領域は、大腸菌における融合タンパク質の表面提示の役割を担うことが今回分かる。実施例7を参照されたい。GSTおよびH.8がC末端に融合されたGSTは、両方ともこれらを発現する大腸菌の細胞膜周辺腔に蓄積するが、H.8がN末端に融合されたGSTは、大腸菌細胞の表面に輸送される。いずれの作用機序に本発明を限定することも意図しないが、H.8領域が細菌細胞の表面への融合タンパク質の輸送を生じさせる能力は、H.8領域が融合タンパク質にBBBを越えさせる能力に関連があるのであろう。髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) などの髄膜炎菌は、BBBを越えて脳髄膜に侵入するため (Nassif, et al., 同上 ; Huang & Jong, 同上) 、このような細菌は、表面に曝露された細胞成分を使用してBBBを崩壊させる可能性が高い。髄膜炎菌のIV型線毛は、脳微絨毛様の膜前突の形成に関与しており、このような線毛の後退は、ナイセリアとヒト細胞との間の相互作用の中心的役割を果たすことが公知である (Pujol et al., PNAS 96:4017-4022 (1999) ; Merz et al., Nature 407: 98-102 (2002) )。しかし、IV型線毛は、線毛を媒介したその他の細胞との接触形成に続いて退縮することが公知であり、髄膜炎菌のさらなる未知の表面成分がBBBを越える役割を担うと考えられる。 (Nassif et al., 同上)。したがって、表面提示されたH.8領域は、ナイセリアがBBBを越えてヒト脳癌細胞と相互作用させるのに直接関与する可能性がある。

10

20

30

40

50

【0069】

Laz H.8領域は、不完全なAAEAP (配列番号25) ペンタペプチドリピートを含むLazのN末端の39アミノ酸領域である。このAAEAP (配列番号25) リピート単位は、BBBを越えて、および / または脳癌細胞内に積荷を輸送するペプチドをデザインするために使用することができると考えられる。さらに、AAEAP (配列番号25) リピートをもつ淋菌および髄膜炎菌由来のその他の外膜タンパク質のアミノ酸配列を、BBBを越えて、および / または脳癌細胞内に積荷を輸送するペプチドをデザインするために使用することができると考えられる。関心対象のその他のナイセリア外膜タンパクには、LipおよびPan 1を含むが、限定されない。 (Trees et al., J. Clin. Microbiol. 38:2914-2916 (2000) ; Hoehn and Clark, Infection and Immunity 60:4704-4708 (1992) )。

【0070】

本発明は、血液脳関門を越えて脳内に、および / または脳癌細胞内に積荷化合物を送達するための方法および材料に関連する。本発明に従った積荷化合物の送達は、適切な輸送ペプチドを使用することによって達成される。本発明の一つの態様において、積荷化合物は、ナイセリアまたは本発明のAAEAP輸送ペプチドに連結される。もう一つの態様において、積荷化合物は、ナイセリアまたは本発明のAAEAP輸送ペプチドと同時投与される。もう一つの態様において、積荷化合物は、クプレドキシンに由来する輸送ペプチドおよびナイセリアまたは本発明のAAEAP輸送ペプチドに連結される。

【0071】

一つの態様において、積荷化合物は、脳癌細胞などの癌細胞の細胞増殖を阻害するために送達される。このような癌細胞は、たとえば、星細胞腫、グリア芽細胞腫、髄膜腫、乏突起細胞腫 (oligodendroglioma) 、オリゴ星細胞腫、神経膠腫、上衣細胞腫、脊髄腫瘍、神経節細胞神経膠腫、神経細胞腫および髄芽腫由来であることができる。たとえば、積荷化合物は、とりわけp53などの細胞周期制御タンパク質 ; p16、p21またはp27などのサイクリン依存性キナーゼ阻害剤 ; チミジンキナーゼまたはニトロ還元酵素などの自殺タンパク質 ; インターロイキン1、インターロイキン2もしくは顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CDF) などのサイトカインまたはその他の免疫調節タンパク質 ; または綠膿菌

外毒素Aなどの毒素であってもよい。一部の態様において、上記の化合物のクラスの1つの生物学的に活性な断片が送達される。もう一つの態様において、積荷化合物は、標的組織のイメージを作製するために送達される。たとえば、標的組織は、癌であってもよく、積荷化合物は、一般にX線CT(CT)、磁気共鳴映像法(MRI)および超音波による検出のためにイメージを作製するために使用されるものであることができる。これらの態様では、積荷化合物は、ガンマ線もしくはポジトロンを放射する放射性同位元素、磁気共鳴映像造影剤、X線造影剤および/または超音波造影剤であってもよい。その他の態様において、積荷化合物は、脳に関連した状態を治療するために送達してもよい。

【0072】

ナイセリアおよびAAEAP輸送ペプチド

10

本発明は、非癌細胞ではなく哺乳動物脳癌細胞内に、および/または BBB を越えて、連結され、または結合された積荷を輸送することができる輸送ペプチドを提供する。Lazなどのナイセリア外膜タンパク質は、タンパク質輸送ドメインである H.8 ドメインを含み、これが哺乳動物脳癌細胞内への、および/または BBB を越えた連結された積荷の侵入を促進することが発見された。本発明は、ナイセリア外膜タンパク質に由来するナイセリア輸送ペプチドを提供する。本発明は、哺乳動物脳癌細胞内への、および/または BBB を越えた連結され、または結合された積荷の輸送に使用され得る AAEAP (配列番号25) ペンタペプチドのリピートを含む天然または合成の輸送ドメインをさらに提供する。

【0073】

「ナイセリア輸送ペプチド」という用語は、脳癌細胞内への、および/または BBB を越えた積荷の侵入のために必要とされるアミノ配列を含むナイセリア外膜タンパク質の全てまたは断片をいう。適切なナイセリア外膜タンパク質には、淋菌由来の Laz、Lip または Pan 1 を含むが、限定されない。髄膜炎菌および淋菌由来の Laz は、特に興味がもたれる。脳癌細胞内への、または BBB を越えた積荷の侵入のために必要とされるアミノ配列を含む外膜タンパク質の決定は、BBB を越えた、および/または脳癌細胞内への侵入のために必要とされるペプチドを同定するいずれの方法によって行ってもよい。このような方法では、ナイセリア外膜タンパク質の全てまたは断片をマーカー物質に連結して、ナイセリア外膜タンパク質の全てまたは断片が脳癌細胞内に、および/または BBB を越えて入るかどうかを決定するために試験を行う。適切なナイセリア外膜タンパク質またはこれらの断片を同定するために使用してもよい方法は、実施例4および7に見いだされる。本発明に使用してもよい適切なナイセリア外膜タンパク質は、H.8 抗体によって認識され、および/または AAEAP (配列番号25) モチーフのいくつかの完全または不完全なリピートで構成されるナイセリア種の外膜タンパクを含む。一部の態様において、ナイセリア輸送ペプチドは、H.8 抗体によって認識される。タンパク質またはペプチドが H.8 抗体によって認識されるかどうかを決定するための方法論およびパラメーターは、Cannon et al., Infection and Immunity 43:994-999 (1984) に記述されている。

20

30

40

50

【0074】

また、本発明は、AAEAP 輸送ペプチドであって、ペプチドが連結され、または結合された積荷化合物を哺乳動物脳癌細胞内に、および/または BBB を越えて輸送する複数の AAEAP (配列番号25) モチーフの完全または不完全なリピートで構成される AAEAP 輸送ペプチドを提供する。本明細書に使用される「不完全な」リピートは、5アミノ酸の少なくとも1つが AAEAP (配列番号25) モチーフの一部ではない AAEAP (配列番号25) ペンタペプチドのリピートとして定義される。その他の態様において、不完全なリピートは、AAEAP (配列番号25) ペンタペプチドの一部でないアミノ酸を1、2、3または4つを越えて有さないであろう。一部の態様において、ナイセリア輸送ペプチドは、Lazタンパク質のアミノ酸1~39 (配列番号24) である。一部の態様において、ナイセリア輸送ペプチドは、少なくとも約20アミノ酸の長さ、少なくとも約40アミノ酸の長さ、少なくとも約60アミノ酸の長さまたは少なくとも約80アミノ酸の長さである。その他の態様において、ナイセリア輸送ペプチドは、約40以下のアミノ酸の長さ、約100以下のアミノ酸の長さ、約200以下のアミノ酸の長さまたは約400以下のアミノ酸の長さである。一部の態様において、ナイセリア輸送ペプ

チドは、配列番号22などのナイセリア外膜タンパク質に対して、少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性または少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有する。

#### 【0075】

「AAEAP(配列番号25)輸送ペプチド」という用語は、完全および/または不完全なAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートの領域を含むペプチドをいう。AAEAP(配列番号25)輸送ペプチドは、標準的で構成されてもよく、または細胞に基づいた発現系によって再生されてもよい。一部の態様において、AAEAP(配列番号25)輸送ペプチドは、少なくとも2つのAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピート、少なくとも4つのAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピート、少なくとも6つのAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピート、少なくとも8つのAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピート、少なくとも10個のAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピート、少なくとも15個のAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートまたは少なくとも20個のAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートで構成される。一部の態様において、AAEAP(配列番号25)輸送ペプチドは、10以下のAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピート、20以下のAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートで、30以下のAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートまたは40以下のAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートで構成される。一部の態様において、AAEAP(配列番号25)輸送ペプチドは、完全なAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートのみ、不完全なAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートのみ、または完全および不完全なAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートの混合物で構成される。  
。

#### 【0076】

一部の態様において、AAEAP(配列番号25)輸送ペプチドは、AAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートのみからなる。その他の態様において、AAEAP(配列番号25)輸送ペプチドは、全長あたり少なくとも約95%のAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピート、全長あたり少なくとも約90%のAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピート、全長あたり少なくとも約80%のAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピート、全長あたり少なくとも約50%のAAEAP(配列番号25)ペントペプチドリピートからなる。一部の態様において、リピートの領域は、同数のAla-Ala-Glu-Ala-Pro(配列番号25)のリピートを含むペプチドと少なくとも約70%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約90%同一または少なくとも約95%同一である。

#### 【0077】

一部の態様において、ナイセリア輸送ペプチドおよび/またはAAEAP(配列番号25)輸送ペプチドは、選択的に脳癌細胞内への、および/または BBB を越えて連結された積荷の輸送を促進するために使用することができる。その他の態様において、ナイセリア輸送ペプチドおよび/またはAAEAP(配列番号25)輸送ペプチドは、脳癌細胞内への、および/または BBB を越えて同時投与された積荷を輸送するために使用することができる。

#### 【0078】

##### ナイセリアまたはAAEAP輸送ドメインの修飾

本発明のその他の態様において、ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP(配列番号25)輸送ペプチドを化学的に修飾し、または遺伝子改変して、脳癌細胞内への、または BBB を越えて積荷化合物を輸送する能力を保持する変異体および誘導体を産生する。ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP(配列番号25)輸送ペプチドの変異体は、標準的技術によって合成してもよい。誘導体は、直接天然のアミノ酸から、または修飾もしくは部分的置換によって形成されるアミノ酸配列である。変異体は、天然の化合物に類似するが、同一ではない構造を有するが、一定の成分または側鎖に関してそれと異なるアミノ酸配列である類似体であってもよい。類似体は、合成しても、または異なる進化の起源由来であってよい。変異体は、誘導体または類似体が修飾されたアミノ酸を含む場合、全長であっても、または全長以外であってもよい。

#### 【0079】

10

20

30

40

50

本発明は、野生型ポリペプチドと比較して置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸を有するナイセリア輸送ペプチドのアミノ酸配列変異体を提供する。本発明の変異体は、ナイセリア輸送ペプチドの切り詰めであってもよい。本明細書に使用されるポリペプチドの「切り詰め」は、ポリペプチド配列の少なくとも1つの末端からの少なくとも1つのアミノ酸残基の除去により生じるペプチドである。一部の態様において、切り詰めペプチドは、ポリペプチド配列の一方または両方の末端からの少なくとも少なくとも1つのアミノ酸残基、少なくとも5つのアミノ酸残基、少なくとも10個のアミノ酸残基、少なくとも50個のアミノ酸残基、少なくとも100個のアミノ酸残基、少なくとも120個のアミノ酸残基または少なくとも150個のアミノ酸残基の除去により生じる。一部の態様において、組成物は、全長ナイセリア輸送ペプチドではないナイセリア輸送ペプチドの領域からなるペプチドを含む。一部の態様において、組成物は、切り詰められたナイセリア輸送ペプチドの約10個を超える残基、約15個を超える残基または約20個を超える残基からなるペプチドを含む。一部の態様において、組成物は、切り詰められたナイセリア輸送ペプチドの約10個以下の残基、約70個以下の残基、約50個以下の残基、約40個以下の残基または約30個以下の残基からなるペプチドを含む。

10

## 【0080】

ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP(配列番号25)輸送ペプチドの変異体は、ナイセリア輸送ペプチド(配列番号24)またはAAEAP(配列番号25)輸送ペプチドに対して同一サイズのアミノ酸配列全体で、または相同性アルゴリズムによって整列を行った整列配列と比較したときに、少なくとも約65%、70%、75%、85%、90%、95%、98%または99%の同一性まで実質的に相同的である領域を含む分子を含むが、限定されない。ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP(配列番号25)輸送ペプチドと候補配列との間の「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」という用語は、2つの配列を整列させたときに、候補配列のアミノ酸残基と同一であるナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP(配列番号25)輸送ペプチドのアミノ酸残基の割合として定義される。

20

## 【0081】

また、変異体には、天然に存在しない合成アミノ酸で作製されたペプチドを含む。たとえば、天然に存在しないアミノ酸を変異体ペプチドに組み込んで、血流における組成物の半減期を延長し、または最適化してもよい。このような変異体には、D,L-ペプチド(ジアステレオマー)(Futaki et al., J. Biol. Chem. 276(8):5836-40 (2001); Papo et al., Cancer Res. 64(16):5779-86 (2004); Miller et al., Biochem. Pharmacol. 36(1):169-76, (1987))；異常アミノ酸を含むペプチド(Lee et al., J. Pept. Res. 63(2):69-84 (2004))および非天然アミノ酸、続いて炭化水素ステーブリングを含むオレフィン(Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Walenski et al., Science 305:1466-1470 (2004))および-(3,5-ジニトロベンゾイル)-Lys残基を含む(conprising)ペプチドを含むが、限定されない。

30

## 【0082】

その他の態様において、本発明のペプチドは、ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP(配列番号25)輸送ペプチドの誘導体である。輸送ペプチドの誘導体は、ペプチドがなおもその基本的活性の一部を保持するようなペプチドの化学修飾である。たとえば、輸送ペプチドの「誘導体」は、それが BBB を越えて、および / または脳癌細胞内に侵入する能力を保持する化学修飾された輸送ペプチドであることができる。ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP輸送ペプチド活性の変化を生じる誘導体化は、このような活性の喪失がかなりのものでない限り、本発明の一部として想定される。本明細書に使用される「かなりの喪失」とは、変更のないペプチドと比較して、約50%を超える活性である。関心対象の化学修飾には、ペプチドのアミド化、アセチル化、硫酸化、ポリエチレンギリコール(PEG)修飾、リン酸化およびグリコシル化を含むが、限定されない。加えて、誘導体ペプチドは、別のペプチド、薬物分子またはその他の治療的もしくは薬学的薬剤または検出可能プローブなどの化学物質に対する誘導体ペプチドまたはその変異体、誘導体もしくは構造的同等物の融合物であってもよい。

40

50

## 【 0 0 8 3 】

関心対象の誘導体には、化学修飾を含み、これにより、ペプチド環状化 (Monk et al., BioDrugs 19 (4) :261-78, (2005); DeFreest et al., J. Pept. Res. 63 (5) :409-19 (2004)) N- および C- 末端修飾 (Labrie et al., Clin. Invest. Med. 13 (5) :275-8, (1990)) 並びに非天然アミノ酸、続いて炭化水素ステーブリングを含むオレフィン (Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Walenski et al., Science 305:1466-1470 (2004)) を含む当業者に周知のいくつかの方法などによって、本発明のペプチドおよび組成物の血流における半減期を延長し、または最適化することができる。

## 【 0 0 8 4 】

本発明の輸送ペプチドは、ナイセリア輸送ペプチドもしくはAAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドの変異体、誘導体および / または構造的同等物であってもよいことが想定される。たとえば、ペプチドは、PEG化された (PEGylated) ナイセリア輸送ペプチドの切り詰めであり、こうしてこれを変異体および誘導体の両方にしてもよい。一つの態様において、本発明のペプチドは、オレフィンを有する繋留、続いてルテニウム触媒オレフィン複分解による全ての炭化水素「ステーブル」を含む、二置換された非天然のアミノ酸で合成される (Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Walensky et al., Science 305:1466-1470 (2004))。加えて、ナイセリア輸送ペプチドの構造的同等物であるペプチドは、その他のペプチドに融合し、こうして構造的同等物および誘導体の両方であるペプチドを作製してもよい。これらの例は、本発明を単に例証するためであり、限定しない。

## 【 0 0 8 5 】

ナイセリア輸送ペプチドもしくはAAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドが脳癌細胞内に、および / または BBB を越えて積荷化合物を輸送する能力を無効にしない、ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドのアミノ配列の変化を引き起こす変更をナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドに導入することができる。「非必須」アミノ酸残基は、脳癌細胞内に、および / または BBB を越えて積荷化合物を輸送するその能力を無効にせずに、ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドの配列から変化させることができる残基であるが、「必須」アミノ酸残基は、このような活性のために必要とされる。

## 【 0 0 8 6 】

「保存的」置換を行うことができるアミノ酸は、当該技術分野において周知である。有用な保存的置換を表1の「好ましい置換」に示してある。1つのクラスのアミノ酸を同じクラスのもう一つのアミノ酸で置換することによる保存的置換は、置換がナイセリア / AAEA P 輸送ペプチドの活性を無効にしない限り、本発明の範囲内になる。変化されたナイセリア / AAEAP 輸送ペプチド活性を生じるこのような交換は、このような活性の喪失がかなりのものでない限り、本発明の一部として想定される。本明細書に使用される「かなりの喪失」とは、変更のないペプチドと比較した活性の約50%を超えるものである。

【表1】

表1 好ましい置換

もとの残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

30

(1) シートまたは ヘリックス高次構造などのポリペプチドバックボーンの構造、(2) 電荷、(3) 疎水性または(4) 標的部位の側鎖の大きさに影響を及ぼす「非保存的」置換により、ナイセリア / AAEAP輸送ペプチド機能を修飾することができる。残基は、表2に示したような一般的側鎖特性に基づいてグループに分けられる。非保存的置換には、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスに交換することを伴う。

## 【0087】

1つのクラスのアミノ酸が異なるクラスの別のアミノ酸と置換されることによる非保存的置換は、置換によりナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP(配列番号25)輸送ペプチドの活性が無効にならない限り、本発明の範囲内である。ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP(配列番号25)輸送ペプチド活性の変化を生じるこのような交換は、このような活性の喪失がかなりのものでない限り、本発明の一部として想定される。

40

【表2】

表2 アミノ酸クラス

クラス	アミノ酸
疎水性	ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile
親水性中性	Cys、Ser、Thr
酸性	Asp、Glu
塩基性	Asn、Gln、His、Lys、Arg
鎖高次構造を崩壊させるもの	Gly、Pro
芳香族	Trp、Tyr、Phe

10

20

30

40

50

その他の態様において、本発明は、淋菌Lazアミノ酸残基1～39（配列番号24）に対して有意な構造類似性を有するナイセリア輸送ペプチドの構造的同等物またはAAEAP（配列番号25）輸送ペプチドを想定する。具体的には、ナイセリア輸送ペプチドの構造的同等物と淋菌Lazアミノ酸残基1～39（配列番号24）との間の有意な構造相同性は、VASTアルゴリズムを使用することにより決定してもよい（Gibrat et al., *Curr Opin Struct Biol* 6:377-385 (1996) ; Madej et al., *Proteins* 23:356-3690 (1995)）。具体的態様において、ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP（配列番号25）輸送ペプチドの構造的同等物と淋菌Lazアミノ酸残基1～39（配列番号24）との構造比較によるVAST確率値は、約 $10^{-3}$ 未満、約 $10^{-5}$ 未満または約 $10^{-7}$ 未満である。その他の態様において、ナイセリア輸送ペプチドの構造的同等物と淋菌Lazアミノ酸残基1～39（配列番号24）との間の有意な構造相同性は、DALIアルゴリズム使用することにより決定することができる（Holm & Sander, *J. Mol. Biol.* 233:123-138 (1993)）。具体的態様において、対での構造比較のためのDALIスコアは、少なくとも約3.5、少なくとも約7.0または少なくとも約10.0である。

## 【0088】

ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP（配列番号25）輸送ペプチドに対する修飾は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニン走査およびPCR突然変異誘発などの当該技術分野において公知の方法を使用して行うことができる。ナイセリア/AAEAP輸送ペプチド変異体をコードする核酸を产生するために、部位特異的変異誘発（Cartier, *Biochem J.* 237:1-7 (1986) ; Zoller and Smith, *Methods Enzymol.* 154:329-50 (1987)）、カセット突然変異誘発、制限選択突然変異誘発（Wells et al., *Gene* 34:315-23 (1985)）またはその他の公知技術をクローニングしたDNAに対して行うことができる。加えて、ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP（配列番号25）輸送ペプチド変異体をコードするヌクレオチドは、当該技術分野において周知方法によって合成してもよい。

## 【0089】

ナイセリア/AAEAP（配列番号25）輸送ペプチド-積荷化合物複合体

本発明のもう一つの局面において、ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP輸送ペプチドが少なくとも積荷化合物上のものと複合体を形成している輸送ペプチド-積荷複合体が提供される。これらの複合体の輸送ペプチドは、ナイセリア輸送ペプチド、AAEAP（配列番号25）輸送ペプチドまたはいずれかの変異体、誘導体もしくは構造的同等物のいずれであってもよい。本発明によって送達される積荷化合物は、タンパク質、リボタンパク質、多糖体、アンチセンス核酸、色素、微小粒子またはナノ粒子、毒素、有機および無機分子を含む核酸、小分子、並びに薬物を含むが、限定されない。このような輸送ペプチド-積荷複合体は、脳および/または脳癌細胞および一般に癌細胞に薬物を送達するために治療目的で、脳癌細胞および一般に癌細胞にイメージング化合物を送達するために診断目的で、並びに脳へ、および/または脳癌細胞への特異的化合物の送達を必要とする任意のその他の目的で使用してもよい。積荷化合物は、輸送ペプチドのC末端またはN末端に付着させてよい。

## 【0090】

一部の態様において、ナイセリア輸送ペプチドまたはAAEAP輸送ペプチドは、クプレドキシンに由来する輸送ペプチドと複合体形成される。クプレドキシンに由来する輸送ペプチドは、2005年10月6日に出願の米国特許出願第11/244,105号に提供されており、参照により明白に本明細書により援用される。一部の態様において、クプレドキシンに由来する輸送ペプチドは、緑膿菌アズリンの50~77アミノ酸領域を含み、その変異体、誘導体または構造的同等物である。

## 【0091】

本明細書に使用される、「複合体を形成した」、「複合体を形成する」または「連結された」という用語は、複合体が形成される構成成分間の物理的な結合をいう。場合によつては、物理的結合は、直接でなくてもよく、連結基または別の成分によって媒介されてもよい。構成成分は、とりわけタンパク質、その他の有機分子または無機分子であつてもよい。構成成分間の物理的結合は、共有結合、疎水結合および/またはファンデルワールス力または物理的結合で構成成分を保持する任意のその他の手段によつてもよい。本発明の種々の態様において、積荷化合物には、その他のアズリンおよびアズリン様タンパク質の中で、アズリン：緑膿菌（配列番号24）（「wt-アズリン」）由来；ラン藻ホルミジウム・ラミノサム（*Phormidium laminosum*）由来のプラスチアニン；鉄酸化細菌由来のルスチシアニン；アクロモバクター・シクロクラステス（*Achromobacter cycloclastes*）由来のプソイドアズリンシュードモナス・シリング（*Pseudomonas syringa*）、髓膜炎菌、腸炎ビブリオ菌（*Vibrio parahaemolyticus*）、気管支敗血症菌（*Bordetella bronchiseptica*）由来のアズリン、クロロフレキサス・オウラチアカス（*Chloroflexus aurantiacus*）または淋菌由来のオーラシアニンAおよびBなどの癌細胞に細胞毒であるクプレドキシンを含んでいてもよい。その他の態様において、積荷化合物は、緑膿菌由来のチトクロムc<sub>551</sub>などのチトクロムcであつてもよい。その他の態様において、積荷化合物は、癌細胞におけるその細胞障害性を保持する上記の任意の変異体であつてもよい。

10

20

30

40

## 【0092】

一つの態様において、積荷化合物は、検出可能な物質、たとえば緑色蛍光タンパク質などの蛍光物質；発光物質；-ガラクトシダーゼなどの酵素；または放射標識され、または細胞に検出可能な表現型を与えるために送達されるビオチン化されたタンパク質であつてもよい。同様に、検出可能な物質、たとえば蛍光物質で標識された微小粒子またはナノ粒子を送達することもできる。適切なナノ粒子の1つの例は、2002年5月7日に発行された米国特許第6,383,500号において見いだされ、これは参照により明白に本明細書に援用される。多くのこののような検出可能な物質が当業者に公知である。

## 【0093】

一部の態様において、積荷化合物は、X線CT、磁気共鳴映像法、超音波画像診断または放射性核種シンチグラフィーのために適した検出可能な物質であつてもよい。これらの態様では、診断のために積荷化合物が患者に投与される。造影剤は、X線CT、MRIおよび超音波によって得られるイメージを増強する積荷化合物として投与される。種々の態様において、積荷化合物は、ガンマ線またはポジトロンを放射する放射性同位元素、磁気共鳴映像造影剤（construct agent）、X線造影剤および/または超音波造影剤である。

30

40

## 【0094】

ナイセリア/AAEAP（配列番号25）輸送ペプチドを介して脳腫瘍組織にターゲットされる放射性核種積荷化合物の投与は、クプレドキシンに由来する輸送ペプチドの有無にかかわらず、放射性核種シンチグラフィー（scintigraphy）のために使用することができる。一部の態様において、ナイセリア/AAEAP（配列番号25）輸送ペプチドは、積荷化合物の有無にかかわらず、放射性ヌクレオチドを含んでいてもよい。米国特許公開第2006/0039861号は、放射性核種造影剤として使用するための、ペプチドにターゲットされる多量体造影剤を提供する。X線イメージングのために適した市販の積荷化合物には、GE Healthcare（Chalfont St. Giles, United Kingdom）から入手可能なVisipaque（登録商標）（イオジキサノール）、Omnipaque（登録商標）（イオヘキソール）およびImagopaque（登録

50

商標)を含むが、限定されない。

【0095】

ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドを介して脳腫瘍組織にターゲットされる超音波造影剤積荷化合物の投与は、クプレドキシンに由来する輸送ペプチドの有無にかかわらず、超音波画像診断のために使用することができる。積荷化合物として使用に適した超音波造影剤には、生体適合性気体の微小な泡、液体担体および界面活性物質微粒子を含むが、限定されず、ターゲティング部分と微小な泡との間に随意の連結部分 $L_n$ をさらに含む。関心対象の微小な泡には、表3に提供したものを含むが、限定されない。この状況において、液体担体という用語は、水溶液を意味し、界面活性物質という用語は、溶液における界面張力の減少を生じる任意の両親媒性物質を意味する。界面活性物質微粒子の形成のために適した界面活性物質の一覧は、EP0727225A2に開示されており、参照により明白に本明細書に援用される。界面活性物質微粒子という用語には、ナノ球、リポソーム、小胞その他を含む。一部の態様において、超音波造影剤は、リポソームまたはデキストランである。生体適合性気体は、空気または $C_3$ - $C_5$ 過フルオロアルカンなどの過フッ化炭化水素であってもよく、これは、エコー源性の相違を、したがって超音波画像診断におけるコントラストを提供する。気体は、任意に連結基を介して、ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドが付着された微粒子にカプセル化しても、または含まれていてもよい。付着は、共有結合性、イオン性またはファンデルワールス力によることができる。

10

【0096】

表3。超音波造影剤として使用される微小な泡およびこれらの組成物

20

【表3】

表3

微小な泡	気体	安定化シェル
第一世代、非経肺動脈血管		
遊離の微小な泡	空気	いずれもなし
Echovist(登録商標)(SHU 454)	空気	いずれもなし
第二世代、経肺動脈血管、短い半減期(<5分)		
Albunex(登録商標)	空気	アルブミン
Levovist(SHU 508 A)	空気	パルミチン酸
第三世代、経肺動脈血管、より長い半減期(>5分)		
Aerosomes ( Definity 、 MRX115、DMP115)	過フルオロプロパン	リン脂質
Echogen(QW3600)	ドデカフルオロペンタン	界面活性物質
Optison(登録商標)(FSO 69)	オクタフルオロプロパン	アルブミン
PESDA	過フルオロブタン	アルブミン
Quantison	空気	アルブミン
QW7437	過フルオロカーボン	界面活性物質
Imavist(登録商標) (Imagent, AFO150)	過フルオロヘキサン	界面活性物質
Sonovue(登録商標)(BR1)	六フッ化硫黄	リン脂質
臓器特異的期(肝臓、脾臓)を伴う経肺動脈血管		
BR14	過フルオロブタン	リン脂質
Levovist(SHU 508 A)	空気	パルミチン酸
Sonavist(登録商標)(SHU 563 A)	空気	シアノアクリル酸
Sonazoid(登録商標) (NC100100)	過フルオロカーボン	界面活性物質。

10

20

30

40

50

ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドを介して脳腫瘍組織にターゲットされるX線造影剤積荷化合物の投与は、クプレドキシンに由来する輸送ペプチドの有無にかかわらず、X線CTおよびX線イメージングのその他の形態のために使用することができる。積荷化合物として使用するために適した現在市販されているX線造影剤は、2つのカテゴリーに分類することができる：1) イオン性のカルボキシル基を有するイオン性造影剤、および2) いずれのイオン性の基も含まない非イオン性造影剤。市販のイオン性造影剤の例にはHypaque(登録商標)(ダイアトリゾエート)およびHexabrix(登録商標)(イオキサグラーート)を含み、一方、非イオン薬には、Omnipaque(登録商標)(イオヘキソール)、Isovue(登録商標)(イオパミドール)、Optiray(登録商標)(イオベルソル)およびVisipaque(登録商標)(イオジキサノール)を含む。積荷化合物として使用するために適した他のX線造影剤には、原子番号20以上の1つまたは複数のX線吸収原子または「重い」原子を含むが、限定されず、ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドとX線吸収原子との間の随意の連結部分L<sub>n</sub>をさらに含む。X線造影剤に頻繁に使用される重原子は、ヨウ素である。金属キレートで構成されるX線造影剤(たとえば、米国特許第5,417,959号)および複数の金属イオン(たとえば、米国特許第5,679,810)で構成されるポリキレートが開示されている。多核クラスター複合体は、X線造影剤として開示されている

(たとえば、米国特許第5,804,161号、PCT国際公開代91/14460号およびPCT国際公開第92/17215号)。その他のX線造影が当業者に公知であり、本発明の積荷化合物と同様に使用することができる。

【0097】

ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドを介して脳腫瘍組織にターゲットされるMRI造影剤積荷化合物の投与は、クプレドキシンに由来する輸送ペプチドの有無にかかわらず、MRIイメージングのために使用することができる。積荷化合物として使用するために適したMRI造影剤には、1つまたは複数の常磁性の金属イオンを含むが、限定されず、ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドと常磁性金属イオンとの間に随意の連結部分L<sub>n</sub>をさらに含む。金属キレートの金属イオンは、常磁性イオンであってもよい。適切な金属イオンには、22-29 (含む)、42、44および58-70 (含む) の原子番号を有するものを含み、および+2または+3の酸化状態を有する。このような金属イオンの例は、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(II)、鉄(III)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、プラセオジム(III)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、ガドリニウム(III)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)、エルビウム(III)およびイッテルビウム(III)である。積荷化合物として使用するために適した市販のMRI造影剤は、GE Healthcare (Chalfont St. Giles, United Kingdom) 由来のOmniscan (登録商標) (gadodiamide) およびTeslascan (登録商標) を含むが、限定されない。

10

【0098】

もう一つの態様において、積荷化合物は、脳癌細胞またはその他の癌細胞などの細胞を死滅させ、または細胞の増殖を阻害するために送達される。たとえば、積荷化合物は、p53などの細胞周期制御タンパク質；p16、p21またはp27などのサイクリン依存性キナーゼ阻害剤；チミジンキナーゼまたはニトロ還元酵素などの自殺タンパク質；インターロイキン1、インターロイキン2もしくは顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CDF)などのサイトカインもしくはその他の免疫調節性タンパク質；または緑膿菌外毒素Aなどの毒素であってもよい。その他の態様において、化合物の上記のクラスの1つの生物学的に活性な断片を送達してもよい。

20

【0099】

さらにもう一つの態様において、積荷化合物は、癌を治療するために使用される薬物である。このような薬物には、たとえば、5-フルオロウラシル；インターフェロン；メトトレキセート；タモキシフェン；およびピンクリンスチンを含む。癌治療のために適したその他の積荷化合物には、ナイトロジエンマスター、アルキルスルホナート、ニトロソ尿素、エチレンイミンおよびトリアゼンなどのアルキル化薬；葉酸アンタゴニスト、プリン類似体およびピリミジン類似体などの抗代謝剤；アントラサイクリン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ダクチノマイシンおよびブリカマイシンなどの抗生素；L-アスパラギナーゼなどの酵素；ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤；5'-レダクターゼ阻害剤；17'-ヒドロキシステロイドヒドロゲナーゼ3型の阻害剤；糖質コルチコイド、エストロゲン/抗エストロゲン、アンドロゲン/抗アンドロゲン、プロゲスチンおよび黄体形成ホルモン放出ホルモンアンタゴニスト、オクトレオチドアセテートなどのホルモン薬；エクティナシジンまたはこれらの類似体および誘導体などの微小管破壊薬；タキサン、たとえばパクリタキセル(タキソール(商標))、ドセタキセル(タキソテール(商標))およびこれらの類似体などの微小管安定化剤、並びにエポシロンA-Fおよびこれらの類似体エポシロン；ピンカアルカロイド、エピポドフィロトキシン、タキサンなどの植物に由来する産物；並びにトポイソメラーゼ阻害剤；ブレニル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤；並びにヒドロキシ尿素、プロカルバジン、ミトタン、ヘキサメチルメラミン、シスプラチニンおよびカルボプラチニンなどの白金配位化合物などの種々の薬剤；並びに生体応答調節剤、成長因子などの抗癌剤および細胞障害性薬として使用される他の薬剤；免疫変調成分およびモノクローナル抗体を含むが、限定されない。抗癌剤および細胞障害性薬のこれらのクラスの代表例には、塩酸メクロレタミン、シクロホスファミド、クロランブシル、メルファラン、イホスファミド、ブスルファン、カルムスチン、ロム

30

40

50

スチン、セムスチン、ストレプトゾシン、チオテバ、ダカルバジン、メトレキセート、チオグアニン、メルカプトプリン、フルダラビン、ペニタスタチン、クラドリビン、シタラビン、フルオロウラシル、塩酸ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、硫酸ブレオマイシン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、サフラシン、サフラマイシン、キノカルシン、ディスコデルモライド、ピンクリスチン、ピンプラスチン、酒石酸ビノレルビン、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド、パクリタキセル、タモキシフェン、エストラムスチン、リン酸エストラムスチンナトリウム、フルタミド、ブセレリン、ロイプロリド、ブテリジン、ジイネセス (diyneoses) 、レバミゾール、アフラコン (aflacon) 、インターフェロン、インターロイキン、アルデスロイキン、フィルグラスチム、サルグラモスチム、リツキシマブ、BCG、トレチノイン、塩酸イリノテカン、ベタメタゾン、塩酸ゲムシタビン、アルトレタミンおよびトポテカン (topotecan) 並びにこれらの任意の類似体または誘導体を含むが、限定されない。積荷化合物として有用なその他の抗癌剤および細胞障害性薬の例には、以下の：ドイツ特許第4138042.8号において見いだされるようなエポシロン誘導体；国際公開第97/19086号、国際公開第98/22461号、国際公開第98/25929号、国際公開第98/38192号、国際公開第99/01124号、国際公開第99/02224号、国際公開第99/02514号、国際公開第99/03848号、国際公開第99/07692号、国際公開第99/27890号、国際公開第99/28324号、国際公開第99/43653号、国際公開第99/54330号、国際公開第99/54318号、国際公開第99/54319号、国際公開第99/65913号、国際公開第99/67252号、国際公開第99/67253号および国際公開第00/00485号；国際公開第99/24416号において見いだされるものなどのサイクリン依存性キナーゼ阻害剤（また、米国特許第6,040,321号も参考されたい）；並びに国際公開第97/30992号および国際公開第98/54966号において見いだされるものなどのプレニル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤；並びに米国特許第6,011,029号に一般的に、および具体的に記述されたものなどの薬剤を含み、これらの化合物は、ARモジュレーター、ERモジュレーターなどの任意のNHRモジュレーターと共に、特に癌の治療において、LHRHモジュレーターと共に使用することができる。

## 【0100】

積荷化合物のその他の例には、脳に都合よく送達することができるものを含む。このような積荷化合物には、脳に関連した状態を治療するための薬物およびその他の治療を含む。このような脳に関連した状態には、鬱病、情動障害、慢性痛、てんかん、アルツハイマー病、脳卒中／神経保護、脳および脊髄損傷、脳癌、脳HIV感染症、種々の運動失調を生じる障害、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 、ハンチントン病、脳に影響を及ぼす小児期先天性遺伝子エラー、パーキンソン病および多発性硬化症を含むが、限定されない。

## 【0101】

鬱病および情動障害を治療するための積荷化合物として使用してもよい抗鬱薬には、ノルトリプチリン、ベンラファキシン (Effexor (登録商標)) およびネファゾドン (nefazadone) (Serzone (登録商標)) などの三環系抗鬱薬；フルオキセチン (Prozac (登録商標)) 、セルトラリン (Zoloft (登録商標)) 、フルボキサミン (Luvox (登録商標)) 、パロキセチン (Paxil (登録商標)) およびシタロプラム (Celexa (登録商標)) などの選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) 、鎮静剤ミルトラザピン (mirtazepine) (Remeron (登録商標)) 、およびより活性化するブプロピオൺ (Wellbutrin (登録商標)) を含むが、限定されない。また、エルゴタミン、ジヒドロエルゴタミン、ケトプロフェン、プロプラノロール、チモロール、アテノロール、メトプロロールおよびナドロールを含むが、限定されない頭痛および片頭痛薬物適用も関心がもたれる。

## 【0102】

慢性痛を治療するための積荷化合物として使用することができる薬物には、アセトアミノフェン (Tylenol (登録商標)) などの一般的鎮痛剤；アスピリンなどの抗炎症剤；イブプロフェン (Advil (登録商標) 、Motrin (登録商標)) およびナプロキセン (Aleve (登録商標)) などの非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) ；モルヒネ様オピオイなどのオピオイド疼痛薬適用；抗鬱薬および抗てんかん発作薬適用を含むが、限定されない。てんかんを治療するための積荷として使用することができる薬物には、フェノバルビタール、ジ

10

20

30

40

50

フェニルヒダントイン、トリメタジオン (Tridione (登録商標)) 、ジアゼパム (Valium (登録商標)) 、カルバマゼピン (Tegretol (登録商標)) 、バルプロ酸 (Depakene (登録商標)) 、Emeside (登録商標) (エトサクシミド) 、Zarontin (登録商標) 、エトサクシミド、トリレプタール、カルバマゼピン、Keppra (登録商標) 、レベチラセタム、ラミクタール、アセタゾラミド、トリアガビン (triagabine) 、バルプロ酸ナトリウム、ブレガバリン、クロナゼパム、カルバマゼピン、トピラメート、バルプロ酸、ラモトリジン、エトサクシミド、クロバザム、ビガバトリン、レベチラセタム、ガバペンチン、ゾニサミド、ブリミドン、フェニトインおよびオキスカルバゼピンを含むが、限定されない。アルツハイマー病を治療するための積荷化合物として使用することができる薬物には、Razadyn (登録商標) (以前には、Reminyl (登録商標) として公知) (ガランタミン) 、Exelon (登録商標) (リバストグミン) 、Aricept (登録商標) (ドネペジル) 、Cognex (登録商標) (タクリン) およびN-メチルD-アスパラギン酸 (NMDA) アンタゴニストの (Nameinda (登録商標) (メマンチン)) などのコリンエステラーゼ阻害剤を含むが、限定されない。脳卒中を治療するための、または神経保護のための積荷化合物として使用することができる薬物には、Gavestinel (登録商標) 、エリスロポエチン (EPO) 、トロンボポエチン、TNF- 、エストロゲン、メラトニンおよびカンナビノイドを含むが、限定されない。  
10

## 【0103】

脳のHIV感染症を治療するための積荷化合物として使用することができる薬物には、デラバルジン、エファビレンツおよびネビラピンなどの非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) ；アバカビル、アバカビル、ラミブジン、アバカビル、ラミブジン、ジドブジン、ジダノシン、エムトリシタビン、エムトリシタビン、テノフォビルDF、ラミブジン、ラミブジン、ジドブジン、スタブジン、テノフォビルDF、ザルシタビンおよびジドブジンなどのヌクレオシド逆転写酵素阻害剤 (NRTI) ；アンプレナビル、アタザナビル、フォサムプレナビル (fosamprenavir) 、インジナビル、ロビナビル、リトナビル、ネルフィナビル、リトナビル、サキナビルおよびチプラナビルなどのプロテアーゼ阻害剤 (PI) ；並びにエンフュービルタيدなどの融合阻害剤を含むが、限定されない。  
20

## 【0104】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を治療するための積荷化合物として使用することができる薬物には、クレアチン、Myotrophin (登録商標) 、Celebrex (登録商標) 、Neotroglin (登録商標) 、NAALADase、ニューロデクス、Rilutek (登録商標) 、オキサンドロロン、補酵素Q10、トピラメート (Topamax (登録商標)) 、ザリプロデン、インジナビル、ミノサイクリンおよびブスピロンを含むが、限定されない。  
30

## 【0105】

ハンチントン病を治療するための積荷化合物として使用することができる薬物には、ハロペリドールなどの抗精神病薬またはクロナゼパムなどの他剤、フルオキセチン、セルトラリンおよびノルトリプチリンなどの抗降下剤；トランキライザおよびリチウム；ミノサイクリン、シタロプラムおよびEthyl-EPA (Miraxion (登録商標)) を含むが、限定されない。  
40

## 【0106】

パーキンソン病を治療するための積荷化合物として使用することができる薬物は、抗コリン作用剤またはアマンタジン、レボドパ (L-ドーパ) プロモクリプチン、ペルゴリド、プラミペキソール、ロピニロール、セレジリンおよびアマンタジンを含むが、限定されない。多発性硬化症を治療するための積荷化合物として使用することができる薬物は、副腎皮質刺激ホルモン (ACTHとしてより周知) 、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ベタメタゾン、デキサメサゾン、インターフェロン (Avonex (登録商標) 、Betaseron (登録商標) およびRebif (登録商標)) 、インターフェロン、Novantrone (登録商標) (ミトキサントロン) 、シクロスボリン (Sandimmune (登録商標)) 、シクロホスファミド (Cytosan (登録商標)) 、メトトレキセート、アザチオプリン (Imuran (登録商標)) およびクラドリビン (Leustatin (登録商標)) を含むが、限定されない  
50

。

### 【0107】

さらにもう一つの態様において、積荷化合物は、化合物の上記のクラスのも1つをコードする核酸である。

### 【0108】

上記の例は、例示目的のために提供してあり、多くのその他のこのような化合物が当業者に公知である。

### 【0109】

ナイセリア輸送ドメインもしくはAAEAP輸送ドメイン、または積荷化合物に連結されたいずれかのものをコードする核酸

10

もう一つの側面において、本発明は、ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドおよびその変異体または積荷化合物がタンパク質である積荷化合物に連結されたナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドを含む融合タンパク質をコードする核酸分子を提供する。本発明にしたがった核酸分子は、当該技術分野において公知の技術の組み合わせによって調製することができる。これらの核酸に使用されるコード配列は、特定のペプチドをコードする天然のゲノムDNAにおいて見いだされるものであってもよく、または公知のコドンからデザインしてもよい。また、これらのコード配列は、ペプチドを発現させる生物体における代わりのコドン選択性および好ましいコドン選択性を考慮してデザインしてもよい。ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドおよび輸送ペプチド-積荷複合体のための核酸配列は、化学合成またはクローニングすることによって個々に調製してもよい。次いで、関心対象の核酸分子を与えるために、核酸配列をリガーゼで共に結合してもよい。

20

### 【0110】

ナイセリアまたはAAEAP輸送ドメインを使用して積荷化合物を送達する方法

本発明の組成物を、たとえば細胞型の検出またはイメージング、特に中枢神経系もしくは脳の癌の治療、または脳に関連した状態の治療に使用することができる。組成物は、治療上有効量で投与してもよい。典型的には、宿主生物は、ヒトまたは動物などの哺乳類である。一部の態様において、積荷化合物は、ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドと複合体を形成して送達され、一方で、その他の態様において、積荷化合物は、ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドと同時投与されるが、それと複合体形成されていない。複数の積荷化合物を、ナイセリア / AAEAP 輸送ペプチドと同時投与してもよい。積荷化合物の同時投与は、同じ医薬品製剤中か、または輸送ペプチド投与の約1時間以内に投与される別の医薬品製剤中のいずれかで、輸送ペプチドの投与と同時であってもよい。加えて、ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドおよび積荷化合物の同時投与には、積荷化合物の投与から約1時間以上約2時間、4時間、6時間、12時間、または24時間未満に行われるナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドの投与を含んでもよい。一部の態様において、ナイセリア / AAEAP 輸送ペプチド、積荷化合物およびクプレドキシン由来の輸送ペプチドを同時投与してもよい。その他の態様において、ナイセリア / AAEAP 輸送ペプチドを、積荷化合物複合体を形成したクプレドキシン由来の輸送ペプチドと同時投与してもよい。

30

### 【0111】

本発明のその他の種々の態様において、ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドは、インビトロ、エキソビオまたはインビオにおいて積荷化合物を細胞に送達する。たとえば、送達は、生検など、ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドと積荷化合物との複合体を細胞培養に添加することによってインビトロで達成してもよい。あるいは、送達は、患者から除去した試料、たとえば血液、組織または骨髄に複合体を添加すること、および治療した試料を患者に戻すことによってエキソビオで達成してもよい。また、送達は、患者に直接複合体を投与することによって達成してもよい。本発明の方法は、治療的、予防的、診断的または研究目的のために使用してもよい。

40

### 【0112】

50

ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドを含む複合体を含むナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドを含む組成物は、任意の適切な経路によって、たとえば経口、口内、吸入、舌下、直腸、膣、経尿道、経鼻、局所的、皮膚すなわち経皮もしくは非経口的 (静脈内、筋肉内、皮下および動脈内投与を含む) によって、または脳室内もしくは脳内注射によって投与してもよい。本発明の組成物およびその医薬品製剤は、その意図された目的を達成するために有効な任意の量で投与することができる。癌または治療を必要とする他の任意の状態を治療するために投与される場合、組成物は、治療上有効量で投与される。種々の積荷化合物の投薬量および投与計画のための手引きは、医師机上便覧 (PD) などの治療または診断におけるこのような化合物の使用を記述する多くの参考文献から集めててもよいし、または当業者によって他に決定されたものでもよい。

10

## 【0113】

本発明の組成物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌してもよいし、または濾過滅菌してもよい。生じる水性溶液は、そのまま使用するために包装しても、または凍結乾燥してもよく、凍結乾燥製剤は、投与前に滅菌溶液と組み合わされる。静脈内の様式で、本発明のナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチド、積荷化合物および/または輸送ペプチド-積荷化合物複合体を投与するときは、点滴静注または断続注入によって投与してもよい。

## 【0114】

正確な処方、投与の経路および投薬量は、患者の状態からみて、世話をしている健康ケア提供者または医師によって決定される。投薬量および間隔は、治療効果を維持するために十分な本発明の組成物の血漿レベルを提供するように個々に調整することができる。一般に、意図された投与経路および標準的薬学的実務を考慮して、所望の組成物が選択された薬学的な担体との混合物で投与される。

20

## 【0115】

適切な投薬量は、たとえば使用されるナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドを含む化合物、積荷化合物、宿主、投与様式、並びに治療または診断される状態の性質および重症度に応じて変更してもよい。しかし、本発明の方法の一つの態様において、ヒトにおける満足な治療結果は、約0.001 ~ 20 mg/kg体重のナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドまたはナイセリア / AAEAP輸送ペプチド複合体を含む化合物の1日投薬量にて得られることが示される。一つの態様において、示されたヒトにおける治療のための1日投薬量は、約0.7 mg ~ 約1400 mgの範囲の、都合よく投与されるナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドまたはナイセリア / AAEAP輸送ペプチド複合体、たとえば1日用量、1週用量、1月用量および/または連続投薬であってもよい。1日用量は、1日あたり1 ~ 12回異常の別々の投薬量であることができる。あるいは、用量は、1日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、1週毎、および同様に1日ずつ増加して31日以上で投与することができる。投薬は、錠剤、パッチ、静脈内投与その他を含む任意の適用できる投薬形態を使用して連続的、断続的または単一用量であることができる。より具体的には、組成物は、治療上有効量で投与される。具体的態様において、治療上有効量は、約0.01 ~ 20 mg/kg体重である。具体的態様において、用量レベルは、約10 mg/kg/日、約15 mg/kg/日、約20 mg/kg/日、約25 mg/kg/日、約30 mg/kg/日、約35 mg/kg/日、約40 mg/kg/日、約45 mg/kg/日または約50 mg/kg/日である。

30

## 【0116】

ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドを含む組成物またはナイセリア / AAEAP 輸送ペプチド複合体を患者に導入する方法は、いくつかの態様において、癌を治療するための公知の他の薬物との同時投与である。このような方法は、当該技術分野において周知である。具体的態様において、ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドを含む組成物またはナイセリア / AAEAP輸送ペプチド複合体は、癌を治療するための他の薬物を含むか、もしくはと共にカクテルまたは同時投薬の一部である。このような薬物は、癌の治療のための本明細書に収載された任意の積荷化合物を含む。

40

## 【0117】

50

本発明のに従って使用される本発明の組成物を含む医薬組成物は、治療的に使用することができる製剤中に、組成物の加工を容易にする賦形剤および補助物質を含む1つまたは複数の生理学的に許容される担体、組成物の分泌を阻害または刺激する活性薬剤、またはそれらの混合物を使用して、従来の方法で製剤化することができる。

## 【0118】

ナイセリア / AAEAP輸送ペプチドまたは輸送ペプチドおよび積荷化合物および / またはクブレドキシン由来の輸送ペプチドのいずれかと結合された融合タンパク質をコードする核酸分子をベクターに挿入して、遺伝子療法ベクターとして使用することができる。遺伝子療法ベクターは、たとえば静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号）によって、または定位注射によって被験体に送達することができる。（Chen et al., Proc Natl Acad Sci USA, 91 : 3054-57 (1994)）。遺伝子療法ベクターの医薬品製剤には、許容される希釈剤を含むことができ、または遺伝子送達媒体が包埋された徐放性基質を含むことができる。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターを組換え細胞から無処置で作成することができる場合、たとえばレトロウイルスベクターの場合、医薬品製剤は、遺伝子送達系を產生する1つまたは複数の細胞を含むことができる。

10

## 【0119】

一つの側面において、組成物は、複合体がインサイチューで產生されるように、DNAとして送達される。一つの態様において、DNAは、たとえば、Ulmer et al., Science 259 : 1745-49 (1993) に記述され、Cohen, Science 259 1691-92 (1993) によって概説されているように「裸である」。裸のDNAの取り込みは、担体、たとえば細胞内に効率的に輸送される生体分解性ビーズなどのに対してDNAをコーティングすることによって増大させてもよい。このような方法において、DNAは、核酸発現系、細菌およびウイルス発現系を含む当業者に公知の任意の種々の送達系内に存在していてもよい。DNAをこのような発現系に組み込むための技術は、当業者に周知である。たとえば、国際公開公報第90/11092号、国際公開公報第93/24640号、国際公開公報第93/17706号および米国特許第5,736,524号を参照されたい。

20

## 【0120】

生物体間で遺伝物質を輸送するために使用されるベクターは、2つの一般的分類に分けることができる：クローニングベクターは、適切な宿主細胞における増殖のために必須ではない領域を有し、かつその中に外来性DNAが挿入された複製するプラスミドまたはファージである；外来性DNAは、あたかもそれがベクターの構成成分であるかのように複製され、増殖される。発現ベクター（プラスミド、酵母または動物ウイルスゲノムなど）は、組成物のDNAなどの外来性DNAを転写し、翻訳するために、外来性遺伝物質を宿主細胞または組織内に導入するために使用される。発現ベクターでは、導入されたDNAは、挿入されたDNAを転写するよう宿主細胞に信号を送るプロモーターなどのエレメントに作動可能に連結されている。特異的因子に応答して遺伝子の転写を調節する誘導性プロモーターなどのいくつかのプロモーターは、ことのほか有用である。誘導性プロモーターに組成物ポリヌクレオチドを作動可能に連結することにより、ナイセリア / AAEAP輸送ペプチド組成物のポリペプチドまたは断片の発現を制御することができる。古典的な誘導性プロモーターの例には、-インターフェロン、熱ショック、重金属イオン、並びに糖質コルチコイドおよびテトラサイクリンなどのステロイドに応答するものが含まれる（Kaufman, Methods Enzymol. 185 : 487-511 (1990)）。その他の望ましい誘導性プロモーターには、構築物が導入される細胞にとって内因性のものではないが、誘導剤が外因的に供給された時に、これらの細胞において応答性であるものも含まれる。一般に、有用な発現ベクターは、たいていプラスミドである。しかし、ウイルスベクター（たとえば、複製できないレトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）などの発現ベクターのその他の形態も想定される。

30

## 【0121】

ベクターの選択は、使用される生物体または細胞、並びに所望のベクターの運命によって規定される。一般に、ベクターは、シグナル配列、複製開始点、マーカー遺伝子、エン

40

50

ハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終結配列を含む。

【0122】

ナイセリア輸送ドメインを含む医薬組成物

ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドまたは積荷化合物に連結されたナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドの複合体を含む本発明の医薬組成物は、任意の従来の様式で、たとえば従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣化、乳化、カプセル化、封入化または凍結乾燥過程によって製造することができる。ナイセリア / AAEAP輸送ペプチド複合体は、当該技術分野において周知の薬学的に許容される担体と容易に組み合わせることができる。このような担体により、製剤を錠剤、丸剤、糖衣、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液、その他として製剤化することができる。また、適切な賦形剤には、たとえば充填剤およびセルロース製剤を含んでいてもよい。その他の賦形剤には、たとえば香料剤、着色剤、非粘着付与剤、増粘剤およびその他の許容される添加物、アジュバントまたは結合剤を含むことができる。

10

【0123】

種々の態様において、組成物には、担体および賦形剤 (緩衝液、炭水化物、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸、抗酸化剤、静菌薬、キレート剤、懸濁剤、濃化剤および / または防腐剤を含むが、限定されない)、水、油、食塩水、デキストロース水溶液およびグリセリン溶液、緩衝剤、浸透圧調整剤、湿潤剤その他などの生理学的条件に近くするために必要とされるその他の薬学的に許容される補助物質を含む。当業者に公知の任意の適切な担体を本発明の組成物を投与するために使用してもよいが、一方で、担体のタイプは、投与様式に応じて変更してもよいことが認識されるであろう。また、化合物は、周知技術を使用してリポソーム内にカプセル化してもよい。また、生体分解性の微粒子を本発明の組成物のための担体として使用してもよい。適切な生体分解性の微粒子は、たとえば米国特許第4,897,268号、第5,075,109号、第5,928,647号、第5,811,128号、第5,820,883号、第5,853,763号、第5,814,344号および第5,942,252号に示されている。本明細書に使用される「化合物」は、本発明のペプチド、アミノ酸配列、積荷化合物および複合体、並びに核酸を含む。

20

【0124】

ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ペプチド、積荷および輸送ペプチド-積荷複合体、並びに核酸を投与するための医薬組成物を調製する際に使用するための輸液は、クリスタロイド (crystalloid) またはコロイドから構成されていてもよい。本明細書に使用されるクリスタロイドは、ミネラル塩またはその他の水溶性分子の水溶液である。本明細書に使用されるコロイドには、ゼラチンなどのより大きな不溶性分子を含む。輸液は、無菌であってもよい。

30

【0125】

静脈内投与のために使用してもよいクリスタロイド液は、表4に記載したような、通常の塩類溶液 (0.9%の濃度の塩化ナトリウムの溶液)、リングル乳酸またはリングル液およびしばしばD5Wと呼ばれる5%のデキストロース水溶液を含むが、限定されない。

【0126】

表4：一般的のクリスタロイド液の組成

40

## 【表4】

表4

溶液	その他の名称	[Na <sup>+</sup> ]	[Cl]	[グルコース]
D5W	5% デキストロース	0	0	252
2/3 & 1/3	3.3% デキストロース ／0.3% 塩類溶液	51	51	168
半通常の塩類溶液	0.45% NaCl	77	77	0
通常の塩類溶液	0.9% NaCl	154	154	0
リングル乳酸*	リングル溶液	130	109	0

10

## 【0127】

リングル乳酸は、28mmol/L乳酸、4mmol/L K<sup>+</sup>および3mmol/L Ca<sup>2+</sup>も有する

本発明の組成物の血流における半減期は、ペプチド環状化 (Monk et al., BioDrugs 19 (4) : 261-78, (2005) ; DeFreest et al., J. Pept. Res. 63 (5) : 409-19 (2004) )、D,L-ペプチド (ジアステレオマー) (Futaki et al., J. Biol. Chem. 2月23日 ; 276 (8) : 5836-40 (2001) ; Papo et al., Cancer Res. 64 (16) : 5779-86 (2004) ; Miller et al., Biochem. Pharmacol. 36 (1) : 169-76, (1987) )、異常アミノ酸を含むペプチド (Lee et al., J. Pept. Res. 63 (2) : 69-84 (2004) ) 並びにびN-およびC-末端修飾 (Labrie et al., Clin. Invest. Med. 13 (5) : 275-8, (1990) ) を含むが限定されない当業者に周知のいくつかの方法によって、半減期を延長し、または最適化することができる。d-異性化 (置換) およびD-置換またはL-アミノ酸置換によるペプチド安定性の修飾は、特に興味がもたれる。

## 【0128】

投与が注射によるときは、組成物を水溶液中に、好ましくはハンクス液、リングル液または生理食塩水緩衝液などの生理的に適合性のある緩衝液中に製剤化してもよい。溶液には、懸濁剤、安定化剤および/または分散剤などの製剤化剤を含んでいてもよい。あるいは、組成物は、使用前に適切な媒体、たとえば無菌の発熱性物質を含まない水で構成するための粉末形態であってもよい。

## 【0129】

投与が吸入法によるときは、組成物を適切な高圧ガス、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、二酸化炭素またはその他の適切なガスを用いた加圧パックまたは噴霧器からエアゾールスプレーの形態で送達してもよい。加圧エアゾルの場合、用量単位は、定量を送達するバルブを設けることにより決定され得る。吸入器または通気器に使用するための、たとえばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、タンパク質と乳糖またはデンプンなどの適切な粉末基材との粉末混合物を含んで製剤化してもよい。

## 【0130】

投与が局所的投与によるときは、当該技術分野において周知のように、組成物を溶液、ゲル、軟膏、クリーム、懸濁液およびその他として製剤化してもよい。一部の態様において、投与は、経皮パッチによる。投与が坐薬 (たとえば、直腸または経膣) によるときは、組成物は、また、従来の坐剤基剤を含む組成物中に製剤化してもよい。

## 【0131】

投与が経口のときは、組成物を当該技術分野において周知の薬学的に許容される担体と組み合わせて容易に製剤化することができる。マンニトール、乳糖、ステアリン酸マグネシウム、その他などの固形担体を使用してもよく；このような担体により、ケモタキシンを、治療される被験体による経口摂取のための錠剤、丸剤、糖衣、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液その他として製剤化することができる。例えば粉末、カプセルおよび錠剤などの経口固体製剤については、適切な賦形剤には、糖、セルロース製剤、造粒剤および結合剤などの充填剤を含む。

## 【0132】

20

30

40

50

また、その他の便利な担体には、当該技術分野において周知のように、細菌莢膜多糖、デキストランまたは遺伝子操作されたベクターなどの多価の担体を含む。加えて、組成物を含む徐放性製剤により、長期間に及ぶ組成物の放出が可能となり、その結果、徐放性製剤を伴わないと、治療効果を誘発もしくは増強する前に、組成物が被験体の系から除去されて、および/またはたとえばプロテアーゼおよび単純な加水分解によって分解されるだろう。

【0133】

ナイセリア / AAEAP (配列番号25) 輸送ドメインを含むキット

もう一つの側面において、本発明は、パッケージまたは容器内に以下の1つまたは複数を含むキットを提供する：(1) 積荷化合物に連結されたナイセリアまたはAAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドの複合体を含む試薬；(2) 薬学的に許容されるアジュバントまたは賦形剤を含む試薬；(3) 注射器などの投与のための媒体；(4) 投与のための説明書。構成成分(1)～(4)の2つ以上が同じ容器において見いだされるような態様も想定される。その他の態様において、キット構成成分には、ナイセリアまたはAAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドを含む試薬および積荷化合物を含む独立した試薬を含んでいてもよい。他の態様において、キットには、ナイセリアまたはAAEAP (配列番号25) 輸送ペプチドを含むが、積荷化合物を含む試薬を含まない。他の態様において、試薬は、静脈内投与のために製剤化されてもよく、および/または投与の媒体は、静脈内投与に適している。一部の態様において、キットは、クプレドキシン由来の輸送ペプチド、特に緑膿菌アズリンを含んでいてもよい。他の態様において、キットは、積荷化合物をナイセリア / AAEAP 輸送ペプチドまたはクプレドキシン由来の輸送ペプチドに対して連結するための試薬を含んでいてもよい。

10

20

30

40

【0134】

キットが供給されるときに、組成物の異なる成分を独立した容器に包装して、使用直前に混合してもよい。このように成分を別々に包装することにより、活性成分の機能を失うことなく、長期貯蔵が可能となるであろう。キットに含まれる試薬は、異なる構成成分の寿命が保たれて、容器の材料に吸着されず、または変化されないように、任意の種類の容器においても供給することができる。たとえば、密封されたガラスアンプルは、凍結乾燥されたポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、または窒素などの中性非反応性ガスの下でパックされた緩衝液を含んでもよい。アンプルは、任意の適切な材料から成っていてもよく、それはガラスや、ポリカーボネート、ポリスチレンなどの有機ポリマー、セラミック、金属または同様の試薬を保持するために典型的に使用されるその他の任意の材料であってもよい。適切な容器のその他の例には、アンプルと同様の物質から製造され得る単純な瓶およびアルミニウムまたは合金などの箔の並び内部で構成され得る封筒を含む。他の容器には、試験管、バイアル、フラスコ、瓶、注射器またはその他を含む。容器は、皮下注射針を突き通すことができる栓を有する瓶などの無菌接触口を有していてもよい。他の容器は、容易に着脱可能な膜によって仕切られ、その除去により成分を混合することができる2つのコンパートメントを有していてもよい。着脱可能な膜は、ガラス、プラスチック、ゴムなどであってもよい。

【0135】

また、キットは、説明用材料と共に供給してもよい。説明書は、紙またはその他の基体に印刷されていてもよく、および/またはフロッピー (登録商標) ディスク、CD-ROM、DVD-ROM、ジップディスク、ビデオテープ、録音テープ、フラッシュメモリ装置などの電子読み込み可能な媒体として供給してもよい。詳細な説明書は、キットと物理的に付随していないてもよく；その代わりに、使用者は、キットの製造業者または卸売業者によって特定されるインターネットウェブサイトに指示されてもよく、または電子メールとして供給されてもよい。

【0136】

本発明のより完全な理解は、以下の具体例を参照することによって得ることができる。実施例は、例証のみのために記述してあり、本発明の範囲を限定することは意図されない

50

。 情況示唆し、または適切であるとする場合には、形の変更および均等物への置換が想定される。特異的用語が本明細書で使用されているにもかかわらず、このような用語は、説明的な意味で意図されるものであり、限定する目的ではない。先に記載したとおりの本発明の修正変更は、これらの精神および範囲から逸脱することなく行うことができ、したがって、付隨する態様によって示されるように、このような制限のみが課されるべきである。

【実施例】

【0137】

実施例1 LazおよびH.8-アズリン融合遺伝子のクローニングと発現

淋菌由来のlaz遺伝子を、その公知の配列（配列番号1）に基づいてクローニングした（図1A）。paz（図1B）と称される緑膿菌アズリン遺伝子（配列番号2）および淋菌由来のlaのH.8エピトープの配列（配列番号3）を使用して、後述するように、H.8-paz（図1C）を産生するためpazの5'末端に、またはpaz-H.8（図1D）を産生するためpazの3'末端に、H.8エピトープ遺伝子のインフレームでクローニングした。

10

【0138】

株化細胞および試薬。ヒト癌細胞、菌株およびプラスミドは、表5に収載した。ヒト乳癌MCF-7細胞および脳腫瘍LN-229細胞は、シカゴのイリノイ大学（UIC）の外科腫瘍学科の保存培養コレクションからのものである。細胞は、2 mM L-グルタミン、0.1 mM MEM必須アミノ酸を含み、10% 熱不活性化したウシ胎児血清、100単位/ml ペニシリンおよび100 µg/ml ストレプトマイシンを補ったイーグル塩を含むMEM中で培養した。全ての細胞は、5 % CO<sub>2</sub> 中で37 °C にて生育した。（Yamada、et al.， Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99：14098-14103 (2002)；Punj、et al.， Oncogene 23：2367-2378 (2004)）。

20

【0139】

表5 癌細胞、菌株および遺伝的な構築物

【表5】

表5

細胞/下部/ プラスミド	関連する特徴*	参照文献
LN-229	ヒト脳グリア芽細胞腫	Ishii, et al., Brain Pathol. 9:469-479 (1999)
MCF-7	ヒト乳腺癌	Soule, et al., J. Natl. Cancer. Inst. 51:1409-1416 (1973); Punj, et al., Oncogene 23:2367-2378 (2004)
緑膿菌 PAO1	原栄養株, FP- (性因子マイナス)	Holloway, et al., Microbiol. Rev. 43:73-102 (1979)
大腸菌 JM109	Cloning and azurin expression strain	Yanisch-Perron, et al., Gene 33:103-119 (1985)
大腸菌 BL21 (DE3)	GST expression strain	Novagen
淋菌 F62	DNA 単離のために使用した原栄養株	American Type Culture Collection
pUC18	一般的クローニングベクター, Ap <sup>r</sup>	Yanisch-Perron, et al., id.
pUC19	一般的クローニングベクター, Ap <sup>r</sup>	Yanisch-Perron, et al., id.
pUC18-laz	pUC18 内にクローン化した淋菌 F62 のゲノム DNA 由来の 1 kb PCR 断片	本明細書
pUC19-paz	HindIII および PstI 消化した pUC19 内にクローン化した緑膿菌 PAO1 由来の 0.55 kb PCR 断片, Ap <sup>r</sup>	Yamada, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14098-14103 (2002); Yamada, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:4770-4775 (2004)
pUC18-H.8-paz	Fusion plasmid encoding H.8 from <i>N. gonorrhoeae</i> and azurin from <i>P. aeruginosa</i> PAO1, Ap <sup>r</sup>	本明細書
pUC19-paz-H.8	緑膿菌 PAO1 由来のアズリンおよび淋菌由来の H.8 をコードする融合プラスミド, Ap <sup>r</sup>	本明細書
pGEX-5X-3	GST 遺伝子融合ベクター, Ap <sup>r</sup>	Amersham
pET29a	大腸菌発現ベクター Km <sup>r</sup>	Novagen
pET29a-gst	gst 遺伝子を含む pET29a 誘導体, Km <sup>r</sup>	本明細書
pET29a-H.8-gst	H.8-gst 遺伝子を含む pET29a 誘導体, Km <sup>r</sup>	本明細書
pGEX-5X-3-H.8	H.8 コード領域を含む pGEX-5X-3 誘導体, Ap <sup>r</sup>	本明細書
pET29a-gst-H.8	gst-H.8 遺伝子を含む pET29a 誘導体, Km <sup>r</sup>	本明細書

【0140】

Ap、アンピシリン ; Km、カナマイシン ; GST、グルタチオンS-トランスフェラーゼ。

【0141】

pazおよびlaz 遺伝子のクローニングおよび発現。アズリン遺伝子のクローニングおよ

10

20

30

40

50

び高発現は、記述されている。(Yamada, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 : 140 98-14103 (2002) ; Punj, et al., Oncogene 23 : 2367-2378 (2004) )。淋菌のLazをコードする遺伝子(laz)は、鑄型DNAとして淋菌F62株のゲノムDNAでのPCRにより増幅した。使用したフォワードおよびリバースプライマーは、5'-CCGGAATTCCGGCAGGGATGTTGTAATA TCCG-3' (配列番号4) および5'-GGGGTACCGCCGTGGCAGGCATACAGCATTCAATCGG-3' (配列番号5) であり、追加として導入したEcoRIおよびKpnIの制限酵素部位には、それぞれ下線を引いてある。EcoRIおよびKpnIで消化した1.0 kbの増幅DNA断片を、laz遺伝子がlacプロモーターの下流に配置されて発現プラスミドpUC18-laz (表5、図1) が得られるように、pUC18ベクター (Yanisch-Perron, et al., Gene 33 : 103-119 (1985) ) の対応する部位に挿入した。

10

## 【0142】

淋菌のLazのH.8および緑膿菌のアズリン(Paz)の融合物を発現するプラスミドは、鑄型としてpUC19-pazおよびpUC18-lazでのPCRによって構築した。H.8-Paz融合物については、3.1 kbの断片を鑄型としてのpUC18-lazおよびSalI部位に下線を引いたプライマーの5'-(リン酸化)GGCAGCAGGGCTTCGGCAGCATCTGC-3' (配列番号6) および5'-CTGCAGGTCGACTCTA GAGGATCCCG-3' (配列番号7) によって増幅した。PCRで増幅された0.4kbの断片は、鑄型としてのpUC19-pazおよびXhoI部位に下線を引いたプライマーの5'-(リン酸化)GCCGAGTGCT CGGTGGACATCCAGG-3' (配列番号8) および5'-TACTCGAGTCACTTCAGGGTCAGGGTG-3' (配列番号9) から得た。pUC18-lazからのSalI消化したPCR断片およびpUC19-pazからのXhoI消化したPCR断片をクローニングして、発現プラスミドpUC18-H.8-paz (表5、図1)を得た。

20

## 【0143】

Paz-H.8融合物については、3.3 kbの断片を鑄型としてのpUC19-pazおよびBamHI部位に下線を引いたプライマーの5'-CTTCAGGGTCAGGGTGCCCTTCATC-3' (配列番号10) および5'-CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCG-3' (配列番号11) によって増幅した。0.13 kbの断片は、鑄型としてのpUC18-lazおよびBamHI部位に下線を引いてあり、かつ追加として導入した細菌遺伝子終止コドンに対応するTTAをイタリック体にしたプライマー、5'-(リン酸化)TGCTCT CAAGAACCTGCCGCGCCTGC-3' (配列番号12) および5'-TAGGATCCTTAGGCAGCAGGGCTCGGCAGCAT CTGC-3' (配列番号13) によって増幅した。2つのBamHI消化したPCR断片をクローニングして、発現プラスミドpUC19-paz-H.8 (表5)を得た。

30

## 【0144】

大腸菌JM109を、アズリンおよびその誘導体遺伝子の発現のための宿主株として使用した。組換え大腸菌株は、アズリンタンパク質を産生するために、37℃にて16時間、100 μg/mlアンピシリン、0.1 mM IPTGおよび0.5mM CuSO<sub>4</sub>を含む2×YT培地中で培養した。

## 【0145】

融合GSTタンパク質のためのプラスミド構築。グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)をコードする遺伝子は、鑄型DNAとしてのpGEX-5X-3 (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ)でのPCRにより増幅した。使用したフォワードおよびリバースプライマーは、5'-CGAGCTCATGCCCCATACTAGGTTATTGG-3' (配列番号14) および5'-CCCAAGCTTCA GGGGATCCCGACCTTCGATCAGATCC-3' (配列番号15) であり、それぞれ追加として導入したSacIおよびHindIIIの制限酵素部位に下線を引いてあり、かつ追加として導入した細菌遺伝子終止コドンに対応するTCAをイタリック体にした。SacIおよびHindIIIで消化した1.0 kbの増幅DNA断片をpET29aベクターの対応する部位に挿入して、発現プラスミドpET29a-gst (表5)を得た。

40

## 【0146】

H.8-GST融合物については、lazのシグナルペプチドおよびH.8コード領域は、鑄型DNAとしてpUC18-lazでのPCRによって増幅した。使用したフォワードおよびリバースプライマーは、5'-GGAATTATGAAAGCTTATCTGGC-3' (配列番号16) および5'-CCGGAATTCCGGCAGCAGGGC TTCGGC-3' (配列番号17) であり、それぞれ追加として導入したNdeIおよびEcoRIの制限酵素部位に下線を引いてある。NdeIおよびEcoRIで消化した0.14kbの増幅DNA断片をpET29a-gstベクターの対応する部位に挿入して、発現プラスミドpET29a-H.8-gst (表5)を得た。

50

## 【 0 1 4 7 】

GST-H.8融合物については、H.8コード領域を鋳型DNAとしてpUC18-lazでのPCRにより増幅した。使用したフォワードおよびリバースプライマーは、5'-CGGGATCCCCTGCTCTCAAGAACCTGCCGCGCC-3'（配列番号18）および5'-CGGAATTCTTAGGCAGCAGGGGCTTCGGCAGCATCTGCAGG-3'（配列番号19）であり、追加として導入したBamHIおよびEcoRIの制限酵素部位に下線を引いてあり、導入した細菌遺伝子終止コドンTTAは、イタリック体にしてある。BamHIおよびEcoRIで消化した0.14 kbの増幅DNA断片をpGEX-5X-3ベクターの対応する部位に挿入して、pGEX-5X-3-H.8を得た。次いで、GST-H.8融合物の領域を、鋳型DNAとしてpGEX-5X-3-H.8でのPCRによって増幅した。使用したフォワードおよびリバースプライマーは、5'-CGAGCTCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGG-3'（配列番号20）および5'-CCGCTCGAGTCAGGCAGCAGGGGCTTCGGCA G-3'（配列番号21）であり、追加として導入したSaciおよびXholの制限酵素部位に下線を引いてあり、導入した細菌遺伝子終止コドンTCAは、イタリック体にしてある。SaciおよびXholで消化した1.1 kbの増幅DNA断片をpET29aベクターの対応する部位に挿入し、発現プラスミドpET29a-gst-H.8（表5）を得た。

10

## 【 0 1 4 8 】

大腸菌BL21（DE3）をgstおよびその誘導融合物の発現のための宿主株として使用した。

## 【 0 1 4 9 】

アズリンについて記述したように、これらのプラスミドを収容する大腸菌株をIPTGの存在下で培養して、細胞を溶解して、タンパク質を精製したときは（Yamada、et al.， Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99：14098-14103（2002）；Punj、et al.， Oncogene 23：2367-2378（2004）；Yamada、et al.， Cell. Microbiol. 7：1418-1431（2005））、種々のアズリン誘導体が単一成分としてSDS-PAGE上で移動した（図1E）にもかかわらず、H.8を含むタンパク質（約17kDa）は、以前に示したように異常な移動を示した（Cannon et al.，同上；Fisette et al.， 同上）。

20

## 【 0 1 5 0 】

実施例2。H.8は、乳癌細胞ではなく、グリア芽細胞腫に対する緑膿菌アズリンの細胞毒性を増強する

癌細胞に対する優先的なPazの侵入（Yamada、et al.， Cell. Microbiol. 7：1418-1431（2005））、並びにヒト黒色腫（Yamada、et al.， Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99：14098-14103（2002））および乳癌（Punj、et al.， Oncogene 23：2367-2378（2004））に対するインピトロおよびインピボの両方の細胞障害性が報告されている。しかし、グリア芽細胞腫などの脳腫瘍に対するPazまたはLazの効果は、公知ではない。ここで、グリア芽細胞腫（LN-229株化細胞）および乳癌（MCF-7株化細胞）細胞の両方に対するPaz、Laz、H.8-Paz（PazのN末端のH.8エピトープ）およびPaz-H.8（PazのC末端のH.8エピトープ）の効果を、研究した。

30

## 【 0 1 5 1 】

タンパク質の調製。緑膿菌のアズリン（Paz）、淋菌のLaz、Paz-H.8およびH.8-Pazを、既に記述されているように精製した。（Yamada、et al.， Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99：14098-14103（2002）；Punj、et al.， Oncogene 23：2367-2378（2004）；Yamada、et al.， Cell. Microbiol. 7：1418-1431（2005））。全ての組換えGST融合物の誘導体を前述のように精製した。（Yamada、et al.， Cell. Microbiol. 7：1418-1431（2005））。化学合成した39アミノ酸のH.8ペプチドを購入した。

40

## 【 0 1 5 2 】

細胞障害性アッセイ法。3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-yl-2,5-ジフェニル）テトラゾリウムプロミド（MTT）アッセイ法を行って、癌細胞に対する細胞障害性を決定した。細胞（ウェルあたり $5 \times 10^3$ ）を5% CO<sub>2</sub>で37℃にて、培地の100：1となるように96ウェル培養プレートに播種した。一晩インキュベーションしたの後、上清を除去し、明記した種々の濃度のタンパク質を含む新鮮な培地を付着細胞に添加した。これらの細胞を、明記した種々の時間インキュベートした後、10 μlの5 mg/ml MTT（Sigma-Aldrich、St. Louis MO）溶液を培養細胞に添加し、37℃にて2時間インキュベーションすることによるMTTアッセ

50

イ法によって生細胞の数を決定した。40 mM塩酸のイソプロパノール溶液を100 µl添加することによってMTT反応を停止した。形成されたMTTホルマザンを、Mosmannによって記述された方法に従って、分光光度計で測定した (J. Immunol. Methods 65 : 55-63 (1983))。

#### 【0153】

合成H.8ペプチドは、LN-229 (図2A) または乳癌MCF-7 (図2B) 細胞に対してごくわずかな細胞障害性しか有さなかった。アズリン (Paz) の効果は、乳癌 (図2B) 細胞でなくグリア芽細胞腫 (図2A) において、アズリン濃度が10 µM ~ 40 µMに上昇するにつれて細胞障害性が増加し、低いながらも用量依存的であった。細胞障害性は、6時間のインキュベーション期間にわたってわずかに増加するだけであった。グリア芽細胞腫および乳癌細胞におけるPaz、Paz-H.8、H.8-PazおよびLazの細胞障害性の相違は、最も顕著であった。Paz、Paz-H.8、H.8-PazおよびLazは、種々のインキュベーション期間についてのMCF-7細胞の全ての用量にて本質的に同一の細胞障害性を有するものの (図2B) 、Pazは、グリア芽細胞腫細胞に対してPaz-H.8、H.8-PazまたはLazよりも、特により短いインキュベーション期間 (6時間) にて、非常に低い細胞障害性を有していた。したがって、H.8部分は、それ自体では細胞障害性を欠いているものの、グリア芽細胞腫細胞に対してだけではなく乳癌細胞に対してもPazの細胞障害性を増強しているようであった。

#### 【0154】

実施例3。Pazに存在するH.8エピトープまたはLazは、グリア芽細胞腫細胞におけるアズリンの取り込みを促進する

Pazと比較したグリア芽細胞腫細胞に対するPaz-H.8、H.8-PazおよびLazの細胞障害性の増強により、H.8部分がいくらかグリア芽細胞腫細胞のアズリンの摂取を促進するかどうかという問題が生じた。Alexa fluor (登録商標) 568標識した赤色蛍光タンパク質 (Invitrogen-Molecular Probe Corp., Carlsbad CA) を使用して、グリア芽細胞腫細胞および乳癌細胞内部へのこれらのタンパク質の内部移行を決定した。この技術は、MCF-7細胞においてアズリンの内部移行を証明するために以前使用した (Punj, et al., Oncogene 23 : 2367-2378 (2004) ; Yamada, et al., Cell. Microbiol. 7 : 1418-1431 (2005) )。

#### 【0155】

共焦点顕微鏡法。顕微鏡試料の調製のためには、細胞を5% CO<sub>2</sub>下で37 °Cにて、カバーガラス上で一晩培養した。予め37 °Cに暖めた新鮮な培地を、赤色蛍光標識 (Alexa fluor (登録商標) 568) したアズリンまたはGST融合物の誘導体と混合して、細胞と共に示した時間インキュベーションした。細胞をPBSで洗浄して、メタノールで-20 °Cにて5分間固定した。PBSで3回洗浄し、核染色用の1.5 mg/ml 4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) を含むマウント媒体 (VECTASHIELD, Vector Laboratories, Burlingame CA) を添加した後、Carl Zeiss LSM510レーザー走査共焦点顕微鏡を使用することによってイメージを取り込んだ。 (Yamada, et al., Cell. Microbiol. 7 : 1418-1431 (2005) )。

#### 【0156】

アズリン (Paz) は、Paz-H.8、H.8-PazおよびLazよりも減少した効率で内部移行し、神経グリア芽細胞腫LN-229細胞 (図3Aおよび4A) におけるPazの侵入については障壁があることを示している。対照的に、Pazは、以前に報告されたようにPaz-H.8、H.8-PazまたはLazと同等またはいくらか高い効率で、乳癌MCF-7細胞において効率的に内部移行した (図3Bおよび4B)。 (Punj, et al., Oncogene 23 : 2367-2378 (2004) ; Yamada, et al., Cell. Microbiol. 7 : 1418-1431 (2005) )。LN-229細胞におけるLaz侵入の用量依存性により、37 °Cにて30分間のインキュベーションの間に約16 µMの最適濃度が証明され (図3Cおよび4C)、それ以上インキュベーションしてもさらなる増強はなかった (データ示さず)。10 µM濃度では、大量のLazが約10 ~ 20分でLN-229細胞に内部移行されたものの (図3Dおよび4D)、Pazの内部移行は、このような条件下で最小であり (図3E)、Pazの内部移行がLN-229細胞において本質的に非効率的であったことを示唆している。Paz-H.8およびH.8-Pazの有意な内部移行は、Lazと同様に、しかしLN-229細胞におけるPazとは対照的に (図3Aおよび4A)、PazのN末端またはC末端のいずれかにおけるH.8部分の相対位置は、グリア

10

20

30

40

50

芽細胞腫細胞におけるPaz部分の内部移行を増する能力に影響を及ぼさなかったことを示唆するように見えた。

【0157】

実施例4。H.8部分は、乳癌細胞ではなくグリア芽細胞腫細胞におけるPaz侵入を促進する

H.8エピトープが、Lazと同様にPazの一部分であることを必要とするかどうか、またはそれが単独でグリア芽細胞腫細胞へのPaz侵入を促進するように機能することができるかを決定するために、H.8単独に加えて種々のH.8融合タンパク質を使用した (where)。39アミノ酸の合成H.8部分などの小ペプチドは、溶液中で低安定性を有するので、本発明者らは、Paz-H.8またはH.8-Pazと同様に、H.8部分を有するグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) 融合物を、H.8をGSTのN末端に (H.8-GST) またはGSTのC末端に (GST-H.8) 組み込むように構築した。GST融合物ペプチドの構築は、実施例1の下に記述してある。

10

【0158】

赤色蛍光を発するAlexa fluor (登録商標) 568抱合Pazを、非標識の合成H.8ペプチド、GST、GST-H.8およびH.8-GST融合タンパク質と別々に、対照としてのリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) と共にインキュベーションして、37にて30分間インキュベーションの後にLN-229細胞における20 μM Paz混合物の内部移行を決定した。合成H.8ペプチドは、Pazと共に別々に導入したときに、PBS (図5E)、GST (図5B) またはGST-H.8 (図5C) と比較して、Pazの内部移行を増強した (図5A)。蛍光の定量化により、H.8ペプチドがPaz侵入を2.1倍刺激することが示された。しかし、H.8-GSTの存在は、Pazの内部移行を有意に増強した (3倍を超える) (図5D)。一方で、GST-H.8は、軽度の刺激のみを示した (図5C)。Paz自体は、グリア芽細胞腫細胞にゆっくりと侵入しただけであり (5E図)、脳腫瘍細胞における侵入は、H.8によって媒介されることを証明している。H.8単独では、グリア芽細胞腫細胞に侵入しなかったが (図3A)、Pazが内部移行を刺激する能力は (図5A)、脳腫瘍細胞へのタンパク質の侵入を促進する能力を反映している。

20

【0159】

実施例5。グリア芽細胞腫細胞におけるH.8-GST存在下でのPazの内部移行の増強により、このような細胞により高い細胞障害性が導かれる

本発明者らは、合成H.8ペプチド、GST、GST-H.8およびH.8-GSTタンパク質 (それぞれ20 μM) をLN-229細胞と共に、20 μM Pazの有無において24時間インキュベーションし、次いで24時間後にMTTアッセイ法によって生存可能なグリア芽細胞腫細胞を測定することにより、細胞障害性の程度を測定した。Paz非存在下では、H.8ペプチド、GSTまたはGST融合タンパク質のいずれも、いかなる有意な細胞障害性も示さなかった (図5F、-Paz)。20 μM Pazの存在下では、それ自体がH.8ペプチドまたはPBS存在下での低細胞障害性を示し、H.8-GSTの存在下においてのみ、かなりの細胞障害性の増強が観察されたが (図5F、+Paz)。GST自体またはGST-H.8では、いくらかの細胞障害性の増強が示された (図5F、+Paz)。合わせると、これらのデータは、H.8部分が、Pazなどのタンパク質の一部として存在するか、またはタンパク質の存在下にあるときに、このような細胞内部へのPazの輸送を促進して、細胞障害性の増強を生じることを示唆している。

30

【0160】

実施例6。H.8は、BBBの横断を媒介して脳内に侵入することができる

H.8エピトープが、グリア芽細胞腫LN-229細胞において融合物または個々のタンパク質の内部移行を増強させる能力 (図3A、4Aおよび5D) により、H.8-PazまたはLazのN末端の一部としてのH.8がBBBの横断を促進して、末梢循環から脳細静脈へのこれらのタンパク質の輸送を可能にするかどうかという疑問が生じた。

40

【0161】

オデッセイ (登録商標) アッセイ法。全てのタンパク質は、製造業者によって推奨される条件下でIRDye (登録商標) 800CW (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska) を使用して標識した。IRDye (登録商標) 800CWと抱合させた500 μg のPaz、H.8-PazおよびLazをヌードマウスの腹腔内に注射した。24時間後、マウスを屠殺して、脳を取り出し、脳イメ

50

ージをLI-COR Odyssey (登録商標) Infrared Imaging System (84 μmの分解能、1mmのオフセット)で検出した。次いで、マウス脳を水平に切断して、標識されたタンパク質の存在を検出するために吻側中脳領域のイメージを得た。

#### 【0162】

アズリンタンパク質の蛍光の定量化。蛍光の定量化は、以下の通りにAdobe (登録商標) Photoshop (登録商標)を使用することによって測定した：一つの細胞をPhotoshop (登録商標)のLasso Toolによって選択し、平均値をイメージメニューの赤色ヒストグラムから得た。少なくとも3つの異なる細胞を一つの試料につき測定し、標準偏差を算出した。

#### 【0163】

赤外色素IRdye (登録商標) 800 CW (LI-CO Bioscience) で標識した500 μg のPaz、H.8-PazおよびLazタンパク質を生きているヌードマウスの腹腔内に注射した。24時間後、マウスを屠殺して、脳を単離し、LI-COR Odyssey (登録商標) Infrared Imaging systemを使用してイメージを得た。Pazは脳細静脈に少量侵入することが見いだされたものの、より多くのLaz、特にH.8-Paz (4倍を超える)が、このような条件下で脳内部に検出され (図6)、脳への融合タンパク質の侵入を可能にするというH.8エピトープの明らかな役割を証明している。

#### 【0164】

実施例7。H.8 エピトープは、N末端に存在するときに、周辺質タンパク質の細菌表面提示を可能にする。

LazにおけるH.8エピトープがN末端に局在することが、その表面提示に寄与するかどうかを調べるために、H.8融合物の誘導体を、実施例1に記載されているように、GST (図5) およびPaz (図2および図3A/Bおよび4A/B) のN- およびC末端に構築した。

#### 【0165】

大腸菌における表面露出されたタンパク質の局在。pET29a-gst、pET29a-H.8-gstまたはpET29a-gst-H.8を収容する大腸菌BL21 (DE3) 株およびpUC19-paz、pUC19-paz-H.8、pUC18-H.8-pazまたはpUC18-lazを収容する大腸菌JM109株を0.4 mM イソブロピル-D-チオガラクトシド (IPTG) と共に37 ℃で培養した。これらの細菌培養液の1 mlずつを遠心し、生じるペレットを回収した。PBSで2回洗浄後、GST誘導体については抗GST抗体 (1 : 2000) またはアズリン誘導体については抗アズリン抗体 (1 : 500) を含む1 mlの1% FBS-PBSを添加した。細胞懸濁液を1時間氷上でインキュベーションして、次いでPBSで2回洗浄した。GST誘導体についてはFITC抱合した抗ウサギIgGまたはアズリン誘導体についてはFITC抱合した抗ウサギ抗体を加え、30分間氷上でインキュベーションした。結合していない抗体を除去するために、細胞をPBSで2回洗浄して、氷上にてエタノールで固定した。次いで、DAPIで処理した大腸菌試料を共焦点顕微鏡下で観察した。

#### 【0166】

H.8融合タンパク質を精製した (図1Eおよび図7A)。GSTの細胞局在、並びにNおよびC末端における2つのH.8融合物 (H.8-GSTおよびGST-H.8) を図7Bに示してある。3つの全てのタンパク質は、抗GST抗体を使用するウエスタンプロットで検出したときに、大腸菌において高発現されており、大腸菌の細胞全体の可溶化液中に存在していた (図7B)。周辺質画分を大腸菌から単離して、3つのタンパク質の存在を調べたときに、GSTおよびGST-H.8タンパク質が有意な量で検出されたが (図7B、周辺質画分のレーン1および3)、少量のH.8-GSTをこのような周辺質画分において検出することができただけであった (図7B、周辺質画分のレーン2)。

#### 【0167】

残りのH.8-GST融合タンパク質が大腸菌細胞の表面へ輸送されたかどうかを調べるために、3つのタンパク質を高発現する細胞を培養して回収し、洗浄し、あらゆる表面に露出したGSTに結合するための抗GST抗体で処理し、再び洗浄し、FITC抱合した二次抗体によって処理した。GSTが表面に露出された場合、抗GST抗体はそれらに結合し、次いでそれらは、FITCが結合した二次抗体によって検出されるであろう。実際は、H.8-GSTを収容する大腸菌細胞だけが、FITCが発生する緑色蛍光を示し (図7C、H.8-GST)、GSTのN末端にH.8エ

10

20

30

40

50

ピトープが存在すると細胞表面への輸送が促進されることを示唆している。GSTのC末端にH.8部分が存在 (GST-H.8) すると、並びにGST自体は、何ら表面提示することなく、主に周辺質および細胞内に留まっていた (図7C、GSTおよびGST-H.8)。

【0168】

上記のものと同じ技術を使用して、本発明者らは、PazおよびPaz-H.8が細胞内のままであるが (図7D、PazおよびPaz-H.8) 、一方のH.8-PazおよびLazが共に表面提示を示すことを決定し、おそらく脂質化のための遊離のシステインを必要とするN末端におけるH.8の存在は、外膜を通過して表面に到達するような融合タンパク質の輸送のために重要であることを確認した。

【0169】

実施例8. 癌に罹患している患者の治療

H.8-Paz融合物 (研究対象薬) の第I/II相臨床試験は、癌に罹患する患者において行われるであろう。具体的には、淋菌のLazをコードする遺伝子 (laz) 由来のH.8ドメインおよび積荷化合物は、緑膿菌由来のアズリン (paz) であり、融合タンパク質「H.8-paz」を作製する。この融合タンパク質は、実施例1にて例証したように構築されるであろう。

【0170】

組織学的に検証された脳癌を有する49人の成人の患者であって、現在利用可能なFDA認可の化学療法剤および治療計画による適切な治療の後に、臨床的およびX線撮影的な進行または再発が示された患者を、研究対象薬を投与する多施設共同前向き研究に登録する。この研究への登録に適格であるためには、全ての患者は、承認された化学療法治療計画の経過の完了後に、測定可能な腫瘍の体積が増加していることを証明する。持続的な転移病巣の証拠および/または大きさもしくは体積の連続的な増大が組織学的に確立されなければならない。この組織学的証明は、微細針吸引 (FNA) 生検によって得ることができる。

【0171】

治療プログラムは、イリノイ大学、シカゴの施設内倫理委員会およびFDAに従って全ての患者からのインフォームドコンセントを得た後に開始される。患者は、提唱された療法の効果の適切な評価の妨げとなるかもしれないその他の悪性腫瘍、以前の悪性腫瘍歴、血液疾患、インシュリン依存性糖尿病またはその他の深刻な心臓血管疾患などの併発症を有しないであろう。肝機能研究 (LFT) を含む基礎となる血液研究 (完全血液検査 [CBC] および血清化学) が療法の開始前に行われる。全ての適格患者が、治験の期間の間に同時に任意の癌化学療法を受けなければならないというわけではない。

【0172】

研究対象薬は、研究対象薬の薬学的に許容される製剤を毎日、静注によって12週間投与して、任意の用量限定毒性について被験体を観察する。10 mg/kg/日で開始して、50 mg/kg/日の極量まで5 mg/kg/日ずつ増加する7用量レベルであるだろう。それぞれの服用レベルの有効性を進行性の測定可能な癌を有する7人の患者において記録する。

【0173】

反応を2次元 (aおよびb) で測定可能な腫瘍を測定することによって見積もる。1) 標的腫瘍の総消失は、完全寛解 (CR) とみなし ; 2) 75%減少は、優秀な部分的応答 (PR) とみなし ; および3) 優れた反応 (PR) は、50%までの治療後縮小である。4) サイズの25%減少は、安定疾患 (SD) とみなし、および5) 25%以下の減少は、無反応 (NR) とみなす。病気の進行を示す患者では、その治療が中断されることもあるが、さらに12週間続けられるであろう。

【0174】

標的腫瘍の総消失およびいかなるサイズ縮小も、H.8-アズリン治療が癌を治療するためには有効であることを示すであろう。H.8-アズリン治療が有効であるというその他の指標は、新たな脳腫瘍の出現の減少率および腫瘍と関連する血管形成の減少である。

【0175】

記述した本発明の実施例および系の種々の修正変更は、本発明の範囲および精神から離れることなく、当業者には明白であろう。本発明は、具体的な態様と関連して記述したが、

10

20

30

40

50

請求した本発明は、このような具体的な態様に過度に限定されるべきでないことが理解されるべきである。実際に、関連分野における当業者にとって明らかである本発明を実施するために記述された様式の種々の修正も、特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0176】

【図1】淋菌(A)由来のlazおよび緑膿菌(B)由来のpazの概略図を示す。大腸菌においてクローニングおよび高発現するための緑膿菌アズリン遺伝子は、アズリン遺伝子(paz)自体およびその周辺質の位置を決定するシグナルペプチド(psp)配列(B)からなった。lazのH.8領域は、ナイセリアのシグナル配列nsp(pUC18-H.8-paz)を含むpaz遺伝子(C)の5'末端に、またはpaz遺伝子(D)(pUC19-paz-H.8)の3'末端にてフレームにクローニングした。構築物を調製するための詳細な手順は、実施例1に示してある。naz、laz遺伝子に存在する淋菌のアズリン様配列；nsp、ナイセリアシグナルペプチド配列。シグナルペプチド配列は、いずれの場合においても、切断されて成熟したPaz(周辺質の)およびLaz(表面曝露された)タンパク質を産生する。(E)、Laz、Pazおよび融合タンパク質のSDS-PAGE。Laz、H.8-PazまたはPaz-H.8(全て約17kDa)などのH.8融合タンパク質の異常な泳動は、石化した(lapidated)H.8含むタンパク質で以前に有名であった(Cannon, Clin. Microbiol. Rev. 2:S1-S4(1989))。

【図2】H.8-Paz融合タンパク質が種々の癌細胞に対して細胞毒である程度を図示するグラフを示す。(A)グリア芽細胞腫LN-229細胞に向けた、合成H.8ペプチド、Paz、LazおよびPaz(Paz-H.8)のカルボキシ末端およびPaz(H.8-Paz)のアミノ末端でのH.8融合物の細胞傷害性。細胞を3つの異なる濃度(10、20および40μM)で、6、12および24時間にて、タンパク質で処理した。MTTアッセイ法を行って、細胞障害性(パーセント細胞死)の根拠となる生細胞の程度を測定した。パーセンテージ細胞障害性を算出するために、無処置の生細胞の値を100%であるように記録し、生細胞の数は、Paz、LazおよびH.8-融合タンパク質で処理した試料において決定した。次いで、細胞障害性の程度(%)を死細胞の数から決定した。(B)ヒト乳癌MCF-7細胞に向けたH.8ペプチド、Paz、Paz-H.8、H.8-PazおよびLazの細胞障害性。全ての処理条件は、上記(A)と同様である。

【図3】グリア芽細胞腫LN-229および乳癌MCF-7細胞に対する種々の蛍光標識されたアズリン結合タンパク質の侵入を示す。(A)Alexa fluor(登録商標)568と抱合させたH.8ペプチド、Paz、Paz-H.8、H.8-PazおよびLaz(それぞれ20μM)をLN-229細胞と共にカバーガラス上で37℃にて30分間インキュベートし、その後イメージを撮った。(B)共焦点顕微鏡観察によって視覚化した、および(A)について記述した、Alexa fluor(登録商標)568と抱合させた種々のタンパク質のMCF-7細胞内への内部移行。(C)Lazの内部移行は、共焦点顕微鏡観察によって視覚化した。種々の濃度(2、4、8および16μM)の蛍光標識したLazをLN-229細胞と共に37℃にて30分間インキュベートした。核は、DAPI(4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)で青く標識される。(D)Alexa fluor(登録商標)568と抱合させたLaz(10μM)をLN-229細胞と共に37℃にて種々の時間(5、10、20および30分)インキュベートした。内部移行は、共焦点顕微鏡観察によって視覚化した。(E)Alexa fluor(登録商標)568と抱合させたPaz(10μM)をLN-229細胞と共にカバーガラス上で37℃にて種々の時間インキュベートし、その後イメージを撮った。(E)では、ごくわずかな測定可能な蛍光しか検出されなかった。

【図4】図3A～Dの共焦点顕微鏡イメージで見いだされる蛍光の定量化を示す棒グラフを示す。(A)図3Aのイメージの蛍光の定量化。アズリンタンパク質の蛍光の定量化は、Adobe(登録商標)Photoshop(登録商標)を使用することにより行った。エラーバーは、单一試料における3回の異なる細胞の蛍光の標準偏差を表す。(B)図3Bのイメージの蛍光の定量化。定量化は、図4Aのように行なった。(C)図3Cのイメージの蛍光の定量化。定量化は、図4Aのように行なった。(D)図3Dのイメージの蛍光の定量化。定量化は、図4Aのように行なった。

【図5】H.8-GST融合タンパク質と組み合わせた処理は、グリア芽細胞腫LN-229細胞へのA

10

20

30

40

50

lexa fluor (登録商標) 568で標識したPazの摂取を促進する。非標識の20 μMの(A) H.8、(B) GST、(C) GST-H.8、(D) H.8-GST、(E) PBS緩衝液およびAlexa fluor (登録商標) 568と抱合させた20 μM PazをLN-229細胞と共に37 ℃にて30分間インキュベートした。内部移行は、共焦点顕微鏡観察によって視覚化した。(F) Pazの有無における合成H.8ペプチド、GSTおよびGST-H.8 / H.8-GST融合誘導体の細胞障害性。およそ $5 \times 10^3$  LN-229細胞を96ウェル培養プレートに播種して、20 μM Pazと共に(+Paz)、または伴わずに(-Paz)、20 μMのそれぞれのH.8ペプチド、GST、GST-H.8、H.8-GSTまたは同体積のPBS緩衝液で24時間処理した。

【図6】IRdye (登録商標) 800CW (LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebraska) と抱合させたPaz、H.8-PazおよびLazを注射したマウスの脳のイメージを示す。(A)生きているマウス由来の脳イメージ。IRdye (登録商標) 800CWと抱合させた500 μgのPaz、H.8-PazおよびLazを生きているヌードマウスの腹腔内に注射した。24時間後、マウスを屠殺して、脳を摘出し、蛍光を検出して、LI-COR Odyssey (登録商標) Infrared Imaging Systemで測定した。(B) (A)のように処理したヌードマウス脳の頭側中脳領域イメージ。マウス脳を水平に切断してイメージを撮った。

【図7】図8は、大腸菌におけるH.8-Gst融合タンパク質の局在化のSDS-PAGE、ウエスタンプロット法および共焦点顕微鏡イメージを示す。(A) . クローン化されたgst、H.8-gstまたはgst-H.8遺伝子を有する大腸菌BL21 (DE3) 細胞を0.1mM IPTGと共に37 ℃にて培養した。細胞ペレットをPBSで2回洗浄し、細胞全体の可溶化液をSDS-PAGEで泳動した。タンパク質の検出のためにクマシーブルー染色を使用した。(B) . 上記手順を繰り返したが、今回は、細胞全体の可溶化液および細胞膜周辺腔の内容物の両方を別々に単離して、SDS-PAGE (20 μgタンパク質) で泳動し、GSTまたはGST-H.8融合タンパク質をモノクローナル抗-GST抗体でのウエスタンプロット法によって検出し、タンパク質の総能動および周辺質濃度を決定した。(C) . クローン化されたgst、H.8-gstまたはgst-H.8遺伝子を有する大腸菌株BL21 (DE) 細胞 (表5) を37 ℃にて0.4mM IPTGと共に培養した。1mlのこれらの細菌培養のそれを遠心し、生じる細菌ペレットを収集した。PBSで2回洗浄した後に、抗GST抗体 (1:2000) を含む1mlの1%のFBS-PBSを適用した。細胞懸濁液を1時間インキュベートし、次いでPBSで2回洗浄した。細菌細胞を1%のFBS-PBS中でFITC抱合抗ウサギIgGと共に30分間インキュベートした。結合していない抗体を除去するために、細胞を再び洗浄して、氷上のエタノールで固定した。DAPIで処理した大腸菌試料 (青い呈色を与える) を共焦点顕微鏡観察 (×100対物レンズ) 下で観察し、単一細胞を撮影した。(D) . pUC19-paz (緑膿菌アズリン)、pUC19-laz (ナイセリア)、pUC18-H.8-pazまたはpUC18-paz-H.8を有する大腸菌細胞を0.1mM IPTGの存在において37 ℃にて一晩培養した。このような培養の0.5mlを遠心分離して、生じる細菌ペレットを冷却したPBSで2回洗浄した。1mlの1%のFBS-PBS中の抗アズリン抗体 (1:500) を適用して、氷上で1時間インキュベートしたPBSで。2回洗浄後、FITC抱合抗ウサギ抗体を適用し、氷上で30分間インキュベートして、PBSで2回洗浄し、冷却エタノールで固定した。細菌試料を共焦点顕微鏡観察 (×100対物レンズ) によって観察した。

【図1】

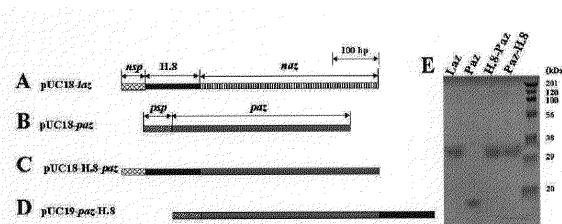


Figure 1

【図3】

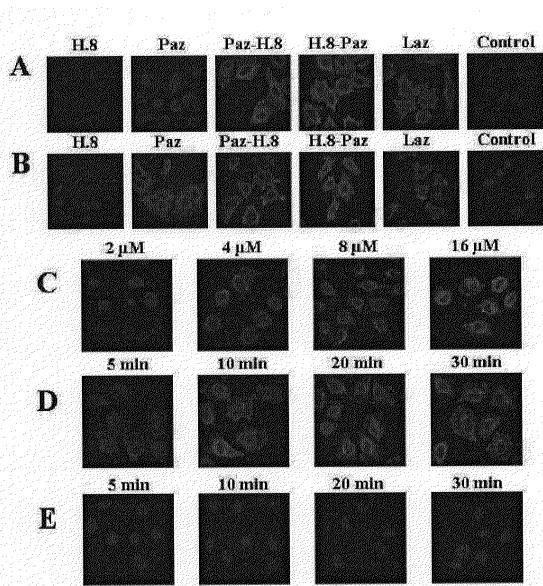


Figure 3

【図2】

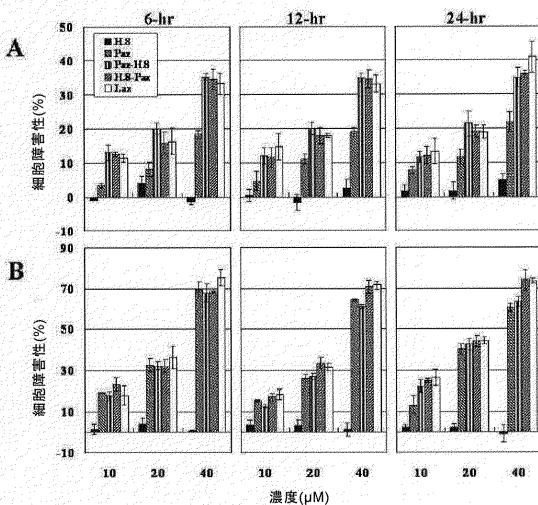


Figure 2

【図4】

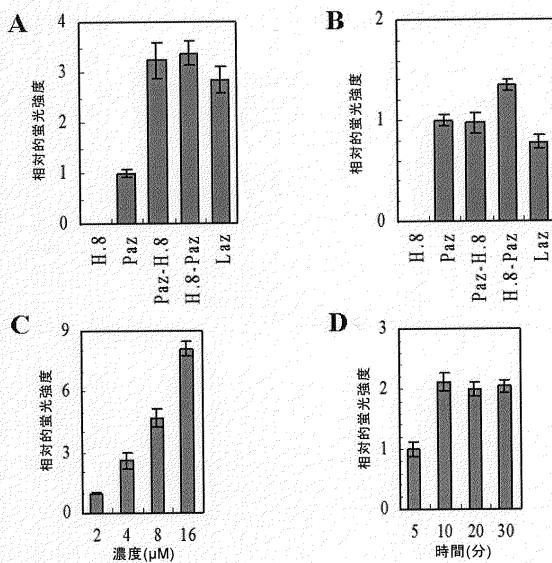


Figure 4

【図5】

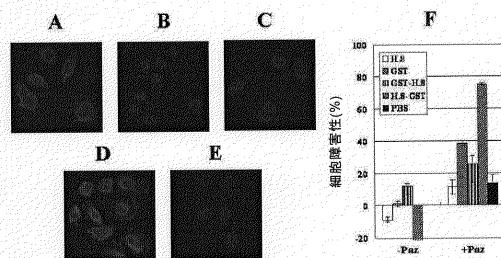


Figure 5

【図6】

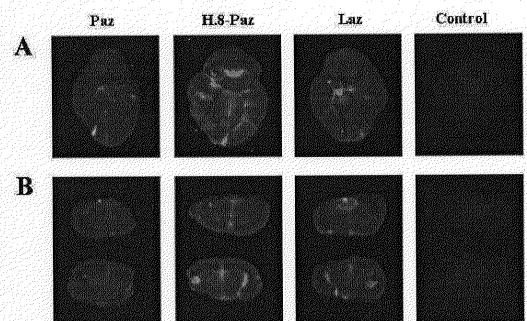


Figure 6

【図7】

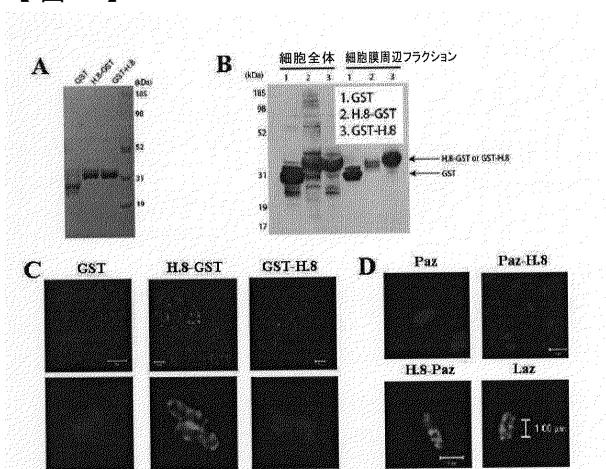


Figure 7

【配列表】

2009502135000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 06/28022																		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8): C12P 21/04 (2007.01) USPC: 435/69.7; 435/71.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 435/69.7; 435/71.3;																				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <a href="http://scholar.google.com">http://scholar.google.com</a> Keyword= azurin or Laz and brain																				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST: DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; terms=neisseria or azurin and tumor																				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">Applicant's Admitted Prior Art, page 3, Ins19-27; page 9, ln 16; page 25, Ins 5-13</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-8 and 35-39</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">9-17, 19-24, 27-34, 40-44</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">WO 2004/046177 A2 (Chiron SRL) 03 June 2004 (03.06.2004), page 3, Ins 13-14, 27-34;</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">9-17, 19-24, 27-34, 40-44</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 2005/0037341 A1 (Dieryck et al) 17 February 2005 (17.02.2005), para [0034]-[0035].</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">19-20, 30-34, 41-44</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 2002/0110872 A1 (Chakrabarty et al) 15 August 2002 (15.08.2002), Fig.4, para [0059], [0088], [0090]</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">17, 21-24, 27-34, 41-44</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	Applicant's Admitted Prior Art, page 3, Ins19-27; page 9, ln 16; page 25, Ins 5-13	1-8 and 35-39	Y		9-17, 19-24, 27-34, 40-44	Y	WO 2004/046177 A2 (Chiron SRL) 03 June 2004 (03.06.2004), page 3, Ins 13-14, 27-34;	9-17, 19-24, 27-34, 40-44	Y	US 2005/0037341 A1 (Dieryck et al) 17 February 2005 (17.02.2005), para [0034]-[0035].	19-20, 30-34, 41-44	Y	US 2002/0110872 A1 (Chakrabarty et al) 15 August 2002 (15.08.2002), Fig.4, para [0059], [0088], [0090]	17, 21-24, 27-34, 41-44
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	Applicant's Admitted Prior Art, page 3, Ins19-27; page 9, ln 16; page 25, Ins 5-13	1-8 and 35-39																		
Y		9-17, 19-24, 27-34, 40-44																		
Y	WO 2004/046177 A2 (Chiron SRL) 03 June 2004 (03.06.2004), page 3, Ins 13-14, 27-34;	9-17, 19-24, 27-34, 40-44																		
Y	US 2005/0037341 A1 (Dieryck et al) 17 February 2005 (17.02.2005), para [0034]-[0035].	19-20, 30-34, 41-44																		
Y	US 2002/0110872 A1 (Chakrabarty et al) 15 August 2002 (15.08.2002), Fig.4, para [0059], [0088], [0090]	17, 21-24, 27-34, 41-44																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																				
* 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 application or patent 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																			
7 Feb 2007 (07.02.2007)	03 MAY 2007																			
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/715 (2006.01)	A 6 1 K 31/715	4 C 0 9 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 6 0 1
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/18 (2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 29/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/02	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
A 6 1 K 49/04 (2006.01)	A 6 1 K 49/04	A
C 0 7 K 14/22 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	C
C 0 7 K 14/21 (2006.01)	C 0 7 K 14/22	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/21	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 B 5/055 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	
A 6 1 B 8/00 (2006.01)	A 6 1 B 5/05 3 8 3	
	A 6 1 B 8/00	

(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,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,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,L,C,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

- (74) 代理人 100075672  
弁理士 峰 隆司
- (74) 代理人 100109830  
弁理士 福原 淑弘
- (74) 代理人 100095441  
弁理士 白根 俊郎
- (74) 代理人 100084618  
弁理士 村松 貞男
- (74) 代理人 100103034  
弁理士 野河 信久
- (74) 代理人 100140176  
弁理士 砂川 克
- (74) 代理人 100092196  
弁理士 橋本 良郎
- (74) 代理人 100100952

弁理士 風間 鉄也

(72)発明者 ホン、チャン

アメリカ合衆国、イリノイ州 60607、シカゴ、アパートメント 704、サウス・アシュラ  
ンド・アベニュー 901

(72)発明者 山田 亨

アメリカ合衆国、イリノイ州 60148、ロンバード、イースト・ノース・ブロードウェイ・ス  
トリート 422

(72)発明者 フィアロ、アルセニオ

ポルトガル国、1500-401 リスボン、ロト 23 3 イーエスキュー、パセタ・マエス  
トロ・イボ・クルズ(番地なし)

(72)発明者 ダス・グブタ、タパス

アメリカ合衆国、イリノイ州 60305、リバー・フォレスト、ジャクソン・アベニュー 13  
17

(72)発明者 チャクラバーティ、アンダ

アメリカ合衆国、イリノイ州 60181、ビラ・パーク、ジュリア・ドライブ 206

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA38 BA80 CA01 DA02 EA10 FA20 GA11 HA01

4C076 AA11 AA16 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 BB40 CC01 CC10

CC11 CC27 CC29 CC35 EE41A EE59A FF32 FF68

4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 AA19 AA20 BA44 CA04 DA32 MA05

MA16 MA56 MA66 NA10 NA12 NA13 ZA011 ZA021 ZA061 ZA081

ZA121 ZA161 ZA181 ZA361 ZA941 ZB261 ZC551

4C085 HH05 HH07 HH09 HH11 JJ01 KB79 KB82 KB92 LL18

4C086 AA01 AA02 EA16 EA20 MA02 MA05 MA07 MA16 MA56 MA66

NA10 NA12 NA13 ZA01 ZA02 ZA06 ZA08 ZA12 ZA16 ZA18

ZA36 ZA94 ZB26 ZC55

4C096 AA11 FC14

4C601 DD11 DE07

4H045 AA10 BA13 BA41 CA11 DA83 EA28 FA74