

(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2016-520557

(P2016-520557A)

(43) 公表日 平成28年7月14日 (2016.7.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02	4 C 0 7 6
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-507115 (P2016-507115)	(71) 出願人	515283747
(86) (22) 出願日	平成26年4月10日 (2014.4.10)		バイオ・ブラスト・ファーマ・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月11日 (2015.11.11)		B i o B l a s t P h a r m a L t d .
(86) 国際出願番号	PCT/IL2014/050354		イスラエル6522042テルアビブ、メ
(87) 国際公開番号	W02014/170896		ナチュム・ビギン・ストリート37番、ル
(87) 国際公開日	平成26年10月23日 (2014.10.23)		ビンスタイン・タワー、フィフティーンス
(31) 優先権主張番号	61/811, 934		・フロア
(32) 優先日	平成25年4月15日 (2013.4.15)	(74) 代理人	100081422
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	61/869, 981	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成25年8月26日 (2013.8.26)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100122301
(31) 優先権主張番号	14/034, 224		弁理士 富田 憲史
(32) 優先日	平成25年9月23日 (2013.9.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ミトコンドリアタンパク質構築物およびその使用

(57) 【要約】

完全細胞内のミトコンドリアに入ることができる機能的ミトコンドリアタンパク質を含む新規融合タンパク質構築物を開示する。さらに、開示した融合タンパク質によるミトコンドリア障害の治療方法およびそのための組成物を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、機能的ヒトミトコンドリアタンパク質、および該TATドメインと該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質の間に位置するヒトミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む、該ヒトMTSが該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質とヘテロローガスである融合タンパク質。

【請求項2】

該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質が該ヒトMTSに対してC末端にある請求項1記載の融合タンパク質。

【請求項3】

該ミトコンドリアタンパク質が機能的ヒトミトコンドリアタンパク質それ自体であり、および/またはミトコンドリア多成分複合体の成分である請求項1または2記載の融合タンパク質。

【請求項4】

該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質がフラタキシンおよびオルニチントランスカルバモイラーゼ(OTC)のいずれかである先の請求項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項5】

該MTSが、約3～約5非連続塩基性アミノ酸残基および所望により約1～約3または4または5セリン/トレオニン残基を含む約15～約40アミノ酸残基を含む先の請求項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項6】

該MTSが、配列番号23に記載のアミノ酸配列を有するヒトミトコンドリアクエン酸シンターゼMTS、配列番号24に記載のアミノ酸配列を有するヒトリポアミドデヒドロゲナーゼMTS、配列番号25に記載のアミノ酸配列を有するヒトC6ORF66遺伝子産物のMTS、および配列番号16に記載の核酸配列によりコードされるヒトミトコンドリアGLUD2のMTSのいずれかである先の請求項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項7】

該MTSが、配列番号23に記載のアミノ酸配列を有するヒトミトコンドリアクエン酸シンターゼMTSおよび配列番号24に記載のアミノ酸配列を有するヒトリポアミドデヒドロゲナーゼMTSのいずれかである請求項6記載の融合タンパク質。

【請求項8】

さらに該TATドメインを該MTS配列と共有結合するリンカーを含む先の請求項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項9】

配列番号26で示されるアミノ酸配列を有するヒトフラタキシンと融合した配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、および配列番号23に記載のアミノ酸配列を有するヒトクエン酸シンターゼのミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む配列番号28で示されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質であって、該MTSが該TATドメインと該フラタキシンの間に位置し、配列番号32で示されるアミノ酸配列を有するリンカーを介して該TATドメインと結合している、該フラタキシンがヒトクエン酸シンターゼの該MTSに対してC末端にある融合タンパク質。

【請求項10】

配列番号26で示されるアミノ酸配列を有するヒトフラタキシンと融合した配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、および配列番号24で示されるアミノ酸配列を有するヒトリポアミドデヒドロゲナーゼのミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む、配列番号30で示されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質であって、該MTSが該TATドメインと該フラタキシンの間に位置し、配列番号32で示されるアミノ酸配列を有するリンカーを介して該TATドメインと結合している、該フラタキシンがヒトリポアミドデヒドロゲナーゼの該MTSに対してC末端にある融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

生理学的に許容される担体と活性成分として請求項1～10のいずれかに記載の融合タンパク質を含む組成物。

【請求項 1 2】

医薬的に許容される担体と活性成分として請求項1～10のいずれかに記載の融合タンパク質を含む医薬組成物。

【請求項 1 3】

ミトコンドリア障害を治療または緩和するための請求項12に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

該障害が、フリードライヒ運動失調症またはフラタキシン欠乏または欠陥フラタキシンと関連するあらゆる他の障害またはOTC欠乏または欠陥OTCと関連する障害である請求項13に記載の医薬組成物。

10

【請求項 1 5】

必要とする対象の欠陥もしくは欠損または非機能的ヒトミトコンドリアタンパク質の活性の少なくとも部分を回復するための請求項12記載の医薬組成物。該ヒトミトコンドリアタンパク質はそれ自体活性でありうるかまたは機能的ミトコンドリアタンパク質複合体のメンバーでありうる。

【請求項 1 6】

ミトコンドリア障害の治療または緩和方法に用いるための請求項1～10のいずれかに記載の融合タンパク質。

20

【請求項 1 7】

該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質がフリードライヒ運動失調症またはフラタキシン欠乏または欠陥フラタキシンと関連するあらゆる他の障害の治療または緩和方法に用いるためのフラタキシンである請求項16記載の融合タンパク質。

【請求項 1 8】

該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質がOTC欠乏または欠陥OTCと関連する障害の治療または緩和方法に用いるためのOTCである請求項16記載の融合タンパク質。

【請求項 1 9】

ミトコンドリア障害の治療または緩和方法であって、そのような治療を必要とする対象に治療的有効量の請求項1～10のいずれかに記載の融合タンパク質を投与することにより、ミトコンドリア障害を治療する工程を含む方法。

30

【請求項 2 0】

該機能的タンパク質がフラタキシン、それぞれOTCであり、該ミトコンドリア障害が、フリードライヒ運動失調症またはフラタキシン欠乏または欠陥フラタキシンと関連するあらゆる他の障害またはそれぞれOTC欠乏または欠陥OTCと関連する障害である請求項19記載の方法。

【請求項 2 1】

さらにさらなる治療薬を投与することを含む請求項19または20に記載のミトコンドリア障害の治療または緩和方法。

【請求項 2 2】

該融合タンパク質を該対象に静脈内投与する請求項19～21のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 2 3】

投与する該治療的有効量が約0.5mg/Kg～約2mg/Kg対象体重である請求項19～21のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 4】

対象のミトコンドリア中に機能的ミトコンドリアタンパク質を導入する方法であって、そのような治療を必要とする対象に治療的有効量の請求項1～10のいずれかに記載の融合タンパク質を投与することによりそれを必要とする対象のミトコンドリア内に機能的ヒトミトコンドリアタンパク質を導入する工程を含む方法。

【請求項 2 5】

50

該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質が野生型ヒトミトコンドリアタンパク質の少なくとも部分的活性を回復させる請求項24記載の方法。

【請求項 2 6】

該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質が、野生型ヒトミトコンドリアタンパク質の活性の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または最大100%を回復させる請求項25記載の方法。

【請求項 2 7】

対象に治療的有効量の請求項1~10のいずれかに記載の融合タンパク質を投与することにより、必要とする対象の欠陥もしくは欠損または非機能的ヒトミトコンドリアタンパク質の少なくとも一部の活性を回復させる方法。

10

【請求項 2 8】

それを必要とする対象の酸化ストレスを緩和する方法であって、そのような治療を必要とする対象に治療的有効量の請求項1~10のいずれかに記載の融合タンパク質を投与することにより該対象の酸化ストレスを緩和する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

機能的ミトコンドリアタンパク質を含む新規融合タンパク質構築物を開示する。さらに、開示した融合タンパク質によるミトコンドリア障害の治療方法とそのための組成物を開示する。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

(従来技術)

本願に開示した対象の背景として関連すると思われる参考文献を以下に記載する。

[1] Chinnery PF, Schon EA(2003) Mitochondria. J Neurol Neurosurg Psychiatry 74 : 1188-1199.

[2] DiMauro S, Schon EA(2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. N Engl J Med 348 : 2656-2668.

[3] Brautigam CA, Chuang JL, Tomchick DR, Machius M, Chuang DT(2005) Crystal structure of human dihydrolipoamide dehydrogenase : NAD⁺/NADH binding and the structural basis of disease-causing mutations. J Mol Biol 350 : 543-552.

30

[4] Brady RO, Schiffmann R(2004) Enzyme-replacement therapy for metabolic storage disorders. Lancet Neurol 3 : 752-756.

[5] Wang D, Bonten EJ, Yogalingam G, Mann L, d'Azzo A(2005) Short-term, high dose enzyme replacement therapy in sialidosis mice. Mol Genet Metab 85 : 181-189.

[6] Luft FC(2003) Transducing proteins to manipulate intracellular targets. J Mol Med(Berl) 81 : 521-523.

[7] Kabouridis PS(2003) Biological applications of protein transduction technology. Trends Biotechnol 21 : 498-503.

40

[8] Green M, Loewenstein PM(1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. Cell 55 : 1179-1188.

[9] Frankel AD, Pabo CO(1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. Cell 55 : 1189-1193.

[10] Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, et al.(2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. J Biol Chem 276 : 5836-5840.

[11] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF(1999) In vivo protein transduction : delivery of a biologically active protein into the mouse. Science 285 : 156

50

9-1572.

- [12] Guo X, Hutcheon AE, Zieske JD(2004) Transduction of functionally active TAT fusion proteins into cornea. *Exp Eye Res* 78 : 997-1005.
- [13] Del Gaizo V, MacKenzie JA, Payne RM(2003) Targeting proteins to mitochondria using TAT. *Mol Genet Metab* 80 : 170-180.
- [14] Harding AE(1981) Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 104 : 589-620.
- [15] Schulz JB, Boesch S, Burk K, Durr A, Giunti P, et al.(2009) Diagnosis and treatment of Friedreich ataxia: a European perspective. *Nat Rev Neurol* 5 : 222-234 10
- [16] Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, et al.(1996) Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 335 : 1169-1175.
- [17] Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, et al.(1997) Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet* 6 : 1771-1780.
- [18] Rotig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, et al.(1997) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 17 : 215-217. 20
- [19] Lodi R, Cooper JM, Bradley JL, Manners D, Styles P, et al.(1999) Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 : 11492-11495.
- [20] Delatycki MB, Camakaris J, Brooks H, Evans-Whipp T, Thorburn DR, et al.(1999) Direct evidence that mitochondrial iron accumulation occurs in Friedreich ataxia. *Ann Neurol* 45 : 673-675.
- [21] Tsou AY, Friedman LS, Wilson RB, Lynch DR(2009) Pharmacotherapy for Friedreich ataxia. *CNS Drugs* 23 : 213-223.
- [22] Perlman SL(2012) A review of Friedreich ataxia clinical trial results. *J Child Neurol* 27 : 1217-1222. 30
- [23] Rapoport M, Saada A, Elpeleg O, Lorberboum-Galski H(2008) TAT-mediated delivery of LAD restores pyruvate dehydrogenase complex activity in the mitochondria of patients with LAD deficiency. *Mol Ther* 16 : 691-697.
- [24] Rapoport M, Salman L, Sabag O, Patel MS, Lorberboum-Galski H(2011) Successful TAT-mediated enzyme replacement therapy in a mouse model of mitochondrial E3 deficiency. *J Mol Med(Berl)* 89 : 161-170.
- [25] Vyas PM, Tomamichel WJ, Pride PM, Babbey CM, Wang Q, et al.(2012) A TAT-frataxin fusion protein increases lifespan and cardiac function in a conditional Friedreich's ataxia mouse model. *Hum Mol Genet* 21 : 1230-1247.
- [26] Gakh O, Cavadini P, Isaya G(2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1592 : 63-77. 40
- [27] Cavadini P, Adamec J, Taroni F, Gakh O, Isaya G(2000) Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase. Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J Biol Chem* 275 : 41469-41475.
- [28] Schmucker S, Argentini M, Carelle-Calmels N, Martelli A, Puccio H(2008) The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum Mol Genet* 17 : 3521-3531.
- [29] Gakh O, Bedekovics T, Duncan SF, Smith DYT, Berkholtz DS, et al.(2010) Normal and Friedreich ataxia cells express different isoforms of frataxin with complementary roles in iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* 285 : 38486-38501. 50

- [30] Gavel Y, von Heijne G(1990) Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng* 4 : 33-37.
- [31] Braun HP, Schmitz UK(1997) The mitochondrial processing peptidase. *Int J Biochem Cell Biol* 29 : 1043-1045.
- [32] Horwich A(1990) Protein import into mitochondria and peroxisomes. *Curr Opin Cell Biol* 2 : 625-633.
- [33] Saada A, Edvardson S, Rapoport M, Shaag A, Amry K, et al.(2008) C6ORF66 is an assembly factor of mitochondrial complex I. *Am J Hum Genet* 82 : 32-38.
- [34] Cheng TL, Liao CC, Tsai WH, Lin CC, Yeh CW, et al.(2009) Identification and characterization of the mitochondrial targeting sequence and mechanism in human citrate synthase. *J Cell Biochem* 107 : 1002-1015. 10
- [35] Santos R, Lefevre S, Sliwa D, Seguin A, Camadro JM, et al.(2010) Friedreich ataxia : molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 13 : 651-690.
- [36] Bulteau AL, O'Neill HA, Kennedy MC, Ikeda-Saito M, Isaya G, et al.(2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* 305 : 242-245.
- [37] Richardson TE, Yu AE, Wen Y, Yang SH, Simpkins JW(2012) Estrogen prevents oxidative damage to the mitochondria in Friedreich's ataxia skin fibroblasts. *PLoS One* 7 : e34600. 20
- [38] WO 2009/098682.
- [39] [http:// www.curefa.org/pipeline.html](http://www.curefa.org/pipeline.html).
- [40] Tang N, et al.(2012) Stable Overexpression of Arginase I and Ornithine Transcarbamylase in HepG2 Cells Improves Its Ammonia Detoxification. *Journal of Cellular Biochemistry* 113 : 518-527.
- [41] Cunningham, S. C. et al.(2011) Induction and Prevention of Severe Hyperammonemia in the spfash Mouse Model of Ornithine Transcarbamylase Deficiency Using shRNA and rAAV-mediated Gene Delivery. *Molecular Therapy* 19(5):854-9.

【 0 0 0 3 】

本明細書中の上記参考文献の認識は、本願に開示した対象の特許性と何らかの関連があることを暗示するものではない。 30

【 0 0 0 4 】

(背景)

ミトコンドリアは細胞の恒常性に重要な主な役割を果たし、特に、細胞内情報伝達とアポトーシスに関与し、クエン酸回路（クレブス回路ともいう）ならびにアミノ酸、脂肪酸、ヌクレオチド、およびステロイドの代謝においてピルビン酸酸化などの多くの生化学的役割を果たす。しかしながら、ミトコンドリアの最も重要な役割は、細胞エネルギー代謝における役割である。これには、電子伝達連鎖と酸化的リン酸化反応系による脂肪酸のβ酸化やATPの産生が含まれる[1、2]。

【 0 0 0 5 】

ミトコンドリア中の約900の遺伝子産物のほとんどは、核DNA(nDNA)によってコードされるが、ミトコンドリアDNA(mtDNA)は13のタンパク質をコードする遺伝子を含むだけである。nDNA遺伝子によってコードされるポリペプチドのほとんどはミトコンドリアターゲティング配列(MTS)により合成され、転座機構(TOM/TIM)を介して細胞質からミトコンドリアに導入することができる。ミトコンドリアに入るとMTSは認識され、適切にプロセッシングされ、必要に応じてミトコンドリア酵素複合体に組み立てることができる[3]。 40

【 0 0 0 6 】

現在、遺伝的ミトコンドリア代謝障害の治療法はなく、治療はほとんど一時的緩和である。

【 0 0 0 7 】

酵素またはタンパク質置換療法(E/PRT)は、欠損または欠如タンパク質/酵素を人工的に製造し、精製し、それを必要とする患者に定期的に静脈内投与する代謝障害の治療的アプローチである。

【0008】

長年の幅広い研究の後、E/PRTは、ゴーシェ病、ファブリー病、およびムコ多糖症1型(MPS 1)の弱毒変異種を含む代謝性リソソーム蓄積症に最適な治療としてうまく認められてきた。しかしながら、静脈内投与した酵素が血液脳関門を通り抜けることができないため、中枢神経系(CNS)を含む他の代謝障害の治療にこのアプローチを適用するのは非常に限られる[4、5]。

【0009】

タンパク質を細胞内に送達するための一つのアプローチは、大分子の送達ベクターとして働く短ペプチドのグループであるタンパク質導入ドメイン(PTD)とタンパク質の融合である。一般的には、PTDは、生理学的pHで正味の正荷電を有する、短い水溶性および部分的疎水性および/または多塩基性ペプチド(多くとも30~35アミノ酸残基)と定義される[6、7]。PTAの主な特徴は、いかなるキラルレセプターも用いることなく、大きな膜損傷をもたらさずにin vitroとin vivoの両方で低マイクロモル濃度で細胞膜を通り抜けることができることである。さらにより重要なことは、これらのペプチドは、低毒性で高効率に静電気結合または共有結合した生物活性カーゴ(例えば薬剤)を中に取り込むことができる。PTDが細胞に入るメカニズムは完全には理解されていない。よく特徴づけられたPTAの1つにHIV-1ウイルス由来の転写のトランスアクチベーター(TAT)ペプチドがある。TATは、HIV-1ウイルスによりコードされるTatタンパク質の11アミノ酸(残基47~57)のアルギニンおよびリジン-豊富部分である[8、9]。TAT融合タンパク質は、培養細胞、完全組織、およびマウスに注射すると生組織内に急速かつ効率的に導入されることが先に示されてきた[10-12]。TAT融合タンパク質がミトコンドリア膜を横切ること示されている[13、38]。

【0010】

in vitroとin vivoの両方で細胞中に種々の大分子を送達するためのPTD融合タンパク質の使用は大きく進歩した。この系は、血液脳関門を横切る脳内へのカーゴの送達にも用いることができる。さらに、特定の細胞内亜局在性(例えば核、ミトコンドリア、およびリソソーム)を標的化する能力は、さらに細胞内オルガネラ標的療法の開発に対するこの送達系の可能性を広げる。治療的応用はほぼ無限のようであり、TATベースの送達系の使用は、タンパク質から種々のカーゴ、例えばオリゴヌクレオチド、画像化剤、低分子量薬剤、ナノ粒子、ミセル、およびリポソームに広がっている。示すように、このPTD系は、ミトコンドリア障害(例えばフリードライヒ運動失調症)を治療するための機能的ミトコンドリアタンパク質の融合構築物を開発するのに用いられる。

【0011】

フリードライヒ運動失調症は、運動失調、反射消失、感覚消失、虚弱、脊柱側彎症、および心筋症を特徴とする常染色体劣性変性障害である。この疾患の患者には、糖尿病、視神経症、および難聴もみられる[14、15]。フリードライヒ運動失調症のほとんどの患者(97%)は、その発現がフリードライヒ運動失調症を減少させる[17] ミトコンドリアタンパク質フラタキシシン [15、16]をコードする遺伝子の両アレル上の第1イントロン中のGAAリピートの伸張がある。GAAリピートの伸張の大きさは、フラタキシシンの発現および疾患の発症年齢と逆相関する[16]。細胞のフラタキシシン欠乏は、ミトコンドリア鉄-硫黄クラスター含有酵素の活性低下、ミトコンドリアマトリックス中の鉄の蓄積、酸化ストレスに対する感受性の増加、およびアデノシン三リン酸(ATP)産生障害をもたらす[18-20]。

【0012】

疾患修飾薬開発の最近の標的には、(1)酸化ストレスおよびフリーラジカル活性を減少させ；(2)ATP産生を改善し；(3)鉄の蓄積を減少させ；および(4)フラタキシシン産生および鉄-硫黄クラスターの組み立てを増加させるためのミトコンドリアターゲティング剤が含まれる[21]。フリードライヒ運動失調症の研究開発に登録された治療薬には現在21薬剤またはクラスがある[39]。公共、個人、および産業主導で数百億ドルがフリードライヒ運

10

20

30

40

50

動失調症の治療薬の研究に費やされてきた[22]。

【0013】

ミトコンドリア障害にTAT送達系を用いるE/PRTの開発は、リポアミドデヒドロゲナーゼ(LAD)ミトコンドリア欠損について以前に報告された[23、38]。LADは、炭水化物とアミノ酸の代謝に極めて重要なミトコンドリアマトリックス中の3つの α -ケト酸脱水素酵素複合体のE3サブユニットである。これらの複合体は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDHC)、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体(KGDHC)、および分岐鎖ケト酸脱水素酵素複合体(BCKDHC)である。この先に報告されたTAT送達系は、N末端35アミノ酸ミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含むヒトLADの天然前駆配列を含むTAT-LAD融合タンパク質に基づいた。LADの天然MTSを用い、ミトコンドリア中に送達されるとTAT-LAD構築物のプロセッシングを促進し、 α -ケト酸脱水素酵素複合体中への送達されたLADの取り込みを可能にした。このTAT-LAD構築物は、患者の細胞に速やかに効率的に入り、ミトコンドリアに達することが明らかにされた。ミトコンドリア内部でTAT-LADは、プロセッシングされ、LAD活性を回復することが示された[23]。さらに、TAT-LADのE3-欠損マウス組織への送達も明らかにされた[24]。マウス組織において、TAT-LADの単回投与は、TAT-LAD処理E3-欠損マウスの肝臓、心臓、および最も重要なのは脳内のミトコンドリア多酵素複合体ピルビン酸脱水素酵素複合体の酵素活性の有意な増加をもたらした[24]。

10

【0014】

特に、TAT-LADは、処理した患者の細胞内のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDHC)の活性をほぼ正常レベルに回復させることができることが示された。PDHCは、 $9.5 \times 106\text{Da}$ の大分子装置であり、その複数部分構造の組み立てプロセスは、以下の多くの種々のサブユニットを含む：E1成分($\alpha 2 \beta 2$)(ピルビン酸デカルボキシラーゼ)の30テトラマー、E3(LAD、ジヒドロリポアミド)成分の12ダイマー、およびE3結合タンパク質の12ユニットと結合したE2成分(ジヒドロリポアミド)の60ユニットの五角形のコア。すべての α -ケト酸脱水素酵素複合体の構造はPDHCと同様である。この構造の複雑さは、1突然変異成分のTAT介入置換が酵素欠損患者の細胞中の必須ミトコンドリア多成分酵素複合体の活性を回復させることを示すことの重要性を強調する。

20

【0015】

ミトコンドリア送達系の先の研究は、ミトコンドリアタンパク質(例えばLAD)の天然MTSを主として用い、天然MTSがLAD酵素機能を最大に回復させるのに必要であることを示した。MTSの欠失は、ミトコンドリア内のきわめて少量のLAD活性を回復させた。TATは、膜を両方向に横切って動くことができるので、MTSが含まれると、マトリックスプロセッシングペプチダーゼは該配列を認識して切り取り、該カーゴ(例えば成熟LAD)はミトコンドリアマトリックス中に残り、TATペプチドはミトコンドリアから形質導入することができる。したがって、反復投与は徐々にミトコンドリア中のカーゴ量の蓄積をもたらす。

30

【0016】

フリードライヒ運動失調症の推定治療用のTAT-フラタキシシン(TAT-FRA、TAT-FXNともいう)融合タンパク質が最近報告された[25]。このTAT-FXN融合タンパク質はin vitroで鉄と結合し、フリードライヒ運動失調症欠損繊維芽細胞のミトコンドリア中に形質導入され、外因性鉄酸化ストレスに応じてカスパーゼ-3活性化も減少させることが示された。このTAT-FXN融合タンパク質において、著者らは、そのTAT-FXN融合タンパク質を製造するために80アミノ酸残基(aa)からなるフラタキシシンの天然MTSを用いた[26]。

40

【0017】

FXN mRNAは、ミトコンドリアマトリックスに運ばれて、少なくとも2の型、すなわちFXN42-210およびFXN81-210にプロセッシングされる前駆体ポリペプチドに翻訳されることが知られている。FXN42-210は一時的プロセッシング中間体であるが、FXN81-210は成熟タンパク質を示す[27、28]。しかしながら、FXN42-210とFXN81-210は共にコントロール細胞株と定常期の組織中に存在し、FXN42-210はフリードライヒ運動失調症患者由来の試料中で常にFXN81-210より枯渇していることがわかった[29]。

【0018】

50

ほとんどの核にコードされたミトコンドリアタンパク質は、該タンパク質のミトコンドリアターゲティングを導く開裂可能なN末端MTSを含み、上記のように、該N末端MTSは3アミノ酸(aa)モチーフであるよく保存されたRXY[°]↓[°](S/A)モチーフ(ここで、Xはあらゆるaaでありうる、次いでセリンまたはアラニンである)でマトリックスプロセッシングプロテアーゼにより切断され、3つの最初のアミノ酸の後で開裂が行われる[26、30-31]。これらのN末端MTSは、典型的には3~5非連続塩基性アミノ酸(アルギニン/リジン)残基を含む長さ15~30アミノ酸であり、しばしば数個のセリン/トレオニン残基を含むが酸性アミノ酸(アスパレート/グルタメート)残基は含まない。分子構造においてこれらのMTSは、効率的なミトコンドリア輸送に必須の強塩基性両親媒性 α -ヘリックスを形成することができる[32]。したがって、例として、フラタキシンの長い80アミノ酸の天然MTSおよびその2段階プロセッシングは、ミトコンドリアのマトリックス中へのカーゴの送達効率を減少させることができる。

【0019】

(発明の要約)

転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、機能的ヒトミトコンドリアタンパク質、および該TATドメインと該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質の間に位置するヒトミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含み、該ヒトMTSが該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質とヘテロローガスである融合タンパク質を提供する。

【0020】

開示した融合タンパク質において、該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は該ヒトMTSに対してC末端に位置することができる。

【0021】

開示した融合タンパク質において、該ヒトミトコンドリアタンパク質は、機能的ヒトミトコンドリアタンパク質自体であり、および/またはミトコンドリア多成分複合体の成分、例えばヒトフラタキシンおよびオルニチントランスカルバモイラーゼ(OTC)でありうる。

【0022】

開示した融合タンパク質において、該MTSは、約3~約5非連続塩基性アミノ酸残基、および所望により約1~約3または4または5セリン/トレオニン残基を含む約15~約40アミノ酸残基を含むことができる。

【0023】

開示した融合タンパク質に含まれるMTSの非限定的例は、ヒトミトコンドリアクエン酸シンターゼMTS(該アミノ酸およびそれをコードする核酸配列をそれぞれ配列番号23および配列番号3で示す)、ヒトリポアミドデヒドロゲナーゼMTS(該アミノ酸およびそれをコードする核酸配列をそれぞれ配列番号24および配列番号5で示す)、ヒトC60RF66遺伝子産物のMTS(該アミノ酸およびそれをコードする核酸配列をそれぞれ配列番号25および配列番号4で示す)およびヒトミトコンドリアGLUD2のMTS(配列番号16で示す核酸配列でコードされる)のいずれかである。

【0024】

さらに、機能的ヒトミトコンドリアタンパク質と融合した転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、および該TATドメインと該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質の間に位置するリポアミドデヒドロゲナーゼ(LAD)およびクエン酸シンターゼ(CS)から選ばれるヒトミトコンドリアタンパク質のヒトミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む、該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質がヒトリポアミドデヒドロゲナーゼまたはヒトクエン酸シンターゼの該MTSに対してC末端にある、融合タンパク質を提供する。

【0025】

本明細書に記載の開示した融合タンパク質は、さらに該TATドメインを該MTS配列と共有結合するリンカーを含みうる。

【0026】

開示した融合タンパク質において、該融合タンパク質は、配列番号26で示されるアミノ

酸配列を有するヒトフラタキシシンと融合した配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、および配列番号24で示されるアミノ酸配列を有するヒトリポアミドデヒドロゲナーゼのミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む配列番号30で示されるアミノ酸配列を有してよく、該MTSが該TATドメインと該フラタキシシンの間に位置し、配列番号32で示されるアミノ酸配列を有するリンカーを介して該TATドメインと結合しており、該フラタキシシンがヒトリポアミドデヒドロゲナーゼの該MTSに対してC末端にある。

【0027】

開示した融合タンパク質のさらなる態様において、該融合タンパク質は、配列番号26で示されるアミノ酸配列を有するヒトフラタキシシンと融合した配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、および配列番号23に記載のアミノ酸配列を有するヒトクエン酸シンターゼのミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む配列番号28で示されるアミノ酸配列を有してよく、該MTSは該TATドメインと該フラタキシシンの間に位置し、配列番号32で示されるアミノ酸配列を有するリンカーを介して該TATドメインと結合しており、該フラタキシシンがヒトクエン酸シンターゼの該MTSに対してC末端にある。

【0028】

さらに、本明細書に記載の生理学的に許容される担体および活性成分として融合タンパク質を含む組成物、および本明細書に記載の生理学的または医薬的に許容される担体および活性成分として融合タンパク質を含む医薬組成物を開示する。

【0029】

さらに、必要とする対象の欠陥もしくは欠損または非機能的ヒトミトコンドリアタンパク質の活性の少なくとも部分を回復するための医薬組成物を開示する。該ヒトミトコンドリアタンパク質はそれ自体活性であるか、または機能的ミトコンドリアタンパク質複合体のメンバーでありうる。

【0030】

さらに、生理学的に許容される担体、および活性成分としてヒトフラタキシシンと融合した転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、および該TATドメインと該フラタキシシンの間に位置するリポアミドデヒドロゲナーゼ(LAD)およびクエン酸シンターゼ(CS)から選ばれるヒトミトコンドリアタンパク質のヒトミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む融合タンパク質を含む、該フラタキシシンが本明細書に記載のヒトリポアミドデヒドロゲナーゼまたはヒトクエン酸シンターゼの該MTSに対してC末端にある、組成物を開示する。

【0031】

さらに、本開示は、配列番号30で示されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質または配列番号28で示されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質と生理学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

【0032】

本明細書に記載の医薬組成物は、ミトコンドリア障害、例えば、限定されるものではないが、フリードライヒ運動失調症、またはフラタキシシン欠乏または欠陥フラタキシシンと関連するあらゆる他の障害、またはOTC欠乏または欠陥OTCと関連する障害を治療または緩和することを意図することができる。

【0033】

さらに、必要とする対象に静脈内投与によりフリードライヒ運動失調症を治療するための、治療的有効量の、配列番号30で示されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質または配列番号28で示されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質および医薬的に許容される担体、希釈剤、添加剤、および賦形剤の少なくとも1を含む医薬組成物を開示する。

【0034】

本明細書に記載の医薬組成物の非限定的例は、投与する治療的有効量が約0.5mg/Kg～約2mg/Kg対象体重である。

10

20

30

40

50

【0035】

したがって、開示した融合タンパク質は、ミトコンドリア障害、例えば、限定されるものではないが、フリードライヒ運動失調症またはフラタキシン欠乏または欠陥フラタキシンと関連するあらゆる他の障害、またはそれぞれOTC欠乏または欠陥OTCと関連する障害の治療方法に用いることができる。

【0036】

さらに、ミトコンドリア障害の治療または緩和方法であって、そのような治療を必要とする対象に治療的有效量の本明細書に記載の融合タンパク質を投与することによりミトコンドリア障害を治療する工程を含む方法を提供する。

【0037】

開示した方法のいくつかの態様において、該機能的タンパク質は、フラタキシン、それぞれOTCであり、ミトコンドリア障害は、フリードライヒ運動失調症、またはフラタキシン欠乏または欠陥フラタキシンと関連するあらゆる他の障害、またはそれぞれOTC欠乏または欠陥OTCと関連する障害である。

【0038】

ミトコンドリア障害を治療または緩和するための開示した方法は、さらにさらなる治療薬を投与することを含みうる。

【0039】

さらに、対象のミトコンドリア中に機能的ミトコンドリアタンパク質を導入する方法であって、そのような治療を必要とする対象に治療的有效量の本明細書に記載の融合タンパク質を投与することによりそれを必要とする対象のミトコンドリア内に機能的ヒトミトコンドリアタンパク質を導入する工程を含む方法を提供する。

【0040】

対象のミトコンドリア中に機能的ミトコンドリアタンパク質を導入するための開示した方法において、導入した機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は、野生型ヒトミトコンドリアタンパク質の少なくとも部分的活性、野生型ヒトミトコンドリアタンパク質の活性の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または最大100%を回復することができる。

【0041】

さらに、本明細書の開示に従って治療的有效量の融合タンパク質を対象に投与することにより、それを必要とする対象の欠陥もしくは欠損または非機能的ヒトミトコンドリアタンパク質の活性の少なくとも部分を回復するための方法を開示する。該ヒトミトコンドリアタンパク質はそれ自体活性であるか、または機能的ミトコンドリアタンパク質複合体のメンバーでありうる。

【0042】

さらに、必要とする対象の酸化ストレスを緩和する方法であって、そのような治療を必要とする対象に治療的有效量の本明細書に記載の融合タンパク質を投与することにより該対象の酸化ストレスを緩和する工程を含む方法を提供する。

【0043】

本明細書に開示した対象をよりよく理解し、実施方法を例示するために、態様を非限定的例としてのみ添付の図面を参照して説明する。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】1A~1D：種々のTAT-MTS-FR融合タンパク質の模式構造とその期待分子量。略語：H、Hisタグ；TAT、転写のトランスアクチベーター；FRA(またはfra)、フラタキシン；MTS、ミトコンドリアトランスロケーション配列；cs、クエン酸シンターゼ；orf、C6ORF66；lad、LADおよびkDa、キロダルトン。

【図2】図2A~2D：TAT-MTSfra-FRAおよびTAT-MTSorf-FR融合タンパク質の発現と細胞下の局在。TAT-MTSfra-FR融合タンパク質を発現する細菌サブ分画のSDS-PAGE分析像(図2A)

10

20

30

40

50

および抗His抗体を用いるそのWesternブロット分析のイムノブロット(図2B)；TAT-MTSorf-FR融合タンパク質を発現する細菌サブ分画のSDS-PAGE分析像(図2C)、および抗His抗体を用いるそのWesternブロット分析のイムノブロット(図2D)を示す。略語(図2A～2D)：1、全細胞抽出物；2、可溶性分画；3、不溶性分画；kDa、キロダルトン；およびM＝マーカー。矢印は該融合タンパク質を示す。

【図3】図3A～3D：TAT-MTSlad-FRAおよびTAT-MTScs-FR融合タンパク質の発現と細胞下の局在。TAT-MTSlad-FR融合タンパク質を発現する細菌サブ分画のSDS-PAGE分析像(図3A)および抗His抗体を用いるそのWesternブロット分析のイムノブロット(図3B)；TAT-MTScs-FR融合タンパク質を発現する細菌サブ分画のSDS-PAGE分析像(図3C)および抗His抗体を用いるそのWesternブロット分析のイムノブロット(図3D)を示す。略語(図3A～3D)：1、全細胞抽出物；2、可溶性分画；3、不溶性分画；KDa、キロダルトン；およびM＝マーカー。矢印は該融合タンパク質を示す。

10

【図4】図4A～4D：TAT-MTSfrA-FRAおよびTAT-MTSorf-FR融合タンパク質の精製。融合タンパク質TAT-MTSfrA-FRAのアフィニティークロマトグラフィ精製プロフィール像(図4A)およびTAT-MTSfrA-FRAの精製工程のSDS-PAGE分析像(図4B)を示す。融合タンパク質TAT-MTSorf-FRAのアフィニティークロマトグラフィ精製プロフィール像を図4Cに、TAT-MTSorf-FRAの精製工程のSDS-PAGE分析像を図4Dに示す。略語：M、マーカー；1、全細胞抽出物；2、流す前の分画(該融合タンパク質を発現する細菌細胞の可溶性サブ分画)；3、フロースルー；4、100mMイミダゾールで溶出；および5～9、250mMイミダゾールで溶出。

【図5】図5A～5D：TAT-MTSlad-FRAおよびTAT-MTScs-FR融合タンパク質の精製。融合タンパク質TAT-MTSlad-FRAのアフィニティークロマトグラフィ精製プロフィール像(図5A)およびTAT-MTSlad-FRAの精製工程のSDS-PAGE分析像(図5B)を示す。融合タンパク質TAT-MTScs-FRAのアフィニティークロマトグラフィ精製プロフィール像を図5Cに示し、TAT-MTScs-FRAの精製工程のSDS-PAGE分析像を図5Dに示す。略語：M、マーカー；1、全細胞抽出物；2、流す前の分画(該融合タンパク質を発現する細菌細胞の可溶性サブ分画)；3、フロースルー；4、100mMイミダゾールで溶出；および5～9、250mMイミダゾールで溶出。

20

【図6】図6A～6C：TAT-MTS-FRA高精製融合タンパク質の特徴づけ。4つの高精製TAT-MTS-FR融合タンパク質をSDS-PAGEゲル(図6A)および抗His(図6B)または抗フラタキシン(図6C)抗体を用いるWesternブロット分析により特徴づけた。略語：1、TAT-MTSfrA-FRA；2、TAT-MTScs-FRA；3、TAT-TSlad-FRA；4、TAT-MTSorf-FRA；およびM、マーカー。

30

【図7】図7A～7B：TAT-MTSlad-FRAの細胞およびそのミトコンドリア内への内在化。図7Aは、抗His抗体を用いるWesternブロット分析のイムノブロットを表し、図7Bは、TAT-MTSlad-FRA非存在下(レーン1&2)または存在下(レーン3～7)でインキュベーションしたBJAB細胞で行った抗フラタキシン抗体を用いるWesternブロット分析のイムノブロットを表す。インキュベーション時間の終了時に、サブ分画化を行い、細胞質およびミトコンドリア分画を得た。分画をSDS-PAGEで分離し、Westernブロット分析を行った。略語：コントロール、非処理細胞：細胞質(1)、ミトコンドリア(2)；該融合タンパク質で1時間処理した細胞：細胞質(3)、ミトコンドリア(4)；5時間処理した細胞：細胞質(5)、ミトコンドリア(6、7；2つの別の実験から)；高精製TAT-MTSlad-FR融合タンパク質を陽性コントロールとして(8)に示す。矢印は該融合タンパク質を示す(またはそのプロセッシング生成物、図7Bの下の矢印で示す)。

40

【図8】図8A～8B：細胞のミトコンドリア中のTAT-MTS-FR融合タンパク質の内在化。図8Aは、TAT-MTS-FR融合タンパク質(各融合タンパク質の最終濃度 $0.02\mu\text{g}/\mu\text{l}$)と3時間インキュベーションした細胞の抗フラタキシン抗体を用いるWesternブロット分析を示す。細胞を洗浄し、そのミトコンドリアを単離した。図8Bは、上記細胞の抗E1 α 抗体を用いるWesternブロット分析を表す。略語：M、マーカー；いかなる処理も行わないコントロール細胞(1)、TAT-MTSfrA-FRAとインキュベーションした細胞(2)、TAT-MTScs-FRAとインキュベーションした細胞(3)、TAT-MTSlad-FRAとインキュベーションした細胞(4)、TAT-MTSorf-FRAとインキュベーションした細胞(5)、精製TAT-MTSfrA-FR融合タンパク質(6)、および精製TAT-MTScs-FR融合タンパク質(7)から単離したミトコンドリア。

50

【図 9】FRA患者の繊維芽細胞に対するTAT-MTScs-FRAの内在化。20 μ g/ml TAT-MTScs-FRA (またはピークル)存在下で2、6、および48時間、24時間後にTAT-MTScs-FRA(20 μ g/ml)を新たに加えてインキュベーションしたフリードライヒ運動失調症患者由来繊維芽細胞(F816)のミトコンドリア(M)および細胞質(C) 分画で行った抗フラタキシン抗体を用いるWesternブロット分析のイムノブロット。TAT-MTScs-FRAおよびプロセシングしたフラタキシンを矢印で示す。略語：kDa、キロダルトン；TAT、転写のトランスアクチベーター；MTS、ミトコンドリアターゲッティング配列；CS、クエン酸シンターゼ；FXN、フラタキシン；Std、標準。

【図 10】TAT-MTScs-FRAと48時間インキュベーションした後のフリードライヒ運動失調症患者から得た繊維芽細胞のアコニターゼ活性。20 μ g/ml TAT-MTScs-FRAタンパク質または(それぞれFXNまたはVEH)と48時間インキュベーションしたフリードライヒ運動失調症患者の繊維芽細胞(F816)から得たミトコンドリア分画のアコニターゼ活性(mOD/min)を示す棒グラフ。HepG2全細胞ホモジネートを陽性コントロール(POS.CON)として用いた。略語：kDa、キロダルトン；TAT、転写のトランスアクチベーター；MTS、ミトコンドリアターゲッティング配列；CS、クエン酸シンターゼ；FXN、フラタキシン；Std、標準；VEH、ピークル、POS. CON.、陽性コントロール。

【図 11】TAT-MTS-FR融合タンパク質はBSO誘導性酸化ストレスから細胞を部分的に救う。図11Aは、L-ブチオニン-スルホキシミン(BSO)により誘導した細胞死のパーセンテージを示す棒グラフを示す。正常リンパ球またはフリードライヒ運動失調症(FRDA)患者(Lym 43)から得たリンパ球を播き、種々のTAT-MTS-FR融合タンパク質と5時間インキュベーションし、次いで、種々の濃度のBSOをさらに48時間加えた。インキュベーション時間の終了時に、細胞培養について細胞増殖アッセイを行った。図11Bは、Apo-ONE Homogeneous Caspase 3/7アッセイキット(Promega)を用いて評価した細胞内のカスパーゼ3活性と関連したL-ブチオニン-スルホキシミン(BSO)誘導性Lym 43の細胞死のパーセンテージを示す棒グラフを示す。実験は細胞生存率アッセイと並行して行った。略語：%、パーセント；YC、正常リンパ球；FRA lym、フリードライヒ運動失調症患者から得たリンパ球；HTFRA=TAT-MTSfrA-FRA、HT(LAD)FRA=TAT-MTSlad-FRA、HT(ORF)FRA=TAT-MTSorf-FRA、HT(CS)FRA=TAT-MTScs-FRA；BSO、L-ブチオニン-スルホキシミン；およびPBS、リン酸緩衝生理食塩水。

【図 12】図12A~12D：TAT-MTS-FR融合タンパク質は、患者から得た繊維芽細胞をBSO誘導性酸化ストレスから部分的に救う。図12A~図12DはFRDA患者から得た繊維芽細胞(Fib. 78)のBSO誘導細胞死のパーセンテージの棒グラフを示す。細胞を播き、TAT-MTSfrA-FRA(図12A)、TAT-MTScs-FRA(図12B)、TAT-MTSlad-FRA(図12C)およびTAT-MTSorf-FRA(図12D)融合タンパク質と24時間インキュベーションし、次いで、種々の濃度のBSOをさらに48時間加えた。インキュベーション時間の終了時に、細胞培養について細胞増殖アッセイを行った。略語：%、パーセント；PBS、リン酸緩衝生理食塩水；BSO、L-ブチオニン-スルホキシミン；HTF、TAT-MTSfrA-FRA；MTS(cs)、TAT-MTScs-FRA；MTS(LAD)、TAT-MTSlad-FRA；MTS(ORF)、TAT-MTSorf-FRA。

【図 13】図13A~13B：TAT-MTSorf-FRAはフリードライヒ運動失調症患者から得たリンパ球および繊維芽細胞をBSO誘導性酸化ストレスから救う。図13Aは、FRDA患者から得た繊維芽細胞(Fib. 78)のBSO誘導細胞死のパーセンテージの棒グラフを示し、図13Bは、患者から得たリンパ球(Lym 43)のBSO誘導細胞死のパーセンテージの棒グラフを示す。細胞を播き、TAT-MTSorf-FR融合タンパク質と24時間インキュベーションし、次いで、種々の濃度のBSOをさらに48時間加えた。インキュベーション時間の終了時に、細胞培養について細胞増殖アッセイを行った。略語：PBS、リン酸緩衝生理食塩水；%、パーセント；BSO、L-ブチオニン-スルホキシミン；およびORF、C6ORF66。

【図 14】図14A~14B：TAT-MTSlad-FRAは患者から得た繊維芽細胞をBSO誘導性酸化ストレスから救う。図14Aおよび図14Bは、2つの代表的実験のFRDA患者から得た繊維芽細胞(Fib. 78)のBSO誘導細胞死のパーセンテージの棒グラフを示す。細胞を播き、TAT-MTSlad-FR融合タンパク質と24時間インキュベーションし、次いで、種々の濃度のBSOをさらに48時間加えた。インキュベーション時間の終了時に、細胞培養について細胞増殖アッセイを行

10

20

30

40

50

った。略語：％、パーセント；PBS、リン酸緩衝生理食塩水；BSO、L-ブチオニン-スルホキシミン；LAD、リポアミドデヒドロゲナーゼ。

【図 1 5】図15A～15D：TAT-MTS-FR融合タンパク質構築物。図15A～図15Dは、ヒトフラタキシシン(下線)と融合したフラタキシシン(MTSfra、図15A)、クエン酸シンターゼ(MTScs、図15B)、リポアミドデヒドロゲナーゼ(MTSlad、図15C)、およびC6ORF66(MTSorf、図15D)から選ばれるヒトミトコンドリアタンパク質(二重下線)のヒトミトコンドリアターゲッティング配列(MTS)と融合したGSDPリンカー(灰色)と融合した転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン(枠で囲む)を含むTAT-MTS-FR融合タンパク質構築物の模式図を示す。

【図 1 6】図16A～16E：TAT-MTS-OTCタンパク質構築物の発現と精製 図16A～図16Dは、オルニチントランスカルバモイラーゼ(OTC、図16A)、クエン酸シンターゼ(CS、図16B)、C6ORF66(ORF、図16C)、またはリポアミドデヒドロゲナーゼ(LAD 図16D)をそのMTSとして含む細菌的に発現したTAT-MTS-OTC融合タンパク質構築物のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS PAGE)分析像である。該融合タンパク質構築物を矢印で示す。約2μgの各タンパク質およびBSAを4～20％ゲルで分析し、次いでクーマシーブルー染色を行った。マーカーサイズを図16Eに示す。略語：M1、タンパク質マーカー；kDa、キロダルトン。

【図 1 7】図17A～17B：TAT-MTS-OTCタンパク質構築物のミトコンドリア中への内在化。図17Aは、イーグル最小必須培地(EMEM)単独または示したDMSO(D)、トレハロース(T)、またはオルニチン(O)を添加したEMEM中で、12μg/mlのTAT-MTS-OTC融合タンパク質 TAT-MTS otc-OTC、TAT-MTScs-OTC、TAT-MTSlad-OTC、またはビークルと20分間、1および3時間インキュベーションしたHepG2細胞のミトコンドリア分画について行ったWesternブロット分析像である。タンパク質標準TAT-MTSlad-OTCまたはTAT-MTSorf-OTC(Std.)を並行して流した。タンパク質マーカー(M)のサイズを図17Bに示す。OTC融合タンパク質の移動を矢印で示す。略語：EMEM、イーグル最小必須培地；TAT、転写のトランスアクチベーター；MTS、ミトコンドリアターゲッティング配列；OTC、オルニチントランスカルバモイラーゼ；CS、クエン酸シンターゼ；LAD、リポアミドデヒドロゲナーゼ；Std.、標準；T/D、トレハロース/DMSO；T/D/O、トレハロース/DMSO/オルニチン；M、マーカー。

【図 1 8】図18A～18B：TAT-MTS-OTCタンパク質構築物とインキュベーションしたHepG2細胞のサイトゾル分画のWesternブロット分析。図18Aおよび図18Bは、EMEM単独、または示したDMSO(D)、トレハロース(T)、またはオルニチン(O)を添加したEMEM中で12μg/mlのTAT-MTS-OTC融合タンパク質 TAT-MTSotc-OTC、TAT-MTScs-OTC、TAT-MTSlad-OTC、またはビークルと20min、1および3時間インキュベーションしたHepG2細胞のサイトゾル分画について行ったWesternブロット分析像である。タンパク質標準TAT-MTScs-OTCまたはTAT-MTSorf-OTC(Std.)を並行して流した。略語：OTC、オルニチントランスカルバモイラーゼ；CS、クエン酸シンターゼ；LAD、リポアミドデヒドロゲナーゼ；ORF、C6ORF66；EMEM、イーグル最小必須培地；T/D、トレハロース/DMSO；T/D/O、トレハロース/DMSO/オルニチン；M、マーカー。

【図 1 9】OTCのIn vitro酵素活性。コントロールと比較した492nmの吸光度(O.D.)でのシトルリンの正味の吸光度を検出することにより測定したOTCタンパク質構築物 TAT-MTScs-OTCおよびTAT-MTSotc-OTCのin vitro酵素活性レベルを示す棒グラフ。略語：TAT、転写のトランスアクチベーター；MTS、ミトコンドリアターゲッティング配列；OTC、オルニチントランスカルバモイラーゼ；CS、クエン酸シンターゼ。

【図 2 0】OTC融合タンパク質によるアンモニアストレスからの救済。ビークル処理および非処理細胞と比較した14μg/mlのOTCタンパク質構築物 TAT-MTScs-OTC、およびTAT-MTS otc-OTCの存在下でアンモニアストレスに曝されたHepG2細胞の細胞生存率を示す棒グラフである。蛍光シグナルを塩化アンモニウム処理および非処理細胞の比として計算した。略語：TAT、転写のトランスアクチベーター；MTS、ミトコンドリアターゲッティング配列；CS、クエン酸シンターゼ；OTC、オルニチントランスカルバモイラーゼ。

【0045】

(態様の詳細な説明)

本願に開示した対象は、ミトコンドリアタンパク質をミトコンドリア中に送達するための広範囲の治療手段の基礎を提供するTAT-MTS-フラタキシン融合タンパク質をコードする種々のプラスミド構築物の製造に関する。

【0046】

ミトコンドリアタンパク質、およびTAT、およびミトコンドリアタンパク質が細胞膜とミトコンドリア膜の両方を横切るのを可能にする特異的にミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む本明細書に記載のタンパク質構築物を発現および精製し、その生物活性を確認した。驚くべきことに、融合構築物(例えば、フラタキシンとヘテロローガスなMTSを含むフラタキシン融合タンパク質構築物)中に存在するミトコンドリアタンパク質の天然MTS以外のMTSを含む融合タンパク質構築物で得られたタンパク質収量は、フラタキシンの天然TMSを含むフラタキシン融合タンパク質構築物で得られた収量より多かった。

10

【0047】

以下に示すように、本発明者らは、種々の融合タンパク質が完全細胞内のミトコンドリアに入ることができることを示す。さらに、本発明者らは、該融合タンパク質が生物活性を有することを示す。例えば、下記実施例に示すように、種々のTAT-MTS-FR融合タンパク質がフリードライヒ運動失調症患者から得られる細胞と正常細胞を酸化ストレスから救うことが示された。驚くべきことに、融合構築物中に存在する機能的ミトコンドリアタンパク質の天然MTS以外のMTS(すなわち、ヘテロローガスなMTS)を有する融合タンパク質では、天然MTSを有する融合タンパク質構築物が示す効果と比べて優れた保護効果がみられた。

20

【0048】

本明細書に記載の対象は、ミトコンドリアに入ると除去されることが知られている古典的MTS配列であるヒト核にコードされたミトコンドリアタンパク質のヘテロローガスなMTSを含む融合タンパク質構築物を提供する。非限定的例では、フラタキシンを含む本明細書に記載の送達系は、フリードライヒ運動失調症、またはフラタキシン欠乏または欠陥フラタキシンに関連するあらゆる他の障害の治療または緩和に用いることができる。

【0049】

したがって、本明細書に記載の対象は、転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、機能的ヒトミトコンドリアタンパク質、および該TATドメインと該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質の間に位置するヒトミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む、該ヒトMTSが該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質とヘテロローガスである融合タンパク質を提供する。

30

【0050】

本明細書で用いている用語「機能的ヒトミトコンドリアタンパク質」は、ミトコンドリアの生物活性に不可欠なあらゆるタンパク質を表す。機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は、ミトコンドリア中に存在するとそれ自身(それ自体)が活性であるタンパク質、またはミトコンドリア多成分複合体(すなわち、他の酵素、補助因子、またはタンパク質を含む)の成分として機能するタンパク質でありうる。典型的には、機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は、欠如、欠損、または突然変異するとミトコンドリア障害を生じるかまたはミトコンドリア障害と関連があるタンパク質である。

40

【0051】

ある特定の態様において、該機能的ミトコンドリアタンパク質は、該タンパク質の完全長アミノ酸配列を表す。他の態様において、該機能的ミトコンドリアタンパク質は、必要に応じて単独または多成分複合体の部分としてミトコンドリアタンパク質の活性をもたらすのに十分な完全長アミノ酸配列の断片である。

【0052】

さらなる態様において、機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は、該タンパク質(単独または多成分複合体の部分として)のミトコンドリア機能を維持しながら、天然アミノ酸残基の1またはそれ以上が欠失、置換、または突然変異している該タンパク質の突然変異誘導体である。

50

【0053】

上記および他の態様において、機能的ヒトミトコンドリアタンパク質(「成熟」タンパク質ともいう)は、そのミトコンドリアターゲッティング配列(MTS)を欠くタンパク質を表す。すなわち、本明細書に記載の融合タンパク質構築物は、ミトコンドリアに入ると、その成熟、活性(機能的)状態で該融合タンパク質構築物から切断される機能的ミトコンドリアタンパク質を表す。

【0054】

非限定的例として、開示した対象の上記および他の態様において、本発明の融合タンパク質により活性がもたらされる機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は以下のいずれかでありうる：ヒトフラタキシン(配列番号26で示されるアミノ酸配列を有する、配列番号6で示される核酸配列によりコードされた成熟タンパク質)、オルニチントランスカルバモイラーゼ(OTC、配列番号39で示されるアミノ酸配列を有する配列番号15で示される核酸配列によりコードされた成熟タンパク質)、ヒトリポアミドデヒドロゲナーゼ(LAD)、2-オキシイソ吉草酸脱水素酵素 α サブユニット(分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼE1 α)(NCBIタンパク質データベース登録No. P12694; OMIM: 248600)、2-オキシイソ吉草酸脱水素酵素 β サブユニット(分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼE1 β ; P21953)、アシル-CoA脱水素酵素、中鎖特異的(P1 1310; OMIM: 201450)、アシル-CoA 脱水素酵素、非常に長い鎖特異的(P49748; OMIM: 201475)、3機能的酵素 α サブユニット(長鎖3ヒドロキシアシルCoA脱水素酵素またはLCHAD)(P40939; OMIM: 609015)(HADHA)、3機能的酵素 β サブユニット(ヒドロキシアシル-CoA 脱水素酵素/3-ケトアシル-CoAチオラーゼ/エノイル-CoAヒドラターゼ(P55084)(HADHB))、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ E1成分 β サブユニット(P1 1177; OMIM: 208800)、およびピルビン酸デヒドロゲナーゼ E1成分 α サブユニット(P08559; OMIM: 312170)。

【0055】

ある態様において、該ヒトミトコンドリアタンパク質は機能的ミトコンドリアタンパク質それ自体および/またはミトコンドリア多成分複合体の成分である。

【0056】

上記のように、開示した対象の機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は、それ自身がミトコンドリア中に存在すると活性であるタンパク質(すなわち、該タンパク質自体が活性である)、またはミトコンドリア中に存在するとミトコンドリア多成分複合体の成分(すなわち、他の酵素、補助因子、またはタンパク質を含む)として機能するタンパク質でありうる。本明細書に記載の用語「ミトコンドリア多成分複合体」は、ミトコンドリアの生物活性に不可欠な他の酵素やタンパク質との複合体を形成する酵素を表す。

【0057】

下記実施例に示すように(図7)、TATおよびMTS配列を含む融合タンパク質は、ミトコンドリア内に入ると開裂し、成熟活性タンパク質が得られる。したがって、本明細書に記載の対象が提供するタンパク質構築物は、TATおよびMTSドメインと最初に共有結合するヒトミトコンドリアタンパク質が細胞膜とミトコンドリア膜の両方を横切り、ミトコンドリア内に入ると、その生物活性と適切なコンフォメーションを維持したまま、ミトコンドリアペプチダーゼによりプロセッシングされるのを可能にする。したがって、本明細書に記載の送達系は、ヒトミトコンドリアタンパク質がそのミトコンドリア機能自体またはミトコンドリア多成分複合体中のその統合を維持するのを可能にする。

【0058】

本開示に含まれるミトコンドリア多成分複合体は、協調的に一連の反応を触媒するように機能するように特定の比で一緒に組み立てられた少なくとも2の異なるタンパク質のグループを表す。ミトコンドリア多成分複合体の機能はその構造に依存し、したがって、該複合体を構成するタンパク質は適切にホールドされ、一連の反応を効率的に触媒するように適切なコンフォメーションに物理的に組み立てられなければならない。

【0059】

すべての態様において、本明細書に記載の対象の機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は、ミトコンドリアに入ると融合タンパク質構築物から切断され、その中でその成熟、適

切にホールドされた活性状態で存在する。ある態様において、該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質を、次いでコンフォメーション的に感受性のミトコンドリア多成分複合体に容易に組み込むことができる。

【0060】

非限定的例では、本明細書に記載の対象は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDHC)、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体(KGDHC)、および分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体(BCKDHC)、呼吸鎖複合体、および脂肪酸 β 酸化および尿素回路に關与するもののいずれかのミトコンドリア多成分複合体を含む。呼吸鎖複合体には、複合体I(NADH-ユビキノン酸化還元酵素)、複合体II(スクシネート-ユビキノン酸化還元酵素)、複合体III(ユビキノール-フェリチンクロームC酸化還元酵素)、複合体IV(チトクロームC酸化還元酵素)、および複合体V(F₁F₀ ATPアーゼ)があり、各ミトコンドリア多成分複合体は本発明の異なる態様を表す。

10

【0061】

下記実施例1~3に示すように、本発明者らは、タンパク質フラタキシシンを含む融合タンパク質構築物をクローニングし、発現させ、精製した。

【0062】

ミトコンドリアタンパク質のヒトフラタキシシン(FXN)は、ミトコンドリア鉄恒常性、特に、鉄-硫黄(Fe-S)クラスタータンパク質のde novo生合成およびヘム生合成に機能すると思われるほとんどの真核生物に発現する必須の高度に保存されたタンパク質である。FXNの正しい機能は明らかでないが、最近の研究は、FXNがFe-Sクラスター生合成においてFe²⁺によるアロステリック活性化剤として機能することを示唆する。FXNの欠如は、Fe-S含有タンパク質、例えばアコニターゼの活性の低下とフリードライヒ運動失調症に関連する。

20

【0063】

前駆体FXNタンパク質(23.1 kDa、210 アミノ酸)は、そのアミノ(N)末端に80アミノ酸のミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む。ミトコンドリア内で前駆体FXNタンパク質は、ミトコンドリアマトリックスプロセッシングペプチダーゼ(MPP)により2段階でプロセッシングされる。FXNの中間形はMPPにより残基42で開裂することにより形成され、FXNの生じる形(FXN₄₂₋₂₁₀)はアミノ酸81で開裂し、推定分子量14.2kDaの成熟130アミノ酸タンパク質を生じることが示された。

30

【0064】

上記のごとく、フリードライヒ運動失調症は、運動失調、反射消失、感覚消失、虚弱、脊柱側彎症、および心筋症を特徴とする常染色体劣性変性障害である。細胞のフラタキシシン欠乏は、ミトコンドリア鉄-硫黄クラスター含有酵素の活性低下、ミトコンドリアマトリックス中の鉄の蓄積、酸化ストレスに対する感受性の増加、およびアデノシン三リン酸(ATP)産生障害をもたらす。

【0065】

本明細書に記載の対象の上記および他の態様において、フラタキシシンは、ヒトフラタキシシンおよびそのあらゆる生物活性断片および誘導体を表し、その自然(天然)MTS配列を欠く。成熟ヒトフラタキシシンの非限定的例を登録番号Q16595[81-210]で示し、下記表1に示すように成熟ヒトフラタキシシンのアミノ酸配列は配列番号26で示され、それをコードする核酸配列は配列番号6で示される。

40

【0066】

特に、下記実施例4に示すように、本発明者らは、TAT-MTS-フラタキシシン融合タンパク質がヒト完全BJAB細胞のミトコンドリアに入ることを証明した。細胞質からミトコンドリアを分離する該細胞の細胞内分画の分析は、種々のフラタキシシン融合タンパク質構築物(すなわち、TAT-MTS₁-FRA、TAT-MTS₂-FRA、TAT-MTS₃-FRA、およびTAT-MTS₄-FRA)が実際にミトコンドリアに成功裏に送達されたことを証明した。驚くべきことに、本発明者らは、ヘテロローガスなMTSを有する融合タンパク質のうち、クエン酸シンターゼのMTS(MTS₄)は、最も効率的にミトコンドリア中に送達されることを示した。

50

【0067】

ミトコンドリアタンパク質を含む融合タンパク質のミトコンドリア内への送達は、一般的にミトコンドリア障害を治療するための広範な治療的有用性を示唆し、フラタキシンのミトコンドリア中への送達は、特にフリードライヒ運動失調症の治療に特に治療的有用性がある。

【0068】

上記のように、オルニチントランスカルバモイルラーゼ(OTC、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ)も本明細書に記載の対象に含まれる。OTCは、カルバモイルホスフェート(CP)とオルニチン(Orn)の反応を触媒してシトルリン(Cit)とホスフェート(Pi)を形成する酵素活性を有するタンパク質である。哺乳動物では、OTCは、ミトコンドリアに局在し、尿素回路の部分である。

【0069】

OTCはトリマーであり、その活性部位は、タンパク質モノマー間の接点に局在し、該タンパク質のミトコンドリア活性に適切なホールディングが重要であることを強調する。OTCの欠損は、アンモニアレベルの増加をもたらす、神経学的問題を生じる。

【0070】

添付の実施例が示すように、OTCとその天然MTSを含む本発明の融合タンパク質構築物、およびOTCとヘテロローガスなMTSを含む融合タンパク質構築物は、HepG2細胞のミトコンドリア中に内在化することができた(実施例9)。興味深いことに、OTCとヘテロローガスなMTSを含む該融合タンパク質構築物の内在化能は、OTCの天然MTSを含む融合タンパク質構築物の内在化能よりわずかに高かった。タンパク質OTCを含む融合タンパク質構築物も活性であることが示された。図20に示すように、OTCおよびMTSとしてクエン酸シンターゼを含む融合タンパク質構築物の存在下の細胞生存率レベルは、塩化アンモニウムに暴露しなかった細胞(欠陥または欠損OTCによりもたらされるアンモニアストレスのモデルとして用いられる)の細胞生存率のレベルと同様であった。さらに、OTCおよびMTSとしてクエン酸シンターゼを含む融合タンパク質構築物存在下の細胞生存率のレベルは、天然MTSとOTCを含む融合タンパク質構築物で処理した細胞の細胞生存率のレベルより高かった。

【0071】

したがって、開示した対象の上記および他の態様において、機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は、本質的にフラタキシンおよびオルニチントランスカルバモイルラーゼ(OTC)のいずれかである。ある態様において、成熟OTCタンパク質をコードする核酸は配列番号15で示される。他の態様において、本開示のOTC成熟タンパク質は配列番号39で示されるアミノ酸配列を有する。

【0072】

上記のように、本明細書に記載の対象は、転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、機能的ヒトミトコンドリアタンパク質、および該TATドメインと該機能的ミトコンドリアタンパク質の間に位置するヒトミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む、該ヒトMTSが該機能的タンパク質とヘテロローガスである融合タンパク質を提供する。

【0073】

ミトコンドリアに向けられたほとんどのタンパク質は、転座機構を通じた細胞質からのミトコンドリアへの取り込みを可能にするミトコンドリアターゲティング(またはトランスロケーション)配列(MTS)とともに合成される。ミトコンドリアに入ると、MTSは認識され切断されて適切にプロセッシングされ、必要に応じてミトコンドリア酵素複合体に組み立てることができる。

【0074】

したがって、本明細書で用いている用語「ミトコンドリアターゲティング配列」、MTS、または「ミトコンドリアトランスロケーション配列」は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸配列、またはそれと結合した化合物、およびそのあらゆる生物活性断片のミトコンドリア中への輸送をもたらすことができるアミノ酸配列を表す。機能的ミトコンドリアタ

10

20

30

40

50

ンパク質のN末端に位置する本明細書に記載の対象の融合タンパク質構築物に用いるMTSは、典型的には、しばしば数個のセリン/トレオニン残基を含み、酸性アミノ酸(アスパラギン酸/グルタミン酸)残基を含まない、約3～約5非連続塩基性アミノ酸(アルギニン/リジン)残基を含み、長さが約15～約40アミノ酸である。その分子構造において、該MTSは効率的ミトコンドリア輸送に不可欠な強塩基性両親媒性 α -ヘリックスを形成することができる。

【0075】

すなわち、該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質が該ヒトミトコンドリアターゲティング配列(MTS)に対してC末端にある本明細書に記載の融合タンパク質を開示する。

【0076】

本明細書で用いている用語「約」は、言及している値より最大1%、より具体的には5%、より具体的には10%、より具体的には15%、および場合により最大20%高いか低いことがありうる値を示し、誤差範囲は、整数値と該当する場合は連続範囲を構成する非整数値を含む。

【0077】

上記および他の態様において、該MTSはヒトMTS、すなわちヒトミトコンドリアタンパク質のMTSである。

【0078】

本明細書に記載の対象の上記および他の態様において、該MTSは、約3～約5非連続(すなわち、互いに連続的に共有結合していない)塩基性アミノ酸残基、および所望により約1～約3または4または5セリン/トレオニン残基を含む約15～約40アミノ酸残基を含む。

【0079】

本明細書に記載の用語「アミノ酸残基」は、天然および合成アミノ酸、およびアミノ酸類似体、および天然アミノ酸と同様に機能することができるアミノ酸模倣物を表す。天然アミノ酸は、遺伝子コードにコードされたもの、および後で修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタメート、およびO-ホスホセリンである。「アミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物」は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を有する化合物を表す。そのような類似体は、修飾されたR基や修飾されたペプチド骨格を有するが、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を保持する。アミノ酸は、本明細書では一般的に知られた3文字記号またはIUPAC-IUB生化学命名法委員会が推奨する1文字記号により表すことができる。

【0080】

アミノ酸残基は、その化学特性に応じて、とりわけ、含まれる残基の極性、荷電、可溶性、疎水性、親水性、および/または両親媒性に基づいて、種々の群に分けることができることが当該分野でよく知られている。

【0081】

例えば、非極性「疎水性」アミノ酸は、バリン(V)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、フェニルアラニン(F)、トリプトファン(W)、システイン(C)、アラニン(A)、チロシン(Y)、ヒスチジン(H)、トレオニン(T)、セリン(S)、プロリン(P)、グリシン(G)、アルギニン(R)、およびリジン(K)からなる群から選ばれ；「極性」アミノ酸は、アルギニン(R)、リジン(K)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)からなる群から選ばれ；「正荷電」アミノ酸は、アルギニン(R)、リジン(K)、およびヒスチジン(H)からなる群から選ばれ、「酸性」アミノ酸は、アスパラギン酸(D)、アスパラギン(N)、グルタミン酸(E)、およびグルタミン(Q)からなる群から選ばれる。「塩基性」アミノ酸は、極性の、そのpKa以下のpH値に正荷電している、非常に親水性のヒスチジン(H)、リジン(K)およびアルギニン(R)からなる群から選ばれる。

【0082】

上記のように、本明細書に記載の対象は、ヒト成熟フラタキシンおよびその天然(自然)MTS配列を欠くそのあらゆる生物活性断片および誘導体を含む。用語「生物活性断片および誘導体」は、本明細書に記載の対象に応じたフラタキシンの生物活性を変化させない成

10

20

30

40

50

熟フラタキシンのアミノ酸配列（またはそれをコードする核酸）中の1またはそれ以上のアミノ酸残基、例えば1、2、3、4、5またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失、置換、および/または挿入を含むあらゆる変化を意味する。

【0083】

さらに、本発明は、本明細書に記載の対象の核酸配列、またはその生物学的に機能的な断片および誘導体を含むDNA構築物に関する。本明細書に記載の対象の構築物は、さらに、本発明の核酸配列と操作可能に結合したプロモーター、制御および調節エレメント、翻訳、発現、および他のシグナルを含むことができる。

【0084】

細胞質中で生成され、ミトコンドリア中に輸送される各ミトコンドリア酵素はその天然MTSを有する前駆体タンパク質として生成されることが知られている。したがって、前駆体ミトコンドリアタンパク質はすでにその天然MTSを有する。しかしながら、該前駆体タンパク質のこの天然配列はあらゆる他の既知のMTSと置換することができる。

【0085】

本明細書に例示する本発明者らが製造したフラタキシンまたはオルニチントランスカルバモイラーゼを含む融合タンパク質構築物は、さらにリポアミドデヒドロゲナーゼのMTS(MTS_{lad}、配列番号24で示されるアミノ酸配列の、配列番号5で示される核酸配列によりコードされる)、C6ORF66のMTS(MTS_{orf}、配列番号25で示されるアミノ酸配列の、配列番号4で示される核酸配列によりコードされる)、またはクエン酸シンターゼのMTS(MTS_{cs}、配列番号23で示されるアミノ酸配列の、配列番号3で示される核酸配列によりコードされる)を含んだ。

【0086】

あるいはまた、本発明者らが製造したフラタキシンまたはオルニチントランスカルバモイラーゼを含む融合タンパク質構築物は、それぞれフラタキシンの天然MTS(MTS_{fra}、配列番号22で示されるアミノ酸配列の、配列番号2で示される核酸配列によりコードされる)またはオルニチントランスカルバモイラーゼの天然MTS(MTS_{otc}、配列番号38で示されるアミノ酸配列の、配列番号37で示される核酸配列によりコードされる)を含んだ。

【0087】

さらに、本発明者らは、フラタキシンおよびフラタキシンの天然MTSでないMTS配列(すなわち、ヘテロローガスなMTS)を含む融合タンパク質構築物は、発現および精製段階でヘテロローガスなMTSを含む融合タンパク質構築物で得られた収量がより高いことに基づいて、天然MTSを含むフラタキシン融合タンパク質構築物より優れていたことを示した。

【0088】

驚くべきことに、本発明者らは、フラタキシンおよびヘテロローガスなMTSを含む融合タンパク質構築物は天然MTSを含むフラタキシン融合タンパク質構築物と比べて生物活性が増強されていることも示した(実施例5)。特に、フラタキシンおよびクエン酸シンターゼMTSを含む融合タンパク質構築物は、BSOの毒性の減少に最も高い効果を示した(図11Aおよび図11B)。下記実施例4が示すように、フラタキシンおよびクエン酸シンターゼMTSを含む融合タンパク質構築物はヘテロローガスなMTSを含む例示した構築物のなかで最も高いミトコンドリア内への送達能力も示した。

【0089】

上記結果と一致して、本発明者らは、フラタキシンおよび別のヘテロローガスなMTS、すなわち、リポアミドデヒドロゲナーゼ(LAD)のMTSを含む融合タンパク質構築物が図12に示すようにフラタキシン天然MTSを含むフラタキシン融合タンパク質構築物と比べて生物活性が増強していることも示した。図12から明らかなように、この融合タンパク質構築物の生物活性はクエン酸シンターゼMTSを含む融合タンパク質構築物の生物活性と同等であった。

【0090】

上記のように、FXN mRNAは、ミトコンドリアマトリックスに輸送され、少なくとも2つの形、すなわち、FXN42-210およびFXN81-210にプロセッシングされる前駆体ポリペプチド

に翻訳されることがわかる（ここで、FXN42-210は一時的プロセッシング中間体であり、FXN81-210は成熟タンパク質を表す）。すなわち、一時的フラタキシンポリペプチドのFXN42-210は天然フラタキシン MTSの部分を含むが、FXN81-210はその天然MTSを欠く成熟タンパク質その自身である。理論に縛られることは望まないが、フラタキシンを含む融合タンパク質構築物にヘテロローガスなMTSを用いることにより成熟フラタキシンは、一工程で融合タンパク質から放出され、フラタキシンとその天然MTSを含む融合タンパク質構築物と比べてミトコンドリア中でこのタンパク質の生物学的利用可能性が増加すると予期される。

【0091】

したがって、本明細書に記載の対象に含まれるMTSは、核DNAによりコードされ、細胞質中で翻訳（生成）され、ミトコンドリア中に輸送される、本発明の融合タンパク質構築物中に存在する機能的タンパク質の天然N末端MTS配列ではないあらゆるヒトMTSである。すなわち、該MTS配列は、該機能的タンパク質の天然N末端MTS配列以外、すなわちそれとヘテロローガスである。種々のMTSがそれら自体のなかで各ミトコンドリア酵素と置換可能でありうる。各可能性は本発明の別々の態様を示す。

【0092】

本明細書で用いている用語「ヘテロローガスな」は、本明細書の開示に従って機能的ヒトミトコンドリアタンパク質と融合したMTSに言及する場合は、別の（異なる）ミトコンドリアタンパク質から得られるMTS、すなわち該機能的タンパク質の天然MTSでないMTSを意味するものとする。

【0093】

非拘束的例として、本明細書の開示に従ってヘテロローガスなMTSは、本明細書に例示したミトコンドリアタンパク質のフラタキシンまたはミトコンドリアタンパク質のオルニチントランスカルバモイラーゼ(OTC)とヘテロローガスなMTSであり、限定されるものではないが、あらゆるヒトミトコンドリアタンパク質のMTS、例えばリポアミドデヒドロゲナーゼのMTS(MTSlad、配列番号24で示されるアミノ酸配列の、配列番号5で示される核酸配列によりコードされる)、C6ORF66のMTS(MTSorf、配列番号25で示されるアミノ酸配列の、配列番号4で示される核酸配列によりコードされる)、およびクエン酸シンターゼのMTS(MTScs、配列番号23で示されるアミノ酸配列の、配列番号3で示される核酸配列によりコードされる)（非限定的例である）でありうる。

【0094】

したがって、本開示の融合タンパク質構築物の態様において、MTSは、配列番号23に記載のアミノ酸配列を有するヒトミトコンドリアクエン酸シンターゼ MTS、配列番号24に記載のアミノ酸配列を有するヒトリポアミドデヒドロゲナーゼ MTS、配列番号25で示されるアミノ酸配列を有するヒトC6ORF66遺伝子産物のMTS、および配列番号16で示される核酸配列によりコードされるヒトミトコンドリアGLUD2のMTSのいずれかでありうる。

【0095】

本開示の融合タンパク質構築物の他の態様において、MTSは、配列番号23に記載のアミノ酸配列を有するヒトミトコンドリアクエン酸シンターゼ MTSおよび配列番号24に記載のアミノ酸配列を有するヒトリポアミドデヒドロゲナーゼ MTSのいずれかである。

【0096】

ある態様において、ヒトフラタキシンと融合した転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、および該TATドメインと該フラタキシンの間に位置するリポアミドデヒドロゲナーゼ(LAD)およびクエン酸シンターゼ(CS)から選ばれるヒトミトコンドリアタンパク質のヒトミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む、該フラタキシンがヒトリポアミドデヒドロゲナーゼまたはヒトクエン酸シンターゼの該MTSに対してC末端にある融合タンパク質を開示する。

【0097】

他の態様において、ヒトオルニチントランスカルバモイラーゼ(OTC)と融合した転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、および該TATドメインと該OTCの間に位置す

10

20

30

40

50

るリポアミドデヒドロゲナーゼ(LAD)およびクエン酸シンターゼ(CS)から選ばれるヒトミトコンドリアタンパク質のヒトミトコンドリアターゲッティング配列(MTS)を含む、該OTCがヒトリポアミドデヒドロゲナーゼまたはヒトクエン酸シンターゼの該MTSに対してC末端にある融合タンパク質を開示する。

【0098】

上記のように、本明細書に記載の対象の融合タンパク質は、該融合タンパク質のN末端、上記のMTSのN末端に位置し、同様に機能的ヒトミトコンドリアタンパク質のN末端に位置する転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメインを含む(図1の模式図を参照のこと)。

【0099】

本明細書で用いている用語、転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメインは、配列番号21に記載のアミノ酸配列 YGRKKRRQRRRを有するHIV-I Tatタンパク質の11アミノ酸(残基47-57) アルギニン-およびリジン-豊富部分であるタンパク質導入ドメインを表す。TAT融合タンパク質構築物は、培養細胞、完全組織、および生組織中に導入され、血液脳関門(BBB)を横切ることが知られている。TAT融合タンパク質はミトコンドリア膜を横切することも知られている[13]。

【0100】

本明細書に記載の対象は、上記TATドメインのあらゆる断片も含む。例えば、本明細書に記載の対象のTATドメインは、アミノ酸配列 YGRKKRRQRRR(配列番号21)を有するHIV-I Tatタンパク質の約3~約11(例えば4~11、5~11、6~11、7~11、8~11、9、10、または11)連続アミノ酸残基を含みうる。

【0101】

ある態様において、上記TATドメインの断片は、以下に例示する融合タンパク質構築物の製造に用いる、配列番号1で示される核酸配列によりコードされる、配列番号27に記載のアミノ酸配列 RKKRRQRRRを有するHIV-I Tatタンパク質の9連続アミノ酸残基を含む。

【0102】

したがって、本明細書に記載の対象のこのおよび他の態様において、該融合タンパク質は、そのN末端にTATドメインおよびそのC末端に機能的ミトコンドリアタンパク質を含み、その両方が該TATドメインと該機能的ミトコンドリアタンパク質の間に位置するMTSと共有結合(融合)している。すなわち、本開示は、機能的タンパク質のN末端と融合したMTSのN末端と融合したN末端TATを含むタンパク質構築物を提供する(図1にフラタキシンの模式図を示す)。

【0103】

本明細書に記載の対象の融合タンパク質は、当業者に知られたあらゆる方法で製造することができる。例として、本明細書に記載の融合タンパク質は以下に例示するように標準的分子生物学的およびクローニング技術により製造することができる。

【0104】

本発明の文脈において用語「融合タンパク質」は、主として(必ずではないが)ペプチド結合により互いに結合したアミノ酸の配列に関する。本発明の融合タンパク質において用語「融合(した)」は、少なくとも3つの異なる起源のアミノ酸配列、すなわち、TATドメイン、ヘテロローガスなミトコンドリアターゲッティングドメイン(MTS)の配列、および機能的ミトコンドリアタンパク質が共有結合により直接互いに結合するか、またはアミノ酸リンカーを介して該アミノ酸配列を結合(架橋、コンジュゲート、共有結合)することを表す。該融合は、化学的コンジュゲーション、例えばペプチドをコンジュゲートするために用いる最新の方法論を用いることによるものでありうる。

【0105】

本発明の文脈において融合タンパク質は、所望により該融合タンパク質構築物の種々のドメインを共有結合する少なくとも1のリンカーも含みうる。

【0106】

本発明の文脈において用語「リンカー」は、異なる融合タンパク質ドメイン間に位置す

10

20

30

40

50

るそれらを互いに共有結合する約4～約20アミノ酸残基のアミノ酸配列に関する。例えば、本発明によればリンカーは、長さが4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸でありうる。リンカーは、隣り合ったタンパク質ドメインが互いに自由に動くように柔軟なアミノ酸残基、例えば限定されるものではないが、グリシンおよびセリンからなることが多い。用語「リンカー」は、「スペーサー」と互換性に用いることができる。

【0107】

タンパク質の種々のドメインを適切にホールディングすることができるリンカーの設計は当該分野でよく知られている。リンカーの非拘束的例は、融合タンパク質のHis TAT MTS(cs) 81-210 FRA(配列番号17で示す)、His TAT MTS(fra) 81-210 FRA(配列番号18で示す)、His TAT MTS(lad) 81-210 FRA(配列番号19で示す)およびHis TAT MTS(orf) 81-210 FRA(配列番号20で示す)、およびOTCを含む種々の該融合タンパク質を構築するために下記実施例で用いた配列番号32で示されるアミノ酸配列 GSDP(Gly-Ser-Asp-Pro)である。

【0108】

したがって、ある態様において、本開示は、さらに該TATドメインを該MTS配列と共有結合するリンカーを含む本明細書に記載の融合タンパク質に関する。

【0109】

本発明の文脈において融合タンパク質は、所望により、以下に例示した融合タンパク質の場合のようにそのN末端に少なくとも1のメチオニン(M)残基も含みうる。メチオニンはTATドメインのN末端に位置する。

【0110】

融合は、組み換え技術により、すなわち、実質的にすべての結合がペプチド結合であるように完全融合タンパク質をコードする(すべての断片をコードする)核酸配列を構築することにより達成することもできる。

【0111】

本明細書に記載のタンパク質構築物の精製を促進するために、本発明の融合タンパク質構築物は、N末端タグ(例えば、数例を挙げれば、以下に例示するHisタグ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質(MBP)、FLAGオクタペプチド)を含むこともでき、これは最終融合構築物中に保持するかまたは除去することができる。そのようなタグは、通常、ミトコンドリア中に入るとTATおよびMTS配列と共に該融合タンパク質から切断される。

【0112】

ある態様において、本発明の融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号17(すなわち、His TAT MTS(cs) FRA)、配列番号19(すなわち、His TAT MTS(lad) FRA)、配列番号20(すなわち、His TAT MTS(orf) FRA)、配列番号45(すなわち、His TAT MTS(cs) OTC)、配列番号46(すなわち、His TAT MTS(orf) OTC)、および配列番号47(すなわち、His TAT MTS(lad) OTC)で示される。

【0113】

本発明の融合タンパク質構築物は、N末端タグを含まずに製造することもできる。ある態様において、本発明の融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号28、すなわちTAT MTS(cs) FRA、配列番号30、すなわちTAT MTS(lad) FRA、配列番号31、すなわち、TAT MTS(orf) FRA、配列番号49、すなわちTAT MTS(cs) OTC、配列番号50、すなわちTAT MTS(orf) OTC、および配列番号51、すなわちTAT MTS(lad) OTCに記載されている。

【0114】

したがって、本開示は、さらに、配列番号26で示されるアミノ酸配列を有するヒトフラタキシンと融合した配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する転写のHIV-1トランスアクトベーター(TAT)ドメインおよび配列番号24で示されるアミノ酸配列を有するヒトリポアミドデヒドロゲナーゼのミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む配列番号30で示されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質であって、該MTSが該TATドメインと該フラタキシンの間に位置し、配列番号32で示されるアミノ酸配列を有するリンカーを介し

て該TATドメインと結合しており、該フラタキシンがヒトリポアミドデヒドロゲナーゼの該MTSに対してC末端にある融合タンパク質を含む。

【0115】

ある態様において、本明細書に記載の融合タンパク質は、配列番号26で示されるアミノ酸配列を有するヒトフラタキシンと融合した配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、および配列番号23に記載のアミノ酸配列を有するヒトクエン酸シンターゼのミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む配列番号28で示されるアミノ酸配列であって、該MTSが該TATドメインと該フラタキシンの間に位置し、配列番号32で示されるアミノ酸配列を有するリンカーを介して該TATドメインと結合している、該フラタキシンがヒトクエン酸シンターゼの該MTSに対してC末端にある、アミノ酸配列を有する。

10

【0116】

ある態様において、本明細書に記載の融合タンパク質は、配列番号39で示されるアミノ酸配列を有するヒトオルニチントランスカルバモイラーゼ(OTC)と融合した配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する転写のHIV-1トランスアクチベーター(TAT)ドメイン、および配列番号23に記載のアミノ酸配列を有するヒトクエン酸シンターゼのミトコンドリアターゲティング配列(MTS)を含む配列番号45で示されるアミノ酸配列であって、該MTSが該TATドメインと該OTCの間に位置し、配列番号32で示されるアミノ酸配列を有するリンカーを介して該TATドメインと結合している、該OTCがヒトクエン酸シンターゼの該MTSに対してC末端にある、アミノ酸配列を有する。

20

【0117】

本明細書に記載の対象は、さらに、生理学的に許容される担体および活性成分として本明細書に記載の融合タンパク質を含む組成物を提供する。

【0118】

特定の態様において、本明細書に記載の対象は、活性成分として、配列番号45で示されるか、配列番号30で示されるアミノ酸配列を有するか、または配列番号28で示されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質、および生理学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

【0119】

本明細書に記載の対象は、本明細書に記載の医薬的に許容される担体および活性成分として融合タンパク質構築物を含む医薬組成物も提供する。

30

【0120】

本明細書に記載の「組成物」は、一般的には、その浸透圧を調節する緩衝剤、および所望により、1またはそれ以上の当該分野で知られた医薬的に（または生理学的に）許容される担体、希釈剤、添加剤、および賦形剤を含む。補助活性成分を該組成物に組み込むこともできる。医薬的に許容される担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、その適切な混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒でありうる。各担体は、場合により、他の成分と適合性であり、患者に有害でないという意味で生理学的または医薬的に許容されなければならない。

40

【0121】

添加剤は、限定されるものではないが、プロテアーゼ阻害剤、例えば、フェニルメタンスルホニルフルオリドまたはフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)、ナファモスタットメシレート、4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩(AEBSF)、ベスタチン、ペプスタチンA、E-64、ロイペプチン、1,10-フェナントロリン、および当該分野で知られたあらゆる他のプロテアーゼ阻害剤の少なくとも1つでありうる。

【0122】

本明細書に記載の対象の「医薬組成物」は、本発明で知られた医薬的に許容される担体、希釈剤、アジュバント、および/または賦形剤、および/または添加剤を含む上記組成物である。

50

【0123】

本明細書に記載の対象は、さらに、ミトコンドリア障害を治療または緩和するための本明細書に記載の医薬組成物を提供する。

【0124】

本明細書に記載の対象に含まれる用語「ミトコンドリア障害」は、肝臓、筋肉、脳、および心臓などの大量のエネルギーを消費する身体領域内のエネルギー不足を生じるミトコンドリアに対する遺伝的または後天的障害をもたらす全身性疾患群を表す。その結果は、しばしば、肝不全、筋力低下、疲労、および心臓、眼、および種々の他の系の問題である。

【0125】

ミトコンドリア障害は、フリードライヒ運動失調症を生じるかまたは関連するフラタキシシン欠損；OTCの欠損(OTC遺伝子の非保存的突然変異によって生じるX関連劣性遺伝性疾患)；LAD欠損関連障害のいずれかでありうるか；またはミトコンドリア代謝障害が複合体I欠損(OMIM：252010)である。複合体I欠損は、そのサブユニットのいずれかの突然変異により生じうる。あるいはまた、該複合体I欠損は、NDUFV1(OMIM：161015)、NDUFV2(OMIM：600532)、NDUFS1(OMIM：157655)、NDUFS2(OMIM：602985)、NDUFS3(OMIM：603846)、NDUFS4(OMIM：602694)、NDUFS6(OMIM：603848)、NDUFS7(OMIM：601825)、NDUFS8(OMIM：602141)、およびNDUF A2(OMIM：602137)から選ばれる遺伝子の突然変異により生じる。

【0126】

他の態様において、ミトコンドリア障害は複合体IV欠損(チトクロームCオキシダーゼ；OMIM：220110)である。複合体IV欠損は、そのサブユニットのいずれかの突然変異により生じうる。別の態様において、該複合体IV欠損は、MTCO1(OMIM：516030)、MTCO2(OMIM：516040)、MTCO3(OMIM：516050)、COX10(OMIM：602125)、COX6B1(OMIM：124089)、SCO1(OMIM：603644)、FASTKD2(OMIM：612322)、およびSCO2(OMIM：604272)からなる群から選ばれる遺伝子の突然変異により生じる。

【0127】

他の態様において、ミトコンドリア障害は神経変性疾患である。本明細書に記載の本発明の組成物は、血液脳関門(BBB)を横切る能力を有する。

【0128】

本明細書に記載の対象のさらなる態様において、ミトコンドリア障害は、激しい乳酸アシドーシス、高アンモニア血症、および凝固障害に伴う脳症および肝不全からなる群から選ばれる。他の態様において、ミトコンドリア障害は以下からなる群から選ばれる：オルニチントランスカルバモイラーゼ欠損(高アンモニア血症)(OTCD)、カルニチン0-パルミトイルトランスフェラーゼII欠損(CPT2)、フマラーゼ欠損、リー脳症関連チトクロームCオキシダーゼ欠損、メープルシロップ尿症(MSUD)、中鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ欠損(MCAD)、アシル-CoAデヒドロゲナーゼ超長鎖欠損(LCAD)、三機能的タンパク質欠損、ミトコンドリアDNA欠失に伴う進行性外眼筋まひ(POLG)、DGUOK、TK2、ピルビン酸デカルボキシラーゼ欠損、およびリー脳症(LS)。別の態様において、ミトコンドリア代謝障害は以下からなる群から選ばれる：アルパース病；パース症候群；β酸化障害；カルニチン-アシル-カルニチン欠損；カルニチン欠損；補酵素Q10欠損；複合体II欠損(OMIM：252011)、複合体III欠損(OMIM：124000)、複合体V欠損(OMIM：604273)、LHON-レーバー遺伝性視神経症；MM-ミトコンドリア筋症；LIMM-致死性小児ミトコンドリア筋症；MMC-母性筋症および心筋症；NARP-神経性筋力低下、運動失調、および網膜色素変性症；リー病；FICP-致死性小児心筋症プラス、MELAS-関連心筋症；MELAS-乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作を伴うミトコンドリア脳筋症；LDYT-レーバー遺伝性視神経症およびジストニア；MERRF-ミオクロヌステんかんおよびぼろ赤筋繊維；MHCM-母性遺伝性肥大型心筋症；CPEO-慢性進行性外眼筋まひ；KSS-キーンズ・セイアー症候群；DM-糖尿病；DMD-糖尿病＋難聴；筋症および眼筋まひを伴うCIPO-慢性腸偽閉塞；DEAF-母性遺伝性難聴またはアミノグリコシド誘導性難聴；PEM-進行性脳症；SNHL-感覚神経難聴；脳筋症；ミトコンドリア細胞症；拡張型心筋症；GER-胃腸逆流；DEMCHO-認知症および舞踏病；AMDF-運動失調、ミオクロヌ

10

20

30

40

50

ス；運動不耐性；ESOCてんかん、脳卒中、視神経萎縮、および認知低下；FBSN 家族性両側線条体壊死；FSGS 巣状分節性糸球体硬化症；LIMM 致死性小児ミトコンドリア筋症；MD M 筋症および糖尿病；MEPRミオクロノスてんかんおよび精神運動退行；MERME MERRF/MELAS重複疾患；MHCM母性遺伝性肥大型 心筋症；MICM 母性遺伝性心筋症；MILS 母性遺伝性リー脳症；ミトコンドリア脳心筋症；多系ミトコンドリア障害(筋症、脳症、盲目、難聴、末梢神経障害)；NAION 非動脈炎性前部虚血性視神経症；NIDDM インスリン非依存性糖尿病；PEM 進行性脳症；PME 進行性ミオクロノスてんかん；RTT レット症候群；SIDS 乳幼児突然死症候群；MIDD 母性遺伝性糖尿病および難聴；およびMODY 若年者の成人発症型糖尿病、およびMNGIE。

【0129】

各ミトコンドリア疾患は本発明の態様を示す。

【0130】

上記および他の態様において、本明細書に記載の対象は、フリードライヒ運動失調症、またはフラタキシン欠乏または欠陥フラタキシンと関連するあらゆる他の障害の治療に用いるかまたはOTC欠乏または欠陥OTCと関連する障害の治療に用いるための本明細書に記載の医薬組成物を提供する。

【0131】

さらなる態様において、本明細書に記載の対象は、それを必要とする対象に静脈内投与することによりフリードライヒ運動失調症を治療するための、治療的有効量の本明細書に記載の融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。

【0132】

特定の態様において、本明細書に記載の対象は、それを必要とする対象に静脈内投与することによりフリードライヒ運動失調症を治療するための、治療的有効量の配列番号30で示されるアミノ酸配列を有するかまたは配列番号28で示されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。

【0133】

さらに特定の態様において、本明細書に記載の対象は、それを必要とする対象に静脈内投与することによりフリードライヒ運動失調症を治療するための、治療的有効量の配列番号30で示されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。

【0134】

さらに特定の態様において、本明細書に記載の対象は、それを必要とする対象に静脈内投与することによりフリードライヒ運動失調症を治療するための、治療的有効量の配列番号28で示されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。

【0135】

さらに、本明細書に記載の対象は、ミトコンドリア障害の治療方法に用いるための本発明の融合タンパク質を提供する。

【0136】

本明細書に記載の対象の上記および他の態様において、該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は、フリードライヒ運動失調症またはフラタキシン欠乏または欠陥フラタキシンと関連するあらゆる他の障害の治療または緩和方法に用いるためのフラタキシンである。

【0137】

本明細書に記載の対象の上記および他の態様において、該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は、OTC欠乏または欠陥OTCと関連する障害の治療または緩和方法に用いるためのOTCである。

【0138】

下記実施例7に示すように、本発明者らは、TAT、MTS、およびフラタキシン(TAT-MTS-FR A)を含む融合タンパク質は、フリードライヒ運動失調症患者から得た細胞および正常細胞を酸化ストレスから部分的に救うことができたことを示し、これは本明細書に記載の対象の融合タンパク質構築物の明確な生物活性を示す。

【0139】

L-ブチオニンスルホキシミン(BSO)は、 γ -グルタミルシステイン合成酵素(γ -GCS)の阻害剤であり、したがって組織グルタチオン(GSH)濃度を低下させる。GSHは、チオエーテルコンジュゲートの形成を介して多様な毒性求電子剤に対する細胞の防御に重要な役割を果たす。したがって、本発明者らは、BSOを、*de novo*のグルタチオン合成を阻害するその能力を介して反応性酸素種(ROS)に対するこれら細胞の固有の防御の重要な成分を枯渇させ、細胞死をもたらすことが知られている天然細胞プロセスにより生じるROSの蓄積を可能にする酸化ストレスのモデルに用いた。

【0140】

フリードライヒ運動失調症細胞はフラタキシンを欠くので、正常細胞に比べてBSO誘導性酸化ストレスに極めて感受性であり、長期フラタキシン欠如の影響をみる*in vitro*モデルとして用いられることが知られている。

10

【0141】

下記実施例に示すように、酸化ストレスを、患者から得た細胞と正常健康細胞に種々の濃度のBSOを用いて誘導し、細胞死に対する種々のTAT-MTS-FR融合タンパク質の影響を測定した。図11に示すように、BSOは、正常リンパ球とフリードライヒ運動失調症患者から得た細胞の細胞死を引き起こした。しかしながら、患者から得た細胞は先の知見と一致してBSO誘導性酸化ストレスにより感受性であった。最も重要なことは、酸化ストレス誘導の数時間前に加えた種々のTAT-MTS-FR融合タンパク質は、正常リンパ球と患者の細胞の両方を細胞死から部分的に救済することがわかった。この部分的救済は、細胞死の減少とカスケード3活性の減少の両方により示された。

20

【0142】

驚くべきことに、図11に示すように、ヘテロローガスなMTSを有する3つの融合タンパク質のうちの少なくとも2(すなわち、MTSorfおよびMTScs)が、天然MTSを有する融合タンパク質により示された効果より優れた保護効果を示した。

【0143】

さらに、種々のTAT-MTS-FR融合タンパク質の酸化ストレスに対する効果を試験した図12に示す独立した比較試験において、別のヘテロローガスなMTSを有する融合タンパク質、すなわちMTSladも、天然MTSを有する融合タンパク質が示した効果より優れた保護効果を示した(図12C)。

【0144】

したがって、本明細書に記載の対象は、ミトコンドリア障害の治療または緩和方法であって、そのような治療を必要とする対象に治療的有効量の本明細書に記載の融合タンパク質を投与することによりミトコンドリア障害を治療する工程を含む方法を提供する。

30

【0145】

上記および他の態様において、本発明のミトコンドリア障害の治療または緩和方法は、該機能的タンパク質がフラタキシンまたはOTCであり、ミトコンドリア障害がフリードライヒ運動失調症またはフラタキシン欠乏または欠陥フラタキシンと関連するあらゆる他の障害、またはそれぞれOTC欠乏または欠陥OTCと関連する障害である。

【0146】

本明細書に記載の用語「治療する」または「治療」は、それを必要とする対象の疾患または病状を止めるか、緩和または治癒し、またはその悪化を防ぐことを意味する。したがって、本発明の文脈において用語「治療」、「治療する」、または「緩和する」は、該疾患を引き起こす突然変異した遺伝的特徴を変化させないので、該疾患を完全に治癒することを意味しない。この用語は、望ましくない該疾患関連症状の少なくとも1を緩和し、対象の生活の質を改善し、疾患による死亡率を減少させ、または(治療が十分早期に行われれば)主として高エネルギー要求性のある器官や組織にミトコンドリア障害が起こる前にその完全な発現を予防することを表す。該治療は、慢性疾患の連続的長期治療、または激しい乳酸アシドーシス、高アンモニア血症および凝固障害に伴う急性病状、例えば脳症および肝不全を治療するための単回、数回、または多回投与であり得る。

40

【0147】

50

特に、代謝障害またはミトコンドリア障害の場合は、タンパク質活性を、100%に戻すまで回復させる必要はなく、基礎タンパク質活性に応じて患者毎に変化する一定のエネルギー閾値以上に上げる。

【0148】

さらに、置換療法を用いるミトコンドリア障害の治療は、細胞基質遺伝子産物の置換より必ず複雑であり、ミトコンドリア中の複数の膜を標的とし横切る必要があるのみならず、ミトコンドリア中の多くのタンパク質が、適切に統合するために適切な構築が必要な多成分複合体として作用する事実を考慮する必要がある。さらに、多くのミトコンドリア遺伝子の欠陥が主なまたは最も顕著な表現型として重度の神経学的症状を引き起こし、上記のごとくBBBを横切る薬剤送達が困難である。

10

【0149】

治療製剤はあらゆる常套的経路と投与製剤で投与することができる。製剤は、典型的には、上記の少なくとも1の活性成分をその1またはそれ以上の許容される担体と共に含む。したがって、投与は、静脈内、腹腔内、筋肉内、および髄腔内投与のいずれかであり得る。経口投与も予期される。

【0150】

本明細書に記載のペプチドの用語「治療的有效量」（または量）は、該医学的病状を治癒するかまたは少なくとも止めもしくは少なくとも緩和するために当該分野で知られた判断により決定される。

【0151】

上記のように、代謝障害またはミトコンドリア障害の場合、タンパク質活性を100%に戻すまで回復させる必要はなく、治療効果を得るには、基礎タンパク質活性に応じて患者毎に異なりうる一定のエネルギー閾値以上に該タンパク質活性を上昇させれば十分でありうる。

20

【0152】

ある態様において、該治療的有效量は、患者の基礎タンパク質活性に基づいて各患者毎に決定することができる。患者の基礎タンパク質活性またはタンパク質活性レベルは、同様に、当該分野で知られたあらゆる方法を用い、例えば患者から得た生物試料（例えば血液（白血球）、皮膚繊維芽細胞、全組織生検）をin vitro酵素アッセイまたは免疫組織化学、またはあらゆる特異的画像化法（例えばPET）により決定することができる。

30

【0153】

ある態様において、該機能的ヒトミトコンドリアタンパク質はOTCであり、患者の基礎OTC活性は肝臓生検により決定される。

【0154】

ある態様において、本明細書に記載の対象の治療的有效量は、それを必要とする対象に、マウスにおける約7mg/kg～約25mg/kgの有効量のヒト等価用量（HED）である約0.5mg/kg～約2.0mg/kg体重である。

【0155】

したがって、特定の態様において、投与する治療的有效量が約0.5mg/Kg～約2mg/Kg対象体重である本明細書に記載の医薬組成物を開示する。

40

【0156】

本明細書で用いている、用語「必要とする対象」は、本明細書に記載のミトコンドリア障害に罹患したヒトを意味するものとする。

【0157】

上記および他の態様において、本発明のミトコンドリア障害の治療または緩和方法はさらにさらなる治療薬を投与することを含む。

【0158】

本明細書に記載の用語「さらなる治療薬」は、その治療が望ましい疾患または障害の関連症状を緩和するために本発明の融合タンパク質に加えて投与するあらゆる物質を表す。開示した対象の上記および他の態様において、本発明の融合タンパク質および該さらなる

50

治療薬は同時に投与される。あるいはもしくはさらに、該融合タンパク質および該さらなる治療薬は、種々の時点、種々の投与間隔、種々の期間、または種々の順序で投与される。

【0159】

開示した対象は、さらに、対象のミトコンドリア中に機能的ミトコンドリアタンパク質を導入する方法であって、そのような治療を必要とする対象に本明細書に記載の治療的有効量の融合タンパク質を投与し、それを必要とする対象のミトコンドリア中に機能的ミトコンドリアタンパク質を導入する工程を含む方法を提供する。

【0160】

ある態様において、それにより導入される機能的ヒトミトコンドリアタンパク質は、野生型ヒトミトコンドリアタンパク質の少なくとも部分的活性を、例えば野生型ヒトミトコンドリアタンパク質の活性の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または最大100%を回復する。

【0161】

したがって、開示した対象は、さらに、必要とする対象に本明細書に記載の融合物を投与することにより該対象の欠陥もしくは欠損または非機能的ヒトミトコンドリアタンパク質の少なくとも一部の活性を回復させる方法を提供する。ヒトミトコンドリアタンパク質は、それ自体活性であるか、またはミトコンドリアタンパク質複合体のメンバーでありうる。

【0162】

その局面の別の一つにより、開示した対象は、さらに、それを必要とする対象の酸化ストレスの緩和方法であって、そのような治療を必要とする対象に本明細書に記載の治療的有効量の融合タンパク質を投与することにより該対象の酸化ストレスを緩和する工程を含む方法を提供する。

【0163】

本明細書に記載の用語「酸化ストレス」は、反応性酸素種(ROS)の全身症状と反応中間体を容易に解毒するかまたは生じた損傷を修復する生物系の能力の不均衡を表す。細胞の正常レドックス状態の異常は、細胞のすべての成分を傷害する過酸化物質とフリーラジカルの生成により毒性作用を生じうる。さらに、いくつかの反応酸化種は、レドックス情報伝達の細胞メッセンジャーとして作用するので、ROSの蓄積は、細胞情報伝達の正常なメカニズムの崩壊を引き起こしうる。ヒトでは、酸化ストレスは、種々の障害および病状（その中で例を挙げると、癌、パーキンソン病、アルツハイマー病）の発現に関与すると考えられる。

【0164】

明確にするために別の態様の文脈において記載の本明細書に記載の対象のある特徴は、一つの態様において組み合わせ提供することもできると認識される。反対に、簡潔にするために一つの態様の文脈で記載する本発明の種々の特徴を、別々に、またはあらゆる適切な部分的組み合わせまたは適切な本発明のあらゆる他に記載の態様で提供することもできる。種々の態様の文脈に記載のある種の特徴は、該態様がそれらの要素なしに実施不能でないかぎり、それらの態様の必須の特徴と考えるべきではない。

【0165】

開示および記載した本発明は、本明細書に記載の特定の実施例、処理工程、および物質に限定されず、そのような処理工程および物質は幾分異なり得ると理解すべきである。また、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲およびその等価物によってのみ限定されるので、本明細書で用いている用語は、特定の態様を説明するだけのために用いており、限定を意図するものではないと理解すべきである。

【0166】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いている単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈がそうでないと明確に示さない限り、複数を示すことを含む。

【0167】

文脈が他を求めないかぎり、本明細書および特許請求の範囲を通して、用語「含む (comprise)」およびその変化 (「comprises」および「comprising」など) は、記載した整数もしくは工程または整数群もしくは工程群を含み、いかなる他の整数もしくは工程または整数群もしくは工程群も排除しないことを意味すると理解される。

【0168】

特記しない限り、本明細書に記載のすべての技術用語および科学用語は、本発明が関連する分野の当業者が一般に理解しているものと同じ意味を有する。以下の用語は、本明細書に記載の本発明のために定義される。

【0169】

以下の実施例は、本発明の局面を実施するのに本発明者らが用いた技術の代表的なものである。これらの技術は、本発明を実施するための典型的な好ましい態様であるが、当業者は、本開示に照らして本発明の精神と意図する範囲から逸脱することなく多くの修飾を行うことができると認識するだろう。

【0170】

(実施例)

さらなる詳述なしに、当業者は先の説明を用いて本発明を最大限に利用できると考えられる。したがって、以下の好ましい特定の態様は、単なる例示であって、本発明を何ら限定するものではないと解釈すべきである。

【0171】

本明細書に具体的に記載していない当該分野で知られた標準的分子生物学は、一般的に Sambrook & Russell、2001 に実質的に従う。

【0172】

(実験プロトコール)

細胞培養

フリードライヒ運動失調症患者由来のリンパ球 (Lym 43) および繊維芽細胞 (Fib. 78 および Fib. 65、F816) を Coriell Cell Repositories (Camden, NJ) から得、推奨培地 (繊維芽細胞をアール塩および非必須アミノ酸含有イーグル最小必須培地 (EMEM) 中で、リンパ球を 2mM L-グルタミン含有 Roswell Park Memorial Institute (ロズウェルパーク記念研究所) (RPMI) 培地 1640 中で、すべて 15% 非不活化ウシ胎児血清添加) で増殖させた。ヒト BJAB 細胞 (EBV 陰性 バーキットリンパ腫細胞 (Hanna Ben-Bassat, Hadassah Medical Center, Jerusalem, Israel 提供)) を 20% 熱不活化ウシ胎児血清 (FCS)、2mM L-グルタミン、100U/mL ペニシリン、および 100 μg/mL ストレプトマイシン添加 RPMI 培地中で増殖させた。正常リンパ球 [20] を 10% ウシ胎児血清 (FCS) および上記抗生物質添加 RPMI 1640 中で増殖させた。HepG2 細胞 (ATCC: HB-8065) は、10% FCS、2mM L-グルタミン、非必須アミノ酸、抗生物質、およびピルビン酸ナトリウム添加 EMEM 中で増殖させた。すべての培養細胞は 5% CO₂ 中 37°C で増殖させた。すべての培地および添加物は Biological Industries (Bet Ha'emek, Israel) から購入した。細胞を 37°C の 5% CO₂ の加湿雰囲気下で維持した。すべての培養のマイコプラズマ汚染を試験し、陰性であることがわかった。

【0173】

融合タンパク質をコードするプラスミドのクローニングHis-TAT-MTSfrA-FRA

プラスミド His-TAT-LAD を先に記載のごとく製造し [23]、BamHI および XhoII で切断して LAD 配列を除去し、His-TAT ドメインをコードするベクター断片を得た。完全長フラタキシンを、鋳型としてフラタキシクロン (Open Biosystem, Ltd. から購入、クローン番号 4842134)、およびそれぞれ配列番号 7 および配列番号 8 で示すその天然 MTS、5'-CGCGGATCCGTGGACTCTCGGGCGCCG-3' (フォワード) および 5'-ACGCTCGAGTCAAGCATCTTTCCGGAATAGGC-3' (リバーズ) を含む全配列をカバーするペアプライマーを用いる PCR により作製した。PCR 断片を BamHI および XhoII で切断し、ベクター断片と結合し、His-TAT-MTSfrA-FR 融合タンパク質をコードするプラスミドを得た。

10

20

30

40

50

【0174】

His-MTSlad-FRA

His-TAT-MTSfrA-FRAをコードするプラスミドをBamHIおよびBsaIで切断してMTSfra配列を除去した。MTSlad(リポアミドデヒドロゲナーゼの天然MTS)を、鋳型としてプラスミドHis-TAT-LAD [23]、およびそれぞれ配列番号9および配列番号10に示す5'-CGCGGATCCACAGAGCTGGAGTCGTGTGTA-3'(フォワード)および5'-CATAGG-TGGTCTCATCTAGAGAGCCTGGGTGGCCCAAAGTTCCAGATGCGTAAGTTCTCAGAGGCA-3'(リバーズ)プライマーペアを用いるPCRにより作製した。PCR産物をBamHIおよびBsaIで切断し、ベクター断片に結合し、His-TAT-MTSlad-FR融合タンパク質をコードするプラスミドを得た。

【0175】

His-TAT-MTSorf-FRA

His-TAT-MTSfrA-FRAをコードするプラスミドを、上記のごとくBamHIおよびBsaIで切断してMTSfra配列を除去した。MTSorf(タンパク質C6ORF66アセンブリー因子の天然MTS)を、鋳型としてプラスミドHis-TAT-ORF、およびそれぞれ配列番号11および配列番号12で示す5'-CGCGGATCCGGGAGCACTAGTGATTCGC-3'(フォワード)および5'-CATAGGTGGTCTCATCTAGAGAGCCTGGGTGGCCCAAAGTTCCAGAAGAGGGGTGTCTGGGAGCGA-3'(リバーズ)のプライマーペアを用いるPCRにより得た。PCR産物をBamHIおよびBsaIで切断し、ベクター断片と結合して、His-TAT-MTSorf-FR融合タンパク質をコードするプラスミドを得た。

【0176】

His-TAT-MTScs-FRA

His-TAT-MTSfrA-FRAをコードするプラスミドを、上記のごとくBamHIおよびBsaIで切断し、MTSfra配列を除去した。MTScs(タンパク質クエン酸シンターゼの天然MTS)を、MTScs配列およびthe 末端のBamHIおよびBsaI部位に及ぶ、それぞれ配列番号13および配列番号14で示す5'-GATCCGGCTTTACTTACTGCGGCCGCCCGGCTCTTGGGAACCAAGAATGCATCTTGTCTTGTCTTGCAGCCCGGCATGCCAGTTCTGGAACTTTGGGCCACCCAGGCTCTC-3'(フォワード)および5'-TCTAGAGAGCCTGGGTGGCCCAAAGTTCCAGAACTGGCATGCCGGGCTGCAAGAACAAGACAAGATGCATTCTTGGTTCCCAAGAGCCGGGCGGCCGAGTAAGTAAAGCCG-3'(リバーズ)の2つのオリゴヌクレオチドを合成することにより作製した。該オリゴヌクレオチドをベクター断片と結合し、His-TAT-MTScs-FR融合タンパク質をコードするプラスミドを得た。下記アッセイのいくつかで用いたHis-TAT-MTScs-FR融合タンパク質構築物はGenscript(Lot #342511S03/P10011312; 50mM トリス-HCl、300mM NaCl、10%グリセロール、pH8.0中の2.5 mg/mlストック)から得た。

【0177】

すべてのプラスミドを制限酵素と配列分析により確認した。

【0178】

表1: 核酸およびアミノ酸配列

10

20

30

【表 1】

配列番号	配列	名前
1	aggaagaagcggagacagcgacgaaga	TAT断片をコードするnt配列
2	TGGACTCTCGGGCGCCGCgcagtagcggcctcctggcgtcacccagcccggccc aggcccagaccctcacccgggtcccgccggccggcagagttggccccactctgcgg ccgccgtggcctgcccacccagacatcgatgcgacctgcacgccccgcgcgcaagt tcgaaccaacgtggcctcaaccagatttggaatgtcaaaaagcagagtgtctatt tgatgaatttgaggaaa	MTSfraのヌクレオチド配列
3	GCTTTACTTACTGCGGCCGCCGGCTCTTGGAACCAAGAATGCATCTTGCTTG TTCTTGACGCCCCGCATGCCAGT	MTScsのヌクレオチド配列
4	ggagcactagtgattcgcggtatcaggaatttcaacctagagaaccgagcggaac gggaaatcagcaagatgaagccctctgtgcctcccagacacccctct	MTSorfのヌクレオチド配列
5	cagagctggagtcgtgtgtactgctccttgcccaagagagggccatttcaatcgaa tatctcatggcctacagggaatttctgcagtgcctctgagaacttaegca	MTSladのヌクレオチド配列
6	tctggaactttgggcccaccaggctctctagatgagaccacctatgaaagaactag cagaggaaaacgtggactcttttagcagagtttttgaagacctgcagacaagcc atacagctttgaggactatgatgtctctttgggagtggtgtcttaactgtcaaa ctgggtggagatctaggaacctatgtgatcaacaagcagacgcccacaagcaaa tctggctatctctccatccagtggaacctaaagcgttatgactggactgggaaaaa ctgggtgtactcccacgaaggcgtgtccctccatgagctgctggccgcagagctc actaaagccttaaaaaccaaactggacttgtcttCCTTGGCCTATTCCGAAAAG ATGCTTGA	成熟フラタキシン(FRA)のヌクレオチド配列
7	CGCGGATCCGTGGACTCTCGGGCGCCG	前駆体フラタキシクローニング用のフォワードプライマー
8	ACGCTCGAGTCAAGCATCTTTCCGGAATAGGC	前駆体フラタキシクローニング用のリバースプライマー
9	CGCGGATCCACAGAGCTGGAGTCGTGTGA	MTS ladクローニング用のフォワードプライマー

10

20

30

40

50

【表 2】

10	CATAGGTGGTCTCATCTAGAGAGCCTGGGTGGCCCAAAGTTCAGATGCGTAAGT TCTCAGAGGCA	MTS ladク ローニン グ用のリ バースプ ライマー
11	CGCGGATCCGGGAGCACTAGTGATTGCG	MTS orfク ローニン グ用のフ ォワード プライマ ー
12	CATAGGTGGTCTCATCTAGAGAGCCTGGGTGGCCCAAAGTTCAGAAGAGGGGTG TCTGGGAGCGA	MTS orfク ローニン グ用のリ バースプ ライマー
13	GATCCGGCTTTACTTACTGCGGCCGCCGGCTCTTGGGAACCAAGAATGCATCTT GTCTTGTCTTGCAGCCCGGCATGCCAGTTCTGGAACCTTGGGCCACCCAGGCTC TC	MTS csク ローニン グ用のフ ォワード オリゴ
14	TCTAGAGAGCCTGGGTGGCCCAAAGTTCAGAACTGGCATGCCGGGCTGCAAGAA CAAGACAAGATGCATTCTTGGTTCCCAAGAGCCGGGCGGCCGAGTAAGTAAAGC CG	MTS csク ローニン グ用のリ バースプ ライマー
15	CTGAAGGGCCGTGACCTTCTCACTCTAAGAACTTTACCGGAGAAGAAATTAAT ATATGCTATGGCTATCAGCAGATCTGAAATTTAGGATAAAACAGAAAGGAGAGTA TTTGCCTTTATTGCAAGGGAAGTCCTTAGGCATGATTTTGGAGAAAAGAAGTACT CGAACAAGATTGTCTACAGAAACAGGCTTTGCACTTCTGGGAGGACATCCTTGTT TTCTTACCACACAAGATATTCATTTGGGTGTGAATGAAAGTCTCACGGACACGGC CCGTGTATTGTCTAGCATGGCAGATGCAGTATTGGCTCGAGTGATAAACAATCA GATTTGGACACCCTGGCTAAAGAAGCATCCATCCCAATTATCAATGGGCTGTCAG ATTTGTACCATCCTATCCAGATCCTGGCTGATTACCTCACGCTCCAGGAACACTA TAGCTCTCTGAAAGGTCTTACCCTCAGCTGGATCGGGGATGGGAACAATATCCTG CACTCCATCATGATGAGCGCAGCGAAATTCGGAATGCACCTTCAGGCAGCTACTC CAAAGGGTTATGAGCCGGATGCTAGTGTAACCAAGTTGGCAGAGCAGTATGCCAA AGAGAATGGTACCAAGCTGTTGCTGACAAATGATCCATTGGAAGCAGCGCATGGA GGCAATGTATTAATTACAGACACTTGGATAAGCATGGGACAAGAAGAGGAGAAGA AAAAGCGGCTCCAGGCTTTCCAAGGTTACCAGGTTACAATGAAGACTGCTAAAGT TGCTGCCTCTGACTGGACATTTTACACTGCTTGGCCAGAAAGCCAGAAGAAGTG GATGATGAAGTCTTTTATTCCTCGATCACTAGTGTCCCAGAGGCAGAAAACA GAAAGTGGAACAATCATGGCTGTCATGGTGTCCCTGCTGACAGATTACTCACCTCA GCTCCAGAAGCCTAAATTTTGA	成熟OTCの ヌクレオ チド配列

10

20

30

40

【表 3】

16	ATGTACCGCTACCTGGCCAAAGCGCTGCTGCCGTCCCGGGCCGGGCCCGCTGCCC TGGGCTCCCGGGCCAACCACTCGGCCGCGTTGCTGGGCCGGGGCCGGACAGCC CGCCGCCGCCTCGCAGCCGGGGCTCGCATTGGCCGCCCGGCGCCACTAC	ヒトmito- chond. GLUD2 のMTSのヌ クレオチ ド配列
17	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMRKKRRQRRRGSDPALLTAAARLLGTKNASCLVLA ARHASSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSGSG VLTVKLGDDLGTIVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHEL LAAELTKALKTKLDLSSLAYSGKDA	His TAT M TS(cs) 81 -210 FRA のアミノ 酸配列
18	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMRKKRRQRRRGSDPWTGRRRAVAGLLASPSAQAQ TLTRVPRPAELAPLCGRRGLRTDIDATCTPRASSNQRLNQIWNVKKQSVYLMN LRKSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSGSGVL TVKLGDDLGTIVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLA AELTKALKTKLDLSSLAYSGKDA	HTフラタ キシン [H is TAT MT S(fra)81- 210 FRA] のアミノ 酸配列
19	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMRKKRRQRRRGSDPQSWSRVYCSLAKRGHFNRI SHGLQGLSAVPLRTYASGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFE DYDVSGSGVLTVKLGDDLGTIVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYS HDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYSGKDA	His TAT M TS(lad) 8 1-210 FRA のアミノ 酸配列
20	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMRKKRRQRRRGSDPGALVIRGIRNFLENRAEREI SKMKPSVAPRHPSSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFED YDVSGSGVLTVKLGDDLGTIVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSH DGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYSGKDA	His TAT M TS(orf) 8 1-210 FRA のアミノ 酸配列
21	YGRKKRRQRRR	TATのアミ ノ酸配列
22	WTGRRRAVAGLLASPSAQAQTLTRVPRPAELAPLCGRRGLRTDIDATCTPRAS SNQRLNQIWNVKKQSVYLMNLRK	MTS (fra) のアミノ 酸配列
23	ALLTAAARLLGTKNASCLVLAARHAS	MTS (cs) のアミノ 酸配列
24	QSWSRVYCSLAKRGHFNRI SHGLQGLSAVPLRTYA	MTS (lad) のアミノ 酸配列
25	GALVIRGIRNFLENRAEREISKMKPSVAPRHP	MTS (orf) のアミノ 酸配列
26	SGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSGSGVLT VKLGDDLGTIVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLA AELTKALKTKLDLSSLAYSGKDA	成熟フラ タキシンの アミノ 酸配列
27	RKKRRQRRR	TAT断片の アミノ酸 配列

10

20

30

40

50

【表 4】

28	MRKKRRQRRRGSDPALLTAAARLLGTKNASCLVLAARHASSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFSGSVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYS	TAT MTS (c s) 81-210 FRAのアミノ酸配列
29	MRKKRRQRRRGSDPWTLGRRVAGLLASPSPAQAQTLTRVPRPAELAPLCGRRGLRTDIDATCTPRRASSNQRLNQIWNVKKQSVYLMNLRKSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFSGSVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYS	TAT MTS (f ra) 81-210 FRAのアミノ酸配列
30	MRKKRRQRRRGSDPQSWSRVYCSLAKRGHFNIRISHGLQGLSAVPLRTYASGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFSGSVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYS	TAT MTS (1 ad) 81-210 FRAのアミノ酸配列
31	MRKKRRQRRRGSDPGALVIRGIRNFNLENRAEREISKMKPSVAPRHPSSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFSGSVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYS	TAT MTS (o rf) 81-210 FRAのアミノ酸配列
32	GSDP	リンカーのアミノ酸配列
33	MRKKRRQRRRALLTAAARLLGTKNASCLVLAARHASSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFSGSVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYS	TAT MTS (c s) 81-210 FRA Δリンカーのアミノ酸配列
34	MRKKRRQRRRWTLGRRVAGLLASPSPAQAQTLTRVPRPAELAPLCGRRGLRTDIDATCTPRRASSNQRLNQIWNVKKQSVYLMNLRKSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFSGSVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYS	TAT MTS (f ra) 81-210 FRA Δリンカーのアミノ酸配列
35	MRKKRRQRRRQSWSRVYCSLAKRGHFNIRISHGLQGLSAVPLRTYASGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFSGSVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYS	TAT MTS (1 ad) 81-210 FRA Δリンカーのアミノ酸配列
36	MRKKRRQRRRGALVIRGIRNFNLENRAEREISKMKPSVAPRHPSSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFSGSVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYS	TAT MTS (o rf) 81-210 FRA Δリンカーのアミノ酸配列

10

20

30

40

上記表1に、上記で用いたプライマー(すなわち、配列番号7～配列番号14で示すプライマー)の核酸配列(nt)、TATドメインのアミノ酸配列(aa)(配列番号21で示す)、本開示で用いたTATドメインの断片のアミノ酸配列(配列番号27で示す)およびそれらをコードする核酸配列(配列番号1で示す)、種々のMTS、すなわちMTS fra、MTS cs、MTS orf、およびMTS ladのアミノ酸配列(それぞれ配列番号22、配列番号23、配列番号25、および配列番号24で示す)およびそれらをコードする核酸配列(それぞれ配列番号2、配列番号3、配列番号4、および配列番号5で示す)、成熟フラタキシンのアミノ酸配列(配列番号26で示す)およびそれらをコードする核酸配列(配列番号6で示す)、およびOTCタンパク質およびヒトミトコンドリアGLUD2のMTSをコードする核酸配列(それぞれ配列番号15および配列番号16で示す)をまとめている。GSDPのアミノ酸配列を有する長さ4アミノ酸のリンカーも上記表1に記載し、配列番号32で示す。

10

【0180】

さらに、上記表1は、成熟フラタキシンを含む種々のHis TAT MTS 81-210 FRA構築物、すなわち、His TAT MTS(cs) 81-210 FRA、His TAT MTS(fra) 81-210 FRA(本明細書では「HTフラタキシン」ともいう)、His TAT MTS(lad) 81-210 FRA、およびHis TAT MTS(orf) 81-210 FRAのアミノ酸配列(それぞれ配列番号17、配列番号18、配列番号19および配列番号20で示す)を示す。配列番号17、配列番号18、配列番号19、および配列番号20で示す種々のHis TAT MTS 81-210 FRA構築物はすべてTATとMTSドメインを連結する配列番号32で示される短いペプチドリンカーを含む。

【0181】

20

さらに、上記表1は、N末端にHisタグを含まず、配列番号32で示す短いペプチドリンカー(TATとMTSドメインを連結する)を含む構築された種々の融合構築物のアミノ酸配列を示す。これらの構築物は、TAT、リンカー、MTS、および成熟フラタキシン(81-210 FRA)を含む、すなわちそれぞれ配列番号28、配列番号29、配列番号30、および配列番号31で示すTAT MTS(cs) 81-210 FRA、TAT MTS(fra) 81-210 FRA、TAT MTS(lad) 81-210 FRA、およびTAT MTS(orf) 81-210 FRA。

【0182】

さらに、上記表1は、Hisタグを含まず、リンカーを含まない構築された種々の融合構築物のアミノ酸配列を示す。これらの融合構築物はTAT、MTSおよび成熟フラタキシン(81-210 FRA)を含む、すなわちそれぞれ配列番号33、配列番号34、配列番号35、および配列番号36で示すTAT MTS(cs) 81-210 FRA Δリンカー、TAT MTS(fra) 81-210 FRA Δリンカー、TAT MTS(lad) 81-210 FRA Δリンカー、およびTAT MTS(orf) 81-210 FRA Δリンカー。

30

【0183】

タンパク質発現および精製

該融合タンパク質をコードするプラスミドで形質転換したE. coli BL21-CodonPlus(λ D E3)またはHMS完全細胞を、カナマイシン(50 μg/ml)、テトラサイクリン(12.5 μg/ml)、およびクロラムフェニコール(34 μg/ml)を含む生理食塩水ラクトースブロス(SLB培地)中で37℃でインキュベーションした。OD600、0.2～0.3で、0.1%グリセロール、および0.1mMグルタミン酸カリウムを培養に加え、次いで、42℃で20～30分間熱ショックを与え、次いで細菌をOD600が0.8になるまで37℃で増殖させた。タンパク質発現をイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG、最終濃度を下記表2に示す)を加えて誘導した。22℃で18時間インキュベーションした後、細胞を遠心分離により回収した(4℃、500gで15分)。

40

【0184】

精製手順は、発現細胞培養0.5Lから得た細菌ペレットを結合緩衝液(PBS、pH7.4、0.4M NaCl、10%グリセロール、1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)、および30mM イミダゾール(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA))中で超音波処理した。サスペンションを遠心分離(4℃、35,000gで30分間)により浄化し、該融合タンパク質を含む上清を自然条件下で結合緩衝液で予め平衡化したHiTrap Chelating HPカラム(Amersham-Pharmacia Biotech、Uppsala、Sweden)を用いて精製した。カラムを増加するイミダゾール濃度を段階的に加えて洗浄した。最後に、標的タンパク質を溶出緩衝液(PBS、pH7.4、0.4M NaCl、10

50

%グリセロール、250mMイミダゾール)を用いて溶出した。すべての精製手順をFPLCシステムAKTA(Amersham-Pharmacia Biotech)を用いて実施した。イミダゾール、NaCl、およびグリセロールを、PD-10脱塩カラム(GE Healthcare、Piscataway、NJ、USA)を用いて精製タンパク質をPBSに移して除去した。該タンパク質のアリコートを使用するまで-80℃で凍結した。

【0185】

【表5】

表2 TAT-MTS-FRA融合タンパク質の発現条件

タンパク質	細菌宿主	熱ショック	誘導温度(℃)	IPTG (mM)
TAT-MTSfra-FRA	codonPlus	あり	22、一夜	0.5
TAT-MTScs-FRA	codonPlus	あり	22、一夜	0.5
TAT-MTSorf-FRA	HMS	あり	22、一夜	1.0
TAT-MTSlad-FRA	HMS	あり	22、一夜	1.0

10

融合タンパク質の特徴付け

タンパク質濃度の測定：タンパク質濃度をBradford試薬とBSAの標準曲線を用いるBradford法に従って測定した。タンパク質濃度を595nmの波長で測定した。

【0186】

電気泳動によるタンパク質の分離：種々のタンパク質分画(5~20 μgタンパク質/レーン)の試料を12%または15%(w/v)SDS-PAGEゲルに流した。タンパク質の分離をSturdielスラブゲル電気泳動を装置を取扱説明書に(Hoefer Sci Instruments、San Francisco、CA、USA)に従って用いて行った。

20

【0187】

Westernプロット分析：タンパク質(5~20 μgタンパク質/レーン)を12%~15%SDS-PAGEゲルで分離し、次いでImmobilon-Pトランスファー膜(Millipore、Bradford、PA、USA)に移した。Westernプロット分析をそれぞれ1:600および1:30,000に希釈した抗フラタキシン(Abcam)または抗His(Amersham-Pharmacia Biotech)抗体を用いて行い、関連タンパク質を同定した。一次抗体の結合をホースラディッシュペーパーオキシダーゼ(HRP)(1:10,000)と結合した適切な二次抗体を用いてプロットすることにより検出した。バンドの可視化を増幅化学発光キット(EZ-ECL、Biological Industries、Beit-Haemek、Israel)を用いて行った。

30

【0188】

患者の繊維芽細胞のミトコンドリア中へのTAT-MTS-FRAの内在化

FA患者繊維芽細胞(Coriellレポジトリ、#GM03816、F816と呼ぶ)を解凍し、アッセイを行う前に少なくとも2~3回継代し、次いでミトコンドリアターゲティング配列(MTS)としてフラタキシンおよびクエン酸シンターゼを含む融合タンパク質構築物TAT-MTS(cs)-FRA(20 μg/ml)存在下で2、6、および48時間インキュベーションし、24時間後にTAT-MTS(CS)-FXN(20 μg/ml)を新たに加えた。ピークルを陰性コントロールとして加えた。細胞をミトコンドリア単離キット(Millipore、MIT1000)を用いて細胞質(C)およびミトコンドリア(M)分画に分画した。すべての分画を、ブロッキング溶液で1:500に希釈したフラタキシンのC末端領域に対するモノクローナル抗フラタキシン抗体(Abnova、cat. no. H00002395-M02、ロット08078-3F3)を用いるWesternプロット分析により分析した。ブロッキング溶液で1:20,000に希釈した1mg/mlヤギ抗マウスIgG-h+lアルカリホスファターゼ結合抗体(BETHYL、Cat#A90-116AP-16)1mlで検出を行った。BCIPO/NBT-Blue(Sigma、B3804)イムノプロットティングに用いるそのまま使用できる緩衝アルカリホスファターゼ基質を用いてシグナルを発現させた。

40

【0189】

アコニターゼ活性アッセイ

50

アコニターゼ活性アッセイを市販キット(Abcam、ab109712、マイクロプレートアッセイキット)を使用説明書に従って用いて行った。イソシトレートのシス-アコニテートへの変換を特定時点のOD 240nmの吸光度の増加として測定し、活性率として計算した(mOD/min)。

【0190】

酸化ストレスを誘導するためのBSO実験

正常または患者のリンパ球(4×10^3 細胞/ $100 \mu\text{l}$)をフェノールレッドおよびビルビン酸ナトリウム不含ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、Bet Ha'emek、Israel)培地(実験培地)に播き、3~4時間後、試験したTAT-MTS-FR融合タンパク質(最終濃度 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)を細胞に5または24時間加えた。該融合タンパク質とのインキュベーション時間後、種々の濃度のL-ブチオニン-スルホキシミン(BSO、Sigma B2640)をさらに48時間加えた。インキュベーション時間の終了時に細胞培養を下記のごとくCellTiter-Blue(登録商標)キット(Promega、Madison、WI)を使用説明書に従って用い細胞生存率または細胞増殖アッセイにかけた。繊維芽細胞を用いて行う実験では、細胞(3×10^3 細胞/ $100 \mu\text{l}$)を上記のごとく増殖培地に播き、24時間放置して細胞を付着させた。24時間後、培地を実験培地に交換し、上記リンパ球について記載したように実験を続けた。

【0191】

細胞増殖アッセイ

サスペンション中に増殖した 10^4 / $100 \mu\text{l}$ /ウェル細胞または 5×10^3 / $100 \mu\text{l}$ /ウェル付着細胞を播き、増加する濃度の融合タンパク質で48~72時間処理し、次いで、CellTiter-Blue(登録商標)試薬(Promega、Madison、WI、USA)を使用説明書に従って用いて細胞生存率を測定した。すべての実験をトリプリケートで行った。

【0192】

in vitroカスパーゼ3活性アッセイ

サスペンション中で増殖した 10^4 / $100 \mu\text{l}$ /ウェル細胞または 5×10^3 / $100 \mu\text{l}$ /ウェル付着細胞を該融合タンパク質($0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、最終濃度)で処理した。細胞内のカスパーゼ3活性をApo-ONE(登録商標)ホモジニアス・カスパーゼ3/7アッセイキット(Promega)により評価した。カスパーゼ3活性アッセイを細胞生存率アッセイと並行して行った。

【0193】

His-TAT-MTS-OTC構築物の製造

His-TAT-MTS断片と結合したオルニチントランスカルバモイラーゼ(OTC)を含む融合タンパク質構築物、すなわち、His-TAT-MTS(otc)-OTC、His-TAT-MTS(lad)-OTC、His-TAT-MTS(cs)-OTC、およびHis-TAT-MTS(orf)-OTCをGenScriptから得た。これらの融合タンパク質構築物を、これらの構築物を有するベクターをE. coli細胞中で発現させ、次いでNiカラムクロマトグラフィを用いて封入体から約80%の純度に精製して調製した。

【0194】

表3 TAT-MTS-OTC構築物の核酸およびアミノ酸配列

10

20

30

【表 6】

配列番号	配列	名前
37	CTGTTTAACCTGCGCATTCTGCTGAACAATGCGGCCTTCCG TAACG GCCATAATTTTATGGTCCGCAACTTCCGTTGCGGTCAGCCGCTGCA AAATAAAGTGCGAG	OTCのMTS のヌクレ オチド配 列
38	LFNLRILLNNAAFRNGHNFMRNFRGQPLQNKVQ	OTCのMTS のアミノ 酸配列
39	LKGRDLLTLRNFTGEEIKYMLWLSADLKFRKQKGEYLPLLQG KSL GMIFEKRSTRTRLSTETGFALLGGHPCFLTQTQDIHLG VNESLTDTA RVLSSMADAVLARVYKQSDLDLTAKEASIPINGLSLDLYHPIQILA DYLTLQEHYSSLKGLTSLWIGDGNILHSIMMSAAKFGMHLQAATP KGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLLLTNDPLEAAHGGNVLITDTWI SMGQEEEEKKRLQAFQGYQVTMTAKVAASDWTFLHCLPRKPPEVD DEVFYSPRSLVFPEAEN RKWTIMAVMVSLLDYSPQLQKPKF	成熟OTCの アミノ酸 配列
40	CATATGGGCT CATCGCATCA TCATCATCAT CACTCATCAG GTCTGGTTCC GCGTGGCTCG CACATGTATG GTCGCAAAAA ACGTCGTCAA CGTCGCCGTC TGTTTAACCT GCGCATTCTG CTGAACAATG CGGCCTTCCG TAACGGCCAT AATTTTATGG TCCGCAACTT CCGTTGCGGT CAGCCGCTGC AAAATAAAGT GCAGCTGAAA GGCCGCGATC TGCTGACCCT GCGTAACTTC ACGGGTGAAG AAATCAAATA CATGCTGTGG CTGAGCGCAG ACCTGAAATT CCGCATCAAA CAAAAAGGCG AATACCTGCC GCTGCTGCAG GGCAAATCTC TGGGTATGAT TTTTGAAAAA CGTAGTACCC GCACGCGTCT GTCCACCGAA ACGGGCTTTG CCCTGCTGGG CGGTCATCCG TGTTTCCTGA CCACGCAAGA TATCCACCTG GGTGTGAACG AAAGTCTGAC CGATACGGCA CGCGTTCTGA GCTCTATGGC AGACGCTGTG CTGGCTCGTG TTTATAAACA GTCCGATCTG GACACCCTGG CGAAAGAAGC CTCAATTCCG ATTATCAATG GCCTGTCGGA TCTGTACCAT CCGATTCAAA TCCTGGCGGA CTATCTGACC CTGCAGGAAC ACTACAGTTC CCTGAAAGGT CTGACCCTGA GTTGGATCGG CGATGGTAAC AATATTCTGC ATAGCATCAT GATGTCTGCA GCTAAATTTG GCATGCACCT GCAAGCGGCC ACCCCGAAAG GTTATGAACC GGATGCCAGC GTTACGAAAC TGGCAGAACA GTACGCTAAA GAAAACGGTA CCAAACCTGCT GCTGACGAAT GATCCGCTGG AAGCAGCTCA TGGCGGTAAC	His-TAT-M TS(otc)-0 TC Δリンカ ーのヌク レオチド 配列

10

20

30

40

10

20

30

40

【表 8】

42	CATATGGGTT CATCACATCA TCATCATCAT	His-TAT-M TS(orf)-0 TCのヌク レオチド 配列
	CATTCATCAG GTCTGGTCCC GCGTGGTTCA	
	CACATGCGTA AAAAACGTCG TCAGCGTCGT	
	CGTGGCAGTG ATCCGGGTGC GCTGGTCATT	
	CGTGGCATCC GCAACTTTAA TCTGAAAAAC	
	CGTGCGGAAC GCGAAATTAG TAAAATGAAA	
	CCGTCCGTGG CACCGCGTCA TCCGTCTGAA	
	TTTCTGAAAG GCCGTGATCT GCTGACCCTG	
	CGCAACTTCA CGGGTGAAGA AATCAAATAC	
	ATGCTGTGGC TGAGTGCAGA CCTGAAATTC	
	CGTATCAAAC AAAAGGGTGA ATACCTGCCG	
	CTGCTGCAGG GCAAATCCCT GGGTATGATT	
	TTCGAAAAAC GCTCAACCCG TACGCGCCTG	
	TCGACCGAAA CGGGCTTTGC CCTGCTGGGC	
	GGTCATCCGT GCTTCCTGAC CACGCAAGAT	
	ATCCACCTGG GTGTGAACGA ATCACTGACC	
	GATACGGCAC GTGTTCTGAG CTCTATGGCA	
	GACGCAGTGC TGGCTCGTGT TTATAAACAG	
	TCGGATCTGG ACACCCTGGC AAAAGAAGCT	
	AGCATTCCGA TTATCAATGG CCTGTCTGAT	
	CTGTACCATC CGATTCAAAT CCTGGCGGAC	
	TATCTGACCC TGCAGGAACA CTACAGTTCC	
	CTGAAAGGTC TGACCCTGAG CTGGATCGGC	
	GATGGTAACA ATATTCTGCA TAGCATCATG	
	ATGTCTGCGG CCAAATTTCG CATGCACCTG	
	CAAGCAGCTA CCCC GAAAGG TTATGAACCG	
	GACGCCTCCG TTACGAAACT GGC GGAACAG	
	TACGCCAAAG AAAACGGCAC CAAACTGCTG	
	CTGACGAATG ATCCGCTGGA AGCGGCCCAT	
	GGCGGTAACG TCCTGATTAC CGACACGTGG	
	ATCAGCATGG GCCAGGAAGA AGAAAAGAAA	
	AAACGTCTGC AGGCATTTCA AGGTTATCAG	
	GTTACCATGA AAACGGCTAA AGTCGCAGCT	
	TCTGATTGGA CCTTCCTGCA CTGTCTGCCG	
	CGCAAACCGG AAGAAGTCGA TGACGAAGTG	
	TTTTACTCAC CGCGTTCGCT GGTGTTCCCG	
	GAAGCGGAAA ATCGCAAATG GACCATTATG	
	GCTGTGATGG TGTCGCTGCT GACGGACTAC	
	TCGCCGCAAC TGCAAAAACC GAAATTCTAA TGAAAGCTT	
43	CATATGGGTA GTTCACATCA TCATCATCAT	His-TAT-M TS(1ad)-0 TCのヌク レオチド 配列
	CACTCGTCGG GTCTGGTGCC GCGTGGCTCA	
	CACATGCGTA AAAAACGTCG TCAGCGTCGT	
	CGTGGCTCAG ATCCGCAATC ATGGTCGCGC	
	GTCTATTGCT CGCTGGCGAA ACGTGGTCAT	
	TTTAACCGCA TTAGCCACGG CCTGCAGGGT	
	CTGTCTGCAG TGCCGCTGCG TACCTACGCT	
	GAATTTCTGA AAGGCCGTGA TCTGCTGACC	
	CTGCGCAACT TCACGGGTGA AGAAATCAAA	

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【表 10】

45	MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MRKKRRQRRR GSDPALLTAA ARLLGTKNAS CLVLAARHAS EFLKGRDLLT LRNFTGEEIK YMLWLSADLK FRIKQKGEYL PLLQGKSLGM IFEKRSTRTR LSTETGFALL GGHPCFLTQ DIHLGVNESL TDTARVLSSM ADAVLARVYK QSDLDTLAKE ASIPILINGLS DLYHPIQILA DYLTQLQEHYS SLKGLTLSWI GDGNNILHSI MMSAAKFGMH LQAATPKGYE PDASVTKLAE QYAKENGTKL LLTNDPLEAA HGGNVLITDT WISMGQEEEEK KKRLQAFQGY QVTMKTAKVA ASDWTFLHCL PRKPEEVDDE VFYSPRSLVF PEAENRKWTI MAVMVSLTLD YSPQLQKPKF	His-TAT-M TS(cs)-OT Cのアミノ 酸配列
46	MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MRKKRRQRRR GSDPGALVIR GIRNFNLENR AEREISKMKP SVAPRHPSEF LKGRDLLTLR NFTGEEIKYM LWLSADLKFR IKQKGEYLP LQGKSLGMIF EKRSTRTRLS TETGFALLGG HPCFLTQDI HLGVNESLTD TARVLSSMAD AVLARVYKQS DLDTLAKEAS IPIINGLSL YHPIQILADY LTLQEHYSSL KGLTLSWIGD GNNILHSIMM SAAKFGMHLQ AATPKGYEPD ASVTKLAEQY AKENGTKLLL TNDPLEAAHG GNVLITDTWI SMGQEEEEKK RLQAFQGYQV TMKTAKVAAS DWTFLHCLPR KPEEVDDEVF YSPRSLVFPE AENRKWTIMA VMVSLTLDYS PQLQKPKF	His-TAT-M TS(orf)-O TCのアミ ノ酸配列
47	MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MRKKRRQRRR GSDPQSWSRV YCSLAKRGHF NRISHGLQGL SAVPLRTYAE FLKGRDLLTL RNFTGEEIKY MLWLSADLKFR RIKQKGEYLP LLQGKSLGMI FEKRSTRTRL STETGFALLG GHPCFLTQD IHLGVNESLT DTARVLSSMA DAVLARVYKQ SDLDTLAKEA SIPIINGLSL LYHPIQILAD YLTQLQEHYSS LKGLTLSWIG DGNNILHSIM MSAAKFGMHL QAATPKGYEP DASVTKLAEQ YAKENGTKLL LTNDPLEAAH GGNVLITDTW ISMGQEEEEK KRLQAFQGYQ VTMKTAKVAA SDWTFLHCLP RKPEEVDDEV FYSPRSLVFP EAENRKWTIM AVMVSLTLDY SPQLQKPKF	His-TAT-M TS(lad)-O TCのアミ ノ酸配列
48	RKKRRQRRRL FNLRIILLNNA AFRNGHNFMV RNFRCGQPLQ NKVQLKGRDL LTLRNFTGEE IKYMLWLSAD LKFERIKQKGE YLPLLQGKSL GMIFEKRSTR TRLSSTETGFA LLGGHPCFLT TQDIHLGVNE SLTDARVLS SMADAVLARV YKQSDLDTLA KEASIPILING LSDLYHPIQI LADYLTQLQEH YSSLKGLTSL WIGDGNNILH SIMMSAAKFG MHLQAATPKG YEPDASVTKL	TAT-MTS(o tc)-OTC Δリンカ ーのアミ ノ酸配列

10

20

30

40

50

【表 1 1】

	AEQYAKENGT KLLLTNDPLE AAHGGNVLIT DTWISMGQEE EKKKRLQAFQ GYQVTMKTAK VAASDWTFLH CLPRKPEEVD DEVFYSPRSL VFPEAENRKW TIMAVMVSLT TDYSPQLQKPKF	
49	MRKKRRQRRR GSDPALLTAA ARLLGTKNAS CLVLAARHAS EFLKGRDLLT LRNFTGEEIK YMLWLSADLK FRIKQKGEYL PLLQGKSLGM IFEKRSTRTR LSTETGFALL GGHPCFLTTO DIHLGVNESL TDTARVLSSM ADAVLARVYK QSDLDTLAKE ASIPILINGLS DLYHPIQILA DYLTQLQEHYS SLKGLTLSWI GDGNNILHSI MMSAAKFGMH LQAATPKGYE PDASVTKLAE QYAKENGTKL LLTNDPLEAA HGGNVLITDT WISMGQEEEK KKRLQAFQGY QVTMKTAKVA ASDWTFLHCL PRKPEEVDDE VFYSPRSLVF PEAENRKWTI MAVMVSLTLD YSPQLQKPKF	TAT-MTS (c s)-OTCの アミノ酸 配列
50	MRKKRRQRRR GSDPGALVIR GIRNFNLENR AEREISKMKP SVAPRHPSEF LKGRDLLTLR NFGTEEEKYM LWLSADLKFR IKQKGEYLP LQGKSLGMIF EKRSTRTRL S TETGFALLGG HPCFLTTOQDI HLGVNESLTD TARVLSSMAD AVLARVYKQS DLDTLAKEAS IPIINGLSDL YHPIQILADY LTLQEHYSSL KGLTLSWIGD GNNILHSIMM SAAKFGMHLQ AATPKGYEPD ASVTKLAEQY AKENGTKLLL TNDPLEAAHG GNVLITDTWI SMGQEEEEKK RLQAFQGYQV TMKTAKVAAS DWTFLHCLPR KPEEVDDEVF YSPRSLVFPE AENRKWTIMA VMVSLTLDYS PQLQKPKF	TAT-MTS (o rf)-OTCの アミノ酸 配列
51	MRKKRRQRRR GSDPQSWSRV YCSLAKRGHF NRISHGLQGL SAVPLRTYAE FLKGRDLLTL RNFTGEEIKY MLWLSADLKFR RIKQKGEYLP LLQGKSLGMI FEKRSTRTRL STETGFALLG GHPCFLTTOQD IHLGVNESLT DTARVLSSMA DAVLARVYKQ SDLDTLAKEA SIPIINGLSL LYHPIQILAD YLTQLQEHYSS LKGLTLSWIG DGNNILHSIM MSAAKFGMHL QAATPKGYEP DASVTKLAEQ YAKENGTKLL LTNDPLEAAH GGNVLITDTW ISMGQEEEEK KRLQAFQGYQ VTMKTAKVAA SDWTFLHCLP RKPEEVDDEV FYSPRSLVFP EAENRKWTIM AVMVSLTLDY SPQLQKPKF	TAT-MTS (l ad)-OTCの アミノ酸 配列

10

20

30

40

【表 1 2】

52	MRKKRRQRRR ALLTAA ARLLGTKNAS CLVLAARHAS EFLKGRDLLT LRNFTGEEIK YMLWLSADLK FRIKQKGEYL PLLQGKSLGM IFEKRSTRTR LSTETGFALL GGHPCFLTQ DIHLGVNESL TDTARVLSSM ADAVLARVYK QSDLDTLAKE ASIPILINGLS DLYHPIQILA DYLTQLQEHYS SLKGLTSLWI GDGNNILHSI MMSAAKFGMH LQAATPKGYE PDASVTKLAE QYAKENGTKL LLTNDPLEAA HGGNVLTITD WISMGQEEEEK KKRLQAFQGY QVTMKTAKVA ASDWTFHLCL PRKPEEVDDE VFYSPRSLVF PEAENRKWTI MAVMVSLLLTD YSPQLQKPKF	TAT-MTS(c s)-OTC Δ リンカー のアミノ 酸配列
53	MRKKRRQRRR GALVIR GIRNFNLENR AEREISKMKP SVAPRHPSEF LKGRDLLTLR NFTGEEIKYM LWLSADLKFR IKQKGEYLP LQGKSLGMIF EKRSTRTRLS TETGFALLGG HPCFLTQDI HLGVNESLTD TARVLSSMAD AVLARVYKQS DLDTLAKEAS IPIINGLSDL YHPIQILADY LTLQEHYSSL KGLTSLWIGD GNNILHSIMM SAAKFGMHLQ AATPKGYEPD ASVTKLAEQY AKENGTKLLL TNDPLEAAHG GNVLTITDTWI SMGQEEEEKK RLQAFQGYQV TMKTAKVAAS DWTFLHCLPR KPEEVDDEVF YSPRSLVFPE AENRKWTIMA VMVSLLLTDYS PQLQKPKF	TAT-MTS(o rf)-OTC Δリンカ ーのアミ ノ酸配列
54	MRKKRRQRRR QWSRV YCSLAKRGHF NRISHGLQGL SAVPLRTYAE FLKGRDLLTL RNFTGEEIKY MLWLSADLKFR RIKQKGEYLP LLQGKSLGMI FEKRSTRTRL STETGFALLG GHPCFLTQD IHLGVNESLT DTARVLSSMA DAVLARVYKQ SDLDTLAKEA SIPIINGLSL LYHPIQILAD YLTQLQEHYSS LKGLTSLWIG DGNNILHSIM MSAAKFGMHL QAATPKGYEP DASVTKLAEQ YAKENGTKLL LTNDPLEAAH GGNVLTITDTW ISMGQEEEEK KRLQAFQGYQ VTMKTAKVAA SDWTFHLHCLP RKPEEVDDEV FYSPRSLVFP EAENRKWTIM AVMVSLLLTDY SPQLQKPKF	TAT-MTS(l ad)-OTC Δリンカ ーのアミ ノ酸配列

10

20

30

【0195】

表3は、OTCタンパク質のMTSのアミノ酸配列およびそれをコードするヌクレオチド配列(それぞれ配列番号38および配列番号37で示す)、成熟OTCのアミノ酸配列(配列番号39で示す)、および融合タンパク質構築物 His-TAT-MTS(otc)-OTC Δリンカー、His-TAT-MTS(cs)-OTC、His-TAT-MTS(orf)-OTC、およびHis-TAT-MTS(lad)-OTCをコードするヌクレオチド配列(それぞれ配列番号40、配列番号41、配列番号42、および配列番号43で示す)を示す。表3は、融合タンパク質構築物 His-TAT-MTS(otc)-OTC Δリンカー、His-TAT-MTS(cs)-OTC、His-TAT-MTS(orf)-OTC、およびHis-TAT-MTS(lad)-OTCのアミノ酸配列(それぞれ配列番号44、配列番号45、配列番号46、および配列番号47で示す)も示す。

40

【0196】

Hisタグを含まず、ミトコンドリア活性タンパク質OTCを含む融合タンパク質構築物、すなわち構築物 配列番号48で示すアミノ酸配列を有するTAT-MTS(otc)-OTC Δリンカー、TA

50

T-MTS(cs)-OTC(配列番号49で示す)、TAT-MTS(orf)-OTC(配列番号50で示す)およびTAT-MTS(lad)-OTC(配列番号51で示す)も列挙する。

【0197】

本開示の該融合タンパク質構築物は、TATとMTS断片の間に位置するリンカーの存在下またはその非存在下で調製することができる。したがって、表3は、His-TAT-MTS(otc)-OTC Δリンカー、TAT-MTS(cs)-OTC Δリンカー、TAT-MTS(orf)-OTC Δリンカー、TAT-MTS(lad)-OTC Δリンカーと呼ぶ融合タンパク質構築物の配列(それぞれ配列番号44、配列番号52、配列番号53、および配列番号54で示すアミノ酸配列を有する)も示す。

【0198】

His-TAT-MTS-OTC構築物のミトコンドリア中への内在化

10

10⁷ HepG2細胞培養(ATCC、#HB-8065)をT-75フラスコに播いた。翌日、12 μg/mlの、上記のごとく調製したOTC、CS、またはLADを含むTAT-MTS-OTC融合タンパク質構築物をイーグル最小必須培地(EMEM)完全培地、またはDMSO(1%)およびトレハロース(30mM)添加EMEM培地、またはDMSO(1%)、トレハロース(30mM)、およびオルニチン(1mM)添加EMEM培地中の細胞に加え、20分間、1または3時間インキュベーションした。次に、細胞を、ミトコンドリア単離キット(Millipore、MIT1000)を使用説明書に従って用いて細胞質とミトコンドリア分画に分画した。分画を、1:1000希釈した1mg/mlのOTCのC末端領域に対するモノクローナル抗体(Aviva Systems Biology、cat. no. ARP41767_P050)を用いるWesternブロット分析で分析した。ブロッキング緩衝液で1:20,000に希釈した0.8mg/mlのヤギ抗ウサギIgG(H_L)二次抗体パーオキシダーゼ結合(Jackson AffiniPure、Code 111-035-003)を用いて検出を行った。化学発光混合物(SC-2048 Santa Cruz)を使用説明書に従って用いてシグナルを発現させた。

20

【0199】

OTCの酵素活性によるシトルリンのin vitro生成

上記のごとく調製したOTCまたはCSのMTSを含む精製TAT-MTS-OTC融合タンパク質構築物の酵素活性を[40]に記載のごとく試験した。簡単には、タンパク質を、ミトコンドリア溶解緩衝液(0.5%トリトン、10mM HEPES、pH7.2、および2mMジチオスレイトール)で希釈して容量80 μl中20 μgの濃度とした。次に、各反応混合物の容量を520 μl反応混合物(5mMオルニチン、15mMカルバモイルリン酸、および270mMトリエタノールアミン、pH7.7)を加えて600 μlとした。渦巻き攪拌後、各反応混合物を2つの別のチューブに分け、最初のチューブは37℃で30分間インキュベーションし、第2チューブを「無反応」バックグラウンドとして用い、OTCタンパク質の内因性シグナルを引くのに用いた。150 μlの1:3硫酸/リン酸(容量による)を加えて反応を終えた。次に、シトルリン生成物を、20 μlの3% 2,3-ブタンジオンモノキシムを加え、暗部で100℃で15分間インキュベーションし、490nmの吸光度を測定することにより測定した。市販のBacillus subtilis由来OTC(Sigma、5ng)を陽性コントロールとして用いた(データ示さず)。

30

【0200】

アンモニア存在下のHepG2細胞中のOTCの酵素活性

HepG2細胞 2.5x10⁵(ATCC、#HB-8065)/ウェルを2つの6ウェルプレートに播いた。翌日、OTCまたはCSのMTSを含むTAT-MTS-OTC融合タンパク質構築物(上記のごとく製造)を各24時間後に補充しながら72時間、細胞に適用した。該融合タンパク質の最終濃度は3mlの完全培地中14 μg/mlであり、最終緩衝液希釈は1:85であった。タンパク質保存緩衝液(1x PBS、0.5%ナトリウムラウロイルサルコシンpH7.4)をビークルコントロールとして用い、非処理細胞を陰性コントロールとして用いた。アッセイ終了前48時間に、細胞を、5mM塩化アンモニウムの存在下または非存在下で0.5%血清増殖培地で処理した。細胞の生存率をalarBlue細胞生存率アッセイ試薬(Pierce)を用いて4時間モニターした。蛍光シグナルを544nmの励起および590nmの放射により得た。

40

【実施例1】

【0201】

TAT-MTS-FR融合タンパク質をコードするプラスミドのクローニング

50

TAT融合タンパク質をコードする発現プラスミドを当該分野で知られた標準的分子生物学によりクローニングし作製した。一般的参考文献としてMolecular Cloning: A Laboratory manual(2001) Joseph Sambrook and David William Russellを参照のこと。配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する(配列番号1で示される核酸配列によりコードされる)TAT [9]を成熟ヒトフラタキシントタンパク質(配列番号26で示されるアミノ酸配列を有する、配列番号6で示される核酸配列によりコードされる)と融合した(N末端)。

【0202】

ヒトフラタキシンのN末端に存在する(従って、TATと成熟ヒトフラタキシンの間に位置する)ミトコンドリアターゲティング配列が異なる、フラタキシンの天然ミトコンドリアターゲティング配列(本明細書ではMTSfraといい、配列番号22で示されるアミノ酸配列を有する、配列番号2で示される核酸配列によりコードされる)、またはリポアミドデヒドロゲナーゼ(本明細書ではMTSladといい、配列番号24で示されるアミノ酸配列を有する、配列番号5で示される核酸配列によりコードされる)、C6ORF66(本明細書ではMTSorfといい、配列番号25で示されるアミノ酸配列を有する、配列番号4で示される核酸配列によりコードされる)、およびクエン酸シンターゼ(本明細書ではMTScsといい、配列番号23で示されるアミノ酸配列を有する、配列番号3で示される核酸配列によりコードされる)を含むヒトミトコンドリアタンパク質の他で定義したMTSのいずれかである種々の融合構築物を製造した。種々のTAT-MTS-FR融合タンパク質を下記表4にまとめ、図1に模式図を示す。

【0203】

すべてのプラスミドをコーディング配列の5'-末端のHis-タグでクローニングし、すべてのコーディング配列はT7プロモーターの制御下にあった。すべてのクローンを制限酵素と配列分析で確認した。

【表13】

表4 クローニングしたプラスミド構築物

No.	プラスミド名	略名
1	His-TAT-MTSfra-FRA	FRA
2	His-TAT-MTSlad-FRA	(lad)FRA
3	His-TAT-MTSorf-FRA	(orf)FRA
4	His-TAT-MTScs-FRA	(cs)FRA

略語: lad、リポアミドデヒドロゲナーゼタンパク質(E3サブユニット); orf、C6ORF66アセンブリー因子; およびcs、クエン酸シンターゼ。

【0204】

上記のように、上記表4の1~4で示すクローニングしたプラスミド構築物から得た融合タンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号18、配列番号19、配列番号20、および配列番号17で示される。

【実施例2】

【0205】

E. coli宿主における融合タンパク質の発現

融合タンパク質の発現を下記のごとくE. coli宿主で実施し、最適発現条件について調整した。当該分野で知られているように、種々の異なる細菌発現系がある。組換えタンパク質の発現の成功は、しばしば用いる細菌発現系の菌株に依存する。したがって、上記のごとく製造した各融合タンパク質につき4つの異なるE.coli細菌株(BL21-CodonPlus、BL21、Rosetta、およびHMS(Invitrogen、USA))を試験し、発現用の宿主を選んだ。発現条件も、インデューサーのイソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)の濃度および誘発増殖条件(すなわち、温度、化学物質の添加など)の長さを含む種々のパラメーターを変化させることにより各TAT融合タンパク質について調整した。

【0206】

発現したら、細菌細胞を破壊し、可溶性分画と不溶性分画を分けて細胞サブ分画を作製した。該融合タンパク質が発現するか否か、また、それがどの細胞内分画に蓄積するかを試験するため、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)ゲルを用いて全細胞細菌(W.C.または全細胞抽出物)、可溶性分画(Sol)および不溶性分画(Insol)について分析を行った。本目的は、発現している細菌の可溶性サブ分画中の種々のTAT融合タンパク質の高い発現レベルを得ることである。また、種々のTAT融合タンパク質を抗His抗体と抗フラタキシン抗体の両方を用いるWesternブロット分析により特徴づけた。上記表2に、種々のMTS配列を有する各TAT-MTS-FR融合タンパク質を製造するための細菌宿主、IPTG濃度、および温度をまとめている。

【0207】

SDS-PAGEゲルおよび抗His抗体を用いるWesternブロットにより特徴づけた4つの融合タンパク質のそれぞれの典型的発現と細胞下の局在を図2および図3に示す。His-TAT-MTSfrA-FR融合タンパク質の発現を図2A~2Bに示し、His-TAT-MTSorf-FR融合タンパク質の発現を図2C~2Dに示し、His-TAT-MTSlad-FR融合タンパク質の発現を図3A~3Bに示し、His-TAT-MTScs-FR融合タンパク質の発現を図3C~3Dに示す。これら実験で種々のTAT融合タンパク質の完全長発現とその同一性を確認した。

【0208】

抗His抗体は、抗体の相互作用に関して最終タンパク質製造におけるHis配列の露出または利用可能性に応じて有効性が異なる種々の融合タンパク質をほぼ確実に認識することを指摘すべきである。したがって、種々の融合タンパク質の発現レベルはSDS-PAGEゲルに基づいて決定される。

【0209】

図2および図3に示すように、TAT-MTSfrA-FR融合タンパク質(図2A&図2B)は、最良に調整した条件でも、ヘテロローガスなMTSを有する他の3つの融合タンパク質に比べて細菌宿主中での発現が低レベルであった(図2C&図2Dおよび図3A~3D)。したがって、天然フラタキシン-MTSの代わりにヘテロローガスなMTSを用いると細菌宿主におけるその発現レベルに好都合である。これは、該融合タンパク質を大量に製造する必要があるヒトで使用するためのその将来の展開に大きな暗示を与える(以下も参照のこと)。

【実施例3】

【0210】

TAT-MTS-FR融合タンパク質の精製

発現したTAT-MTS-FR融合タンパク質の可溶性分画を、上記のごとくこれらのタンパク質をアフィニティ精製するためにニッケルキレートリングカラムに流した。融合タンパク質のアフィニティカラムへの結合、その溶出、および最終タンパク質調製物からのイミダゾールの除去の特定の条件を含む較正実験を各融合タンパク質について行った。各融合タンパク質のある典型的精製操作を図4(His-TAT-MTSfrA-FRAおよびHis-TAT-MTSorf-FRA)および図5(His-TAT-MTSlad-FRAおよびHis-TAT-MTScs-FRA)に示す。

【0211】

例えば、図4Aは、融合タンパク質TAT-MTSfrA-FRAについて得たアフィニティクロマトグラフィー精製プロファイル像を示す。このタンパク質構築物の精製工程のSDS-PAGE分析像について図4Bに示すように、図4Bのレーン7に示すタンパク質分画は、250mMイミダゾールでカラムから溶出した融合タンパク質 TAT-MTSfrA-FRAを示す。

【0212】

対応する分析は、TAT-MTSorf-FRAを図4Cおよび図4Dに、TAT-MTSlad-FRAを図5Aおよび図5Bに、およびTAT-MTScs-FRA対応分析を図5Cおよび図5Dに示す。

【0213】

図6Aに示すように、溶出したタンパク質は、SDS-PAGE分析と抗His(図6B)および抗Fra抗体(図6C)を用いるWesternブロット分析により、予期した大きさ(約20~27kDa)の主要バンドを示し、純度>95%であった。図6に示すように、ヘテロローガスなMTSを有するTAT-MTS-FR融合タンパク質は、完全長の完全タンパク質であり、タンパク質分解の証拠はなかつ

10

20

30

40

50

た(レーン2、TAT-MTScs-FRA；レーン3、TAT-MTslad-FRA；およびレーン4、TAT-MTSorf-FRA参照)。しかしながら、天然MTS配列を有するTAT-MTSfrA-FRAは部分的に分解した(図6Bおよび図6Cのレーン1参照)。したがって、TAT-FR融合タンパク質に対するヘテロローガスなMTS配列の使用は、該融合タンパク質を完全かつ安定に保つためにも好都合である。

【0214】

さらに、細菌培養の同じ出発容量から生成した各該融合タンパク質の総量および濃度を比較すると、ヘテロローガスなMTSを有する融合タンパク質は、天然MTSを有する融合タンパク質にくらべてより大量および高濃度で生成された(下記表5)。また、これは、該融合タンパク質を高濃度で大量に必要とするヒトで使用するためのその将来の展開に大きな暗示を与える。さらに、生成した融合タンパク質の安定性はさらなる利点を持つ。

10

【0215】

【表14】

表5 TAT-MTS-FRA融合タンパク質

タンパク質	最終濃度 (mg/ml)	0.5Lの細菌培養からの精製量(mg)
TAT-MTSfrA-FRA	0.2	0.6-0.7
TAT-MTScs-FRA	1.0	3-4
TAT-MTSorf-FRA	1.0	3-4
TAT-MTslad-FRA	0.8	2.4-3.2

20

【実施例4】

【0216】

TAT-MTS-FR融合タンパク質の内在化

該融合タンパク質が完全細胞内のミトコンドリアにたつする能力を試験するために、ヒトBJAB細胞を精製した融合タンパク質の1つ、すなわちTAT-MTslad-FRAとインキュベーションした。インキュベーションした後、ミトコンドリアとサイトゾルを分離して細胞内分画を調製した。次に、ミトコンドリアをプロテアーゼK(Sigma P2308)で処理して外膜に非特異的に吸着したタンパク質を消化し、ミトコンドリア抽出物にミトコンドリア内のタンパク質のみが存在することを確実にした。次に、試料を抗Hisと抗FRA抗体の両方を用いるWesternブロット分析にかけて、試料中のFRAベースの融合タンパク質の存在を分析した(図7参照)。

30

【0217】

図7Aに示すように、抗His抗体を用いた結果は、1および5時間インキュベーション後の処理した細胞のミトコンドリア分画内のHisタグ付TAT-MTslad-FR融合タンパク質の存在を示す(それぞれレーン4およびレーン6&7)。

【0218】

図7Bに示すように、抗FRA抗体を用いてミトコンドリア内にフラタキシン融合タンパク質構築物の存在が示唆される。図7Bのレーン2から、該融合タンパク質で処理しなかったコントロール細胞は、内因性FRAタンパク質、成熟アイソフォームと中間体アイソフォーム(2つの矢印で示す)の両方をほぼ確実に有することがわかる。

40

【0219】

図7B(レーン4、6、7)に示すように、TAT-MTslad-FR融合タンパク質で処理すると、プロセシングされていない融合タンパク質と成熟タンパク質の両方の相対量がインキュベーション時間とともに増加した(図7B；それぞれ上と下のバンド)。理論に縛られることを望まないが、上のバンドの増加はミトコンドリアに入り、プロセシングされなかった融合タンパク質構築物により説明される。

【0220】

細胞のミトコンドリア中にフラタキシンを含む融合タンパク質の内在化を、図8Aに示すように、他のTAT-MTS-FR融合タンパク質、すなわち、TAT-MTSfrA-FRA、TAT-MTScs-FRA、およびTAT-MTSorf-FRA(およびTAT-MTslad-FRA)についても試験した。この試験において、

50

細胞を、各TAT-MTS-FR融合タンパク質(最終濃度0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)と3時間インキュベーションした。次に、細胞を洗浄し、そのミトコンドリアを単離し、次いでフラタキシンタンパク質のC末端に対するモノクローナル抗FRA抗体(Abnova、Taiwan; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を用いるWesternブロット分析にかけた。

【0221】

図8A、レーン2~5に示すように、種々の融合タンパク質構築物間に、種々のMTSポリペプチドの長さの違いから生じるわずかなサイズ変化がみられた(図1参照)。

【0222】

図8Aに示すように、ミトコンドリア中への内在化がすべての4つのTAT-MTS-FR融合タンパク質でみられた。意外にも、図8Aのレーン3に示すように、フラタキシンとヘテロローガスなMTSを有する融合タンパク質のうち、クエン酸シンターゼMTS(MTSCs)が最も効率的にミトコンドリア中に送達されることがわかった。

【0223】

上記のように、ミトコンドリアに入る該融合タンパク質構築物の長さにわずかな変化があり、本実験条件(すなわち、細胞を各TAT-MTS-FR融合タンパク質と3時間インキュベーション)下でフラタキシンタンパク質がミトコンドリア中で各His-TAT-MTS-フラタキシン構築物から開裂しなかったことを示す(完全His-TAT-MTS-フラタキシンをまだ含むタンパク質構築物は以下で「プロセッシングされていない融合構築物」という)。

【0224】

特に、図8Aは、フラタキシンとヘテロローガスなMTS、すなわちクエン酸シンターゼのMTS(cs)、リポアミドデヒドロゲナーゼ(lad)、およびC60RF66(orf)を含む融合タンパク質では一本のバンド(プロセッシングされていない融合構築物を示す)のみがみられたが、フラタキシンの天然MTSを含む融合タンパク質では2本の異なるバンドがみられることも示す(図8A、レーン2)。理論に縛られることを望まないが、これは、TATおよび天然フラタキシンMTS領域を含む完全融合タンパク質の不安定性の結果かもしれない。

【0225】

図7Bに示す内在化アッセイにおいてフラタキシンを検出するのに用いた抗体はヒトフラタキシンに対するポリクローナル抗体であった。該抗体は、完全長のプロセッシングされていないヒトフラタキシンを非常によく認識し、そのプロセッシングされた生成物も認識する。下記の図8において、フラタキシンタンパク質のC末端に特異的なモノクローナル抗体を用いて検出を行った。該モノクローナル抗体は、特に図8に示すタンパク質の量では該タンパク質を認識する効率が悪いので、図7と図8の結果を比較することはできない。

【0226】

抗El α 抗体(Molecular Probes、Eugene、OR、1:1,000希釈)を用いるコントロールWesternブロット分析を図8Bに示す。

【実施例5】

【0227】

His-TAT-MTS(cs)-FRAは患者の繊維芽細胞のミトコンドリアに入る

ヒトBJAB細胞のミトコンドリアに入るフラタキシン融合タンパク質の能力を示す上記結果に加えて、フリードライヒ運動失調症患者から得た繊維芽細胞のミトコンドリア中へのクエン酸シンターゼのMTSを含むフラタキシン融合タンパク質の内在化を下記のごとく試験した。

【0228】

フリードライヒ運動失調症患者から得た繊維芽細胞を上記のごとく処理し、His-TAT-MTS(cs)-FRA(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)存在下で2、6、および48時間、24時間後に新たに添加してインキュベーションした。繊維芽細胞のミトコンドリアおよびサイトゾル分画を上記のごとくWesternブロット分析にて分析した。

【0229】

図9に示すように、融合タンパク質構築物His-TAT-MTS(cs)-FRAが、2、6および48時間インキュベーションした後に繊維芽細胞のミトコンドリア分画に検出された。抗フラタキシ

ン抗体により検出された2つのバンド(図9の上および下の矢印で示す)は、該融合タンパク質がミトコンドリア内でプロセッシングされることを示す。フラタキシンは、繊維芽細胞のサイトゾル分画に検出されず、すべてのHis-TAT-MTS(cs)-FR融合タンパク質構築物がミトコンドリアに入ったことを示した。

【実施例6】

【0230】

His-TAT-MTS(cs)-FRAを投与した後の患者から得た繊維芽細胞中のアコニターゼ活性

ミトコンドリア内のフラタキシシンレベルの減少は、種々の組織種に対する2つの直接効果、すなわち鉄-硫黄(Fe-S)クラスターの形成障害および細胞内反応性酸素種(ROS)の上昇を有する[35]。Fe-Sを含むタンパク質、例えばヘム、電子伝達系(ETC)複合体I~IIIおよびクレブス回路タンパク質アコニターゼの減少は、細胞呼吸を著しく損ない[36]、さらに、これらミトコンドリアタンパク質に対する同時酸化損傷を伴う。これらの事象はすべて結果的に、ミトコンドリアが細胞のエネルギー要求を満たすことができず、細胞死をもたらす[35]。

【0231】

ミトコンドリア内部のフラタキシシンの活性を評価するため、フリードライヒ運動失調症患者から得たミトコンドリア中のアコニターゼ活性レベルをHis-TAT-MTS(cs)-FRAの投与時に試験した。

【0232】

上記のごとく処理し、His-TAT-MTS(cs)-FRAまたはビークル存在下で48時間インキュベーションした(それぞれFXNまたはVEH)フリードライヒ運動失調症患者から得た繊維芽細胞(F816)のミトコンドリア分画中のアコニターゼ活性(mOD/min)を、上記のごとくイソシトレートシス-アコニテートへの変換後に測定した。His-TAT-MTS(cs)-FRAを20 µg/mlで投与し、20 µg/mlのさらなる用量を初回投与後24時間に投与した。HepG2全細胞ホモジネートを陽性コントロールとした(POS.CON)。

【0233】

図10に示すように、アコニターゼ活性は、His-TAT-MTS(cs)-FRAとインキュベーションした繊維芽細胞(FXN、14.5)においてビークルコントロール存在下でインキュベーションした繊維芽細胞(VEH、10.5)に比べて高かった。この知見は、該融合タンパク質がミトコンドリアに入るだけでなく、活性でその種々の細胞活性に利用可能であることを明確に示す。

【0234】

HepG2全細胞ホモジネートを陽性コントロールとして用いた(POS.CON)。

【実施例7】

【0235】

TAT-MTS-FR融合タンパク質は、FA-患者の細胞と正常細胞を酸化ストレスから部分的に救う

上記のごとく、ミトコンドリア内のフラタキシシンレベルの低下は、細胞内反応性酸素種(ROS)の上昇をもたらす[35]。

【0236】

L-ブチオニンスルホキシミン(BSO)は、γ-グルタミルシステイン合成酵素(γ-GCS)の阻害剤であり、組織グルタチオン(GSH)濃度を低下させる。GSHは、チオエーテルコンジュゲートの形成を介して種々の毒性求電子剤に対する細胞防御または保護に重要な役割を果たす。したがって、BSOアッセイは、これら細胞の内因性防御の重要な成分を枯渇させ、細胞死をもたらすことが分かっている天然細胞プロセスにより生じるROSの蓄積を可能にするde novoグルタチオン合成の阻害に用いる[37]。BSOがGSHの生成を阻害し、細胞死をもたらすメカニズムはRichardson, T. E. et al. [37]に記載された。フリードライヒ運動失調症細胞はフラタキシシンを欠くので、正常細胞と比べてBSO誘導性酸化ストレスに極めて感受性であり[37]、フラタキシシン欠如の長期的結果のin vitroモデルとして用いられる。

10

20

30

40

50

【0237】

酸化ストレスは、患者の細胞および正常健康細胞に種々の濃度のBSOを誘導し、細胞死に対する種々のTAT-MTS-FR融合タンパク質の効果を測定した。図11に示すように、BSOは、正常リンパ球およびフリードライヒ運動失調症患者から得た細胞の細胞死をもたらした。しかしながら、患者の細胞は、先の知見と一致してBSO誘導性酸化ストレスにより感受性であり、高率の細胞死を示す。最も重要なことは、酸化ストレス誘導前に数時間加えた種々のTAT-MTS-FR融合タンパク質は、正常リンパ球と患者の細胞の両方を細胞死から部分的に助けることが証明された。部分的救済は、図11Bに示すように細胞死の減少とカスパーゼ3活性の減少の両方により決定した。

【0238】

図11Aおよび図11Bに示すように、ヘテロローガスなMTSを有する3つの融合タンパク質のうちの少なくとも2つ(すなわちMTSorfおよびMTScs)は、患者の細胞および健康細胞における両方の天然MTSを有する融合タンパク質により示された効果に比べて優れた保護効果を示した。

【0239】

患者の繊維芽細胞のBSO誘導性酸化ストレスを救済する種々のTAT-MTS-FR融合タンパク質の能力の比較試験を各融合タンパク質構築物 TAT-MTSfrA-FRA、TAT-MTScs-FRA、TAT-MTSlad-FRA、およびTAT-MTSorf-FRAについて図12A～図12Dに示す

【0240】

興味深いことに、それぞれ図12Bおよび図12Cに示すように、ヘテロローガスなMTSを含むタンパク質構築物の2つ、すなわちTAT-MTScs-FRAおよびTAT-MTSlad融合タンパク質は、特に、患者の繊維芽細胞のBSO誘導性酸化ストレスの部分的救済において天然フラタキシン MTSを含む融合タンパク質(TAT-MTSfrA-FRA)より効率的であった。

【0241】

種々の濃度のBSOにより誘導された患者の細胞の同様の保護効果がアッセイしたときのみTAT-MTSorf-FRAおよびTAT-MTSlad融合タンパク質でもみられた(各図13および図14)。

【実施例8】

【0242】

フリードライヒ運動失調症マウスにおけるTAT-MTS-FR融合タンパク質の薬力学的および薬物動態評価

進行中の試験で、フリードライヒ運動失調症前臨床マウスモデルにおけるTAT-MTS-FR融合タンパク質の薬力学、薬物動態(PK/PD)、および安全性を評価するために、進行中の試験にマウスモデルJR# 18299 FVB; B6-Tg(FXN)1Sars Fxntm1Mkn/Jを用いた。これら試験から得た情報を、さらなる臨床試験のための用量および時間間隔を決定するために用いる。簡単には、該試験には、該マウスフラタキシン遺伝子座の標的とした突然変異とホモ接合性および導入遺伝子と半接合体の45匹の6～8週齢の雌マウスが必要である。なお、系統18299は、その優れた繁殖能力により元のC57BL/6Jコンジェニック系統から選択した混合遺伝背景の元のSarseroマウスであり、この試験では行動的表現型検査を行っていない。

【0243】

前臨床試験を行うために、2用量のTAT-MTScs-FR融合タンパク質(100 μgおよび400 μg)を1週間に2回、ピークルと共に最大3週間、18229 FVB; B6-Tg(FXN)1Sars Fxntm1Mkn/Jマウスに尾静脈注射した。注射後1、4、7、14、または21日でマウスを屠殺し、次いで血液を心臓穿刺により採取し、種々の組織を採取した(例えば脳、心臓、肝臓、および腎臓)。脳および心臓組織を処理してアコニターゼ活性を測定する。脳および心臓組織を処理し、ミトコンドリア抽出物中のフラタキシンレベルをELISAアッセイにより測定する。血液、乾燥、および腎臓を瞬間凍結し、保存する。

【0244】

次に、処置の効果を採取した組織で評価する。

【実施例9】

【0245】

TAT-MTS-OTCタンパク質構築物はミトコンドリアに内在化する

His-TAT-MTSと融合したOTCを含む融合タンパク質構築物を上記のごとく作製した。図16に示すように、OTCの天然MTS、クエン酸シンターゼのMTS、C6ORF66のMTS、およびリポアミドデヒドロゲナーゼのMTSを含む精製融合タンパク質構築物を得た(それぞれ図16A、図16B、図16C、および図16D)。得られた精製融合タンパク質構築物の大きさは約40kDaであった(図16Eに示すようにそのゲル移動をタンパク質マーカーの移動との比較に基づいて決定した)。製造した4つすべての融合タンパク質構築物について同様の発現結果を得た。

【0246】

種々のOTC融合タンパク質構築物のミトコンドリアに入る能力を試験するために、HepG2細胞は、OTCの天然MTSまたはOTCとヘテロローガスなMTSを含むOTC融合タンパク質構築物、すなわち、His-TAT-MTSotc-OTC、His-TAT-MTScs-OTC、およびTAT-MTSlad-OTCの存在下でインキュベーションした。

【0247】

最初に、図17Aに示すように、融合タンパク質構築物 His-TAT-MTSotc-OTC、His-TAT-MTScs-OTC、およびHis-TAT-MTSlad-OTC(およびHis-TAT-MTSorf-OTC(データ示さず))は、沈殿または分解産物が検出されなかったことに基づいて種々のアッセイで可溶性であったことは注目に値する。

【0248】

上記構築物とインキュベーションしたHepG2細胞のミトコンドリア分画の分析は、OTCの天然MTSを含むOTC融合タンパク質構築物(His-TAT-MTSotc-OTC)および該OTCタンパク質とヘテロローガスなMTS(すなわちクエン酸シンターゼ(cs)およびリポアミドデヒドロゲナーゼ(lad))を含むOTC融合タンパク質構築物は、1時間のインキュベーション時間後にミトコンドリアに入ることができたことを示した(図17A)。図17Aは、インキュベーション時間を3時間に延ばすとミトコンドリア内部の融合タンパク質構築物レベルの増加をもたらしたことを示す。

【0249】

興味深いことに、例えばEMEM中で3時間インキュベーションしたOTCの天然MTSを含むタンパク質構築物(His-TAT-MTSotc-OTC)の能力とOTCタンパク質とヘテロローガスなMTSを含むOTC融合タンパク質構築物(すなわちHis-TAT-MTScs-OTCおよびHis-TAT-MTSlad-OTC)の能力を比較すると、OTCとヘテロローガスなMTSを含む融合タンパク質構築物の内在化能は、OTCの天然MTSを含む融合タンパク質構築物の内在化能よりわずかに高かったようである。

【0250】

さらにOTC融合タンパク質構築物のミトコンドリア内への内在化を確認するため、種々のHis-TAT-MTS-OTCタンパク質構築物とインキュベーションした細胞のサイトゾル分画も分析した。図18Aおよび図18Bに示すように、分析したサイトゾル分画のいずれにも融合タンパク質構築物はみられなかった。

【実施例10】

【0251】

OTCのin vitro酵素活性

上記のごとく、OTCは、シトルリンとホスフェートを形成するカルバモイルリン酸とオルニチンの間の反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質である。上記のOTCを含む精製融合タンパク質構築物の活性を評価するため、種々の融合タンパク質構築物によるオルニチンおよびカルバモイルリン酸からのシトルリンの生成も上記のごとく評価した。

【0252】

図19に示すように、アッセイした融合タンパク質構築物His-TAT-MTScs-OTCは比較的酵素活性が低く、融合タンパク質構築物His-TAT-MTSotc-OTCは活性がなかった。理論に縛られることを望まないが、これは、OTCはHis-TAT-MTS断片と結合するので、OTCがおそらくその酵素活性に必要なその天然トリマー状態で反応混合物中に存在しないという事実によるかもしれない。

【0253】

しかしながら、図19に示すように、低レベルの酵素活性が実際にCSのMTSを含む融合タンパク質構築物に観察された。

【実施例 1 1】

【0 2 5 4】

アンモニアストレスを受けたHepG2細胞におけるOTCの酵素活性

OTC欠損は、ヒトの最も一般的な尿素回路障害である。この障害の欠陥酵素であるOTCは、尿素回路の近位部の最終酵素であり、上記のごとくカルバモイルリン酸およびオルニチンのシトルリンへの変換に参与する。重症罹患個体ではアンモニア濃度が急速に増加し、迅速な介入がなければ運動失調、嗜眠、および死をもたらす。

【0 2 5 5】

細胞のアンモニアストレスを救済するOTC融合タンパク質構築物の能力を試験するため、HepG2細胞にOTCの天然MTSを含む融合タンパク質構築物またはCSのMTSを含む融合タンパク質構築物を毎日（3日間）投与し、次いで塩化アンモニウムで処理し、最後にその細胞生存率を上記のごとくalamarBlueインジケータを用いて評価した。

【0 2 5 6】

図20に示すように、OTCおよびMTSとしてクエン酸シンターゼを含む融合タンパク質構築物の存在下の細胞生存率は、塩化アンモニウムに暴露しなかった細胞（非処理細胞）の細胞生存率と同様であった。さらに、OTCおよびMTSとしてクエン酸シンターゼを含む融合タンパク質構築物の存在下の細胞生存率は、OTCの天然MTSを含む融合タンパク質構築物で処理した細胞の細胞生存率より高かった。

【0 2 5 7】

まとめると、上記結果は、TAT、MTS、およびOTCを含む融合タンパク質構築物、特にOTCとヘテロローガスなMTSを含むそのような融合タンパク質はミトコンドリアに入ることができ、次いでOTCがプロセッシングされてその酵素活性を示すことができることを示す。該結果は、アンモニアを伴わない該融合タンパク質構築物は細胞毒性がないことも示す（データ示さず）。

【実施例 1 2】

【0 2 5 8】

マウスにおけるTAT-MTS-OTC融合タンパク質構築物の肝臓に入る動力学および用量測定

OTCの肝臓に入る動力学を評価するため、本明細書に記載のいずれかのTAT-MTS-OTC融合タンパク質構築物の肝臓レベルを、OTC-欠損spfashマウス（半接合雄3匹およびホモ接合雌3匹）でOTCを含む融合タンパク質構築物（500 μ g/マウス）を投与後4、8、24、および48時間に測定した。次に、肝臓片および他の組織（例えば骨格筋、脳）を採取し、それらのOTCタンパク質レベルをWesternブロット分析で分析した。さらに、採取した肝臓のOTCの活性をOTC酵素アッセイ（例えば上記シトルリンアッセイ）を用いて測定した。

【0 2 5 9】

血液を心臓穿刺により採取し、血漿を肝機能検査（ALT/AST）、アミノ酸（シトルリンを含む）、アンモニア測定、およびOTCタンパク質レベル（Westernブロット）用に単離した。尿をオロチン酸分析用に採取した。

【0 2 6 0】

上記実験で雄と雌でいかなる差もみられない場合は雄マウスをさらなる試験に用いる。

【0 2 6 1】

次に、種々の用量のTAT-MTS-OTC融合タンパク質構築物（100～500 μ g/マウス）を投与したマウスの組織のタンパク質レベルを、上記アッセイで最も高いOTCタンパク質レベルが検出された時点で測定した。

【実施例 1 3】

【0 2 6 2】

TAT-MTS-OTC融合タンパク質構築物による表現型保護

OTC-欠損spfashマウス（雄6匹または雄3匹と雌3匹）にCunningham, S. C. et al. [41]に従ってOTC-shRNAノックダウンrAAVを投与する。示した時点（OTC-shRNAバッチの活性と上

10

20

30

40

50

記実験から得た結果に基づいて)で、TAT-MTS-OTC融合タンパク質構築物の投与を各試験群のマウスに0、1、2、または3用量/週を投与することにより開始する。

【0263】

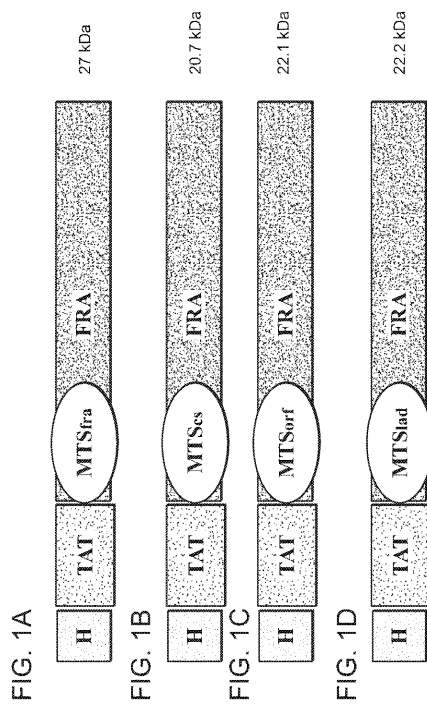
OTC-shRNAノックダウンrAAVの注射前に、アンモニア、アミノ酸(シトルリンを含む)、およびALT/AST、ならびに尿オロチン酸のベースライン血漿レベルを最初に測定することにより分析を行う(尾静脈を傷つけて血液を回収する)。血液および尿を、上記分析用にTAT-MTS-OTC融合タンパク質構築物を投与する前と、次いで試験期間中、週に1回収収する。

【0264】

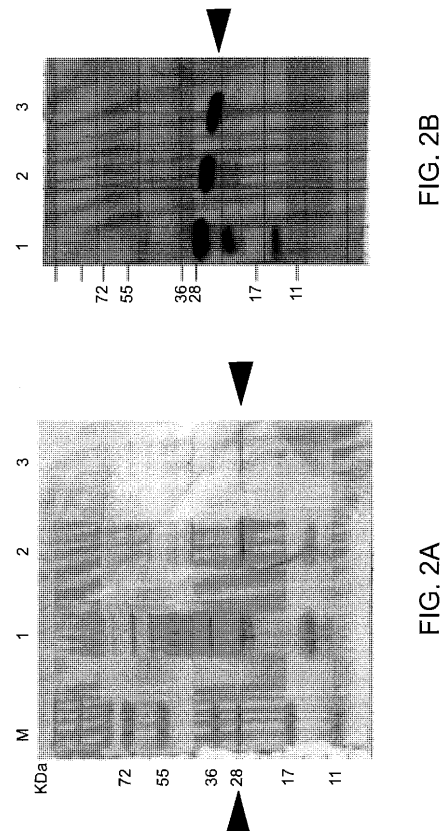
マウスをモニターし、高アンモニア血症の臨床症状(嗜眠、振戦、運動失調)の観察直後またはTAT-MTS-OTC融合タンパク質構築物の注射後1カ月で屠殺した。実験終了時に、肝臓、筋肉、および脳を、ベクターコピー分析(定量的PCR)、OTC活性(肝臓溶解物および凍結切片中)、およびタンパク質レベル(ウェスタンブロット)用に液体窒素中で凍結するかまたは4%PFA中で固定した。

10

【図1】



【図2-1】



【図 2 - 2】

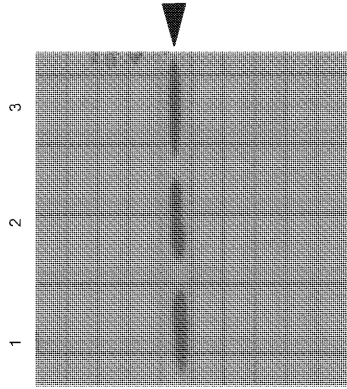


FIG. 2D

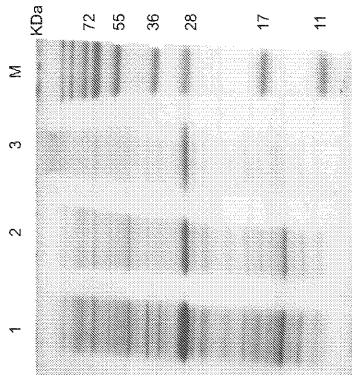


FIG. 2C

【図 3 - 1】

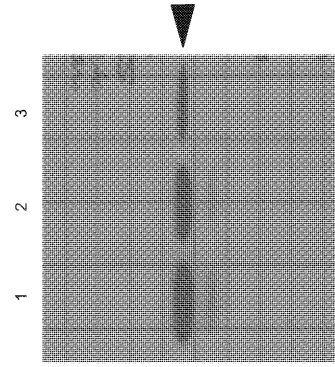


FIG. 3B

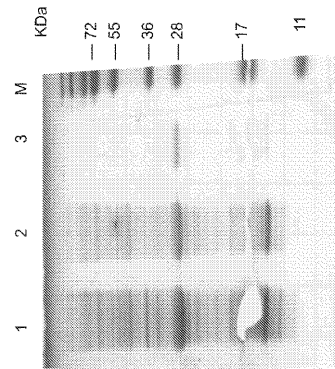


FIG. 3A

【図 3 - 2】

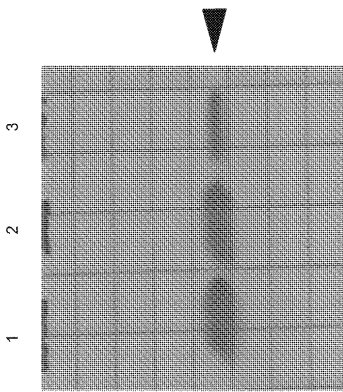


FIG. 3D

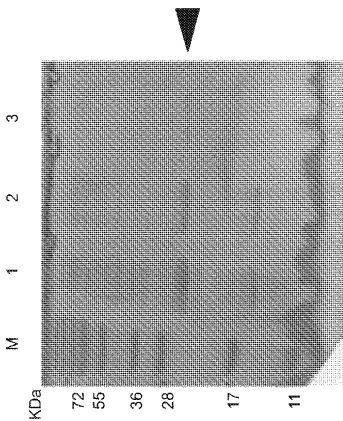


FIG. 3C

【図 4 - 1】

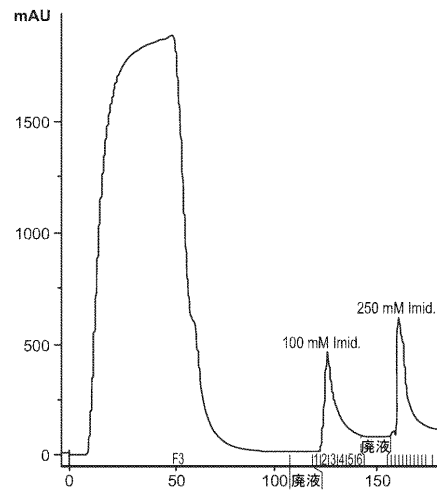


FIG. 4A

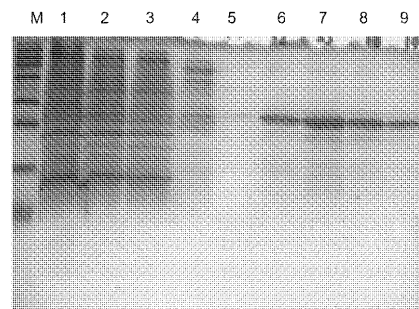


FIG. 4B

【図 4 - 2】

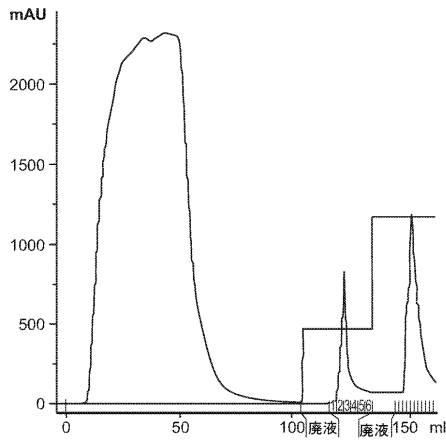


FIG. 4C

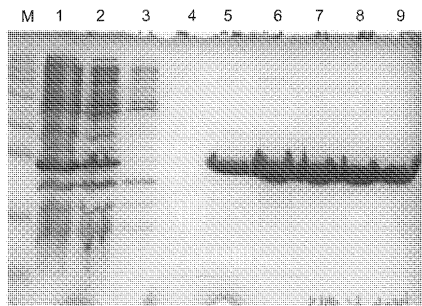


FIG. 4D

【図 5 - 1】

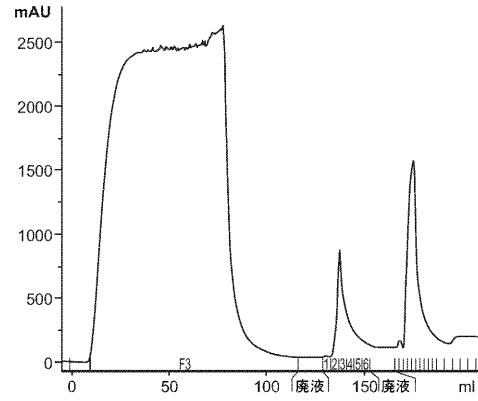


FIG. 5A

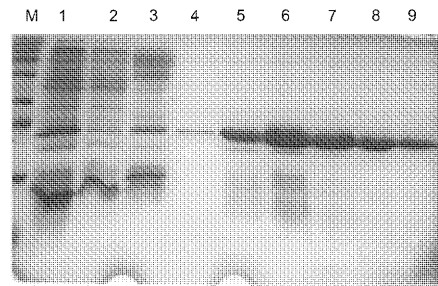


FIG. 5B

【図 5 - 2】

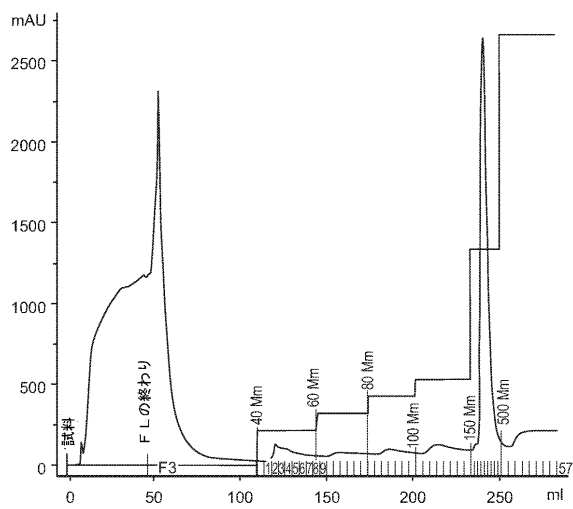


FIG. 5C

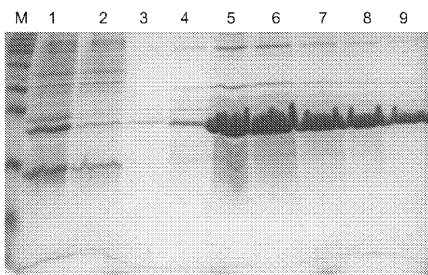


FIG. 5D

【図 6 - 1】

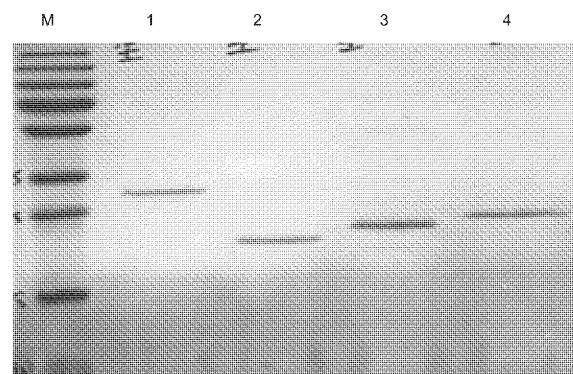


FIG. 6A

【図 6 - 2】

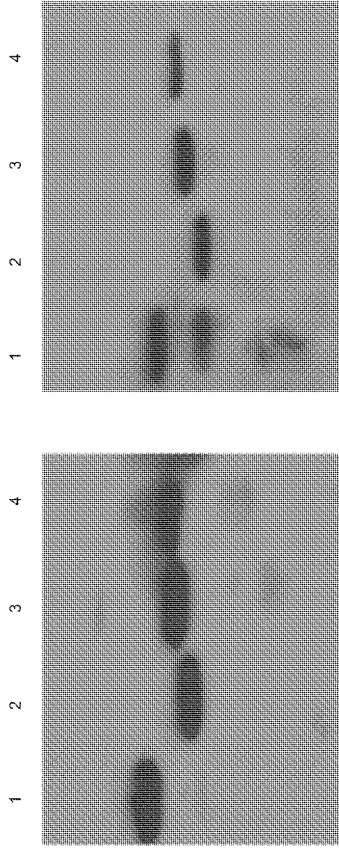


FIG. 6C

FIG. 6B

【図 7 - 1】

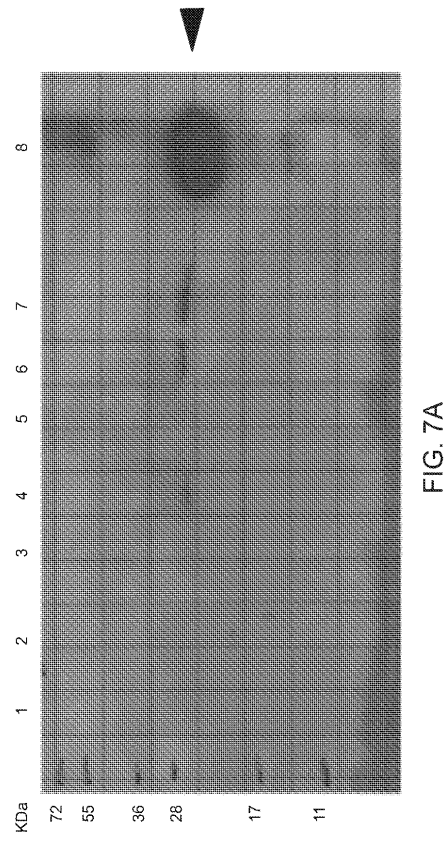


FIG. 7A

【図 7 - 2】

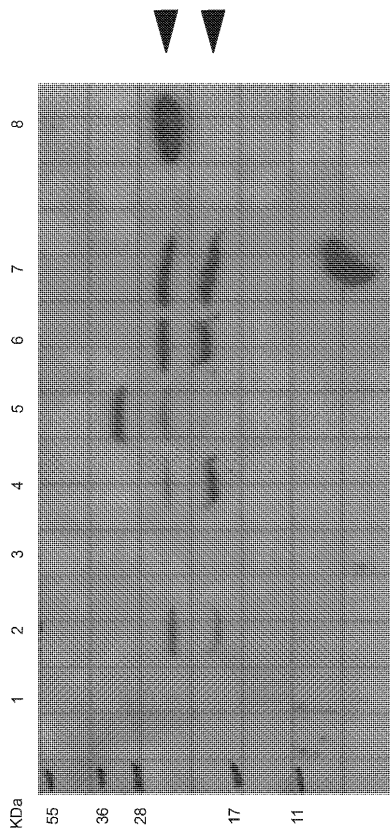


FIG. 7B

【図 8】

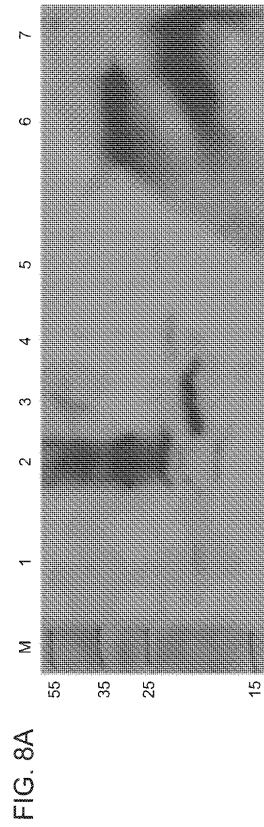


FIG. 8A

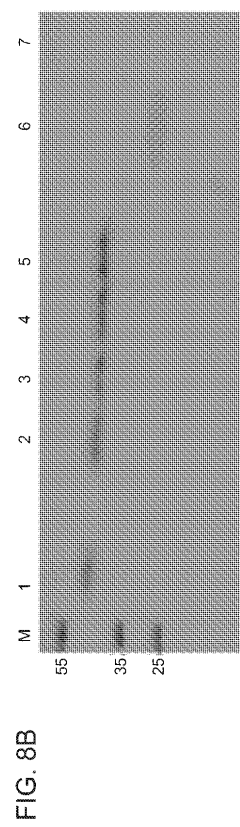


FIG. 8B

【図 9】

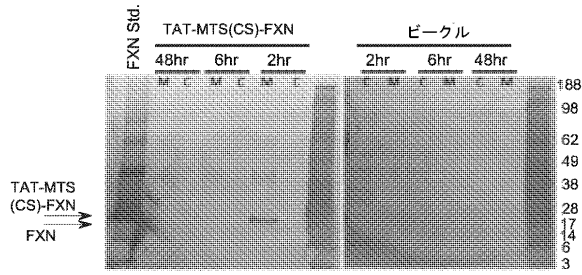


FIG. 9

【図 10】

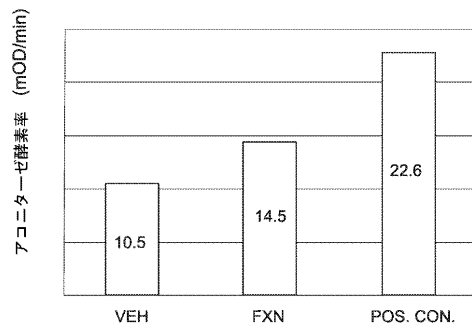


FIG. 10

【図 11-2】

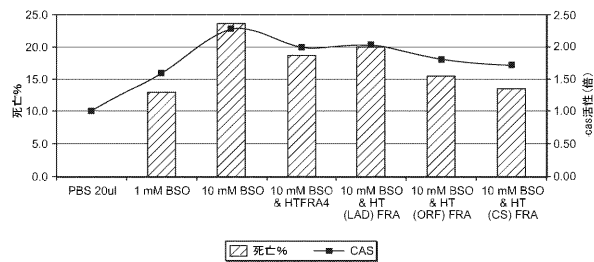


FIG. 11B

【図 11-1】

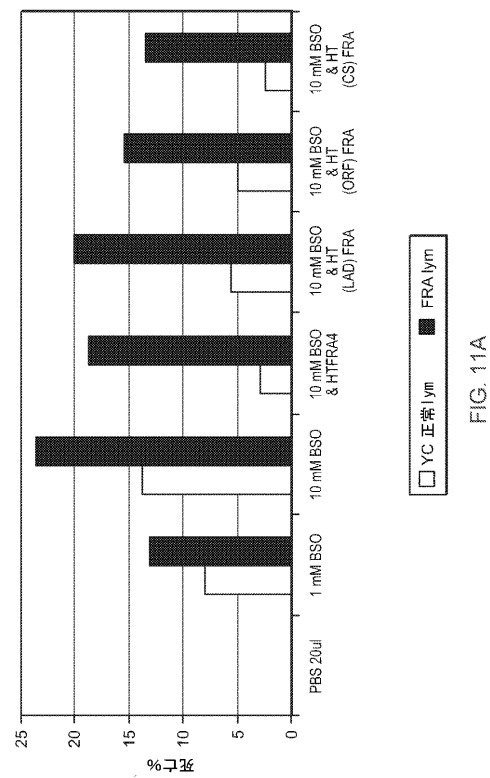


FIG. 11A

【図 12-1】

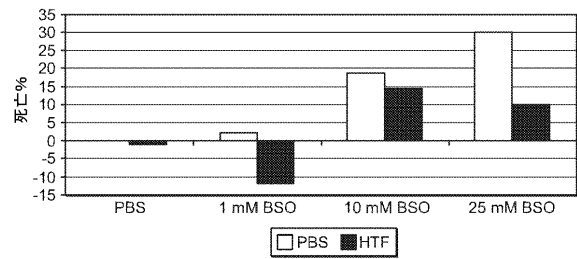


FIG. 12A

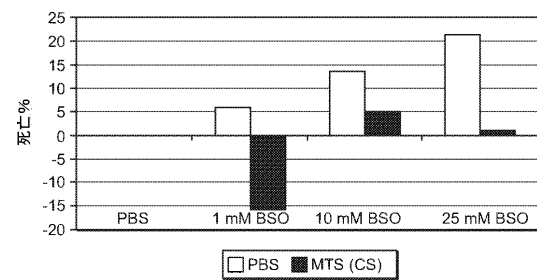


FIG. 12B

【図 12 - 2】

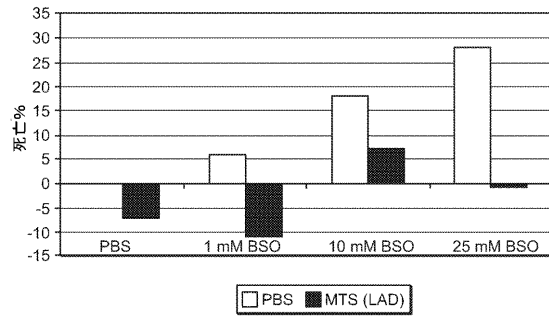


FIG. 12C

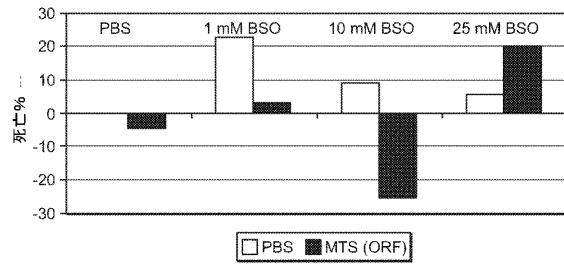


FIG. 12D

【図 13】

FIG. 13A

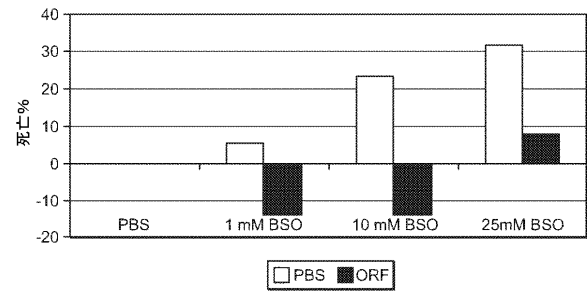
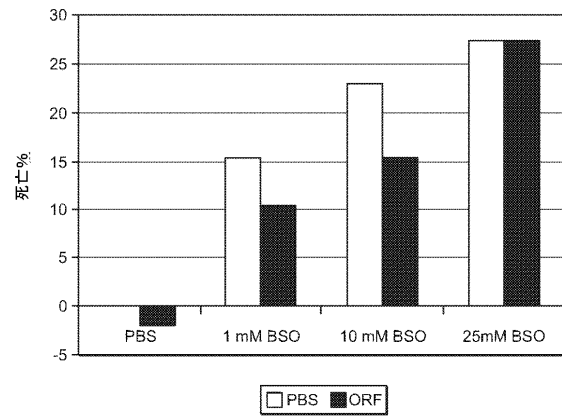


FIG. 13B



【図 14 - 1】

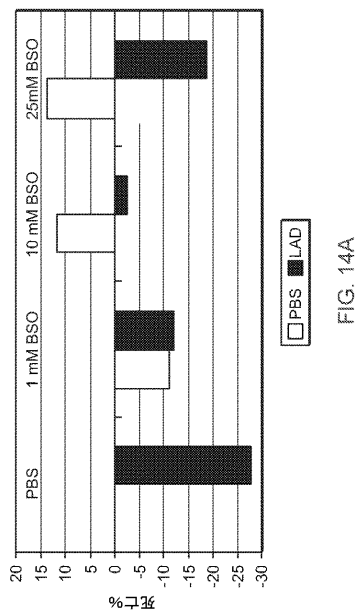


FIG. 14A

【図 14 - 2】

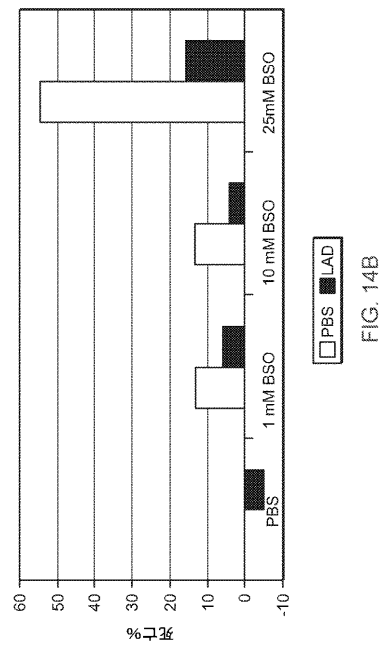


FIG. 14B

【図 16】

FIG. 15A

MRKKRRQRRRGSDIPWTLGRRAYAGLLASPSPAQAQTLTRVPRPAELAPLCGRB
GLRTDIDATCTPRRASSNQRLNQIWNVKQSVYLMNLRKSGTLGHGPSLDET
YERLAETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFGSGVITVKLGDDLTYVINKOT
PNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSL
AYSCKDA

FIG. 15B

MRKKRRQRRRGSDPALLTAAARLLGTKNASCLVLAARHASSGTLGHPGSLDETT
YERLAEEETLDSLAEEFFEDLADKPYTFEDYDVSGSGVLTVKLGGLDGTYYINKQT
PNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSL
AYSGKDA

FIG. 15C

MRKKRRQRRRGGSPQSWSRVYCSLAKRGHFNRIJHIGLOGLSAVPLRTYASGTIG
HPSGLDETTYERLAEETLDLSAEFFEDLADKPYTFEDYDVFSFGSGVLTVKLGDDL
GTIVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKAL
KTKLDLSSLAYSKGDA

FIG. 15D

MRKKRRQRRRGSDPGALVIRGIRNFLENRAEREISKMKPSVAPRHPSGTLGHP
GSLDETTYERLAETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSVFGSGVLTVKLGDLGT
YVINKQTPNKOIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKT
KLDLSSLAYSGKDA

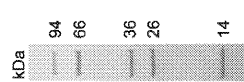


FIG. 16E

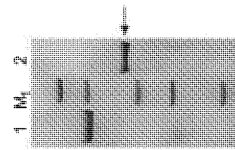


FIG. 16D

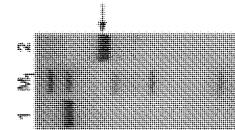


FIG. 16C

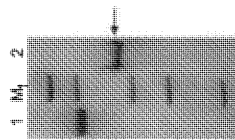


FIG. 16B

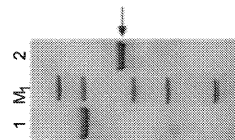


FIG. 16A

【図 18-1】

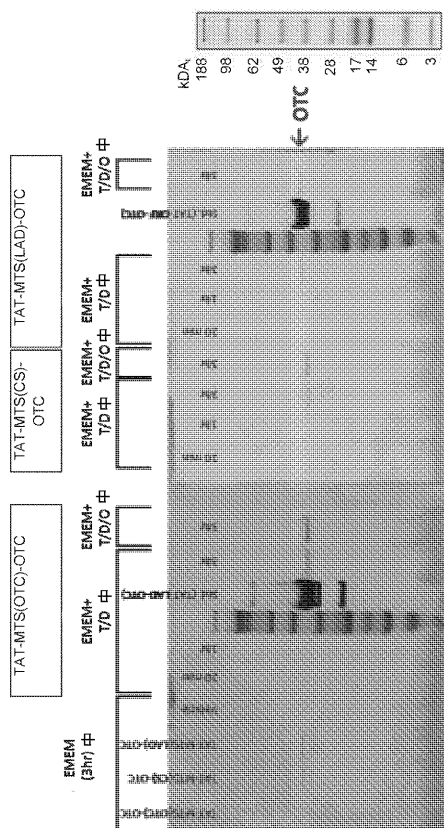


FIG. 17B

FIG. 17A

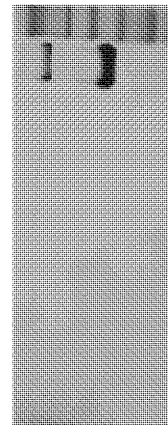
[illegible]

FIG. 18A

【 図 1 8 − 2 】

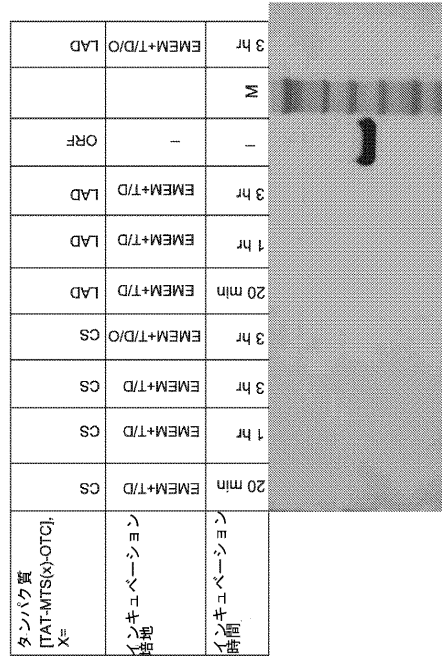


FIG. 18B

【 図 1 9 】

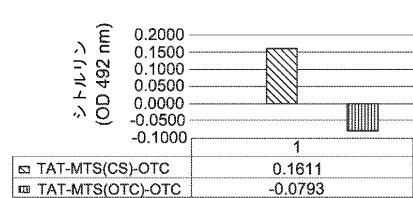


FIG. 19

【 図 2 0 】

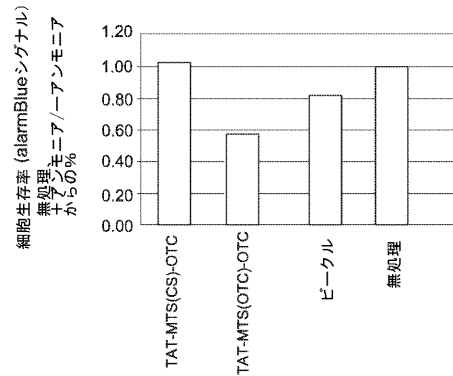


FIG. 20

【 配 列 表 】

2016520557000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2014/050354

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/435

ADD. C12N1/00 A61K48/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/098682 A2 (YISSUM RES DEV CO [IL]; HADASIT MED RES SERVICE [IL]; GALSKI-LORBERBOU) 13 August 2009 (2009-08-13) cited in the application	1-8, 11-28
A	the whole document	9
A	C. A. KOCZOR ET AL: "Mitochondrial DNA Damage Initiates a Cell Cycle Arrest by a Chk2-associated Mechanism in Mammalian Cells", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 52, 19 October 2009 (2009-10-19), pages 36191-36201, XP055127240, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M109.036020 the whole document	1-9, 11-28
----- -/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier 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

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 July 2014

Date of mailing of the international search report

06/11/2014

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Seranski, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2014/050354

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DEL GAIZO V ET AL: "Targeting proteins to mitochondria using TAT", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 80, no. 1-2, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 170-180, XP002986585, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2003.08.017 the whole document -----	1-9, 11-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/IL2014/050354

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

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
 9(completely); 1-8, 11-28(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/IL2014/050354

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 9(completely); 1-8, 11-28(partially)

A fusion protein comprising a HIV-1 transactivator of transcription (TAT) domain, a functional human mitochondrial protein and a human mitochondria targeting sequence (MTS) situated between said TAT domain and said functional human mitochondrial protein and wherein said human MTS is heterologous to said functional human mitochondrial protein, wherein said MTS is the human mitochondrial citrate synthase MTS having the amino acid sequence denoted by Seq-ID-N°23; composition comprising said fusion protein; said fusion protein for use in a method of treatment.

2. claims: 10(completely); 1-8, 11-28(partially)

A fusion protein comprising a HIV-1 transactivator of transcription (TAT) domain, a functional human mitochondrial protein and a human mitochondria targeting sequence (MTS) situated between said TAT domain and said functional human mitochondrial protein and wherein said human MTS is heterologous to said functional human mitochondrial protein, wherein said MTS is the human lipoamide dehydrogenase MTS having the amino acid sequence denoted by Seq-ID-N°24; composition comprising said fusion protein; said fusion protein for use in a method of treatment.

3. claims: 1-8, 11-28(all partially)

A fusion protein comprising a HIV-1 transactivator of transcription (TAT) domain, a functional human mitochondrial protein and a human mitochondria targeting sequence (MTS) situated between said TAT domain and said functional human mitochondrial protein and wherein said human MTS is heterologous to said functional human mitochondrial protein, wherein said MTS is the MTV of human C6ORF66 gene product having the amino acid sequence denoted by Seq-ID-N°25; composition comprising said fusion protein; said fusion protein for use in a method of treatment.

4. claims: 1-8, 11-28(all partially)

A fusion protein comprising a HIV-1 transactivator of transcription (TAT) domain, a functional human mitochondrial protein and a human mitochondria targeting sequence (MTS) situated between said TAT domain and said functional human mitochondrial protein and wherein said human MTS is heterologous to said functional human mitochondrial protein, wherein said MTS is the human mitochondrial GLUD2 MTS encoded by the nucleic acid denoted by Seq-ID-N°16;

International Application No. PCT/ IL2014/ 050354

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

composition comprising said fusion protein; said fusion
protein for use in a method of treatment.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2014/050354

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009098682 A2	13-08-2009	EP 2300614 A2	30-03-2011
		US 2011177051 A1	21-07-2011
		WO 2009098682 A2	13-08-2009

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 P 39/06 (2006.01)	A 6 1 P	39/06	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P	27/16	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K	47/48	
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N	9/00	
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10	

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

(72)発明者 ハヤ・ローバーブームーガルスキー

イスラエル 9 7 8 9 0 1 7 エルサレム、ネハゲイ・ハペルドス・ストリート 2 4 / 7 番

(72)発明者 ハガル・グレイフ

イスラエル 7 4 0 7 2 3 2 ネス・ジオナ、ストルマ・ストリート 2 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA07 DA02 DA03 EA04 GA11 HA01 HA17
 4B050 CC05 DD11 LL01
 4C076 BB13 CC01 CC10 CC11 CC21 EE41 EE59
 4C084 AA01 AA02 AA07 AA19 BA44 MA02 MA66 NA14 ZA021 ZA022
 ZA201 ZA202 ZA331 ZA332 ZA341 ZA342 ZA361 ZA362 ZC211 ZC212
 ZC351 ZC352
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA05 CA40 DA50 DA89 EA20 FA74