

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4514607号
(P4514607)

(45) 発行日 平成22年7月28日 (2010. 7. 28)

(24) 登録日 平成22年5月21日 (2010. 5. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006. 01)

C O 7 K 19/00

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 47/48 (2006. 01)

A 6 1 K 47/48

A 6 1 P 3/10 (2006. 01)

A 6 1 P 3/10

請求項の数 28 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-510837 (P2004-510837)
 (86) (22) 出願日 平成15年6月6日 (2003. 6. 6)
 (65) 公表番号 特表2006-500917 (P2006-500917A)
 (43) 公表日 平成18年1月12日 (2006. 1. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2003/003097
 (87) 国際公開番号 W02003/103718
 (87) 国際公開日 平成15年12月18日 (2003. 12. 18)
 審査請求日 平成18年5月23日 (2006. 5. 23)
 (31) 優先権主張番号 10/165, 015
 (32) 優先日 平成14年6月7日 (2002. 6. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507045085
 ザイジェン エス. アー.
 スイス国 1 0 0 3 ローザンヌ, リュ
 ー デ テロ 1 7 (4 ウーエムウー
 エタージュ)
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ボニー, クリストフ
 スイス国 ツューハー 1 1 1 0 モルジ
 ュ, リュ ドゥ ドクテール イエルサ
 ン, 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的エフェクターの細胞内送達

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I、

$$[P]_v - [スパーサー]_x - \text{コア} - [\text{リンカー}]_y - [\text{レポーター}]_z \quad (I)$$

による多量体トランスポーターペプチドであって：

ここで、P は少なくともアミノ酸配列 R R T K (配列番号 1) を含むトランスポーターペプチドであり、ここで、

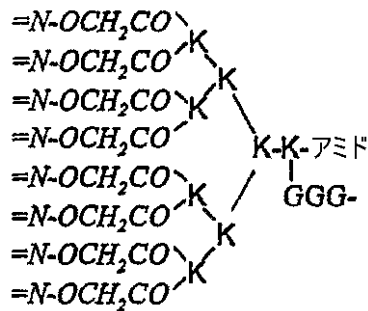
v は 8 であり、

x は、0 ~ 8 であり、y および z は独立に 0 または 1 であり、

各 P は同じでも異なってもよく、該トランスポーターペプチドは生体膜を通過して移行し得、

ここで、該コアは、

【化 1】



10

であり、ここで、Gはグリシンであり、Kはリジンである、トランスポーターペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のトランスポーターペプチドであって、前記スペーサーがスクシンイミジル - ポリエチレングリコールである、トランスポーターペプチド。

【請求項 3】

エフェクターと結合体化されている請求項 1 に記載のトランスポーターペプチドを含む、トランスポーターユニット。

【請求項 4】

式 I I :

([P]_v - [スペーサー]_x - コア - [リンカー]_y - [レポーター]_z) · E (I 20 I)

のトランスポーターユニットであって：

ここで、E はエフェクターであり、

P は少なくともアミノ酸配列 R R T K (配列番号 1) を含むトランスポーターペプチドであり、ここで、

v は 8 であり、

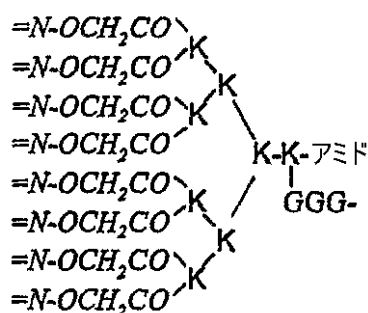
x は、0 ~ 8 であり、y および z は独立に 0 もしくは 1 であり、

各 P は同じでも異なってもよいものとし、ならびに該トランスポーターペプチドは生体膜を通過して移行し得、

ここで、該コアは、

30

【化 2】



40

であり、ここで、Gはグリシンであり、Kはリジンである、トランスポーターユニット。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のトランスポーターユニットであって、前記エフェクターが前記リンカーに共有結合により融合されている、トランスポーターユニット。

【請求項 6】

請求項 4 に記載のトランスポーターユニットであって、前記エフェクターが核酸、ペプチドおよび薬学的に活性な薬剤からなる群から選ばれる、トランスポーターユニット。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のトランスポーターユニットであって、前記エフェクターが核酸である、トランスポーターユニット。

50

【請求項 8】

請求項 7 に記載のトランスポーターユニットであって、前記核酸が DNA である、トランスポーターユニット。

【請求項 9】

請求項 7 に記載のトランスポーターユニットであって、前記核酸が RNA である、トランスポーターユニット。

【請求項 10】

請求項 6 に記載のトランスポーターユニットであって、前記エフェクターがペプチドである、トランスポーターユニット。

【請求項 11】

請求項 6 に記載のトランスポーターユニットであって、前記エフェクターが薬学的に活性な薬剤である、トランスポーターユニット。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のトランスポーターユニットであって、前記薬学的に活性な薬剤が、毒素、抗生物質、抗病原体剤、抗原、抗体断片、免疫調節剤、酵素および治療剤からなる群から選ばれる、トランスポーターユニット。

【請求項 13】

請求項 4 に記載のトランスポーターユニットであって、各トランスポーターペプチドが 50 アミノ酸長未満である、トランスポーターユニット。

【請求項 14】

請求項 4 に記載のトランスポーターユニットであって、各トランスポーターペプチドが 25 アミノ酸長未満である、トランスポーターユニット。

【請求項 15】

請求項 4 に記載のトランスポーターユニットであって、各トランスポーターペプチドが 15 アミノ酸長未満である、トランスポーターユニット。

【請求項 16】

請求項 4 に記載のトランスポーターユニットであって、移行が脾 B 細胞、肝細胞、結腸細胞、筋肉細胞および肺細胞からなる群から選ばれる組織内へ行われる、トランスポーターユニット。

【請求項 17】

請求項 4 に記載のトランスポーターユニットを脾細胞の膜を通過させて移行させるインビトロの方法。

【請求項 18】

治療的もしくは予防的に有効な量の請求項 4 に記載のトランスポーターユニット、および薬学的受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 19】

請求項 1 に記載の前記トランスポーターペプチドとエフェクターとの間で移行可能な結合体を生成する方法であって、該エフェクターを該トランスポーターペプチドに結合させてトランスポーターペプチド - エフェクター結合体を形成することを含む方法。

【請求項 20】

エフェクターを真核細胞の細胞質および核の中へ移行させるインビトロの方法であって、

該エフェクターを請求項 1 に記載のトランスポーターペプチドに結合させてトランスポーターペプチド - エフェクター結合体を形成する工程、および

該トランスポーターペプチド - エフェクター結合体を該細胞に導入する工程を包含する、方法。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の方法であって、前記導入工程が、前記トランスポーターペプチド - エフェクター結合体の存在下で細胞培養物をインキュベートすることにより、または前記トランスポーターペプチド - エフェクター結合体を前記細胞内に注入することにより達成

10

20

30

40

50

される方法。

【請求項 2 2】

請求項 2 0 に記載の方法であって、前記真核細胞がヒト細胞である、方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 0 に記載の方法であって、前記真核細胞が 細胞である、方法。

【請求項 2 4】

真核細胞内のエフェクターの細胞内濃度を増大させるインビトロの方法であって、
該エフェクターを請求項 1 に記載のトランスポーターペプチドに結合させてトランスポ
ーターペプチド - エフェクター結合体を形成する工程、および
該真核細胞の活性な代謝を促進する条件の下、該トランスポーターペプチド - エフェク
ター結合体の存在下で該細胞をインキュベートする工程
を包含する、方法。

10

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の方法であって、前記真核細胞がヒト細胞である、方法。

【請求項 2 6】

1 つ以上の容器に請求項 1 8 に記載の治療的もしくは予防的に有効な量の薬学的組成物
を含む、キット。

【請求項 2 7】

疾患を処置または予防するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物が、被験体の
該疾患を処置または予防するために十分な量の請求項 1 8 に記載の薬学的組成物である、
薬学的組成物。

20

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の薬学的組成物であって、該疾患が、糖尿病、結腸癌、呼吸器疾患、
神経変性障害、心臓麻痺、およびウイルス感染症からなる群から選ばれる、薬学的組成物
。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の技術分野)

本発明は分子生物学の分野に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

(発明の背景)

対象物質を外部培地から細胞内、特に細胞核へ効率的に移入することを可能にする技術
は、バイオテクノロジーの分野において極めて重要である。このような技術は、タンパク
質もしくはペプチド産生、遺伝子発現の調節、細胞内シグナル伝達チャネルの解析、およ
び細胞（もしくは細胞核）内への種々多様な物質の移送効果の解析に有用であり得る。現
在利用できる技術は、移入用ベクターに対し、生物活性のある物質を宿主細胞の細胞質（
もしくは核）内に移入させて、宿主ゲノムに影響を与えずに、またはこの活性物質の生物
学的性質を変えずに処理することができないことにより制約を受ける場合が多い。

40

【0 0 0 3】

以前は、高分子活性物質の細胞内への導入は、この移送すべき物質のサイズおよび生
化学的性質によって制約されていた。しかしながら、最近、トランスポーターペプチドも
しくはタンパク質を用いることにより、この分野に進歩がもたらされた。例えば、Schw
arzeとその共同研究者は、複合ペプチドもしくはタンパク質を組織の細胞内へ、およ
び血液 - 脳関門を通過させて移送させることができる HIV、TAT₄₈₋₅₇ 由来 10
マーのペプチドについて報告している。Schwarzeら、Science 285 :
1573 (1999) 参照。この複合ペプチドもしくはタンパク質は、エンドサイトーシ
スを伴わないタンパク質導入プロセスにより細胞に吸収されるものと考えられている。こ
の発見により、生物医学研究および患者体内への薬物の直接的な送達に新しい方法論の突

50

破口が開かれた。しかしながら、この方法の1つの重要な制限は、これらのタイプのトランスポーターに細胞特異性がないことである。従って、標的としない正常な組織との相互作用により有害な副作用が生じるため、こうした非特異的トランスポーターペプチドの多くは、有用性に制限がある。このような制限は、糖尿病などの慢性疾患の処置において特に問題となる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

薬物および治療剤をペプチド移送を介して細胞内に送達するための、種々の細胞型を特異的に標的とするための効率的で安全な組成物および方法は、当該分野でなお求められている。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

(発明の要旨)

本発明は、生体膜を通過して移行することができるトランスポーターペプチドを提供する。また、本発明は、エフェクターに対し生体膜を通過させて移行させるこのようなトランスポーターペプチドを使用する方法に関する。このトランスポーターペプチドは単体もしくは多量体であり得る。

【0006】

一局面として、本発明は、 $(X_m R X_o R X_n)$ 、 $(X_m R R R X_n)$ 、 $(X_m R R X R X_n)$ および $(X_m R X R R X_n)$ から選ばれ、Xが非塩基性アミノ酸であり、mが0~14の整数であり、nがmとは独立に0と14との間の整数であり、oがmおよびnとは独立に0と5との間の整数である少なくとも1種のアミノ酸を有するトランスポーターペプチドであって、生体膜を通過して移行することができるトランスポーターペプチドを含む。

20

【0007】

一実施形態として、本発明は、アミノ酸配列R-X-X-Rを有するトランスポーターペプチドを提供する。他の実施形態として、本発明は、配列番号1-34のうちの任意の1つのアミノ酸配列を有するトランスポーターペプチドを提供する。種々の別の実施形態として、このトランスポーターペプチドは、タンパク質転換酵素のリガンド由来のものである。さらに他の実施形態として、このトランスポーターペプチドは、タンパク質転換酵素の切断部位から得られるものである。

30

【0008】

別の局面として、本発明は、各単量体トランスポーターペプチドが $(X_m R X_o R X_n)$ 、 $(X_m R R R X_n)$ 、 $(X_m R R X R X_n)$ および $(X_m R X R R X_n)$ から選ばれ、Xが非塩基性アミノ酸であり、mが0~14の整数であり、nがmとは独立に0と14との間の整数であり、oがmおよびnとは独立に0と5との間の整数であり、生体膜を通過して移行することができる2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個もしくはそれ以上の単量体トランスポーターペプチドを含む多量体トランスポーターペプチドを含む。多量体トランスポーターペプチド内の個々の単量体トランスポーターペプチドは同一もしくは異なるものであり得る。

40

【0009】

別の実施形態として、本発明は、アミノ酸配列R-X-X-Rを有する多量体トランスポーターペプチドを提供する。他の実施形態として、本発明は、配列番号1-34のうちの任意の1つのアミノ酸配列を有する多量体トランスポーターペプチドを提供する。種々の他の実施形態として、この多量体トランスポーターペプチドは、タンパク質転換酵素のリガンド由来のものである。さらに別の実施形態として、この多量体トランスポーターペプチドは、タンパク質転換酵素の切断部位から得られるものである。

【0010】

一部の実施形態として、この多量体トランスポーターペプチドは、スペーサー部分およ

50

びリンカー部分を含む。好ましくは、このスペーサー部分およびリンカー部分は、可動性、両親媒性、非免疫原性、およびタンパク質分解酵素に対し非感受性である。このリンカーは、例えば、ポリエチレングリコールであり得る。

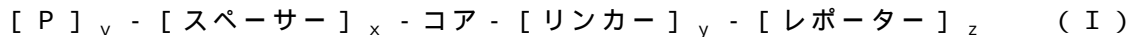
【0011】

他の実施形態として、この単量体もしくは重合体トランスポーターペプチドは、レポーター基を含むことができる。本明細書に用いている「レポーター基」とは、検出可能な任意の基である。非限定的な例としては、放射性同位体、蛍光性部分、リン光性部分、化学発光性部分、および量子ドットが挙げられる。その他のレポーター基としては、ビオチン、シンテイン、ヒスチジン、赤血球凝集素、mycもしくはフラッグ・タグが挙げられる。

10

【0012】

一部の実施形態として、本発明のトランスポーターペプチドは、式I：



によって表され、式中、Pは前述のコンセンサスモチーフ (consensus motif) ($X_m R X_n$)、($X_m R R R X_n$)、($X_m R R X R X_n$) および ($X_m R X R R X_n$) に包含されるペプチドである。例えば、このペプチドは、配列 $X_1 - X_2 - X_3 - X_4$ を含むことができ、式中、 X_1 および X_4 はRもしくはKであり得、 X_1 および X_4 は任意のアミノ酸であり得る。一実施形態として、本発明は、アミノ酸配列 $R - X - X - R$ を有する少なくとも1種のペプチドを含む多量体トランスポーターを提供する。他の実施形態として、本発明は、配列番号1-34のうちの任意の1つのアミノ酸配列を有する少なくとも1種のペプチドを含む多量体トランスポーターを提供する。種々の実施形態として、このトランスポーターペプチドは、タンパク質転換酵素のリガンド由来のものである。さらに他の実施形態として、このトランスポーターペプチドは、タンパク質転換酵素の切断部位から得られるものである。vによって表される所与のトランスポーター内のペプチド数は、整数とする。単量体トランスポーターでは、vは1である。多量体トランスポーターでは、vは2~8以上の整数とする。任意の所与の多量体結合体において、それぞれのペプチドは互いに同じであっても異なってもよい。

20

【0013】

単量体のトランスポーター構築物では、コアは存在していてもしていなくてもよいものとする。

30

【0014】

ペプチドとコアとの間のスペーサーは存在していてもしていなくてもよく、従って、xは0または1である。好ましいスペーサーは可動性、両親媒性、非免疫原性、およびタンパク質分解酵素に対し非感受性であり、例えば、スクシンイミジル-PEG (succ-peg) などのポリエチレングリコール (PEG) が挙げられる。

【0015】

本明細書に用いている「コア」とは、リンカー、スペーサーおよびレポーター基の接続ポイントとなる構造体である。また、コアは多量体トランスポーター内のペプチド間を結合する役割を果たす。一部の実施形態として、このコアを分枝型とすることによって多くのペプチドを同一トランスポーターユニット内で結合させることができる。通常、コアに対し結合に利用可能な多くの官能性を持たせることによって、この多量体構築物の種々の異なる部分 (ペプチド、ならびに存在する場合にはスペーサー、リンカーおよびレポーター) をこのコアと融合させて1つの分子を形成させることができる。企図しているコア部分としては、以下に詳細を説明するポリリジン (K) が挙げられ、また、リンカーの組み込まれた構造のものも挙げられる。コアを選択することにより、所与の結合体内に存在するペプチドの数が決まる。代表的なコアとしては、 $C_4 - K_2 K - K$ (succ-peg-S) - アミド、 $C - G G G - [K(C)]_3 - K$ (succ-peg-S) - アミド、 $(NH_2 OCH_2 CO)_4 - K_2 K - K$ (succ-peg) - アミドおよび $(NH_2 OCH_2 CO)_8 - K_4 K_2 K - K$ (GGG) - アミドが挙げられる。

40

【0016】

50

多量体のトランスポーター構築物では、リンカーおよびレポーター基は存在していてもしていなくてもよく、従って、 y および z は、式 I において独立に 1 もしくは 0 である。

【0017】

本明細書に用いている「トランスポーターペプチド」とは、物質が生体膜を通過して移行するのを容易にするペプチドである。特に明記しない限り、または用いる文脈において不正確でない限り、トランスポーターペプチドを意味するものは単量体もしくは多量体のトランスポーターペプチドを包含する。

【0018】

一部の実施形態として、このトランスポーターペプチドは、1つ以上のエフェクターと融合させる。「エフェクター」は、DNA、RNA、タンパク質、ペプチド、または薬学的に活性な薬剤、例えば、毒素、抗生物質、抗病原体剤 (antipathogenic agent)、抗原、抗体、抗体断片、免疫調節剤、酵素もしくは治療剤などを含む任意の適切な分子であり得る。2つ以上のエフェクターが存在する場合、これらのエフェクターは同一もしくは異なるものであり得る。

【0019】

「融合」もしくは「融合した」という用語は、何らかの第3の分子よりも互いを好む2種以上の分子をもたらすような特定の相互作用全てを含むものである。これには、共有結合、イオン結合、疎水性結合、水素結合などの作用が含まれるが、溶媒選択性などの非特異的結合は含まれない。

【0020】

本発明の多量体結合体は、式 (II) :

$$([P]_v - [\text{スペーサー}]_x - \text{コア} - [\text{リンカー}]_y - [\text{レポーター}]_z) \cdot E$$

(II)

によって表すことができ、式中、P、コア、スペーサー、リンカー、レポーター、 v 、 x 、 y および z は前記の通りであり、E はエフェクターである。共有結合により融合させた結合体では、化学の法則通りに、エフェクターはコア、もしくはリンカー、またはこれらの両方に結合させることができる。

【0021】

本明細書に用いている「結合体 (conjugate)」もしくは「結合体化 (conjugation)」とは、エフェクターと単量体もしくは多量体トランスポーターペプチドとの間の物理的な結合を可能にするあらゆるタイプの相互作用のことを意味する。この結合の性質は、共有もしくは非共有結合であり得るが、その結合は、細胞移行の前もしくは移行中に結合体が解離しないように十分強力なものである必要がある。結合体化は、当業者に公知の任意の化学的、生化学的、酵素的もしくは遺伝子的カップリング法を用いて達成することができる。目的のエフェクターは、トランスポーターペプチドのN末端もしくはC末端にカップリングまたは融合させることができる。一部の実施形態として、このエフェクターは、リンカー基に、もしくは直接コアに、またはレポーター基にカップリングあるいは融合させる。

【0022】

種々の実施形態として、単量体および/または多量体トランスポーターペプチドは、長さをアミノ酸長として50個未満、25個未満もしくは15個未満であり得る。

【0023】

さらなる実施形態として、移行は脾B細胞、肝細胞、大腸細胞、筋肉細胞および/または肺細胞内で行われる。

【0024】

別の実施形態として、本発明は、トランスポーターペプチドを生体膜を通過させて移行させる方法を含む。例えば、配列番号1-6の配列のうちの1種以上を含む単量体もしくは多量体ペプチドは脾B細胞の膜を通過させて移行させることができ、配列番号7-10の配列のうちの1種以上を含む単量体もしくは多量体ペプチドは肝細胞の膜を通過させて移行させることができ、配列番号11のペプチドうちの1種以上を含む単量体もしくは多

10

20

30

40

50

量体ペプチドは大腸細胞の膜を通過させて移行させることができ、配列番号 12 - 20 の配列のうちの 1 種以上を含む単量体もしくは多量体ペプチドは筋肉細胞の膜を通過させて移行させることができ、および配列番号 21 - 34 の配列のうちの 1 種以上を含む単量体もしくは多量体ペプチドは肺細胞の膜を通過させて移行させることができる。

【0025】

なおさらなる実施形態として、本発明は、1 種以上のエフェクターに結合させた単量体もしくは多量体トランスポーターペプチドであるトランスポーターユニットを含む。種々の他の実施形態として、このエフェクターは核酸、ペプチドもしくは薬学的に活性な薬剤であり得る。

【0026】

さらに別の実施形態として、本発明は、トランスポーターペプチドと 1 種以上のエフェクターとの間で移行可能な単量体もしくは多量体結合体を作製し、従ってトランスポーターペプチド - エフェクター結合体を形成する方法を含む。

【0027】

別の実施形態として、本発明は、エフェクターを単量体もしくは多量体トランスポーターペプチドに結合させて真核細胞内に導入することによる、真核細胞の細胞質および / または核内に 1 種以上のエフェクターを移行させる方法を含む。例えば、このトランスポーターペプチド - エフェクター結合体は、この結合体の存在下で培養細胞をインキュベートすることにより、またはこの結合体を細胞内に注入することにより細胞内に導入することができる。

【0028】

種々の他の実施形態として、本発明は、エフェクターを単量体もしくは多量体のトランスポーターペプチドに結合させ、細胞の活性状態の代謝を亢進させる条件の下、この細胞の存在下にインキュベートすることによる、真核細胞におけるエフェクターの細胞内濃度を上昇させる方法を含む。本発明の好ましい実施形態は、この真核細胞としてヒト細胞を使用することを含む。

【0029】

さらなる実施形態として、本発明は、治療的もしくは予防的に有効な量の単量体もしくは多量体トランスポーターユニット、および薬学的に受容可能な担体を含む薬学的組成物を含む。

【0030】

好ましい「薬学的組成物」としては、a) 希釈剤、例えば、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニトール、ソルビトール、セルロースおよび / またはグリシン; b) 滑沢剤、例えば、シリカ、滑石、ステアリン酸、そのマグネシウム塩もしくはカルシウム塩および / またはポリエチレングリコール; また、錠剤用として c) 結合剤、例えば、ケイ酸マグネシウム・アルミニウム、でんぷん糊、ゼラチン、トラガント、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび / またはポリビニルピロリドン; 必要に応じて d) 崩壊剤、例えば、でんぷん、寒天、アルギン酸またはそのナトリウム塩もしくは発泡性混合物; ならびに / あるいは e) 吸収剤、着色剤、矯味矯臭剤および甘味剤とともに有効成分を含む錠剤およびゼラチンカプセル剤が挙げられる。注射用組成物は、好ましくは等張水溶液もしくは懸濁液であり、坐剤は脂肪性乳濁液もしくは懸濁液から調製するのが有利である。これらの組成物は、滅菌することができ、および / または保存剤、安定化剤、湿潤剤または乳化剤などのアジュバント、溶解促進剤、浸透圧調節塩および / または緩衝液を含むことができる。また、さらに、これらは他の治療上有用な物質を含むこともできる。これらの組成物は、それぞれ、従来の混和、顆粒化またはコーティング法によって調製され、有効成分を約 0.1 % ~ 75 %、好ましくは約 1 % ~ 50 % 含有する。

【0031】

なおさらなる実施形態として、本発明は、1 個以上の容器が本発明の薬学的組成物を治療的もしくは予防的有効量で含有するキットを含む。

【0032】

本発明の別の実施形態は、疾患の処置もしくは予防を必要とする被験体に対し、疾患を処置もしくは予防するのに十分な量の薬学的組成物を投与することにより、その疾患を処置もしくは予防する方法を含む。処置対象の疾患としては、例えば、糖尿病、大腸癌、呼吸器疾患、神経変性障害、心臓麻痺、および／またはウイルス感染症が挙げられ得る。

【0033】

別の局面として、本発明は、特定の細胞型に対してファージ・ライブラリをスクリーニングした後、どの細胞がファージを取り込んだかを評価する、トランスポーターペプチド用ファージ・ライブラリのスクリーニング方法を含む。

【0034】

別の実施形態として、この方法は、取り込まれたファージのDNAを同定し、これから発現されるペプチドを推定することを含む。

10

【0035】

なおさらなる実施形態として、この方法は、ファージ・ライブラリを少なくとも3サイクルにわたって選択するスクリーニング工程を含む。

【0036】

さらに別の実施形態として、本発明は、ペプチドの多価(multivalent)ディスプレイを有するファージを含む。

【0037】

(発明の詳細な説明)

本発明は、薬物および治療剤を細胞内へ送達するための、種々の細胞型を特異的に標的とするペプチドトランスポーターならびにペプチド移送システムを提供する。当該分野で公知の既存の移送システムには、これらが非効率的で、宿主ゲノムに影響を与え、活性物質(例えば、エフェクタ)の生物学的性質を変え、標的細胞を殺傷し、あるいは(例えば、ウイルス性結合体を使用することにより)極めて高いリスクを生じるためヒト対象には使用できないので、制約がある場合が多い。本発明のペプチド移送システムでは、治療剤となり得るものを細胞内へ送達するためにプロタンパク質転換酵素およびその特異的なリガンドを用いることによって当該分野で公知のトランスポーターシステムの限界を克服している。本発明のシステムでは、宿主のゲノムに影響を与えず、その他の点でも、非侵襲性である、変化を受けていない生物活性物質が効率的に送達される。

20

【0038】

受容体媒介性のエンドサイトーシスは、細胞内への治療剤の送達を狙った実験系において広く利用されてきた。KatoおよびSugiyama、Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14:287(1997)。従って、細胞特異的なエンドサイトーシス受容体を首尾良く標的にすることによって、ペプチドを細胞型特異的に送達することができる。プロタンパク質転換酵素は、受容体媒介性エンドサイトーシスにより取り込まれる細胞表面受容体の一例である。こうしたタンパク質は、ペプチドホルモン、神経ペプチドその他の多くのタンパク質の前駆体をその生物活性のある形に転換する役割を果たしていることが明らかにされている。プロタンパク質転換酵素ファミリーの切断部位にはコンセンサス配列R-X-X-Rが含まれている。発現および局在性に関する情報は、プロタンパク質転換酵素は細胞外のリガンドを細胞内空間に移送することを示す。

30

【0039】

例えば、哺乳類のプロタンパク質転換酵素は、その組織分布に基づいて3グループに分類することができる。1つのクラスのフーリン(Furin)、PACE4、PC5/PC6およびLPCIPC7/PC8/SPC7は広範囲の組織および細胞株において発現される。第2のクラスの神経内分泌特異的転換酵素PC2およびPC1/PC3の発現は、膵島、下垂体、副腎髄質および多くの脳領域などの内分泌組織に限定されている。さらに、第3のクラスのPC4の発現は、精巢の精子形成細胞に高度に制限されている。神経内分泌特異的転換酵素は、主として分泌顆粒内に局在している。また、PC5/PC6Aも、分泌顆粒に局在していると報告されている。さらに、間接的な証拠ではあるが、一

40

50

部のプロタンパク質転換酵素分子は細胞表面に存在することが示唆されており、フューリンはTGNと細胞表面との間を循環することが明らかにされている。Mandrup-Poulsen, BMJ, 316:1221(1998)を参照されたい。

【0040】

天然リガンドの働きをするように見えるペプチドリガンドは、ファージ・ディスプレイ法によって同定される場合が多い。効率的な受容体媒介性エンドサイトーシスを誘導するペプチド配列の単離は、ファージ・ディスプレイ法を用いることによって向上する。Ivanenkovら、Biochem. Biophys. Acta 1448:450、p463(1999)を参照されたい。ファージ・ディスプレイ・ライブラリは、細胞受容体に対する天然リガンドの修飾体を含む変異体分子(Cabibboら、Gene 167:41(1995))および短鎖ペプチド(Zwickら、Curr. Opin. Biotechnol. 9:427(1998))の膨大な供給源となる極めて強力なツールである。また、ライブラリを直接注射したマウスにおいて、脳および腎臓に13倍の選択性を示すペプチド配列が首尾良く単離されている。PasqualiniおよびRuoslahti, Nature 380:364(1996)ならびにPasqualini、Ruoslahti, Mol. Psychiatry 1:423(1996)を参照されたい。

10

【0041】

時として、この方法により得られたリガンドは、短鎖ペプチド分子内の立体構造の自由度が高く接触残基数が少ないため、低親和性(マイクロモル程度)となることがある。ペプチドリガンドの結合親和性を改善する1つの方法は、低親和性ペプチドのいくつかのコピーを単一の多量体分子の形に結合させることである。この多量体リガンドの親和力(および生物活性)は、単量体リガンドに対して大きく向上させることができる。一部の実施形態として、多量体構築物は、オキシム化学を用いて、構築ブロックとしての細胞を標的とするペプチドから作製する。例えば、このペプチドは、特定の細胞(例えば、脾細胞)に特異的に結合し、受容体媒介性エンドサイトーシスを介してこの細胞による取り込みを誘発させることができるペプチドリガンドを選択するファージ・ディスプレイ実験から得ることができる。

20

【0042】

例えば、単量体としてのIgMは低親和性タンパク質であるが、5量体の形をとると、細菌もしくはウイルスの表面に存在する反復性抗原決定基に対する親和力が大きく向上する。Roitt, Essential Immunology (Oxford/Blackwell, London), p65-84(1991)を参照されたい。

30

【0043】

同様に、組換えDNA技術により作製されるタンパク質であるこのペンタボディでは、 10^5 倍の向上がみられる。Alexeyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1663-1668(1997)。ファージ・ライブラリから得られるポリペプチドの低親和性はペンタボディの5量体構造によって補われ、その標的に対する高い親和力が得られる。

【0044】

また、最近、Roseは同様な分子を「ケモボディ(chemobody)」と名付けた。RoseおよびVizzavona, J. Am. Chem. Soc. 121:7034-7038(1999)を参照されたい。このケモボディは、相補性構造に非共有結合することにより抗体分子の働きを模倣することができるペプチドサブユニットの複数のコピーを提示する合成分子である。その結合ペプチドのアミノ酸配列は、ファージ・ライブラリ法により同定され、サブユニット自体そのものは、オキシム化学によって構築された。また、同時に2つ以上のペプチドサブユニットによって標的に結合することができるように、適切なスペーサーおよびリンカーもこのケモボディに導入された。Roseは、可動性リンカーを有するインフルエンザ・ウイルスのファージ由来ペプチドのコピーを4個有するモデルケモボディを作製した。

40

50

【0045】

特定の細胞型を選択的に標的とする低分子トランスポーターペプチドは、大きなファージ・ディスプレイ・ライブラリから得て、単量体もしくは多量体トランスポーター分子として用いることができる。ファージ・ディスプレイ・ライブラリを用いて得られるような低分子ペプチド担体の有利な点としては、高品質、高純度、低免疫原性であり、生体の全ての細胞に極めて効率的に送達することを可能にすることが挙げられる。Schwarzeら、Science 285:1573(1999)。従って、ペプチド担体では、種々の高分子を効率的に送達するためのリポソーム、ウイルスなどの従来のトランスポーターを改良することができる可能性がある。例えば、Mahatoら、J. Drug Target. 4:337(1997)、およびMahatoら、Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14:133 4:337(1997)を参照されたい。

10

【0046】

本明細書に記載したトランスポーターペプチドは、種々の疾患の治療に用いられ、このような疾患としては、糖尿病が挙げられるが、これに限定されるものではない。正常な生物体（では、インスリン分泌により正常血糖が維持されるように細胞集団は厳格に制御されている。細胞集団は、乳児もしくは成熟生物体の要求に反応して、特に、特定の生理的および生理病理学的状態への反応として調節されている。細胞集団の適切性は、基本的に細胞の死と再生との動的バランスによって達成されている。このバランスは、未熟細胞の分化および既存のインスリン分泌細胞の増殖によって達成されている。ScharfmannおよびCzernichow、Diabetes Metab. 22:223(1996)ならびにBonner-Weir, Recent Prog. Horm. Res. 49:91(1994)を参照されたい。I型糖尿病における細胞集団の障害されたバランスは、膵細胞を標的にする免疫系の特異的攻撃により惹起される過程である細胞破壊の促進によって生じる。従って、細胞破壊の速度を抑制もしくは低下させると、糖尿病が安定化されるばかりではなく、島が再生されて細胞集団の機能不全を是正することも可能となる。

20

【0047】

I型糖尿病の実験モデルにおいて細胞の喪失速度を低下させるのに用いられる効力のあるツールとして数種の化合物を確立した。これらのペプチドの多くは本質的にペプチドであり、従ってペプチド担体に容易に結合する。本明細書に記載したこれらのペプチドは、治療用「積み荷(cargo)」のデザイン、即ち、治療剤(「エフェクタ」)を担体(単量体もしくは多量体「トランスポーターペプチド」)とカップリングさせるための基剤となる。

30

【0048】

本発明の移送システムの1つの実施形態は、I型糖尿病の治療のために細胞の細胞内メカニズムを標的にしたものである。I型糖尿病の症状は、免疫系の分泌による膵細胞の破壊に続発するものである。Mandrup-Poulsen, BMJ 316:1221(1998)を参照されたい。ヒトおよび齧歯類における結論的なデータは、サイトカインのインターロイキン-1(IL-1)は、マクロファージおよびT細胞により分泌されるTNFおよびINFと共に、細胞の機能不全および破壊ならびにI型糖尿病をもたらす最終的な転帰の原因となる主要な成分であることを示す。Mandrup-Poulsen, Diabetologia 39:1005(1996)、Nerupら、Diabetes Care 11 Suppl 1:16(1988)、ならびにMauricioおよびMandrup-Poulsen, Diabetes 47:1537(1998)を参照されたい。これらの分泌サイトカインは、膵細胞においてシグナル伝達およびエフェクター分子の高度に複雑なネットワークに参与している。このシグナル伝達は、細胞の挙動を改変し、細胞の運命に決定的な影響力を与える。これまでに蓄積された証拠から、この調節性細胞内ネットワークは新規な治療方法の開発のための有望な標的となることが分かる。Iwahashiら、Cytokines. Cell

40

50

Mol. Ther. 4:45 (1998)、Sjoholm, Cell Death Differ. 5:461 (1998)、Stephensら、J. Autoimmun. 10:293 (1997)、Rabinovitchら、Diabetes 48:1223 (1999)、Bleichら、J. Clin. Invest. 103:1431 (1999)、Welshら、Mol. Med. 5:169 (1999)、およびChenら、Diabetes 49:562 (2000)を参照されたい。細胞内サイトカイン・シグナル伝達の処理および形成に関与するこれらの分子はそれぞれ、トランスポーター・薬物設計の標的とすることができる。

【0049】

細胞内でIL-1によって動員される最も重要なシグナル伝達分子としては、セラミド、プロスタグランジン、熱ショックタンパク質、誘導性NOシンターゼ酵素(iNOS)、転写因子NF- κ B(Torgersonら、J. Immunol. 161:6084 (1998)参照)、ならびに3種のMAPキナーゼERK1/2、p38およびJNKがある。これらの分子の多くは、細胞の生存および機能の改善をもたらした既存の阻害剤によるブロックの標的である。iNOSノックアウト(KO)マウスはIL-1の細胞毒性に対して抵抗性であり(Flodstromら、Diabetes 48:706 (1999)参照)、iNOS作用のブロkkerはNOの細胞毒性の種々の側面を抑制する(Sjoholm, Cell Death Differ. 5:461 (1998)に概説されている)。島および細胞株による研究は、Ca²⁺チャネルのブロkkerおよびカスパーゼ阻害剤は齧歯類の細胞死を防止することを示す。Wangら、Endocrinology 140:1200 (1999)、およびYamadaら、Diabetes 48:478 (1999)を参照されたい。p38阻害剤は、グルコース賦活性インスリン放出のIL-1媒介性阻害を減弱させる。Larsenら、J. Biol. Chem. 273:15294 (1998)を参照されたい。アンチセンスGADトランスジェニックNODマウスにおいてGADの発現を細胞特異的に抑制すると、自己免疫性糖尿病が阻止された。Yoonら、Science 284:1183 (1999)を参照されたい。膵細胞株においてbcl-2、IL-1RaおよびJBD(c-Jun N末端キナーゼJNKの優性阻害因子)を発現させると、細胞はアポトーシスに抵抗性となった。Bonnyら、Diabetes 50:77-82 (2000)、Iwashihiraら、Diabetologia 39:530 (1996)、Duprazら、Gene Ther. 6:1160 (1999)、およびGiannoukakisら、Diabetes 48:1730 (1999)を参照されたい。以上のデータを総合すると、特定の手段により細胞内事象を操作することはI型糖尿病の治療にかなり有望であることを示す。

【0050】

疾病治療の1つの主要な課題は、生物学的に重要な分子をインビボで有効な細胞透過性の生物活性化合物に変換することである。Gibbs, Science 287:1969 (2000)を参照されたい。例えば、細胞の喪失を防止するための最も有望なツールは、多くの高分子タンパク質(例えば、Bcl-2(Rabinovitchら、Diabetes 48:1223 (1999)参照)、ドミナントネガティブ型のMyD88、TRAF、FADDもしくはIRAK(Burnsら、J. Biol. Chem. 273:12203 (1998)、およびStephensら、Endocrinology 140:3219 (1999)参照)などのサイトカイン・シグナル伝達の阻害因子、または現在インビボで組織および膵細胞を含む細胞型に送達させることができないJNK阻害剤JBD280(Ammendrupら、Diabetes 49:1468-1476 (2000)参照)である。

【0051】

最近の研究は、高分子タンパク質を、細胞および器官に容易に送達させることができる低分子生物活性化合物に変換する試みの前進を示す。Hawiger, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:89 (1999)を参照されたい。これらの方法には基本

10

20

30

40

50

的に2つの条件が必要とされる：即ち、1)細胞内に効率的に送達させたい分子に特定のトランスポーターもしくはその化学的修飾体を結合させること(例えば、Schwarzeら、Science 285:1573(1999)、Brugidouら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 214:685(1995)、Oehlkeら、Biochim. Biophys. Acta 1414:127(1998)およびTerskikhら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:1663(1997)に報告されている効率的な短鎖ペプチドトランスポーターを参照されたい)；2)トランスポーターに低分子ペプチド配列を結合させることができるように、タンパク質の活性部分を狭小化する必要があること。手短に言えば、概してこれらの条件では、元のタンパク質の不可欠な生物学的性質を保ちながら細胞内に入ることができる3~30アミノ酸長の二連(bi-partite)ペプチドが設定される。癌研究の場合のように(Gibbs、Oliff、Cell 79:193(1994)参照)、

細胞には操作することによりサイトカイン誘発性アポトーシスから細胞を保護することができる多数の細胞内事象があり、こうした操作は薬剤設計の有望な標的となると考えられる。

【0052】

受容体媒介性エンドサイトーシスは、細胞内への治療剤の送達を狙った実験系において広く利用されている。Kato、Sugiyama、Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14:287(1997)を参照されたい。エンドサイトーシス作用は、IgG Fc、ソマトスタチン、インスリン、IGF-IおよびII、トランスフェリン、EGF、GLP-1、VLDLもしくはインテグリン受容体を含む多くの受容体について報告されている共通の性質である。Hoflandら、Proc. Assoc. Am. Physicians. 111:63(1999)、Anderson、Clin. Immunol. Immunopathol. 53:S63(1989)、Lundら、J. Biol. Chem. 265:15713(1990)、SmithおよびJarett、Lab. Invest. 58:613(1988)、Solerら、Endocrinology 127:595(1990)、Widmannら、Biochem. J. 310:203(1995)、Yorkら、J. Biol. Chem. 274:1164(1999)、およびMukherjeeら、Physiol. Rev. 77:759(1997)を参照されたい。エンドサイトーシスを媒介する細胞型特異的受容体についても報告されている。Ivanenkovら、Biochem. Biophys. Acta 1448:463(1999)を参照されたい。

【0053】

強い実験的バックグラウンドは、臍細胞を選択的に標的にするトランスポーターペプチドが大きなファージ・ディスプレイ・ライブラリから得られることも考えられることを示しているが、そのような試みについては報告されていない。ファージ・ディスプレイ・ライブラリを用いて得られるような低分子ペプチド担体の利点は数多くあり、例えば、化学合成による作製が容易であること、高品質、高純度、低免疫原性であること、および生物体の全ての細胞に極めて効率的に送達することが可能であることが挙げられる。Schwarzeら、Science 285:1573(1999)を参照されたい。従って、本発明のペプチド担体には、多くの高分子の効率的な送達において、リポソームもしくはウイルスなどの従来のトランスポーターよりもうまく機能する可能性がある。例えば、Mahatoら、J. Drug Target 4:337(1997)およびMahatoら、Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14:133(1997)を参照されたい。

【0054】

ファージ・ペプチド・ライブラリは、従来より、線維状ファージM13の誘導体として構築されている。ペプチド・ライブラリは、このペプチドモチーフの1~5個のコピーを提示するキャプシドのマイナーコートタンパク質pIIIに融合される。Zwickら、Curr. Opin. Biotechnol. 9:427(1998)を参照されたい。

あるいは、メジャーコートタンパク質 p V I I I を用いることによって高価 (high-valent) 提示 (display) が達成される。しかしながら、これらのタイプのライブラリは、受容体媒介性エンドサイトーシスペプチド配列の単離のために最適化されていない。高い内部移行効率を有する担体を回収することに関連して考慮すべき事柄は以下の通りである：1) ペプチドの1価もしくは低価 (low-valent) 提示は、線維状ファージのような大きな構造体を効率的に取り込ませるには基本的に不十分であるが、多価提示では効率的取り込みが可能となること (Ivanenkovら、Biochem. Biophys. Acta 1448:450 (1999) 参照)；および2) 受容体結合リガンドが内部移行が、原形質膜の特定領域における細胞表面受容体の濃縮、続くクラスリン被覆小胞の形成に関連すること (Damke、FEBS Lett. 389:48 (1996))。

【0055】

M13誘導体のサイズは大きく (1~1.5 μm) (Zacherら、Gene 9:127 (1980) 参照)、古典的なクラスリン被覆ピットの通常サイズ (150 nm) を上回る。クラスリン被覆ピットは、膜表面の約2%を占める原形質膜上の陥入構造体である。この特殊な構造は、インスリン、EGFなどの細胞外タンパク質もしくはペプチドを10~50%/分という極めて速い速度で除去する高度に効率的な受容体媒介性内部移行プロセスを指向する。Mukherjeeら、Physiol. Rev. 77:759 (1997) を参照されたい。従って、従来のM13ファージでは、こうした特殊で高度に効率的な構造による受容体媒介性内部移行が行われるとは考えられない。

【0056】

従って、報告されている試みでは、ペプチド担持ファージが高い内部移行率を示すペプチドは得られていない。これまで、こうした研究から、特定の細胞型に特異的なコンセンサス取り込みモチーフは出現していない。

【0057】

一部の局面として、本明細書に開示した本発明は、ペプチド担持エフェクターの取り込みを促進するトランスポーターペプチドの同定に関する。一旦このペプチド配列が決まると、このペプチドをエフェクター分子に結合させることによりエフェクター分子を生体膜を通過させて移送させる。例えば、ファージ・ディスプレイ・パニングにより膵インスリン分泌細胞を標的にする一連のペプチドを単離した。こうした細胞を標的にするペプチドを構築ブロックとする単量体もしくは多量体構築物を合成した。これらの構築物は、治療剤を特異的に送達して糖尿病をコントロールするように設計した新規化学物質である。

【0058】

本発明のトランスポーターペプチドは式Iで表すことができる：

$$[P]_v - [\text{スペーサー}]_x - \text{コア} - [\text{リンカー}]_y - [\text{レポーター}]_z \quad (\text{I})$$

式中、Pは前述のコンセンサス配列 (consensus motif) ($X_m R X_n$)、($X_m R R R X_n$)、($X_m R R X R X_n$) および ($X_m R X R R X_n$) に含まれるペプチドである。例えば、このペプチドは、配列 $X_1 - X_2 - X_3 - X_4$ を含むことができ、式中、 X_1 および X_4 はRもしくはKとすることができ、 X_1 および X_4 は任意のアミノ酸とすることができる。一実施形態として、本発明は、アミノ酸配列 $R - X - X - R$ を有する少なくとも1種のペプチドを含む多量体トランスポーターを提供する。別の実施形態として、本発明は、配列番号1-34のうちの任意の1つのアミノ酸配列を有する少なくとも1種のペプチドを含む多量体トランスポーターを提供する。種々の別の実施形態として、このトランスポーターペプチドは、タンパク質転換酵素のリガンド由来のものである。さらに別の実施形態として、このトランスポーターペプチドは、タンパク質転換酵素の切断部位から得られるものである。vによって表される所与のトランスポーター内のペプチド数は、整数とする。単量体トランスポーターでは、vは1である。多量体トランスポーターでは、vは2~8またはそれ以上の整数とする。任意の所与の多量体結合体において、それぞれのペプチドは互いに同じか、異なるものとすることができる。

【0059】

ペプチドとコアとの間のスペーサーは存在していてもしていなくてもよく、従って、 x は1または0である。好ましいスペーサーは可動性、両親媒性、非免疫原性、およびタンパク質分解酵素に対し非感受性であり、例えば、スクシンイミジル-ポリエチレングリコール(succ-p eg)などのポリエチレングリコール(P EG)が挙げられる。

【0060】

本明細書に用いている「コア」とは、多量体トランスポーターペプチド内のペプチド間を結合する役割を果たす構造体である。また、コアは、リンカー、スペーサーおよびレポーター基の接続ポイントとなる。通常、コアに対し結合に利用可能な多くの機能性を持たせることによって、この多量体構築物の種々の異なる部分(ペプチド、および存在する場合にはスペーサー、リンカーおよびレポーター)をこのコアと融合させて1つの分子を形成させることができる。企図しているコア部分としては、以下に詳細を説明するポリリジン(K)が挙げられ、また、リンカーの組み込まれた構造のものも挙げられる。コアを選択することにより、所与の結合体内に存在するペプチドの数が決まる。代表的なコアとしては、 $C_4 - K_2 K - K(succ - peg - S) - \text{アミド}$ 、 $C - GGG - [K(C)]_3 - K(succ - peg - S) - \text{アミド}$ 、 $(NH_2 OCH_2 CO)_4 - K_2 K - K(succ - peg) - \text{アミド}$ および $(NH_2 OCH_2 CO)_8 - K_4 K_2 K - K(GGG) - \text{アミド}$ が挙げられる。単量体トランスポーターペプチドでは、コアは存在していてもいなくてもよい。

【0061】

このトランスポーター構築物では、リンカーおよびレポーター基は存在していてもいなくてもよく、従って、 y および z は、式Iにおいて独立に1もしくは0である。

【0062】

本明細書に用いている「トランスポーターペプチド」とは、物質が生体膜を通過して移行するのを促進するペプチドである。特に明記しない限り、または用いる文脈において不正確でない限り、トランスポーターペプチドを意味するものは単量体もしくは多量体のトランスポーターペプチドを包含する。

【0063】

トランスポーターペプチドは、物質が細胞の生体膜を横切って、特にその細胞質もしくは核内へ通過または移行するのを容易にするペプチドである。移行の検出は、例えば、PCT出願第WO97/02840号に記載されている細胞透過アッセイ(cellular penetration assay)を含む種々の方法によって行うことができる。一般に、細胞透過アッセイは、a)培養細胞を、移行させるペプチドとインキュベートし、b)この細胞を固定して透過処理し、およびc)細胞内のペプチドの有無を検出することによって実施する。検出工程は、固定、透過処理した細胞をこのペプチドに対する標識抗体とインキュベートした後、ペプチドと標識抗体との免疫反応を検出することによって行うことができる。あるいは、検出可能な標識ペプチドを用い、細胞コンパートメント内の標識の有無を直接検出することによっても、検出を行うことができる。この標識は、例えば、放射性標識もしくは蛍光標識、色素、または検出可能な任意の標識とすることができる。例えば、de Jongら、J. Nucl. Med. 40: 2081 (1999)およびBreemanら、Int. J. Cancer 81: 658 (1999)を参照されたい。

【0064】

さらに、本発明は、トランスポーターペプチドをエフェクターにカップリングもしくは融合させた結合体である移送ユニット、もしくは結合体を含む。本明細書に用いている「カップリングさせた」とは、エフェクターと前記ペプチドとの物理的な結合を可能にする任意のタイプの相互作用のことを意味する。この結合の性質は、共有もしくは非共有結合とすることができるが、その結合は、細胞移行の前もしくは移行中にこのペプチドが解離しないように十分強力なものである必要がある。カップリングは、当業者に既知の任意の化学的、生化学的、酵素的もしくは遺伝子的カップリング法を用いて達成することができる。対象とするエフェクターは、このペプチド・ペクターのN末端もしくはC末端にカッ

10

20

30

40

50

プリングさせることができる。

【 0 0 6 5 】

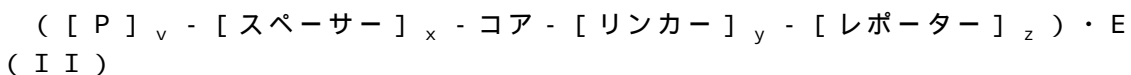
「融合した」もしくは「融合」または「結合する」あるいは「相互作用する」という用語は、2種以上の分子同士が何らかの第3の分子に対するよりも高い選択性を示すような特定の相互作用全てを含むものであり、これらには、共有結合、イオン結合、疎水性結合、水素結合などの作用が含まれるが、溶媒選択性などの非特異的結合は含まれない。

【 0 0 6 6 】

一部の実施形態として、このトランスポーターペプチドは、1つ以上のエフェクターとカップリングもしくは融合させる。このカップリングは、直接的なものの、もしくはコアを介したものとすることができる。「エフェクター」は、DNA、RNA、タンパク質、ペプチド、または薬学的に活性な薬剤、例えば、毒素、抗生物質、抗病原体剤 (antipathogenic agent)、抗原、抗体、抗体断片、免疫調節剤、酵素もしくは治療剤などを含む任意の適切な分子とすることができる。2つ以上のエフェクターが存在する場合、これらのエフェクターは同一もしくは異なるものとすることができる。エフェクターとは、例えば、生物学、医薬、診断、トレーシングもしくは食品加工の対象になる任意の分子または化合物のことを意味する。エフェクターは、種々の由来の核酸、特にヒト、ウイルス、動物、真核もしくは原核生物、植物または合成由来等の核酸 (リボ核酸、デオキシリボ核酸) で構成することができる。対象とする核酸は、例えば、単純な微量ヌクレオチドからゲノム断片もしくはゲノム全体に至る種々のサイズのものとすることができる。同様に、これはウイルスゲノムもしくはプラスミドとすることができる。あるいは、対象とするエフェクターは、例えば、酵素、ホルモン、サイトカイン、アポリポタンパク質、成長因子、抗原、抗体などのタンパク質とすることもできる。さらに、このエフェクターは、例えば、毒素、治療剤、もしくは抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生虫剤などの抗病原体剤のような薬学的に活性な物質とすることができる。この対象とするエフェクターは、それ自体そのままで活性があるものとすることができ、またはインサイチュでペプチドもしくは別の物質または環境条件により活性化されるものとすることができる。

【 0 0 6 7 】

本発明のトランスポーターペプチド結合体は、式 (I I) :



によって表すことができ、式中、P、コア、スペーサー、リンカー、レポーター、v、x、y および z は前記の通りであり、E はエフェクターである。共有結合により融合させた結合体では、化学の法則通りに、エフェクターはコア、もしくはリンカー、またはこれらの両方に結合させることができる。単量体トランスポーターペプチド結合体 (v = 1) では、コアは存在してもしていなくてもよい。

【 0 0 6 8 】

本明細書に用いている「薬学的に活性な物質」とは、ヒトもしくは動物の生物体に投与したときに、検出可能な薬理学的および/または生理学的効果を誘起する化学物質もしくは化合物のことを意味する。本明細書に用いている「治療剤」とは、ヒトもしくは動物の生物体に投与したときに、目的とする薬理学的および/または生理学的効果を誘起する化学物質もしくは化合物のことを意味する。

【 0 0 6 9 】

本発明によるトランスポーターペプチドは、その透過能がこれにカップリングさせる対象物質 (エフェクター) の性質とは事実上無関係であるという事実の特徴がある。

【 0 0 7 0 】

また、本発明は、対象物質を細胞もしくは細胞の核内に導入する方法を含む。この方法は、細胞内への効率的な透過を可能にするのに十分な量のトランスポーターペプチド - エフェクター結合体もしくはトランスポーターユニットと細胞とを接触させることを含む。一般に、本方法は、この結合体をインビボまたはインビトロで取り込ませるために用いる

ことができる。例えば、この結合体は、インビトロ、エキソビボ、またはインビボで与えることができる。さらに、本発明によるトランスポーターペプチドは、カップリングさせた物質に生物活性を持たせることを可能にすることができる。従って、トランスポーターペプチドはカップリングさせたエフェクターの生物活性を増強させることができる。インビトロによる方法では、エフェクターをトランスポーターとカップリングさせ、得られた結合体を、細胞代謝の活性化を可能にする温度で細胞とインキュベートする。場合によっては、このトランスポーター - エフェクター結合体を特定の細胞に注入する。この結合体を細胞内に導入する他の任意の方法を用いることもできることは当業者によって認められよう。

【0071】

また、以上のペプチド - エフェクター結合体のほかに、本発明は、薬学的に受容可能な塩基もしくは酸付加塩、水和物、エステル、溶媒和物、プロドラッグ、代謝体、立体異性体もしくはこれらの混合物を提供する。また、本発明は、薬学的に受容可能な担体、希釈剤もしくは賦形剤と共に、ペプチド - エフェクター結合体を含む薬学的組成物を含む。

【0072】

「薬学的に受容可能な塩」という用語に包含される塩とは、一般に、この遊離塩基と適切な有機もしくは無機酸とを反応させて本明細書に開示した化合物の「薬学的に受容可能な酸付加塩」を作製することにより調製する本発明の化合物の毒性のない塩のことを意味する。こうした化合物は、この遊離塩基の生物学的効果および性質を保持するものである。このような塩の代表例は、酢酸塩、アムソン酸塩（4, 4 - ジアミノスチルベン - 2, 2' - ジスルホネート）、ベンゼンスルホン酸塩、ベンゾネート、重炭酸塩、重硫酸塩、酒石酸水素塩、ホウ酸塩、臭化物、酪酸塩、エデト酸カルシウム塩、カンシル酸塩、炭酸塩、塩化物、クエン酸塩、クラブラリエート（clavulanic acid）、二塩化水素化物、エデト酸塩、エディシレート、エストレート、エシレート、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニレート、ヘキサフルオロリン酸塩、ヘキシルレゾルシネート、ヒドラバミン塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヒドロキシナフトエート、ヨウ化物、イソチオネート、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、ラウリン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、臭化メチル塩、メチル硝酸塩、メチル硫酸塩、ムチン酸塩、ナブシル酸塩、硝酸塩、N - メチルグルカミン・アンモニウム塩、3 - ヒドロキシ - 2 - ナフトエート、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモン酸塩（1, 1 - メチレン - ビス - 2 - ヒドロキシ - 3 - ナフトエート、エンボネート）、パントテン酸塩、リン酸塩 / ニリン酸塩、ピクリン酸塩、ポリガラクトロン酸塩、プロピオン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、塩基性酢酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、スルホサリキュレート、スラメート、タンニン酸塩、酒石酸塩、テオクル酸塩、トシル酸塩、トリエチオダイド、および吉草酸塩などの水溶性ならびに非水溶性塩である。

【0073】

本発明の方法によれば、ヒト患者に対し、薬理学的に有効な量のペプチドもしくは結合体を投与することができる。「薬理学的に有効な量」という用語は、研究者もしくは臨床家によって求められている組織、器官系、動物もしくはヒトの生物学的または医学的反応を誘起する薬物もしくは薬学的組成物（エフェクター）の量のことを意味する。

【0074】

また、本発明は、対象エフェクターを細胞もしくは細胞核内に導入するのに適した薬学的組成物を含む。この組成物は、内服に適したものであることが好ましく、有効量の本発明の薬理学的に活性化化合物を単独、もしくは1種以上の薬学的に受容可能な担体との組合せで含む。この化合物は、毒性があるとしても極めて少ないという点で、特に有用である。

【0075】

好ましい薬学的組成物は、a) 希釈剤、例えば、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニトール、ソルビトール、セルロースおよび／またはグリシン；b) 滑沢剤、例えば、シリカ、滑

10

20

30

40

50

石、ステアリン酸、そのマグネシウムもしくはカルシウム塩および／またはポリエチレングリコール；錠剤用として c) カップリング剤、例えば、ケイ酸マグネシウム・アルミニウム、でんぷん糊、ゼラチン、トラガント、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび／またはポリビニルピロリドン；必要に応じて d) 崩壊剤、例えば、でんぷん、寒天、アルギン酸またはそのナトリウム塩もしくは発泡性混合物；および／または e) 吸収剤、着色剤、矯味矯臭剤および甘味剤とともに有効成分を含む錠剤ならびにゼラチンカプセル剤である。注射用組成物は、好ましくは等張水溶液もしくは懸濁液であり、坐剤は脂肪性乳濁液もしくは懸濁液から調製するのが有利である。これらの組成物は、滅菌することができ、および／または保存剤、安定化剤、湿潤剤または乳化剤などの佐剤、溶解促進剤、浸透圧調節塩および／または緩衝液を含むことができる。また、さらに、これらは別の治療上有用な物質を含むことができる。これらの組成物は、それぞれ、従来の混和、顆粒化またはコーティング法によって調製することができ、有効成分を約 0.1 ~ 75 %、好ましくは約 1 ~ 50 % 含有する。

10

【0076】

本明細書に開示した活性化合物および塩の投与は、一般に認められている治療剤の投与方法のうちの任意の方法によることができる。これらの方法としては、経口、鼻腔内、非経口、経皮、皮下もしくは局所性投与様式などの全身性または局所投与が挙げられる。

【0077】

目的とする投与様式に応じて、この組成物は、例えば、好ましくは単位投与量の注射用剤、錠剤、坐剤、丸剤、徐放性カプセル剤、散剤、液剤、懸濁剤などのような固体もしくは半固体または液状の投与形態とすることができる。この組成物は、有効量の活性化合物もしくはその薬学的に受容可能な塩を含むことになり、また、さらに、薬学において通例用いられている任意の従来の薬学的賦形剤および他の治療薬もしくは薬学的組成物、担体、アジュバント、希釈剤なども含むことができる。

20

【0078】

固体組成物の賦形剤としては、医薬用品質のマニトール、乳糖、でんぷん、ステアリン酸マグネシウム、サッカリン・ナトリウム、滑石、セルロース、グルコース、蔗糖、炭酸マグネシウムなどを用いることができる。また、上記の活性化合物は、例えば、プロピレングリコールなどのポリアルキレングリコールを担体とする坐剤として製剤化することができる。

30

【0079】

液体、特に注射用組成物は、例えば、溶解、分散などにより調製することができる。活性化合物は、例えば、水、生理食塩液、ブドウ糖水溶液、グリセロール、エタノールなどの医薬用純品溶媒に溶解もしくは混合することにより、注射用溶液もしくは懸濁液を作製する。

【0080】

また、投与することになる薬学的組成物は、必要に応じて、湿潤剤、乳化剤、pH 緩衝剤、および例えば、酢酸ナトリウム、オレイン酸トリエタノールアミンのような他の物質などの毒性のない補助剤を少量含むことができる。

【0081】

一般に、非経口注射用剤は、皮下、筋肉内もしくは静脈内注射もしくは注入により投与する。注射用剤は、溶液もしくは懸濁液、または液に溶かした後、注射するのに適した固体形態のような通常の形態として調製することができる。

40

【0082】

非経口投与の 1 つの方法として、本明細書に引用により組み込まれている米国特許第 3,710,795 号に記載の方法に従い、投与量の一定のレベルが維持されるのを確実なものにする徐放性もしくは持続放出性製剤の埋め込み法を用いる。

【0083】

本発明の化合物は、錠剤、カプセル剤（各々が徐放性および持続放出性製剤を含む）、丸剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、懸濁剤、シロップ剤および乳剤のような

50

経口剤形として投与することができる。また、同様に、この化合物は、医薬分野の当業者に周知の形態により静脈内（急速および点滴の両方）、腹腔内、皮下もしくは筋肉内形態で投与することができる。

【0084】

この化合物の用法・用量は、患者の体型、種類、年齢、体重、性別および病状；治療対象の症状の重症度；投与経路；患者の腎および肝機能；ならびに使用する特定の化合物もしくはその塩を含む種々の要素に基づいて選択する。当該分野の医師もしくは獣医師であれば、症状の進行を防止し、遅らせ、または止めるのに必要とされる薬剤の有効量を容易に決定し、処方することができる。

【0085】

本発明の経口用量は、適応となる効果に用いる場合、有効成分を0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100.0、250.0、500.0もしくは1000.0mg含有する分割錠の形態で提供し得る。

【0086】

本発明の化合物は、1日1回の用量として投与することができ、あるいは1日当たりの総投与量を1日2回もしくは3回または4回の分割用量として投与することができる。さらに、本発明に好ましい化合物は、適切な鼻腔内投与用器具（intranasal vehicle）の局所使用による鼻腔内投与、もしくは当業者に周知の形態の経皮投与用皮膚パッチ剤による経皮投与を行うことができる。経皮送達システムの形態で投与する場合には、勿論、適量投与（dosage administration）は用法・用量全体を通して間欠的ではなく連続的なものとなる。その他の好ましい局所用製剤としては、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、エアロゾル・スプレー剤およびゲル剤が挙げられ、これらの場合、有効成分の濃度は0.1%～15%w/wまたはw/vの範囲となろう。

【0087】

本明細書に詳細に述べた化合物は、有効成分を構成することができ、通常、対象とする投与形態、即ち、経口用としての錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、シロップ剤などに対して適切に選ばれ、従来の調剤慣行に合った適切な薬学的希釈剤、賦形剤もしくは担体（本明細書ではこれらを総称して「担体」物質と呼ぶ）と混合して投与する。

【0088】

例えば、錠剤もしくはカプセル剤として経口投与する場合、有効薬物成分は、エタノール、グリセロール、水などの経口用で毒性がなく薬学的に受容可能な不活性担体と混合することができる。さらに、所望もしくは必要に応じて、この混合物に適切な結合剤、滑沢剤、崩壊剤および着色剤を混和することもできる。好適な結合剤としては、でんぷん、ゼラチン、グルコースもしくはベータ乳糖のような天然糖、コーン甘味剤、アカシア、トラガントもしくはアルギン酸ナトリウムのような天然および合成ゴム、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、ろうなどが挙げられる。こうした剤形に用いる滑沢剤としては、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。崩壊剤としては、でんぷん、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサンタン・ガムなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0089】

また、本発明の化合物は、小単層小胞、大単層小胞および多重層小胞などのリボソーム送達システムの形で投与することもできる。リボソームは、コレステロール、ステアリンアミンもしくはホスファチジルコリンを含有する種々のリン脂質から形成することができる。一部の実施形態として、米国特許第5,262,564号に記載されているようにして、脂質成分の膜を薬剤の水溶液で水和させて、薬剤を内包する脂質層を形成する。

【0090】

また、本発明の化合物は、標的を定めることができる薬物担体としての可溶性ポリマーとカップリングさせることもできる。このようなポリマーとしては、ポリビニルピロリド

10

20

30

40

50

ン、ピラン・コポリマー、ポリヒドロキシプロピル - メタクリルアミド - フェノール、ポリヒドロキシエチルアspanアミドフェノール (polyhydroxyaspanamidophenol)、もしくはパルミトイル残基で置換したポリエチレンオキシドポリリジンを挙げることができる。さらに、本発明の化合物は、薬剤の放出を制御するのに有用なクラスを生分解性ポリマー、例えば、ポリ乳酸、ポリ カプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルソエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレート、およびヒドロゲルの架橋もしくは両親媒性ブロックコポリマーとカップリングさせることができる。

【0091】

上記薬学的組成物はいずれも、活性化合物、特に有効成分としての式 I の化合物を 0 . 1 ~ 99 %、好ましくは 1 ~ 70 % 含有することができる。

【0092】

(その他の実施形態)

本発明の 1 つ以上の実施形態についてその詳細を前記の添付明細書において説明した。本発明の特定の実施形態についての前記詳細な説明から、生体膜を通過させて移行させるための独自の方法および組成物が開示されたことが明瞭に理解されよう。本明細書では特定の実施形態についてその詳細を説明したが、これは単に例示を目的として例として説明したものであり、以下に添付した特許請求の範囲に対して限定しているものではない。特に、この特許請求の範囲に定義したような本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明に対し、種々の置換、変更および変形を行うことができることは、本発明者により企図されている。例えば、特定のタイプの細胞、または移行させるべき特定のエフェクターの選択については、本明細書に開示した実施形態を知った当業者には日常的な事柄であると考えられる。

【0093】

本明細書および添付の特許請求の範囲では、文脈上明らかに別の意味に解すべき場合を除き、単数形は複数の対象を含む。特に定義しない限り、本明細書に用いている科学技術用語は全て、本発明が属する分野の当業者により一般に理解されている意味と同じ意味を有する。また、本明細書に引用されている全ての特許および刊行物は、引用により本明細書に組み込まれている。

【0094】

以下に示した実施例は、本発明の好ましい実施形態についてさらに十分に説明するためのものである。これらの実施例は、添付の特許請求の範囲により定義した本発明の範囲を限定するものと決して解釈されるべきではない。

【実施例】

【0095】

(実施例 1 : 内部移行ペプチドモチーフの特定)

ファージ・ペプチド・ライブラリは、古典的な方法では、線維状ファージ M13 の誘導体として構築される。ペプチド・ライブラリを、ペプチドモチーフの 1 ~ 5 個のコピーを提示するキャプシドのマイナーコートタンパク質 pIII に融合する。Zwick ら、Curr. Opin. Biotechnol. 9 : 427 - 436 (1998) を参照されたい。あるいは、メジャーコートタンパク質 pVI を用いることによって高価 (high valent) 提示が得られる。しかしながら、これらのタイプのライブラリは、受容体媒介性エンドサイトーシスの対象となるペプチド配列の単離のために最適化されていない。何故なら、ペプチドの 1 価もしくは低価提示は、線維状ファージのような巨大な構造体を効率的に取り込ませるには不十分であるからである。多価提示のみが効率的取り込みを可能にする。Ivanenkov ら、Biochem. Biophys. Acta 1448 : 450 - 462 (1999) を参照されたい。さらに、受容体結合リガンドの内部移行は、原形質膜の特定領域に細胞表面受容体が濃縮され、次いでクラスリン被覆小胞が形成される必要があり (Damke、FEBS Lett. 389 : 48 - 51 (1996) 参照)、従来の M13 ファージでは、こうした特殊で高度に効率的な構造によ

る受容体媒介性内部移行が行われるとは考えられない。

【0096】

T7 415 ファージ系および T7 413 b ファージ系のファージ・ディスプレイ・ライブラリを構築した。このファージでは、減少した容量内にこの提示ペプチドが 415 個のコピーとして生じる（キャプシドの直径は約 50 nm である）。従って、本発明に含まれるのは、以下の基準を満たす新規なファージ系のファージ・ディスプレイ・ライブラリである：4 ~ 50 mer ペプチドの多価提示（> 400 個のコピー / ファージ）；サイズが小さい（50 nm）；内部移行したファージを効率的に回収できる；内部移行しなかった結合ファージを除去できる；および個別ペプチド配列の数が大である（> 10^9 個のヘプタペプチド配列を示す 3×10^8 個の独立クローン）。

10

【0097】

このライブラリを用いて、TC-3 細胞モデル内への高分子の効率的、特異的な細胞内送達を誘導するペプチドモチーフの単離に成功した。さらに、このライブラリを 5 種の異なる（非-）細胞株に対して用い、それぞれの場合で、各細胞型に特異的なペプチドモチーフの濃縮（enrichment）について観察した。この方法の概括的な全体像を以下に説明する。

【0098】

（選択 / 濃縮（enrichment）方法）

多くのインスリン分泌細胞株、齧歯類およびヒト単離島、および FACS により精製した細胞に対するファージ・ディスプレイ・ライブラリをパニングし、最終的に、これを直接動物（マウス、ラット、ブタ）に注射した後、島を抽出して内部移行したファージを回収する。パニング方法は、ファージの添加、回収および増幅の少なくとも 3 サイクルからなる。あるいは、最も選択的なりガンドを単離するために、このライブラリを種々のインスリン非分泌細胞と共にインキュベートした後に細胞に対するライブラリを選択することにより、他の細胞型に結合するファージを除去する。記載されるように、クロロキンを用いてリソソームによる分解をブロックする実験を実施する。Ivanenkovら、Biochem. Biophys. Acta 1448: 450 (1999) を参照されたい。

20

【0099】

（ファージ特異性の測定）

選択したファージを単離し、多くの種々の細胞および器官と共にインキュベートする。例えば、一部の実験として、選択したファージをインスリン分泌およびインスリン非分泌細胞および器官とインキュベートする。取り込みについては、回収されたファージ数をカウントすることにより測定する。抗ファージ抗体を用いて免疫細胞化学的研究を実施する。

30

【0100】

（ファージ由来（phage-beard）ペプチドの特徴付け）

単離ファージからの DNA を配列決定し、発現されるペプチドを推定する。直接の内部移行を誘導するペプチド、およびこれらのペプチドの変異型を化学的に合成し、N 末端を FITC で標識し、もしくはヨウ素化する。標識ペプチドを種々の細胞型、齧歯類およびヒト単離島に加え、そして、マウスに直接注射する。取り込みの特異性、細胞内局在性、クリアランスおよび安定性について評価する。Widmannら、Biochem. J. 310: 203 (1995) を参照されたい。

40

【0101】

（生化学的アッセイ）

インスリン分泌細胞およびインスリン非分泌細胞を分析するため、特徴付けを行ったペプチドを 3 種の既知配列：YVAD（カスパーゼ阻害因子、配列番号 35；Rouquetら、Curr. Biol. 6: 1192 (1996)）、VQRKRQKLMP（NF-B 核内局在化阻害因子（Linら、J. Biol. Chem. 270: 14255 (1995)）、配列番号 36）もしくは RPKRPTTLNLFQVPRSQDT（JN

50

K阻害因子、Bonnyら、Diabetes 50:77-82(2000)、配列番号37)に結合させる。これらのペプチドは、化学的に合成し、インスリン分泌細胞およびインスリン非分泌細胞に加える。カスパーゼ、NF- κ BおよびJNKは、一般的活性化剤エトポシド(Kimら、Anticancer Res. 20:439(2000)参照)もしくはアニソマイシン(Usamiら、Biochem. Pharmacol. 55:185(1998)参照)により活性化する。上記ペプチドによるカスパーゼ、NF- κ BおよびJNKの阻害については細胞および非細胞を用いて検討する。以上の実験によって、これらのペプチド担体が薬剤となり得る物質を活性のある形態で特に細胞内に移送することができるかどうか分かる。

【0102】

(治療剤となり得る物質のGLP-1受容体による取り込み)

GLP-1受容体(GLP-1R)の発現は、主として脳および膵臓に限定されている。Yamatoら、Horm. Metab. Res. 29:56(1997)を参照されたい。この受容体は、アゴニストに結合した後、内部移行される。Widmannら、Biochem. J. 310:203(1995)を参照されたい。こうした性質があるため、GLP-1Rは膵細胞への治療剤の選択的送達を媒介する魅力的なツールとなる。この特性は、上に記載されるように評価される。GLP-1Rを用いて集められた情報が、例えば、高められた選択性を有する二重特異的ダイマーの設計において、補助する。

【0103】

(GLP-1受容体に対する他の内部移行モチーフの特定)

GLP-1Rを用いてトランスフェクションしたCOS-7細胞は、上記のような選択実験の基材(substrate)となる。新規に特定したモチーフについてその特異性およびエンドサイトーシス誘導能を評価する。

【0104】

(全-D-レトロ-インベルソ型(all-D-retro-inverso)ペプチドの作製)

一部の実施形態として、上記ペプチドはレトロ-インベルソ型ペプチドとして合成することができる。安定性が高く、免疫原性の少ない全D-レトロ-インベルソ型ペプチド(Sela, Zisman, FASEB J. 11:449(1997)参照)について、前述の方法により、分析する。

【0105】

進化によって、天然のタンパク質にはほぼL型アミノ酸のみが存在することになった。従って、事実上全てのタンパク質分解酵素は、隣接するL型アミノ酸間のペプチド結合を切断するので、D型アミノ酸からなる人工的なタンパク質もしくはペプチドは、タンパク質分解に対してかなり抵抗性である。この抵抗性は薬剤の設計者には魅力的であったが、L-アミノ酸からなるタンパク質の生体系が排他的であるため、このようなタンパク質は、鏡像異性タンパク質により形成される鏡像面と相互作用することができないということになる。従って、通常、全D(all-D)型アミノ酸タンパク質には生物効果もしくは活性がない。

【0106】

線状の修飾レトロ-ペプチド構造については長い間研究されてきており(Goodmanら、Accounts of Chemical Research, 12:1-7(1979)参照)、「レトロ-アイソマー」という用語は、親ペプチドに対して配列の方向が逆であるアイソマーを含むとされた。「レトロ-インベルソ・アイソマー」とは、配列の方向が逆で、各アミノ酸残基の対掌性が逆であり、従って末端基相補性が生じ得ない線状ペプチドのアイソマーのことを意味する。

【0107】

さらに最近、Jamesonらは、これら2つの性質、即ち、逆合成および対掌性の変化を組み合わせることにより、CD4受容体のヘアピンループのアナログを設計した。Jamesonら、Nature 368:744-746(1994)およびBrady

10

20

30

40

50

ら、Nature, 368:692-693(1994)を参照されたい。D-鏡像異性体と逆合成を組み合わせたことによる最終的な結果は、各アミド結合のカルボニル基とアミノ基とが交換されるが、各炭素の側鎖基の位置は保存されたことである。Jamesonらは、従来の全-L鏡像異性体の限定的なインビボ活性(タンパク質分解を受けやすいことに起因する)とは対照的に、逆Dペプチドの生物活性が増大することを明らかにした。

【0108】

ヒト・クラスI組織適合性分子HLA-A2の非天然リガンドとして使用することができる部分修飾したレトロ-インベルソ偽ペプチドが報告されている。Guichardら、Med.Chem.39:2030-2039(1996)を参照されたい。このような非天然リガンドでは、安定性およびMHC結合能が増大した。

10

【0109】

レトロ-インベルソ・ペプチドを、以下のようにして配列が既知のペプチドに対して作製する。レトロ-インベルソ・ペプチドアナログをデザインし、合成するためのモデル・ペプチドとして、既知の配列を有するペプチド(例えば、腫瘍抗原ペプチド)を選択する。このアナログは、D-アミノ酸を用い、このレトロ-インベルソ・ペプチド内のアミノ酸の配列がモデルとして働く選択したペプチド内の配列と正確に逆になるように、D-アミノ酸を結合させてペプチド鎖とすることにより合成する。例えば、このペプチド・モデルがABCの配列を有するL-アミノ酸で形成されているペプチドである場合、D-アミノ酸で形成されるそのレトロ-インベルソ・ペプチドアナログはCBAの配列を有することになる。D-アミノ酸の鎖を合成してレトロ-インベルソ・ペプチドを作製する方法は、当該分野で公知であり、前記文献において説明されている。

20

【0110】

天然ペプチドの場合の固有の問題が天然のタンパク質分解酵素により分解されることにあるので、本発明のペプチドは、目的ペプチドの「レトロ-インベルソ・アイソマー」を含むように作製することができる。従って、天然性のタンパク質分解からペプチドを保護することにより、この特定のヘテロ2価(heterobivalent)もしくはヘテロ多価(heteromultivalent)化合物の有効性は増大するはずである。

【0111】

レトロ-インベルソを含むペプチドでは、天然のタンパク質分解酵素による分解から保護されるため、レトロ-インベルソを含まないアナログと比べて、生物活性が増大すると予測される。

30

【0112】

(修飾ペプチドの作製)

一部の実施形態として、このペプチドは、修飾ペプチドとして合成することができる。この修飾ペプチドは前述の方法により分析する。

【0113】

アナログは、アミノ酸配列により、またはアミノ酸配列に影響を与えない修飾により、あるいはこれらの両者により天然のペプチドと異なるものとすることができる。好ましいアナログとしては、その配列が、単に保存的アミノ酸置換、好ましくは1、2もしくは3置換のみ、例えば、1つのアミノ酸の同様な特徴を有する別のアミノ酸による置換(例えば、グリシンをバリンに、リジンをアルギニンに置換など)によって、またはペプチドの生物活性を消失させない1つ以上の非保存的アミノ酸置換、欠失もしくは挿入によって、その野性型配列(すなわち、天然に生じるペプチドの相同な部分の配列)と異なるペプチドが挙げられる。

40

【0114】

(普通一次配列に影響を与えない)修飾としては、インビボもしくはインビトロにおけるペプチドの化学的誘導体化、例えば、アセチル化もしくはカルボキシル化が挙げられる。また、糖鎖形成の修飾、例えば、ペプチドの合成およびプロセッシング過程において、または、例えば、糖鎖形成に影響を与える酵素、例えば、哺乳類のグリコシル化もしくは

50

脱グリコシル化酵素をペプチドに作用させることによる別のプロセッシング工程において、ペプチドの糖鎖形成パターンを修飾することによるものも挙げることができる。また、リン酸化されたアミノ酸残基、例えば、ホスホチロシン、ホスホセリンもしくはホスホスレオニンを有する配列を挙げることでもある。

【0115】

本発明は、1つ以上のペプチド結合が、ペプチダーゼにより切断されにくい別のタイプの共有結合（「類似ペプチド結合」）に置換されたアナログを含む。対象に注射後のペプチドの蛋白性分解が問題となる場合、特定の切断されやすいペプチド結合を切断不能の類似ペプチド結合に置換すると、得られるペプチドは安定性が増し、治療剤としてより有用なものとなる。このような類似ペプチド結合およびこれをペプチドに組み込む方法は、当該分野では周知である。また、*t*-ブチルオキシカルボニル、アセチル、テイル（*the y l*）、スクシニル、メトキシスクシニル、スベリル、アジピル、アゼライル、ダンシル、ベンジルオキシカルボニル、フルオレニルメトキシカルボニル、メトキシアゼライル、メトキシアジピル、メトキシスベリル、および2, 4-ジニトロフェニルなどのアミノ末端ブロック基も有用である。ペプチドの荷電アミノ-末端およびカルボキシ-末端をブロックすると、ペプチドが疎水性細胞膜を通過して細胞内へ入るのが促進されるという別のメリットがある。

【0116】

（多量体ペプチドの作製）

多量体リガンドでは、内部移行速度の増大につながる最大数桁の結合力の向上がみられる。Terskikhら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94: 1663 (1997) およびYorkら、J. Biol. Chem. 274: 1164 (1999) を参照されたい。単一特異性ダイマーは、強い結合力を示し、二重特異性ダイマーでは、特異的に細胞を標的にする物質としての実用面の潜在能力を向上させることができる選択性が高まると考えられる。Caruthers and Lerner, Chem. Biol. 3: 537 (1996) を参照されたい。単量体および多量体ペプチド（単一および多重特異性）は、ペプチドとして、あるいは例えば、柔軟性のあるペプチジルまたは糖ベースの主鎖を有するペプチド類似体として合成することができる。Caruthers and Lerner, Chem. Biol. 3: 537 (1996)、Zengら、J. Pept. Sci. 2: 66 (1996) およびUlbrichら、J. Controlled Release 64. (1. - 3.) : 63 - 79.、64: 63 (2000) を参照されたい。

【0117】

（細胞内局在性）

単離した種々のペプチド配列は、種々の細胞コンパートメント（例えば、核、ミトコンドリア、細胞質ゾルなど）に局在し得る。これについては、標識（例えば、ヨウ素化もしくはFITC標識）ペプチドを用いて調べる。この局在性情報を利用して機能性研究をデザインする。例えば、細胞質ゾル内に蓄積するペプチドは、NF- κ Bの核移行を阻害するのに好ましく、核内に移行するペプチドは、JNKを阻害するのに最も適している。一部の実施形態として、核局在化モチーフのような配列を結合体に加えて、担体を適切な細胞コンパートメントへ再誘導することができる。

【0118】

（機能性研究）

カスパーゼ、NF- κ BもしくはJNK阻害剤に結合させた、細胞を標的とするトランスポーターペプチド（例えば、単量体もしくは多量体のL型もしくはD型エナンチオマー）を細胞株、FACS精製細胞ならびに単離ヒトおよび齧歯類の島（*islet*）に加える。IL- γ （TNF およびIFN を併用）によりアポトーシスを誘発させ、アポトーシスに対する抵抗性を調べる。

【0119】

（インビボ糖尿病実験）

糖尿病発症前および発症後の状態のNODマウスにエフェクタ・ペプチド（カスパーゼ、NF- κ BもしくはJNK阻害剤に結合させた細胞を標的とするペプチド）を注射する。用量および注射頻度は、前述のようにして決定する。次いで、糖尿病の発生を測定する。

【0120】

（免疫原性に関するアッセイ）

齧歯類およびウサギを用い、ペプチドの免疫原性の潜在性について評価する。

【0121】

（クローニング）

特定の細胞による効率的な内部移行を誘導するペプチドモチーフについては実施例II IおよびIVにおいて説明する。このペプチドを用いて、確立された手順により、例えば、INS-1、TC-3およびヒト島cDNAライブラリからの同族（cognate）受容体のクローニングならびに特徴付けを行う。Thorens、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 8641 (1992) およびVolzら、FEES Lett. 373: 23 (1995) を参照されたい。

【0122】

（特徴付け）

上記のクローニングした受容体の組織分布について、インスリン分泌およびインスリン非分泌細胞および器官のノーザンブロッティングおよびウェスタンブロッティングにより調べる。結合速度、クリアランスおよび内部移行の特異性についてはCOS-7細胞にこの受容体を一時的にトランスフェクションさせることにより調べる。対照ペプチドは、変異配列、および例えば、GLP-1、GIP、グルカゴン、セクレチンなどの既知ペプチドとする。これらの受容体に対する別の内部移行モチーフについては上記のトランスフェクションしたCOS-7細胞において前記ライブラリをパニングすることにより特徴付ける。

【0123】

（実施例II：トランスポーターペプチドのスクリーニング方法）

特に指定した場合を除き、溶媒および試薬は全てフルカ社（Fluka）、ブックス（Buchs）、スイスから入手し、分析品質以上のものとし、さらに精製することなく使用した。アミノ酸は全てペプチド・インスティテュート社（Peptide Institute Inc.）（日本）から購入した。樹脂はアプライド・バイオシステムズ社（Applied Biosystems）、米国；ノババイオケム社（Novabiochem）、スイスもしくはバッヘム社（Bachem）、スイスから入手した。水は、Milli-Qシステム（ミリポア社（Millipore, Inc.））を用いて再精製した。バイオアッセイにはインスリン分泌細胞株TC-3を用いた。Efratら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9037-9041を参照されたい。

【0124】

（ファージの調製および濃縮（enrichment）方法）

標準的な手順により（例えば、ノバジェン社（Novagen）のT7 414ファージもしくはT7 413bファージを用い）、キャプシドの表面にランダムな15マーエピトープを提示する 3×10^8 個の単独（independent）ファージのライブラリを作製した。SmithおよびScott, Methods Enzymol. 217: 228 (1993) を参照されたい。（Smith、Scottの上記文献に）記載されるように、ファージを増幅させた後、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法により精製し、最終的に、Tris-EDTA緩衝液（10:1mM、TE）中に 10^{10} 個感染性粒子/ μ lの濃度で再懸濁した。培養培地中の細胞にファージ（ 10^{12} 個）を1~24時間加えておいた。エンドサイトーシス小胞内でタンパク質分解を免れたファージの単離を容易にするには、インキュベーション時間をさらに長くすることが好ましかった。結合および内部移行を行わせた後、細胞を洗浄し、内部移行されなかったファージを、サブチリシン（3mg/ml）（44）で消化させて破壊した。十分に洗った後、2%デオ

10

20

30

40

50

キシコール酸塩、10 mM Tris-HCl および 2 mM EDTA を含有する pH 8.0 の緩衝液で細胞を溶解させることにより、内部移行されたファージを回収した。回収したファージは、最終的に E. coli 細胞 (XL-1-Blue) を用いて増幅させ、前述のようにして精製した。次いで、この選択したファージの調製物を用いて第 2 ラウンドのパニングを行った。3 ~ 5 ラウンドを順次実施することにより特定のファージ保有ペプチド配列を濃縮した。

【0125】

(免疫細胞化学および蛍光による検討)

上記の濃縮スキームによって単離した単一ファージを増幅させた後、培養培地中の細胞に 24 時間加えておいた。次いで、培地を洗い流し、細胞を冷メタノール-アセトン (1 : 1) で 5 分間固定した。ファージ・キャプシドに対する抗体は、蛍光結合二次抗体と共に用いた。古典的な蛍光顕微鏡による検討および共焦点顕微鏡によるアッセイを実施した。組織は、処理の前にパラフィン包埋した。

10

【0126】

(ペプチド)

C-末端アミド基を有し、必要に応じて FITC 標識もしくはヨウ素化したペプチドを、古典的な Fmoc 化学 (オースペップ社 (Auspep)、オーストラリア) を用いて合成した。ペプチドは全て HPLC により精製し、質量分析法によって分析した。

【0127】

(生化学的検討)

種々の細胞株、例えば TC-3、INS-1、HeLa、WiDr、HepG2、NIH3T3、COS-7 などにおいて、ペプチド添加の 1 時間後から JNK、NF- κ B およびカスパーゼをエトポシド (VP-16, Alexis) により 1 時間賦活化する。細胞抽出物を処理して (c-Jun を基質として用いる固相 JNK アッセイ (Bonny ら、J. Biol. Chem. 275 : 16466 (2000) 参照) により) JNK 活性、(電気泳動移動度シフトアッセイ (Lin ら、J. Biol. Chem. 270 : 14255 (1995) 参照) により) NF- κ B の核移行および (アップステート・バイオケミカルズ社 (Upstate Biotechnicals) から市販のキットおよび抗体により) カスパーゼ活性を測定する。

20

【0128】

(アポトーシスの測定)

アポトーシスは、以前に報告された方法に従い、Hoechst 33342 およびヨウ化プロビジウムの組合せを用いて測定する。Bonny ら、J. Biol. Chem. 275 : 16466 (2000)、Hoorens ら、J. Clin. Invest. 98 : 1568 (1996) を参照されたい。

30

【0129】

(島)

島は、Gotoh らの方法 (Gotoh ら、Transplantation 43 : 725 (1987) 参照) により単離する。ヒト島は、例えば、「Insel Spital」、ベルン (Bern)、スイスから入手することができる。

40

【0130】

(マウス)

正確な投与量および注射の時間枠は、各ペプチドごとに最適化する。しかしながら、JNKI を用いたこれまでの経験から、ペプチドの 1 mM PBS 溶液 100 μ l を 2 日おきに注射するのが合理的な出発点であることが分かっている。

【0131】

(ZAP 発現ライブラリ)

ZAP 発現原核/真核発現ベクター中の INS-1 cDNA ライブラリを用いて IB1 cDNA および IB2 cDNA をクローン化した。Bonny ら、J. Biol. Chem. 273 : 1843 (1998) および Negri ら、Genomics 6

50

4 : 3 2 4 (2 0 0 0) 参照。このライブラリは、真核 C M V プロモータの制御下で、単純なヘルパー・ファージ切り出し (e x c i s i o n) (ストラタジーン社 (S t r a t a g e n e)) によって容易にプラスミド・ライブラリに変換される。

【 0 1 3 2 】

(実施例 I I I : ファージ・ディスプレイ・ライブラリのパニングおよび内部移行されたペプチドモチーフの特徴付け)

細胞を特異的に標的にして薬剤を送達させることができれば、I 型糖尿病の治療に極めて大きな影響を与えることになる。基本的に 細胞の機能 (すなわち、インスリン分泌) を変えない 細胞破壊のプロッカーはすでに存在する (例えば、J B D、b e l - 2)。こうした分子の 1 つ (J B D) を低分子ペプチドに変換しても全生物活性を保持させることができることが示されている。

10

【 0 1 3 3 】

腓 細胞株 T C - 3 は、本明細書に記載したファージ・ディスプレイ・ライブラリを用いてパニングした。下記の表 1 に示すように、選択の各サイクルにおいて、回収ファージ数の選択的な濃縮が認められた。T C - 3 細胞を用いるパニング実験を、濃縮手順の各工程で 10^9 個のファージを用いて実施した。0 (エンドサイトーシスはみられない) で回収されたファージ数は 1 0 0 個未満であり、このことから、本明細書に記載した条件下では、内部移行されなかった細胞外の結合ファージのバックグラウンドは極めて低いことが分かる。

【 0 1 3 4 】

20

【 表 1 】

表 1.

パニング	回収ファージ
1回目	$<1 \times 10^3$
2回目	2×10^5
3回目	3×10^8

【 0 1 3 5 】

T C - 3 細胞株における 3 工程のパニング後のファージ回収率を表 2 に示す。

【 0 1 3 6 】

30

【 表 2 】

表 2.

P1	61%
P6	17%
P8	5.5%
P10	5.5%
P65	5.5%
P66	5.5%

【 0 1 3 7 】

40

表 3 に示した時間 T C - 3 細胞とインキュベートしたファージ P 1 (配列番号 1) を用い、滴定実験を実施した。また、投入 / 回収ファージの比率も示す。滴定実験から、最初の投入 P 1 ファージの 1 0 % も回収することができることが分かった。

【 0 1 3 8 】

【表 3】

表 3.

ファージ	インキュベーション	回収%
P1	1時間	0.01
	5時間	1
	17時間	10

【0139】

取り込みの特異性についての測定は、5種の細胞株における回収ファージ数をタイトレーションすることにより行った。ファージ (10^8 個) を、示した細胞株と16時間インキュベートした後、表4に示したように、内部移行されたファージ数および回収されたファージ数を算定した。インテグリン内部移行モチーフを提示する対照ファージは、全ての細胞株に対して同様な回収ファージ数 ($1 \sim 3 \times 10^6$ 個) を示した。このことから、P1 (配列番号1、表5参照) は、TC-3細胞によって、テストした他のどの細胞株より10,000~1,000,000倍効率的に内部移行されることが分かる。

10

【0140】

【表 4】

表 4.

細胞	回収ファージ
βTC-3	1×10^7
HeLa	$< 1 \times 10^2$
WiDr	2×10^2
HepG2	< 10
A549	10^3

20

【0141】

次いで、ファージP1の提示ペプチドの配列に基づいてペプチドを合成した。FITCで標識した10アミノ酸ランダム配列にP1 5マーペプチドの配列を結合させた。対照配列は、P1 5マー配列を (Ala)₅ で置き換えた以外は同一であった。細胞にペプチド ($10 \mu\text{M}$) を1時間加え、細胞を洗い、冷メタノール-アセトン (1:1) で固定した。TC-3細胞内のFITC標識P1ペプチドは可視化することができたが、他の細胞型ではできなかった。

30

【0142】

最後のサイクルの濃縮 (enrichment) 時の20個の回収ファージの配列解析結果を表5に示す。重要なことであるが、全ての配列は、5個のアミノ酸の同じ保存コンセンサス配列に厳密に従った。このことから、ファージの効率的な取り込みを誘導する保存モチーフが特異的に選択/濃縮されることが示唆される。こうして得られたペプチドモチーフの大部分は、プロタンパク質転換酵素のコンセンサスな R-X-X-R に従う。この知見は、潜在的薬物および高分子を特定の細胞型の細胞内に送達するためのビヒクルとしてプロタンパク質転換酵素を使用する提案の根拠を成すものである。

40

【0143】

【表 5 - 1】

表 5.

	細胞型	配列 ID	配列	配列番号
1.	膵β細胞	P1	RRTK	1
2.		P6	RKLR	2
3.		P66	RRPK	3
4.		I2	PTAKPTYTK	4
5.		I6	IQGNRQVGCLTNK	5
6.		I10	MRGLSKRG	6
7.	肝細胞	H2	RQFRK	7
8.		H4	RRIRG	8
9.		H6	NRRRGIN	9
10.		H16	KGKW	10
11.	結腸癌	WP2	RGNRGAR	11
12.	筋肉	M1	RRPR	12
13.		M2	GRRKG	13
14.		M3	ERRK	14
15.		M4	SGGRKQR	15
16.		M6	RSKR	16
17.		M7	RRSGR	17
18.		M9	KQRR	18
19.		M11	GKRAR	19

【 0 1 4 4 】

【表 5 - 2】

20.		M13	TGKRMTR	20
21.	肺	A2	KRGR	21
22.		A3	SLRRR	22
23.		A8	PSLRRPR	23
24.		A10	YKRGR	24
25.		A16	GMGRKPR	25
26.		T1	RRRVG	26
27.		T2	RSFGVKKYG	27
28.		T3	KSLRSFK	28
29.		T5	RVRR	29
30.		T7	PRSR	30
31.		T8	MRRR	31
32.		T10	YGGKRTLAMSK	32
33.		T11	GRRSR	33
34.		T13	YPLPNMK	34

【 0 1 4 5 】

(実施例Ⅳ：多量体結合体)

ファージ・ライブラリから得られるリガンド・ペプチドは低親和性(マイクロモル程度)とすることができる。その結合親和性もしくは結合力は、ペプチド分子のコピーを多量体化することにより、例えば、ペプタボディ(peptabody)を形成させることにより向上させることができる。ScottおよびSmith, Science 249: 386-90(1990)、Renschlerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3623-3627(1994)、およびAlexeyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1663-1668(1997)を参照されたい。ファージを用いた実験から、ファージ・ペプチドRRTK(配列番号1、上記参照)は受容体媒介性エンドサイトーシスを介してTC-3細胞により特異的に取り

込まれるが、その内部移行効率は低い（これはその低親和性結合（ほぼマイクロモルの程度）に起因し得る）ことが分かった。レポーター・タグ（F I T Cまたはビオチン）と共にこのペプチドの複数（4もしくは8個）のコピーを有する一連の多量体（図1および2）を構築した。

【0146】

本発明の多量体トランスポーターペプチドは、式I：

$[P]_v - [\text{スペーサー}]_x - \text{コア} - [\text{リンカー}]_y - [\text{レポーター}]_z$ (I)
 によって表すことができ、式中、Pは前述のコンセンサスモチーフ（ $X_m R X_n$ ）、 $(X_m R R R X_n)$ 、 $(X_m R R X R X_n)$ および $(X_m R X R R X_n)$ のトランスポーターペプチドである。例えば、このペプチドは、配列 $X_1 - X_2 - X_3 - X_4$ を含むことができ、式中、 X_1 および X_4 はRもしくはKとすることができ、 X_1 および X_4 は任意のアミノ酸とすることができる。vによって表される所与のトランスポーターペプチド内のペプチド数は、2～8以上の整数とする。任意の所与の多量体トランスポーターペプチドにおいて、それぞれのペプチドは互いに同じか、異なるものとすることができる。好ましいペプチドとしては、例えば、表5に挙げたものがある。

【0147】

ペプチドとコアとの間のスペーサーは存在していてもしていなくてもよく、従って、xは1または0である。好ましいスペーサーは可動性、両親媒性、非免疫原性、およびタンパク質分解酵素に対し非感受性であり、例えば、スクシンイミジル-PEG(succinyl-PEG)などのポリエチレングリコール(PEG)が挙げられる。

【0148】

企図されるコア部分としては、表7に記載したポリリジン(K)コアが挙げられ、また、組み込まれたリンカーを有するものも挙げられる。選択されるコアにより、所与の結合体内に存在するペプチドの数が決まる。代表的なコアとしては、 $C_4 - K_2 K - K(succinyl-PEG-S) - \text{アミド}$ 、 $C - GGG - [K(C)]_3 - K(succinyl-PEG-S) - \text{アミド}$ 、 $(NH_2 OCH_2 CO)_4 - K_2 K - K(succinyl-PEG) - \text{アミド}$ および $(NH_2 OCH_2 CO)_8 - K_4 K_2 K - K(GGG) - \text{アミド}$ が挙げられる。リンカーおよびレポーター基は存在していてもしていなくてもよく、従って、yおよびzは、式Iにおいて独立に1もしくは0である。

【0149】

リンカーは存在していてもしていなくてもよい（即ち、yは1もしくは0である）。リンカーとしては、コアをレポーターに接続する部分が挙げられ、例えば、succinyl-PEGもしくは $NH_2 OCH_2 CO - Lys$ とすることができる。

【0150】

レポーター基は存在していてもしていなくてもよい（zは1もしくは0である）。レポーター基は検出可能な任意の基である。例としては、放射性同位体、蛍光性部分、リン光性部分、化学発光性部分、および量子ドットが挙げられるが、これらに限定されるものではない。その他のレポーター基としては、ビオチン、シンテイン、ヒスチジン、赤血球凝集素、mycもしくはフラッグ・タグが挙げられる。本明細書において用いる代表的な蛍光レポーター基はF I T C（フルオレセインイソチオシアネート）である。

【0151】

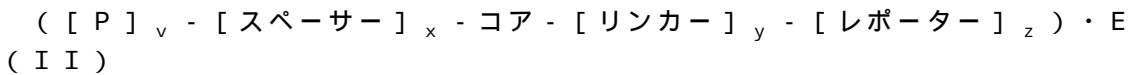
代表的な多量体トランスポーターペプチドは図1および図2に示した。

【0152】

多量体トランスポーターペプチド・ユニットもしくは結合体においては、多量体トランスポーターペプチドを、1つ以上のエフェクターと融合させる。このエフェクターは、DNA、RNA、タンパク質、ペプチド、または薬学的に活性な薬剤、例えば、毒素、抗生物質、抗病原体剤(antipathogenic agent)、抗原、抗体、抗体断片、免疫調節剤、酵素もしくは治療剤などを含む任意の適切な分子とすることができる。2つ以上のエフェクターが存在する場合、これらのエフェクターは同一もしくは異なるものとすることができる。

【0153】

従って、本発明の多量体結合体は、式(II)：



によって表すことができ、式中、P、コア、スペーサー、リンカー、レポーター、v、x、yおよびzは前記の通りであり、Eはエフェクターである。共有結合により融合させた結合体では、化学結合の法則通りに、エフェクターはコア、もしくはリンカー、またはこれらの両方に結合させることができる。

【0154】

(ペプチド合成)

ペプチド配列RRTK(P1、配列番号1)を、膵細胞に結合させるためのペプチドコンセンサスモチーフ $X_1 - X_2 - X_3 - X_4$ (ここで、 X_1 および X_4 はRもしくはKとすることができ、 X_1 および X_4 は任意のアミノ酸とすることができる)を明らかにするファージ・ディスプレイ実験から得た。表6に示されるように修飾したペプチドを、Boc化学により0.5mmolのBoc-Lys(CIz)-PAM樹脂を用いて手動で合成した。イタリック体は、対応するタンパク質配列には存在しないリンカー残基およびスペースを示す。この実験に用いたいくつかのコア構造を表7に示す。合成を、Boc化学により0.5mmolのメチルベンズヒドリルアミン樹脂(MBHA樹脂)を用いて行った。

【0155】

ペプチドは全て、(5%のp-クレゾールの存在下に0で1時間)HFを作用させて樹脂から切断し、冷エーテルで沈殿させ、50%アセトニトリルで抽出し、ろ過して凍結乾燥した。粗製ペプチドを分取HPLCにより精製し、ESIMSにより特性を決定した。

【0156】

【表6】

表 6: RRTK (配列番号1) から修飾した合成ペプチドの配列	
ペプチド1	<i>BrCH₂CO</i> -RRTK-OH
ペプチド2	<i>BrCH₂CO</i> -(<i>peg-succ</i>) ₂ -RRTK-OH
ペプチド3	<i>H-S</i> -(<i>pog-succ</i>) ₂ -RRTK-OH (L型)
ペプチド4	<i>H-S</i> -(<i>pog-succ</i>) ₂ -RRTK-OH (D型)

【0157】

【表7】

表 7: 使用したコア構造	
コア1	C ₄ -K ₂ K-K(<i>succ-peg-S</i>)-アミド
コア2	C-GGG-[K(C)] ₃ -K(<i>succ-peg-S</i>)-アミド
コア3	(NH ₂ OCH ₂ CO) ₄ -K ₂ K-K(<i>succ-peg</i> -ビオチン)-アミド
コア4	(NH ₂ OCH ₂ CO) ₈ -K ₄ K ₂ K-K(GGG-ビオチン)-アミド

【0158】

(フルオレセイン・リンカーの調製)

フルオレセイン・リンカーNH₂OCH₂CO-Lys(FITC)-OHを、オフワード(Offord)の方法により調製した。Offordら、Methods Enzymol. 287: 348-69 (1997)を参照されたい。簡単に言えば、2mmolのBoc-アミノオキシアセチル(Boc-AOA-OSu)および1.2mmolの

10

20

30

40

50

N - (T F A) - L y s を 3 m l の D M S O (ジメチルスルホキシド) 溶液に加え、N - エチルモルホリンを pH 値が 8 ~ 9 となるまで加えた。室温で 15 時間、次いで 37 で 1 時間インキュベートした後、絶えず攪拌しながら氷酢酸を注意深く加えることによって pH 値を 3 . 0 に下げた。生成物 [B o c - A O A - L y s (T F A) - O H] を、分取スケールの H P L C により単離し、次いで乾燥した。この乾燥した化合物に 4 m l の水、次いで 0 . 44 m l のピペリジン (最終濃度 1 M) を加え、これを室温で 4 時間インキュベートした後、氷上で pH を 3 . 0 に調整した。次に、この混合物を 0 . 1 % の T F A 10 m l で希釈した。分取 H P L C により脱保護物質 (B o c - A O A - L y s - O H) を単離し、再度乾燥した。この乾燥物質を 300 μ l の N , N - ジメチルホルムアミド (D M F) に溶かし、40 m g のフルオレセインイソチオシアネート (F I T C) を加え、得られた混合物を N - エチルモルホリンで pH 8 . 0 に調整した。暗所で 15 時間インキュベートした後、生成物を、メタノール / C H ₃ C l (1 : 1、v / v) で平衡させたシリカ・カラム [K i e s e l g e l 60 (フルカ・ケミー社 (F l u k a C h e m i e)、ブックス (B u c h s)、スイス)、1.5 x 20 c m] を用いたクロマトグラフィーにより精製した。過剰の F I T C を貫流 (f l o w - t h r o u g h) 画分に溶出させ、予測される生成物を含む第二の黄色画分をメタノール / C H ₃ C l (4 : 1、v / v) で溶出させた。回転式蒸発により溶媒を除去した後、この乾燥化合物 B o c - A O A - L y s (F I T C) - O H を (20 m g / m l 以下の濃度の) T F A 中で脱保護し、室温で 45 分間置いておいた。次に、T F A の大部分を蒸発させ、凍結乾燥により乾燥を完了させた。最終生成物 [A O A - L y s (F I T C) - O H] は、分取 H P L C により単離し、E S I - M S により特性を決定した。

【 0 1 5 9 】

(コアへのペプチドリガンドのアルキル化)

0 . 9 μ m o l の C y s - コア・ペプチド (1 . 19 m g) を 50 μ l のアセトニトリルおよび 100 μ l の水に溶かした (ペプチドは完全には溶けない)。プロモアセチル・ペプチドの新鮮溶液 (pH 7 . 0 の 0 . 1 M リン酸ナトリウム緩衝液の 3 . 6 μ m o l 溶液) を調製した。次いで、2 つの溶液を室温の暗所で混合することによりアルキル化を開始させた。40 分後に生成物を半分取 R P - H P L C により精製し、凍結乾燥し、そして特性を決定した。

【 0 1 6 0 】

(過ヨウ素酸酸化)

過ヨウ素酸酸化を行うため、0 . 375 μ m o l のペプチド (表 6 のペプチド 3 もしくは 4、または表 8 に挙げたアルキル化ペプチド) を 433 μ l アセトニトリルおよび 1 . 26 m l イミダゾール緩衝液 (50 m M、p H 6 . 95、塩化物対イオン) に溶かした。メチオニン (113 μ l、200 m M) を加えた。次に、17 μ l の N a O ₄ (0 . 1 M 水溶液) を加えて酸化を開始させた。5 分後、40 μ l のエチレングリコール (500 m M 水溶液) を加えることにより反応を停止させた。得られた生成物は分取 H P L C により精製し、質量分析法により特性を決定した。

【 0 1 6 1 】

【 表 8 】

表 8: アルキル化ペプチド*	
1	H-S-(peg-succ) ₂ -RRTK-OH
2	H-S-(peg-succ) ₂ -RRTK-OH (D 型)
3	[HO-KTRR-COCH ₂ -S-C] ₄ -K ₂ K(succ-peg-S)-アミド
4	[HO-KTRR-(succ-peg) ₂ -COCH ₂ -S-C] ₄ -K ₂ K(succ-peg-S)-アミド
5	HO-KTRR-COCH ₂ -S-C-G3-[K(C-S-CH ₂ CO-RRTK-OH)] ₃ -K(succ-peg-S)-アミド

*太字はアミノ酸残基を示す。

【 0 1 6 2 】

(オキシム化)

次に、過ヨウ素酸酸化により得られたアルデヒドをコア 3 もしくは 4 (各コアに A O A 基を含む)、または A O A - L y s (F I T C) - O H と反応させてオキシムを形成した。図 1 および 2 に示したオキシム 1 ~ 6 をこうして作製した。また、表 9 に予測および実測質量分析データを示した。図 1 に示されるように、オキシム 1 ~ 3 については、コアの分枝 L y s 残基を、アミノ基とアミノ基との両方において、スパーサーありまたはなしで、R R T K (配列番号 1) ペプチドの N 末端でアシル化した。スパーサーと共に、レポータ・タグ F I T C を各構築体のコアに導入した。図 2 のオキシム 4 ~ 6 では、コアの分枝 L y s 残基を、アミノ基とアミノ基との両方において、スパーサーとともに R R T K (配列番号 1) ペプチドの N 末端でアシル化した。スパーサーと共に、レポータ・タグのピオチンを各構築体のコアに導入した。

【 0 1 6 3 】

【表 9】

表 9 オキシム

オキシム	予測質量 分析値	実測質量 分析値
オキシム 1	4289.04	4289.31
オキシム 2	4460.18	4459.48
オキシム 3	6708.00	6708.29
オキシム 4	6160.3	6160.0
オキシム 5	6160.3	6158.6
オキシム 6	11643.6	11646.1

【 0 1 6 4 】

A O A L y s (F I T C) - O H でオキシム化するために、0 . 1 2 9 μ m o l の酸化構築物を 5 μ l のアセトニトリルおよび 2 0 0 μ l の N a O A c 緩衝液 (酢酸 0 . 5 7 m l および水 1 0 0 m l の混合物と、酢酸ナトリウム 0 . 8 2 g を水 1 0 0 m l に溶かした溶液とを p H 4 . 0 となるように混合した溶液) に溶解させた。この混合物に 0 . 5 1 6 μ m o l の A O A - L y s (F I T C) - O H (1 0 0 μ l のアセトニトリルおよび 1 0 0 μ l の N a O A c 緩衝液に 8 . 8 m g / m l の濃度で溶かしたもの) を加えた後、酢酸を最終濃度が 4 % となるよう加えた。コア 3 もしくは 4 をオキシム化するために、酸化したペプチド 3 もしくは 4 の 3 . 8 μ m o l を 1 0 0 μ l のアセトニトリルおよび 2 0 0 μ l の N a O A c 緩衝液に溶解させた。この溶液に 0 . 4 7 5 μ m o l のコア 3 もしくは 0 . 2 3 7 μ m o l のコア 4 を加えた後、酢酸を最終濃度が 4 % となるよう加えた。室温で 2 4 時間反応させた後、生成物を半分取 R P - H P L C で精製し、質量分析により特性を決定した。

【 0 1 6 5 】

4 本の分枝のそれぞれの末端に R R T K (配列番号 1) ペプチド (ペプチド 1) のコピーを有する円形のトリリジン・コア (コア 1) にオキシム 1 (図 1) を形成させた。各ペプチドの N 末端を、プロモアセチル基とチオール基との特異的な反応により生じるチオエーテル結合を介して結合させた。また、このトリリジン・コアにはスクシンイミジル - P E G スパーサー、および酸化を受けてアルデヒドを形成することができるセリンを含ませたので、レポーター基アミノオキシアセチル - L y s (F I T C) を、オキシム形成を介してこのテトラマーに導入した。H P L C および E S I - M S 分析により、目的生成物であることが示された：質量分析データ：M r 実測値 4 2 8 9 . 3 1、M r 理論値 4 2 8 9 . 0 4。オキシム 1 は酸性および中性 p H で 2 4 時間安定であった。

【0166】

オキシム2および3(図1)を、同様に形成したが、オキシム3ではRRTKペプチド(配列番号1)とコアとの間に2ユニットのPEGスペーサーを配置し、オキシム2ではRRTKペプチド(配列番号1)のN末端はコア1ではなくコア2と結合させた。質量分析データ: オキシム2: Mr実測値4459.48、Mr理論値4460.19; オキシム3: Mr実測値6708.29、Mr理論値6708.00。

【0167】

オキシム4(図2)を、オキシム3と同様に合成したが、FITC基をレポーターとするのではなく、ビオチン基をトリリジン・コアのアミド結合を介して直接結合させた。質量分析データ: Mr実測値6160.0、Mr理論値6160.3。オキシム5はオキシム4と同様であったが、RRTK(配列番号1)残基は全てD型であった。質量分析データ: Mr実測値6158.6、Mr理論値6160.3。

【0168】

オキシム6を、オキシム4と同様に合成したが、RRTK(配列番号1)ペプチドのコピーを4個ではなく、8個含む。質量分析データ: Mr実測値11646.1、Mr理論値11643.6。

【0169】

(免疫細胞化学および蛍光による検討)

前述の濃縮スキームによって単離した単一ファージを増幅させた。このファージ・ペプチドおよびオキシム1~6のうちの1種を培養培地中の細胞に加え、24時間インキュベートした。次に、培地を洗い流し、細胞を冷メタノール・アセトン(1:1)で5分間固定した。ファージ・キャプシドに対する抗体もしくはビオチン(ペプチド)に対する抗体を、フルオレセイン結合(ファージ)もしくはテキサス・レッド標識(ペプチド)二次抗体と共に用いた。古典的な蛍光顕微鏡による検討および共焦点顕微鏡によるアッセイを実施した。

【0170】

まず、オキシム1~3のTC-3細胞内への侵入について調べた。蛍光による検討では、構築ブロックとして2ユニットのPEGスペースを有するRRTKペプチドの4つのコピーを用いるテトラオキシム(樹状形)のオキシム3は、TC-3細胞表面の受容体に明確に結合し、細胞内へ侵入可能であることが明らかになった。オキシム3が優れているのは、細胞表面の受容体への結合を増強するPEGスペーサーの可動性に起因し得る。

【0171】

次いで、オキシム3に類似のオキシム4~6を合成し、結合親和力および侵入効率についてアッセイした。RRTK(配列番号1)ペプチドのコピー数を、オキシム6では8個まで増やし、D-ペプチドが高い安定性を有し、免疫原性がより低いことが実証されているので(Ivanenkovら、Biochem. Biophys. Acta 1448:450(1999)を参照)、オキシム5では上記ペプチドをD-エナンチオマー型に変更した。顕微鏡による検査では、8個のペプチドコピーを有するオキシム6(オクタオキシム)は細胞内へ効率的に侵入することができることが明らかになった。ビオチンに対するテキサス・レッド標識二次抗体によって、このオクタオキシムは、「空胞状」構造体としての細胞の内側に、または細胞膜に局在することが明らかになった。従って、ペプチドコピー数を最大8個まで増加させた多量体は、結合ペプチドの向上した結合活性および移送効率を示す。

【図面の簡単な説明】

【0172】

【図1】図1はオキシム1~3の構造を示す。コアの分枝Lys残基の および アミノ基は、RRTKペプチドのN末端でアシル化(スペーサーがあってもなくてもよい)されている。スペーサーと共に、レポーター・タグFITCが各構築体のコアに導入されている。

【図2】図2はオキシム4~6の構造を示す。コアの分枝Lys残基の および アミノ基は、RRTKペプチドのN末端でスペーサーを有してアシル化されている。スペーサー

10

20

30

40

50

と共に、レポータ・タグのビオチンが各構築体のコアに導入されている。

【図 1】

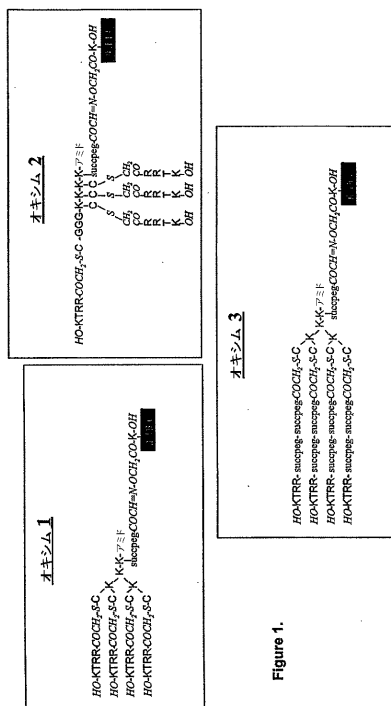


Figure 1.

【図 2】

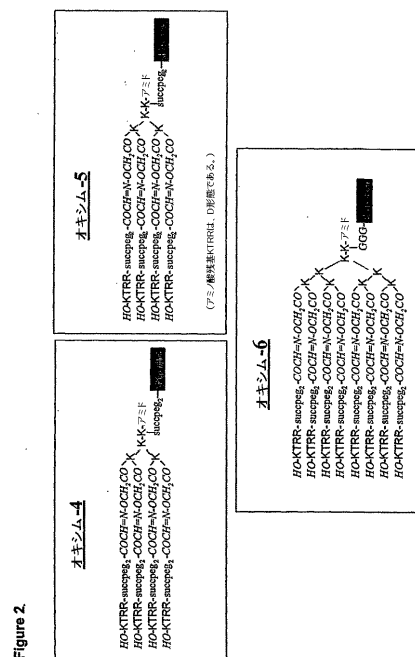


Figure 2.

【配列表】

0004514607000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)		A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 25/00	1 0 1
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 国際公開第 0 2 / 0 3 1 1 0 9 (W O , A 1)
 特表 2 0 0 1 - 5 1 2 7 3 9 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C07K 19/00
 C12N 15/00
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)