

(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2004-511494

(P2004-511494A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 5/10	C07K 5/10 ZNA	4B063
A61K 31/7088	A61K 31/7088	4C076
A61K 38/00	A61K 45/00	4C084
A61K 45/00	A61K 47/48	4C086
A61K 47/48	A61K 48/00	4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-534479 (P2002-534479)	(71) 出願人	502129715 ユニバーシティ オブ ローザンヌ スイス国 ツェーハー 1005 ローザ ンヌ, リュー デ ビュニオン 21
(86) (22) 出願日	平成13年10月15日 (2001.10.15)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月11日 (2003.4.11)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/IB2001/002423	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02002/031109		
(87) 国際公開日	平成14年4月18日 (2002.4.18)		
(31) 優先権主張番号	60/240, 315		
(32) 優先日	平成12年10月13日 (2000.10.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なトランスポーターペプチド配列による生物学的エフェクターの細胞内送達

(57) 【要約】

本発明は、エフェクターが生物学的膜を横切って容易に移動することが可能なアミノ酸配列に関する。より具体的には、本発明は、薬物および治療剤の細胞内送達のために特定の細胞型を特異的に標的化する新規なペプチド輸送体に関し、このペプチド輸送体は、a) $(X_m R X_o R X_n)$; b) $(X_m R R R X_n)$; c) $(X_m R R X R X_n)$; および d) $(X_m R X R R X_n)$ からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含み、ここでXは、非塩基性アミノ酸であり; mは、0~14の整数であり; nは、mとは独立して、0と14との間の整数であり; oは、mおよびnとは独立して、0と5との間の整数であり; ここでこの輸送体ペプチドは、生物学的膜を横切って輸送され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のアミノ酸配列

a) (X_m R X_o R X_n) ;

b) (X_m R R R X_n) ;

c) (X_m R R X R X_n) ; および

d) (X_m R X R R X_n) 、

からなる群より選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む輸送体ペプチドであって、

ここで、X は非塩基性アミノ酸であり、

m は、0 から 14 の整数であり、

n は、m とは独立した、0 と 14 の間の整数であり、

o は、m および n とは独立した、0 と 5 の間の整数であり、

ここで該輸送体ペプチドは、生物学的膜を横切って移動することが可能である、輸送体ペプチド。

10

【請求項 2】

前記アミノ酸配列が R - X - X - R である、請求項 1 の輸送体ペプチド。

【請求項 3】

前記輸送体ペプチドがエフェクターに結合した、請求項 1 の輸送体ペプチド。

【請求項 4】

前記エフェクターが核酸である、請求項 3 の輸送体ペプチド。

20

【請求項 5】

前記核酸が DNA である、請求項 3 の輸送体ペプチド。

【請求項 6】

前記核酸が RNA である、請求項 3 の輸送体ペプチド。

【請求項 7】

前記エフェクターがペプチドである、請求項 3 の輸送体ペプチド。

【請求項 8】

前記エフェクターが薬学的に活性な薬剤である、請求項 3 の輸送体ペプチド。

【請求項 9】

前記薬学的に活性な薬剤がトキシン、抗生物質、抗病原性薬剤、抗原、抗体フラグメント、免疫調節剤、酵素、および治療剤からなる群より選択される、請求項 8 の輸送体ペプチド。

30

【請求項 10】

前記ペプチドが 50 アミノ酸長未満である、請求項 1 の輸送体ペプチド。

【請求項 11】

前記ペプチドが 25 アミノ酸長未満である、請求項 1 の輸送体ペプチド。

【請求項 12】

前記ペプチドが 15 アミノ酸長未満である、請求項 1 の輸送体ペプチド。

【請求項 13】

移動が脾臓 B 細胞、肝細胞、大腸細胞、筋細胞、および肺細胞からなる群より選択される組織内で起こる、請求項 1 の輸送体ペプチド。

40

【請求項 14】

輸送体ペプチドが、配列番号 1 ~ 6 からなる群より選択される、脾臓 B 細胞の膜を横切る、請求項 1 の輸送体ペプチドを移動する方法。

【請求項 15】

請求項 1 の輸送体ペプチドを肝細胞の膜を横切って移動する方法であって、該輸送体ペプチドが、配列番号 7 ~ 10 からなる群より選択される、方法。

【請求項 16】

請求項 1 の輸送体ペプチドを大腸細胞の膜を横切って移動する方法であって、該輸送体ペ

50

プチドが、配列番号 11 である、方法。

【請求項 17】

請求項 1 の輸送体ペプチドを筋細胞の膜を横切って移動する方法であって、該輸送体ペプチドが、配列番号 12 ~ 20 からなる群より選択される、方法。

【請求項 18】

請求項 1 の輸送体ペプチドを肺細胞の膜を横切って、移動する方法であって、該輸送体ペプチドが、配列番号 21 ~ 34 からなる群より選択される、方法。

【請求項 19】

エフェクターに結合した、請求項 1 の輸送体ペプチドを含む、輸送体ユニット。

【請求項 20】

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より選択される、請求項 19 の輸送体ユニット。

【請求項 21】

請求項 19 に記載の輸送体ユニットの治療的または予防的な有効量および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物。

【請求項 22】

請求項 1 の輸送体ペプチドとエフェクターとの間の移行可能な複合体を産生する方法であって、該方法は、該エフェクターを該輸送体ペプチドに結合体化して、輸送体ペプチド - エフェクター結合体を形成する工程を包含する、方法。

【請求項 23】

エフェクターを真核生物細胞の細胞質および核へ移行する方法であって、該方法は、
a) 該エフェクターを請求項 1 の輸送体ペプチドへ結合体化して、輸送体ペプチド - エフェクター結合体を形成する工程、および
b) 該輸送体ペプチド - エフェクター結合体を細胞に導入する工程、
を包含する、方法。

【請求項 24】

前記導入工程は、前記輸送体ペプチド - エフェクター結合体の存在下で細胞培養液をインキュベートすることによって、または請求項 22 に記載の細胞へ該輸送体ペプチド - エフェクター結合体を注入することによって、達成される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記真核生物細胞がヒト細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

真核生物細胞内でエフェクターの細胞内濃度を増加する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 該エフェクターを請求項 1 の輸送体ペプチドに結合体化して、輸送体ペプチド - エフェクター結合体を形成する工程、
b) 該真核生物細胞の活性な代謝を促進する条件下で、該輸送体ペプチド - 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。

【請求項 27】

前記真核生物細胞がヒト細胞である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

1 以上の容器中に、治療的または予防的に有効量の請求項 21 に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項 29】

疾患を処置または予防する方法であって、該方法は、そのような処置または予防が所望される被験体に、請求項 21 に記載の薬学的組成物を該被験体における該疾患を処置または予防するに十分な量で投与する工程を包含する、方法。

【請求項 30】

前記疾患が、糖尿病、大腸癌、呼吸器病、神経変性障害、心臓麻痺、およびウイルス感染

10

20

30

40

50

からなる群より選択される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

輸送体ペプチドに対してファージライブラリーをスクリーニングする方法であって、該方法は、以下：

- a) ファージディスプレイライブラリーを提供する工程、
 - b) 特定の細胞型に対する前記ライブラリーをスクリーニングする工程、および
 - c) 内在化したファージを有する細胞を決定する工程、
- を包含する、方法。

【請求項 32】

請求項 31 に記載の方法であって、さらに、

- d) 内在化したファージ由来の DNA を同定する工程、および
- e) 発現されたペプチドを推定する工程、を含む、方法。

【請求項 33】

前記スクリーニング工程が少なくとも 3 サイクルのパニングを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記ファージディスプレイライブラリーが多価ファージディスプレイライブラリーである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 35】

アミノ酸配列が、配列番号 1 ~ 34 をからなる群より選択される、輸送体ペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の技術分野)

本発明は、分子生物学の分野に関する。

【0002】

(発明の背景)

細胞外媒体から細胞への、特に細胞の核への、目的の物質の効率的な輸送を可能にする技術は、バイオテクノロジーの分野で、かなり興味深い。これらの技術は、タンパク質またはペプチドの産生にとって、遺伝子の発現の調節にとって、細胞内シグナル伝達チャネルの解析にとって、そして種々の異なる物質が細胞内（または細胞の核）への輸送による効果の解析にとって、有用であり得る。そのような技術の 1 つの重要な適用は、遺伝子治療である。しかし、宿主のゲノムに作用することなく処置されるか、または活性物質の生物学的性質を変えらることなく処置される、宿主中の細胞質または細胞の核に生物学的に活性な物質を輸送することは、遺伝子輸送ベクターの無能によって限定される。

【0003】

いくつかの技術は、細胞内に DNA を効率的に輸送するための試みにおいて開発されてきた。代表的な例は、リン酸カルシウムまたは DEAE-デキストランを用いる DNA の共沈降あるいはエレクトロポレーションを含む。これらの両方の方法は、DNA が細胞膜を貫き、次いで、細胞および/または核に入ることを可能にする。これらの技術の両方が、低輸送効率および高率の細胞死という欠点を持つ。他の方法は、DNA および核酸に対して強い親和性を有するウイルス関連物質の複合体を使用する。しかし、ウイルス複合体は、使用するのが困難であり、そしてウイルス成分の使用に関するいくつかの危険性が存在する。例えば、米国特許第 5,521,291 号を参照のこと。レセプター媒介性エンドサイトーシスはまた、細胞への治療剤の標的化された送達のための、実験系で広く利用されている(36)。リガンド含有複合体は、リガンドに対して特異的な細胞膜に位置するレセプター、または、膜構成物中に位置する特定の抗体のいずれかによって、選択的に内部移行される。エンドサイトーシス活性は、IgG、Fc、ソマトスタチン、インスリン、IGF-I および IGF-II、トランスフェリン、EGF、GLP-1、VLDL レセプターまたはインテグリンレセプターを含む、多くのレセプターについて記載されてきた(35; 37~43)。

10

20

30

40

50

【0004】

プロタンパク質コンベルターゼもまた、レセプター媒介性エンドサイトーシスを通して内在化される、細胞表面レセプターの例である。これらのタンパク質は、ペプチドホルモン、神経ペプチド、および多くの他のタンパク質がこれらの生物学的に活性形態に転換することに寄与することが示されてきた。プロタンパク質コンベルターゼファミリーについての全ての切断部位は、コンセンサスR-X-X-Rに従う。哺乳動物プロタンパク質コンベルターゼは、それらの組織分布に基づいて、三つの群に分類され得る。フリン(Furin)、PACE4、PC5/PC6およびLPCIPC7/PC8/SPC7は、広範な組織および細胞株中で、発現されている。それと対照的に、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のような、神経内分泌組織に限定される。PC4の発現は、精巣の精子形成細胞に高度に限定されている。神経内分泌系特異的コンベルターゼ、PC2およびPC1/PC3は、分泌性顆粒中に主に局在している。PC5/PC6Aもまた、分泌性顆粒に局在していることが報告されてきた。さらに、間接的な証拠によって、プロタンパク質コンベルターゼ分子の集団は、細胞表面上に存在することが示唆され、フリンがTGNと細胞表面との間で循環するということが示された((1)中に総説される)。一緒にすると、これらの特性は、プロタンパク質コンベルターゼが細胞内空間に細胞外リガンドを輸送することを示す。

10

【0005】

効率的なレセプター媒介性エンドサイトーシスを指向するペプチド配列の単離は、ファージディスプレイ技術(44)の使用によって大いに促進される。ファージディスプレイライブラリーは、細胞レセプター(45)への天然のリガンドおよび短いペプチド(46)の修飾を含んだ分子改変体の事実上限定されない供給源を提供する、極めて強力なツールである。類似のライブラリーもまた、ネズミに直接注射され、13倍の選択性を脳および腎臓に対して示すペプチド配列は、首尾よく単離された(48;49)。

20

【0006】

当該分野において、薬物および治療剤の細胞内輸送のために種々の細胞型を標的化するための、効率的な、生物学的変化に変化させない、低危険性の手段の必要性が未だ存在している。従って、特異的な細胞型を選択的に標的化する輸送体小ペプチドは、大きなファージディスプレイライブラリー由来のものであり得る。ファージディスプレイを使用して得られたペプチドのような小さなペプチドキャリアの利点は、高品質ならびに高純度、低い免疫源性および生体内ですべての細胞に高効率で送達するための潜在能力を含む(26)。従って、ペプチドキャリアは、多くの巨大分子の効率的な送達のためのリポソームまたはウイルスのような慣用的な輸送体に対して改善する能力を有する(例えば、50;51を参照のこと)。

30

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、生物学的膜を横切って移動し得る輸送体ペプチドを提供する。本発明はまた、生物学的膜を横切ってエフェクターを移動させるような輸送体ペプチドを使用する方法に関する。

【0008】

一つの局面において、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 $(X_m R X R R X_n)$ から選択されるアミノ酸配列を少なくとも1つ有する輸送体ペプチドを含む。ここで、Xは非塩基性アミノ酸であり; mは、0~14の整数であり; nは、mとは独立した、0と14の間の整数であり; oは、mおよびnとは独立した、0と5の間の整数であり; そして輸送体ペプチドは、生物学的膜を横切って移動し得る。

40

【0009】

1つの実施形態において、本発明は、アミノ酸配列R-X-X-Rを有する輸送体ペプチドを提供する。他の実施形態において、本発明は、配列番号1~34のいずれか1つのアミノ酸配列を有する輸送体ペプチドを提供する。他の種々の実施形態において、輸送体ペ

50

プチドは、タンパク質コンベルターゼリガンド由来である。さらに他の実施形態において、輸送体ペプチドは、タンパク質コンベルターゼ切断部位由来である。

【0010】

本明細書中で使用される場合、輸送体ペプチドは、生物学的膜を横切って物質が移動することを容易にするペプチドである。

【0011】

いくつかの実施形態において、輸送体ペプチドは、エフェクターに融合される。その「エフェクター」は、任意の適切な分子であり得、DNA, RNA, タンパク質、ペプチド、あるいは例えば、毒素、抗生物質、抗病原性因子、抗原、抗体、抗体フラグメント、免疫調節因子、酵素、または治療剤のような薬学的に活性な因子を含む。

10

【0012】

用語「融合」または「融合した」は、いくつかの第三の分子に関して互いに対してある性能を示す、2つ以上の分子を生じるような特異的な相互作用を全て含むことが意味される。これは、共有結合、イオン結合、疎水性結合、および水素結合のようなプロセスを含むが、溶媒選択性のような非特異的結合は、含まない。

【0013】

種々の実施形態において、輸送体ペプチドは50よりも少ない、25よりも少ない、または15よりも少ないアミノ酸長であり得る。

【0014】

さらなる実施形態において、移動は、膵臓B細胞、肝細胞、結腸細胞、筋細胞および/または肺細胞中で生じる。

20

【0015】

別の実施形態において、本発明は、生物学的膜を横切って輸送体ペプチドを移動させる方法を含む。例えば、配列番号1~6のペプチドを、膵臓B細胞の膜を横切って移動し得、配列番号7~10のペプチドを、肝細胞の膜を横切って移動し得、配列番号11のペプチドを、結腸細胞の膜を横切って移動し得、配列番号12~20のペプチドを、筋細胞の膜を横切って移動し得、および配列番号21~34のペプチドを、肺細胞の膜を横切って移動し得る。

【0016】

さらに別の実施形態において、本発明は、エフェクターに結合した輸送体ペプチドである輸送体ユニットを含む。種々の他の実施形態において、そのエフェクターは、核酸、ペプチド、または薬学的活性剤であり得る。

30

【0017】

なおさらなる実施形態において、本発明は、輸送体ペプチドとエフェクターとの間の移動可能な複合体を産生して、輸送体ペプチド-エフェクター複合体を形成する方法を含む。本明細書中で使用される場合、「複合体」または「複合体化」は、エフェクターと輸送体ペプチドとの間の物理的結合を可能にする任意の型の相互作用を意味する。結合は、天然では共有結合的または非共有結合的であり得、そして細胞を貫通する前またはその間にベクターが解離しないように十分に強くあるべきである。複合体化は、化学的、生化学的、酵素的または当業者に既知である遺伝子的カップリングのいずれかを使用して達成され得る。目的のエフェクターは、輸送体ペプチドのN末端またはC末端へ連結され得る。

40

【0018】

別の実施形態において、本発明は、真核生物細胞の細胞質および核内へエフェクターを移動させる方法を含む。これによって、エフェクターを輸送体ペプチドに結合体化し、そして真核生物細胞へ導入する。例えば、輸送体ペプチド-エフェクター複合体は、この複合体の存在下で細胞培養物をインキュベートすること、または細胞へこの複合体を注入することによって、細胞内へ導入され得る。

【0019】

種々の他の実施形態において、本発明は、真核生物細胞内のエフェクターの細胞内濃度を増加させる方法を含み、これによってエフェクターを輸送体ペプチドに結合体化し、そし

50

て細胞の活性な代謝を促進する条件下にある細胞中でインキュベートした。本発明の好ましい実施形態は、真核生物細胞としてのヒト細胞の使用を含む。

【0020】

なおさらなる実施形態において、本発明は、輸送体ユニットおよび薬学的に受容可能なキャリアの治療的有効量または予防的有効量を含む薬学的組成物を含む。

【0021】

好ましい「薬学的組成物」は、a) 希釈液(例えば、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マニトール、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)とを一緒に含む活性成分を含む錠剤およびゼラチンカプセルであり; 錠剤についてはまた、c) 結合剤(例えば、珪酸マグネシウムアルミニウム、澱粉ペースト、ゼラチン、トラガカントゴム、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)が挙げられ、所望ならば、d) 崩壊剤(例えば、澱粉、寒天、アルギン酸もしくはそのナトリウム塩または沸騰性混合物; ならびに/あるいは、e) 吸収剤、着色料、香味料および甘味料を含む。注入可能な組成物は、好ましくは等張の水溶液または懸濁液であり、そして坐剤は、脂肪乳化液または懸濁液から都合の良く調製される。組成物は、滅菌され得、ならびに/あるいは保存料、安定剤、湿潤剤もしくは乳化剤、溶液促進剤、浸透圧を調節するための塩および/または緩衝液のようなアジュバントを含み得る。さらに、これらはまた、他の治療上価値のある物質を含み得る。その組成物は、それぞれ慣用的な混合方法、粒状化方法またはコート方法に従って調製され、約0.1%~75%、好ましくは、約1%~50%の活性成分を含む。

10

20

【0022】

なおさらなる実施形態において、本発明は、治療有効量または予防的有効量の薬学的組成物を含む1つ以上の容器を含む、キットを含む。

【0023】

本発明の別の実施形態は、このような治療または予防を所望される被験体へ投与することによって、疾患を治療または予防する方法、疾患を治療または予防するために十分な量の化学療法的構成物を含む。例えば、治療されるべき疾患としては、糖尿病、結腸癌、呼吸器病、神経変性障害、心臓麻痺および/またはウイルス感染が挙げられ得る。

【0024】

別の局面において、本発明は、輸送体ペプチドに対するファージライブラリーをスクリーニングする方法を含み、それによって、ファージライブラリーが特定の細胞型に対してスクリーンされ、次いで、どの細胞がファージを内部移行させたかが決定される。

30

【0025】

別の実施形態において、本発明は、内部移行したファージのDNAを同定することおよび発現されたペプチドを推定することを含む。

【0026】

なおさらなる実施形態において、本発明は、スクリーニング工程を含み、それによって、ファージライブラリーは、少なくとも3サイクル選り分けられる。

【0027】

なお、さらなる実施形態において、本発明は、ペプチドの多価の提示を有するファージを含む。

40

【0028】

(発明の詳細な説明)

本発明は、薬物および治療剤の細胞内送達について、種々の細胞型を特異的に標的化するペプチド輸送系を提供する。当該分野において存在する輸送系は、あまりに限定されているので、一般的な適用ではない。なぜなら、これらは不十分であるか、宿主ゲノムへの影響を与えるか、活性物質の生物学的性質を変化させるか、標的細胞を殺すか、または、ウイルス複合体の使用のために、あまりに高い危険率が提示するので、ヒト被験体に使用することはできないかのいずれかであるからである。本発明のペプチド輸送系は、当該分野

50

における輸送系の制限を克服するために、プロテオソームコンベクターゼ、および潜在的治療剤の細胞内送達に特異的なリガンドを使用する。本発明の系は、変化していない生物学的活性物質の効率的な送達を示す。この物質は、宿主のゲノムに影響せず、さもなければ非侵略性である。

【0029】

例えば、輸送体ペプチドには、糖尿病を処置する際の用途を有する。細胞量は、厳密に調節されていて、その結果、インシュリン分泌が正常血糖を維持する。細胞量を未熟な組織または成熟した組織の必要性に合わせることで、特に、特定の生理学的条件および生理医学的条件において、細胞死と、未成熟細胞の分化および既存のインシュリン分泌細胞の増殖から生じる再生との間の動的なバランスによって、本質的に達成される(54、55)。I型糖尿病において、損なわれたバランスは、膵臓細胞を標的化する免疫系の特異的な攻撃によって開始されたプロセスである、促進した細胞の破壊から生じる。したがって、細胞の破壊速度の阻害または減少は、糖尿病の安定化を補助し得るだけでなく、細胞量不足を修正するために、小島の再生を可能にし得る。

10

【0030】

いくつかの分子は、I型糖尿病の実験モデルにおける細胞の損失の速度を減少させるために、強力なツールとして、確立された。これら分子の多くは、天然においてペプチジルであり、よって、ペプチドキャリアに容易に連結させられる。本明細書中に記載されるペプチドは、治療上の「荷物(cargo)」(すなわち、キャリア(「輸送体ペプチド」))を治療剤(「エフェクター」)と連結)の設計に対する基本を提供する。

20

【0031】

従って、本発明の輸送系の好ましい実施形態は、I型糖尿病の処置のための細胞細胞内機構を標的化する。I型糖尿病は、免疫系の分泌による膵臓細胞の破壊に続く(1)。ヒトおよび齧歯類の両方における、決定的なデータは、マクロファージおよびT細胞によって分泌された、TNFおよびIFNと組合わせたサイトカイン(インターロイキン-1(IL-1))が、細胞機能不全および破壊ならびにI型糖尿病を導く最終的な結果に対して原因となる主要な構成成分である(2-4)。これらの分泌されたサイトカインは、シグナル伝達の高度に複雑なネットワークおよび膵臓細胞中のエフェクター分子に係合される。シグナル伝達は、細胞の組成物を改変し、そして細胞の運命に決定的な影響力を与える。蓄積してきている証拠は、この調節細胞内ネットワークが、新規の治療アプローチの開発のための、有望な標的を表すことを示す(5-11)。処置および細胞内サイトカインシグナル伝達の統合に参与する各々の分子は、輸送体-薬物を設計するための標的を表し得る。

30

【0032】

ほとんどの著名なシグナル伝達分子の間で、セラマイド、プロスタグランジン、熱ショックタンパク質、誘導性NO合成酵素(iNOS)、転写因子NF- κ B、および3つのMAPキナーゼERK1/2、p38ならびにJNKが、細胞中のIL-1によって漸増される。これらの分子の多くは、細胞の生存および機能の改善を導いた、現存するインヒビターでブロックするための標的である。iNOS KOマウスは、IL-1細胞毒性に抵抗性であり(12)、iNOS活性のブロkkerは、NO細胞毒性の異なる側面を阻害する((6)中に総説される)。小島および細胞株の研究によって、Ca²⁺チャネルのブロkkerまたはカスパーゼインヒビターは齧歯類の細胞死を防ぐことが示された(13;14)。p38インヒビターは、グルコース誘導性インシュリン放出のIL-1媒介性阻害を減弱させる(15)。アンチセンスGADトランスジェニックNODマウス中での、GAD発現の細胞特異的抑制は、自己免疫糖尿病を防ぐ(16)。膵臓細胞株中で、JBD(c-Jun N末端キナーゼJNKの優性なインヒビター)同様に、bc1-2、IL-1Raの発現は、アポトーシスに抵抗性の細胞の生成を導いた(17-20)。まとめると、これらのデータは、特定のツールを用いる細胞内事象の操作が、I型糖尿病の処置についての大きな保証を維持することを示す。

40

【0033】

50

疾患の処置に対する一つの主要な挑戦は、生物学的に重要な分子を、インビボで使用可能である、生物活性であり細胞浸透性である化合物に転換することである(21)。例えば、細胞の損失を阻止するための最も有望なツールは、組織および臓器細胞を含む細胞株へ、インビボで現在のところ送達され得ない、多くの巨大タンパク質(例えば、BC1-2(8)、MyD88、TRAF、FADDまたはIRAKの優勢劣勢型のようなサイトカインシグナル伝達のインヒビター(22;23)、あるいはJNKインヒビターJB₂₈₀(24))である。

【0034】

最近の研究は、細胞および器官へ容易に送達され得る、生物活性な小さな化合物へ巨大タンパク質を転換するための試みにおける進歩を示す(25)。これらの技術は、実質的に2つの条件を必要とする: 1) 特定の輸送体またはその化学修飾を、細胞内への効率的な送達のための分子に連結する(例えば、(26~28)に記載される効率的な短いペプチド輸送体を参照のこと)、および2) タンパク質の活性部分は、縮減されるべきで、その結果、小ペプチドの配列をこの輸送体に直結し得る。簡単には、これらの条件は、一般に、3~30アミノ酸長で、双極性のペプチドを規定し、これは、細胞内に入り得るが、由来するタンパク質の重要な生物学的特徴を保存する。癌の研究(32)にあるように、細胞内に多くの細胞内事象が存在し、その操作は、薬物設計のための有望な目標であるような、サイトカイン誘導性アポトーシス操作から、細胞を保護する。

【0035】

レセプター媒介性エンドサイトーシスは、細胞内へ治療剤の標的化された送達のための実験系において、広範に活用されている(36)。エンドサイトーシス活性は、IgG Fc、ソマトスタチン、インシュリン、IGF-IおよびIGF-II、トランスフェリン、EGF、GLP-I, VLDL、またはインテグリンレセプターを含む、多くのレセプターに対して記載された、共通の性質である(35、37-43)。最近、効率的なレセプター媒介性エンドサイトーシスを指向するペプチド配列の単離は、ファージディスプレイ技術を使用することによって、かなり高められた(44)。ファージディスプレイライブラリーは、細胞レセプター(45)および短いペプチド(46)への天然のリガンドの改変を含む、分子の改変体の実質的に制限のない供給源を提供する、極めて強力なツールである。この技術を使用して、細胞型特異的レセプターがエンドサイトーシスを媒介するという証拠は、報告された(47)。同様のライブラリーが、直接ネズミに注入されて、脳および腎臓に対して13倍の選択性を示すペプチド配列は、首尾よく単離されてきた(48;49)。

【0036】

有力な実験背景が、選択的に臓器細胞を標的化する輸送体ペプチドが、大きなファージディスプレイライブラリーから導かれ得たことを示しているにもかかわらず、そのような試みは、報告されてこなかった。ファージディスプレイライブラリーを利用することによって得られるもののような小さなペプチドキャリアの利点は、多数性であり、そして化学合成による生成の簡便性、高品質ならびに高純度、低い免疫原性、生物体中のすべての細胞への高効率の送達の可能性を含む(26)。結果的に、本発明のペプチドキャリアは、多くの高分子の効率的な送達において、リポソームまたはウイルスのようなより従来の輸送体よりも良好に機能する可能性を有する(例えば、50;51を参照のこと)。

【0037】

ファージペプチドライブラリーは、繊維状ファージM13の誘導体中で、伝統的に構築されてきた。ペプチドライブラリーを、ペプチドモチーフ(46)の1~5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pIIIに融合した。あるいは、高価での提示が、メジャーコートタンパクpVIIIIを使用することによって達成される。

【0038】

ライブラリーのこれらの型は、レセプター媒介性エンドサイトーシスのペプチド配列の単離に対して最適化されてはこなかった。以下の考察が、最高の内在化効率でのキャリアの回収に関連する。

10

20

30

40

50

【0039】

1) ペプチドの一価または低結合価の提示は、繊維状ファージのような大きな構造物の効率的な取り込みには、実質的に不十分である。しかし、高価での提示は、効率的な取り込みを可能にする(44); および、
2) レセプター結合性リガンドの内在化は、形質膜の特定の領域上の細胞表面レセプターの濃縮およびクラスリン被覆小胞の引き続く形成を含む(52)。

【0040】

M13 誘導体の大きなサイズ(1 μm ~ 1.5 μm)は(53)、古典的なクラスリン被覆小孔(150 nm)の一般的なサイズを超えている。クラスリン被覆小孔は、形質膜上で陥入した構造で、膜表面の約2%を占めている。これらの特殊化された構造は、毎分10% ~ 50%の極端に速い速度で、細胞外タンパク質または、インシュリンあるいはEGFのようなペプチドを取り除く、高度に効率的なレセプター媒介性内在化プロセスを導く(43)。そのようにして、これらの特殊化された、高度に効率的な構造による、レセプター媒介性内在化は、従来のM13ファージと共に起こることは、期待されない。

【0041】

結果的に、公表された試みは、ペプチドを保有するファージが高い内在化速度を示すようなペプチドを生成することに失敗してきた。現在まで、特定の細胞型に対して特異的なコンセンサス内在化モチーフは、これらの研究から現れてきていない(44; 47 ~ 49)。

【0042】

特定の局面において、本明細書中に記載されている本発明は、ペプチドを保有するファージの内在化を促進する輸送体ペプチドの同定に関連する。いったん、ペプチド配列が決定されると、生物学的膜を横切ってエフェクター分子を輸送するために、そのペプチドはエフェクター分子に結合される。

【0043】

本明細書中において使用される場合、用語「結合した」(「bound」)あるいは「結合する」(「bind」)、または「会合する」(「associate」)あるいは「相互作用する」(「interact」)は、いくつかの第三の分子と比較して、お互いに選択性を示す二つまたはそれ以上の分子を生じさせる、すべての特異的な相互作用を含むことを意味する。これは、共有結合、イオン結合、疎水結合、および水素結合のようなプロセスを含むが、溶媒選択性のような非特異的な結合は含まない。

【0044】

輸送体ペプチドは、生物学的膜を横切った、特に細胞の細胞質または核への、物質の通過またはトランスロケーションを容易にするペプチドである。トランスロケーションは、例えば、PCT出願番号第WO97/02840に記載されているような細胞貫通アッセイを含む、様々な手順によって検出され得る。一般的に、細胞貫通アッセイは、a) トランスロケーションするペプチドと共に細胞培養液をインキュベーションすること; b) 細胞を固定し、透過化すること; およびc) 細胞内部のペプチドの存在を検出することによって、行われる。検出工程は、固定され、透過化された細胞をペプチドに対する標識化抗体と共にインキュベーションすることによって、続いて、ペプチドと標識化抗体との間の免疫学的反応の検出によって、実行され得る。あるいは、検出はまた、検出可能なように標識化されたペプチドを用いることによって、および、細胞内画分中の標識の存在を直接検出することによって、達成され得る。その標識は、例えば、放射性標識、蛍光標識、または色素であり得る。

【0045】

本発明はさらに、エフェクターに連結されたトランスロケーションペプチドの複合体である、輸送ユニットを含む。本明細書で使用される場合、「連結した」(「coupled」)は、エフェクターとペプチドとの間の物理的な結合を可能にする任意の型の相互作用を意味する。その結合は、本質的に共有結合または非共有結合であり得、ペプチドが移動の前または移動中に解離しないように、結合は十分に強くなければならない。連結は、当

10

20

30

40

50

業者に公知の化学的、生化学的、酵素的または遺伝子的連結のどれを用いても達成され得る。目的のエフェクターは、ペプチドベクターのN末端またはC末端へ連結され得る。

【0046】

「エフェクター」(「e f f e c t o r」)は、例えば、生化学的目的、薬学目的、診断上の目的、追跡上の目的、または食品加工上の目的のすべての分子または化合物をいう。エフェクターは、様々な起源、特にヒト、ウイルス、動物、真核生物あるいは原核生物、植物、合成起源など由来の核酸(リボ核酸、デオキシリボ核酸)から成り得る。目的の核酸は様々な大きさであり得、例えば単純にとってきたヌクレオチドから、ゲノムフラグメントまたはゲノム全体に及ぶ。エフェクターは、ウイルスのゲノムまたはプラスミドでもあり得る。あるいは、目的のエフェクターは、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、または抗体などのような、タンパク質でもあり得る。さらにエフェクターは、例えば、トキシン、治療剤、または、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌薬、もしくは抗寄生生物剤のような抗病原薬のような、薬学的に活性な薬剤であり得る。目的のエフェクターは、それ自身、そのまま活性であり得るか、または、ペプチドによって、別個の物質によって、もしくは環境の条件によって、インサイチュで活性化され得る。

10

【0047】

用語「薬学的に活性な薬剤」は、本明細書中で、それらが、生物体(ヒトまたは動物)へ投与された場合、検出できる薬理学的および/または生理学的効果を誘導する、化学物質または化合物をいうために使用される。

20

【0048】

用語「治療剤」は、本明細書中で、それらが、生物体(ヒトまたは動物)へ投与された場合、望ましい薬理学的および/または生理学的効果を誘導する、化学物質または化合物をいうために使用される。

【0049】

本発明による輸送体ペプチドは、それらの貫通能が、それと連結された目的の物質(エフェクター)の性質とは、実質的に独立である、という事実によって特徴付けられる。

【0050】

本発明はまた、細胞または細胞核への目的の物質の導入法を含む。本方法は、細胞内への十分な貫通を可能にするのに十分な量の輸送体ペプチド-エフェクター複合体と細胞とを接触することを含む。一般的には、本方法は、複合体のインビボまたはインビトロでの内在化のために使用され得る。例えば、その複合体は、インビトロ、エキソビボ、またはインビボにおいて提供され得る。さらに、本発明に従う輸送体ペプチドは、連結された物質の生物学的活性の可能性をもたせる能力があるということが示された。従って、本発明の他の目的は、それが連結されているエフェクターの生物学的活性を増加する、輸送体ペプチドの使用方法である。インビトロでの方法によって、エフェクターはまず輸送体と連結され、複合体は細胞の活発な代謝を可能にする温度で、細胞とインキュベーションされる。いくつかの場合において、輸送体-エフェクター複合体は特定の細胞に注入される。当業者は、細胞に複合体を導入する他のどんな方法でもまた使用され得る、ということを知識する。

30

40

【0051】

ペプチド-エフェクター複合体に加えて、本発明はまた、薬学的に受容可能な塩基または酸付加塩、水和物、エステル、溶媒和物、プロドラッグ、代謝産物、立体異性体、またはそれらの混合物を提供する。本発明はまた、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤とあわせてペプチド-エフェクター複合体を含む、薬学的処方物もまた、含む。

【0052】

用語「薬学的に受容可能な塩」に含まれる塩は、本明細書中に記載されている化合物の「薬学的に受容可能な酸付加塩」を生成するために適切な有機酸または無機酸と遊離塩基を反応させることによって、一般的に調製される、本発明の化合物の無毒性塩をいう。これらの化合物は、遊離塩基の生物学的効力および特徴を保持する。そのような塩の代表は、

50

水溶性および非水溶性の塩であり、酢酸塩、アムソネート(4,4-ジアミノスチルベン-2,2'-ジスルホネート)、ベンゼンスルホネート、ベンゾネート、炭酸水素塩、重硫酸塩、酒石酸水素塩、ホウ酸塩、臭化物、ブチレート、カルシウムエデテート、カンシラート、カーボネート、塩化物、クエン酸塩、クラブラリエート、ジヒドロクロリド、エデテート、エジシレート(edisylate)、エストレート(estolate)、エシレート(esylate)、フマル酸塩、グルセプテート、グルコナート、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、ヒドラミン、ヒドロプロミド、ヒドロクロリド、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、ラクトビオネート(lactobionate)、ラウリン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシレート、メチルプロミド、硝酸メチル、硫酸メチル、ムコ酸塩(mucate)、ナフシレート(napsylate)、硝酸塩、N-メチルグルコサ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、パモエート(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(embonate))、パントテン酸塩、ホスフェート/ジホスフェート、ピクリン酸塩、ポロガラクツロネート、プロピオン酸塩、p-トルエンスルホネート、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、スルホサリクレート(sulfosalicylate)、スラメート(suramate)、タンニン酸塩、酒石酸塩、テオクレート(teoclate)、トシレート、トリエチオジド、および吉草酸塩のような塩である。

10

【0053】

20

本発明の方法に従って、ヒト患者はペプチドまたは複合体の薬理的有効量で治療され得る。用語「薬理的有効量」は、研究者または医師が探究する、組織、系、動物またはヒトの生物学的または医学的応答を誘発する薬物または薬学的薬剤(エフェクター)の量を意味する。

【0054】

本発明はまた、細胞または細胞核への目的のエフェクターの導入に適切な薬学的組成物を含む。その組成物は、好ましくは、体内での使用に適切であり、単独または組み合わせにおいて、一つまたは多くの薬学的に受容可能なキャリアと共に、本発明の薬理的に活性化化合物の有効量を含む。この化合物は、毒性があるとしても、極めて低い毒性を有するという点で、特に有用である。

30

【0055】

好ましい薬学的組成物は、a)希釈剤、例えば、ラクトース、ブドウ糖、ショ糖、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、タルク、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；錠剤用にはまたc)結合剤、例えば、珪酸アルミニウムマグネシウム、デンプンペースト、ゼラチン、トラガカントゴム、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；所望される場合にはd)崩壊剤、例えば、デンプン、寒天、アルギン酸あるい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、着色料、香味料および甘味料、と一緒にした活性成分を含む錠剤およびゼラチンカプセルである。注入可能な組成物は、好ましくは等張水溶液または懸濁水溶液であり、坐薬は脂肪乳化剤または懸濁液から有利なように調製される。その組成物は、滅菌され得、および/または保存料、安定化剤、湿潤剤または乳化剤、溶液促進剤、浸透圧を制御するための塩および/または緩衝液のようなアジュバントを含み得る。加えて、それらはまた、他の治療上有効な物質を含み得る。その組成物は、従来の混合方法、顆粒化方法またはコーティング方法それぞれに従って調製され、約0.1%~75%、好ましくは、約1%~50%の活性成分を含む。

40

【0056】

活性化化合物および本明細書中に記載されている塩の投薬は、治療剤の投薬の受容可能な様式のいずれかをとおしてであり得る。これらの方法は、経口の、経鼻の、非経口の、経皮的な、皮下の、または局所的な投薬様式のような、全身投与または局所的な投与を含

50

む。

【0057】

意図された投薬様式に依存して、その組成物は、好ましくは単位投薬における、例えば、注射可能物質、錠剤、坐薬、丸剤、徐放性のカプセル、粉末、液体、懸濁物などのような、固体投薬形態、半固体投薬形態または液体投薬形態であり得る。その組成物は、活性な化合物またはその薬学的に受容可能な塩の有効量を含む。そして、薬学において慣習的に使用されているような、従来の任意の薬学的賦形剤および他の医学的または薬学的な薬物または薬剤、キャリア、アジュバント、希釈剤などもまた含み得る。

【0058】

固体組成物について、薬学的グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、タルク、セルロース、グルコース、ショ糖、炭酸マグネシウムなどを含む賦形剤が、使用され得る。上で定義した活性な化合物はまた、キャリアとして、例えば、ポリアルキレングリコール、例えば、ポリエチレングリコールを使用することによって、坐薬として、処方され得る。

10

【0059】

液体、特に注射可能な組成物は、例えば、溶解、分散などによって調製され得る。活性な化合物は、例えば、水、生理食塩水、水溶液のブドウ糖、グリセロール、エタノール、およびその種などのような、薬学的に純粋な溶媒に溶解されるか、または薬学的に純粋な溶媒と混合され、それによって、注射可能な溶液または懸濁物を形成する。

【0060】

所望される場合、投薬される薬学的組成物はまた、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝化薬剤、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などのような、他の物質のような無毒性の補助物質を少量含み得る。

20

【0061】

非経口的な (parental) 注射可能な投薬は、一般的に皮下的な、筋内的なまたは静脈内的な注射および注入のために使用される。注射可能物質は、液状溶液あるいは懸濁液または注射前に液体中に溶解するのに適切な固体形態のいずれかのような、従来の形態中に調製され得る。

【0062】

非経口の投薬のための一つのアプローチは、本明細書中で参考として援用される、米国特許第3,710,795号に従って、一定レベルの投薬量が維持されることを保証する、緩徐放出性または徐放性の系の移植を使用する。

30

【0063】

本発明の化合物は、錠剤、カプセル (時限放出性または徐放性処方を各々含む)、丸剤、粉末、顆粒、エリキシル、チンキ剤、懸濁物、シロップおよび乳化物のような経口投薬形態で、投与され得る。同様に、それらはまた、静脈内の (ボラスおよび注入両方を含む)、腹腔内の、皮下形態のまたは筋肉内の形態、薬学分野の当業者に周知である全ての使用形態で投与され得る。望ましい化合物の有効であるが非毒性である量は、抗男性ホルモン薬剤として使用され得る。

【0064】

化合物を使用した投薬レジメンは、患者の型、種、年齢、体重、性別、および医療状態；治療される状態の重篤度；投与経路；患者の腎臓および肝臓の機能；ならびに使用される特定の化合物またはその塩を含む、様々な因子に従って選択される。普通に熟練した医師または獣医は、状態の進行を阻害し、逆らい、または阻止するために必要な薬物の有効量を容易に決定し得、処方し得る。

40

【0065】

本発明の経口投薬量は、指示された効果のために使用される場合、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100.0、250.0、500.0または1000.0mgの活性成分を含む、スコア付けされた錠剤の形態で、提供され得る。

50

【0066】

本発明の化合物は、一日あたり一回の投薬で、投与され得るか、または一日の全投薬量が、一日に二回、三回または四回の分割された用量で投与され得る。さらに、本発明について、好ましい化合物は、鼻腔内用形態において鼻腔内での適切なピヒクルの局所的な使用をとおして、または経皮的な経路で、当業者に周知の経皮的皮膚パッチの型を使用することによって、投与され得る。経皮的送達系の形態において投与されるためには、もちろん、投薬量の投与は、投薬レジメンの間中ずっと、断続的ではなく連続的である。他の好ましい局所的な調製は、クリーム、軟膏、ローション、エアロゾルスプレーおよびゲルを含む。ここで活性成分の濃度は、W/WまたはW/Vで、0.1%~15%の範囲である。

【0067】

本明細書中に詳細に記載されている化合物は、活性成分を形成し得、一般的に、投与の意図される形態、すなわち、経口錠剤、カプセル、エリキシル、シロップなど、および通常の薬学的な実施に一致させるという観点で、適切に選択された、適切な薬学的希釈剤、賦形剤またはキャリア（ひとまとめにして、「キャリア」物質として本明細書中でいう）との混合物において投与される。

10

【0068】

例えば、錠剤またはカプセルの形態での経口投薬の場合、活性な薬物成分は、エタノール、グリセロール、水などのような経口的で無毒性の薬学的に受容可能な不活性なキャリアと合わせられ得る。さらに、所望される場合または必要な場合、適切な結合剤、滑沢剤、崩壊剤および着色剤もまた、混合物中に組み込まれ得る。適切な結合剤は、テンブン、ゼラチン、グルコースまたはラクトースのような天然の糖、トウモロコシ甘味料、アカシア、トラガカントゴムまたはアルギン酸ナトリウムのような、天然または合成のガム、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。これらの投薬形態で使用される滑沢剤は、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、限定はないが、デンプン、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。

20

【0069】

本発明の化合物はまた、小さな単一層状小胞、大きな単一層状小胞、および多層状小胞のようなりポソーム送達系の形態で、投与され得る。リポソームは、コレステロール、ステアリン酸、またはホスファチジルコリンを含む、様々なリン脂質から形成され得る。いくつかの実施形態において、脂質成分のフィルムは、米国特許第5,262,564号に記載されているように、薬物をカプセルに内包する脂質層を形成するように薬物の水溶液で水和される。

30

【0070】

本発明の化合物はまた、標的化可能な薬物キャリアとしての可溶性ポリマーとともに連結され得る。そのようなポリマーは、ポリビニルピロリドン、ピラン共重合体、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、またはパルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシドポリリジンを含み得る。さらに、本発明の化合物は、例えば、ポリ乳酸、ポリイブシロンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、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されたブロック共重合体または両親媒性のブロック共重合体のような、薬物の制御された放出を達成するにおいて有用な、一クラスの生分解性のポリマーと連結され得る。

40

【0071】

上記の薬学的組成物はいずれも、0.1%から99%、好ましくは1%から70%の活性な化合物、特に、活性成分としての式Iの化合物を含み得る。

【0072】

(等価物)

本発明の特定の実施形態についての前記の詳細な説明から、生物学的膜を横切るトランス

50

ロケーションの独特な方法が、記載されてきたことは、明らかである。特定の実施形態が、詳細に本明細書中に開示されてきたが、これは、説明のみの目的で例としてなされ、そして、以下に続く添付された特許請求の範囲に関して、限定されることを意図されない。特に、様々な置換、変化、および改変は、特許請求の範囲で定義されるような、本発明の意図および範囲から逸脱することなく、本発明に対してなされ得ることが本発明者らにより意図される。例えば、細胞の特定の型またはトランスロケーションされるべき特定のエフェクターの選択は、本明細書中に記載されている実施形態の見識とともに当業者にとって慣用的事柄であると考えられる。

【0073】

本発明の一つまたはそれ以上の実施形態の詳細は、付随されている上記の説明中に述べられてきた。本明細書中に記載された方法および材料と類似または等価な任意の方法も材料が、本発明の実施または試験において使用され得る。好ましい方法および材料が、ここに記載される。本発明の他の特徴、目的および利点は、明細書および特許請求の範囲から明らかである。明細書および添付された特許請求の範囲中で、文脈が明らかに他を示していない限り、単数形は複数への参照を含む。他に定義されない限り、本明細書中で使用されている全ての専門用語および科学技術用語は、本発明が属している技術分野の当業者によって、一般に理解されているのと同じ意味を持つ。本明細書中で引用された全ての特許および刊行物は、参考として援用される。

10

【0074】

以下の実施例は、本発明の好まれる実施形態をより十分に説明するために提示される。これらの実施例は、添付された特許請求の範囲によって定義されるような、本発明の範囲を、いかようにも限定するように解釈されるべきではない。

20

【0075】

(実施例)

(実施例 I : 内在化ペプチドモチーフの同定)

以下の基準を満足する新規のファージ系中のファージディスプレイライブラリーは、本発明に含まれる：4マー～50マーのペプチド (> 400 コピー/ファージ) の多価提示；小さなサイズ (50 nM)；内在化ファージの効率的な回収；非内在性結合ファージの除去；および多数の個々のペプチド配列 (10⁹ より多くのヘプタペプチド配列を提示している 3 × 10⁸ 個の独立したクローン)。

30

【0076】

このライブラリーを、高分子の効率的なおよび特異的な細胞内送達を TC-3 細胞モデルに向けるペプチドモチーフの単離に首尾よく使用した。さらにこのライブラリーを、5つの異なった (非 の) 細胞株を用いて使用した。そして、それぞれの場合において、それぞれの細胞型に対して特異的なペプチドモチーフの富化を観測した。この手順の一般的な概観は、以下のとおりである。

【0077】

(選択/富化手順)

ファージディスプレイライブラリーを、多くのインシュリン分泌性細胞株、齧歯類およびヒトの単離された小島、ならびに FACS 精製細胞に対して、選り分け、そして、最後に小島の抽出および内在化ファージの回収の前に、動物 (マウス、ラット、ブタ) へ直接注射する。パニング手順は、ファージ添加、回収および増幅の少なくとも三つのサイクルからなる。あるいは、最も選択的なりガンドを単離するために、他の細胞型に結合するファージを、細胞に対するライブラリーを選り分ける前に、異なった非インシュリン分泌性細胞とともにそのライブラリーをインキュベーションすることによって減じる。リソソーム分解を止めるためのクロロキンを含んだ実験を、(44) に記載されているように実行する。これらの実験は、異なるペプチドキャリアを産生することを期待される。

40

【0078】

(ファージ特異性の決定)

パニングされたファージを単離し、多くの異なった細胞および器官とともにインキュベ

50

ションする。例えば、ある特定の試験において、パニングされたファージを、インシュリン分泌細胞および器官ならびに非インシュリン分泌細胞および器官と共にインキュベーションする。取り込みを、回収されたファージの数を数えることによって決定する。免疫細胞学の研究を、抗ファージ抗体を用いて行う。

【0079】

(ファージ保有ペプチドの特徴づけ)

単離されたファージ由来のDNAを、シーケンスし、発現されたペプチドが推定される。内在化を導くペプチドおよびこれらペプチドの変異バージョンを、化学的に合成し、N末端をFITCで標識するかまたはヨウ素化する。標識されたペプチドを、異なる細胞型に添加し、齧歯類およびヒトの小島を単離し、直接マウスに注射する。取り込みの特異性、細胞内の局在化、クリアランスおよび安定性を見積もる(56)。

10

【0080】

(生化学的アッセイ)

インシュリン分泌性細胞および非インシュリン分泌性細胞の解析のために、特徴付けられたペプチドを以下の3つの既知の配列に連結する：YVAD(カスパーゼ阻害剤(29)、配列番号35)、VQRKRQKLMP(NF-B核局在化阻害剤(30)、配列番号36)またはRPKRPTTLNLFPPQVPRSQDT(JNK阻害剤(17)、配列番号37)。これらのペプチドを、化学的に合成し、インシュリン分泌性細胞および非インシュリン分泌性細胞に添加する。カスパーゼ、NF-BおよびJNKを、一般的な活性化剤、エトポシド(57)またはアニソマイシン(58)によって活性化する。ペプチドによるカスパーゼ、NF-BおよびJNKの阻害を、細胞および非細胞で、研究した。これらの試験は、ペプチドキャリアが、活性コンフォメーションの潜在的な薬剤を細胞内に特異的に輸送するか否かを示す。

20

【0081】

(GLP-1レセプターによる潜在的な治療剤の取り込み)

GLP-1レセプター(GLP-1R)の発現は、主に脳および膵臓に限定される(66)。レセプターは、アゴニストの結合に続いて内在化される(56)。これらの特性は、GLP-1Rを、膵臓細胞中への治療剤の優先的な送達を媒介するための魅力的なツールにする。この特性は、上述のように評価される。例えば、GLP-1Rを用いて集められた情報は、強化された選択性を有する二重特異性二量体の設計を補助する。

30

【0082】

(GLP-1レセプターに対する他の内在化モチーフの同定)

GLP-1RでトランスフェクトされたCOS-7細胞は、上述の富化実験のための基質として作用する。新しく同定されたモチーフを、それらの特異性およびエンドサイトーシスを導く能力について評価する。

【0083】

(全D-レトロインベルソ(retro-inverso)ペプチドの産生)

いくつかの実施形態において、ペプチドを、レトロインベルソペプチドとして合成し得る。増強された安定性および低い免疫原性を有する、全D-レトロインベルソペプチドを上記のように解析する。

40

【0084】

進化は、天然に存在するタンパク質におけるL-アミノ酸のほぼ排他的な存在を確実にしてきた。従って、実質的に全てのプロテアーゼは隣接するL-アミノ酸の間でペプチド結合を切断する；従って、人工的なタンパク質またはD-アミノ酸から構成されるペプチドは、たいていタンパク質分解による分解に耐性である。この耐性は、ドラッグデザイナーにとって魅力的なものであったが、L-アミノ酸から作製されたタンパク質に対する生物学的な系の排他性は、そのようなタンパク質が、エナンチオマーのタンパク質によって形成された鏡像面と相互作用できないということを意味している。従って、全てD-アミノ酸のタンパク質はたいてい、生物学的効果または活性を持たない。

【0085】

50

線状の修飾されたレトロペプチドの構造は、長期にわたって研究されてきた (Goodman, 10M, ら、「On the Concept of Linear Modified Retro-Peptide Structures」、Accounts of Chemical Research, 12(1)、1-7(1979年1月))。そして、用語「レトロ異性体」は配列の方向が親ペプチドに比べて逆になっている異性体を含むように意図された。「レトロインベルソ (retro-inverso) 異性体」は、その中で配列の方向が逆になっていて、各々のアミノ酸残基のキラリティーが逆である、線状ペプチドの異性体を意味する。従って、末端基の相補性が存在し得ない。

【0086】

より最近、Jamesonらは、伝えるところによれば、これら二つの特性：逆合成 (reverse synthesis) およびキラリティーの変化 (a change in chirality) を組み合わせることによって、CD4レセプターのヘアピンループのアナログを、操作した (Jamesonら、A rationally designed CD4 analogue inhibits experimental allergic encephalomyelitis、Nature、368、744-746(1994) および Bradyら、Reflection on a Peptide、Nature、368、692-693(1994))。D-エナンチオマーと逆合成とを組合せた最終的な結果は、各々のアミド結合中のカルボニル基およびアミノ基の位置が交換され、一方、各々の炭素での側鎖の基の位置は保存されていることである。Jamesonらは、伝えるところによれば、それら逆向きのDペプチドについて生物学的活性の増加を実証した。それは、普通の全Lエナンチオマーのインビボでの限定された活性 (タンパク質分解への感受性による) と対照的である。

【0087】

部分的に修飾されたレトロインベルソ偽ペプチドは、ヒトクラスI組織適合性分子HLA-A2に対する非天然リガンドとしての使用が報告されてきた (Guichardら、Partially Modified Retro-Inverso Pseudopeptides as a Non-Natural Ligands for the Human Class I Histocompatibility Molecule HLA-A2、1.Med.Chem.39、2030-2039(1996))。その著者らは、そのような非天然リガンドが、増強された安定性および高いMHC結合能力を有していたことを報告する。

【0088】

レトロインベルソペプチドを、以下のような方法で、既知の配列のペプチドに対して調製する。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、レトロインベルソペプチドアナログを設計し、合成するためのモデルペプチドとして選択する。レトロインベルソペプチドアナログ中のアミノ酸の配列が、モデルとして作用する選択されたペプチド中の配列と、正確に逆であるように、ペプチド鎖中のアミノ酸を結合することによって、Dアミノ酸を使用してそのアナログを合成する。例示のために、ペプチドモデルが配列ABCを有するLアミノ酸から成るペプチドである場合、Dアミノ酸から成るレトロインベルソペプチドアナログは、配列CBAを有する。レトロインベルソペプチドを形成するためにDアミノ酸の鎖を合成する手順は、当該技術分野において既知であり、上記参考文献中で説明されている。

【0089】

天然のペプチドに固有の問題は、天然のプロテアーゼによる分解であるので、本発明のペプチドは、所望のペプチドの「レトロインベルソ異性体」 (retro-inverso isomer) を含むように調製され得る。従って、天然のタンパク質分解からペプチドを保護することは、特異的なヘテロ二価化合物またはヘテロ多価化合物の有効性を増大するはずである。

【0090】

天然のプロテイナーゼによる分解から保護するための非レトロインベルソ含有アナログと

比較する場合、より高い生物学的活性は、レトロインベルソ含有ペプチドに対して予想される。

【0091】

(修飾ペプチドの産生)

いくつかの実施形態において、ペプチドを、修飾ペプチドとして合成し得る。修飾ペプチドは上記のように解析される。

【0092】

アナログは、アミノ酸配列で、または配列に影響しない修飾で、またはその両方で、天然のペプチドと異なり得る。好ましいアナログは、その配列が野生型の配列(すなわち、天然に存在するペプチドの相同部位の配列)と、保存的アミノ酸置換でのみ、好ましくは、一つのみの、二つのみの、または三つのみの置換、例えば、一つのアミノ酸の他の似た性質を持つアミノ酸への置換(例えば、バリンからグリシン、アルギニンからリジンなど)または、ペプチドの生物学的活性を完全に破壊しない、一つ以上の非保存的アミノ酸置換、欠失、もしくは挿入だけ、異なるペプチドを含む。

10

【0093】

修飾(通常、一次配列を変えない)は、インピボまたはインピトロでのペプチドの化学的誘導体化(例えば、アセチル化またはカルボキシル化)を含む。グリコシル化の修飾体、例えば、その合成および処理過程中またはさらなる処理工程において、ペプチドのグリコシル化のパターンを改変することによって、例えば、ペプチドをグリコシル化に影響を与える酵素(例えば、哺乳類のグリコシル化酵素または脱グリコシル化酵素)にさらすこと

20

【0094】

本発明は、一つ以上のペプチド結合が、ペプチダーゼによる切断に感受性ではない、共有結合の代替型で置換されたアナログ(ペプチド模倣物)を含む。被験体への注射後に、ペプチドのタンパク質分解が問題になる場合、特に感受性のペプチド結合を切断性のないペプチド模倣物に置換することは、得られるペプチドを、より安定でそして治療剤としてより有用にする。そのようなミメティックス、およびそれらをペプチドに組込む方法は、当該技術分野において周知である。t-ブチルオキシカルボニル、アセチル、テノイル(thetyl)、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-ジニトロフェニルのような、アミノ末端ブロック基もまた有用である。ペプチドの荷電したアミノ末端およびカルボキシル末端をブロックすることは、疎水性の細胞膜を介した細胞内へのペプチドの増強された通過という追加の利点を有する。

30

【0095】

(多価ペプチドの産生)

多価リガンドは、数オーダーの大きさにまで増大されたアビディティを示す(60)。その親和性は、増大された速度の内在化で翻訳する(42)。単一特異的な二量体は高いアビディティを示し、二重特異的な二量体は特異的な細胞標的化剤としての、実施上の可能性を強化し得るより高度な選択性を有しそうである(61)。多価のペプチド(単一特異的および多数特異的の両方)を、例えば、柔軟なペプチジル骨格または糖ベースの骨格のいずれかを有する、ペプチド模倣物として合成する(61-63)。

40

【0096】

(細胞内局在化)

単離された異なるペプチド配列は、異なった細胞区画(例えば、核、ミトコンドリア、細胞質など)に局在化し得る。これは、ヨウ素化ペプチドおよびFITC標識ペプチドを用いて注意深く見積もられる。この情報は、機能の研究の設計に使用される。例えば、細胞質に蓄積しているペプチドは、NF- κ B核移行を阻害されるために好まれるのに対して、核に入るペプチドは、JNKの阻害に最も適している。いくつかの実施形態において、

50

核局在化モチーフのような配列を、キャリアを適切な区画に向けなおすために加える。

【0097】

(機能の研究)

カスパーゼ阻害剤、NF- κ B阻害剤またはJNK阻害剤に連結した、細胞標的化ペプチド(例えば、LエナンチオマーまたはDエナンチオマー、多価のペプチド)を、細胞株、FACS精製細胞および単離されたヒト小島ならびに齧歯類小島に加えた。アポトーシスを、IL- γ (TNF α およびIFN γ とともに)によって誘導し、アポトーシス耐性を評価する。

【0098】

(インビボ実験)

NODマウスに、糖尿病前状態および糖尿病後状態中にエフェクターペプチド(カスパーゼ阻害剤、NF- κ B阻害剤またはJNK阻害剤に連結した細胞標的化ペプチド)を注射する。注射の投薬量および頻度を、上記のとおり決定する。その後、糖尿病の発生を測定する。

【0099】

(免疫原性アッセイ)

ペプチドの免疫原的可能性を、齧歯類およびウサギで評価する。

【0100】

(クローニング)

特定の細胞による、効率的な取り込みを方向付けるペプチドモチーフを、実施例IIIに記載する。これらのペプチドを、確立された手順を用いて、例えば、INS-1、TC-3およびヒト小島cDNAライブラリー由来の同起源のレセプターのクローニングおよび特徴づけに使用する(64; 65)。

【0101】

(特徴づけ)

クローン化されたレセプターの組織分布を、インシュリン分泌性細胞ならびに器官およびインシュリン非分泌性細胞ならびに器官のノーザンブロットおよびウエスタンブロットによって評価する。結合の動力学、クリアランスおよび取り込みの特異性を、COS-7細胞中のレセプターの一時的なトランスフェクションによって評価する。コントロールペプチドは、変異した配列および例えば、GLP-1、GIP、グルカゴン、セクレチンなどのような、公知のペプチドである。これらのレセプターに対する代替の内在化モチーフを、上記のように、トランスフェクトしたCOS-7細胞でライブラリーを選り分けることによって特徴付ける。

【0102】

(実施例II:実験の手順の方法)

(ファージの調製および富化手順)

キャプシドの表面にランダムな15マーのエピトープを提示している 3×10^8 の独立したファージのライブラリーを、標準の手順を使用することによって生成した(67)。ファージを増幅し、その後、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿によって精製し、最後に、記載されているように(67)、Tris-EDTA緩衝液(10:1 mM、TE)中に1マイクロリットルあたり 10^{10} の感染粒子の濃度に再懸濁した。ファージ(10^{12})を、1時間から24時間の間、培養培地中の細胞に加えた。より長いインキュベーション時間は、エンドサイトーシス小胞中でタンパク質分解を逃れたファージの単離を有利にするために好適であった。結合および内在化に続いて、細胞を洗浄し、非内在化ファージをズブチリシン(3 mg/ml)(44)による消化によって破壊した。広範囲の洗浄に続いて、その後、内在化したファージを2%デオキシコレート、10 mM Tris-HClおよび2 mM EDTA、pH 8.0を含む緩衝液中で細胞を溶解することによって、回収した。回収したファージを、最後にE. coli細胞(XL-1-Blue)で増幅し、上記のとおり精製した。その後、この富化されたファージの調製物を、2回目の富化に使用する。3回から5回連続して、特定のファージ保有ペプチド配列の富化を得

10

20

30

40

50

るために実行した。

【0103】

(免疫細胞化学および蛍光の研究)

上記富化スキームに沿って単離された単一のファージを、増幅し、培養培地中の細胞に24時間加えた。その後、培地を洗い落とし、細胞を5分間、冷メタノール-アセトン(1:1)で固定した。ファージキャプシドに対して方向付けられた抗体を、フルオレセイン結合体二次抗体とともに使用した。古典的な蛍光顕微鏡的研究アッセイおよび共焦点顕微鏡アッセイを実行した。組織を、処理前にパラフィン中に埋め込んだ。

【0104】

(ペプチド)

ペプチドを、C末端アミド基と共におよび、必要ならば、FITCで標識するかまたはヨウ素化して、古典的なF-moc化学(Auspap, Australia)を使用することによって合成した。すべてのペプチドを、HPLCで精製し、質量分析法で解析した。

10

【0105】

(生化学的研究)

JNK、NF- κ Bおよびカスパーゼが、異なる細胞株(例えば、TC-3、INS-1、HeLa、WiDr、HepG2、NIH3T3、COS-7)中で、エトポシド(VP-16、Alexis)で1時間かけて、活性化される1時間前に、ペプチドを加える。細胞抽出物を、JNK活性(基質として、c-Junを用いた固相JNKアッセイを用いて(68))、NF- κ B核移行(電気泳動的移動度シフトアッセイ(30))およびカスパーゼ活性(入手可能な市販のキットおよびUpstate Biochemicals)抗体を用いて)について処理する。

20

【0106】

(アポトーシスの測定)

アポトーシスを、Hoechst 33342および前述のような(68; 69)ヨウ素化プロピジウムを組合わせて使用することによって測定する。

【0107】

(小島)

小島をGotohら(70)の方法で単離する。ヒト小島を「Insel Spital」(Bern, Switzerland)から得る。

30

【0108】

(マウス)

注射の正確な投薬量および時間枠を、各々のペプチドに対して最適化する。しかし、JNK1ペプチドを用いた以前の実験は、2日毎に投薬される、PBS中の1mMペプチド溶液100 μ lが、妥当なスタート地点であることを示す。

【0109】

(ZAP発現ライブラリー)

ZAP発現性原核生物/真核生物発現ベクター中のINS-1 cDNAライブラリーは、IB1 cDNAおよびIB2 cDNA(71, 72)をクローニングするために使用されてきた。このライブラリーは、単純なヘルパーファージの除去(Stratagene)によって、真核生物のCMVプロモーターの制御下で、容易にプラスミドライブラリーへ転換される。

40

【0110】

(実施例III:ファージディスプレイライブラリーのパニングおよび内在化したペプチドモチーフの特徴づけ)

薬物送達のために細胞を特異的に標的化する能力は、I型糖尿病の処置において、絶大な影響を有する。本質的に細胞の機能(すなわち、インシュリン分泌)を変えない細胞破壊のプロッカーは、すでに存在(例えば、JBD、bc1-2)し、これらの分子のうちの一つ(JBD)の小さなペプチドへの変換は、完全な生物学的活性を保持すること

50

が示されてきた。

【0111】

脾臓細胞株 TC-3 を、本明細書中に記載されるファージディスプレイライブラリーによってパニングした。回収されたファージの数を選択的に富化することは、以下の表1 中に見られるように、選択の各々のサイクルで観測された。TC-3 細胞を使用するパニング実験を、富化手順の各々の工程で使用される 10^9 個のファージを用いて実行した。0 度で回収されたファージの数（エンドサイトーシスなし）は、100 未満であり、これは、細胞外にあるが内在化せずに結合したファージのバックグラウンドが、本明細書中に記載されている条件下で極端に低いことを示す。

【0112】

【表1】

表1

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

TC-3 細胞株中での3段階のパニングの後、回収されたファージの出現率は、表2 に見られる。

【0113】

【表2】

表2

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

滴定実験を、表3 に示された時間、TC-3 細胞とともにインキュベーションされたファージ P1（配列番号1）を用いて実行した。投入ファージ/回収ファージの比もまた、示される。滴定実験は、最初の P1 ファージ投入の10%ほどが回収され得るということを示した。

【0114】

【表3】

表3

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

取り込みの特異性の決定を、5 個の異なる細胞株で回収されたファージの数を滴定することによって、実行した。ファージ (10^8) を、指示された細胞株とともに16 時間インキュベーションし、内在化したファージおよび回収したファージの数を表4 に見られるように計算した。インテグリン内在化モチーフを提示するコントロールファージは、すべての細胞株に対して回収されたファージと似た数 ($1 \sim 3 \times 10^6$) を示した。これは、P1（配列番号1）が TC-3 細胞によって、テストされた他のどの細胞株よりも、10

10

20

30

40

50

, 000 から 1, 000, 000 倍効率的に取り込まれることを示す。

【0115】

【表4】

表4

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

10

次いで、ペプチドをファージ P 1 に提示されたペプチドの配列から合成した。P 1 5 マーペプチドの配列を、FITC で標識した 10 アミノ酸のランダム配列と連結した。コントロール配列は、P 1 5 マー配列を (Ala)₅ で置き換えたことを除いて、同一である。ペプチド (10 μM) を、1 時間細胞に加え、細胞を洗浄し、冷メタノール-アセトン (1:1) で固定した。FITC で標識した P 1 ペプチドは、βTC-3 細胞中で可視化され得たが、他の細胞型では可視化されなかった。

【0116】

富化の最終サイクルでの、20 の回収されたファージの配列解析を、表 5 に示す。重要なことに、すべての配列は、5 アミノ酸の同一の保存されたコンセンサス配列を厳密にもった。このことは、ファージの効率的な取り込みを導く、保存されたモチーフの特異的な選択/富化を示唆する。このようにして得られたペプチドモチーフの大部分は、プロタンパク質コンベルターゼコンセンサス R - X - X - R をもつ。この観察は、強力な薬物および巨大分子の特定の細胞型への細胞内送達のためのビヒクルとしてプロタンパク質コンベルターゼを使用する提唱の基礎を築く。

20

【0117】

【表5】

表5

	細胞型	配列ID	配列	配列番号
1.	脾臓β細胞	P1	RRTK	1
2.		P6	RKLR	2
3.		P66	RRPK	3
4.		I2	PTAKPTYTK	4
5.		I6	IQNGRQVGCLTNK	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.	大腸癌	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
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	RRVVG	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

10

20

30

参考文献

【0118】

【表6】

参考文献

1. Mandrup-Poulsen, T. 1998. "Diabetes". *BMJ*. 316:1221.
2. Mandrup-Poulsen, T. 1996. "The role of interleukin- 1 in the pathogenesis of IDDM". *Diabetologia* 39:1005.
3. Nerup, J., T. Mandrup-Poulsen, J. Molvig, S. Helqvist, L. Wogensen, and J. Egeberg. 1988. "Mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in type I diabetes". *Diabetes Care* 11 Suppl 1:16.
4. Mauricio, D. and T. Mandrup-Poulsen. 1998. "Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death". *Diabetes* 47:1537. 10
5. Iwahashi, H., N. Itoh, K. Yamagata, A. Imagawa, H. Nakajima, K. Tomita, M. Moriwaki, M. Waguri, K. Yamamoto, J. Miyagawa, M. Namba, T. Hanafusa, and Y. Matsuzawa. 1998."Molecular mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in autoimmune diabetes: potential targets for preventive therapy". *Cytokines. Cell Mol. Ther.* 4:45.
6. Sjöholm, A. 1998. "Aspects of the involvement of interleukin- I and nitric oxide in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus". *Cell Death.Differ.* 5:461.
7. Stephens, L.A., H.E. Thomas, and T.W. Kay. 1997." Protection of NIT-I pancreatic beta-cells from immune attack by inhibition of NF-kappaB". *J.Autoimmun.* 10:293. 20
8. Rabinovitch, A., W. Suarez-Pinzon, K. Strynadka, Q. Ju, D. Edelstein, M. Brownlee, G.S. Korbutt, and R.V. Rajotte. 1999. "Transfection of human pancreatic islets with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction". *Diabetes* 48:1223.
9. Bleich, D., S. Chen, B. Zipser, D. Sun, C.D. Funk, and J.L. Nadler. 1999. "Resistance to type I diabetes induction in 12-lipoxygenase knockout mice". *J. Clin.Invest.* 103:1431.
10. Welsh, M., L. Christmansson, T. Karlsson, S. Sandler, and N. Welsh. 1999. "Transgenic mice expressing Shb adaptor protein under the control of rat insulin promoter exhibit altered viability of pancreatic islet cells". *Mol.Med.* 5:169. 30
11. Chen, G., H.E. Hohmeier, R. Gasa, V.V. Tran, and C.B. Newgard. 2000. "Selection of insulinoma cell lines with resistance to interleukin-1beta- and gamma-interferon-induced cytotoxicity". *Diabetes* 49:562.
12. Flodstrom, M., B. Tyrberg, D.L. Eizirik, and S. Sandler. 1999. "Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes". *Diabetes* 48:706.

13. Wang, L., A. Bhattacharjee, Z. Zuo, F. Hu, R.E. Honkanen, P.O. Berggren, and M. Li. 1999. "A low voltage-activated Ca²⁺ current mediates cytokine-induced pancreatic beta-cell death". *Endocrinology* 140:1200.
14. Yamada, K., F. Ichikawa, S. Ishiyama-Shigemoto, X. Yuan, and K. Nonaka. 1999. "Essential role of caspase-3 in apoptosis of mouse beta-cells transfected with human Fas". *Diabetes* 48:478.
15. Larsen, C.M., K.A. Wadt, L.F. Juhl, H.U. Andersen, A.E. Karlsen, M.S. Su, K. Seedorf, L. Shapiro, C.A. Dinarello, and T. Mandrup-Poulsen. 1998. "Interleukin-1beta-induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases". *J.Biol.Chem.* 273:15294. 10
16. Yoon, J.W., C.S. Yoon, H.W. Lim, Q.Q. Huang, Y. Kang, K.H. Pyun, K. Hirasawa, R.S. Sherwin, and H.S. Jun. 1999. "Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells". *Science* 284:1183.
17. Bonny, C., A. Oberson, S. Negri, S. Stem, and D.F. Schorderet. 2000. "Cell-permeable peptide inhibitors of JNK with biological activity in mice". *Diabetes* 49: in Press.
18. Iwahashi, H., T. Hanafusa, Y. Eguchi, H. Nakajima, J. Miyagawa, N. Itoh, K. Tomita, M. Namba, M. Kuwajima, T. Noguchi, Y. Tsujimoto, and Y. Matsuzawa. 1996. "Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2". *Diabetologia* 39:530. 20
19. Dupraz, P., C. Rinsch, W.F. Pralong, E. Rolland, R. Zufferey, D. Trono, and B. Thorens. 1999. "Lentivirus-mediated Bcl-2 expression in betaTC-tet cells improves resistance to hypoxia and cytokine-induced apoptosis while preserving in vitro and in vivo control of insulin secretion". *Gene Ther.* 6:1160.
20. Giannoukakis, N., W.A. Rudert, S.C. Ghivizzani, A. Gambotto, C. Ricordi, M. Trucco, and P.D. Robbins. 1999. "Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1beta-induced beta-cell impairment and activation of islet cell apoptosis in vitro". *Diabetes* 48:1730.
21. Gibbs, J.B. 2000. "Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research". *Science* 287:1969. 30
22. Burns, K., F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J.L. Bodmer, F. Di Marco, L. French, and J. Tschoopp. 1998. "MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling". *J.Biol.Chem.* 273:12203.
23. Stephens, L.A., H.E. Thomas, L. Ming, M. Grell, R. Darwiche, L. Volodin, and T.W. Kay. 1999. "Tumor necrosis factor-alpha-activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells". *Endocrinology* 140:3219.

24. Ammendrup, A., A. Oberson, K. Nielsen, N. Andersen, P. Serup, O. Madsen, T. Mandrup-Poulsen, and C. Bonny. 2000. "The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic β -cells". *Diabetes* 49: In Press.
25. Hawiger, J. 1999. "Noninvasive intracellular delivery of functional peptides and proteins". *Curr.Opin.Chem.Biol.* 3:89.
26. Schwarze, S.R., A. Ho, A. Vocero-Akbani, and S.F. Dowdy. 1999. "In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse". *Science* 285:1573.
27. Brugidou, J., C. Legrand, J. Mery, and A. Rabie. 1995. "The retro-inverso form of a homeobox-derived short peptide is rapidly internalised by cultured neurones: a new basis for an efficient intracellular delivery system". *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 214:685. 10
28. Oehlke, J., A. Scheller, B. Wiesner, E. Krause, M. Beyemiann, E. Klauschenz, M. Melzig, and M. Bienert. 1998. "Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically". *Biochim.Biophys.Acta* 1414:127.
29. Rouquet, N., J.C. Pages, T. Molina, P. Briand, and V. Joulin. 1996. "ICE inhibitor YVADcmk is a potent therapeutic agent against in vivo liver apoptosis". *Curr.Biol.* 6:1192. 20
30. Lin, Y.-Z., S. Yao, R.A. Veach, T.R. Torgerson, and J. Hawiger. 1995. "Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence". *J.Biol.Chem.* 270:14255.
31. Torgerson, T.R., A.D. Colosia, J.P. Donahue, Y.Z. Lin, and J. Hawiger. 1998. "Regulation of NF-kappa B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappa B p50". *J.Immunol.* 161:6084.
32. Gibbs, J.B. and A. Oliff 1994. "Pharmaceutical research of molecular oncology". *Cell* 79:193.
33. de Jong, M., W.H. Bakker, B.F. Bernard, R. Valkema, D.J. Kwekkeboom, J.C. Reubi, A. Srinivasan, M. Schmidt, and E.P. Krenning. 1999. "Preclinical and initial clinical evaluation of ¹¹¹In-labeled nonsulfated CCK8 analog: a peptide for CCK-B receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy". *J.Nucl.Med.* 40:2081. 30
34. Breeman, W.A., L.J. Hofland, M. de Jong, B.F. Bernard, A. Srinivasan, D.J. Kwekkeboom, T.J. Visser, and E.P. Krenning. 1999. "Evaluation of radiolabelled bombesin analogues for receptor-targeted scintigraphy and radiotherapy". *Int.J. Cancer* 81:658.

35. Hofland, L.J., W.A. Breeman, E.P. Krenning, M. de Jong, M. Waaijers, P.M. van Koetsveld, H.R. Macke, and S.W. Lamberts. 1999. "Internalization of [I 251-Tyr3]Ocreotide by somatostatin receptor-positive cells in vitro and in vivo: implications for somatostatin receptor-targeted radio-guided surgery". *Proc.Assoc.Am.Physicians*. 111:63.
36. Kato, Y. and Y. Sugiyama. 1997. "Targeted delivery of peptides, proteins, and genes by receptor-mediated endocytosis". *Crit.Rev. Ther.Drug Carrier.Syst*. 14:287.
37. Anderson, C.L. 1989. "Human IgG Fc receptors". *Clin.Immunol.Immunopathol*. 53:563.
38. Lund, K.A., L.K. Opresko, C. Starbuck, B.J. Walsh, and H.S. Wiley. 1990. "Quantitative analysis of the endocytic system involved in hormone-induced receptor internalization". *J.Biol.Chem*. 265:15713. 10
39. Smith, R.M. and L. Jarett. 1988. "Receptor-mediated endocytosis and intracellular processing of insulin: ultrastructural and biochemical evidence for cell-specific heterogeneity and distinction from nonhormonal ligands". *Lab.Invest*. 58:613.
40. Soler, A.P., J. Alemany, R.M. Smith, F. de Pablo, and L. Jarett. 1990. "The state of differentiation of embryonic chicken lens cells determines insulin-like growth factor I internalization". *Endocrinology* 127:595.
41. Widmann, C., W. Dolci, and B. Thorens. 1995. "Agonist-induced internalization and recycling of the glucagon-like peptide-1 receptor in transfected fibroblasts and in insulinomas". *Biochem.J*. 310:203. 20
42. York, S.J., L.S. Arneson, W.T. Gregory, N.M. Dahms, and S. Kornfeld. 1999. "The rate of internalization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor H receptor is enhanced by multivalent ligand binding". *J.Biol.Chem*. 274:1164.
43. Mukherjee, S., R.N. Ghosh, and F.R. Maxfield. 1997. "Endocytosis". *Physiol.Rev*. 77:759.
44. Ivanenkov, V., F. Felici, and A.G. Menon. 1999. "Uptake and intracellular fate of phage display vectors in mammalian cells". *Biochem.Biophys.Acta* 1448:450.
45. Cabibbo, A., E. Sporeno, C. Toniatti, S. Altamura, R. Savino, G. Paonessa, and G. Ciliberto. 1995. "Monovalent phage display of human interleukin (hIL)-6: selection of superbinder variants from a complex molecular repertoire in the hIL-6 D-helix". *Gene* 167:41. 30
46. Zwick, M.B., J. Shen, and J.K. Scott. 1998. "Phage-displayed peptide libraries". *Curr.Opin.Biotechnol*. 9:427.

35. Hofland, L.J., W.A. Breeman, E.P. Krenning, M. de Jong, M. Waaijers, P.M. van Koetsveld, H.R. Macke, and S.W. Lamberts. 1999. "Internalization of [I 251-Tyr3]Ocreotide by somatostatin receptor-positive cells in vitro and in vivo: implications for somatostatin receptor-targeted radio-guided surgery". *Proc.Assoc.Am.Physicians*. 111:63.
36. Kato, Y. and Y. Sugiyama. 1997. "Targeted delivery of peptides, proteins, and genes by receptor-mediated endocytosis". *Crit.Rev. Ther.Drug Carrier.Syst*. 14:287.
37. Anderson, C.L. 1989. "Human IgG Fc receptors". *Clin.Immunol.Immunopathol*. 53:S63.
38. Lund, K.A., L.K. Opresko, C. Starbuck, B.J. Walsh, and H.S. Wiley. 1990. "Quantitative analysis of the endocytic system involved in hormone-induced receptor internalization". *J.Biol.Chem*. 265:15713. 10
39. Smith, R.M. and L. Jarett. 1988. "Receptor-mediated endocytosis and intracellular processing of insulin: ultrastructural and biochemical evidence for cell-specific heterogeneity and distinction from nonhormonal ligands". *Lab.Invest*. 58:613.
40. Soler, A.P., J. Alemany, R.M. Smith, F. de Pablo, and L. Jarett. 1990. "The state of differentiation of embryonic chicken lens cells determines insulin-like growth factor I internalization". *Endocrinology* 127:595.
41. Widmann, C., W. Dolci, and B. Thorens. 1995. "Agonist-induced internalization and recycling of the glucagon-like peptide-1 receptor in transfected fibroblasts and in insulinomas". *Biochem.J*. 310:203. 20
42. York, S.J., L.S. Arneson, W.T. Gregory, N.M. Dahms, and S. Kornfeld. 1999. "The rate of internalization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor H receptor is enhanced by multivalent ligand binding". *J.Biol.Chem*. 274:1164.
43. Mukherjee, S., R.N. Ghosh, and F.R. Maxfield. 1997. "Endocytosis". *Physiol.Rev*. 77:759.
44. Ivanenkov, V., F. Felici, and A.G. Menon. 1999. "Uptake and intracellular fate of phage display vectors in mammalian cells". *Biochem.Biophys.Acta* 1448:450.
45. Cabibbo, A., E. Sporeno, C. Toniatti, S. Altamura, R. Savino, G. Paonessa, and G. Ciliberto. 1995. "Monovalent phage display of human interleukin (hIL)-6: selection of superbinder variants from a complex molecular repertoire in the hIL-6 D-helix". *Gene* 167:41. 30
46. Zwick, M.B., J. Shen, and J.K. Scott. 1998. "Phage-displayed peptide libraries". *Curr.Opin.Biotechnol*. 9:427.

61. Carrithers, M.D. and M.R. Lerner. 1996. "Synthesis and characterization of bivalent peptide ligands targeted to G-protein-coupled receptors". *Chem.Biol.* 3:537.
62. Zeng, W., D.C. Jackson, and K. Rose. 1996. "Synthesis of a new template with a built-in adjuvant and its use in constructing peptide vaccine candidates through polyoxime chemistry". *J.Pept.Sci.* 2:66.
63. Ulbrich, K., V. Subr, I. Strohal, D. Plocova, M. Jefinkova, and B. Rihova. "Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules. I. Synthesis and physico-chemical characterisation". *J.Controlled Release*.2000 Feb. 14.;64.(1.-3.):63.-79. 64:63.
64. Thorens, B. 1992. "Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1". *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 89:8641. 10
65. Volz, A., R.Goke, B. Lankat-Buttgereit, H.C. Fehmann, H.P. Bode, and B.Goke. 1995. "Molecular cloning, functional expression, and signal transduction of the GIP-receptor cloned from a human insulinoma". *FEBS Lett.* 373:23.
66. Yamato, E., H. Ikegami, K. Takekawa, T. Fujisawa, Y. Nakagawa, Y. Hamada, H. Ueda, and T. Ogihara. 1997. "Tissue-specific and glucose-dependent expression of receptor genes for glucagon and glucagon-like peptide-1 (GLP-1)". *Horm.Metab.Res.* 29:56.
67. Smith, G.P. and J.K. Scott. 1993. "Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage". *Methods Enzymol.* 217:228. 20
68. Bonny, C., A. Oberson, M. Steinmann, D.F. Schorderet, P. Nicod, and G. Waeber. 2000. "IB1 reduces cytokine-induced apoptosis of insulin-secreting cells". *J.Biol.Chem.* 275:16466.
69. Hoorens, A., M. Van de Casteele, G. Kloppel, and D. Pipeleers. 1996. "Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program". *J.Clin.Invest.* 98:1568.
70. Gotoh, M., T. Maki, S. Satomi, J. Porter, S. Bonner-Weir, C.J. O'Hara, and A.P. Monaco. 1987. "Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection". *Transplantation* 43:725. 30
71. Bonny, C., P. Nicod, and G. Waeber. 1998. "IB1, a JIP-I-related nuclear protein present in insulin-secreting cells". *J.Biol.Chem.* 273:1843.
72. Negri, S., A. Oberson, M. Steinmann, P. Nicod, G. Waeber, D.F. Schorderet, and C. Bonny. 2000. "cDNA cloning and mapping of a novel islet-brain/JNK interacting protein". *Genomics* 64:324.

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/31109 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
- (21) International Application Number: PCT/IB01/02423
- (22) International Filing Date: 15 October 2001 (15.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/240,315 13 October 2000 (13.10.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF LAUSANNE [CH/CH], Rue de Bugnon 21, CH-1005 Lausanne (CH).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): BONNY, Christophe [CH/CH]; Chief Research Unit, Division of Medical Genetics, CHUV, Falaises 1, CH-1011 Lausanne (CH).
- (74) Agent: BUGNION S.A.; Case 375, CH-1211 Geneva 12 (CH).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/31109 A2

(54) Title: INTRACELLULAR DELIVERY OF BIOLOGICAL EFFECTORS

(57) Abstract: The invention relates to a sequence of amino acids with the capacity to facilitate transport of an effector across a biological membrane. More specifically, the present invention relates to novel peptide transporters that specifically target certain cell types for the intracellular delivery of drugs and therapeutic agents.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

INTRACELLULAR DELIVERY OF BIOLOGICAL EFFECTORS**TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION**

The invention relates to the field of molecular biology.

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 Techniques enabling efficient transfer of a substance of interest from the external medium into cells, and particularly to cellular nuclei, are of considerable interest in the field of biotechnology. These techniques may be useful for protein or peptide production, for regulation of gene expression, for analysis of intracellular signaling channels and for the analysis of the effect of transport of a variety of different substances into a cell (or cell
10 nucleus). One important application of such a technique is gene therapy. However, it is limited by the inability of the gene transfer vectors to transfer the biologically active substance into the cytoplasm or nuclei of cells in the host to be treated without affecting the host genome or altering the biological properties of the active substance.

Several techniques have been developed in an effort to efficiently transfer DNA into
15 cells. Representative examples include coprecipitating DNA with calcium phosphate or DEAE-dextran or electroporation, both of which enable DNA to penetrate the plasma membrane and then enter the cell and/or nucleus. Both of these techniques suffer from low transfer efficiency and a high percentage of cell death. Other methods employ a conjugate of a virus-related substance with a strong affinity for DNA and a nucleic acid. However, the
20 viral conjugates are difficult to use, and there are some risks related to the use of virus components. See, *e.g.*, US patent No. 5,521,291. Receptor-mediated endocytosis is also widely exploited in experimental systems for the targeted delivery of therapeutic agents into cells (36). Ligand-containing complexes are either selectively internalized by receptors located in the cell membrane which are specific for the ligands, or by specific antibodies
25 located in membrane constituents. Endocytotic activity has been described for many receptors including IgG Fc, somatostatin, insulin, IGF-I and II, transferrin, EGF, GLP-1, VLDL or integrin receptors (35;37-43).

Protein convertases are also an example of a cell surface receptor which gets internalized through receptor mediated endocytosis. These proteins have been shown to be
30 responsible for conversion of precursors of peptide hormones, neuropeptides, and many other

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

proteins into their biologically active forms. All cleavage sites for the proprotein convertase family obey to the consensus R-X-X-R. The mammalian proprotein convertases can be classified into three groups on the basis of their tissue distribution. Furin, PACE4, PC5/PC6, and LPCIPC7/PC8/SPC7 are expressed in a broad range of tissues and cell lines. In contrast, expression of PC2 and PC1/PC3 is limited to neuroendocrine tissues, such as pancreatic islets, pituitary, adrenal medulla and many brain areas. Expression of PC4 is highly restricted to testicular spermatogenic cells. The neuroendocrine-specific convertases, PC2 and PC1/PC3, are mainly localized in secretory granules. PC5/PC6A has also been reported to be localized to secretory granules. Furthermore, indirect evidence has suggested that a proportion of proprotein convertases molecules is present on the cell surface, and it has been shown that furin cycles between the TGN and the cell surface (reviewed in (1)). Taken together, these properties indicate that proprotein convertases transport extracellular ligands into the intracellular space.

The isolation of peptide sequences that direct efficient receptor-mediated endocytosis are profoundly boosted by the use of phage display technologies (44). Phage display libraries are extremely powerful tools that provide for a practically unlimited source of molecular variants including modifications of natural ligands to cell receptors (45) and short peptides (46). Similar libraries have also been injected directly into mice and peptide sequences that show a 13-fold selectivity for brain and kidney have been successfully isolated (48;49).

A need remains in the art for an efficient, non-biologically altering, low-risk means to target various cell types for the intracellular delivery of drugs and therapeutic agents. Thus, small transporter peptides that selectively target specific cell types may be derived from large phage display libraries. The advantages of small peptide carriers such as those obtained using phage display libraries include high quality and purity, low immunogenicity and the potential for highly efficient delivery to all cells in an organism (26). Accordingly, peptide carriers have the potential to improve upon conventional transporters such as liposomes or viruses for the efficient delivery of many macromolecules (see for example (50;51)).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides transporter peptides which are capable of translocating across a biological membrane. The invention also relates to methods of using such transporter peptides to translocate an effector across a biological membrane.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

In one aspect, the invention involves transporter peptides having at least one amino acid sequence selected from: $(X_m R X_o R X_n)$; $(X_m R R R X_n)$; $(X_m R R X R X_n)$; and $(X_m R X R R X_n)$, where X is a non-basic amino acid; m is an integer from zero to fourteen; n is an integer, independent of m, between zero and fourteen; o is an integer, independent of m and n,
5 between zero and five; and wherein the transporter peptide is capable of translocating across a biological membrane.

In one embodiment, the invention provides a transporter peptide having the amino acid sequence R-X-X-R. In other embodiments, the invention provides a transporter peptide having an amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 1-34. In various other
10 embodiments, the transporter peptides are derived from protein convertase ligands. In still other embodiments, the transporter peptides are derived from protein convertase cleavage sites.

As used herein, a transporter peptide is a peptide that facilitates the translocation of a substance across a biological membrane.

In some embodiments, the transporter peptide is fused to an effector. The "effector"
15 can be any suitable molecule, including DNA, RNA, a protein, a peptide, or a pharmaceutically active agent, such as, for example, a toxin, an antibiotic, an antipathogenic agent, an antigen, an antibody, an antibody fragment, an immunomodulator, an enzyme, or a therapeutic agent.

The term "fusion" or "fused" is meant to include all such specific interactions that
20 result in two or more molecules showing a preference for one another relative to some third molecule. This includes processes such as covalent, ionic, hydrophobic, and hydrogen bonding, but does not include non-specific associations such as solvent preferences.

In various embodiments, the transporter peptide can be less than fifty (50), less than
25 twenty-five (25), or less than fifteen (15) amino acids in length.

In further embodiments, translocation occurs within pancreatic B-cells, hepatocytes, colon cells, muscle cells and/or lung cells.

In another embodiment, the invention involves a method of translocating a transporter peptide across a biological membrane. For example, peptides of SEQ ID NOS: 1-6 can be
30 translocated across a membrane of pancreatic B-cells; peptides of SEQ ID NOS: 7-10 can be translocated across a membrane of hepatocytes; the peptide of SEQ ID NO:11 can be translocated across a membrane of colon cells; peptides of SEQ ID NOS: 12-20 can be translocated across a membrane of muscle cells; and peptides of SEQ ID NOS: 21-34 can be translocated across a membrane of lung cells.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

In yet another embodiment, the invention involves a transporter unit that is a transporter peptide conjugated to an effector. In various other embodiments, the effector may be a nucleic acid, a peptide, or a pharmaceutically active agent.

In still a further embodiment, the invention includes a method of producing a translocatable conjugate between a transporter peptide and an effector, forming a transporter peptide-effector conjugate. As used herein, "conjugate" or "conjugation" means any type of interaction enabling a physical association between an effector and a transporter peptide. The association may be covalent or a non-covalent in nature, and it must be sufficiently strong so that the vector does not disassociate before or during cellular penetration. Conjugation may be achieved using any chemical, biochemical, enzymatic or genetic coupling known to those skilled in the art. The effector of interest may be coupled to the N-terminal or C-terminal end of the transporter peptide.

In another embodiment, the invention includes a method of translocating an effector into the cytoplasm and nucleus of a eukaryotic cell, whereby the effector is conjugated to a transporter peptide and introduced into the eukaryotic cell. For example, the transporter peptide-effector conjugate can be introduced into the cell by incubating a cell culture in the presence of the conjugate or injecting the conjugate into the cell.

In various other embodiments, the invention includes a method of increasing the cellular concentration of an effector within a eukaryotic cell, whereby an effector is conjugated to a transporter peptide and incubated in a cell under conditions promoting active metabolism of the cell. A preferred embodiment of the invention includes use of a human cell as a eukaryotic cell.

In yet further embodiments, the invention includes a pharmaceutical composition containing a therapeutically or prophylactically effective amount of a transporter unit and a pharmaceutically acceptable carrier.

Preferred "pharmaceutical compositions" are tablets and gelatin capsules comprising the active ingredient together with a) diluents, *e.g.*, lactose, dextrose, sucrose, mannitol, sorbitol, cellulose and/or glycine; b) lubricants, *e.g.*, silica, talcum, stearic acid, its magnesium or calcium salt and/or polyethyleneglycol; for tablets also c) binders, *e.g.*, magnesium aluminum silicate, starch paste, gelatin, tragacanth, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose and/or polyvinylpyrrolidone; if desired d) disintegrants, *e.g.*, starches, agar, alginic acid or its sodium salt, or effervescent mixtures; and/or e) absorbents, colorants, flavors and sweeteners. Injectable compositions are preferably aqueous isotonic solutions or suspensions, and suppositories are advantageously prepared from fatty emulsions

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

or suspensions. The compositions may be sterilized and/or contain adjuvants, such as preserving, stabilizing, wetting or emulsifying agents, solution promoters, salts for regulating the osmotic pressure and/or buffers. In addition, they may also contain other therapeutically valuable substances. The compositions are prepared according to conventional mixing, granulating or coating methods, respectively, and contain about 0.1 to 75%, preferably about 1 to 50%, of the active ingredient.

In yet still further embodiments, the invention includes a kit in which one or more containers containing a therapeutically or prophylactically effective amount of a pharmaceutical composition.

Another embodiment of the invention involves a method of treating or preventing a disease by administering to a subject in which such treatment or prevention is desired, a pharmaceutical composition in an amount sufficient to treat or prevent a disease. For example, the disease to be treated may include diabetes, colon cancer, respiratory ailments, neurodegenerative disorders, cardioplegia and/or viral infections.

In another aspect, the invention involves a method of screening a phage library for transporter peptides, whereby a phage library is screened against specific cell types and it is then determined which cells have internalized phages.

In another embodiment, the invention includes identifying the DNA of an internalized phage and deducing an expressed peptide.

In yet a further embodiment, the invention includes a screening step whereby a phage library is panned for at least three cycles.

In still a further embodiment, the invention includes a phage having a multivalent display of peptides.

25

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides a peptide transport system that specifically targets various cell types for the intracellular delivery of drugs and therapeutic agents. Existing transport systems in the art are too limited to be of general application because they are either inefficient, affect the host genome, alter the biological properties of the active substance, kill the target cell, or pose too high a risk to be used in a human subject due to the use of viral

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

conjugates. The peptide transport system of the present invention uses proprotein convertases and specific ligands for the intracellular delivery of potential therapeutics, in order to overcome the limitations of transport systems in the art. The present system exhibits efficient delivery of an unaltered biologically active substance that does not affect the host's genome and that is otherwise non-invasive.

For example, transporter peptides have a use in treating diabetes. β -cell mass is tightly regulated so that insulin secretion maintains normoglycemia. Fitting β -cell mass to the needs of the infant or the adult organism, particularly in certain physiological and physiopathological conditions, is essentially attained by a dynamic balance between β -cell death and regeneration that occurs from differentiation of immature β -cells and from the proliferation of preexisting insulin-secreting cells (54;55). In Type I diabetes, impaired balance results from accelerated β -cell destruction, a process initiated by the specific attack of the immune system that targets pancreatic β -cells. Preventing or decreasing the rate of β -cell destruction may therefore not only help stabilize diabetes, but may also allow for islet regeneration to correct β -cell mass insuffisance.

Several molecules have been established as potent tools to decrease the rate of β -cell loss in experimental models of Type I diabetes. Many of these molecules are peptidyl in nature, and thus easily linked to peptide carriers. The peptides described herein serve as basis for the design of therapeutic "cargos", namely the coupling of the carriers ("transporter peptide") with therapeutic agents ("effectors").

Thus, a preferred embodiment of the transport system of the present invention targets β -cell intracellular mechanisms for the treatment of Type I diabetes. Type I diabetes is secondary to the destruction of the pancreatic β -cells by secretion of the immune system (1). Conclusive data, both in human and rodents, indicate that the cytokines interleukin-1 β (IL-1 β) in conjunction with TNF α and IFN γ , secreted by macrophages and T-cells, are major components responsible for the final outcome that leads to β -cell dysfunction and destruction and Type I diabetes (2-4). These secreted cytokines engage in a highly complex network of signaling and effector molecules in pancreatic β -cells. The signaling modifies the compartment of the cells and has a decisive impact on the cell fate. Accumulating evidence indicates that this regulatory intracellular network represents a promising target for the development of novel therapeutic approaches (5-11). Each of the molecules involved in the treatment and integration of intracellular cytokine signaling may represent a target for transporter -drug design.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

Among the most prominent signaling molecules recruited by IL-1 β in β -cells are ceramides, prostaglandins, heat-shock proteins, the inducible NO synthase enzyme (iNOS), the transcription factor NF- κ B, and the three MAP kinases ERK1/2, p38 and JNK. Many of these molecules are targets for blockage with existing inhibitors that have led to improvement of β -cell survival and function. iNOS KO mice are resistant to IL-1 β cytotoxicity (12) and blockers of iNOS activity prevent different aspects of NO cytotoxicity (reviewed in (6)). Islets and cell-lines studies have indicated that blockers of Ca²⁺ channels or caspase inhibitors prevent rodent β -cell death (13;14). p38 inhibitors attenuate IL-1 β -mediated inhibition of glucose-stimulated insulin release (15). β -cell specific suppression of GAD expression in antisense GAD transgenic NOD mice prevented autoimmune diabetes (16). Expression of bcl-2, IL-1Ra as do JBD (a dominant inhibitor of the c-Jun N-terminal Kinase JNK) in pancreatic β -cell lines had lead to the generation of cells that resist apoptosis (17-20). Together, these data indicate that the manipulation of intracellular events with specific tools holds great promise for the treatment of Type I diabetes.

One major challenge for disease treatment is to convert biologically important molecules into bioactive, cell-permeable compounds which are usable *in vivo* (21). For example, the most promising tools for the prevention of β -cell loss are a number of large proteins (*e.g.*, Bcl-2 (8), inhibitors of cytokine signaling such as dominant negative versions of MyD88, TRAF, FADD or IRAK (22;23), or the JNK inhibitor JBD₂₈₀ (24)) that cannot be currently delivered *in vivo* to tissues and cell-types including pancreatic β -cells.

Recent work indicates progress in attempts to convert large proteins into small bioactive compounds which can be easily delivered to cells and organs (25). These techniques essentially require two conditions: 1) a specific transporter or a chemical modification thereof is linked to the molecules for efficient delivery inside cells (*see, for example, efficient short peptide transporters described in (26-28)*); and 2) the active portion of the protein has to be narrowed down so that small peptides sequence might be linked to the transporter. In short, these conditions generally define 3-30 amino acid- long, bi-partite peptides that are able to enter cells while conserving the essential biological properties of the proteins from which they are derived. As in cancer research (32), there are numerous intracellular events in the β -cells whose manipulations protect β -cells from cytokine-induced apoptosis -manipulations which appear to be promising targets for drug design.

Receptor-mediated endocytosis is widely exploited in experimental systems for the targeted delivery of therapeutic agents into cells (36). Endocytotic activity is a common property that has been described for many receptors including IgG Fc, somatostatin, insulin,

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

IGF-I and II, transferrin, EGF, GLP-I, VLDL or integrin receptors (35;37-43). Recently, the isolation of peptide sequences that direct efficient receptor-mediated endocytosis has been profoundly boosted by the use of phage display technologies (44). Phage display libraries are extremely powerful tools that provide for a practically unlimited source of molecule variants including modifications of natural ligands to cell receptors (45) and short peptides (46). Using this technology, evidence that cell-type specific receptors mediate endocytosis has been reported (47). Similar libraries have been injected directly into mice and peptide sequences that show a 13-fold selectivity for brain and kidney have been successfully isolated (48;49).

Although strong experimental background indicates that transporter peptides which selectively target pancreatic β -cells might be derived from large phage display libraries, no such attempts have been reported. The advantages of small peptide carriers such as those obtained using phage display libraries are numerous and include ease of generation by chemical synthesis, high quality and purity, low immunogenicity and potential for highly efficient delivery to all cells in an organism (26). Accordingly, the peptide carriers of the invention have the potential to perform better than more conventional transporters such as liposomes or viruses in the efficient delivery of many macromolecules (*see* for example (50;51)).

Phage peptide libraries are traditionally constructed in derivatives of the filamentous phage M13. Peptide libraries are fused to the minor coat protein pIII of the capsid that displays 1-5 copies of the peptide motif (46). Alternatively, high-valent display is attained by using the major coat protein pVIII.

These types of libraries have not been optimized for the isolation of receptor-mediated endocytotic peptide sequences, and the following considerations are relevant for the recovery of carriers with the highest efficiencies of internalization:

- 1) mono- or low-valent display of peptides is essentially insufficient for efficient uptake of such large structures as filamentous phages, however multivalent display allows for efficient uptake (44); and
- 2) the internalization of receptor-bound ligands involves concentration of cell surface receptors in specialized areas of the plasma membrane and subsequent formation of clathrin-coated vesicles (52).

The large size of the M13 derivatives (1-1.5 μ m) (53) exceeds the typical size of classical clathrin-coated pits (150 nM). Clathrin-coated pits are invaginated structures on the plasma membrane that occupy approximately 2% of the membrane surface. These

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

specialized structures direct the highly efficient receptor-mediated internalization process that clears extracellular proteins or peptides such as insulin or EGF at the extremely rapid rate of 10-50%/min (43). Thus, receptor-mediated internalization by these specialized and highly efficient structures is not expected to occur with the conventional M13 phages.

5 Accordingly, published attempts have failed to produce peptides that display a high internalization rate of peptide bearing phages. To date, no consensus internalization motif specific for a particular cell-type has emerged from these studies (44;47-49).

10 In certain aspects, the invention described herein relates to the identification of transporter peptides which promote the internalization of peptide-bearing phages. Once the peptide sequences are determined, that are bound to effector molecules in order to transport the effector molecules across a biological membrane.

As used herein, the terms "bound" or "binds" or "associates" or "interacts" are meant to include all specific interactions that result in two or more molecules showing a preference for one another relative to some third molecule. This includes processes such as covalent, 15 ionic, hydrophobic, and hydrogen bonding, but does not include non-specific associations such as solvent preferences.

A transporter peptide is a peptide that facilitates the passage, or translocation, of a substance across a biological membrane, particularly into the cytoplasm or nucleus, of the cell. Translocation may be detected by various procedures, including a cellular penetration 20 assay as described in, for example, PCT application No. WO 97/02840. Generally, a cellular penetration assay is performed by: a) incubating a cell culture with a translocating peptide; b) fixing and permeabilizing the cells; and c) detection of the presence of the peptides inside the cell. The detection step may be carried out by incubating the fixed, permeabilized cells with labeled antibodies directed to the peptide, followed by detection of an immunological 25 reaction between the peptide and the labeled antibody. Alternatively, detection may also be achieved by using a detectably labeled peptide, and directly detecting the presence of the label in cellular compartments. The label may be, for example, a radioactive label, or a fluorescent label, or a dye.

The invention further includes transport units, which are complexes of the 30 translocation peptide coupled to an effector. As used herein, "coupled" means any type of interaction enabling a physical association between an effector and the peptide. The association may be covalent or a non-covalent in nature, and it must be sufficiently strong so that the vector does not disassociate before or during translocation. Coupling may be achieved using any chemical, biochemical, enzymatic or genetic coupling known to those

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

skilled in the art. The effector of interest may be coupled to the N-terminal or C-terminal end of the peptide vector.

An "effector" refers to any molecule or compound of, for example, biological, pharmaceutical, diagnosis, tracing, or food processing interest. It may consist of nucleic acids (ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid) from various origins, and particularly of human, viral, animal, eukaryotic or prokaryotic, plant, synthetic origin, etc. A nucleic acid of interest may be of a variety of sizes, ranging from, for example, a simple trace nucleotide to a genome fragment, or an entire genome. It may be a viral genome or a plasmid. Alternatively, the effector of interest may also be a protein, such as, for example, an enzyme, a hormone, a cytokine, an apolipoprotein, a growth factor, an antigen, or an antibody, etc. Furthermore, the effector may be a pharmaceutically active agent, such as, for example, a toxin, a therapeutic agent, or an antipathogenic agent, such as an antibiotic, an antiviral, an antifungal, or an anti-parasitic agent. The effector of interest may itself be directly active or may be activated *in situ* by the peptide, by a distinct substance, or by environmental conditions.

The term "pharmaceutically active agent" is used herein to refer to a chemical material or compound which, when administered to an organism (human or animal) induces a detectable pharmacologic and/or physiologic effect.

The term "therapeutic agent" is used herein to refer to a chemical material or compound which, when administered to an organism (human or animal) induces a desired pharmacologic and/or physiologic effect.

The transporter peptides according to the present invention are characterized by the fact that their penetration capacity is virtually independent of the nature of the substance of the interest (the effector) that is coupled to it.

The invention also includes a method of introducing a substance of interest into a cell or a cell nucleus. The method includes contacting the cell with a transporter peptide-effector conjugate in an amount sufficient to enable efficient penetration into the cells. In general, the method may be used for *in vivo* or *in vitro* internalization of the conjugate. For example, the conjugate can be provided *in vitro*, *ex vivo*, or *in vivo*. Furthermore, it has been shown that a transporter peptide according to this invention is capable of potentializing the biological activity of the coupled substance. Therefore, another purpose of this invention is a method of using a transporter peptide that increases the biological activity of the effector to which it is coupled. According to the *in vitro* method, an effector is first coupled to a transporter, and the conjugate is incubated with cells at a temperature which enables active metabolism of the cells. In some cases, the transporter-effector conjugate is injected into

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

particular cells. Those skilled in the art will recognize that any other method of introducing the conjugate into the cells can also be used.

In addition to the peptide-effector conjugates, the invention also provides a pharmaceutically acceptable base or acid addition salt, hydrate, ester, solvate, prodrug, metabolite, stereoisomer, or mixture thereof. The invention also includes pharmaceutical formulations comprising a peptide-effector conjugate in association with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient.

Salts encompassed within the term "pharmaceutically acceptable salts" refer to non-toxic salts of the compounds of this invention which are generally prepared by reacting the free base with a suitable organic or inorganic acid to produce "pharmaceutically-acceptable acid addition salts" of the compounds described herein. These compounds retain the biological effectiveness and properties of the free bases. Representative of such salts are the water-soluble and water-insoluble salts, such as the acetate, amsonate (4,4-diaminostilbene-2, 2'-disulfonate), benzenesulfonate, benzonate, bicarbonate, bisulfate, bitartrate, borate, bromide, butyrate, calcium edetate, camsylate, carbonate, chloride, citrate, clavulinate, dihydrochloride, edetate, edisylate, estolate, esylate, fumarate, gluceptate, gluconate, glutamate, glycolylarsanilate, hexafluorophosphate, hexylresorcinate, hydrabamine, hydrobromide, hydrochloride, hydroxynaphthoate, iodide, isothionate, lactate, lactobionate, laurate, malate, maleate, mandelate, mesylate, methylbromide, methylnitrate, methylsulfate, mucate, napsylate, nitrate, N-methylglucamine ammonium salt, 3-hydroxy-2-naphthoate, oleate, oxalate, palmitate, pamoate (1,1-methylene-bis-2-hydroxy-3-naphthoate, embonate), pantothenate, phosphate/diphosphate, picrate, polygalacturonate, propionate, p-toluenesulfonate, salicylate, stearate, subacetate, succinate, sulfate, sulfosalicylate, suramate, tannate, tartrate, teoclate, tosylate, triethiodide, and valerate salts.

According to the methods of the invention, a human patient can be treated with a pharmacologically effective amount of a peptide or conjugate. The term "pharmacologically effective amount" means that amount of a drug or pharmaceutical agent (the effector) that will elicit the biological or medical response of a tissue, system, animal or human that is being sought by a researcher or clinician.

The invention also includes pharmaceutical compositions suitable for introducing an effector of interest into a cell or cell nucleus. The compositions are preferably suitable for internal use and include an effective amount of a pharmacologically active compound of the invention, alone or in combination, with one or more pharmaceutically acceptable carriers. The compounds are especially useful in that they have very low, if any toxicity.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

Preferred pharmaceutical compositions are tablets and gelatin capsules comprising the active ingredient together with a) diluents, *e.g.*, lactose, dextrose, sucrose, mannitol, sorbitol, cellulose and/or glycine; b) lubricants, *e.g.*, silica, talcum, stearic acid, its magnesium or calcium salt and/or polyethyleneglycol; for tablets also c) binders, *e.g.*, magnesium aluminum silicate, starch paste, gelatin, tragacanth, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose and/or polyvinylpyrrolidone; if desired d) disintegrants, *e.g.*, starches, agar, alginic acid or its sodium salt, or effervescent mixtures; and/or e) absorbents, colorants, flavors and sweeteners. Injectable compositions are preferably aqueous isotonic solutions or suspensions, and suppositories are advantageously prepared from fatty emulsions or suspensions. The compositions may be sterilized and/or contain adjuvants, such as preserving, stabilizing, wetting or emulsifying agents, solution promoters, salts for regulating the osmotic pressure and/or buffers. In addition, they may also contain other therapeutically valuable substances. The compositions are prepared according to conventional mixing, granulating or coating methods, respectively, and contain about 0.1 to 75%, preferably about 1 to 50%, of the active ingredient.

Administration of the active compounds and salts described herein can be via any of the accepted modes of administration for therapeutic agents. These methods include systemic or local administration such as oral, nasal, parenteral, transdermal, subcutaneous, or topical administration modes.

Depending on the intended mode of administration, the compositions may be in solid, semi-solid or liquid dosage form, such as, for example, injectables, tablets, suppositories, pills, time-release capsules, powders, liquids, suspensions, or the like, preferably in unit dosages. The compositions will include an effective amount of active compound or the pharmaceutically acceptable salt thereof, and in addition, and may also include any conventional pharmaceutical excipients and other medicinal or pharmaceutical drugs or agents, carriers, adjuvants, diluents, etc., as are customarily used in the pharmaceutical sciences.

For solid compositions, excipients include pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, talcum, cellulose, glucose, sucrose, magnesium carbonate, and the like may be used. The active compound defined above, may be also formulated as suppositories using for example, polyalkylene glycols, for example, propylene glycol, as the carrier.

Liquid, particularly injectable compositions can, for example, be prepared by dissolving, dispersing, etc. The active compound is dissolved in or mixed with a

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

pharmaceutically pure solvent such as, for example, water, saline, aqueous dextrose, glycerol, ethanol, and the like, to thereby form the injectable solution or suspension.

If desired, the pharmaceutical composition to be administered may also contain minor amounts of non-toxic auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, and other substances such as for example, sodium acetate, triethanolamine oleate, etc.

Parental injectable administration is generally used for subcutaneous, intramuscular or intravenous injections and infusions. Injectables can be prepared in conventional forms, either as liquid solutions or suspensions or solid forms suitable for dissolving in liquid prior to injection.

One approach for parenteral administration employs the implantation of a slow-release or sustained-released systems, which assures that a constant level of dosage is maintained, according to U.S. Pat. No. 3,710,795, incorporated herein by reference.

The compounds of the present invention can be administered in such oral dosage forms as tablets, capsules (each including timed release and sustained release formulations), pills, powders, granules, elixers, tinctures, suspensions, syrups and emulsions. Likewise, they may also be administered in intravenous (both bolus and infusion), intraperitoneal, subcutaneous or intramuscular form, all using forms well known to those of ordinary skill in the pharmaceutical arts. An effective but non-toxic amount of the compound desired can be employed as an antiandrogenic agent.

The dosage regimen utilizing the compounds is selected in accordance with a variety of factors including type, species, age, weight, sex and medical condition of the patient; the severity of the condition to be treated; the route of administration; the renal and hepatic function of the patient; and the particular compound or salt thereof employed. An ordinarily skilled physician or veterinarian can readily determine and prescribe the effective amount of the drug required to prevent, counter or arrest the progress of the condition.

Oral dosages of the present invention, when used for the indicated effects, may be provided in the form of scored tablets containing 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0 or 1000.0 mg of active ingredient.

Compounds of the present invention may be administered in a single daily dose, or the total daily dosage may be administered in divided doses of two, three or four times daily. Furthermore, preferred compounds for the present invention can be administered in intranasal form via topical use of suitable intranasal vehicles, or via transdermal routes, using those forms of transdermal skin patches well known to those of ordinary skill in that art. To be

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

administered in the form of a transdermal delivery system, the dosage administration will, of course, be continuous rather than intermittent throughout the dosage regimen. Other preferred topical preparations include creams, ointments, lotions, aerosol sprays and gels, wherein the concentration of active ingredient would range from 0.1% to 15%, w/w or w/v.

5 The compounds herein described in detail can form the active ingredient, and are typically administered in admixture with suitable pharmaceutical diluents, excipients or carriers (collectively referred to herein as "carrier" materials) suitably selected with respect to the intended form of administration, that is, oral tablets, capsules, elixirs, syrups and the like, and consistent with conventional pharmaceutical practices.

10 For instance, for oral administration in the form of a tablet or capsule, the active drug component can be combined with an oral, non-toxic pharmaceutically acceptable inert carrier such as ethanol, glycerol, water and the like. Moreover, when desired or necessary, suitable binders, lubricants, disintegrating agents and coloring agents can also be incorporated into the mixture. Suitable binders include starch, gelatin, natural sugars such as glucose or beta-
15 lactose, corn sweeteners, natural and synthetic gums such as acacia, tragacanth or sodium alginate, carboxymethylcellulose, polyethylene glycol, waxes and the like. Lubricants used in these dosage forms include sodium oleate, sodium stearate, magnesium stearate, sodium benzoate, sodium acetate, sodium chloride and the like. Disintegrators include, without limitation, starch, methyl cellulose, agar, bentonite, xanthan gum and the like.

20 The compounds of the present invention can also be administered in the form of liposome delivery systems, such as small unilamellar vesicles, large unilamellar vesicles and multilamellar vesicles. Liposomes can be formed from a variety of phospholipids, containing cholesterol, stearylamine or phosphatidylcholines. In some embodiments, a film of lipid components is hydrated with an aqueous solution of drug to form a lipid layer encapsulating
25 the drug, as described in U.S. Pat. No. 5,262,564.

The compounds of the present invention may also be coupled with soluble polymers as targetable drug carriers. Such polymers can include polyvinylpyrrolidone, pyran copolymer, polyhydroxypropyl-methacrylamide-phenol, polyhydroxyethylspanamidephenol, or polyethyleneoxidepolylysine substituted with
30 palmitoyl residues. Furthermore, the compounds of the present invention may be coupled to a class of biodegradable polymers useful in achieving controlled release of a drug, for example, polylactic acid, polyepsilon caprolactone, polyhydroxy butyric acid, polyorthoesters, polyacetals, polydihydropyrans, polycyanoacrylates and cross-linked or amphiphathic block copolymers of hydrogels.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

Any of the above pharmaceutical compositions may contain 0.1-99%, preferably 1-70% of the active compounds, especially compounds of the Formula I as active ingredients.

Equivalents. From the foregoing detailed description of the specific embodiments of the invention, it should be apparent that unique methods of translocation across a biological membrane have been described. Although particular embodiments have been disclosed herein in detail, this has been done by way of example for purposes of illustration only, and is not intended to be limiting with respect to the scope of the appended claims that follow. In particular, it is contemplated by the inventor that various substitutions, alterations, and modifications may be made to the invention without departing from the spirit and scope of the invention as defined by the claims. For instance, the choice of the particular type of cell, or the particular effector to be translocated is believed to be a matter of routine for a person of ordinary skill in the art with knowledge of the embodiments described herein.

The details of one or more embodiments of the invention have been set forth in the accompanying description above. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described. Other features, objects, and advantages of the invention will be apparent from the description and from the claims. In the specification and the appended claims, the singular forms include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. All patents and publications cited in this specification are incorporated by reference.

The following EXAMPLES are presented in order to more fully illustrate the preferred embodiments of the invention. These EXAMPLES should in no way be construed as limiting the scope of the invention, as defined by the appended claims.

EXAMPLES

Example I: Identification of internalization peptide motifs.

Included in this invention is a phage display library in a novel phage system that fulfills the following criteria: multivalent display of 4-50-mer peptides (>400 copies/phage);

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

small size (50 nM); efficient recovery of internalized phages; removal of non-internalized bound-phages; and large number of individual peptide sequences (3×10^8 independent clones, representing $>10^9$ heptapeptide sequences).

5 This library has been successfully used for the isolation of a peptide motif that directs efficient and specific intracellular delivery of macromolecules to the β TC-3 cell-model. In addition, this library has been used with five different (non- β -) cell lines, and in each case, the enrichment of peptide motifs specific for each cell-type has been observed. A general overview of the procedure is as follows:

10 *Selection/enrichment procedure*

A phage display library is panned against a number of insulin-secreting cell-lines, rodent and human isolated islets and FACS purified β -cells, and finally is injected directly into animals (mice, rats, pigs) before extracting islets and recovering internalized phages. The panning procedure consists of at least three cycles of phage addition, recovery and
15 amplification. Alternatively, and in order to isolate the most selective ligands, phages that bind other cell-types are subtracted by incubating the library with different non-insulin secreting cells before panning the library against β -cells. Experiments involving chloroquine to block lysosomal degradation are performed as described (44). These experiments are expected to produce different peptide carriers.

20

Determination of phage specificity

Panned phages are isolated and incubated with a number of different cells and organs. For example, in certain experiments, panned phages are incubated with insulin and non-insulin secreting cells and organs. Uptake is determined by counting the number of phages
25 recovered. Immunocytochemistry studies are performed with anti-phage antibodies.

Characterization of phage-beard peptides

DNA from isolated phages are sequenced and expressed peptides are deduced. Peptides which direct internalization and mutated versions of these peptides are chemically
30 synthesized and N-terminally labeled with FITC or iodinated. Labeled peptides are added to different cell types, isolated rodent and human islets, and directly injected into mice. Specificity of uptake, subcellular localization, clearance and stability are estimated (56).

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

Biochemical assays

For analysis of insulin and non-insulin secreting cells, characterized peptides are linked to three known sequences: YVAD (caspases inhibitor (29), SEQ ID NO:35),
5 VQRKRQKLMP (inhibitor of NF- κ B nuclear localization (30), SEQ ID NO:36) or RPKRPTTLNLFQVPRSQDT (JNK inhibitor (17), SEQ ID NO:37). These peptides are chemically synthesized and added to insulin and non-insulin secreting cells. Caspases, NF- κ B and JNK are activated by the general activator etoposide (57) or anisomycin (58). Inhibition of caspases, NF- κ B and JNK by the peptides are studied in β - and non β -cells.
10 These experiments indicate whether the peptide carriers transport potential drugs in an active conformation specifically inside the β -cells.

Uptake of potential therapeutic agents by the GLP-1 receptor

Expression of the GLP-1 receptor (GLP-1R) is mainly restricted to the brain and the
15 pancreas (66). The receptor is internalized following binding to an agonist (56). These properties make the GLP-1R an attractive tool to mediate preferential delivery of therapeutic agents to the pancreatic β -cells. This property is evaluated as described above. Information gathered with the GLP-1R assists, for example, in the design of bispecific dimers with enhanced selectivity.
20

Identification of other internalization motifs for the GLP-1 receptor

COS-7 cells transfected with the GLP-1R serve as substrates for a panning
experiments as above. Newly identified motifs are evaluated for their specificity and their
capacity to direct endocytosis.
25

Production of all-D-retro-inverso peptides

In some embodiments, the peptides can be synthesized as retro-inverso peptides. All-
D-retro-inverso peptides with increased stability and lower immunogenicity (59) are
analyzed as described above.
30

Evolution has ensured the almost exclusive occurrence of L-amino acids in naturally
occurring proteins. Virtually all proteases therefore cleave peptide bonds between adjacent L
amino acids; thus, artificial proteins or peptides composed of D-amino acids are largely
resistant to proteolytic breakdown. This resistance has been attractive to drug designers, but
the exclusivity of biological systems for proteins made of L-amino acids means that such

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

proteins cannot interact with the mirror image surface formed by enantiomeric proteins. Thus, an all D-amino acid protein usually has no biological effect or activity.

Linear modified retro-peptide structures have been studied for a long time (Goodman, 10 M., et al., On the Concept of Linear Modified Retro-Peptide Structures, Accounts of
5 Chemical Research, 12(1), 1-7 (January, 1979)) and the term "retro-isomer" was designated to include an isomer in which the direction of the sequence is reversed compared with the parent peptide. By "retro-inverso isomer" is meant an isomer of a linear peptide in which the direction of the sequence is reversed and the chirality of each amino acid residue is inverted; thus, there can be no end-group complementarity.

10 More recently, Jameson et al. reportedly engineered an analogue of the hairpin loop of the CD4 receptor by combining these two properties: reverse synthesis and a change in chirality (Jameson et al., A rationally designed CD4 analogue inhibits experimental allergic encephalomyelitis, *Nature*, 368, 744-746 (1994) and Brady, L. et al., Reflections on a Peptide, *Nature*, 368, 692-693 (1994)). The net result of combining D-enantiomers and
15 reverse synthesis is that the positions of carbonyl and amino groups in each amide bond are exchanged, while the position of the side-chain groups at each alpha carbon is preserved. Jameson et al. reportedly demonstrated an increase in biological activity for their reverse D peptide, which contrasts to the limited activity in vivo of its conventional all-L enantiomer (owing to its susceptibility to proteolysis).

20 A partially modified retro-inverso pseudopeptide has been reported for use as a non-natural ligand for the human class I histocompatibility molecule, HLA-A2 (Guichard et al., Partially Modified Retro-Inverso Pseudopeptides as a Non-Natural Ligands for the Human Class I Histocompatibility Molecule HLA-A2, *J. Med. Chem.* 39, 2030-2039 (1996)). The authors report that such non-natural ligands had increased stability and high
25 MHC-binding capacity.

Retro-inverso peptides are prepared for peptides of known sequence in the following manner. A peptide having a known sequence (e.g., a tumor antigen peptide) is selected as a model peptide for designing and synthesizing a retro-inverso peptide analog. The analog is synthesized using D-amino acids by attaching the amino acids in a peptide chain such that the
30 sequence of amino acids in the retro-inverso peptide analog is exactly opposite of that in the selected peptide which serves as the model. To illustrate, if the peptide model is a peptide formed of L-amino acids having the sequence ABC, the retro-inverso peptide analog formed of D-amino acids would have the sequence CBA. The procedures for synthesizing a chain of

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

D-amino acids to form the retro-inverso peptides are known in the art and are illustrated in the above-noted references.

Since an inherent problem with native peptides is degradation by natural proteases, the peptides of the invention may be prepared to include the "retro-inverso isomer" of the desired peptide. Protecting the peptide from natural proteolysis should therefore increase the effectiveness of the specific heterobivalent or heteromultivalent compound.

A higher biological activity is predicted for the retro-inverso containing peptide when compared to the non-retro-inverso containing analog owing to protection from degradation by native proteinases.

Production of modified peptides

In some embodiments, the peptides can be synthesized as modified peptides. The modified peptides are analyzed as described above.

Analogs can differ from the native peptides by amino acid sequence, or by modifications which do not affect the sequence, or by both. Preferred analogs include peptides whose sequences differ from the wild-type sequence (*i.e.*, the sequence of the homologous portion of the naturally occurring peptide) only by conservative amino acid substitutions, preferably by only one, two, or three, substitutions, for example, substitution of one amino acid for another with similar characteristics (*e.g.*, valine for glycine, arginine for lysine, *etc.*) or by one or more non-conservative amino acid substitutions, deletions, or insertions which do not abolish the peptide's biological activity.

Modifications (which do not normally alter primary sequence) include *in vivo* or *in vitro* chemical derivitization of peptides, *e.g.*, acetylation or carboxylation. Also included are modifications of glycosylation, *e.g.*, those made by modifying the glycosylation patterns of a peptide during its synthesis and processing or in further processing steps, *e.g.*, by exposing the peptide to enzymes which affect glycosylation *e.g.*, mammalian glycosylating or deglycosylating enzymes. Also included are sequences which have phosphorylated amino acid residues, *e.g.*, phosphotyrosine, phosphoserine, or phosphothreonine.

The invention includes analogs in which one or more peptide bonds have been replaced with an alternative type of covalent bond (a "peptide mimetic") which is not susceptible to cleavage by peptidases. Where proteolytic degradation of the peptides following injection into the subject is a problem, replacement of a particularly sensitive peptide bond with a noncleavable peptide mimetic will make the resulting peptide more

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

stable and thus more useful as a therapeutic. Such mimetics, and methods of incorporating them into peptides, are well known in the art. Also useful are amino-terminal blocking groups such as t-butyloxycarbonyl, acetyl, theryl, succinyl, methoxysuccinyl, suberyl, adipyl, azelal, dansyl, benzyloxycarbonyl, fluorenylmethoxycarbonyl, methoxyazelal, methoxyadipyl, methoxysuberyl, and 2,4,-dinitrophenyl. Blocking the charged amino- and carboxy-termini of the peptides would have the additional benefit of enhancing passage of the peptide through the hydrophobic cellular membrane and into the cell.

Production of multivalent peptides

Multivalent ligands display enhanced avidity of up to several orders of magnitude (60) that translates in enhanced rate of internalization (42). Monospecific dimers display great avidity and bispecific dimers are likely to have greater selectivity that may enhance their practical potential as specific cell-targeting agents (61). Multivalent peptides (both mono- and pluri-specific) are synthesized as peptidomimetics, *e.g.*, with either flexible peptidyl or sugar-based backbones (61-63).

Intracellular localization

The different peptide sequences isolated may localize to different cell compartments (*e.g.*, the nucleus, mitochondria, cytosol, etc.). This is carefully evaluated with iodinated and FITC-labeled peptides. This information is used for the design of the functional studies. For example, peptides accumulating in the cytosol are preferred for inhibiting NF- κ B nuclear translocation, while peptides entering the nucleus are best suited for inhibiting JNK. In some embodiments, sequences such as nuclear localization motifs are added to redirect the carriers to the appropriate compartment.

Functional studies

β -cell targeting peptides (*e.g.*, L or D enantiomers, multivalent peptides) linked to the caspase, NF- κ B or JNK inhibitors are added to β -cell lines, FACS purified β -cells and isolated human and rodent islets. Apoptosis is induced by IL- β (in conjunction with TNF α and IFN γ) and resistance to apoptosis is evaluated.

In vivo experiments

NOD mice are injected in pre- and post-diabetic states with the effector peptides (β -cell targeting peptides linked to the caspase, NF- κ B or JNK inhibitors). Dose and frequency of injection is determined as described above. Occurrence of diabetes is then measured.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

Immunogenicity assays

The immunogenic potential of the peptides is evaluated in rodents and rabbits.

5 *Cloning*

Peptide motifs that direct efficient uptake by specific cells are described in Example III. These peptides are used for the cloning and characterization of the cognate receptors from e.g., INS-1, β TC-3 and human islet cDNA libraries using established procedures (64;65).

10

Characterization

Tissue distribution of the cloned receptor(s) is evaluated by Northern and Western blotting of insulin and non-insulin secreting cells and organs. Binding kinetics, clearance and specificity of uptake are evaluated by transient transfection of the receptors in COS-7 cells.

15

Control peptides are mutated sequences as well as known peptides such as, for example, GLP-1, GIP, glucagon, secretin, etc. Alternative internalization motifs for these receptors are characterized by panning the library in transfected COS-7 cells as described above.

Example II: Methods of Procedure for the Experiments.

20

Phage preparation and enrichment procedures

A library of 3×10^8 independent phages displaying random 15-mer epitopes at the surface of the capsids was generated using standard procedures (67). Phages were amplified then purified by polyethylene glycol (PEG) precipitation and finally resuspended at a concentration of 10^{10} infective particles per μ l in Tris-EDTA buffer (10:1 mM, TE) as described (67). Phages (10^{12}) were added to cells in culture medium for 1 to 24 hours. Longer incubation times were preferred to favor isolation of phages that escaped proteolytic degradation in endocytotic vesicles. Following binding and internalization, cells were washed and non-internalized phages were destroyed by digestion with subtilisin (3 mg/ml) (44). Following extensive washing, internalized phages were then recovered by lysing cells in a buffer containing 2% deoxycholate, 10 mM Tris-HCl and 2mM EDTA, pH 8.0. Recovered phages were finally amplified in *E.coli* cells (XL-1-Blue) and purified as described above. This preparation of selected phages was then used for a second round of

25
30

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

panning. Three to five sequential rounds were performed to obtain enrichment of specific phage-bearing peptide sequences.

Immunocytochemistry and fluorescence studies

5 Single phages isolated according to the enrichment scheme above were amplified and added for 24 hours to cells in culture medium. Medium was then washed off and cells fixed in cold methanol-acetone (1:1) for 5 minutes. Antibodies directed against the phage capsid were used with a fluorescein-conjugated secondary antibody. Classical fluorescence
10 microscopic studies and confocal microscopic assays were performed. Tissues were embedded in paraffin before processing.

Peptides

15 Peptides were synthesized using classical F-moc chemistry (Auspep, Australia), with a C-terminal amide group and labeled with FITC or iodinated when necessary. All peptides have been purified by HPLC and analyzed by Mass-Spectrometry.

Biochemical studies

20 Peptides are added one hour before JNK, NF- κ B and caspases will be activated in different cell-lines, such as, for example, β TC-3, INS-1, HeLa, WiDr, HepG2, NIH 3T3, COS-7, by etoposide (VP-16, Alexis) for 1 hour. Cell extracts are processed for JNK activity (using a solid phase JNK assay with c-Jun as substrate (68)), NF- κ B nuclear translocation (electrophoretic mobility shift assay (30)) and caspase activity (using available commercial kits and antibodies, Upstate Biochemicals).

Measurement of apoptosis

25 Apoptosis is measured using a combination of Hoechst 33342 and propidium iodide as previously described (68;69).

Islets

30 Islets are isolated by the method of Gotoh *et al.* (70). Human islets will be obtained from the "Insel Spital", Bern, Switzerland.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

Mice

The exact dosage and time-frame of injection is optimized for each peptide.

However, previous experience with JNK1 peptides indicates that 100 μ l of a 1 mM solution of peptides in PBS injected every two days is a reasonable starting point.

5

 λ ZAP-Express library

The INS-1 cDNA library in the λ ZAP-Express prokaryotic/eukaryotic expression vector has been used to clone the IB1 and IB2 cDNAs (71;72). This library is easily converted to a plasmid library under the control of the eukaryotic CMV promoter by simple helper phage excision (Stratagene).

10

Example III: Panning of phage display library and characterization of internalized peptide motifs

15 The ability of specifically targeting β -cells for drug delivery will have an enormous impact on the treatment of Type I diabetes. Blockers of β -cell destruction that essentially do not alter β -cell function (*i.e.* insulin secretion) already exist (*e.g.* JBD, bcl-2), and the conversion of one of these molecules (JBD) into a small peptide has been shown to retain full biological activity.

20 The pancreatic β -cell line β TC-3 was panned with the phage display library mentioned herein. Selective enrichment of the number of recovered phages was observed at each cycle of selection as seen below in Table 1. Panning experiments using β TC-3 cells were performed with 10^9 phages used at each step of the enrichment procedure. The number of phages recovered at 0°C (no endocytosis) is less than 100, indicating that the background of extracellular, but not internalized, bound phages is extremely low under the conditions
25 described herein.

Table 1.

Panning	Phages recovered
1 st	$<1 \times 10^3$
2 nd	2×10^5
3 rd	3×10^8

30 The occurrence of phages recovered after three steps of panning in the β TC-3 cell line is seen in Table 2.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

Table 2.

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

Titration experiments were performed with the phage P1 (SEQ ID NO:1) incubated with β TC-3 cells for the times indicated in Table 3. The ratio of input/recovered phages is also shown. Titration experiments indicated that as much as 10% of the initial P1 phage input could be recovered.

Table 3.

Phage	Incubation	% Recovered
P1	1h	0.01
	5h	1
	17h	10

Determination of the specificity of uptake was performed by titrating the number of recovered phages in 5 different cell lines. Phages (10^6) were incubated for 16 hours with the indicated cell lines, and the number of internalized and recovered phages was calculated as seen in Table 4. Control phages displaying an integrin internalization motif showed a similar number ($1-3 \times 10^6$) of recovered phages for all cell lines. This indicates that P1 (SEQ ID NO:1) is taken up by β TC-3 cells 10,000 to 1,000,000 fold more efficiently than by any other cell line tested.

Table 4.

Cells	Phages recovered
β TC-3	1×10^7
HeLa	$< 1 \times 10^2$
WiDr	2×10^2
HepG2	< 10
A549	10^2

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

Peptides were then synthesized from the sequence of the displayed peptide in phage P1. The sequence of the P1 5-mer peptide was linked to a 10 amino-acid random sequence that was labeled with FITC. The control sequence was identical except that the P1 5-mer sequence was replaced by (Ala)₅. Peptides (10 μ M) were added to the cells for one hour and cells were washed and fixed in cold methanol-acetone (1:1). FITC-labeled P1 peptides could be visualized inside β TC-3 cells, but not in other cell types.

Sequence analysis of 20 recovered phages at the final cycle of enrichment is shown in Table 5. Importantly, all sequences strictly obeyed to a same conserved consensus sequence of 5 amino acids. This suggests the specific selection/enrichment of a conserved motif that directs efficient uptake of the phages. A large proportion of the peptide motifs thus obtained obeys to the proprotein convertase consensus R-X-X-R. This observation forms the basis of the proposal to use proprotein convertases as vehicles for the intracellular delivery of potential drugs and macromolecules to specific cell-types.

15

Table 5.

	Cell-Type	Sequence ID	Sequence	SEQ ID NO
1.	Pancreatic β -Cells	P1	RRTK	1
2.		P6	RKLR	2
3.		P66	RRPK	3
4.		I2	PTAKPTYTK	4
5.		I6	IQNGRQVGCLTNK	5
6.		I10	MRGLSKRG	6
7.	Hepatocytes	H2	RQFRK	7
8.		H4	RRIRG	8
9.		H6	NRRRGIN	9
10.		H16	KGKW	10
11.	Colon Cancer	WP2	RGNRGAR	11
12.	Muscles	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
20.		M13	TGKRMTR	20
21.	Lung	A2	KRGR	21
22.		A3	SLRRR	22
23.		A8	PSLRRPR	23
24.		A10	YKRGR	24

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

25.	A16	GMGRKPR	25
26.	T1	RRRVG	26
27.	T2	RSFGVKKYG	27
28.	T3	KSLRSFK	28
29.	T5	RVRR	29
30.	T7	PRRR	30
31.	T8	MRRR	31
32.	T10	YGGKRTLAMSK	32
33.	T11	GRRSR	33
34.	T13	YPLPNMK	34

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

REFERENCES

1. Mandrup-Poulsen, T. 1998. "Diabetes". *BMJ*. 316:1221.
- 5 2. Mandrup-Poulsen, T. 1996. "The role of interleukin- 1 in the pathogenesis of IDDM". *Diabetologia* 39:1005.
3. Nerup, J., T. Mandrup-Poulsen, J. Molvig, S. Helqvist, L. Wogensen, and J. Egeberg. 1988. "Mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in type I diabetes".
10 *Diabetes Care* 11 Suppl 1:16.
4. Mauricio, D. and T. Mandrup-Poulsen. 1998. "Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death". *Diabetes* 47:1537.
- 15 5. Iwahashi, H., N. Itoh, K. Yamagata, A. Imagawa, H. Nakajima, K. Tomita, M. Moriwaki, M. Waguri, K. Yamamoto, J. Miyagawa, M. Namba, T. Hanafusa, and Y. Matsuzawa. 1998. "Molecular mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in autoimmune diabetes: potential targets for preventive therapy". *Cytokines. Cell Mol. Ther.* 4:45.
- 20 6. Sjöholm, A. 1998. "Aspects of the involvement of interleukin- 1 and nitric oxide in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus". *Cell Death.Differ.* 5:461.
- 25 7. Stephens, L.A., H.E. Thomas, and T.W. Kay. 1997. "Protection of NIT-1 pancreatic beta-cells from immune attack by inhibition of NF-kappaB". *J.Autoimmun.* 10:293.
8. Rabinovitch, A., W. Suarez-Pinzon, K. Strynadka, Q. Ju, D. Edelstein, M. Brownlee, G.S. Korbutt, and R.V. Rajotte. 1999. "Transfection of human pancreatic islets with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction". *Diabetes* 48:1223.
- 30 9. Bleich, D., S. Chen, B. Zipser, D. Sun, C.D. Funk, and J.L. Nadler. 1999. "Resistance to type I diabetes induction in 12-lipoxygenase knockout mice". *J. Clin.Invest.* 103:1431.
- 35 10. Welsh, M., L. Christmansson, T. Karlsson, S. Sandler, and N. Welsh. 1999. "Transgenic mice expressing Shb adaptor protein under the control of rat insulin promoter exhibit altered viability of pancreatic islet cells". *Mol.Med.* 5:169.
- 40 11. Chen, G., H.E. Hohmeier, R. Gasa, V.V. Tran, and C.B. Newgard. 2000. "Selection of insulinoma cell lines with resistance to interleukin-1beta- and gamma-interferon-induced cytotoxicity". *Diabetes* 49:562.
- 45 12. Flodstrom, M., B. Tyrberg, D.L. Eizirik, and S. Sandler. 1999. "Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes". *Diabetes* 48:706.
- 50

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

13. Wang, L., A. Bhattacharjee, Z. Zuo, F. Hu, R.E. Honkanen, P.O. Berggren, and M. Li. 1999. "A low voltage-activated Ca²⁺ current mediates cytokine-induced pancreatic beta-cell death". *Endocrinology* 140:1200.
- 5 14. Yamada, K., F. Ichikawa, S. Ishiyama-Shigemoto, X. Yuan, and K. Nonaka. 1999. "Essential role of caspase-3 in apoptosis of mouse beta-cells transfected with human Fas". *Diabetes* 48:478.
- 10 15. Larsen, C.M., K.A. Wadt, L.F. Juhl, H.U. Andersen, A.E. Karlsen, M.S. Su, K. Seedorf, L. Shapiro, C.A. Dinarello, and T. Mandrup-Poulsen. 1998. "Interleukin-1beta-induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases". *J.Biol.Chem.* 273:15294.
- 15 16. Yoon, J.W., C.S. Yoon, H.W. Lim, Q.Q. Huang, Y. Kang, K.H. Pyun, K. Hirasawa, R.S. Sherwin, and H.S. Jun. 1999. "Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells". *Science* 284:1183.
- 20 17. Bonny, C., A. Oberson, S. Negri, S. Stem, and D.F. Schorderet. 2000. "Cell-permeable peptide inhibitors of JNK with biological activity in mice". *Diabetes* 49: in Press.
- 25 18. Iwahashi, H., T. Hanafusa, Y. Eguchi, H. Nakajima, J. Miyagawa, N. Itoh, K. Tomita, M. Namba, M. Kuwajima, T. Noguchi, Y. Tsujimoto, and Y. Matsuzawa. 1996. "Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2". *Diabetologia* 39:530.
- 30 19. Dupraz, P., C. Rinsch, W.F. Pralong, E. Rolland, R. Zufferey, D. Trono, and B. Thorens. 1999. "Lentivirus-mediated Bcl-2 expression in betaTC-tet cells improves resistance to hypoxia and cytokine-induced apoptosis while preserving in vitro and in vivo control of insulin secretion". *Gene Ther.* 6:1160.
- 35 20. Giannoukakis, N., W.A. Rudert, S.C. Ghivizzani, A. Gambotto, C. Ricordi, M. Trucco, and P.D. Robbins. 1999. "Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1beta-induced beta-cell impairment and activation of islet cell apoptosis in vitro". *Diabetes* 48:1730.
- 40 21. Gibbs, J.B. 2000. "Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research". *Science* 287:1969.
- 45 22. Burns, K., F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J.L. Bodmer, F. Di Marco, L. French, and J. Tschopp. 1998. "MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling". *J.Biol.Chem.* 273:12203.
- 50 23. Stephens, L.A., H.E. Thomas, L. Ming, M. Grell, R. Darwiche, L. Volodin, and T.W. Kay. 1999. "Tumor necrosis factor-alpha-activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells". *Endocrinology* 140:3219.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

24. Ammendrup, A., A. Oberson, K. Nielsen, N. Andersen, P. Serup, O. Madsen, T. Mandrup-Poulsen, and C. Bonny. 2000. "The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic β -cells". *Diabetes* 49: In Press.
25. Hawiger, J. 1999. "Noninvasive intracellular delivery of functional peptides and proteins". *Curr.Opin.Chem.Biol.* 3:89.
26. Schwarze, S.R., A. Ho, A. Vocero-Akbani, and S.F. Dowdy. 1999. "In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse". *Science* 285:1573.
27. Brugidou, J., C. Legrand, J. Mery, and A. R.abcic. 1995. "The retro-inverso form of a homeobox-derived short peptide is rapidly internalised by cultured neurones: a new basis for an efficient intracellular delivery system". *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 214:685.
28. Oehlke, J., A. Scheller, B. Wiesner, E. Krause, M. Beyemiann, E. Klauschenz, M. Melzig, and M. Bienert. 1998. "Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically". *Biochim.Biophys.Acta* 1414:127.
29. Rouquet, N., J.C. Pages, T. Molina, P. Briand, and V. Joulin. 1996. "ICE inhibitor YVADcmk is a potent therapeutic agent against in vivo liver apoptosis". *Curr.Biol.* 6:1192.
30. Lin, Y.-Z., S. Yao, R.A. Veach, T.R. Torgerson, and J. Hawiger. 1995. "Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence". *J.Biol.Chem.* 270:14255.
31. Torgerson, T.R., A.D. Colosia, J.P. Donahue, Y.Z. Lin, and J. Hawiger. 1998. "Regulation of NF-kappa B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappa B p50". *J.Immunol.* 161:6084.
32. Gibbs, J.B. and A. Oliff 1994. "Pharmaceutical research of molecular oncology". *Cell* 79:193.
33. de Jong, M., W.H. Bakker, B.F. Bernard, R. Valkema, D.J. Kwekkeboom, J.C. Reubi, A. Srinivasan, M. Schmidt, and E.P. Krenning. 1999. "Preclinical and initial clinical evaluation of ^{111}In -labeled nonsulfated CCK8 analog: a peptide for CCK-B receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy". *J.Nucl.Med.* 40:2081.
34. Breeman, W.A., L.J. Hofland, M. de Jong, B.F. Bernard, A. Srinivasan, D.J. Kwekkeboom, T.J. Visser, and E.P. Krenning. 1999. "Evaluation of radiolabelled bombesin analogues for receptor-targeted scintigraphy and radiotherapy". *Int.J. Cancer* 81:658.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

- 5 35. Hofland, L.J., W.A. Breeman, E.P. Krenning, M. de Jong, M. Waaijers, P.M. van Koetsveld, H.R. Macke, and S.W. Lamberts. 1999. "Internalization of [I 251-Tyr³]Ostreotide by somatostatin receptor-positive cells in vitro and in vivo: implications for somatostatin receptor-targeted radio-guided surgery". *Proc.Assoc.Am.Physicians*. 111:63.
- 10 36. Kato, Y. and Y. Sugiyama. 1997. "Targeted delivery of peptides, proteins, and genes by receptor-mediated endocytosis". *Crit.Rev. Ther.Drug Carrier.Syst.* 14:287.
- 15 37. Anderson, C.L. 1989. "Human IgG Fc receptors". *Clin.Immunol.Immunopathol.* 53:S63.
38. Lund, K.A., L.K. Opreko, C. Starbuck, B.J. Walsh, and H.S. Wiley. 1990. "Quantitative analysis of the endocytic system involved in hormone-induced receptor internalization". *J.Biol.Chem.* 265:15713.
- 20 39. Smith, R.M. and L. Jarett. 1988. "Receptor-mediated endocytosis and intracellular processing of insulin: ultrastructural and biochemical evidence for cell-specific heterogeneity and distinction from nonhormonal ligands". *Lab.Invest.* 58:613.
- 25 40. Soler, A.P., J. Alemany, R.M. Smith, F. de Pablo, and L. Jarett. 1990. "The state of differentiation of embryonic chicken lens cells determines insulin-like growth factor I internalization". *Endocrinology* 127:595.
- 30 41. Widmann, C., W. Dolci, and B. Thorens. 1995. "Agonist-induced internalization and recycling of the glucagon-like peptide-1 receptor in transfected fibroblasts and in insulinomas". *Biochem.J.* 310:203.
42. York, S.J., L.S. Arneson, W.T. Gregory, N.M. Dahms, and S. Kornfeld. 1999. "The rate of internalization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor H receptor is enhanced by multivalent ligand binding". *J.Biol.Chem.* 274:1164.
- 35 43. Mukherjee, S., R.N. Ghosh, and F.R. Maxfield. 1997. "Endocytosis". *Physiol.Rev.* 77:759.
44. Ivanenkov, V., F. Felici, and A.G. Menon. 1999. "Uptake and intracellular fate of phage display vectors in mammalian cells". *Biochem.Biophys.Acta* 1448:450.
- 40 45. Cabibbo, A., E. Sporeno, C. Toniatti, S. Altamura, R. Savino, G. Paonessa, and G. Ciliberto. 1995. "Monovalent phage display of human interleukin (hIL)-6: selection of superbinder variants from a complex molecular repertoire in the hIL-6 D-helix". *Gene* 167:41.
- 45 46. Zwick, M.B., J. Shen, and J.K. Scott. 1998. "Phage-displayed peptide libraries". *Curr.Opin.Biotechnol.* 9:427.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

47. Ivanenkov, V.V., F. Felici, and A.G. Menon. 1999. "Targeted delivery of multivalent phage display vectors into mammalian cells". *Biochem.Biophys.Acta* 1448:463.
- 5 48. Pasqualini, it and E. Ruoslahti. 1996. "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries". *Nature* 380:364.
49. Pasqualuni, B., and B. Ruoslahti. 1996. "Tissue targeting with phage peptide libraries". *Mol.Psychiatry* 1:423.
- 10 50. Mahato, R.I., Y. Takakura, and M. Hashida. 1997. "Development of targeted delivery systems for nucleic acid drugs". *J Drug Target.* 4:337.
- 15 51. Mahato, R.I., Y. Takakura, and M. Hashida. 1997. "Nonviral vectors for in vivo gene delivery: physicochemical and pharmacokinetic considerations". *Crit.Rev. Ther Drug Carrier.Syst.* 14:133.
52. Damke, H. 1996. "Dynamin and receptor-mediated endocytosis". *FEBS Lett.* 389:48.
- 20 53. Zacher, A.N., C.A. Stock, J.W. Golden, and G.P. Smith. 1980. "A new filamentous phage cloning vector: fd-tet". *Gene* 9:127.
54. Scharfmann, R. and P. Czernichow. 1996. "Differentiation and growth of pancreatic beta cells". *Diabetes Metab.* 22:223.
- 25 55. Bonner-Weir, S. 1994. "Regulation of pancreatic beta-cell mass in vivo". *Recent.Prog.Horm.Res.* 49:91.
56. Widmann, C., W. Dolci, and B. Thorens. 1995. "Agonist-induced internalization and recycling of the glucagon-like peptide-1 receptor in transfected fibroblasts and in insulinomas". *Biochem.J.* 310:203.
- 30 57. Kim, R., Y. Ohi, H. Inoue, and T. Toge. 2000. "Enhancement of chemotherapeutic agents induced-apoptosis associated with activation of c-Jun N-terminal kinase I and caspase 3 (CPP32) in bax-transfected gastric cancer cells". *Anticancer Res.* 20:439.
- 35 58. Usami, I., M. Kubota, R. Bessho, A. Kataoka, S. Koishi, K. Watanabe, M. Sawada, Y.W. Lin, Y. Akiyama, and K. Furusho. 1998. "Role of protein tyrosine phosphorylation in etoposide-induced apoptosis and NF-kappa B activation". *Biochem.Pharmacol.* 55:185.
- 40 59. Sela, M. and E. Zisman. 1997. "Different roles of D-amino acids in immune phenomena". *FASEB J.* 11:449.
- 45 60. Terskikh, A.V., J.M. Le Doussal, R. Cramer, I. Fisch, J.P. Mach, and A.V. Kajava. 1997. "'Peptabody': a new type of high avidity binding protein". *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 94:1663.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

61. Carrithers, M.D. and M.R. Lerner. 1996. "Synthesis and characterization of bivalent peptide ligands targeted to G-protein-coupled receptors". *Chem.Biol.* 3:537.
- 5 62. Zeng, W., D.C. Jackson, and K. Rose. 1996. "Synthesis of a new template with a built-in adjuvant and its use in constructing peptide vaccine candidates through polyoxime chemistry". *J.Pept.Sci.* 2:66.
- 10 63. Ulbrich, K., V. Subr, I. Strohal, D. Plocova, M. Jelinkova, and B. Rihova. "Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules. I. Synthesis and physico-chemical characterisation". *J.Controlled Release*.2000 Feb. 14.;64.(1-3):63.-79. 64:63.
- 15 64. Thorens, B. 1992. "Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1". *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 89:8641.
- 20 65. Volz, A., R.Goke, B. Lankat-Buttgereit, H.C. Fehmann, H.P. Bode, and B.Goke. 1995. "Molecular cloning, functional expression, and signal transduction of the GIP-receptor cloned from a human insulinoma". *FEBS Lett.* 373:23.
- 25 66. Yamato, E., H. Ikegami, K. Takekawa, T. Fujisawa, Y. Nakagawa, Y. Hamada, H. Ueda, and T. Ogihara. 1997. "Tissue-specific and glucose-dependent expression of receptor genes for glucagon and glucagon-like peptide-1 (GLP-1)". *Horm.Metab.Res.* 29:56.
- 30 67. Smith, G.P. and J.K. Scott. 1993. "Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage". *Methods Enzymol.* 217:228.
- 35 68. Bonny, C., A. Oberson, M. Steinmann, D.F. Schorderet, P. Nicod, and G. Waeber. 2000. "IB1 reduces cytokine-induced apoptosis of insulin-secreting cells". *J.Biol.Chem.* 275:16466.
- 40 69. Hoorens, A., M. Van de Casteele, G. Kloppel, and D. Pipeleers. 1996. "Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program". *J.Clin.Invest.* 98:1568.
- 45 70. Gotoh, M., T. Maki, S. Satomi, J. Porter, S. Bonner-Weir, C.J. O'Hara, and A.P. Monaco. 1987. "Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection". *Transplantation* 43:725.
71. Bonny, C., P. Nicod, and G. Waeber. 1998. "IB1, a JIP-1-related nuclear protein present in insulin-secreting cells". *J.Biol.Chem.* 273:1843.
72. Negri, S., A. Oberson, M. Steinmann, P. Nicod, G. Waeber, D.F. Schorderet, and C. Bonny. 2000. "cDNA cloning and mapping of a novel islet-brain/JNK interacting protein". *Genomics* 64:324.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

CLAIMS

We claim:

- 5
1. A transporter peptide comprising at least one amino acid sequence selected from the group consisting of:
- a) $(X_mRX_oRX_n)$;
 - b) (X_mRRRX_o) ;
 - 10 c) (X_mRRXXR_n) ; and
 - d) (X_mRXRRX_n) ,
- wherein
- X is a non-basic amino acid;
 - m is an integer from zero to fourteen;
 - 15 n is an integer, independent of m, between zero and fourteen;
 - o is an integer, independent of m and n, between zero and five; and
- wherein said transporter peptide is capable of translocating across a biological membrane.
- 20
2. The transporter peptide of claim 1, wherein the amino acid sequence is R-X-X-R.
3. The transporter peptide of claim 1, wherein the transporter peptide is coupled to an effector.
- 25
4. The transporter peptide of claim 3, wherein said effector is a nucleic acid.
5. The transporter peptide of claim 3, wherein said nucleic acid is DNA.
6. The transporter peptide of claim 3, wherein said nucleic acid is RNA.
- 30
7. The transporter peptide of claim 3, wherein said effector is a peptide.
8. The transporter peptide of claim 3, wherein said effector is a pharmaceutically active agent.
- 35

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

9. The transporter peptide of claim 8, wherein said pharmaceutically active agent is selected from the group consisting of: a toxin; an antibiotic; an antipathogenic agent; an antigen; an antibody fragment; an immunomodulator; an enzyme, and a therapeutic agent.
- 5
10. The transporter peptide of claim 1, wherein the peptide is less than 50 amino acids long.
11. The transporter peptide of claim 1, wherein the peptide is less than 25 amino acids long.
- 10
12. The transporter peptide of claim 1, wherein the peptide is less than 15 amino acids long.
- 15
13. The transporter peptide of claim 1 wherein translocation occurs within a tissue selected from the group consisting of: pancreatic B-cells; hepatocytes; colon cells; muscle cells; and lung cells.
- 20
14. A method of translocating the transporter peptide of claim 1 across the membrane of pancreatic B-cells, wherein the transporter peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1-6.
- 25
15. A method of translocating the transporter peptide of claim 1 across the membrane of hepatocytes, wherein the transporter peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 7-10.
16. A method of translocating the transporter peptide of claim 1 across the membrane of colon cells, wherein the transporter peptide is SEQ ID NO: 11.
- 30
17. A method of translocating the transporter peptide of claim 1 across the membrane of muscle cells, wherein the transporter peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 12-20.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

18. A method of translocating the transporter peptide of claim 1 across the membrane of lung cells, wherein the transporter peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 21-34.
- 5 19. A transporter unit comprising the transporter peptide of claim 1 conjugated to an effector.
20. The transporter unit of claim 19, wherein the effector is selected from the group consisting of: a nucleic acid; a peptide; and a pharmaceutically active agent.
- 10 21. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically or prophylactically effective amount of the transporter unit according to claim 19, and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 15 22. A method of producing a translocatable conjugate between the transporter peptide of claim 1 and an effector, said method comprising conjugating said effector to said transporter peptide to form a transporter peptide-effector conjugate.
- 20 23. A method of translocating an effector into the cytoplasm and nucleus of a eukaryotic cell, said method comprising:
- a) conjugating said effector to the transporter peptide of claim 1 to form a transporter peptide-effector conjugate; and
 - b) introducing said transporter peptide-effector conjugate to the cell.
- 25 24. The method of claim 23, wherein the introducing step is achieved by incubating a cell culture in the presence of said transporter peptide-effector conjugate, or injecting said transporter peptide-effector conjugate into the cell of claim 22.
- 30 25. The method of claim 23, wherein the eukaryotic cell is a human cell.
26. A method of increasing the intracellular concentration of an effector within a eukaryotic cell, said method comprising;

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

- 5
- a) conjugating said effector to the transporter peptide of claim 1 to form a transporter peptide-effector conjugate;
 - b) incubating said cell in the presence of said transporter peptide-effector conjugate, under conditions promoting active metabolism of said eukaryotic cell.
27. The method of claim 26, wherein the eukaryotic cell is a human cell.
- 10
28. A kit comprising in one or more containers, a therapeutically or prophylactically effective amount of the pharmaceutical composition of claim 21.
- 15
29. A method of treating or preventing a disease, said method comprising administering to a subject in which such treatment or prevention is desired the pharmaceutical composition of claim 21, in an amount sufficient to treat or prevent said disease in said subject.
- 20
30. The method of claim 29, wherein said disease is selected from a group consisting of: diabetes; colon cancer; respiratory ailments; neurodegenerative disorders; cardioplegia; and viral infections.
- 25
31. A method of screening a phage library for transporter peptides, said method comprising:
- a) providing a phage display library;
 - b) screening said library against specific cell types; and
 - c) determining the cells having internalized phages.
- 30
32. The method of claim 31 further comprising the steps of:
- d) identifying the DNA from internalized phages; and
 - e) deducing the expressed peptides.
33. The method of claim 31, wherein said screening step includes panning for at least three cycles.

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

34. The method of claim 31, wherein said phage display library is a multivalent phage display library.

5 35. A transporter peptide, wherein the amino acid sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1-34.

WO 02/31109

1

PCT/IB01/02423

SEQUENCE LISTING

<110> PACTT, Tech Transfer Office University of Lausanne
Bonny, Christophe

<120> INTRACELLULAR DELIVERY OF BIOLOGICAL EFFECTORS

<130> 20349-512 Transporter peptides

<140> Unknown

<141> 2001-10-15

<150> U.S.S.N. 60/240,315

<151> 2000-10-13

<160> 37

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4

<212> ERT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 1

Arg Arg Thr Lys

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 2

Arg Lys Leu Arg

1

<210> 3

WO 02/31109

2

PCT/IB01/02423

<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 3
Arg Arg Pro Lys
1

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 4
Pro Thr Ala Lys Pro Thr Tyr Thr Lys
1 5

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 5
Ile Gln Gly Asn Gly Arg Gln Val Gly Cys Leu Thr Asn Lys
1 5 10

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER

WO 02/31109

3

PCT/IB01/02423

PEPTIDE

<400> 6

Met Arg Gly Leu Ser Lys Arg Gly
1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 7

Arg Gln Phe Arg Lys
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 8

Arg Arg Ile Arg Gly
1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 9

Asn Arg Arg Arg Gly Ile Asn
1 5

WO 02/31109

PCT/IB01/02423

4

<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 10
Lys Gly Lys Trp
1

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 11
Arg Gly Asn Arg Gly Ala Arg
1 5

<210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 12
Arg Arg Pro Arg
1

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/31109

5

PCT/IB01/02423

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 13
Gly Arg Arg Lys Gly
1 5

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 14
Glu Arg Arg Lys
1

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 15
Ser Gly Gly Arg Lys Gln Arg
1 5

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 16
Arg Ser Lys Arg

WO 02/31109

6

PCT/IB01/02423

1

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 17
Arg Arg Ser Gly Arg
1 5

<210> 18
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 18
Lys Gln Arg Arg
1

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 19
Gly Lys Arg Ala Arg
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT

WO 02/31109

7

PCT/IB01/02423

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 20

Thr Gly Lys Arg Met Thr Arg
1 5

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 21

Lys Arg Gly Arg
1

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 22

Ser Leu Arg Arg Arg
1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

WO 02/31109

8

PCT/IB01/02423

<400> 23

Pro Ser Leu Arg Arg Pro Arg
1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 24

Tyr Lys Arg Gly Arg
1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 25

Gly Met Gly Arg Lys Pro Arg
1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 26

Arg Arg Arg Val Gly
1 5

<210> 27

WO 02/31109

9

PCT/IB01/02423

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 27
Arg Ser Phe Gly Val Lys Lys Tyr Gly
1 5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 28
Lys Ser Leu Arg Ser Phe Lys
1 5

<210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 29
Arg Val Arg Arg
1

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER

WO 02/31109

10

PCT/IB01/02423

PEPTIDE

<400> 30

Pro Arg Ser Arg Arg
1 5

<210> 31

<211> 4

<212> FRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 31

Met Arg Arg Arg
1

<210> 32

<211> 11

<212> FRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 32

Tyr Gly Gly Lys Arg Thr Leu Ala Met Ser Lys
1 5 10

<210> 33

<211> 5

<212> FRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 33

Gly Arg Arg Ser Arg
1 5

WO 02/31109

11

PCT/IB01/02423

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TRANSPORTER
PEPTIDE

<400> 34
Tyr Pro Leu Pro Asn Met Lys
1 5

<210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Caspase
inhibitor peptide

<400> 35
Tyr Val Ala Asp
1

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Inhibitor of
NF- κ B nuclear localization

<400> 36
Val Gln Arg Lys Arg Gln Lys Leu Met Pro
1 5 10

<210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/31109

12

PCT/IB01/02423

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: JNK Inhibitor

<400> 37

Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg
1 5 10 15Ser Gln Asp Thr
20

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/031109 A3(51) International Patent Classification: C07K 5/068,
5/09, 5/11, 7/06, 7/08, 14/47, 1/04, A61K 47/48, 38/05,
38/06, 38/07, 38/08, 38/10, A61P 5/48, 9/00

(21) International Application Number: PCT/IB01/02423

(22) International Filing Date: 15 October 2001 (15.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/240,315 13 October 2000 (13.10.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): UN-
IVERSITY OF LAUSANNE [CH/CH]; Rue de Bugnon
21, CH-1005 Lausanne (CH).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): BONNY, Christophe
[CH/CH]; Chief Research Unit, Division of Medical Ge-
netics, CHUV, Talaises 1, CH-1011 Lausanne (CH).(74) Agent: BUGNON S.A.; Case 375, CH-1211 Geneva 12
(CH).(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
16 January 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/031109 A3

(54) Title: INTRACELLULAR DELIVERY OF BIOLOGICAL EFFECTORS BY NOVEL TRANSPORTER PEPTIDE
SEQUENCES(57) Abstract: The invention relates to a sequence of amino acids with the capacity to facilitate transport of an effector across a
biological membrane. More specifically, the present invention relates to novel peptide transporter that specifically target certain cell
types for the intracellular delivery of drugs and therapeutic agents, comprising at least one amino acid sequence selected from the
group consisting of: a) (X_mRRX_n), b) (X_mRRRX_n), c) (X_mRRXR_n), and d) (X_mRXR_n), wherein X is a non-basic amino acid;
m is an integer from zero to fourteen; n is an integer, independent of m, between zero and fourteen; o is an integer, independent of
m and n, between zero and five; and wherein said transporter peptide is capable of translocating across a biological membrane.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT						International Application No. PCT/IB 01/02423
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER						
IPC 7	C07K5/068	C07K5/09	C07K5/11	C07K7/06	C07K7/08	
	C07K14/47	C07K1/04	A61K47/48	A61K38/05	A61K38/06	
	A61K38/07	A61K38/08	A61K38/10	A61P5/48	A61P9/00	
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)						
IPC 7 C07K						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.
X	WO 98 51325 A (MAHONY DANIEL J O ; PATTERSON CATHERINE A (IE); ELAN CORP PLC (IE);) 19 November 1998 (1998-11-19) abstract; claims 10,14					1-30, 35
X	WO 98 51825 A (ELAN CORP PLC ; SEVESO MICHELA (IE); MAHONY DANIEL JOSEPH O (IE); A) 19 November 1998 (1998-11-19) abstract; claim 2					1-35
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.						
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims 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 ** 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				Date of mailing of the international search report		
14 June 2002				08. 10. 02		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5516 Patentstrasse 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3076				Authorized officer Lüdemann, S		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB 01/02423		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61P11/00 A61P25/00 A61P31/12 G01N33/68				
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)				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents : <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means ** document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> *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 ** 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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means ** 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 ** 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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means ** 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 ** 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 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	Date of mailing of the international search report			
14 June 2002	08.10.02			
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lüdemann, S			

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB 01/02423
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 14-18, 23-27, 29-30 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 1.b, 1.c, 1.d (complete), 2-15, 17-30, 35 (partially) 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/>	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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	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.	<input checked="" type="checkbox"/>	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.: s. pct/isa/206
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/JP 01 02423

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 14-18, 23-27, 29-30

Although claims 14-18 and 23-27, as long as in vivo methods are concerned, and claims 29-30 are related to methods for treatment of the human or animal body by therapy (according to Rule 39.1(iv) PCT), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1.b, 1.c, 1.d (complete) , 2-15, 17-30, 35 (partially)

The first invention as relating to claims 1.a, 16 (complete) and 2-30, 35 (all partially) relates to an extremely large number of possible products. Support within the meaning of Article 6 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the products claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Furthermore, the scope of the general concept of said first invention (as given in the formula in claim 1.a, considering that this formula needs only be COMPRISED in the transporter peptide) is so broad that the search found an overflow of documents relevant for novelty. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely the peptides listed in table 5 falling within the scope of claim 1.a, as seq id 1, 3, 7, 11, 13, 14, 17-21, 24.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No
PCT/IB 01/02423

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9851325 A	19-11-1998	AU 7494398 A	08-12-1998
		EP 1019071 A	19-07-2000
		JP 2002504811 T	12-02-2002
		NZ 501110 A	26-10-2001
		NZ 513915 A	28-09-2001
WO 9851825 A	19-11-1998	US 6361938 B	26-03-2002
		AU 7575698 A	08-12-1998
		EP 0981649 A	01-03-2000
		JP 2002502368 T	22-01-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 7/08	
C 0 7 K 7/08	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/70	A 6 1 K 37/02	
// G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	

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

(72) 発明者 ボニー, クリストフ

スイス国 ツェーハー - 1 0 1 1 ローザンヌ, ファレーズ 1, シーエイチユーブイ, デ
イビジョン オブ メディカル ジェネティクス, チーフ リサーチ ユニット

F ターム(参考) 4B063 QA18 QQ42 QQ79 QR74
4C076 AA95 CC41 EE59A FF68
4C084 AA02 AA13 AA17 BA41 CA17 CA62 MA05 NA10 NA13 ZA011
ZA151 ZA361 ZA591 ZB261 ZB331 ZC351
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 NA10 NA13 ZA01 ZA15 ZA36
ZA59 ZB26 ZB33 ZC35
4H045 AA10 AA30 BA13 BA14 BA15 BA16 BA41 BA54 EA21 EA23
EA27 EA28 EA29

专利名称(译)	通过新的转运肽序列细胞内递送生物效应子		
公开(公告)号	JP2004511494A	公开(公告)日	2004-04-15
申请号	JP2002534479	申请日	2001-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	洛桑大学		
申请(专利权)人(译)	ユニバー花旗银行洛桑		
[标]发明人	ボニークリストフ		
发明人	ボニー, クリストフ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/06 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61P3/10 A61P5/48 A61P9/00 A61P9/04 A61P11/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P31/12 A61P35/00 C07K1/04 C07K5/10 C07K5/103 C07K5/107 C07K5/11 C07K5/113 C07K7/06 C07K7/08 C07K19/00 C12Q1/70 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K47/62 A61K47/65 A61P3/10 A61P5/48 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P31/12 A61P35/00 C07K1/047 C07K5/1013 C07K5/1016 C07K5/1019 C07K5/1021 C07K7/06 C07K2319/00		
FI分类号	C07K5/10.ZNA A61K31/7088 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61P3/10 A61P9/04 A61P11/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P31/12 A61P35/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K19/00 C12Q1/70 A61K37/02 G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR74 4C076/AA95 4C076/CC41 4C076/EE59A 4C076/FF68 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA41 4C084/CA17 4C084/CA62 4C084/MA05 4C084/NA10 4C084/NA13 4C084/ZA011 4C084/ZA151 4C084/ZA361 4C084/ZA591 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C084/ZC351 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA10 4C086/NA13 4C086/ZA01 4C086/ZA15 4C086/ZA36 4C086/ZA59 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA41 4H045/BA54 4H045/EA21 4H045/EA23 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/EA29		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/240315 2000-10-13 US		
其他公开文献	JP4387669B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使效应子能够容易地迁移穿过生物膜的氨基酸序列。更具体地，本发明涉及一种新的肽转运特异性靶向特定细胞类型的药物和治疗剂的细胞内递送，肽转运蛋白是一个) (X 米 RX 0 RX 名词) ; b) (X 米 RRRX 名词) ; 选自下组和 d) (X 米 RXRRX 名词) ; C) (X 米 RRXRX 名词) 包含至少一个氨基酸序列选择，其中X是一个非碱性氨基酸；m为从0至14的整数；n，的m独立地在0和14之间O是0到5之间的整数，与m和n无关；其中转运肽可以通过生物膜转运。

フージ	インキュベーション	% 回収
P1	1h	0.01
	5h	1
	17h	10