

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5703466号
(P5703466)

(45) 発行日 平成27年4月22日 (2015. 4. 22)

(24) 登録日 平成27年3月6日 (2015. 3. 6)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	9/99	(2006. 01)	C 1 2 N	9/99	Z N A
C 0 7 K	7/06	(2006. 01)	C 0 7 K	7/06	
C 0 7 K	7/08	(2006. 01)	C 0 7 K	7/08	
C 0 7 K	14/00	(2006. 01)	C 0 7 K	14/00	
A 6 1 K	38/00	(2006. 01)	A 6 1 K	37/02	

請求項の数 19 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-520314 (P2010-520314)	(73) 特許権者	598063203
(86) (22) 出願日	平成20年8月7日 (2008. 8. 7)		パーデュー・リサーチ・ファウンデーション
(65) 公表番号	特表2010-535508 (P2010-535508A)		PURDUE RESEARCH FOUNDATION
(43) 公表日	平成22年11月25日 (2010. 11. 25)		アメリカ合衆国・インディアナ州 479
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/072525		06-4182・ウエスト ラファイエット
(87) 国際公開番号	W02009/021137		ト・ウィン ヘンチェル ブルーヴァード
(87) 国際公開日	平成21年2月12日 (2009. 2. 12)		1281
審査請求日	平成23年8月8日 (2011. 8. 8)	(74) 代理人	110000176
(31) 優先権主張番号	60/963, 941		一色国際特許業務法人
(32) 優先日	平成19年8月7日 (2007. 8. 7)	(72) 発明者	パニチ アリッサ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 インディアナ州 479
(31) 優先権主張番号	60/994, 970		06 ウェスト ラファイエット ヒルク
(32) 優先日	平成19年9月24日 (2007. 9. 24)		レスト ロード 807
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キナーゼ阻害薬およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下式VIの配列を有する、単離されたポリペプチドであって、
Z1-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-Z2 [式VI]、
X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10がKALARQLGVAAまたはKALNRQLAVAAであり、
Z1及びZ2のそれぞれは存在しないか、または導入ドメインである、ポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが
HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA[配列番号166]
である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが
KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173]
である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが
FAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163]
である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記ポリペプチドが

YARAAARQARAKALARQLGVAA[配列番号106]
である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項6】

前記ポリペプチドが

YARAAARQARAKALNRQLAVAA[配列番号100]
である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項7】

前記ポリペプチドが合成されたものである、請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項8】

前記ポリペプチドがL-アミノ酸、D-アミノ酸、または両方を含有する、請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項に記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含有する組成物。

【請求項10】

前記薬学的に許容される担体が水、リンゲル液、食塩水、及び油からなる群から選択される、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

前記組成物が、経口、口腔内、非経口、局所、吸入、直腸内からなる群から選択される投与形態である、請求項9または10に記載の組成物。

【請求項12】

前記投与形態が非経口であって、前記非経口の投与形態は、皮下、筋肉内、静脈内、髄腔内、胸骨内、点滴からなる群から選択される、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

前記組成物が粉末形である、請求項9～12のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項14】

前記組成物が注射可能である、請求項9～12のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項15】

前記ポリペプチドが、約0.01 µg/体重(kg)～約10mg/体重(kg)の範囲の治療有効量である、請求項9～14のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項16】

前記ポリペプチドが、約0.05 µg/体重(kg)～約5mg/体重(kg)の範囲の治療有効量である、請求項9～14のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項17】

キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する薬剤の製造におけるキナーゼ阻害組成物の使用であって、

前記キナーゼ阻害組成物は請求項1～8に記載のいずれか1つの単離されたポリペプチドの阻害量を含み、キナーゼ酵素は前記キナーゼ阻害組成物と接触し、前記キナーゼ酵素の活性が阻害される、使用。

【請求項18】

キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する薬剤の製造におけるキナーゼ阻害組成物の使用であって、

前記キナーゼ阻害組成物は請求項9～16に記載のいずれか1つ組成物を含み、キナーゼ酵素は前記キナーゼ阻害組成物と接触し、前記キナーゼ酵素の活性が阻害される、使用。

【請求項19】

乳癌細胞、中枢神経系癌細胞、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、前立腺癌細胞、肺癌細胞からなる群から選択される癌細胞を含む新生物を治療するための薬剤の製造方法における薬学的組成物の使用方法であって、前記薬学的組成物は、請求項1に記載の式VIの配列を

10

20

30

40

50

有する単離されたペプチドを含み、前記ペプチドは、HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA[配列番号166]、WLRRIKAHRRIKALARQLGVAA[配列番号167]、またはWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA [配列番号169]である、使用方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、米国特許出願第60/963,941号(出願日:2007年8月7日)および第60/994,970号(出願日:2007年9月24日)に基づく利益を主張する。そのそれぞれは、参照によりその全体が本願に組み込まれる。

10

【0002】

連邦政府による資金提供の記載

本発明は、米国立衛生研究所が交付したNIH/NHLBI助成金番号HL074968の下で政府の支援を受けて行った。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本発明は、細胞生物学、キナーゼ阻害ペプチドおよびペプチドをコードする核酸の使用ならびに治療におけるそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

20

【0004】

キナーゼ

キナーゼは、リン酸供与体(通例ATP)から受容体基質へのリン酸基転移反応を触媒する遍在酵素群である。すべてのキナーゼは、本質的に同じリン酸転移反応を触媒するが、それが関与する基質特異性、構造および経路において、著しい多様性を示す。すべての入手可能なキナーゼ配列(おおよそ60,000配列)の最近の分類によれば、キナーゼは25ファミリーの相同タンパク質に分類できることが示されている。フォールド構造の類似性に基づいて、これらのキナーゼファミリーは12フォールド群にまとめられる。25ファミリーのうちの22ファミリー(全配列のおおよそ98.8%)は、フォールド構造が既知の10フォールド群に属する。他の3ファミリーの内、ポリリン酸キナーゼは明確なフォールド群の1つを形成し、残りの2つのファミリーは、共に膜内在性キナーゼであり、最後のフォールド群を構成する。これらのフォールド群は、Rossmann様フォールド、フェレドキシン様フォールド、TIMバレルフォールドおよび逆平行バレルフォールドなどの最も広く分布するタンパク質フォールドの一部ばかりでなく、タンパク質構造のすべての主要なクラス(全、全、+、/)もまた含む。フォールド群の範囲内では、各ファミリーのヌクレオチド結合ドメインのコアは同じ構造を有し、タンパク質のコアのトポロジーは、同じかまたは円順列変異によって関連づけられる。フォールド群内のファミリー間の相同性は含まれない。

30

【0005】

群I(23,124配列)キナーゼは、タンパク質S/T-Yキナーゼ、非定型プロテインキナーゼ、脂質キナーゼおよびATP捕捉酵素を含み、さらにタンパク質S/T-Yキナーゼおよび非定型プロテインキナーゼファミリー(22,074配列)を含む。これらのキナーゼは、コリンキナーゼ(EC 2.7.1.32);プロテインキナーゼ(EC 2.7.1.37);ホスホリラーゼキナーゼ(EC 2.7.1.38);ホモセリンキナーゼ(EC 2.7.1.39);l-ホスファチジルイノシトール4-キナーゼ(EC 2.7.1.67);ストレプトマイシン6-キナーゼ(EC 2.7.1.72);エタノールアミンキナーゼ(EC 2.7.1.82);ストレプトマイシン3'-キナーゼ(EC 2.7.1.87);カナマイシンキナーゼ(EC 2.7.1.95);5-メチルチオリボースキナーゼ(EC 2.7.1.100);バイオマイシンキナーゼ(EC 2.7.1.103);[ヒドロキシメチルグルタリル-CoAレダクターゼ(NADPH2)]キナーゼ(EC 2.7.1.109);タンパク質チロシンキナーゼ(EC 2.7.1.112);[イソクエン酸脱水素酵素(NADP+)]キナーゼ(EC 2.7.1.116);[ミオシンL鎖]キナーゼ(EC 2.7.1.117);ハイグロマイシンBキナーゼ(EC 2.

40

50

7.1.119);カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(EC 2.7.1.123);ロドプシンキナーゼ(EC 2.7.1.125);[アドレナリン受容体]キナーゼ(EC 2.7.1.126);[ミオシンH鎖]キナーゼ(EC 2.7.1.129);[タウタンパク質]キナーゼ(EC 2.7.1.135);マクロライド2'-キナーゼ(EC 2.7.1.136);l-ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(EC 2.7.1.137);[RNAポリメラーゼ]サブユニットキナーゼ(EC 2.7.1.141);ホスファチジルイノシトール-4,5-ニリン酸3-キナーゼ(EC 2.7.1.153);およびホスファチジルイノシトール-4-リン酸3-キナーゼ(EC 2.7.1.154)を含む。群Iは、さらに脂質キナーゼファミリー(321配列)を含む。これらのキナーゼは、l-ホスファチジルイノシトール-4-リン酸5-キナーゼ(EC 2.7.1.68);l D-ミオイノシトール三リン酸3-キナーゼ(EC 2.7.1.127);イノシトール四リン酸5-キナーゼ(EC 2.7.1.140);l-ホスファチジルイノシトール-5-リン酸4-キナーゼ(EC 2.7.1.149) 10; l-ホスファチジルイノシトール-3-リン酸5-キナーゼ(EC 2.7.1.150);イノシトールポリリン酸マルチキナーゼ(EC 2.7.1.151);およびイノシトール六リン酸キナーゼ(EC 2.7.4.21)を含む。群Iはさらに、ATP捕捉キナーゼ(729配列)を含み、これには、イノシトール四リン酸l-キナーゼ(EC 2.7.1.134);ピルビン酸リン酸ジキナーゼ(EC 2.7.9.1);およびピルビン酸水ジキナーゼ(EC 2.7.9.2)を含む。

【 0 0 0 6 】

群II(17,071配列)キナーゼは、Rossmann様キナーゼを含む。群IIは、(i)グルコノキナーゼ(EC 2.7.1.12);ホスホリプロキナーゼ(EC 2.7.1.19);チミジンキナーゼ(EC 2.7.1.21);リボシルニコチンアミドキナーゼ(EC 2.7.1.22);デホスホ CoAキナーゼ(EC 2.7.1.24);アデニル硫酸キナーゼ(EC 2.7.1.25);パントテン酸キナーゼ(EC 2.7.1.33);プロテイン 20キナーゼ(細菌)(EC 2.7.1.37);ウリジンキナーゼ(EC 2.7.1.48);シキミ酸キナーゼ(EC 2.7.1.71);デオキシチジンキナーゼ(EC 2.7.1.74);デオキシアデノシンキナーゼ(EC 2.7.1.76);ポリヌクレオチド5'-ヒドロキシルキナーゼ(EC 2.7.1.78);6-ホスホフルクト 2キナーゼ(EC 2.7.1.105);デオキシグアノシンキナーゼ(EC 2.7.1.113);テトラアシル二糖4'キナーゼ(EC 2.7.1.130);デオキシヌクレオシドキナーゼ(EC 2.7.1.145);アデノシルコピンアミドキナーゼ(EC 2.7.1.156);ポリリン酸キナーゼ(EC 2.7.4.1);ホスホメバロン酸キナーゼ(EC 2.7.4.2);アデニル酸キナーゼ(EC 2.7.4.3);ヌクレオシドリノ酸キナーゼ(EC 2.7.4.4);グアニル酸キナーゼ(EC 2.7.4.8);チミジル酸キナーゼ(EC 2.7.4.9);ヌクレオシドリノ酸アデニル酸キナーゼ(EC 2.7.4.10);(デオキシ)ヌクレオシドリノ酸キナーゼ(EC 2.7.4.13);シチジル酸キナーゼ(EC 2.7.4.14);およびウリジル酸キナーゼ(EC 302.7.4.-)を含むPループキナーゼファミリー(7,732配列);(ii)プロテインキナーゼ(HPrキナーゼ/ホスファターゼ)(EC 2.7.1.37);ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(GTP)(EC4.1.1.32);およびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(ATP)(EC4.1.1.49)を含むホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼファミリー(815配列);(iii)ホスホグリセリン酸キナーゼ(EC 2.7.2.3)およびホスホグリセリン酸キナーゼ(GTP)(EC 2.7.2.10)を含むホスホグリセリン酸キナーゼ(1,351配列)ファミリー;(iv)カルバミン酸キナーゼ(EC 2.7.2.2);アスパラギン酸キナーゼ(EC 2.7.2.4);アセチルグルタミン酸キナーゼ(EC 2.7.2.81);グルタミン酸5キナーゼ(EC 2.7.2.1)およびウリジル酸キナーゼ(EC 2.7.4.-)を含むアスパルトキナーゼファミリー(2,171配列);(v)6-ホスホフルクトキナーゼ(EC 2.7.1.11);NAD(+)キナーゼ(EC 2.7.1.23);l-ホスホフルクトキナーゼ(EC 2.7.1.56);ニリン 40酸-フルクトース-6-リン酸l-ホスホトランスフェラーゼ(EC 2.7.1.90);スフィンガニンキナーゼ(EC 2.7.1.91);ジアシルグリセロールキナーゼ(EC 2.7.1.107);およびセラミドキナーゼ(EC 2.7.1.138)を含むホスホフルクトキナーゼ様キナーゼファミリー(1,998配列);(vi)グルコキナーゼ(EC 2.7.1.2);ケトヘキソキナーゼ(EC 2.7.1.3);フルクトキナーゼ(EC 2.7.1.4);6-ホスホフルクトキナーゼ(EC 2.7.1.11);リボキナーゼ(EC 2.7.1.15);アデノシンキナーゼ(EC 2.7.1.20);ピリドキサルキナーゼ(EC 2.7.1.35);2-デヒドロ-3-デオキシグルコノキナーゼ(EC 2.7.1.45);ヒドロキシメチルピリミジンキナーゼ(EC 2.7.1.49);ヒドロキシエチルチアゾールキナーゼ(EC 2.7.1.50);l-ホスホフルクトキナーゼ(EC 2.7.1.56);イノシンキナーゼ(EC 2.7.1.73);5-デヒドロ-2-デオキシグルコノキナーゼ(EC 2.7.1.92);タガトース-6-リン酸キナーゼ(EC 2.7.1.144);ADP依存性ホスホフルクトキ 50

ナーゼ(EC 2.7.1.146);ADP依存性グルコキナーゼ(EC 2.7.1.147);およびホスホメチルピリミジンキナーゼ(EC 2.7.4.7)を含むリボキナーゼ様ファミリー(2,722配列);(vii)チアミンピロホスホキナーゼ(EC 2.7.6.2)を含むチアミンピロホスホキナーゼファミリー(175配列);ならびに(viii)グリセリン酸キナーゼ((EC 2.7.1.31)を含むグリセリン酸キナーゼファミリー(107配列)を含む。

【 0 0 0 7 】

群IIIキナーゼ(10,973配列)は、(i)theフェレドキシン様フォールドキナーゼ;(ii)ヌクレオシドニリン酸キナーゼ(EC 2.7.4.6)を含むヌクレオシドニリン酸キナーゼファミリー(923配列);(iii)2-アミノ-4-ヒドロキシ-6-ヒドロキシメチルジヒドロプテリジンピロホスホキナーゼ(EC 2.7.6.3)を含むHPPKキナーゼファミリー(609配列);(iv)グアニド酢酸キナーゼ(EC 2.7.3.1);クレアチンキナーゼ(EC 2.7.3.2);アルギニンキナーゼ(EC 2.7.3.3);およびロムブリシンキナーゼ(EC 2.7.3.5)を含むグアニドキナーゼファミリー(324配列);(v)プロテインキナーゼ(ヒスチジンキナーゼ)(EC 2.7.1.37)、[ピルビン酸脱水素酵素(リポアミド)]キナーゼ(EC 2.7.1.99);および[3-メチル-2-オキシブタン酸脱水素酵素(リポアミド)]キナーゼ(EC 2.7.1.115)を含むヒスチジンキナーゼファミリー(9,117配列)を含む。

10

【 0 0 0 8 】

群IVキナーゼ(2,768配列)は、ヘキソキナーゼ(EC 2.7.1.1);グルコキナーゼ(EC 2.7.1.2);フルクトキナーゼ(EC 2.7.1.4);ラムヌロースキナーゼ(EC 2.7.1.5);マンノキナーゼ(EC 2.7.1.7);グルコノキナーゼ(EC 2.7.1.12);L-リブロキナーゼ(EC 2.7.1.16);キシロキナーゼ(EC 2.7.1.17);エリスリトールキナーゼ(EC 2.7.1.27);グリセロールキナーゼ(EC 2.7.1.30);パントテン酸キナーゼ(EC 2.7.1.33);D-リブロキナーゼ(EC 2.7.1.47);L-フクロキナーゼ(EC 2.7.1.51);L-キシロキナーゼ(EC 2.7.1.53);アロースキナーゼ(EC 2.7.1.55);2-デヒドロ-3-デオキシガラクトノキナーゼ(EC 2.7.1.58);N-アセチルグルコサミンキナーゼ(EC 2.7.1.59);N-アシルマンノサミンキナーゼ(EC 2.7.1.60);ポリリン酸グルコースホスホトランスフェラーゼ(EC 2.7.1.63); α -グルコシドキナーゼ(EC 2.7.1.85);酢酸キナーゼ(EC 2.7.2.1);酪酸キナーゼ(EC 2.7.2.7);分枝鎖脂肪酸キナーゼ(EC 2.7.2.14);およびプロピオン酸キナーゼ(EC 2.7.2.-)を含むH様キナーゼを含む。

20

【 0 0 0 9 】

群Vキナーゼ(1,119配列)は、ピルビン酸キナーゼ(EC 2.7.1.40)を含むTIM / バレルキナーゼを含む。

30

【 0 0 1 0 】

群VIキナーゼ(885配列)はGHMPキナーゼを含む。これらの酵素は、ガラクトキナーゼ(EC 2.7.1.6);メバロン酸キナーゼ(EC 2.7.1.36);ホモセリンキナーゼ(EC 2.7.1.39);L-アラビノキナーゼ(EC 2.7.1.46);フコキナーゼ(EC 2.7.1.52);シキミ酸キナーゼ(EC 2.7.1.71);4-(シチジン5'-ジホスホ)-2-C-メチル-D-エリスリトールキナーゼ(EC 2.7.1.148);およびホスホメバロン酸キナーゼ(EC 2.7.4.2)を含む。

【 0 0 1 1 】

群VIIキナーゼ(1,843配列)は、チアミンリン酸キナーゼ(EC 2.7.4.16)およびセレニド水ジキナーゼ(EC 2.7.9.3)を含むAIR合成酵素様キナーゼを含む。

40

【 0 0 1 2 】

群VIIIキナーゼ(565配列)は、リボフラビンキナーゼ(EC 2.7.1.26)を含むリボフラビンキナーゼ(565配列)を含む。

【 0 0 1 3 】

群IXキナーゼ(197配列)は、グリセロンキナーゼ(EC 2.7.1.29)を含むジヒドロキシアセトンキナーゼを含む。

【 0 0 1 4 】

群Xキナーゼ(148配列)は、グリセリン酸キナーゼ(EC 2.7.1.31)を含む含む推定上のグリセリン酸キナーゼを含む。

【 0 0 1 5 】

50

群XIキナーゼ(446配列)は、ポリリン酸キナーゼ(EC 2.7.4.1)を含むポリリン酸キナーゼを含む。

【0016】

群XIIキナーゼ(263配列)は膜内在性キナーゼを含む。群XIIは、ドリコールキナーゼ(EC 2.7.1.108)を含むドリコールキナーゼファミリー;およびウンデカプレノールキナーゼ(EC 2.7.1.66)を含むウンデカプレノールキナーゼファミリーを含む。

【0017】

キナーゼは、構造レベル、生化学レベルおよび細胞レベルにおいて最もよく研究された酵素の1つであり、多くの細胞の代謝経路およびシグナル伝達経路において不可欠な役割を果たしている。すべてのキナーゼが同じリン酸供与体(ほとんどの場合ATP)を利用し、見かけは同じリン酸転移反応を触媒するよう思われるにもかかわらず、それらはフォールド構造および基質認識機構において著しい多様性を示す。このことは、主として、それらの基質の構造および特性の非常に多様な性質に基づくと考えられる。

【0018】

シグナル伝達経路

【0019】

プロテインキナーゼのAGCファミリーは、プロテインキナーゼB(PKB、別名Akt)のアイソフォーム、p70リボソームS6キナーゼ(S6K)、血清およびグルココルチコイド誘導性プロテインキナーゼ(SGK)ならびにプロテインキナーゼC(PKC)の非定型アイソフォームを含み、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI_3 キナーゼ)のインスリンまたは増殖因子誘導刺激の数分以内に活性化される。ひとたび活性化されれば、PKB/Aktは、多くの重要な制御タンパク質をリン酸化し、その機能を調節し、アポトーシスの抑制、細胞分裂の進行ならびにグルコース取り込みおよび保存の刺激をもたらす。セリン/トレオニンキナーゼAkt(プロテインキナーゼB)は、細胞増殖、アポトーシス、血管新生および糖尿病に関与するシグナル伝達経路における重要な酵素である。哺乳動物において、3つのAktアイソフォーム(、 、 またはAkt1、2、3)が知られている。これらのアイソフォームは高度の相同性を示すが、その調節リン酸化部位の局在化において少し異なる。Akt酵素は、3つの機能的に異なる領域:1)N末端プレックストリンホモロジー(PH)ドメイン;2)中央触媒ドメイン;および3)C末端疎水性モチーフで構成される。AktのN末端領域におけるPHドメインは、Aktを PIP_2 (ホスファチジルイノシトールビホスフェートまたは PIP_3 の切断により得られる産物)および PIP_3 (ホスファチジルイノシトール(3,4,5)-三リン酸、ホスファチジルイノシトール(4,5)-ビホスフェートに対するクラスIホスホイノシチド3 キナーゼ活性の産物)に向けさせ、3'-ホスホイノシチドと相互作用させ、Aktの細胞膜への動員を助ける脂質結合モジュールを提供する。

【0020】

無刺激細胞において、Aktは、PHドメインと触媒ドメインの間の領域におけるSer¹²⁴部位およびC末端領域におけるThr⁴⁵⁰(Akt において)部位で構成的にリン酸化されている。Aktの活性化には、受容体チロシンキナーゼへの増殖因子の結合および PI_3 -Kの活性化(PI_3 -Kは膜結合型 PIP_2 をリン酸化して PIP_3 を生じる)を必要とする。 PIP_3 のPHドメインへの結合によりAktを細胞膜に固定し、PDK1(ピルビン酸脱水素酵素キナーゼアイソザイム1)によるそのリン酸化および活性化を可能にする。Aktは、2つの調節残基、キナーゼドメインのトレオニン残基および疎水性モチーフのセリン残基のリン酸化後に完全に活性化される。これらのモチーフは、AGCキナーゼファミリー内で構造的および機能的に保存されている。Akt の活性化には、Thr³⁰⁸部位およびSer⁴⁷³部位でのリン酸化が必要である。Akt は、Thr³⁰⁹部位およびSer⁴⁷⁴部位でのリン酸化により活性化される。Akt は、Thr³⁰⁵部位でのリン酸化により活性化される。Aktの活性化には、PDK1により触媒されるキナーゼドメインのトレオニン残基のリン酸化を必要とする。これにより、電荷により誘起されるコンホメーション変化が引き起こされ、基質結合および触媒反応速度増加を可能にする。主としてmTOR/richtor複合体(mTORC2)により行われるセリン残基部位でのリン酸化により、Akt活性をおおよそ10倍増加させる。DNA-PKおよびPKC β IIは、調節サブユニットのセリ

10

20

30

40

50

ン残基をリン酸化することが研究により示されている。トレオニンがリン酸化されていないAktの疎水性モチーフは、ホスファターゼの作用に対してより感受性が高い。しかしながら、2ヶ所がリン酸化され、完全に活性な酵素は安定であり、核および他の部位へのその局在化が可能になる。Aktの活性は、PTEN(その産物がホスファチジルイノシトール(3,4,5)-三リン酸を脱リン酸化するホスファターゼとして機能するホスファターゼ・テンシン・ホモログ遺伝子)およびSHIP(SH2含有イノシトールホスファターゼ、INPP5D)によって負の制御を受ける。

【 0 0 2 1 】

Aktは、増殖因子を介する細胞生存を促進し、Bad、カスパーゼ-9およびForkhead転写因子(AFX、Daf-16、FKHR)などのアポトーシス促進因子を不活化する(リン酸化による)ことによりアポトーシス細胞死を妨げる。Ser¹³⁶部位でBadをリン酸化することにより、サイトゾル中の14-3-3タンパク質とのその会合を促進し、これによりBadがミトコンドリアに局在化してアポトーシスを誘導することが妨げられる。Aktは、Ser¹⁹⁶部位でのリン酸化によりカスパーゼ-9を不活化して細胞生存を促進する。同様に、活性化されたAktは、Forkheadファミリーメンバーをリン酸化し、それらの細胞質内への移行をもたらす。生存因子およびAkt活性の非存在下では、Forkheadファミリーメンバーは核に移行し、そこで細胞死を促進する遺伝子発現(例えば、FasL)のプログラムを開始する。Aktはまた、Thr²³部位でIKK (核因子 B(NF- B)の活性化に重要な役割を有するI B キナーゼ複合体のサブユニットであり、正常および腫瘍細胞増殖、アポトーシスならびに化学療法への反応性の重要な調節因子である)をリン酸化し、活性化する。活性化されたIKK は、次にはI B をリン酸化し、それをユビキチン化およびプロテアソーム分解の標的とする。これにより、NF- Bの活性化および核内移行ならびに、Bcl-xLおよびカスパーゼ阻害薬を含むNF-kB依存性生存促進遺伝子の転写をもたらす。

【 0 0 2 2 】

Aktはまた、GSK-3(グリコーゲンシンターゼキナーゼ3)をリン酸化し、不活化して、グリコーゲンシンターゼの活性化を進行させる。GSK-3は、サイクリンD(G1期からS期への移行の調節因子)をリン酸化し、サイクリンDをタンパク質分解の標的にする。従って、GSK-3の不活化により、サイクリンDのアップレギュレーションを促進し、細胞周期を促進させることができる。

【 0 0 2 3 】

Aktは、Chk1(DNA損傷エフェクターキナーゼ)をSer²⁸⁰部位でリン酸化し、それによって、ヒトプロテインキナーゼATM(血管拡張性失調症変異)およびATR(毛細血管拡張運動失調症およびRad3関連)が、Ser³⁴⁵部位のリン酸化によりChk1の活性化を阻害することが研究により示されている。Chk1阻害は化学療法剤への腫瘍感作を高めるので、このことは治療上の意義を有する可能性がある。

【 0 0 2 4 】

Aktは、Ser³⁵³部位でCdc25Bをリン酸化し、その細胞質内蓄積をもたらす。Cdc25BはS期の中に活性化を受け、細胞質内の有糸分裂キナーゼCdk1/サイクリンBの活性化に役割を有する。細胞質へのCdc25Bのこの移行により、AktがCdc25B機能を調節し、細胞の有糸分裂開始の調節に関与することが可能になる。

【 0 0 2 5 】

上流のいろいろの癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子によるAktの調節は、癌の進展に影響を与える。乳癌細胞株は、さまざまな度合いでAkt を発現する。Akt阻害薬である1L-6-ヒドロキシメチルchiro-イノシトール2-(R)-2-O-メチル-3-O-オクタデシルカルボナートは、薬剤耐性および薬剤感受性多発性骨髄腫細胞の生存率を共に低下させる。Aktはまた、腫瘍形成にも重要な役割を有する。細胞周期抑制因子p27およびPTENなどの腫瘍抑制因子がそれらの機能を失うとき、Aktは活性化される。Thr¹⁵⁷部位でp27リン酸化することにより、Aktはp27の核内移行を妨げる。細胞内へのp27の誤配置は、乳癌における分化の喪失および予後不良に強く関連づけられてきた。Aktはまた、内因性p21(細胞周期抑制因子)と物理的に結合することが報告されている。p21のThr¹⁴⁵部位でのAktによるリン酸化は、

p21の細胞質への局在化およびそれに続く分解を引き起こす。

【0026】

Aktおよびp53(別名タンパク質53または腫瘍タンパク質53、細胞周期を調節する転写因子)は、細胞生存を決定するシグナル伝達経路において対立する役割を有している。p53のアポトーシス作用が優位な条件下では、Aktの破壊はアポトーシス過程を促進する役割を有している。アポトーシス傾向のある細胞において、p53依存性シグナル伝達はAktのダウンレギュレーションを可能にし、これにより、細胞は、ストレスシグナルに反応して迅速にアポトーシスを起こしやすくなる。特定の環境下で、Aktの活性化はp53の死促進作用に打ち勝つことができ、アポトーシスから細胞を救出することができる。Aktは、Ser166およびSer188部位でMdm2(p53腫瘍抑制因子活性を調節する癌遺伝子によりコードされるタンパク質)をリン酸化し、核へのMdm2の移動を促進することができ、Mdm2は核内でp53を不安定化し、プロテアソーム経路によるその分解を促進する。

10

【0027】

キナーゼ阻害

真核プロテインキナーゼは、その触媒ドメインによって互いに関連する相同タンパク質の最大スーパーファミリーの1つを構成する。大部分の関連プロテインキナーゼは、セリン/トレオニンリン酸化またはチロシンリン酸化のいずれかに特異的である。プロテインキナーゼの刺激は、シグナル伝達系におけるこれらの酵素の最もよく見られる活性化機構の1つと考えられ、従って細胞外刺激に対する細胞応答における不可欠な役割を果たしている。多くの基質は、複数のプロテインキナーゼによりリン酸化を受けることが知られている。種々のプロテインキナーゼの触媒ドメインの一次配列に関するかなりの量の情報が公表されている。これらの配列は、ATP結合、触媒作用および構造的完全性維持に關与する多数の残基を共通にする。大部分のプロテインキナーゼは、よく保存された30~32kDaの触媒ドメインを有する。プロテインキナーゼの調節因子を同定し利用する研究が試みられている。これらの調節因子は、抗体、阻害ペプチドおよび阻害薬を含む。

20

【0028】

阻害薬

酵素阻害薬は、酵素に結合し、それによって酵素活性を低下させる分子である。阻害薬の結合により、酵素の活性部位に基質が入り込むのを妨げることができ、かつ/または酵素がその反応を触媒するのを妨げることができる。阻害薬の結合は可逆的かまたは不可逆的かのいずれかである。不可逆的阻害薬は、通例、酵素と反応して、例えば酵素活性に必要な重要なアミノ酸残基を修飾することによりそれを化学的に変化させる。対照的に、可逆的阻害薬は非共有結合的に結合し、これらの阻害薬が酵素に結合するのか、酵素-基質複合体に結合するのか、またはその両方であるのかに応じて種類の異なる阻害を生じる。

30

【0029】

酵素阻害薬は、多くの場合その特異性および効力によって評価される。本明細書において、用語"特異性"は、1つの物質の他の物質への選択的結合または影響のことを言う。本明細書において、用語"効力"は、有効性、効果、強度のことを言い、あるいは一般的には、酵素を阻害するのに必要な濃度を示す解離定数のことを言う。

【0030】

プロテインキナーゼの阻害薬は、プロテインキナーゼ活性を調節するツールとして使用するために研究されてきた。例えば、サイクリン依存性(Cdk)キナーゼ、MAPキナーゼ、セリン/トレオニンキナーゼ、Srcファミリータンパク質チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼ、カルモジュリン(CaM)キナーゼ、カゼインキナーゼ、チェックポイントキナーゼ(Chk1)、GSK-3、JNK、MEK、ミオシン鎖キナーゼ(MLCK)、プロテインキナーゼA、Akt(プロテインキナーゼB)、プロテインキナーゼC、プロテインキナーゼG、タンパク質チロシンキナーゼ、RafキナーゼおよびRhoキナーゼなどに使用するために阻害薬が研究されてきた。

40

【0031】

抗体

抗体(または"免疫グロブリン")は、抗原に反応して免疫系のBリンパ球により産生され

50

、その抗原を有する異物を同定し中和するために身体により用いられる グロブリンタンパク質である。その天然型において、一般的には、抗体は、それぞれが2つの大きな重(H)鎖および2つの小さな軽(L)鎖を有する基本構造単位でできており、例えば単位1つで単量体、単位2つで二量体、単位5つで五量体を形成する。いくつかの異なる抗体H鎖が存在し、いくつかの異なる種類の抗体が存在するが、それらは所有するH鎖に基づいて異なるアイソタイプに分類される。哺乳動物において5つの異なる抗体アイソタイプが知られ、それらは異なる役割を果たし、それらが遭遇するそれぞれ異なる外来物に対して適切な免疫反応を振り向けるのに役立つ。抗体の特異性および結合親和性は、その抗体の各アームに位置するVL鎖の3つの多可変ループおよびVH鎖の3つの超可変ループにより規定される。これらのループの長さおよび配列の変化により抗体結合部位(ACS)が限定される。本明細書において、用語"抗体"は、一例として天然に存在する抗体および天然に存在しない抗体の両方を含む。具体的には、用語"抗体"は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体ならびにそれらのフラグメントを含む。さらにまた、用語"抗体"は、キメラ抗体および完全合成抗体ならびにそれらのフラグメントを含む。本明細書において、用語"エピトープ"および"抗原決定基"は同義で使用され、ACSが認識し、それに抗体が自身を結合/接着させる分子上の部位を指すために用いられる。エピトープは、キナーゼ阻害ペプチド上の抗原決定基/抗原結合部位であることができる。エピトープは一次、二次または三次配列関連であることができる。

10

【0032】

プロテインキナーゼ活性の調節に使用するために、特定の抗体とプロテインキナーゼの間の相互作用の特異性が研究されている。例えば、MAPキナーゼ経路、プロテインキナーゼA、プロテインキナーゼB、プロテインキナーゼG、セリン/トレオニンキナーゼ、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3(GSK-3)、ストレス活性化タンパク質(SAP)キナーゼ経路およびチロシンキナーゼに使用する抗体が単離されている。さらに、プロテインキナーゼ阻害薬およびプロテインキナーゼ基質に使用する抗体が単離されている。

20

【0033】

阻害ペプチド

ペプチドは、2以上のアミノ酸の鎖で構成される化学化合物である。1つのアミノ酸のカルボキシル基が、隣接アミノ酸のアミノ基に結合されてペプチド結合を形成する。本明細書において、用語"ポリペプチド"は、その最も広い意味において、サブユニットであるアミノ酸、アミノ酸アナログまたはペプチドミメティックの配列を指すために用いられ、ここでサブユニットはペプチド結合で連結されている。ペプチドまたはポリペプチドは化学的に合成することもできるし、組換えで発現させることもできる。ペプチドは、タンパク質の構造と機能の研究に用いられてきた。どこでタンパク質-ペプチド相互作用が行われるかを調べるために、合成ペプチドをプローブとして用いることができる。プロテインキナーゼ、癌タンパク質および他の疾患の抑制に対するペプチドの効果を研究するために、臨床研究に阻害ペプチドを用いることができる。

30

【0034】

いろいろの阻害ペプチドの使用が研究されている。例えば、細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)、MAPKプロテインキナーゼ(細胞外刺激(抗原)に感受性があり、種々の細胞活性を調節するタンパク質セリン/トレオニンキナーゼの群のいずれかを意味する)は細胞増殖および分化に必須である。MAPKの活性化には、上流のMAPKK(MEK)によりMAPKがリン酸化され、次いでそれが第3のキナーゼMAPKKK(MEKK)によりリン酸化されるカスケード機構を必要とする。この阻害ペプチドは、ERKに結合することによりMEKデコイとして機能する。これは、MEK1のアミノ末端13アミノ酸(GMPKKKPTPIQLN)[配列番号149]を含み、ERKに結合する。このことにより、ERKはMEKと相互作用できないので、MEKによるERKの活性化が妨げられる。ERK阻害ペプチドはまた、ペプチドを細胞透過性にするアンテナペディア(Antennapedia)由来のタンパク質導入(PTD)配列(DRQIKIWFQNRRMKWKK)[配列番号150]も含む。

40

【0035】

他の阻害ペプチドは、オートカムチド2関連阻害ペプチド(AIP)を含む。この合成ペプチ

50

ドは、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII(CaMKII)の高度に特異的で強力な阻害薬である。AIPは、CaMKIIの高選択的ペプチド基質であるオートカムチド2の非リン酸化性アナログである。AIPは、IC₅₀=100nM(IC₅₀は、50%阻害に必要な阻害薬の濃度である)でCaMKIIを阻害する。AIP阻害は、シンチド2(CaMKIIペプチド基質)およびATPに関しては非競合的であるが、オートカムチド2に関しては競合的である。この阻害は、Ca²⁺/カルモジュリンの存否により影響を受けない。CaMKII活性は、AIP 1 μMで完全に阻害されるが、PKA、PKCおよびCaMKIVは影響を受けない。AIPのアミノ酸配列はKKALRRQEAVDAL(Lys-Lys-Ala-Leu-Arg-Arg-Gln-Glu-Ala-Val-Asp-Ala-Leu) [配列番号151]である。

【0036】

他の阻害ペプチドはサイクリン依存性キナーゼ5(Cdk5)阻害ペプチド(CIP)を含む。Cdk5は、p25制御成分と結合して、アルツハイマー病(AD)に特徴的なリン酸化エピトープ部位でタウをリン酸化する。p25はCdk-p25ヘテロ二量体(微小管結合タンパク質)の短縮型アクチベーターであり、アミロイド(A、ADに関係しているタンパク質)ペプチドへの暴露により生理学的Cdk5アクチベーターであるp35から産生される。CIPでのニューロンの感染により、CIPはp25/Cdk5活性を選択的に阻害し、皮質ニューロンにおける異常なタウリン酸化を抑制する。CIPにより示される特異性の根拠は十分には理解されていない。

【0037】

ERK2、ERK3、p38/HOG1、プロテインキナーゼC、カゼインキナーゼII、Ca²⁺/カルモジュリンキナーゼIV、カゼインキナーゼII、Cdk4、Cdk5、DNA-PK、PAK3、PI-3キナーゼ、PI-5キナーゼ、PSTAIR、リボソームS6キナーゼ、GSK-4、GCK、SAPK、SEK1およびFAKに関してさらなる阻害ペプチドが研究されている。

【0038】

タンパク質導入ドメイン

新しいドラッグデリバリー技術は、薬物をより有効にすることが可能なので、治療における重要なニッチを占めている。ドラッグデリバリーは、いまだに薬物発見よりも劣るものと考えられ、95%を超える新規な潜在的治療剤が、不良な薬物動態学を示す。治療分子のサイトゾルへの放出のための最も大きな障害は、標的細胞の膜バリアである。タンパク質導入ドメイン(PTD)は、Trojanペプチド、膜輸送配列または細胞透過性タンパク質とも呼ばれ、一般に哺乳動物細胞の細胞膜を透過することができるペプチドのクラスである。PTDは、長さが一般に10~16アミノ酸の、例えばアルギニンおよび/またはリジンを豊富に含むペプチドであり、それらの組成に従って分類できる。PTDはまた、新規HSP27キナーゼ阻害薬が細胞膜を透過するのを助けるために使用できる(例えば、2007年7月16日に出願されたPCT/US2007/16246、"Polypeptidic Inhibitors of HSP27and Uses Thereof"を参照のこと(参照によりその全体が本願に組み込まれる))。PTDは、哺乳動物細胞を横切って多くの種類および分子量の化合物を輸送することができる。これらの化合物は、タンパク質などのエフェクター分子、DNA、結合型ペプチド、オリゴヌクレオチドおよびリボソームなどの小粒子を含む。PTDを他のタンパク質に化学的に結合させるか融合させる場合、これらの融合タンパク質もまた細胞膜を透過し、細胞に入り込むことができる。このような導入の正確な機構は未知であるが、これらのタンパク質の内在化は、受容体または輸送体を介するものとは考えられていない。細胞内にエフェクター分子を輸送することができるPTDの使用は、PTDがカーゴ分子の細胞内取り込みを促進するので、薬物の設計において、ますます興味を持たれている。これらの細胞透過ペプチドは、一般に、それらの配列に応じて両性または陽イオン性として分類され、高分子のための非侵襲的デリバリー技術を提供する。

【0039】

ウイルスPTD含有タンパク質

導入特性を有するとして記載された最初のタンパク質はウイルス起源であった。これらのタンパク質は、いまだに最も認められたPTD作用のモデルである。HIV-1転写トランスアクチベーター(TAT)およびHSV-1 VP22タンパク質は最もよく解析されたウイルスPTD含有タンパク質である。

10

20

30

40

50

【0040】

TAT(HIV-1トランスアクチベーター遺伝子産物)は86アミノ酸ポリペプチドであり、組み込まれたHIV-1ゲノムの強力な転写因子としての機能を果たす。TATは潜伏感染した細胞においてウイルス複製を刺激する。TATタンパク質の移動特性により、休止感染細胞を活性化することが可能になり、サイトカインを含む多くの細胞遺伝子を調節することにより、その後の感染のための非感染細胞のプライミングに関与することができる。TATの最小PTDは、9アミノ酸タンパク質配列RKKRRQRRR(TAT₄₉₋₅₇)[配列番号152]である。より長いTATフラグメントを用いた研究により、120kDaまでの融合タンパク質の導入に成功したことが明らかにされている。複数のTAT-PTDおよび合成TAT誘導体の添加により、膜移動が仲介されることが明らかにされている。TAT PTD含有融合タンパク質は、細胞に細胞死タンパク質を輸送する、癌に関する実験および神経変性疾患の疾患モデルにおける治療部分として用いられてきた。

10

【0041】

VP22は、HSVビリオンの構造部分であるHSV-1テグメントタンパク質である。VP22は、受容体に依存せずに核に移動し集積することができる。VP22のこの特性により、このタンパク質はPTD含有ペプチドとして分類される。完全長VP22を含む融合タンパク質は、細胞膜を効率的に透過している。

【0042】

細胞間移動特性を有するホメオタンパク質

ホメオタンパク質は、形態学的過程に関与する高度に保存されたトランス活性化転写因子である。ホメオタンパク質は、60アミノ酸の特異的配列を介してDNAに結合する。DNA結合ホメオドメインは、ホメオタンパク質の最も高度に保存された配列である。いくつかのホメオタンパク質はPTD様活性を示す。それらは、エネルギーまたはエンドサイトーシスに依存せず、細胞型に限定されずに、細胞膜を横切って効率的に移動することができる。

20

【0043】

Antennapediaタンパク質(Antp)は、細胞膜を介して移動できるトランス活性化因子であり、移動可能な最小配列は、そのタンパク質のホメオドメインの第3らせんに対応する16アミノ酸からなるペプチドである。このらせんの内在化は4 で生じるため、この過程はエンドサイトーシスに依存しないことが示唆される。AntpHDとの融合タンパク質として産生される100アミノ酸までのペプチドは細胞膜を透過する。

30

【0044】

移動が可能な他のホメオドメインは、フシタラズ(Ftz)およびエングレイルド(En)ホメオドメインを含む。すべてのホメオドメインの第3らせんは高度に保存されているため、他のホメオドメインは同様な性質を有する可能性があると考えられる。

【0045】

合成PTD

いろいろのPTDペプチドが合成されている。これらの合成ペプチドの多くは、文書による十分な裏づけのある既存のペプチドに基づいているが、PTD機能に非常に重要と考えられる塩基性残基および/または正電荷に基づいて選択されたものもある。これらの合成ペプチドはPTD-4(YARAAARQARA)[配列番号153];PTD-5(RRQRRTSKLMKR)[配列番号154];MST-1(AVLLPVLLAAR)[配列番号155];L-R9(RRRRRRRR)[配列番号156];およびペプチド2(SGWFRRWKK)[配列番号157]を含む。

40

【0046】

ヒトPTD

ヒトPTDは、ヒト患者に治療薬として投与に用いるとき、潜在的免疫原性問題を回避することができる。PTD配列を含むペプチドは、Hoxa-5、Hox-A4、Hox-B5、Hox-B6、Hox-B7、HOX-D3、GAX、MOX-2およびFtzPTDを含み、これら全部は、AntpPTD(RQIKIWFQNRMMKWK)[配列番号158]に見られる配列を共有する。他のPTDは、エネルギー、受容体またはエンドサイトーシスに依存しないで移動することができるIslet-1、インターロイキン-1、腫瘍壊死因子および、Kaposi-FGF(K-FGFまたはFGF-4)シグナルペプチド由来の疎水性配列を

50

含む。未確認のPTDは、線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーメンバーを含む。

【0047】

現在、*in vivo*治療的投与のために、組換えDNA技術により所定のタンパク質分子を産生することができる。小または中程度の大きさのタンパク質を送達するために、細胞膜を横切ることができる小分子またはペプチドを設計することには成功しているが、組換えタンパク質を*in vivo*での所望の標的に送達することは相変わらず難題である。タンパク質導入ペプチドの領域の発展にもかかわらず、アデノ関連ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルスベクターおよびプラスミド発現ベクターによるタンパク質コード遺伝子の古典的送達方法は、相変わらずタンパク質発現のための好ましい選択である。

10

【0048】

ウイルスベクターを用いた遺伝子発現は、許容細胞へ特定の遺伝子を送達するその自然の能力により、分裂活性を有するかまたは有糸分裂後にブロックされた細胞型において新たに機能性タンパク質を発現させるための最も効率的で信頼性のあるアプローチであると考えられている。それにもかかわらず、対象とするタンパク質の治療発現レベルを達成し、宿主染色質に組み込むことを可能にするためには、常に大量のウイルスベクターを必要とする。これらの特性は宿主の遺伝子系に望ましくない結果をもたらす可能性があるので、その最終的な臨床応用には、安全性が重要な懸念として残されている。

【0049】

代替的アプローチ、すなわち、外因的に組換えタンパク質を産生し、次いでそれを全身性または局所注射により標的器官に送達するアプローチはより優れた安全性プロファイルを有すると考えられるが、細胞または組織への組換えタンパク質の送達およびバイオアベイラビリティには改良を必要とする。

20

【0050】

いろいろな研究により、薬物発見および種々の細胞への120kDaまでのタンパク質の導入におけるPTDの潜在性が示されている。融合タンパク質の*in vivo*全身注射により、タンパク質送達におけるPTDの効果が示されている。適用の成功にもかかわらず、PTDを用いたタンパク質導入の効力に関してはまだ解決されていない問題が存在する。さらにまた、*in vitro/in vivo*でのPTDを用いて融合タンパク質を導入し、免疫反応の誘導を試みた研究には失敗したものもある。さらにまた、PTD融合タンパク質または他の非分泌タンパク質の細胞内発現は、組換えタンパク質と同じ生体内分布を達成できない。さらにまた、血液脳関門をPTDが通過するのは困難なままである。

30

【0051】

種々の細胞透過ペプチドを用い、*in vitro*および*in vivo*で、小分子から微粒子カーゴまでの範囲のカーゴの種々のセットの送達が試みられている。しかしながら、内在化経路としてエンドサイトーシスを含むエネルギーに依存する過程の関与に関する観点から劇的な変化を有するこれらのペプチドの内在化機構は、今日まで未解決の問題である。PTDの効果の改善により、既存および新規の治療剤のバイオアベイラビリティを顕著に増加させ、必要量を低下させると考えられる。

【0052】

本発明は、キナーゼの阻害に有用な導入ドメインペプチドを提供する。本発明はさらに、キナーゼ活性の阻害薬として有用な特定の導入ドメインを含むペプチドのクラスを提供する。本発明は、さらに、種々の過形成性疾患および腫瘍性疾患の治療剤として有用な導入ドメインペプチドを提供する。本発明はさらに、細胞死を引き起こす物質として有用な導入ドメインペプチドを提供する。

40

【発明の概要】

【0053】

本発明は、キナーゼ阻害組成物およびその使用に関する。本発明はさらに、過形成を抑制する、新生物の増殖を抑制する、および細胞集団のプログラム細胞死を誘導する単離されたキナーゼ阻害ペプチドならびにその使用を提供する。

50

【 0 0 5 4 】

一側面において、本発明は、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み;(b)キナーゼ酵素と段階(a)のキナーゼ阻害組成物とを接触させて、キナーゼ酵素とキナーゼ阻害ペプチドとを結合させ;(c)キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する段階を含む前記方法を提供する。本方法の一実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはK1Pペプチドである。他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはサイクリン依存性キナーゼ阻害薬である。他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式IVのアミノ酸配列[Q1-Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Q2](式中、Q1およびQ2は独立して存在しないか、または存在し、Q1およびQ2が存在する場合、Q1およびQ2は式IV(a)のアミノ酸配列[X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11](式中、X1はK以外の任意のアミノ酸であるか、または存在せず;X2は存在するか、または存在せず;X2が存在するとき、X2は任意のアミノ酸であり;X3は任意のアミノ酸であり;X4は任意のアミノ酸であり;X5は任意の塩基性アミノ酸であり;X6は任意のアミノ酸であり;X7は任意のアミノ酸であり;X8は任意のアミノ酸であり;X9は任意のアミノ酸であり;X10は任意のアミノ酸であり;X11は任意のアミノ酸であるか、または存在しない)を有するポリペプチドを含み;Z1およびZ2は存在し;Z3は存在するか、または存在せず、Z4は存在しないか、または存在し、Z4が存在する場合、Z3は存在し、Z5は存在しないか、または存在し、Z5が存在する場合、Z3およびZ4は存在し;Z6は存在しないか、または存在し、Z6が存在する場合、Z3、Z4およびZ5は存在し;Z1、Z2、Z3、Z4、Z5およびZ6のそれぞれは:(a)X1-X2-B1-B2-X3-B3-X4[式IV(b)](式中、X1、X3およびX4のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(b)X1-X2-B1-B2-X3-B3[式IV(c)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、X2は任意のアミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(c)X1-X2-B1-B2-X3[式IV(d)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(d)X1-B1-B2-X2-B3-X3[式IV(e)](式中、X1は任意のアミノ酸であり;X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(e)X1-B1-B2-X2-B3[式IV(f)](式中、X1は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;X2は疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(f)X1-B1-B2-X2[式IV(g)](式中、X1は任意のアミノ酸であり;X2は疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(g)X1-X2-B1-B2[式IV(h)](式中、X1は疎水性アミノ酸であり、X2は任意のアミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(h)X1-X2-B1-X3-X4[式IV(i)](式中、X1、X3およびX4のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;B1は任意の塩基性アミノ酸である)、(i)X1-B1-X2-X3[式IV(j)](式中、X1は任意のアミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;X3は疎水性アミノ酸であり;B1は任意の塩基性アミノ酸である)、(j)X1-X2-B1-X3[式IV(k)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;B1は塩基性アミノ酸である)、(k)B1-B2-X1-X2-B3-X3[式IV(l)](式中、X1、X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(l)B1-B2-X1-X2-B3[式IV(m)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(m)B1-B2-X1-X2[式IV(n)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)(n)B1-X1-X2-B2-B3-X3[式IV(o)](式中、X1、X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(o)B1-X1-X2-B2-B3[式IV(p)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)ならびに(p)B1-X1-X2-B2[式IV(q)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)からなる群から選択されるペプチドである、但し、Q2が存在する場合、Z2、Z3、Z4、Z5またはZ6の一部としての、Q2の直前の2つのアミノ酸はKAであってはならない)を有するペプチドである。前記実施形態の1つによれば、Q1、Z3、Z4、Z5およびZ6は存在しない。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX2は疎水性アミノ酸

10

20

30

40

50

、HまたはNである。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX2はAである。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX3は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、X3はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX4はQ、AおよびNからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX6はQおよびNからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX7は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX7はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX8はG、A、C、S、TおよびYからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9はVである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、HRRIKAWLKKILALARQLGVAA[配列番号166];WLRRIKAWLRRIKALARQLGVAA[配列番号113];およびWLRRIKAWLRRALARQLGVA[配列番号177]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はHRRIKAWLKKILALARQLGVAA[配列番号166]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRIKALARQLGVAA[配列番号113]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRALARQLGVA[配列番号177]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式Vのアミノ酸配列[(XXBBXBXX)_n](式中、Xは任意のアミノ酸であり、Bは塩基性アミノ酸であり、nは2~5の整数である)を有するペプチドである。前記実施形態の1つによれば、BはK、RまたはHである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式VIのアミノ酸配列[Z1-X1-X2-X3-X4X5-X6-X7-X8-X9-X10-Z2](式中、Z1およびZ2のそれぞれは存在しないか、または導入ドメイン(transduction domain)であり;X1は存在しないか、または存在し、存在する場合、A、K、A、KKA、KKKAおよびRAからなる群から選択され;X2は脂肪族アミノ酸、G、L、A、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択され;X3は脂肪族アミノ酸、V、L、I、A、G、Q、N、S、TおよびCからなる群から選択され;X4はQ、N、H、RおよびKからなる群から選択され;X5はQおよびNからなる群から選択され;X6は脂肪族アミノ酸、C、A、G、L、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択され;X7は脂肪族アミノ酸、S、A、C、TおよびGからなる群から選択され;X8はV、L、IおよびMからなる群から選択され;X9は存在しないか、または任意のアミノ酸であり;X10は存在しないか、または任意のアミノ酸である)を有するペプチドである。前記実施形態の1つによれば、X2はG、L、A、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、X3はV、L、I、A、G、Q、N、S、TおよびCからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、X6はC、A、G、L、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドは、KFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173];FAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163];およびWLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA[配列番号142]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである。前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はKFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173]である。前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163]である。前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA[配列番号142]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ酵素は、Ab1、Akt/PKB、AMPK、Arg、Ask、オーロラA、Ax1、B1k、Bmx、Brk、BTK、CaMK1、CaMK1、CaMK1I、CaMK1II、CaMK1I1、カゼインキナーゼ、Cdk、CDK9/サイクリン、CK1y1、CK1y2、CK1y3、Ckl、CK2、CK2、CHK、CDK1/サイクリンB、CHK1、CHK2変異体、CK1、CK2、c-Kit、CLK2、CLK3、Cott、Csk、DAPK1、DCAMKL2、DDR、DYRK2、EGFR、Ephs、EphA2、FAK、Fer、Fes/Fps、FGFR、FGFR1、Fgr、Fit、Flt3、Flt4、Fms/CSF-1R、Fyn、GRK5、GRK6、GRK7、GSK、CSK3、Hck、HER/ErbB、HIPK1、HIPK2、HIPK3、IGF-1、ICF、IR、IKK、インスリンR、IRAK、IRAK1、IRAK4、JAK、JAK1、JAK2、JAK3、JNK/SAPK、KDR、Lck、LIMK、LIMK1、LOK、Lyn、MAPK、MAPK1、MAPKAPキナーゼ、MEK、MEK1、MELK、Met、Mer

10

20

30

40

50

、MINK、MKK、MLCK、MLK1、MRCKa、MSK1、MST、MST3、NEK、NEK3、NEK9、PDGFR、PDGFR、PDGFR、PDK、PhK、PI3キナーゼ、PIM、Pim-1、Pim-2、Pim-3、PKC、PKC1、PKC、PKD2、PKR、PKA、PKB、PKC1、PKC、PKG1、PKGI、PKG1、PKR、PLK、PRAK、PTK5、Pyk、Raf、Rct、RIPK2、ROK/ROCK、ROCK-1、Ron、Ros、Rse、Rsk4、Rsk/MAPKAPキナーゼ、S6キナーゼ、Rsk2、SAPK2a、SGK、c-Src、Src(1-530)、Src、Syk、TAK1、TAO1、TAO2、TBK、Tie2/TEK、TLK2、Trk、TSSK2、TrkA、Txk、ULK3、Ulk2、VRK2、WEE、Yes、ZAP-70およびZIPKからなる群から選択されるキナーゼ酵素である。前記実施形態の1つによれば、キナーゼ酵素はROCKキナーゼ、Srcキナーゼ、PKCキナーゼおよびTrkキナーゼからなる群から選択される。前記実施形態のいくつかによれば、キナーゼ酵素はROCKキナーゼである。前記実施形態のいくつかによれば、キナーゼ酵素はSrcキナーゼである。前記実施形態のいくつかによれば、キナーゼ酵素はPKCキナーゼである。前記実施形態のいくつかによれば、キナーゼ酵素はTrkキナーゼである。

【0055】

他の側面において、本発明は、細胞集団の過形成を抑制する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物の治療的有効量を、それを必要とする被験者に提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み；(b)細胞集団の少なくとも1つの過形成性細胞とキナーゼ阻害組成物とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドと少なくとも1つの過形成性細胞とを結合させ；(c)少なくとも1つの過形成性細胞の過形成を抑制する段階を含む前記方法を提供する。一実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはKIPペプチドである。他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはサイクリン依存性キナーゼ阻害薬である。他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式IVのアミノ酸配列[Q1-Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Q2](式中、Q1およびQ2は独立して存在しないか、または存在し、Q1およびQ2が存在する場合、Q1およびQ2は式IV()のアミノ酸配列[X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11](式中、X1はK以外の任意のアミノ酸であるか、または存在せず；X2は存在するか、または存在せず；X2が存在するとき、X2は任意のアミノ酸であり；X3は任意のアミノ酸であり；X4は任意のアミノ酸であり；X5は任意の塩基性アミノ酸であり；X6は任意のアミノ酸であり；X7は任意のアミノ酸であり；X8は任意のアミノ酸であり；X9は任意のアミノ酸であり；X10は任意のアミノ酸であり；X11は任意のアミノ酸であるか、または存在しない)を有するポリペプチドを含み；Z1およびZ2は存在し；Z3は存在するか、または存在せず、Z4は存在しないか、または存在し、Z4が存在する場合、Z3は存在し、Z5は存在しないか、または存在し、Z5が存在する場合、Z3およびZ4は存在し；Z6は存在しないか、または存在し、Z6が存在する場合、Z3、Z4およびZ5は存在し；Z1、Z2、Z3、Z4、Z5およびZ6のそれぞれは：(a)X1-X2-B1-B2-X3-B3-X4[式IV(b)](式中、X1、X3およびX4のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；X2は任意のアミノ酸であり；B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(b)X1-X2-B1-B2-X3-B3[式IV(c)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、X2は任意のアミノ酸であり；B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(c)X1-X2-B1-B2-X3[式IV(d)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；X2は任意のアミノ酸であり；B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(d)X1-B1-B2-X2-B3-X3[式IV(e)](式中、X1は任意のアミノ酸であり；X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(e)X1-B1-B2-X2-B3[式IV(f)](式中、X1は疎水性アミノ酸、HまたはNであり；X2は疎水性アミノ酸であり；B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(f)X1-B1-B2-X2[式IV(g)](式中、X1は任意のアミノ酸であり；X2は疎水性アミノ酸であり；B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(g)X1-X2-B1-B2[式IV(h)](式中、X1は疎水性アミノ酸であり、X2は任意のアミノ酸であり；B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(h)X1-X2-B1-X3-X4[式IV(i)](式中、X1、X3およびX4のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；X2は任意のアミノ酸であり；B1は塩基性アミノ酸である)、(i)X1-B1-X2-X3[式IV(j)](式中、X1は任意のアミノ酸であり；X2は任意のアミノ酸であり；X3は疎水性アミノ酸であり；B1は塩基性アミノ酸である)、(j)X1-X2-B1-X3[式IV(k)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；X2は任意のアミノ酸であり；B1は塩基性アミノ酸である)、(k)B1-B2-X1-X2-B3-X3[式IV(l)](式中、X1、X2およびX3

10

20

30

40

50

のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(l)B1-B2-X1-X2-B3[式IV(m)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(m)B1-B2-X1-X2[式IV(n)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)(n)B1-X1-X2-B2-B3-X3[式IV(o)](式中、X1、X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(o)B1-X1-X2-B2-B3[式IV(p)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)ならびに(p)B1-X1-X2-B2[式IV(q)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)からなる群から選択されるペプチドである、但し、Q2が存在する場合、Z2、Z3、Z4、Z5またはZ6の一部としての、Q2の直前の2つのアミノ酸はKAであってはならない)を有するペプチドである。前記実施形態の1つによれば、Q1、Z3、Z4、Z5およびZ6は存在しない。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX2は疎水性アミノ酸、HまたはNである。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX2はAである。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX3は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX3はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX4はQ、AおよびNからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX6はQおよびNからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX7は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX7はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX8はG、A、C、S、TおよびYからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9はVである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、HRRIKAWLKKILALARQLGVAA[配列番号166];WLRRIKAWLRRIKALARQLGVAA[配列番号113];およびWLRRIKAWLRRALARQLGVA[配列番号177]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はHRRIKAWLKKILALARQLGVAA[配列番号166]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRIKALARQLGVAA[配列番号113]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRALARQLGVA[配列番号177]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式Vのアミノ酸配列[(XXBBXBXX)_n](式中、Xは任意のアミノ酸であり、Bは塩基性アミノ酸であり、nは2~5の整数である)を有するペプチドである。前記実施形態の1つによれば、BはK、RまたはHである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式VIのアミノ酸配列[Z1-X1-X2-X3-X4X5-X6-X7-X8-X9-X10-Z2](式中、Z1およびZ2のそれぞれは存在しないか、または導入ドメインであり;X1は存在しないか、または存在し、存在する場合、A、KA、KKA、KKKAおよびRAからなる群から選択され;X2は脂肪族アミノ酸、G、L、A、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択され;X3は脂肪族アミノ酸、V、L、I、A、G、Q、N、S、TおよびCからなる群から選択され;X4はQ、N、H、RおよびKからなる群から選択され;X5はQおよびNからなる群から選択され;X6は脂肪族アミノ酸、C、A、G、L、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択され;X7は脂肪族アミノ酸、S、A、C、TおよびGからなる群から選択され;X8はV、L、IおよびMからなる群から選択され;X9は存在しないか、または任意のアミノ酸であり;X10は存在しないか、または任意のアミノ酸である)を有するペプチドである。前記実施形態の1つによれば、X2はG、L、A、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、X3はV、L、I、A、G、Q、N、S、TおよびCからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、X6はC、A、G、L、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドは、KAFKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173];FAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163];およびWLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA[配列番号142]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである。前記実施形態

他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はKAFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173]である。前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163]である。前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA[配列番号142]である。

【0056】

他の側面において、本発明は、新生物の増殖を抑制する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物の治療的有効量を、それを必要とする被験者に提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み；(b)新生物とキナーゼ阻害組成物とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドと新生物とを結合させ；(c)新生物の増殖を抑制する段階を含む前記方法を提供する。一実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはKIPペプチドである。他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはサイクリン依存性キナーゼ阻害薬である。他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式IVのアミノ酸配列[Q1-Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Q2](式中、Q1およびQ2は独立して存在しないか、または存在し、Q1およびQ2が存在する場合、Q1およびQ2は式IV(a)のアミノ酸配列[X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11](式中、X1はK以外の任意のアミノ酸であるか、または存在せず；X2は存在するか、または存在せず；X2が存在するとき、X2は任意のアミノ酸であり；X3は任意のアミノ酸であり；X4は任意のアミノ酸であり；X5は任意の塩基性アミノ酸であり；X6は任意のアミノ酸であり；X7は任意のアミノ酸であり；X8は任意のアミノ酸であり；X9は任意のアミノ酸であり；X10は任意のアミノ酸であり；X11は任意のアミノ酸であるか、または存在しない)を有するポリペプチドを含み；Z1およびZ2は存在し；Z3は存在するか、または存在せず、Z4は存在しないか、または存在し、Z4が存在する場合、Z3は存在し、Z5は存在しないか、または存在し、Z5が存在する場合、Z3およびZ4は存在し；Z6は存在しないか、または存在し、Z6が存在する場合、Z3、Z4およびZ5は存在し；Z1、Z2、Z3、Z4、Z5およびZ6のそれぞれは：(a)X1-X2-B1-B2-X3-B3-X4[式IV(b)](式中、X1、X3およびX4のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；X2は任意のアミノ酸であり；B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(b)X1-X2-B1-B2-X3-B3[式IV(c)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、X2は任意のアミノ酸であり；B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(c)X1-X2-B1-B2-X3[式IV(d)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；X2は任意のアミノ酸であり；B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(d)X1-B1-B2-X2-B3-X3[式IV(e)](式中、X1は任意のアミノ酸であり；X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(e)X1-B1-B2-X2-B3[式IV(f)](式中、X1は疎水性アミノ酸、HまたはNであり；X2は疎水性アミノ酸であり；B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(f)X1-B1-B2-X2[式IV(g)](式中、X1は任意のアミノ酸であり；X2は疎水性アミノ酸であり；B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(g)X1-X2-B1-B2[式IV(h)](式中、X1は疎水性アミノ酸であり、X2は任意のアミノ酸であり；B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(h)X1-X2-B1-X3-X4[式IV(i)](式中、X1、X3およびX4のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；X2は任意のアミノ酸であり；B1は任意の塩基性アミノ酸である)、(i)X1-B1-X2-X3[式IV(j)](式中、X1は任意のアミノ酸であり；X2は任意のアミノ酸であり；X3は疎水性アミノ酸であり；B1は塩基性アミノ酸である)、(j)X1-X2-B1-X3[式IV(k)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；X2は任意のアミノ酸であり；B1は塩基性アミノ酸である)、(k)B1-B2-X1-X2-B3-X3[式IV(l)](式中、X1、X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(l)B1-B2-X1-X2-B3[式IV(m)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(m)B1-B2-X1-X2[式IV(n)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(n)B1-X1-X2-B2-B3-X3[式IV(o)](式中、X1、X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり；B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(o)B1-X1-X2-B2-B3[式IV(p)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)ならびに(p)B1-X1-X2-B2[式IV(q)](式中、X1およびX2のそ

10

20

30

40

50

れぞれは疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)からなる群から選択されるペプチドである、但し、Q2が存在する場合、Z2、Z3、Z4、Z5またはZ6の一部としての、Q2の直前の2つのアミノ酸はKAであってはならない)を有するペプチドである。前記実施形態によれば、Q1、Z3、Z4、Z5およびZ6は存在しない。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX2は疎水性アミノ酸、HまたはNである。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX2はAである。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX3は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX3はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX4はQ、AおよびNからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX6はQおよびNからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX7は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX7はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX8はG、A、C、S、TおよびYからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9はVである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはHRRIKAWLKKILALARQLGVAA[配列番号166];WLRRIKAWLRRIKALARQLGVAA[配列番号113];およびWLRRIKAWLRRALARQLGVA[配列番号177]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はHRRIKAWLKKILALARQLGVAA[配列番号166]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRIKALARQLGVA[配列番号113]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRALARQLGVA[配列番号177]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式Vのアミノ酸配列[(XXBBXBXX)_n](式中、Xは任意のアミノ酸であり、Bは塩基性アミノ酸であり、nは2~5の整数である)を有するペプチドである。前記実施形態の1つによれば、BはK、RまたはHである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式VIのアミノ酸配列[Z1-X1-X2-X3-X4X5-X6-X7-X8-X9-X10-Z2](式中、Z1およびZ2のそれぞれは存在しないか、または導入ドメインであり;X1は存在しないか、または存在し、存在する場合、A、KA、KKA、KKKAおよびRAからなる群から選択され;X2は脂肪族アミノ酸、G、L、A、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択され;X3は脂肪族アミノ酸、V、L、I、A、G、Q、N、S、TおよびCからなる群から選択され;X4はQ、N、H、RおよびKからなる群から選択され;X5はQおよびNからなる群から選択され;X6は脂肪族アミノ酸、C、A、G、L、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択され;X7は脂肪族アミノ酸、S、A、C、TおよびGからなる群から選択され;X8はV、L、IおよびMからなる群から選択され;X9は存在しないか、または任意のアミノ酸であり;X10は存在しないか、または任意のアミノ酸である)を有するペプチドである。前記実施形態の1つによれば、X2はG、L、A、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、X3はV、L、I、A、G、Q、N、S、TおよびCからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、X6はC、A、G、L、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択される。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはKAFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173];FAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163];およびWLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA[配列番号142]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はKAFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はFAKLAAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA[配列番号142]である。本方法の他の実施形態によれば、新生物は、乳頭腫、腺腫、胞状奇胎、線維腫、軟骨腫、骨腫、平滑筋腫、横紋筋腫、脂肪腫、血管腫、リンパ管腫、真性赤血球増加症、伝染性単核症、"良性"神経膠腫、髄膜腫、神経節性神経腫、神経鞘腫、神経線維腫、色素性母斑(黒あざ)、褐色細胞腫、カルチノイド腫瘍、奇形腫、癌、腺癌、基底細胞癌、絨毛癌、線維肉腫、軟骨肉腫

10

20

30

40

50

、骨肉腫、子宮平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、血管肉腫、リンパ管肉腫、骨髄球性白血病、赤芽球性白血病、リンパ性白血病、多発性骨髄腫、単球性白血病、ユーイング肉腫、非ホジキン悪性リンパ腫、髄芽腫、乏突起膠腫、神経鞘肉腫悪性黒色腫、胸腺腫、多形性膠芽腫、星状細胞腫、上衣腫、髄膜肉腫、神経芽細胞腫(神経鞘腫)、神経線維肉腫、悪性褐色細胞腫、網膜芽細胞腫、カルチノイド腫瘍、腎芽細胞腫(ウイلمス腫瘍)、奇形癌および絨毛癌胎児性癌からなる群から選択される新生物である。

【0057】

他の側面において、本発明は、細胞集団のプログラム細胞死を誘導する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み;(b)細胞集団の少なくとも1つの細胞とキナーゼ阻害組成物とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドと少なくとも1つの細胞とを結合させ;(c)少なくとも1つの細胞のプログラム細胞死を誘導する段階を含む前記方法を提供する。本方法の一実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはKIPペプチドである。他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはサイクリン依存性キナーゼ阻害薬である。他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式IVのアミノ酸配列[Q1-Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Q2](式中、Q1およびQ2は独立して存在しないか、または存在し、Q1およびQ2が存在する場合、Q1およびQ2は式IV(a)のアミノ酸配列[X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11](式中、X1はK以外の任意のアミノ酸であるか、または存在せず;X2は存在するか、または存在せず;X2が存在するとき、X2は任意のアミノ酸であり;X3は任意のアミノ酸であり;X4は任意のアミノ酸であり;X5は任意の塩基性アミノ酸であり;X6は任意のアミノ酸であり;X7は任意のアミノ酸であり;X8は任意のアミノ酸であり;X9は任意のアミノ酸であり;X10は任意のアミノ酸であり;X11は任意のアミノ酸であるか、または存在しない)を有するポリペプチドを含み;Z1およびZ2は存在し;Z3は存在するか、または存在せず、Z4は存在しないか、または存在し、Z4が存在する場合、Z3は存在し、Z5は存在しないか、または存在し、Z5が存在する場合、Z3およびZ4は存在し;Z6は存在しないか、または存在し、Z6が存在する場合、Z3、Z4およびZ5は存在し;Z1、Z2、Z3、Z4、Z5およびZ6のそれぞれは:(a)X1-X2-B1-B2-X3-B3-X4[式IV(b)](式中、X1、X3およびX4のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(b)X1-X2-B1-B2-X3-B3[式IV(c)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、X2は任意のアミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(c)X1-X2-B1-B2-X3[式IV(d)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(d)X1-B1-B2-X2-B3-X3[式IV(e)](式中、X1は任意のアミノ酸であり;X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(e)X1-B1-B2-X2-B3[式IV(f)](式中、X1は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;X2は疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(f)X1-B1-B2-X2[式IV(g)](式中、X1は任意のアミノ酸であり;X2は疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(g)X1-X2-B1-B2[式IV(h)](式中、X1は疎水性アミノ酸であり、X2は任意のアミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(h)X1-X2-B1-X3-X4[式IV(i)](式中、X1、X3およびX4のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;B1は任意の塩基性アミノ酸である)、(i)X1-B1-X2-X3[式IV(j)](式中、X1は任意のアミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;X3は疎水性アミノ酸であり;B1は塩基性アミノ酸である)、(j)X1-X2-B1-X3[式IV(k)](式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;B1は塩基性アミノ酸である)、(k)B1-B2-X1-X2-B3-X3[式IV(l)](式中、X1、X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(l)B1-B2-X1-X2-B3[式IV(m)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(m)B1-B2-X1-X2[式IV(n)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)(n)B1-X1-X2-B2-B3-X3[式IV(o)](式中、X1、X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、(o)B1-X1-X2-B2-B3[式IV(p)](式中、X1およびX2のそ

10

20

30

40

50

れぞれは疎水性アミノ酸であり、B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)ならびに(p)B1-X1-X2-B2[式IV(q)](式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは任意の塩基性アミノ酸である)からなる群から選択されるペプチドである、但し、Q2が存在する場合、Z2、Z3、Z4、Z5またはZ6の一部としての、Q2の直前の2つのアミノ酸はKAであってはならない)を有するペプチドである。前記実施形態の1つによれば、Q1、Z3、Z4、Z5およびZ6は存在しない。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX2は疎水性アミノ酸、HまたはNである。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX2はAである。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX3は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX3はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX4はQ、AおよびNからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX6はQおよびNからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX7は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX7はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX8はG、A、C、S、TおよびYからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9は疎水性アミノ酸である。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9はL、I、VおよびMからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、式IV(a)におけるX9はVである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはHRRIKAWLKKILALARQLGVAA[配列番号166];WLRRIKAWLRRIKALARQLGVAA[配列番号113];およびWLRRIKAWLRRALARQLGVA[配列番号177]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はHRRIKAWLKKILALARQLGVAA[配列番号166]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRIKALARQLGVAA[配列番号113]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRALARQLGVA[配列番号177]である。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式Vのアミノ酸配列[(XXBBXBX)n](式中、Xは任意のアミノ酸であり、Bは塩基性アミノ酸であり、nは2~5の整数である)を有するペプチドである。前記実施形態の1つによれば、BはK、RまたはHである。本方法の他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式VIのアミノ酸配列[Z1-X1-X2-X3-X4X5-X6-X7-X8-X9-X10-Z2](式中、Z1およびZ2のそれぞれは存在しないか、または導入ドメインであり;X1は存在しないか、または存在し、存在する場合、A、KA、KKA、KKKAおよびRAからなる群から選択され;X2は脂肪族アミノ酸、G、L、A、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択され;X3は脂肪族アミノ酸、V、L、I、A、G、Q、N、S、TおよびCからなる群から選択され;X4はQ、N、H、RおよびKからなる群から選択され;X5はQおよびNからなる群から選択され;X6は脂肪族アミノ酸、C、A、G、L、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択され;X7は脂肪族アミノ酸、S、A、C、TおよびGからなる群から選択され;X8はV、L、IおよびMからなる群から選択され;X9は存在しないか、または任意のアミノ酸であり;X10は存在しないか、または任意のアミノ酸である)を有するペプチドである。前記実施形態の1つによれば、X2はG、L、A、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、X3はV、L、I、A、G、Q、N、S、TおよびCからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、X6はC、A、G、L、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択される。前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドはKAFKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173];FAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163];およびWLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA[配列番号142]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである。前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はKAFKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173]である。前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163]である。前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA[配列番号142]である。本方法の他の実施形態によれば、細胞は原核細胞である。本方法の他の実施形態によれば、細胞は真核細胞である。本方法の他の実施形態によれば、プログラム細胞死はアポトーシスにより引き起こされる。

10

20

30

40

50

【0058】

発明の詳細な説明

本発明は、治療用キナーゼ阻害組成物およびその使用方法を提供する。

【0059】

本明細書において、用語"投与"または"投薬"は同義で使用され、in vivo投与に加えて組織に直接にex vivo投与することも含む。一般に、組成物は、必要に応じて従来の毒性のない薬学的に許容される担体、アジュバントおよびビヒクルを含有する投与単位製剤で、経口、口腔内、非経口、局所、吸入もしくは吹き入れ(すなわち、口からまたは鼻から)または直腸内のいずれかに全身投与することもでき、限定するものではないが、例えば注射、植込み、移植、局所投与により、または非経口で局所投与することもできる。本明細書において、用語"非経口"は、例えば、皮下注射(すなわち、皮下への注射)、筋肉内注射(すなわち、筋肉内への注射)、静脈内注射(すなわち、静脈内への注射)、髄腔内注射(すなわち、脊髄の周囲または脳のクモ膜下の間隙への注射)を含む注射(すなわち、注射投与)、胸骨内注入または点滴を用いる導入のことを言う。非経口で投与される組成物は、針、例えば手術針を用いて送達される。本明細書において、用語"手術針"は、選択された解剖学的構造への流体(すなわち、流動性の)組成物の送達に適した針のことを言う。注射剤、例えば滅菌注射用水性または油性懸濁液は、適切な分散剤もしくは湿潤剤および懸濁化剤を用い、当業者に公知の技術を用いて製剤化できる。

10

【0060】

追加投与は、例えば、静脈内、心膜内、経口、インプラント経由、経粘膜、経皮、筋肉内、皮下、腹腔内、髄腔内、リンパ内、病巣内または硬膜外に行うことができる。投与は、例えば1回、複数回および/または1以上の延長期間行うことができる。本明細書において、用語"局所投与"および"局所に投与"は、上皮表面を含む組織または細胞の1以上の表面に、ペプチド、核酸またはそのペプチドもしくは核酸を含むベクターを送達することを指すために同義で使用される。

20

【0061】

局所投与は、経皮投与とは対照的に、一般に、全身作用よりもむしろ局所作用を提供する。本明細書において、特記しない限り、用語"局所投与"および"経皮投与"は同義で使用される。

【0062】

本明細書において、用語"結合する(associate)"または"連結する(associates)"は、直接または間接に、活発にまたは不活発に、緩やかにまたはきつく、完全にまたは不完全に結ぶ、結びつける、または接合することをいう。

30

【0063】

本明細書に用いられるアミノ酸の略語は、従来用いられている略語である:A=Ala=アラニン;R=Arg=アルギニン;N=Asn=アスパラギン;D=Asp=アスパラギン酸;C=Cys=システイン;Q=Gln=グルタミン;E=Glu=グルタミン酸;G=Gly=グリシン;H=His=ヒスチジン;I=Ile=イソロイシン;L=Leu=ロイシン;K=Lys=リジン;M=Met=メチオニン;F=Phe=フェニルアラニン;P=Pro=プロリン;S=Ser=セリン;T=Thr=トレオニン;W=Trp=トリプトファン;Y=Tyr=チロシン;V=Val=バリン。アミノ酸は、L-アミノ酸であることもD-アミノ酸であることもできる。ペプチドの半減期を増加させるか、ペプチドの効力を増加させるか、またはペプチドのバイオアベイラビリティを増加させるために、改変された合成アミノ酸でアミノ酸を置換することができる。

40

【0064】

本明細書において、用語"接触させる"は、接触をもたらす、接触を生じる、接触状態にある、または接触状態になることをいう。本明細書において、用語"接触"は、接するまたは直もしくは局所近接する状態または状況のことを言う。送達先、例えば限定するものではないが器官、組織、細胞または腫瘍への組成物の接触は、当業者に公知の任意の投与手段を用いて行うことができる。

【0065】

50

細胞への核酸の形質導入およびトランスフェクションのための方法は存在する。本明細書において、用語"形質導入"または"導入"は、生体膜を横切る過程を指すために同義で使用される。生体膜を横切ることは、1つの細胞から他の細胞へであることもでき、細胞外環境から細胞内環境へであることもでき、細胞膜もしくは核膜を横切ってであることもできる。導入されることのできる物質は、限定するものではないが、タンパク質、融合タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、アミノ酸、ウイルスDNAおよび細菌DNAを含む。

【0066】

用語"調節配列"("調節領域"または"調節因子"とも呼ばれる)は、転写因子などの制御タンパク質が選択的に結合し、遺伝子発現、従ってタンパク質発現を調節するDNAのプロモーター、エンハンサーまたは他のセグメントのことを言う。

10

【0067】

本明細書において、用語"制御調節因子"は、核酸またはそのペプチドもしくはタンパク質産物の発現をもたらすことのできる核酸配列のことを言う。制御調節因子は、本発明の核酸、ペプチドまたはタンパク質に作動可能に連結されていることができる。制御調節因子、例えば限定するものではないが調節配列は、それが核酸、ペプチドまたはタンパク質の発現を指示する機能を果たす限り、それが発現を調節する核酸、ペプチドまたはタンパク質と隣接している必要はない。従って、例えば、本発明の核酸とプロモーター配列との間に介在する非翻訳配列ではあるが転写される配列が存在することができ、このプロモーター配列もまた、コード配列に"作動可能に連結されている"と考えることができる。他のこのような調節配列は、限定するものではないが、ポリアデニル化シグナル、終結シグナルおよびリボソーム結合部位を含む。

20

【0068】

用語"ハイブリダイゼーション"は、2つの一本鎖核酸分子が塩基対形成により互いに結合することをいう。通常条件下でヌクレオチドはその相補鎖に結合し、従って、2つの完全に相補的な鎖は互いに容易に結合する(すなわちアニールする)。しかしながら、ヌクレオチドの異なる分子形態により、2つの鎖の間の1つの不一致が、それらの間の結合をエネルギー的に不利なものにする。塩基不適合の効果は、2つの鎖がアニールする速度を定量することにより測定でき、このことにより、アニールさせている2つの鎖間の塩基配列における類似性に関して情報を得ることができる。

【0069】

用語"単離された"とは、核酸、ペプチドまたはタンパク質などの物質であって、(1)天然に存在する環境において見られる、通常それに付随または相互作用する成分を実質的にまたは本質的に含まない物質のことをいう。用語"実質的にまたは本質的に含まない"は、少なくとも80%が、天然に存在する環境において見られる、通常それ付随または相互作用する成分を含まない物質を指すを指すために用いられる。単離された物質は、場合により、その自然環境における物質に見られない物質を含むことがあり;あるいは、(2)その物質が自然環境における物質でない場合、その物質は組成物への故意のヒト介入により合成的に(非自然的に)改変されたものである、および/またはその環境に見られる物質に由来しないで、細胞(例えば、ゲノムまたは細胞小器官)のある部位に配置されたものである。合成物質を得るための改変は、天然状態にある物質かまたは天然状態から除去した物質に行うことができる。例えば、天然に存在する核酸は、改変された場合か、あるいはそれが由来する細胞内でヒト介入により、改変されたDNAから転写された場合、単離された核酸となる。例えば、Compounds and Methods for Site Directed Mutagenesis in Eukaryotic Cells, Kmiec(米国特許第5,565,350号); In Vivo Homologous Sequence Targeting in Eukaryotic Cells; Zarling et al.(PCT/US93/03868)を参照のこと。同様に、天然に存在する核酸(例えば、プロモーター)は、その核酸が由来しないゲノムの遺伝子座に天然に存在しない手段で導入された場合、単離された核酸となる。本明細書で定義する"単離された"核酸は、"異種"核酸とも呼ばれる。

30

40

【0070】

本明細書において、用語"治療効果"は、治療結果であって、望ましく有益であると判断

50

された結果のことを言う。治療効果は、直接または間接に、疾患発現の抑制、軽減または除去を含むことができる。治療効果は、直接または間接に、疾患発現の進行の抑制、軽減または除去を含むこともできる。本発明の活性成分の1以上の"治療的有効量"または"有効量"という用語は、治療効果を得るために十分な量のことをいう。一般に、用いることができる活性成分の有効量は、約0.000001mg/体重(kg)～約100mg/体重(kg)の範囲である。しかしながら、投与量レベルは、損傷の種類、年齢、体重、性別、患者の病状、疾患の重症度、投与経路および用いられる特定の活性成分を含む種々の要素に基づく。従って、用法・用量は大きく異なる場合があるが、医師は、標準法を用いてルーチンに決定することができる。

【0071】

本明細書において、用語"治療剤"は、治療効果を与える薬物、分子、核酸、タンパク質、組成物または他の物質のことを言う。本明細書において、用語"活性"は、対象とする治療効果に關与する本発明の組成物の成分、材料または構成要素のことを言う。本明細書において、用語"治療剤"および"活性成分"は同義で使用される。

【0072】

本明細書において、用語"治療成分"は、集団のある割合における特定の疾患発現の進行を除去、軽減または抑制させる治療上有効な用量(すなわち、投与量および投与頻度)のことを言う。一般的に用いられる治療成分の例は、集団の50%における特定の疾患発現に治療上有効な特定の用量における投与量を記述するED50である。

【0073】

本明細書において、用語"薬物"は、疾患の予防、診断、軽減、治療または治癒に用いられる、食物以外の治療剤または任意の物質のことを言う。

【0074】

本明細書において、用語"軽減"または"軽減させる"は、疾患を発症する恐れがある個人において、疾患の存在を限定することを言う。

【0075】

本明細書において、用語"調節する"は、特定の程度または割合に調製する、変える、適合させるまたは整えることを意味する。

【0076】

本明細書において、用語"阻害すること"、"阻害する"または"阻害"は、過程の量または速度を低下させるか、またはその過程を完全に停止させるか、またはその作用または機能を低下、限定または阻止することを指すために用いられる。阻害は、基準物質と比較して、量、速度、作用関数または過程の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の低下または減少を含むことができ、ここで基準物質は阻害されない物質である。

【0077】

本明細書において、用語"キナーゼ"は、高エネルギードナー分子から特定の標的分子または基質にリン酸基を転移させる酵素の一種のことを言う。高エネルギードナー群は、限定するものではないが、ATPを含むことができる。

【0078】

本明細書において、用語"キナーゼ阻害ペプチド"(または"KIP")は、KIPアミノ酸配列を含むアミノ酸配列のことを言う。ペプチドまたはペプチドミメティックの範囲内のKIPアミノ酸配列は、特定のキナーゼ阻害能力を有するペプチドまたはペプチドミメティックを意味する。KIP1、KIP2およびKIP3はKIPアミノ酸配列に属するクラスである。

【0079】

本明細書において、用語"ペプチドミメティック"は、ペプチドを模倣するように設計された低分子量タンパク質様鎖のことを言う。ペプチドミメティックは、一般的には、分子

10

20

30

40

50

の特性を変えるための既存のペプチドの修飾により生成される。

【0080】

本明細書において、用語"キナーゼ基質"は、キナーゼによりリン酸化することができる基質のことを言う。

【0081】

本明細書において、用語"キナーゼ活性"は、キナーゼにより介されるキナーゼ基質のリン酸化のことを言う。

【0082】

本明細書において、用語"哺乳動物細胞"は、哺乳類綱の動物由来の細胞のことを言う。本明細書において、哺乳動物細胞は、正常細胞、異常細胞および形質転換細胞を含むことができる。本発明で用いられる哺乳動物細胞の例は、限定するものではないが、ニューロン、上皮細胞、筋細胞、血球、免疫細胞、幹細胞、骨細胞、内皮細胞および芽球細胞を含む。

10

【0083】

用語"核酸"は、一本鎖型または二本鎖型のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーのことを言い、特記しない限り、天然に存在するヌクレオチド(例えば、ペプチド核酸)と同様の方法で一本鎖核酸にハイブリダイズする点において天然のヌクレオチドの本質的性質を有する既知のアナログを含む。

【0084】

用語"作動可能に連結された"は、プロモーターと第2配列との機能的連関であって、プロモーター配列が第2配列に対応するDNA配列の転写を開始し、媒介する前記機能的連関のことを言う。一般に、作動可能に連結されたは、連結された核酸配列が隣接することを意味し、必要ならば連結した2つのタンパク質が隣接し、同じコード領域にあることを意味する。

20

【0085】

用語"ポリヌクレオチド"は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、天然に存在するヌクレオチドと実質的に同じヌクレオチド配列にハイブリダイズする、および/または天然に存在するヌクレオチド(単数または複数)と同じアミノ酸(単数または複数)への翻訳を可能にするという点で天然リボヌクレオチドの本質的性質を有するデオキシリボポリヌクレオチド、リボポリヌクレオチドまたはそれらのアナログのことを言う。ポリヌクレオチドは、天然または異種の構造または調節遺伝子の完全長または部分配列であることができる。特記しない限り、この用語は、特定の配列ばかりでなく、その相補配列も含む。従って、安定性または他の理由で主鎖を修飾したDNAまたはRNAは、本明細書においてその用語が用いられるとき"ポリヌクレオチド"である。さらに、ほんの2例をあげれば、イノシンなどの異常塩基またはトリチル化塩基などの修飾塩基を含むDNAまたはRNAは、その用語が本明細書で用いられるときポリヌクレオチドである。当該技術分野で当業者に公知の多くの有用な目的に役立つDNAおよびRNAに、多種多様の修飾がなされてきたことは明らかであろう。本明細書で用いられるとき、用語ポリヌクレオチドは、このようなポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的修飾体ばかりでなく、ウイルスおよび細胞(とりわけ単純型細胞および複雑型細胞を含む)のDNAおよびRNAの特性を示す化学型もまた含む。

30

40

【0086】

本明細書において、用語"ペプチド"は、ポリペプチド、タンパク質またはペプチドミメティックのことを言う。本明細書において、用語"ポリペプチド"、"ペプチド"および"タンパク質"は、アミノ酸残基のポリマーを指すために用いられる。この用語は、1以上のアミノ酸残基に対応する天然に存在するアミノ酸および天然に存在するアミノ酸ポリマーの人工の化学的アナログであるアミノ酸ポリマーに適用される。天然に存在するアミノ酸のこのようなアナログの本質的性質は、タンパク質に組み込まれるとき、そのタンパク質は、完全に天然に存在するアミノ酸からなる同じタンパク質に対して誘導された抗体に特異的に反応することである。用語"ポリペプチド"、"ペプチド"および"タンパク質"はまた、

50

限定するものではないが、グリコシル化、脂質付着、硫酸化、グルタミン酸残基の γ -カルボキシル化、ヒドロキシル化およびADP-リボシル化を含む修飾もまた含む。公知であり、上で述べたように、ポリペプチドは完全に直鎖でなくてもよいことは明らかであろう。例えば、ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝鎖であることができ、一般に天然のプロセシング事象および天然では起きないヒト操作によりもたらされる事象を含む翻訳後事象の結果として、分枝の有り無しで環状であることもできる。環状、分枝鎖および分枝鎖環状ポリペプチドは、非翻訳天然過程により合成でき、もっぱら合成方法によっても合成できる。

【0087】

用語"核酸"は、一本鎖型または二本鎖型のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーのことを言い、特記しない限り、天然に存在するヌクレオチド(例えば、ペプチド核酸)と同様の方法で一本鎖核酸にハイブリダイズする点において天然のヌクレオチドの本質的性質を有する既知のアナログを含む。

10

【0088】

用語"ヌクレオチド"は、複素環塩基、糖および1以上のリン酸基からなる化学化合物のことを言う。最も一般的なヌクレオチドにおいて、塩基はプリンまたはピリミジンの誘導体であり、糖はペントースデのオキシリボースまたはリボースである。ヌクレオチドは核酸のモノマーであり、3以上が結合して核酸を形成する。ヌクレオチドは、RNA、DNAならびに、限定するものではないが、CoA、FAD、DMN、NADおよびNADPを含むいくつかの補因子の構造単位である。プリンは、アデニン(A)およびグアニン(G)を含み、ピリミジンはシトシン(C)、チミン(T)およびウラシル(U)を含む。

20

【0089】

本明細書において、用語"低下させる"または"低下する"は、新生物または過形成の細胞のサイズの減少または増殖もしくは増殖速度の低下のことを言う。

【0090】

本明細書において、用語"新形成"は、新生物をもたらし細胞の異常増殖のことを言う。本明細書において、用語"新生物"は、組織の異常な塊であって、その増殖が正常組織の増殖よりも速く、組織立っておらず、その変化を引き起こした刺激が停止した後も、同様に度を超え続けるもののことを言う。新生物は、良性、潜在的悪性または悪性であることができる。良性新生物は、子宮筋腫および色素細胞母斑(皮膚黒あざ)を含む。これらの新生物は癌に変化しない。潜在的悪性新生物in situ癌を含む。これらの新生物は侵襲および破壊はしないが、十分な時間を考慮すれば、癌に変化する。悪性新生物は一般に癌と呼ばれる。これらの新生物は周辺組織を侵襲および破壊し、転移する可能性があり、最終的には被験者を殺す可能性がある。

30

【0091】

本明細書において、用語"過形成"は、例えば、絶えず分裂している細胞において通常見られるものよりも速い、器官または組織内の細胞の増殖について言う一般用語である。過形成は、器官の著しい肥大をもたらし場合もあり、良性腫瘍の形成の場合もあり、顕微鏡下でのみ見える場合もある。過形成は、特定の刺激に対する生理的応答と考えられ、過形成の細胞は正常な調節制御機構の支配下のままである。過形成は、被験者内にできる場合もあり、被験者上にできる場合もある。過形成は、原因がいくつも考えられ、消費量増加、慢性炎症反応、ホルモン異常または他の部位での損傷または疾患の補償を含む。過形成は、無害であり、特定の組織上に生じたものである場合がある。過形成は、人工的に引き起こすこともできる。過形成はまた、病的に生じる場合もあり、種々の臨床疾患と関連している。過形成は、限定するものではないが、動脈の新生内膜増殖;ケロイド癬痕または肥厚性癬痕;術後癒着;手術後に生じた過形成;先天性副腎過形成;子宮内膜増殖症;良性前立腺肥大;乳房過形成;局所性上皮肥厚;脂腺過形成;代償性肝肥大および過形成状態などを含む。

40

【0092】

用語"被験者"または"個体"または"患者"は、マウス、ラット、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ウ

50

マ、ハムスター、フェレット、ブタ、イヌ、モルモット、ウサギおよび霊長類、例えば、サル、類人猿またはヒトなどを含むが限定されない哺乳動物起源の動物種のメンバーを指すために同義で使用される。

【0093】

本明細書において、用語"治療する"または"治療"は、以下の1以上を達成することを言う:(a)疾患の重症度を軽減すること;(b)治療される疾患に特徴的な症状の発症を抑えること;(c)治療される疾患に特徴的な症状の悪化を抑えること;(d)以前罹患した患者において疾患の再発を抑えること;および(e)以前疾患の徴候を示した患者において症状の再発を抑えること。本明細書において、用語"疾患"または"障害"は、健康障害または機能異常状態のことを言う。本明細書において、用語"症候群"は、ある疾患または状態を示す症状のパターンのことを言う。本明細書において、用語"損傷"は、物理的または化学的であることができる外部の薬剤または力により引き起こされる身体の構造または機能に対する損害または害のことを言う。本明細書において、用語"状態"は、種々の健康状態のことを言い、任意の発症機序または基礎疾患により引き起こされる障害または疾患、損傷ならびに健常組織および器官の促進を含むと解される。疾患は、例えば、限定するものではないが、新形成または過形成を含むことができる。

10

【0094】

組成物:キナーゼ阻害ペプチド(KIP)

一側面によれば、本発明は、キナーゼ阻害組成物であって、キナーゼ阻害ペプチドの治療的有効量を含む前記組成物において、キナーゼ阻害ペプチドがキナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する前記組成物を提供する。

20

【0095】

一実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドはサイクリン依存性キナーゼ阻害薬である。前記実施形態の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドは、一般式IVのアミノ酸配列:

Q1-Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Q2[式IV]

(式中、Q1およびQ2は独立して存在しないか、または存在し、Q1およびQ2が存在する場合、Q1およびQ2は配列:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11[式IV(a)]

(式中、X1はK以外の任意のアミノ酸であるか、または存在せず;X2は存在するか、または存在せず;いくつかの前記実施形態においてX2が存在するとき、X2は任意のアミノ酸であり;いくつかの前記実施形態において、X2が存在するとき、X2は疎水性アミノ酸であり;いくつかの前記実施形態において、X2が存在するとき、X2はAであり;X3は任意のアミノ酸であり;いくつかの前記実施形態において、X3は疎水性アミノ酸であり;いくつかの前記実施形態において、X3はL、I、VおよびMからなる群から選択され;X4は任意のアミノ酸であり;いくつかの前記実施形態において、X4はQ、AおよびNからなる群から選択され;X5は任意の塩基性アミノ酸であり;X6は任意のアミノ酸であり;いくつかの前記実施形態において、X6はQおよびNからなる群から選択され;X7は任意のアミノ酸であり;いくつかの前記実施形態において、X7は疎水性アミノ酸であり;いくつかの前記実施形態において、X7はL、I、VおよびMからなる群から選択され;X8は任意のアミノ酸であり;いくつかの前記実施形態において、X8はG、A、C、S、TおよびYからなる群から選択され;X9は任意のアミノ酸であり;いくつかの前記実施形態において、X9は疎水性アミノ酸であり;いくつかの前記実施形態において、X9はL、I、VおよびMからなる群から選択され;いくつかの前記実施形態において、X9はVであり;X10は任意のアミノ酸であり;X11は任意のアミノ酸であるか、または存在しない)のポリペプチドを含み;Z1およびZ2は存在し;Z3は存在するか、または存在せず、Z4は存在しないか、または存在し、Z4が存在する場合、Z3は存在し、Z5は存在しないか、または存在し、Z5が存在する場合、Z3およびZ4は存在し;Z6は存在しないか、または存在し、Z6が存在する場合、Z3、Z4およびZ5は存在し;Z1、Z2、Z3、Z4、Z5およびZ6のそれぞれは:

30

40

(a)X1-X2-B1-B2-X3-B3-X4[式IV(b)]

50

(式中、X1、X3およびX4のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;いくつかの実施形態において、X2は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

(b)X1-X2-B1-B2-X3-B3[式IV(c)]

(式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、X2は任意のアミノ酸であり、いくつかの実施形態において、X2は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

(c)X1-X2-B1-B2-X3[式IV(d)]

(式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;いくつかの実施形態において、X2は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

(d)X1-B1-B2-X2-B3-X3[式IV(e)]

(式中、X1は任意のアミノ酸であり;いくつかの実施形態において、X1は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

(e)X1-B1-B2-X2-B3[式IV(f)]

(式中、X1は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;X2は任意の疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

(f)X1-B1-B2-X2[式IV(g)]

(式中、X1は任意のアミノ酸であり;いくつかの実施形態において、X1は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;X2は疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

(g)X1-X2-B1-B2[式IV(h)]

(式中、X1は疎水性アミノ酸であり、X2は任意のアミノ酸であり、いくつかの実施形態において、X2は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

(h)X1-X2-B1-X3-X4[式IV(i)]

(式中、X1、X3およびX4のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり、いくつかの実施形態において、X2は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;B1は塩基性アミノ酸である)、

(i)X1-B1-X2-X3[式IV(j)]

(式中、X1は任意のアミノ酸であり、いくつかの実施形態において、X1は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;X2は任意のアミノ酸、疎水性アミノ酸またはQであり;X3は疎水性アミノ酸であり;B1は塩基性アミノ酸である)、

(j)X1-X2-B1-X3[式IV(k)]

(式中、X1およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり、いくつかの実施形態において、X2は疎水性アミノ酸、HまたはNであり;B1は塩基性アミノ酸である)、

(k)B1-B2-X1-X2-B3-X3[式IV(l)]

(式中、X1、X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

(l)B1-B2-X1-X2-B3[式IV(m)]

(式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

(m)B1-B2-X1-X2[式IV(n)]

(式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

(n)B1-X1-X2-B2-B3-X3[式IV(o)]

(式中、X1、X2およびX3のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

10

20

30

40

50

(o)B1-X1-X2-B2-B3[式IV(p)]

(式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり、B1、B2およびB3のそれぞれは塩基性アミノ酸である)、

(p)B1-X1-X2-B2[式IV(q)]

(式中、X1およびX2のそれぞれは疎水性アミノ酸であり;B1およびB2のそれぞれは塩基性アミノ酸である)

からなる群から選択されるペプチドである、但し、Q2が存在する場合、Z2、Z3、Z4、Z5またはZ6の一部としての、Q2の直前の2つのアミノ酸はKAであってはならない)を有するペプチドである。

【0096】

一般式IVの単離されたポリペプチドの他の実施形態において、Q1、Z3、Z4、Z5およびZ6は存在しない。

【0097】

いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドはHRRIKAWLKKILALARQLGVAA[配列番号166];WLRRIKAWLRRIKALARQLGVAA[配列番号113];およびWLRRIKAWLRRALARQLGVA[配列番号177]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はHRRIKAWLKKILALARQLGVAA[配列番号166]である。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRIKALARQLGVAA[配列番号113]である。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRALARQLGVA[配列番号177]である。

【0098】

前記実施形態の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドはKIP1である。いくつかの前記実施形態において、KIP1ペプチドは少なくとも14アミノ酸、少なくとも21アミノ酸、少なくとも28アミノ酸または最大35アミノ酸のペプチドである。いくつかの前記実施形態において、KIP1ペプチドは、式Iのアミノ酸配列:(XXBBXB_X)_n(式中、Xは任意のアミノ酸であり、Bは塩基性アミノ酸、例えば、K、R、Hであり、nは2~5の整数である)を有するペプチドである。

【0099】

前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドはKIP2である。いくつかの前記実施形態において、KIP2ペプチドは11アミノ酸のペプチドである。いくつかの前記実施形態において、KIP2ペプチドは式IIのアミノ酸配列:X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11(式中、X1は存在するか、または存在せず、存在する場合、X1はA、F、I、L、V、WおよびYからなる群から選択されるか、または芳香族疎水性アミノ酸であり;X2は任意のアミノ酸であり;X3はQ、N、RおよびKからなる群から選択され;X4はA、G、I、L、V、RおよびKからなる群から選択されるか、または脂肪族アミノ酸であり;X5はA、G、I、L、V、RおよびKからなる群から選択されるか、または脂肪族アミノ酸であり;X6はA、G、I、L、V、RおよびKからなる群から選択されるか、または脂肪族アミノ酸であり;X7は塩基性アミノ酸であり;X8はQ、N RおよびKからなる群から選択され;X9はA、G、I、L、V、RおよびKからなる群から選択されるか、または脂肪族アミノ酸であり;X10は存在するか、または存在せず、但しX10が存在しない場合、X11もまた存在せず;X10が存在する場合、X10は塩基性アミノ酸であり;X11は存在するか、または存在せず;X11が存在する場合、X11はA、G、I、L、V、RおよびKからなる群から選択されるか、または脂肪族アミノ酸である)を有するペプチドである。いくつかの前記実施形態において、X1はF、WまたはYである。いくつかの前記実施形態において、X3はRである。いくつかの前記実施形態において、X4はRまたはKである。いくつかの前記実施形態において、X5はRまたはKである。いくつかの前記実施形態において、X6はRまたはKである。いくつかの前記実施形態において、X8はQまたはNである。いくつかの前記実施形態において、X9はRまたはKである。いくつかの前記実施形態において、X10はRまたはKである。いくつかの前記実施形態において、X11はRまたはKである。

【0100】

10

20

30

40

50

前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドはKIP3である。いくつかの前記実施形態において、KIP3ペプチドは少なくとも12アミノ酸、少なくとも18アミノ酸、少なくとも24アミノ酸、または少なくとも30アミノ酸のペプチドである。KIP3アミノ酸配列は一般式III:(XBBXB_X)_n(式中、Xは任意のアミノ酸であり、Bは塩基性アミノ酸、例えばK、R、Hであり、nは2~5の整数である)で示される。

【0101】

前記実施形態の他の1つによれば、キナーゼ阻害ペプチドはKIP4である。いくつかの前記実施形態において、KIP4ペプチドは少なくとも16アミノ酸、少なくとも24アミノ酸、少なくとも32アミノ酸または少なくとも40アミノ酸のペプチドである。いくつかの前記実施形態において、KIP4ペプチドは式Vのアミノ酸配列:(XXBBXB_X)_n(式中、Xは任意のアミノ酸であり、Bは塩基性アミノ酸、例えば、K、RまたはHであり、nは2~5の整数である)を有するペプチドである。

10

【0102】

他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは、式VIのアミノ酸配列:

Z1-X1-X2-X3-X4X5-X6-X7-X8-X9-X10-Z2[式VI]

(式中、Z1およびZ2のそれぞれは存在しないか、または導入ドメインであり;X1は存在しないか、または存在し、存在する場合、A、KA、KKA、KKKAおよびRAからなる群から選択され;X2は脂肪族アミノ酸であるか、またはG、L、A、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択され;X3は脂肪族アミノ酸であるか、またはV、L、I、A、G、Q、N、S、TおよびCからなる群から選択され;X4はQ、N、H、RおよびKからなる群から選択され;X5はQおよびNからなる群から選択され;X6は脂肪族アミノ酸であるか、またはC、A、G、L、V、I、M、Y、WおよびFからなる群から選択され;X7は脂肪族アミノ酸であるか、またはS、A、C、TおよびGからなる群から選択され;X8はV、L、IおよびMからなる群から選択され;X9は存在しないか、または任意のアミノ酸であり;X10は存在しないか、または任意のアミノ酸である)を有するペプチドである。

20

【0103】

いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドはKAFKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173];FAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163];およびWLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA[配列番号142]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はKAFKLAARLYRKALARQLGVA A[配列番号173]である。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163]である。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドのアミノ酸配列はWLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA[配列番号142]である。

30

【0104】

他の実施形態によれば、キナーゼ阻害ペプチドは表1のキナーゼ阻害ペプチドである。

【表 1 - 1】

表 1. さらなる KIP アミノ酸配列

	アミノ酸配列	[配列番号]
1	(R) ₄₋₉	[配列番号 1]
2	GRKKRRQRRRPPQ	[配列番号 2]
3	AYARAAARQARA	[配列番号 3]
4	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE	[配列番号 4]
5	GWTLNSAGYLLGLINLKALAALAKKIL	[配列番号 5]
6	PLSSIFSRIGDP	[配列番号 6]
7	AAVALLPAVLLALLAP	[配列番号 7]
8	AAVLLPVLLAAP	[配列番号 8]
9	VTVLALGALAGVGVG	[配列番号 9]
10	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQP	[配列番号 10]
11	GWTLNSAGYLLGLINLKALAALAKKIL	[配列番号 11]
12	KLALKLALKALKKAALKLA	[配列番号 12]
13	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	[配列番号 13]
14	KFAKLAARLYRKA	[配列番号 14]
15	KFAKLAARLYRAA	[配列番号 15]
16	AAFALAAARLYRKA	[配列番号 16]
17	KFAKLAARLYRKA	[配列番号 17]

10

20

30

40

【表 1 - 2】

	アミノ酸配列	[配列番号]
18	KAFAKLAARLYRKAGC	[配列番号 18]
19	KAFAKLAARLYRAAGC	[配列番号 19]
20	AAFAKLAARLYRKAGC	[配列番号 20]
21	KAFAKLAARLYRKAGC	[配列番号 21]
22	KAFAKLAAQLYRKAGC	[配列番号 22]
23	AGGGGYGRKKRRQRRR	[配列番号 23]
24	(WLRIKA) ₁₋₃	[配列番号 176]
25	YGRKKRRQRRR	[配列番号 24]
26	YARAAARQARA	[配列番号 25]
27	RQRRKKRG	[配列番号 26]
28	GRKKRRQR	[配列番号 27]
29	YARAAARQARAKALNRQLGVA	[配列番号 28]
30	YGRKKRRQRRRKALNRQLGVA	[配列番号 29]
31	GRKKRRQRKALNRQLGVA	[配列番号 30]
32	RQRRKKRGKALNRQLGVA	[配列番号 31]
33	WLRIKAWLRIKAKALNRQLGVA	[配列番号 32]
34	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKALNRQLGVA	[配列番号 33]

10

20

30

40

【表 1 - 3】

	アミノ酸配列	[配列番号]
35	YARAAARQARAKKKALNRQLGVA	[配列番号 34]
36	YGRKKRRQRRRKKKALNRQLGVA	[配列番号 35]
37	RQRRKKRGKKKALNRQLGVA	[配列番号 36]
38	GRKKRRQRRRKKKALNRQLGVA	[配列番号 37]
39	WLRIKAWLRIKAKKKALNRQLGVA	[配列番号 38]
40	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKKKALNRQLGVA	[配列番号 39]
41	YARAAARQARAKKKALNRGLGVA	[配列番号 40]
42	YGRKKRRQRRRKKKALNRGLGVA	[配列番号 41]
43	RQRRKKRGKKKALNRGLGVA	[配列番号 42]
44	GRKKRRQRRRKKKALNRGLGVA	[配列番号 43]
45	WLRIKAWLRIKAKKKALNRGLGVA	[配列番号 44]
46	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKKKALNRGLGVA	[配列番号 45]
47	YARAAARQARAKKKALNRQLAVA	[配列番号 46]
48	YGRKKRRQRRRKKKALNRQLAVA	[配列番号 47]
49	RQRRKKRGKKKALNRQLAVA	[配列番号 48]
50	GRKKRRQRRRKKKALNRQLAVA	[配列番号 49]
51	WLRIKAWLRIKAKKKALNRQLAVA	[配列番号 50]

10

20

30

40

【表 1 - 4】

	アミノ酸配列	[配列番号]
52	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKKKALNRQLAVA	[配列番号 51]
53	YARAAARQARAKKKALARQLGVA	[配列番号 52]
54	YGRKKRRQRRRKKALARQLGVA	[配列番号 53]
55	RQRKKRGKKKALARQLGVA	[配列番号 54]
56	GRKKRRQRKKKALARQLGVA	[配列番号 55]
57	WLRIKAWLRIKAKKKALARQLGVA	[配列番号 56]
58	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKKKALARQLGVA	[配列番号 57]
59	YARAAARQARAKALNRGLGVA	[配列番号 58]
60	YGRKKRRQRRRKALNRGLGVA	[配列番号 59]
61	RQRKKRGKALNRGLGVA	[配列番号 60]
62	GRKKRRQRKALNRGLGVA	[配列番号 61]
63	WLRIKAWLRIKAKALNRGLGVA	[配列番号 62]
64	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKALNRGLGVA	[配列番号 63]
65	YARAAARQARAKALNRQLAVA	[配列番号 64]
66	YGRKKRRQRRRKALNRQLAVA	[配列番号 65]
67	RQRKKRGKALNRQLAVA	[配列番号 66]
68	GRKKRRQRKALNRQLAVA	[配列番号 67]

10

20

30

40

【表 1 - 5】

	アミノ酸配列	[配列番号]
69	WLRIKAWLRIKAKALNRQLAVA	[配列番号 68]
70	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKALNRQLAVA	[配列番号 69]
71	YARAAARQARAKALARQLGVA	[配列番号 70]
72	YGRKKRRQRRRKALARQLGVA	[配列番号 71]
73	RQRRKKRGKALARQLGVA	[配列番号 72]
74	GRKKRRQRKALARQLGVA	[配列番号 73]
75	WLRIKAWLRIKAKALARQLGVA	[配列番号 74]
76	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKALARQLGVA	[配列番号 75]
77	YARAAARQARAKKALNRGLGVAA	[配列番号 76]
78	YGRKKRRQRRRKKKALNRGLGVAA	[配列番号 77]
79	RQRRKKRGKKKALNRGLGVAA	[配列番号 78]
80	GRKKRRQRKKKALNRGLGVAA	[配列番号 79]
81	WLRIKAWLRIKAKKKALNRGLGVAA	[配列番号 80]
82	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKKKALNRGLGVAA	[配列番号 81]
83	YARAAARQARAKKKALNRQLAVAA	[配列番号 82]
84	YGRKKRRQRRRKKKALNRQLAVAA	[配列番号 83]
85	RQRRKKRGKKKALNRQLAVAA	[配列番号 84]

10

20

30

40

【表 1 - 6】

	アミノ酸配列	[配列番号]
86	GRKKRRQRKKKALNRQLAVAA	[配列番号 85]
87	WLRIKAWLRIKAKKKALNRQLAVAA	[配列番号 86]
88	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKKKALNRQLAVAA	[配列番号 87]
89	YARAAARQARAKKALARQLGVAA	[配列番号 88]
90	YGRKKRRQRRRKKKALARQLGVAA	[配列番号 89]
91	RQRRKKRGKKALARQLGVAA	[配列番号 90]
92	GRKKRRQRKKKALARQLGVAA	[配列番号 91]
93	WLRIKAWLRIKAKKKALARQLGVAA	[配列番号 92]
94	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKKKALARQLGVAA	[配列番号 93]
95	YARAAARQARAKALNRGLGVAA	[配列番号 94]
96	YGRKKRRQRRRKALNRGLGVAA	[配列番号 95]
97	RQRRKKRGKALNRGLGVAA	[配列番号 96]
98	GRKKRRQRKALNRGLGVAA	[配列番号 97]
99	WLRIKAWLRIKAKALNRGLGVAA	[配列番号 98]
100	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKALNRGLGVAA	[配列番号 99]
101	YARAAARQARAKALNRQLAVAA	[配列番号 100]
102	YGRKKRRQRRRKALNRQLAVAA	[配列番号 101]

10

20

30

40

【表 1 - 7】

	アミノ酸配列	[配列番号]
103	RQRRKKRGKALNRQLAVAA	[配列番号 102]
104	GRKKRRQRKALNRQLAVAA	[配列番号 103]
105	WLRIKAWLRIKAKALNRQLAVAA	[配列番号 104]
106	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKALNRQLAVAA	[配列番号 105]
107	YARAAARQARAKALARQLGVAA	[配列番号 106]
108	YGRKKRRQRKKALARQLGVAA	[配列番号 107]
109	RQRRKKRGKALARQLGVAA	[配列番号 108]
110	GRKKRRQRKALARQLGVAA	[配列番号 109]
111	WLRIKAWLRIKAKALARQLGVAA	[配列番号 110]
112	WLRIKAWLRIKAWLRIKAKALARQLGVAA	[配列番号 111]
113	WLRIKAWLRIKALARQLGVAA	[配列番号 113]
114	WLRIKAWLRIKALNRQLGVAA	[配列番号 142]
115	FAKLAARLYRKA	[配列番号 160]
116	FAKLAARLYRKAGC	[配列番号 161]
117	FAKLAARLYRKALNRQLGVAA	[配列番号 162]
118	FAKLAARLYRKALARQLGVAA	[配列番号 163]
119	FAKLAARLYRKALNRQLGVA	[配列番号 164]

10

20

30

40

【表 1 - 8】

	アミノ酸配列	[配列番号]
120	FAKLAARLYRKALARQLGVA	[配列番号 165]
121	HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA	[配列番号 166]
122	WLRIKAHRRIKALARQLGVAA	[配列番号 167]
123	WLRIKAWLRR	[配列番号 168]
124	WLRIKAWLRRALNRQLGVAA	[配列番号 169]
125	YARAAARQARAKALNRQLGVAA	[配列番号 147]
126	YARAAARQARALNRQLGVAA	[配列番号 170]
127	YARAAARQARALARQLGVAA	[配列番号 171]
128	KAFAKLAARLYRKALNRQLGVAA	[配列番号 172]
129	KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA	[配列番号 173]
130	KAFAKLAARLYRKALNRQLGVA	[配列番号 174]
131	KAFAKLAARLYRKALARQLGVA	[配列番号 175]
132	WLRIKAWLRRALARQLGVA	[配列番号 177]

10

20

30

【 0 1 0 5 】

本明細書において、以下の用語は、2以上の核酸またはポリヌクレオチド間の配列相関を説明するために用いられる：(a)"参照配列"、(b)"比較ウィンドウ"、(c)"配列同一性"、(d)"配列同一性パーセント"および(e)"実質的同一性"。

【 0 1 0 6 】

用語"参照配列"は、配列比較の基準として用いられる配列のことを言う。参照配列は、例えば完全長のcDNAもしくは遺伝子配列のセグメントまたは完全長のcDNAもしくは遺伝子配列のように、特定の配列のサブセットまたは全体であることができる。

40

【 0 1 0 7 】

用語"比較ウィンドウ"は、ポリヌクレオチド配列の連続した特定のセグメントであって、ポリヌクレオチド配列と参照配列とを比較でき、2つの配列の最適のアラインメントに対して、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の部分が、参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含むことができるセグメントのことを言う。一般に、比較ウィンドウは、20連続ヌクレオチド長であり、場合により、少なくとも30連続ヌクレオチド長、少なくとも40連続ヌクレオチド長、少なくとも50連続ヌクレオチド長、少なくとも100連続ヌクレオチド長またはそれ以上であることがで

50

きる。ポリヌクレオチド配列におけるギャップの包含による参照配列に対する高い類似性をさけるために、一般的にはギャップペナルティが導入され、マッチ数から差し引かれることは、当業者には明らかであろう。

【0108】

比較のための配列のアラインメント方法は、当該分野で公知である。比較のための配列の最適のアラインメントは、Smith and Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981) の局所相同性アルゴリズム; Needleman and Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) の相同性アラインメントアルゴリズム; Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444 (1988) の類似性検索方法; これらのアルゴリズムのコンピュータ処理方法(限定するものではないが、Intelligenetics, Mountain View, Calif.によるCLUSTAL in the PC/Geneプログラム; Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., USAにおけるGAP、BESTFIT、BLAST、FASTAおよびTFASTA; CLUSTALプログラムはHiggins and Sharp, *Gene* 73:237-244 (1988) によりよく説明されている; Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989); Corpet, et al., *Nucleic Acids Research* 16:10881-90 (1988); Huang, et al., *Computer Applications in the Biosciences* 8:155-65 (1992) および Pearson, et al., *Methods in Molecular Biology* 24:307-331 (1994) を含む)により行うことができる。データベース類似性検索に使用できるBLASTファミリーのプログラムは、ヌクレオチドデータベース配列に対するヌクレオチドクエリー配列のためのBLASTN; タンパク質データベース配列に対するヌクレオチドクエリー配列のためのBLASTX; タンパク質データベース配列に対するタンパク質クエリー配列のためのBLASTP; ヌクレオチドデータベース配列に対するタンパク質クエリー配列のためのTBLASTN; およびヌクレオチドデータベース配列に対するヌクレオチドクエリー配列のためのTBLASTXを含む。Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 19, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995) を参照のこと。

【0109】

特記しない限り、本明細書に記載の配列同一性/類似性値は、デフォルトパラメータを用い、BLAST 2.0プログラム1式を用いて得た値を指す(Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997))。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、例えばNational Center for Biotechnology-Information(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)から公表されている。このアルゴリズムは、最初に、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインメントしたとき、ある正の閾値スコアTとマッチまたは適合する、クエリー配列における長さWの短いワードを特定することにより高スコア配列対(HSP)を特定することを必要とする。Tは、隣接ワードスコア閾値(Altschul et al, 前出)と呼ばれる。これらの最初の隣接ワードヒットは、それらを含むさらに長いHSPを見出すための検索を開始するための種(seed)としての機能を果たす。次いで、累積アラインメントスコアが増加する限り、各配列に沿って両側にワードヒットが延長される。ヌクレオチド配列の累積スコアは、パラメータM(1対のマッチ残基のリワードスコア; 常に>0)およびN(ミスマッチ残基のペナルティスコア; 常に<0)を用いて算出する。アミノ酸配列に関しては、累積スコアを算出するためにスコアリングマトリックスが用いられる。各方向におけるワードヒットの延長は、累積アラインメントスコアがその最大達成値から量Xだけ減少するとき; 1以上の負のスコアの残基アラインメントの蓄積により累積スコアがゼロ以下になるとき; またはいずれかの配列の末端に到達するときに停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXにより、アラインメントの感度および速度が決定される。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)は、デフォルト値として、ワード長さ(W)11、期待値(E)10、カットオフ値100、M=5、N=-4および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列に関しては、BLASTPプログラムは、デフォルト値として、ワード長さ(W)3、期待値(E)10およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを用いる(Henikoff & Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 参照)。

【0110】

配列同一性パーセントの算出に加えて、BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似

10

20

30

40

50

性の統計解析も行う(例えば、Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993) を参照のこと)。BLASTアルゴリズムにより得られる類似性の尺度の1つは、最小合計確立(P(N))であり、これは、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然に起こる確率の度数を提供する。BLAST検索は、タンパク質をランダム配列として作られると仮定する。しかしながら、多くの実際のタンパク質は、ホモポリマーラクト、ショートピリオドリピートまたは1以上のアミノ酸の富化した領域であることができるランダムでない配列領域を含む。このような低複雑性領域は、たとえタンパク質の他の領域が全く異なっている場合でも、非血縁者のタンパク質間でアラインメントすることができる。このような低複雑性アラインメントを限定するために、いくつかの低複雑性フィルタプログラムを用いることができる。例えば、SEG (Wooten and Federhen, Comput. Chem., 17:149-163 (1993)) および XNU (Claverie and States, Comput. Chem., 17:191-201 (1993)) 低複雑性フィルターを、単独または組み合わせで用いることができる。

10

【0111】

本明細書において、2つの核酸またはポリペプチド配列に関する"配列同一性"または"同一性"は、特定の比較ウィンドウにわたる最大一致に関してアラインメントしたとき同じである2つの配列における残基のことを言う。タンパク質に関して配列同一性パーセントが用いられるとき、同一ではない残基位置は、多くの場合保存的アミノ酸置換により異なっており(すなわち、アミノ酸残基は類似した化学的特性(例えば荷電または疎水性)を有する他のアミノ酸残基で置換されており)、従って分子の機能的特性を変化させない。配列が同類置換で異なっている場合は、置換の保存的性質に基づいて補正するために、配列同一性パーセントを上方に調整することができる。このような同類置換により異なる配列は、"配列類似性"または"類似性"を有するといわれる。このような調整を行う手段は当業者には公知である。一般的には、これには、保存的置換を完全不一致としてよりはむしろ部分的不一致としてスコアし、それによって配列同一性パーセントが増加することを必要とする。従って、例えば、同一アミノ酸にスコア1が与えられ、非保存的置換にスコアゼロが与えられる場合、保存的置換にはゼロと1の間のスコアが与えられる。同類置換のスコアリングは、例えば、Meyers and Miller, Computer Applic. Biol. Sci., 4:11-17 (1988) のアルゴリズムに従い、例えばプログラムPC/GENE(Intelligenetics, Mountain View, Calif., USA)により実行して算出される。

20

【0112】

本明細書において、"配列同一性パーセント"は、比較ウィンドウにわたって最適にアラインメントした2つの配列を比較することにより決定される値を意味し、ここで比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適のアラインメントに関して、参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含むことができる。同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が2つの配列に存在する位置数を決定して一致した位置数を得、比較ウィンドウ内の位置の総数により一致した位置数を割り、その結果に100を掛けて百分率を算出し、配列同一性パーセントを得る。

30

【0113】

ポリヌクレオチド配列の"実質的同一性"という用語は、記載されているアラインメントプログラムの1つを用い標準のパラメータを用いて参照配列と比較して、ポリヌクレオチドが少なくとも70%の配列同一性、少なくとも80%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性および少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。コドン縮重、アミノ酸類似性、リーディングフレームの配置などを考慮することにより、これらの値を適切に適合させて、2つのヌクレオチド配列によりコードされる、対応するタンパク質の同一性を決定することができることは、当業者には明らかであろう。これらの目的のためのアミノ酸配列の実質的同一性は、通常、少なくとも60%または少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を意味する。ヌクレオチド配列が実質的に同一であるという他の目安は、ストリンジェントな条件下で2つの分子が互いにハイブリダイズするかどうかである。しかしながら、ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズしない核酸であっても、コードするポリペプチドが実質的に同一で

40

50

あれば、なお実質的に同一である。例えば、このことは、遺伝コードにより容認される最大のコドン縮重を用いて核酸のコピーが調製されるとき起こる。2つの核酸配列が実質的に同一であるという1つの目安は、第1の核酸がコードするポリペプチドが、第2の核酸によりコードされるポリペプチドと免疫学的交差反応性を有することである。

【0114】

ペプチドに関連する用語"実質的同一性"は、ペプチドが、特定の比較ウィンドウにわたって、参照配列に対して少なくとも70%の配列同一性を有し、参照配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または95%の配列同一性を有する配列を含むことを示す。場合により、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) の相同性アラインメントアルゴリズムを用いて最適のアラインメントを行う。2つのペプチド配列が実質的に同一であるという目安は、1つのペプチドが、第2のペプチドに対して作られた抗体に免疫学的反応性を有することである。従って、例えば2つのペプチドが1つの保存的置換によってのみ異なる場合、あるペプチドは第2のペプチドと実質的に同一である。"実質的に同様な"ペプチドは、同一ではない複数の残基位置が保存的アミノ酸変化により異なる以外は上で述べたように配列を共有する。

【0115】

他の実施形態によれば、本発明は、KIP1に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドであって、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する前記ポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。いくつかの前記実施形態において、単離された核酸は、KIP1に対して100%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドであって、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する前記ポリペプチドをコードする。いくつかの前記実施形態において、KIP1配列は制御調節因子に作動可能に連結されている。

【0116】

他の実施形態によれば、本発明は、KIP2に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドであって、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する前記ポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。いくつかの前記実施形態において、単離された核酸は、KIP2に対して100%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドであって、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する前記ポリペプチドをコードする。いくつかの前記実施形態において、KIP2配列は制御調節因子に作動可能に連結されている。

【0117】

他の実施形態によれば、本発明は、KIP3に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドであって、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する前記ポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。いくつかの前記実施形態において、単離された核酸は、KIP3に対して100%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドであって、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する前記ポリペプチドをコードする。いくつかの前記実施形態において、KIP3配列は制御調節因子に作動可能に連結されている。

【0118】

他の実施形態によれば、本発明は、KIP4に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドであって、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する前記ポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。いくつかの前記実施形態において、単離された核酸は、KIP4に対して100%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドであって、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する前記ポリペプチドをコードする。いくつかの前記実施形態において、KIP4配列は制御調節因子に作動可能に連結されている。

【0119】

他の実施形態によれば、本発明は、KIP1またはKIP2アミノ酸配列を含むペプチドをコードするmRNAに特異的にハイブリダイズする単離された核酸を提供する。本明細書において、用語"特異的にハイブリダイズする"は、もともとは核酸と対合していなかった少なくとも1つのDNA鎖の相補的領域と際立ってまたは明確に塩基対を形成する核酸の過程のことを言う。例えば、KIP配列を含むペプチドをコードする、細胞のmRNAの少なくとも一部と結合またはハイブリダイズすることができる核酸は、特異的にハイブリダイズする核酸と考

10

20

30

40

50

えることができる。選択的にハイブリダイズする核酸は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、その核酸配列の、特定の標的核酸配列へのハイブリダイゼーションを、非標的核酸配列および非標的核酸の実質的除外へのそのハイブリダイゼーションよりも検出可能な程度に大きく(例えば、バックグラウンドの少なくとも2倍)受ける。選択的にハイブリダイズする配列は、一般的には、互いに、およそ少なくとも80%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性または少なくとも100%の配列同一性(すなわち、相補的)を有する。

【0120】

RNAの抽出方法は当該分野で公知であり、例えば、J. Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), vol. 1, ch. 7, "Extraction, Purification, and Analysis of Messenger RNA from Eukaryotic Cells" に記載されている(参照により本願に組み込まれる)。他の単離および抽出方法もまた公知であり、例えばF. Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, 2007)に記載されている。一般的には、単離は、塩化グアニジウムまたはチオシアン酸グアニジンなどのカオトロピック剤の存在下で行われるが、他の界面活性剤および抽出剤を代わりに用いることもできる。一般的には、mRNA分子のポリアデニル化された3'部分に結合する能力を有するオリゴ(dT)セルロースまたは他のクロマトグラフ媒体によるクロマトグラフィーにより、抽出された全RNAからmRNAが単離される。あまり好ましくはないが、代わりに全RNAを用いることもできる。しかしながら、一般に、哺乳動物起源のポリ(A)+RNAを単離することが好ましい。

【0121】

他の実施形態によれば、本発明は、KIPペプチドのアミノ酸配列に特異的に結合する抗体または抗体フラグメントを提供する。

【0122】

キナーゼ活性を阻害する方法

他の側面によれば、本発明は、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み;(b)キナーゼ阻害組成物とキナーゼ酵素とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドとキナーゼ酵素とを結合させ;(c)キナーゼ酵素のキナーゼ活性を低下させる段階を含む前記方法を提供する。

【0123】

他の実施形態によれば、本発明は、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み、キナーゼ阻害ペプチドはさらにKIP1ペプチドを含み;(b)キナーゼ阻害組成物とキナーゼ酵素とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドとキナーゼ酵素とを結合させ;(c)キナーゼ酵素のキナーゼ活性を低下させる段階を含む前記方法を提供する。

【0124】

他の実施形態によれば、本発明は、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み、キナーゼ阻害ペプチドはさらにKIP2ペプチドを含み;(b)キナーゼ阻害組成物とキナーゼ酵素とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドとキナーゼ酵素とを結合させ;(c)キナーゼ酵素のキナーゼ活性を低下させる段階を含む前記方法を提供する。

【0125】

他の実施形態によれば、本発明は、キナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み、キナーゼ阻害ペプチドはさらにKIP3ペプチドを含み;(b)キナーゼ阻害組成物とキナーゼ酵素とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドとキナーゼ酵素とを結合させ;(c)キナーゼ酵素のキナーゼ活性を低下させる段階を含む前記方法を提供する。

【0126】

他の実施形態によれば、本発明は、キナーゼ反応の酵素反応速度を低下させる方法であ

って、(a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み、キナーゼ阻害ペプチドはKIP1ペプチドを含み;(b)キナーゼ阻害組成物とキナーゼ酵素とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドとキナーゼ酵素とを結合させ;(c)キナーゼ酵素の酵素反応速度を低下させる段階を含む前記方法を提供する。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素は原核細胞に含まれる。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素は真核細胞に含まれる。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドは制御調節因子に作動可能に連結されている。

【0127】

他の実施形態によれば、本発明は、キナーゼ反応の酵素反応速度を低下させる方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み、キナーゼ阻害ペプチドはKIP2ペプチドを含み;(b)キナーゼ阻害組成物とキナーゼ酵素とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドとキナーゼ酵素とを結合させ;(c)キナーゼ酵素の酵素反応速度を低下させる段階を含む前記方法を提供する。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素は原核細胞に含まれる。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素は真核細胞に含まれる。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドは制御調節因子に作動可能に連結されている。

10

【0128】

他の実施形態によれば、キナーゼ酵素はセリンキナーゼである。他の実施形態によれば、キナーゼ酵素はトレオニンキナーゼである。他の実施形態によれば、キナーゼ酵素はチロシンキナーゼである。他の実施形態によれば、キナーゼ酵素は受容体チロシンキナーゼである。他の実施形態によれば、キナーゼ酵素はセリン/トレオニンキナーゼである。

20

【0129】

他の実施形態によれば、キナーゼ酵素は、Ab 1、Akt/PKB、AMPK、Arg、Ask、オーロラA、Axl、Blk、Bmx、Brk、BTK、CaMKI、CaMKI、CaMKII、CaMKII、CaMKI1、カゼインキナーゼ、Cdk、CDK9/サイクリン、CKIy1、CKIy2、CKIy3、Ckl、CK2、CK2、CHK、CDK1/サイクリンB、CHK1、CHK2変異体、CK1、CK2、c-Kit、CLK2、CLK3、Cott、Csk、DAPK1、DCAMKL2、DDR、DYRK2、EGFR、Ephs、EphA2、FAK、Fer、Fes/Fps、FGFR、FGFR1、Fgr、Fit、Flt3、Flt4、Fms/CSF-1R、Fyn、GRK5、GRK6、GRK7、GSK、CSK3、Hck、HER/ErbB、HIPK1、HIPK2、HIPK3、IGF-1、ICF IR、IKK、インスリンR、IRAK、IRAK1、IRAK4、JAK、JAK1、JAK2、JAK3、JNK/SAPK、KDR、Lck、LIMK、LIMK1、LOK、Lyn、MAPK、MAPK1、MAPKAPキナーゼ、MEK、MEK1、MELK、Met、Mer、MINK、MKK、MLCK、MLK1、MRCKa、MSK1、MST、MST3、NEK、NEK3、NEK9、PDGFR、PDGFR、PDGFR、PDK、Phk 2、PI3キナーゼ、PIM、Pim-1、Pim-2、Pim-3、PKC、PKC 1、PKC、PKD2、PKR、PKA、PKB、PKC 1、PKC、PKG1、PKG1、PKR、PLK、PRAK、PTK5、Pyk、Raf、Rct、RIPK2、ROK/ROCK、ROCK-1、Ron、Ros、Rse、Rsk4、Rsk/MAPKAPキナーゼ、S6キナーゼ、Rsk2、SAPK2a、SGK、c-Src、Src(1-530)、Src、Syk、TAK1、TAO1、TAO2、TBK、Tie2/TEK、TLK2、Trk、TSSK2、TrkA、Txk、ULK3、Ulk2、VRK2、WEE、Yes、ZAP-70およびZIPKからなる群から選択されるキナーゼ酵素である。

30

【0130】

いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素はROCKキナーゼ、Srcキナーゼ、PKCキナーゼおよびTrkキナーゼからなる群から選択される。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素はROCKキナーゼである。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素はROCK-1である。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素はSrcキナーゼである。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素はSRrc(1-530)である。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素はPKCキナーゼである。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素はPKC 1またはPKC である。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素はTrkキナーゼである。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ酵素はTrkAである。

40

【0131】

他の実施形態によれば、本発明は、mRNA_{KIP}分子のmRNA翻訳を阻害する方法であって、(

50

a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はKIP1に対して100%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸の阻害量を含み、ポリペプチドはキナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害し；(b)段階(a)のキナーゼ阻害組成物とmRNA_{KIP}分子とを接触させて、単離された核酸とmRNA_{KIP}とをハイブリダイズさせ；(c)mRNA_{KIP}分子のmRNA翻訳を阻害する段階を含む前記方法を提供する。本明細書において、用語“mRNA_{KIP}”は、mRNA翻訳によりKIP分子を与えるmRNA分子のことを言う。いくつかの前記実施形態において、mRNA_{KIP}分子のmRNA翻訳はKIP1分子を与える。いくつかの前記実施形態において、mRNA_{KIP}分子は制御調節因子に作動可能に連結されたKIP配列を含む。いくつかの前記実施形態において、段階(a)において、単離された核酸は、KIP1ペプチドに対して約85%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする。

10

【0132】

他の実施形態によれば、本発明は、mRNA_{KIP}分子のmRNA翻訳を阻害する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はKIP2ペプチドに対して100%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸の阻害量を含み、ポリペプチドはキナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害し；(b)段階(a)のキナーゼ阻害組成物とmRNA_{KIP}分子とを接触させて、単離された核酸とmRNA_{KIP}とをハイブリダイズさせ；(c)mRNA_{KIP}分子のmRNA翻訳を阻害する段階を含む前記方法を提供する。いくつかの前記実施形態において、mRNA_{KIP}分子のmRNA翻訳はKIP2分子を与える。いくつかの前記実施形態において、mRNA_{KIP}分子は制御調節因子に作動可能に連結されたKIP配列を含む。いくつかの前記実施形態において、段階(a)において、単離された核酸は、KIP2ペプチドに対して約85%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする。

20

【0133】

他の実施形態によれば、本発明は、KIP1ペプチドのキナーゼ阻害機能を阻害する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物は、キナーゼ阻害ペプチドアミノ酸配列のエピトープに特異的な抗体の治療的有効量を含み、キナーゼ阻害ペプチドアミノ酸配列はKIP1ペプチドアミノ酸配列であり；(b)段階(a)のキナーゼ阻害組成物とKIP1ペプチドとを接触させて、抗体とKIP1ペプチドとを結合させ；(c)キナーゼ阻害ペプチドのキナーゼ阻害機能を阻害する段階を含む前記方法を提供する。

【0134】

他の実施形態によれば、本発明は、KIP2ペプチドのキナーゼ阻害機能を阻害する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物は、キナーゼ阻害ペプチドアミノ酸配列のエピトープに特異的な抗体の治療的有効量を含み、キナーゼ阻害ペプチドアミノ酸配列はKIP2ペプチドアミノ酸配列であり；(b)段階(a)のキナーゼ阻害組成物とKIP2ペプチドとを接触させて、抗体とKIP2ペプチドとを結合させ；(c)キナーゼ阻害ペプチドのキナーゼ阻害機能を阻害する段階を含む前記方法を提供する。

30

【0135】

疾患の抑制

他の側面によれば、本発明は、細胞集団の過形成を抑制する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物の治療的有効量を、それを必要とする被験者に提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はKIPペプチドに対して100%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸を含み、ポリペプチドはキナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害し；(b)段階(a)のキナーゼ阻害組成物と少なくとも1つの過形成性細胞とを接触させて、単離された核酸と少なくとも1つの過形成性細胞とを結合させ；(c)過形成を抑制する段階を含む前記方法を提供する。他の実施形態において、段階(a)の単離された核酸は、さらに、制御調節因子を含む。

40

【0136】

他の側面によれば、本発明は、細胞集団の過形成を抑制する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物の治療的有効量を、それを必要とする被験者に提供し、ここでキナーゼ阻害組成物は、キナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み、キナーゼ阻害ペプチドはKIPペプチドを含み；(b)キナーゼ阻害組成物と少なくとも1つの過形成性細胞とを接触させて、キナー

50

ゼ阻害ペプチドと少なくとも1つの過形成性細胞とを結合させ;(c)過形成を抑制する段階を含む前記方法を提供する。いくつかの前記実施形態において、段階(a)のキナーゼ阻害ペプチドは制御調節因子に作動可能に連結されている。

【0137】

本明細書において、用語"増殖"は、細胞集団の細胞の、より大きく、より長くもまたはより多数になる過程、あるいはサイズ、数または容量の増加のことを言う。

【0138】

他の側面によれば、本発明は、新生物の増殖を抑制する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物の治療的有効量を、それを必要とする被験者に提供し、ここでキナーゼ阻害組成物は、KIPペプチドに対して100%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸の阻害量を含み、ポリペプチドはキナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害し; (b)新生物と段階(a)のキナーゼ阻害組成物とを接触させて、単離された核酸と新生物とを結合させ;(c)新生物の増殖を抑制する段階を含む前記方法を提供する。他の実施形態において、段階(a)の単離された核酸は、さらに制御調節因子を含む。

【0139】

他の側面によれば、本発明は、新生物の増殖を抑制する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物の治療的有効量を、それを必要とする被験者に提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み、キナーゼ阻害ペプチドはKIPペプチドを含み; (b)新生物とキナーゼ阻害組成物とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドと新生物とを結合させ;(c)新生物の増殖を抑制する段階を含む前記方法を提供する。いくつかの前記実施形態において、段階(a)のキナーゼ阻害ペプチドは、制御調節因子に作動可能に連結されている。

【0140】

他の実施形態によれば、新生物は良性腫瘍である。他の実施形態によれば、新生物は悪性腫瘍である。他の実施形態によれば、新生物は乳頭腫、腺腫、胞状奇胎、線維腫、軟骨腫、骨腫、平滑筋腫、横紋筋腫、脂肪腫、血管腫、リンパ管腫、真性赤血球増加症、伝染性単核症、"良性"神経膠腫、髄膜腫、神経節性神経腫、神経鞘腫、神経線維腫、色素性母斑(黒あざ)、褐色細胞腫、カルチノイド腫瘍、奇形腫、癌、腺癌、基底細胞癌、絨毛癌、線維肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、子宮平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、血管肉腫、リンパ管肉腫、骨髄球性白血病、赤芽球性白血病、リンパ性白血病、多発性骨髄腫、単球性白血病、ユーイング肉腫、非ホジキン悪性リンパ腫、髄芽腫、乏突起膠腫、神経鞘肉腫悪性黒色腫、胸腺腫、多形性膠芽腫、星状細胞腫、上衣腫、髄膜肉腫、神経芽細胞腫(神経鞘腫)、神経線維肉腫、悪性褐色細胞腫、網膜芽細胞腫、カルチノイド腫瘍、腎芽細胞腫(ウィルムス腫瘍)、奇形癌および絨毛癌胎児性癌からなる群から選択される新生物である。

【0141】

他の実施形態によれば、KIPペプチドに対して100%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドであって、キナーゼ活性を阻害する前記ポリペプチドをコードする単離された核酸は、局所投与または全身投与することができる。

【0142】

他の側面によれば、本発明はさらに、本発明のポリペプチドの効果を測定するために用いられる、ヒト疾患の動物モデル実験を記載する。これらの動物モデルは他の研究者により用いられてきており、そのようなものとして一般に認められている。従って、このモデルを用いて得られた治療結果は、ヒト被験者を治療する方法へ外挿することができる。

【0143】

過形成モデル

Heldmanら (A.W. Heldman, L. Cheng, G.M. Jenkins, etc., 2001, "Paclitaxel Stent Coating Inhibits Neointimal Hyperplasia at 4 Weeks in a Porcine Model of Coronary Restenosis," Circulation, 103: 2289-2295) により記載されている冠動脈再狭窄のブタモデルを用いて、過形成を抑制するKIPペプチドの能力を評価することができる。KIPペプチドを含有する溶液にステントを浸し、溶媒を乾燥させることによりステントをコ

10

20

30

40

50

ーティングする。コーティングされたステントをバルーンカテーテルに取り付け、エチレンオキシドガスを用いて滅菌する。ステント留置術の前日に、体重35～45kgの雌雄のNIHミニプタをアスピリン(325mg)およびジルチアゼム(180mg)で前処置する。ケタミン(20mg/kg IM)およびアセチルプロマジン(0.22mg/kg IM)を用いて動物を落ち着かせ、仰臥位および気管内挿管を容易にするためにペントバルビタールナトリウム(4mg/kg IV)を動物に与えた後、滅菌外科技術に基づいて、右頸動脈に動脈シースを挿入する。ヘパリン(5000U)を投与後、ガイディングカテーテルを介して左冠動脈前下行枝にステントを送達し、バルーン膨張を用いて配備することができる。回復期間および実験期間を通じて血管造影図を撮る。特に、組織標本および組織形態計測学的分析を用いて過形成の大きさを評価することができる。

10

【0144】

新生物モデル

スキッドマウス腫瘍モデル、例えばBeckerら(J.C. Becker, N. Varki, S.D. Gillies, K. Furukawa, and R.A. Reisfeld, 1996, "Long-lived and Transferable Tumor Immunity in Mice after Targeted Interleukin-2 Therapy," J. Clin. Invest., 98(12): 2801-2804)により記載されたものを用いて、新生物の増殖を抑制または低下させるKIPペプチドの能力を評価することができる。RPMI1640などの等張緩衝液に懸濁した 5×10^6 腫瘍細胞(マウス黒色腫細胞株B16または細胞株B78-D14など)の皮下注射により、皮下腫瘍を誘導することができる。14日以内に、およそ $40 \mu\text{l}$ の量の腫瘍が生じるはずである。KIPペプチドは、腫瘍に直接注射することもでき、腫瘍誘導時に注射により投与することもでき、

20

【0145】

細胞死

本明細書において、用語"プログラム細胞死"(または"PCD")は、細胞内在性プログラムにより媒介される、任意の形態の細胞死のことを言う。壊死(急性組織損傷により生じ、炎症反応を引き起こす細胞死の形態)と対照的に、PCDは、一般に生物の生活環中、利点を付与する調節された過程である。2つの型のPCDが知られている。アポトーシス(I型)およびオートファジー細胞死(II型)である。細胞死の他の経路は、非アポトーシス性プログラム細胞死(カスパーゼ非依存性PCDまたは壊死様PCDとも呼ばれる)、アノイキス(周囲の細胞外マトリックスから離れた足場依存性細胞により誘導されるアポトーシスの1形態)、角化、興奮毒性およびウォーラー変性(軸索変性)を含む。

30

【0146】

本明細書において、用語"アポトーシス"は、例えば、限定するものではないが、プレブ形成、細胞膜に対する変化(例えば膜の非対称性および接着性の喪失)、細胞収縮、細胞核断片化、クロマチン凝集および染色体DNA断片化を含む形態学的変化をもたらす一連の生化学的事象のことを言う。アポトーシスの過程は、多様な細胞外および細胞内細胞シグナルによって調節されている。このような細胞外シグナルは、例えば、限定するものではないが、毒素、ホルモン、増殖因子、一酸化窒素またはサイトカインを含むことができ、

40

【0147】

他の側面によれば、本発明は、細胞集団のプログラム細胞死を誘導する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物の治療的有効量を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み;(b)細胞集団の少なくとも1つの細胞とキナーゼ阻害組成物

50

とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドと少なくとも1つの細胞とを結合させ;(c)細胞集団の少なくとも1つの細胞のプログラム細胞死を誘導する段階を含む前記方法を提供する。いくつかの前記実施形態において、細胞は原核細胞である。いくつかの前記実施形態において、細胞は真核細胞である。いくつかの前記実施形態において、細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの前記実施形態において、哺乳動物細胞はニューロン、上皮細胞、筋細胞、血球、免疫細胞、幹細胞、骨細胞または内皮細胞からなる群から選択される。いくつかの前記実施形態において、プログラム細胞死はアポトーシスである。

【0148】

他の実施形態によれば、本発明は、細胞集団のプログラム細胞死を誘導する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物の治療的有効量を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物は、KIPペプチドに対して100%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸の阻害量を含み、ポリペプチドはキナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害し;(b)細胞集団の少なくとも1つの細胞と段階(a)のキナーゼ阻害組成物とを接触させて、単離された核酸と少なくとも1つの細胞とを結合させ;(c)細胞集団の少なくとも1つの細胞のプログラム細胞死を誘導する段階を含む前記方法を提供する。いくつかの前記実施形態において、段階(a)の単離された核酸は、さらに制御調節因子を含む。いくつかの前記実施形態において、細胞は原核細胞である。いくつかの前記実施形態において、細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの前記実施形態において、哺乳動物細胞は、ニューロン、上皮細胞、筋細胞、血球、免疫細胞、幹細胞、骨細胞または内皮細胞からなる群から選択される。いくつかの前記実施形態において、細胞は真核細胞である。いくつかの前記実施形態において、プログラム細胞死はアポトーシスである。

【0149】

本明細書において、用語"進行性疾患"は、以前に投与された治療薬(単数または複数)が有効ではない(なかった)ため、その疾患を抑制するために他の治療薬が必要な可能性があることを意味する。本明細書において、用語"病状の安定化"は、体内での病変のサイズまたは数の有意な減少のことを言い、治癒を試みるにはさらなる治療薬(単数または複数)が必要と考えられることを意味する。本明細書において、用語"部分寛解"は、臨床検査、X線、走査またはバイオマーカー試験に見られる、疾患の約30%以上の縮小のことを言う。本明細書において、用語"完全寛解"は、疾患の臨床検査、X線またはバイオマーカー試験において残存疾患が認められないことを言うが、治癒を意味しない。

【0150】

他の側面によれば、本発明は、増殖細胞集団の進行を抑制する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物の治療的有効量を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み(b)増殖細胞集団の少なくとも1つの細胞とキナーゼ阻害組成物とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドと少なくとも1つの増殖細胞とを結合させ(c)少なくとも1つの細胞による増殖を抑制する段階を含む前記方法を提供する。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドは制御調節因子に作動可能に連結されている。いくつかの前記実施形態において、細胞は原核細胞である。いくつかの前記実施形態において、細胞は真核性である。

【0151】

一実施形態によれば、本発明は、細胞集団の増殖の進行を抑制する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物の治療的有効量を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物はキナーゼ阻害ペプチドの阻害量を含み、キナーゼ阻害ペプチドはKIPペプチドを含み;(b)増殖細胞集団の少なくとも1つの細胞とキナーゼ阻害組成物とを接触させて、キナーゼ阻害ペプチドと少なくとも1つの増殖細胞とを結合させ;(c)少なくとも1つの細胞による増殖を抑制する段階を含む前記方法を提供する。いくつかの前記実施形態において、細胞は原核細胞である。いくつかの前記実施形態において、細胞は真核細胞である。

【0152】

他の実施形態によれば、本発明は、増殖細胞集団の進行を抑制する方法であって、(a)キナーゼ阻害組成物の治療的有効量を提供し、ここでキナーゼ阻害組成物は、KIPペプチ

10

20

30

40

50

ドに対して100%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸の阻害量を含み、ポリペプチドはキナーゼ酵素のキナーゼ活性を阻害し;(b)増殖細胞集団の少なくとも1つの細胞と段階(a)のキナーゼ阻害組成物とを接触させて、単離された核酸と少なくとも1つの増殖細胞とを結合させ;(c)少なくとも1つの細胞の増殖を抑制する段階を含む前記方法を提供する。他の実施形態において、段階(a)の単離された核酸は、さらに制御調節因子を含む。いくつかの前記実施形態において、細胞は原核細胞である。いくつかの前記実施形態において、細胞は真核細胞である。

【0153】

他の実施形態によれば、キナーゼ阻害組成物は、局所送達が望ましい場合、注射、例えばボーラス注射または持続注射による非経口投与用に製剤化することができる。注射用製剤は、単位剤形、例えば防腐剤を添加したアンプルまたは複数回投与容器で提供できる。組成物は、油性または水性ビヒクルによる懸濁液、溶液またはエマルジョンなどの形態を選ぶことができ、懸濁化剤、安定化剤および/または分散剤などの製剤用薬剤を含有することができる。非経口投与用医薬製剤は、水溶性型の活性化合物の水溶液を含む。さらに、適切な油性注射懸濁液として、活性化合物の懸濁液を調製することができる。適切な親油性溶媒またはビヒクルは、ゴマ油などの脂肪油またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステルまたはリポソームを含む。水性懸濁注射液は、懸濁液の粘度を増加させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランを含有することができる。場合により、懸濁液には、化合物の溶解性を増加させて高濃度溶液の製造を可能にする適切な安定剤または薬剤を含有させることもできる。あるいは、活性化合物は、使用前に、適切なビヒクル、例えば、滅菌ピロジェンフリー水で再構成するために粉末形にすることができる。

【0154】

医薬組成物(すなわち、キナーゼ阻害組成物)はまた、適切な固相またはゲル相の担体または賦形剤を含むことができる。このような担体または賦形剤の例は、限定するものではないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖類、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチンおよび、ポリエチレングリコールなどのポリマーを含む。

【0155】

適切な液体または固体医薬剤型は、例えば、必要に応じて1以上の賦形剤を用いてマイクロカプセル化されるか、コヒレート化(encochleate)されるか、微細金粒子にコーティングされるか、リポソームに含有されるか、組織に埋め込むためにペレット化されるか、組織にすりこむために物体上に乾燥される。このような医薬組成物はまた、顆粒、ビーズ、粉末剤、錠剤、コーティング錠、(マイクロ)カプセル、座剤、シロップ、エマルジョン、懸濁液、クリーム、滴剤または、賦形剤および添加剤および/または補助剤、例えば崩壊剤、バインダー、コーティング剤、膨張剤、滑沢剤または可溶化剤が前述のように通常に用いられている、活性化合物を遅延放出させる製剤の形態であることができる。本医薬組成物は、種々のドラッグデリバリーシステムに使用するのに適している。ドラッグデリバリーの方法についての概説に関しては、Langer 1990 Science 249, 1527-1533 を参照されたい(この概説は、参照により本願に組み込まれる)。

【0156】

キナーゼ阻害組成物および場合により他の治療剤は、それ自体で(ニートで)投与することもでき、あるいは薬学的に許容される塩の形で投与することもできる。医薬に用いる場合、塩は薬学的に許容されるものでなければならないが、薬学的に許容されない塩は、その薬学的に許容される塩を調製するために好都合に用いることができる。このような塩は、限定するものではないが、以下の酸:塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸およびベンゼンスルホン酸から調製される塩を含む。また、このような塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類塩、例えばカルボン酸基のナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩として調製することができる。"薬学的に許容される塩"とは、信頼できる医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激

10

20

30

40

50

、アレルギー反応などを伴わないで、ヒトおよび下等動物の組織への接触に使用するのに適し、妥当な便益/リスク比に釣り合った塩を意味する。薬学的に許容される塩は当該分野で公知である。例えば、P. H. Stahlらは、"Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" (Wiley VCH、スイス・チューリヒ(2002年))に薬学的に許容される塩を詳細に記載している。これらの塩は、本発明に記載されている化合物の最終分離精製中に *in situ* で調製することもできるし、別々に遊離塩基と適切な有機酸とを反応させることにより調製することもできる。代表的な酸付加塩は、限定するものではないが、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、クエン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩、カンファースルホン酸塩、ジグルコン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、フマル酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩(イセチオン酸塩)、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、シュウ酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、リン酸塩、グルタミン酸塩、重炭酸塩、p-トルエンスルホン酸塩およびウンデカン酸塩を含む。また、塩基性窒素含有基は、低級アルキルハリド、例えばメチル、エチル、プロピルおよびブチルクロリド、ブロミドおよびヨージド;ジアルキルスルファート、例えばジメチル、ジエチル、ジブチルおよびジアミルスルファート;長鎖ハリド、例えばデシル、ラウリル、ミリスチルおよびステアリルクロリド、ブロミドおよびヨージド;アリールアルキルハリド、例えばベンジルおよびフェネチルブロミドなどの薬剤で四級化することができる。水またはオイルに可溶性または分散性の産物は、それによって得られる。薬学的に許容される酸付加塩を形成するために用いることができる酸の例は、塩酸、臭化水素酸、硫酸およびリン酸などの無機酸ならびにシュウ酸、マレイン酸、コハク酸およびクエン酸などの有機酸を含む。塩基付加塩は、本発明に記載の化合物の最終分離精製中に、*in situ* で、カルボン酸含有基と適切な塩基、例えば薬学的に許容される金属カチオンのヒドロキシド、カルボナートもしくはピカルボナートまたはアンモニアまたは有機第一級、第二級もしくは第三級アミンとを反応させることにより調製できる。薬学的に許容される塩は、限定するものではないが、アルカリ金属またはアルカリ土類金属、例えばリチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムおよびアルミニウム塩などに基づくカチオンならびにアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ジエチルアミン、エチルアミンなどを含む毒性のない第四級アンモニアおよびアミンカチオンを含む。塩基付加塩の形成に有用な他の代表的有機アミンは、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペリジン、ピペラジンなどを含む。薬学的に許容される塩は、当該分野で公知の標準的方法、例えばアミンなどの十分な塩基性を有する化合物と生理学的に許容されるアニオンを生成する適切な酸とを反応させる方法を用いて得ることもできる。カルボン酸のアルカリ金属(例えば、ナトリウム、カリウムもしくはリチウム)またはアルカリ土類金属(例えばカルシウムもしくはマグネシウム)塩もまた製造することができる。

【0157】

本製剤は、好都合には、単位剤形で提供することができ、製薬業界に公知の方法のいずれかを用いて製造することができる。方法は、すべて、キナーゼ阻害組成物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物("活性化化合物")と、1以上の補助薬剤を構成する担体とを混合する段階を含む。一般に、本製剤は、活性成分と液体担体もしくは微細固体担体または両方とを均一かつ密接に混合し、次いで必要に応じてその製品を所望の製剤に成形することにより製造される。

【0158】

本医薬剤またはその薬学的に許容されるエステル、塩、溶媒和物もしくはプロドラッグは、所望の作用を損ねない他の活性物質と混合するか、または所望の作用を補う物質と混合することができる。非経口、皮内、皮下、鞘内または局所投与に用いられる溶液または

10

20

30

40

50

懸濁液は、限定するものではないが、例えば以下の成分：滅菌希釈剤、例えば注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗菌剤、例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸；緩衝液、例えば酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩および張度調節剤、例えば塩化ナトリウムまたはデキストロースを含むことができる。非経口剤は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、ディスポーザブルシリンジまたは複数回投与バイアルに入れることができる。静脈内投与する場合、特定の担体は、生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)である。

【0159】

注射剤用医薬組成物は、薬学的に許容される滅菌水性または非水性の溶液、分散剤、懸濁液またはエマルジョンおよび滅菌注射液または分散剤に再構成するための滅菌粉末を含む。適切な水性および非水性担体、希釈剤、溶媒またはビヒクルの例は、水、エタノール、ポリオール(プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセロールなど)、それらの適切な混合物、植物油(例えばオリーブ油)および注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルを含む。例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散剤の場合における必要な粒度の維持および界面活性剤の使用により適切な流動性を維持できる。

【0160】

これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤を含むアジュバントを含有することもできる。種々の抗菌剤および抗真菌薬、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などにより、微生物の活動を確実に予防することができる。等張剤、例えば、糖類、塩化ナトリウムなどを含むのが望ましい場合もある。吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用により、注射剤の持続吸収を引き起こすことができる。

【0161】

懸濁液は、活性化化合物に加えて、懸濁化剤、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天、トラガントならびにそれらの混合物を含有することができる。

【0162】

注射用デポ剤は、ポリラクチド/ポリグリコリドなどの生分解性ポリマー中に薬物のマイクロカプセル化を形成させることにより製造される。ポリマー対薬物の比および用いられる特定のポリマーの性質に従って薬物放出速度を調節することができる。このような持続性製剤は、適切なポリマーもしくは疎水性物質(例えば許容されるオイルによるエマルジョンとして)またはイオン交換樹脂を用いて製剤化することもでき、難溶性誘導体、例えば難溶性塩として製剤化することもできる。他の生分解性ポリマーの例は、ポリ(オルトエステル)およびポリ(無水物)を含む。体組織と適合するリポソームまたはマイクロエマルジョンに薬物を捕捉することによっても注射用デポ剤が調製される。

【0163】

局所注射用製剤は、例えば細菌保持フィルターによる濾過により、あるいは使用直前に滅菌水または他の滅菌注射用媒体に溶解または分散させることができる滅菌固体組成物の形の滅菌剤を組み込むことにより滅菌することができる。注射剤、例えば、滅菌注射用水性または油性懸濁液は、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を用い、既知の技術に従って製剤化できる。滅菌注射剤は、毒性のない、非経口的に許容される希釈剤または溶媒を用いて、例えば1,3-ブタンジオール溶液により、滅菌注射液、懸濁液またはエマルジョンにすることができる。許容されるビヒクルおよび使用可能な溶媒には、水、リンゲル液(USP)および生理食塩液がある。さらに、溶媒または懸濁化剤として、滅菌不揮発性油が通常用いられる。このために、合成モノまたはジグリセリドを含む任意の滅菌固定油を用いることができる。さらに、注射剤の製造に、オレイン酸などの脂肪酸が用いられる。

。

10

20

30

40

50

【0164】

非経口(皮下、皮内、筋肉内、静脈内、鞘内および関節内を含むが限定されない)投与用製剤は、抗酸化薬、緩衝液、静菌剤および、被提供者の血液と製剤とを等張にする溶質を含有することができる水性および非水性滅菌注射液ならびに懸濁化剤および増粘剤を含有することができる水性および非水性滅菌懸濁液を含む。これらの製剤は、投薬単位または複数回投与容器、例えば密封アンプルおよびバイアルで提供でき、使用の直前に滅菌液体担体、例えば、生理食塩水、注射用水を添加することだけを必要とするフリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存できる。前述のような滅菌粉末、顆粒および錠剤から、即座に使用できる注射液および懸濁液を調製できる。

【0165】

本明細書記載の組成物の他の製剤化方法は、水溶性を高めるポリマーへ本明細書記載の化合物を結合させることを含む。適切なポリマーの例は、限定するものではないが、ポリエチレングリコール、ポリ-(d-グルタミン酸)、ポリ-(l-グルタミン酸)、ポリ-(l-グルタミン酸)、ポリ-(d-アスパラギン酸)、ポリ-(l-アスパラギン酸)、ポリ-(l-アスパラギン酸)およびそれらのコポリマーを含む。分子量約5,000~約100,000を有するポリグルタミン酸、分子量約20,000~約80,000を有するポリグルタミン酸を使用することができ、分子量約30,000~約60,000を有するポリグルタミン酸もまた使用できる。米国特許第5,977,163号(これは参照により本願に組み込まれる)に本質的に記載されているプロトコルを用いて、発明によるエポチロンの1以上のヒドロキシルにエステル結合でこれらのポリマーが結合される。特定の結合部位は、本発明の21-ヒドロキシ誘導体の場合は、炭素-21のヒドロキシルを含む。他の結合部位は、限定するものではないが、炭素3のヒドロキシルおよび/または炭素7のヒドロキシルをふくむ。

【0166】

適切な緩衝化剤は、酢酸および塩(1~2%w/v);クエン酸および塩(1~3%w/v);ホウ酸および塩(0.5~2.5%w/v);ならびにリン酸および塩(0.8~2%w/v)を含む。適切な防腐剤は塩化ベンザルコニウム(0.003~0.03%w/v);クロロブタノール(0.3~0.9%w/v);パラベン(0.01~0.25%w/v)およびチメロサル(0.004~0.02%w/v)を含む。

【0167】

いくつかの実施形態において、キナーゼ阻害組成物は医薬組成物である。本発明に記載の医薬組成物は、薬学的に許容される担体に含有させたキナーゼ阻害組成物の治療的有効量および場合により他の治療剤を含む。本明細書において、用語"薬学的に許容される担体"は、ヒトまたは他の脊椎動物への投与に適した、1以上の、適合性のある固体もしくは液体の充填剤、希釈剤またはカプセル化物質のことを言う。本明細書において、用語"担体"は、活性成分と混合して投与を容易にするための、天然または合成の有機または無機成分のことを言う。活性成分は、キナーゼ阻害組成物であることができる。医薬組成物の成分は、所望の薬剤の有効性を実質的にそこねる相互作用のないように混合することもできる。

【0168】

キナーゼ阻害組成物を含む治療剤(単数または複数)は、粒子で提供することができる。本明細書において、用語"粒子"は、全体または一部分においてキナーゼ阻害組成物を含むことができるナノまたはマイクロパーティクル(あるいは場合によってはより大きい)のことを言う。これらの粒子は、コーティングに囲まれたコア内に治療剤(単数または複数)を含むことができる。治療剤(単数または複数)は、粒子の隅から隅まで分散させることもできる。治療剤(単数または複数)はまた、粒子の少なくとも1つの表面に吸着させることもできる。粒子は、ゼロ次放出、一次放出、二次放出、遅延放出、持続放出、即時放出など、ならびにそれらの任意の組み合わせを含む任意の次数の放出キネティクスのものであることもできる。粒子は、治療剤(単数または複数)に加えて、限定するものではないが、侵食性、耐食性、生分解性もしくは非生分解性物質またはそれらの組み合わせを含む、製薬業界および医療業界でルーチンに用いられている物質を含む。粒子は、溶液または半固体状態でキナーゼ阻害組成物を含有するマイクロカプセルであることができる。粒子は、事

10

20

30

40

50

実上任意の形状のものであることができる。

【0169】

非生分解性および生分解性ポリマー材料は、両方とも、治療剤(単数または複数)送達のための粒子の製造に使用できる。このようなポリマーは、天然または合成のポリマーであることができる。ポリマーは、望ましい放出期間に基づいて選択される。特に興味を持たれる生体接着性ポリマーは、Macromolecules (1993) 26, 581-587 にSawhneyらによって記載された生分解性ヒドロゲルを含む(その教示は、本明細書に組み込まれる)。これらは、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリアンヒドリド、ポリアクリル酸、アルギン酸塩、キトサン、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)およびポリ(オクタデシルアクリレート)を含む。

10

【0170】

治療剤(単数または複数)は、徐放性システムに含有させることができる。薬物の効果を長引かせるためには、多くの場合、皮下注射、鞘内注射または筋肉注射からの薬物の吸収をおそくすることが望ましい。水溶性の低い結晶性または非晶質物質の液体懸濁液の使用によりこのことは達成できる。そのとき、薬物の吸収速度はその溶出速度に依存し、その溶出速度は、今度は結晶サイズおよび結晶形に依存すると考えられる。用語"徐放性"は、製剤からの薬物放出の方法およびプロファイルが調節されている任意の薬物含有製剤を指すものとする。この用語は、即時放出製剤ばかりでなく非即時放出製剤のこともいい、非即時放出製剤は、限定するものではないが、持続放出および遅延放出製剤を含む。本明細書において、用語"持続放出"(とも呼ばれる"徐放性")は、その従来の意味において、薬物の除放を長期間提供し、かつ好ましくは、必ずではないが、長期間実質的に一定の薬物の血中濃度をもたらす薬物製剤を指すために用いられる。あるいは、非経口投与剤型の遅延吸収は、オイルビヒクルに薬物を溶解または懸濁することにより達成される。本明細書において、用語"遅延放出"は、その従来の意味において、製剤の投与と製剤からの薬物の放出との間に時間遅延が存在する薬物製剤を指すために用いられる。"遅延放出"は、長期間にわたる薬物の除放を含むことも含まないこともでき、従って"持続放出"であることもそうでないこともできる。

20

30

【0171】

長期持続放出インプラントの使用は、慢性疾患の治療に特に適している場合がある。本明細書において、用語"長期"放出は、治療濃度の活性成分を少なくとも7日間、好ましくは約30~約60日間送達するようにインプラントが構築され配置されていることを意味する。長期持続放出インプラントは当業者に公知であり、前述の放出システムの一部をふくむ。

【0172】

他の側面において、本発明はさらに、式IVの配列を含む少なくとも1つの単離されたキナーゼ阻害ペプチドを含む生物医学デバイスであって、1以上の単離されたキナーゼ阻害ペプチドがデバイス上またはデバイス内に配置された前記生物医学デバイスを提供する。いくつかの前記実施形態において、少なくとも1つのキナーゼ阻害ペプチドは、HRRIKAWLK KILALARQLGVAA[配列番号166];WLRRIKAWLRRIKALARQLGVAA[配列番号113];およびWLRRIKAWLR RALARQLGVA[配列番号177]からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの前記実施形態において、生物医学デバイスは、式Vの配列を含む少なくとも1つの単離されたキナーゼ阻害ペプチドであって、デバイス上またはデバイス内に配置された前記1以上の単離されたキナーゼ阻害ペプチドを含む。いくつかの前記実施形態において、生物医学デバイスは、式VIの配列を含む少なくとも1つの単離されたキナーゼ阻害ペプチドであって、デバイス上またはデバイス内に配置された前記1以上の単離されたキナーゼ阻害ペプチドを含む。いくつかの前記実施形態において、キナーゼ阻害ペプチドはKFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173];FAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列

40

50

番号163];およびWLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA[配列番号142]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである。

【0173】

本発明に有用な分子遺伝学および遺伝子工学における一般法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, edited by D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" in Methods in Enzymology (M.P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, CA), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2nd Ed. (R. I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY)および Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.)の現行版に記載されている。遺伝子操作のための試薬、クローニングベクターおよびキットは、BioRad社、Stratagene社、Invitrogen社、ClonTech社およびSigma-Aldrich Co.社などの販売会社から入手できる。

10

【0174】

数値の範囲が示されている場合、文脈により明確に否定されない限りは、その範囲の上限値および下限値の間の値ならびにその記載された範囲における任意の他の定められたまたは中間の値が、下限の単位の10分の1まで本発明に含まれると解される。より小さな範囲内に独立して含むことができるこれらのより小さな範囲の上限および下限もまた、記載された範囲内の任意の特に除外された境界に従って本発明に含まれる。記載された範囲がその境界の1つまたは両方を含む場合、これらの含まれた境界の両方のいずれかを除外した範囲もまた本発明に含まれる。

20

【0175】

特記しない限り、本明細書に用いられるすべての学術用語は、本発明の属する当該技術分野における当業者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書記載のものと類似または等価な任意の方法および物質もまた本発明の実施または試験に用いることができるが、好ましい方法および物質は次に記載される。本明細書記載のすべての刊行物は参照により本願に組み込まれて、刊行物が引用しているものに関して方法および/または物質を開示し、記載する。

30

【0176】

本明細書および添付の特許請求の範囲において、文脈により明確に否定されない限りは、単数形"a"、"and"および"the"は複数指示を含む事に注意しなければならない。すべての技術用語および科学用語は同じ意味を有する。

【0177】

本明細書に開示された刊行物は、単に、本発明の出願日より前の開示について提供されている。本明細書に記載の何物も、本発明が、先願発明に基づいて、このような刊行物に先行することの資格を与えられないことの承認として解釈してはならない。さらにまた、記載された刊行日は、実際の刊行日とは異なる可能性があり、独立して確認する必要がある。

40

【図面の簡単な説明】

【0178】

【図1】4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したMCF-7細胞を示す図である。ペプチド1はHRRIKAWLKKIKALARQLGVAA[配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRIKALARQLGVAA[配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRR[配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA[配列番号169]である。すべてのペプチドに関してIC50濃度は15 μM以下であった。

【図2】4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したMDA231細胞を示す図である。ペプチド1はHRRIKAWLKKIKALARQLGVAA[配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRIKALARQLGVAA[配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRR[配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIK

50

AWLRRALNRQLGVAA[配列番号169]である。すべてのペプチドに関してIC50濃度は20 μM以下であった。

【図3】4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したSF539細胞を示す図である。ペプチド1はHRRIKAWLKKIKALARQLGVAA[配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRIKALARQLGVAA[配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRR[配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA[配列番号169]である。すべてのペプチドに関してIC50濃度は27 μM以下であった。

【図4】4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したHT29細胞を示す図である。ペプチド1はHRRIKAWLKKIKALARQLGVAA[配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRIKALARQLGVAA[配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRR[配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA[配列番号169]である。すべてのペプチドに関してIC50濃度は27 μM以下であった。

10

【図5】4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したPaca 2細胞を示す図である。ペプチド1はHRRIKAWLKKIKALARQLGVAA[配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRIKALARQLGVAA[配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRR[配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA[配列番号169]である。すべてのペプチドに関してIC50濃度は43 μM以下であった。

【図6】4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したPC3細胞を示す図である。ペプチド1はHRRIKAWLKKIKALARQLGVAA[配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRIKALARQLGVAA[配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRR[配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA[配列番号169]である。すべてのペプチドに関してIC50濃度は36 μM以下であった。

20

【図7】4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したA549細胞を示す図である。ペプチド1はHRRIKAWLKKIKALARQLGVAA[配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRIKALARQLGVAA[配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRR[配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA[配列番号169]である。すべてのペプチドに関してIC50濃度は35 μM以下であった。

【図8】癌細胞株においてKIPペプチドがアポトーシスを誘導することを示す図である。3 μM(上部パネル)または10 μM(下部パネル)のKIPペプチドHRRIKAWLKKIKALARQLGVAA[配列番号166]でMCF-7細胞を24時間処置した。Hoescht色素(パネルAおよびD;青)、アネキシンV抗体(パネルBおよびE;緑)ならびにヨウ化プロピジウム(パネルCおよびF;赤)で細胞を染色した。試験した両方の濃度に関してアネキシンV染色はヨウ化プロピジウム染色よりもより一層強く染色された。KIPペプチドは、癌細胞株においてアポトーシスを誘導することができることをこのことは示している。

30

【実施例】

【0179】

以下の実施例は、本発明の製造法および使用法の十分な開示および説明を当業者に提示するためのものであり、本発明者がその発明とみなす範囲を限定するものではなく、以下の実験がすべてであるか、ただその実験のみが行われたことを表すことを意味するものでもない。用いた数値(例えば、量、温度など)に関しては、正確さを確保するために努力がなされているが、いくぶんかの実験誤差および偏りを計上する必要がある。特記しない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度で表示され、圧力は大気圧またはその近傍である。

40

【実施例1】

【0180】

単独の、またはWLRRIKAWLRRIKA[配列番号134]導入ドメインに共有結合しているMAPKAPキナーゼII(MK2)のペプチド阻害薬の効果の比較

Omnia(登録商標)Lysate Assay for MAPKAP-K2キット(Invitrogen社、カリフォルニア州カールスバート)を用い、表2に列挙したペプチドのそれぞれの存在下および非存在下でMK2の反応速度を測定した。簡潔に言えば、12.5 μmol、25 μmol、50 μmolおよび100 μmolの

50

阻害ペプチド濃度を評価した。このキットは、登録商標をもつ反応緩衝液に以下を添加したものを含む(最終濃度を示す):1mM ATP、0.2mM DTT、10 μM MAPKAP-K2 Sox修飾ペプチド基質、MK2 5ngおよび対象とするペプチド阻害薬(最終容量50 μL)。キットに備わっている低タンパク結合性96ウェルプレートのウェル内で反応を行い、Molecular Devices社製M5分光光度計で、485nmで30秒毎に20分間、蛍光を測定した。配列KALNRQLGVAA[配列番号124]を有するペプチドを基準として用いたが、これはHayessおよびBenndorfの研究に基づいた既知の阻害薬だからである(Katrin Hayess and Rainer Benndorf, 1997, "Effect of protein kinase inhibitors on activity of mammalian small heat-shock protein (HSP 25) kinase", Biochemical Pharmacology, 53(9): 1239-1247。

【0181】

10

MK2阻害薬濃度100 μMでの反応速度を表3に示す。より低濃度およびより高濃度におけるペプチド間の相対反応速度は同様であった(データは示さず)。本発明記載のキナーゼ阻害ペプチドのいくつかは、MK2活性を阻害することができることをこの研究の結果は示している。この結果は、さらに、MK2阻害薬の機能に対して最も重要なアミノ酸に関する情報を提供している。MK2阻害ペプチドのWLRRIKAWLRRIKA[配列番号134]導入ドメインへの共有結合は、実質的にMK2阻害薬機能を増加させることに注意されたい。

【表2】

表2:MK2阻害薬の各アミノ酸の配列評価

	[配列番号:]
対照	
KALNRQLGVA*	[配列番号 114]
KKKALNRQLGVAA [#]	[配列番号 115]
(WLRRIKA) ₂ LNRQLGVAA	[配列番号 178]
アラニンスキャン	
KALNRQLGVAA	[配列番号 116]
KA <u>A</u> NRQLGVAA	[配列番号 117]
KAL <u>A</u> RQLGVAA	[配列番号 118]
KALNA <u>A</u> QLGVAA	[配列番号 119]
KALNR <u>A</u> LGVAA	[配列番号 120]
KALNRQ <u>A</u> GVAA	[配列番号 121]
KALNRQL <u>A</u> VAA	[配列番号 122]
KALNRQLG <u>A</u> AA	[配列番号 123]
D-アミノ酸スキャン	
K <u>d</u> ALNRQLGVAA	[配列番号 179]
K <u>A</u> dLNRQLGVAA	[配列番号 180]
KAL <u>d</u> NRQLGVAA	[配列番号 181]
KALNR <u>d</u> RQLGVAA	[配列番号 182]
KALNR <u>d</u> QLGVAA	[配列番号 183]
KALNRQ <u>d</u> LGdVAA	[配列番号 184]
KALNRQLG <u>d</u> VAA	[配列番号 185]

20

30

40

*=最後のAの必要性を決定するための対照;#=最初のK(複数)の重要性を決定するための対照

【表 3】

表 3. MK2 阻害薬バリエーションに関する反応速度 (n=3)

MK2 阻害薬バリエーションのペプチド配列	阻害薬濃度 100 μ M での KALNRQLGVAA [配列番号 124] の反応速度の% (\pm ペプチド配列 SEM*)
WLKKIKAWLKKIKALNRQLGVAA [配列番号 159]	-32% (\pm 6%)
KALNRQLGVAA [配列番号 124]	100% (\pm 3%)
KALNRQLGVA [配列番号 125]	100% (\pm 3%)
KAANRQLGVAA [配列番号 126]	152% (\pm 3%)
KALARQLGVAA [配列番号 127]	39% (\pm 1%)
KALNAQLGVAA [配列番号 128]	358% (\pm 8%)
KALNRALGVAA [配列番号 129]	358% (\pm 15%)
KALNRQAGVAA [配列番号 130]	118% (\pm 4%)
KALNRQLAVAA [配列番号 131]	72% (\pm 3%)
KALNRQLGAAA [配列番号 132]	373% (\pm 13%)
KAdLNRQLGVAA [配列番号:	146% (\pm 4%)
KALdNRQLGVAA	95% (\pm 6%)
KALNdRQLGVAA	306% (\pm 4%)
KALNRdQLGVAA	276% (\pm 3%)
KALNRQdLGVAA	357% (\pm 10%)
KALNRQLGdVAA	260% (\pm 14%)
KKKALNRQLGVAA [配列番号 133]	91% (\pm 4%)
*SEM - 3 つの数値の標本平均の標準誤差	

【実施例 2】

【0182】

導入ドメインの反応速度

WLRR1KAWLRR1KA [配列番号 134] 導入ドメインの MK2 阻害活性と、他の既知の導入ドメイン、YARAAARQARA [配列番号 135] および YGRKKKRRQRRR [配列番号 136] の MK2 阻害活性とを比較した。実施例 1 と同じアッセイ条件を用いて、導入ドメインの MK2 活性を試験した。その結果を表 4 に示す。

10

20

30

40

【表 4】

表 4. 異なる導入ドメインの反応速度 (n=3)

ペプチド配列	[配列番号]	阻害薬濃度 100 μ M での KKKALNRQLGVAA [配列番号 115] の反応速度の% (+/-SEM*)
WLRIKA	137	394% (+/-5%)
WLRIKAWLRIKA	134	19% (+/-2%)
YARAAARQARA	135	274% (+/-9%)
YGRKKRRQRRR	136	158% (+/-11%)

*SEM = 3 つの数値の標本平均の標準誤差

【 0 1 8 3 】

これらの結果は、MK2の阻害へのいくつかの導入ドメインの影響において実質的な差異が存在することおよび導入ドメインがMK2などのキナーゼの活性を阻害するのに有用であることを示している。WLRIKA[配列番号137]モノマーは、阻害薬対照なしと同じ阻害レベルを示した(データは示さず);しかしながら、WLRIKAWLRIKA[配列番号134]導入ドメイン二量体は、KKKALNRQLGVAA[配列番号115]をかなり超えてMK2を阻害した。YARAAARQARA[配列番号135]およびYGRKKRRQRRR[配列番号136]もまたMK2を阻害するが、WLRIKAWLRIKA[配列番号134]には遠くおよびない。

【実施例 3】

【 0 1 8 4 】

導入ドメインを有するMK2阻害ペプチド

導入ドメインを有する1組のMK2阻害ペプチドを合成した(表5参照)。バリエーションは、WLRIKAWLRIKA[配列番号134]導入ドメインを有し、治療ドメインにおいてアラニンをアスパラギンに置換するか、アラニンをグリシンに置換するか、あるいは両方のアラニン置換したペプチドを含む。YARAAARQARA[配列番号135]導入ドメインを有する同様のペプチドもまた製造した。これらのバリエーションの反応速度と、阻害薬を添加しないブランクの反応速度とを比較した。表6に結果を示す。表6のデータは、MK2の阻害における導入ドメインと治療ドメインとの相乗効果を示している。WLRIKAWLRIKA[配列番号134]導入ドメインはYARAAARQARA[配列番号135]導入ドメインよりはるかに強力なMK2の阻害薬であるため、WLRIKAWLRIKA[配列番号134]導入ドメインを有するペプチドは、所定の濃度において、YARAAARQARA[配列番号135]導入ドメインを有するペプチドよりもはるかに強力なMK2の阻害薬である。

【表 5】

表 5:2 つの異なる導入ドメインを有する提案された最適化治療ドメイン

WLRIKAWLRIKA[配列番号 134] 導入ドメインを有するペプチド	配列番号	YARAAARQARA[配列番号 135] 導入ドメインを有するペプチド	配列番号
WLRIKAWLRIKALARQLAVA	138	YARAAARQARAKALARQLAVA	143
WLRIKAWLRIKALARQLGVA	139	YARAAARQARAKALARQLGVA	144
WLRIKAWLRIKALARQLAVA	140	YARAAARQARAKALNRQLAVA	145
WLRIKAWLRIKALNRQLGVA	141	YARAAARQARAKALNRQLGVA	146
WLRIKAWLRIKALNRQLGVAA	142	YARAAARQARAKALNRQLGVAA	147

【表6】

表6:選択された最適化ペプチドの反応速度(n=3)

ペプチド配列	配列番号	ペプチド配列の阻害薬濃度 6.25pNでのブランク反応速度 の%(+/-SEM*)
WLRIKAWLRIKALARQLAVA	138	3.3% (+/-0.4%)
WLRIKAWLRIKALARQLGVA	139	3.9% (+/-0.8%)
WLRIKAWLRIKALNRQLAVA	140	-2.1% (+/-0.5%)
WLRIKAWLRIKKKALARQLAVA	148	1.0% (+/-0.4%)
YARAAARQARAKALARQLGVA	143	28.9% (+/-0.8%)
YARAAARQARAKKALARQLAVA	112	22.4% (+/-0.5%)
阻害薬無添加	-	100% (+/-2%)

*SEM = 3つの数値の標本平均の標準誤差

【実施例4】

【0185】

kinase profilerアッセイ

種々の異なるキナーゼをプロファイリングするために、KIPペプチドWLRIKAWLRIKALNRQLGVAA[配列番号142]、KAFKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173]およびFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163]を用いた。キナーゼのプロファイリングを行うために、Millipore Corporation社(マサチューセッツ州ビルリカ)の子会社であるUpstate社により提供されているkinase profilerアッセイサービスを用いた。kinase profilerアッセイは放射分析であり、所定の時点および温度で、既知の濃度のキナーゼ酵素、阻害薬、ATPおよび緩衝液を用いて、ATP($-^{33}\text{P-ATP}$)から基質ペプチドへの放射能移行量を測定することに基づく。各キナーゼの反応条件の詳細は、<http://www.millipore.com/drugdiscovery/dd3/KinaseProfiler> から得ることができる。例えば、ROCK-1(h)の阻害は、20mM MOPS、1mM EDTA、0.01%Brij-35、5%グリセロール、0.1% β -メルカプトエタノール、1mg/mL BSAを含有する緩衝液を用いて行った。8mM MOPS(pH7.0)、0.2mM EDTA、30 μM ペプチドKEAKEKRQEIQAKRRRLS SLRASTKSGGSQK、10mM酢酸マグネシウムおよび $-^{33}\text{P-ATP}$ (比活性およそ500cpm/pmol、濃度は必要に応じて)を最終反応容量25 μl にしてROCK-1(h)(5~10mU)と共にインキュベートした。阻害化合物の非存在下および存在下で、MgATP混合物の添加により反応を開始させた。室温で40分間インキュベーション後、3%リン酸溶液5 μl を添加することにより反応を停止させた。次いで、P30 filtermat上に反応混合物10 μl をスポットした。75mMリン酸で3回5分間洗浄し、メタノールで1回洗浄し、乾燥しシンチレーション計数により計数した。キナーゼが阻害されていない場合、キナーゼは、正に荷電した基質を放射性ATPでリン酸化し、次いでそれが負電荷を持つフィルター膜に結合する。シンチレーションカウント(放射能)は、キナーゼ活性に直接相関する。個別の各キナーゼの K_m の15 μM 以内のATP濃度でアッセイを行った。100未満のプロファイリングデータは、すべてキナーゼ阻害を示し、100を超えるデータはキナーゼ刺激を示す。

【0186】

kinase profilerアッセイの結果を、WLRIKAWLRIKALNRQLGVAA[配列番号142]については表7に、KAFKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173]については表8に、FAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163]については表9に示す。これらの結果は、キナーゼ機能を調節するのにKIPペプチドが有用であることを示している。より具体的には、これらのデータは、WLRIKAWLRIKALNRQLGVAA[配列番号142]、KAFKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号173]およびFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号163]ペプチドがいくつかのキナーゼを阻害することを示してお

10

20

30

40

50

り、その多くは過形成および癌のメディエーターであることが知られている。

【表 7】

表 7. 試験ペプチド WLRRKAWLRRRIKALNRQLGVAA[配列番号 142]を用いた kinase profiler

アッセイ結果

キナーゼ	プロフィール 1 @=30 μm	キナーゼ	プロフィール 1 @=30 μm	キナーゼ	プロフィール 1 @=30 μm
Abl(h)	24	GSK3β (h)	129	PKB β (h)	18
AMPK (r)	36	IGF-IR(h)	227	PKC β1 (h)	8
オーロラ A(h)	46	IRAK4 (h)	12	PKCδ (h)	11
BTK(h)	5	JAK3 (h)	85	PKG1α(h)	16
CaMKI (h)	9	KDR(t1)	27	PKG1β (h)	15
CDKI/サイクリン B(h)	17	Lck (h)	130	Ret (h)	117
CHK1(h)	31	LIMK1 (h)	89	ROCK-1(h)	0
CK1B (h)	52	MAPK1 (h)	121	Rsk2 (h)	14
CK2 (h)	114	MEK1 (h)	14	SAPK2 a (h)	61
cKit(h)	23	Met (h)	30	Src(1-530)(h)	6
DYRK2 (h)	93	MLCK(h)	4	Syk(h)	19
EGFR(h)	10	PDGFRβ(h)	42	Tie2 (h)	17
EphA2 (h)	38	Phkγ2 (h)	15	TrkA(h)	6
FGFR1(h)	27	Pim-1 (h)	5		
Flt3 (h)	38	PKA(h)	80		

10

20

30

【表 8】

表 8. 試験ペプチド KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA[配列番号 173]を用いた kinase profiler

アッセイ結果

キナーゼ	プロフィール 1 @=100 µm	キナーゼ	プロフィール 1 @=100 µm	キナーゼ	プロフィール 1 @=100 µm
Abl(h)	55	IRAK4 (h)	16	Pim-1 (h)	1
AMPK (r)	118	JAK3 (h)	91	PKA(h)	103
ASK1(h)	48	JNK1α1(h)	92	PKB β (h)	28
オーロラ A (h)	60	KDR(t1)	56	PKC β 1 (h)	23
BTK(h)	16	Lck (h)	847	PKCδ (h)	24
CaMKI (h)	0	LIMK1 (h)	93	PKG1α(h)	25
CDKI/サイクリン B(h)	55	MAPK1 (h)	108	PKG1β (h)	24
CHK1(h)	68	MAPKAP- K2(h)	8	PRAK	148
CKIB (h)	97	MAPKAP- K3(h)	17	Ret (h)	117
CK2 (h)	79	MEKI (h)	66	ROCK-1(h)	29
cKit(h)	31	Met (h)	22	Rsk2 (h)	6
DYRK2 (h)	-10	MKK4(m)	114	SAPK2 a (h)	59
EGFR(h)	16	MKK6(h)	48	Src(1- 530)(h)	3
EphA2 (h)	22	MLCK(h)	2	Syk(h)	4
FGFR1(h)	35	MSK1(h)	13	Tie2 (h)	8
Flt3 (h)	20	MSK2(h)	30	TrkA(h)	16
GSK3β (h)	184	PDGFRβ(h)	66		
IGF-IR(h)	76	PhKy2 (h)	27		

10

20

30

40

【表 9】

表 9. 試験ペプチド FAKLAARLYRKALARQLGVAA [配列番号 163] を用いた kinase profiler

アッセイ結果

キナーゼ	プロフィール 1 @=100 μ m	キナーゼ	プロフィール 1 @=100 μ m	キナーゼ	プロフィール 1 @=100 μ m
Abl(h)	41	IRAK4 (h)	13	Pim-1 (h)	1
AMPK (r)	101	JAK3 (h)	102	PKA(h)	76
ASK1(h)	53	JNK1 α 1(h)	91	PKB β (h)	16
オーロラ A(h)	65	KDR(t1)	78	PKC β 1 (h)	73
BTK(h)	19	Lck (h)	493	PKC δ (h)	40
CaMKI (h)	0	L1MK1 (h)	92	PKG1 α (h)	12
CDKI/サイクリン B(h)	36	MAPK1 (h)	104	PKG1 β (h)	15
CHK1(h)	54	MAPKAP- K2(h)	5	PRAK	131
CKIB (h)	99	MAPKAP- K3(h)	10	Ret (h)	89
CK2 (h)	80	MEK1 (h)	68	ROCK-1(h)	25
cKit(h)	42	Met (h)	17	Rsk2 (h)	-1
DYRK2 (h)	-11	MKK4(m)	90	SAPK2 a (h)	30
EGFR(h)	18	MKK6(h)	42	Src(1- 530)(h)	5
EphA2 (h)	32	MLCK(h)	1	Syk(h)	38
FGFR1(h)	22	MSK1(h)	11	Tie2 (h)	0
Flt3 (h)	14	MSK2(h)	24	TrkA(h)	17
GSK3 β (h)	188	PDGFR β (h)	92		
IGF-1R(h)	69	PhK γ 2 (h)	20		

【実施例 5】

【0187】

複数の癌細胞株に対するKIPペプチドの毒性試験

7つの癌細胞株に対する4つのKIPペプチドの6つの濃度の効果を評価した。これらの実験に用いたKIPペプチドを表10に示す。

【表10】

表10:癌細胞株に対して試験したKIPペプチド

ペプチド番号	ペプチドの一次構造	配列番号
1	HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA	166
2	WLRIKAHRRIKALARQLGVAA	167
3	WLRIKAWLRR	168
4	WLRIKAWLRRALNRQLGVAA	169

10

【0188】

7つの細胞株は、エストロゲン依存性MCF-7乳癌細胞、エストロゲン非依存性MDA231乳癌細胞、SF539中枢神経系癌細胞、HT29結腸癌細胞、Paca 2膵臓癌細胞、PC3前立腺癌細胞およびA549肺癌細胞であった。各細胞株について、対数的に増殖している細胞をトリプシン処理し、96ウェルプレートの各ウェルに播種した。加湿型5%CO₂インキュベーター中に37℃で24時間細胞を維持した。翌日、ペプチド原液1μlに加えて新鮮培地を加え、最終ペプチド濃度0.3μM、1μM、3μM、10μM、30μMおよび100μMにした(n=4)。陽性対照としてドキシソルピシンを試験した。細胞を72時間インキュベートした後、各ウェルに0.5%MTT{3-(4,5-ジメチルジアゾール-2-イル)-2,5ジフェニルテトラゾリウムブロミド}溶液20μlを加えた。次いでプレートをさらに4時間インキュベートし、その時点で、マイクロプレートリーダーを用いて、各ウェルについて570nmの吸光度を測定した。ペプチド濃度の関数として吸光度をプロットし、各細胞株について各ペプチドに関するIC50値を算出した。この実験より得た結果を図1~7に示す。算出されたIC50値を表11に示す。全細胞株に関して、4つのペプチドのそれぞれのIC50値は50μM以下であった。KIPペプチドは、いくつかの異なる癌細胞株に対して用量依存的に増殖を抑制する/細胞毒性を示すことをこれらの結果は示している。

20

【表11】

表11:癌細胞株に対して試験したKIPペプチドのIC50

ペプチド	細胞株のIC50(μM)						
	MCF-7	MDA 231	SF 539	HT29	Paca 2	A549	PC3
ペプチド1	1.6	9.3	4.3	6.7	9.0	8.7	6.0
ペプチド2	7.8	19.9	26.0	26.4	19.5	31.9	28.9
ペプチド3	13.5	17.4	22.0	20.7	42.5	34.3	35.5
ペプチド4	4.4	12.0	10.0	11.8	11.2	12.5	23.7

30

【実施例6】

【0189】

KIPペプチドを用いたMCF-7乳癌細胞におけるアポトーシスの評価

96ウェルプレートの各ウェルにMCF-7乳癌細胞を播種し、加湿型5%CO₂インキュベーター中37℃で24時間維持した。翌日、KIPペプチドHRRIKAWLKKIKALARQLGVAA[配列番号166]の原液1μlに加えて新鮮培地を加え、最終濃度を3μMまたは10μMにした(n=4)。細胞を24時間インキュベートした後、細胞を、核染色のためにHoescht色素で処理し、壊死性細胞からのDNAを染色するためにヨウ化プロピジウムで処理し、アポトーシス細胞を可視化するためにアネキシンVで処理した。

【0190】

図8に見られるように、KIPペプチドの両方の濃度に関して、MCF-7乳癌細胞は、ヨウ化プロピジウム染色と比較して高度のアネキシンV染色を示している。これらの結果は、KIP

40

50

ペプチドが癌細胞株においてアポトーシスを誘導することができることを示している。

【0191】

本発明を、その特定の実施形態を参照して説明してきたが、本発明の真の精神と範囲から逸脱することなく種々の変更を加えることができ、均等物を置換することができることは当業者には明らかであろう。加えて、本発明の目的とする精神と範囲に適合させるために、特定の状況、物質、組成物、プロセス、処理段階または段階に多くの変更が可能である。これらすべての変更は、添付の特許請求の範囲内であるものとする。

【図1】

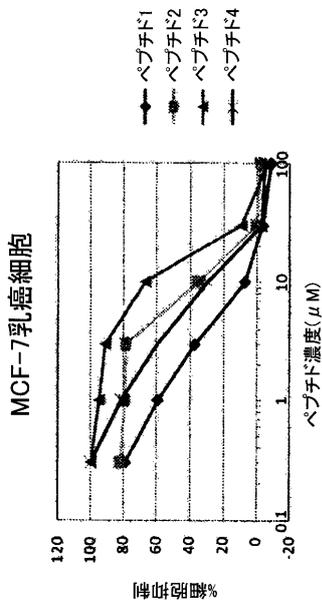


Figure 1. 4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したMCF-7細胞。ペプチド1はHRRRIKAWLKKIKALARQLGVAA [配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRRIKALARQLGVAA [配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRR [配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA [配列番号169]である。

【図2】

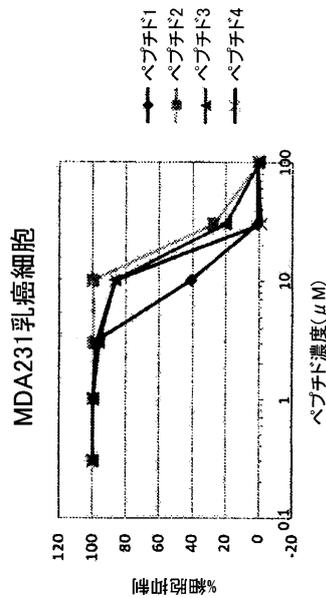


Figure 2. 4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したMDA231細胞。ペプチド1はHRRRIKAWLKKIKALARQLGVAA [配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRRIKALARQLGVAA [配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRR [配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA [配列番号169]である。

【 図 3 】

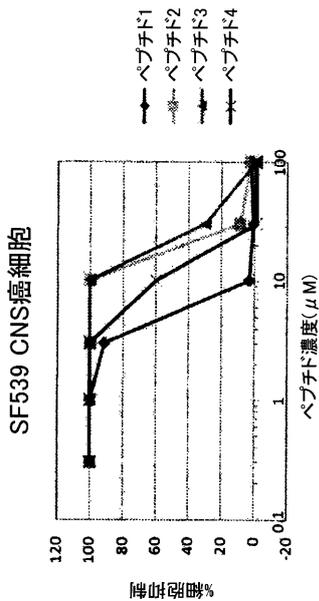


Figure 3.

4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したSF539細胞。ペプチド1はHRRRIKAWLKKIKALARQLGVAA [配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRRIKALARQLGVAA [配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRRRI [配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA [配列番号169]である。

【 図 4 】

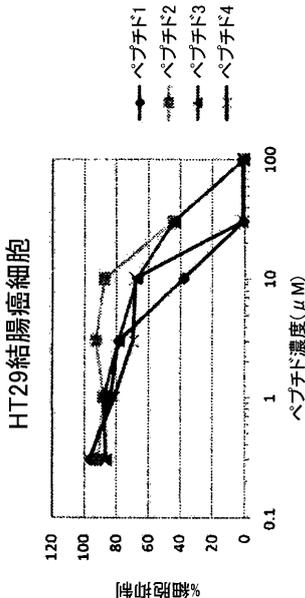


Figure 4.

4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したHT29細胞。ペプチド1はHRRRIKAWLKKIKALARQLGVAA [配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRRIKALARQLGVAA [配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRRRI [配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA [配列番号169]である。

【 図 5 】

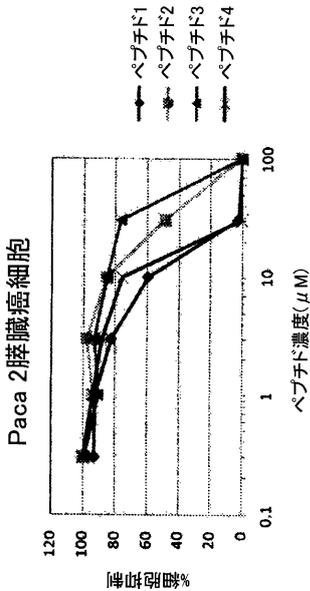


Figure 5.

4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したPaca 2細胞。ペプチド1はHRRRIKAWLKKIKALARQLGVAA [配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRRIKALARQLGVAA [配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRRRI [配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA [配列番号169]である。

【 図 6 】

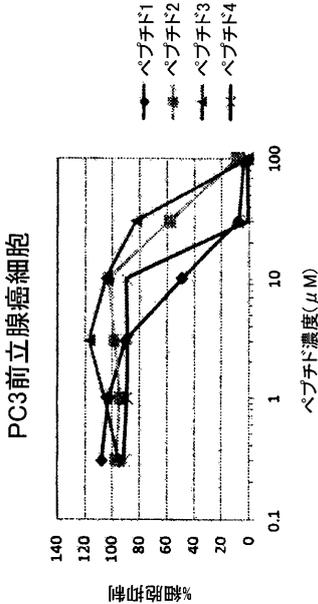


Figure 6.

4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したPC3細胞。ペプチド1はHRRRIKAWLKKIKALARQLGVAA [配列番号166]であり、ペプチド2はWLRRIKAHRRRIKALARQLGVAA [配列番号167]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRRRI [配列番号168]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA [配列番号169]である。

【 図 7 】

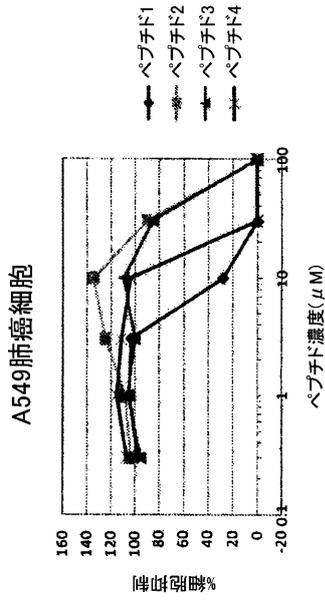


Figure 7.

4つのKIPペプチドの異なる用量で処置したA549細胞。ペプチド1はHRRIKAWLKKIKALARQLGVAA [配列番号167]であり、ペプチド2はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA [配列番号168]であり、ペプチド3はWLRRIKAWLRR [配列番号169]であり、ペプチド4はWLRRIKAWLRRALNRQLGVAA [配列番号166]である。

【 図 8 】

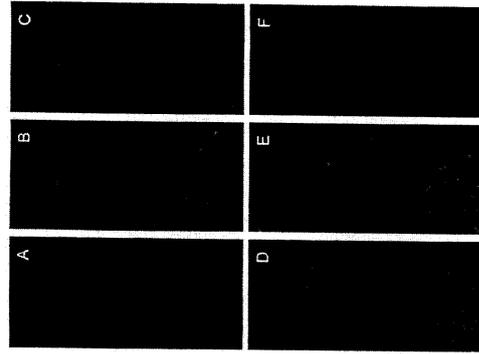


Figure 8. 3 μM(上部パネル)または10 μM(下部パネル)のKIPペプチドで処置したMCF-7細胞。パネルAおよびDはHoescht染色(核)を示す。パネルBおよびEはAlexa568染色を示す。パネルCおよびFはヨウ化プロピジウム染色を示す。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
		A 6 1 P	43/00	1 0 5

(72)発明者 シール ブランドン
 アメリカ合衆国 インディアナ州 47906 ウェスト ラファイエット リッチフィールド
 プレイス 3722

(72)発明者 ウォード,ブライアン シー.
 アメリカ合衆国 インディアナ州 46112-9266 ブラウンズバーグ ノース カントリ
 - ロード 925 イースト 8845

審査官 櫛引 明佳

(56)参考文献 国際公開第2006/053315(WO, A1)
 国際公開第2007/053512(WO, A1)
 特表2002-505077(JP, A)
 Biochemical Pharmacology, 1997年, Vol.53, p.1239-1247

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00
 C07K
 MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
 Caplus/REGISTRY(STN)
 UniProt/GeneSeq