

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6576355号
(P6576355)

(45) 発行日 令和1年9月18日(2019.9.18)

(24) 登録日 令和1年8月30日(2019.8.30)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z N A Z
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 20 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-549646 (P2016-549646)	(73) 特許権者	516123789
(86) (22) 出願日	平成26年10月9日(2014.10.9)		キュービッド ペプチド カンパニー リ
(65) 公表番号	特表2016-535600 (P2016-535600A)		ミテッド
(43) 公表日	平成28年11月17日(2016.11.17)		イギリス国, カーディフ シーエフ14
(86) 国際出願番号	PCT/GB2014/053037		4 ユージェイ, ヒース パーク, ラボ 2
(87) 国際公開番号	W02015/063452		7, カーディフ メディセンター
(87) 国際公開日	平成27年5月7日(2015.5.7)	(74) 代理人	100149294
審査請求日	平成29年9月29日(2017.9.29)		弁理士 内田 直人
(31) 優先権主張番号	1318954.3	(72) 発明者	ライヴズ, ウィリアム ジョナサン
(32) 優先日	平成25年10月28日(2013.10.28)		イギリス国, サレー ケーティー2 7 ビ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		ーエス, キングストン, ギャルスウォーシ
			ー ロード 48
前置審査		審査官	坂崎 恵美子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞輸送

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

選択された分子又は薬剤を細胞膜を越えて輸送するための細胞浸透性ペプチド(CPP)であって、

アミノ酸配列: R R V Q I W F Q N K R A K V K R からなる、細胞浸透性ペプチド。

【請求項 2】

前記膜が天然に生じるか又は合成されている、請求項 1 に記載の CPP。

【請求項 3】

前記膜が生体膜である、請求項 1 又は 2 に記載の CPP。

【請求項 4】

前記 CPP が、前記膜を越えて選択された分子又は薬剤を輸送することを目的として、選択された分子又は薬剤の少なくとも一つと接合ないしコンジュゲートしている、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の CPP。

【請求項 5】

前記 CPP が、前記分子又は薬剤と共有結合的に又は非共有結合的に接合ないし結合している、請求項 4 に記載の CPP。

【請求項 6】

前記選択された分子又は薬剤が、小分子、ペプチドを含むタンパク質および超分子粒子、タンパク質、プラスミド DNA、siRNA またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む核酸配列、化学物質、治療薬、抗体、有機染料、蛍光標識、量子ドット又はナノ粒子を

含む群から選択される、請求項 4 又は 5 に記載の C P P。

【請求項 7】

前記 C P P が、インビボ又はインビトロの組換えによって前記選択された分子又は薬剤に接着している、請求項 4 又は 5 に記載の C P P。

【請求項 8】

前記 C P P が、インビトロの組換えによって前記選択された分子又は薬剤に接着している、請求項 7 に記載の C P P。

【請求項 9】

前記 C P P が、そのアミノ末端又はカルボキシ末端で前記選択された分子又は薬剤にコンジュゲートしている、請求項 4 から 8 のいずれか一項に記載の C P P。

10

【請求項 10】

前記 C P P が、少なくとも一つのさらなるスペーサーアミノ酸残基の存在により、前記選択された分子又は薬剤から遠位に位置する、請求項 4 から 8 のいずれか一項に記載の C P P。

【請求項 11】

前記 C P P が、前記選択された分子又は薬剤から、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 アミノ酸残基遠位に位置する、請求項 10 に記載の C P P。

【請求項 12】

選択された治療的薬剤に接合又はコンジュゲートした請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の C P P の少なくとも一つを含んでなる、治療薬。

20

【請求項 13】

前記治療的薬剤が、小分子化学的阻害因子又は活性因子、タンパク質、ペプチドを含む超分子粒子、プラスミド DNA、siRNA またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む核酸配列、化学物質、治療的薬剤又は抗体を含む群から選択される、請求項 12 に記載の治療薬。

【請求項 14】

請求項 12 又は 13 に記載の治療薬の少なくとも一つと、少なくとも一つの他の治療的薬剤とを含む、併用治療薬。

【請求項 15】

30

請求項 12 又は 13 に記載の治療薬又は請求項 14 に記載の併用治療薬を、薬学的に許容可能な担体とともに含む、薬学的組成物。

【請求項 16】

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の C P P をコードする核酸分子。

【請求項 17】

請求項 12 又は 13 に記載の治療薬をコードする核酸分子。

【請求項 18】

請求項 16 又は 17 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 19】

請求項 18 に記載のベクターを形質移入又は形質導入した宿主細胞。

40

【請求項 20】

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の C P P、又は請求項 12 又は 13 に記載の治療薬の製造方法であって、前記 C P P 又は前記治療薬をコードする核酸分子を形質移入した宿主細胞を、前記 C P P および / 又は前記治療薬の転写および翻訳が起こる条件下で培養することと、それらを回収することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞膜、特に、限定するものではないが、生体膜を越えて分子を輸送するための新規のポリペプチド、前記ポリペプチドの少なくとも一つと前記ポリペプチドに接合

50

ないしコンジュゲートした選択された分子ないし薬剤の少なくとも一つとを含む、細胞膜を越えて前記分子ないし薬剤を輸送するためのコンジュゲート、前記ポリペプチドの少なくとも一つの使用を伴う、細胞膜を越えて少なくとも一つの選択された分子ないし薬剤を輸送する方法、前記コンジュゲートの少なくとも一つを含む治療薬、前記コンジュゲートの少なくとも一つとその他の治療薬の少なくとも一つとを含む併用治療薬、前記コンジュゲート又は前記治療薬の少なくとも一つの使用を伴う治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞膜ないしは原形質膜は生細胞の細胞質を取り囲み、特に細胞内成分を細胞外環境から分離している。細胞膜はイオンおよび有機分子を選択的に通し、細胞の内外への物質の移動を制御している。この膜は、細胞を周囲環境から分離する働きがあり、これによって化学的および物理的環境の変化から保護し、かつ細胞内外への分子の移入/移出の制御を可能としている。主に、リン脂質分子の二層（二重層）からなり、脂質二層を直接通り抜けて、膜の片側から他方側に行くことができるのはわずかな分子のみである。この膜には、必要な分子を細胞の内外へ輸送するためのチャネルおよびポンプとして働くさまざまなタンパク質分子が埋没している。したがって、細胞は選択的透過性があり、細胞に入り細胞から出て行くものを調節することが可能であるので、生存に必要な物質の輸送を促すといわれている。

10

【0003】

生物学的に生きている間、これらの膜は多くの治療薬の輸送を困難にすることがある。この治療薬の有効性はその分子が体内の水性環境をめぐりその後細胞膜の疎水性のバリアを通り抜けることができる能力に依存している。

20

【0004】

細胞透過ないしは細胞浸透性のペプチド（CPP）（タンパク質導入ドメイン又は膜転位配列としても知られている）は、原形質膜の不透過性を克服するために用いられている。典型的には、30アミノ酸残基以下の長さであるCPPは、細胞の膜を超え、細胞内部へ通過することができるので、分子（一般的には「カーゴ」と称される）を内在化する生システムでは採用されている。現在のところ何百もの異なるCPP配列が明らかにされており、単独であろうとカーゴと会合していようとすべてが生物学的な膜を破り、細胞へ入る共通の能力を有する。CPPの機能は典型的には細胞内へカーゴを運ぶことであり、生きている哺乳動物細胞のエンドソームを介して運ばれるカーゴのエンドサイトーシスにより共通して生じるプロセスである。よって、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸および他の薬学的に活性な化合物へのCPPのカップリングは、他の膜不透過性分子の細胞輸送にとって期待できる戦略となる。

30

【0005】

CPPの共通の用途には、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、DNAおよびプラスミドなどの核酸ベースの高分子の輸送が含まれる。これらすべては、遺伝子発現の調節において期待できる生物学的および薬理学的治療薬として認識されている。近年、さまざまな方法を用いて、CPPをビヒクルとして用いて生物学的に活性な全長タンパク質、例えば西洋わさびペルオキシダーゼ、RNアーゼAおよびCPP架橋結合Fab断片さえも生細胞へ輸送できることが報告された。

40

【0006】

大まかに言えば、CPPは一般に3つのグループに分類されるが、すべて原形質膜の位置を変え、細胞質への又は細胞小器官へのさまざまな分子カーゴの輸送を促すという能力を共通して持つ。

1. 高密度の塩基性（+）荷電のアミノ酸の短い配列、一般に一連のリジン又はアルギニン残基。例として、オクタアルギニン。
2. ウイルスペプチド、そのうち最も研究されているHIV由来のトランス作動性転写活性化因子（TAT）配列。又は、
3. アンテナペディアペプチドおよびその誘導体。1990年代に発見された、ショウジ

50

ヨウバエの発生に伴うアンテナペディアタンパク質内の重要な転写因子。

【 0 0 0 7 】

さらに又はあるいは、C P Pは、そのペプチド配列および脂質への結合性質に基づいて、一次両親媒性C P P、二次両親媒性C P Pおよび非両親媒性C P Pに分類されうる。

【 0 0 0 8 】

機構的に、C P Pの膜の位置を変える能力は現在研究されている。作用のメカニズムはC P Pごとに異なり得、いくつかのC P Pは1より多くのメカニズムを用いていると考えられている。一般に、C P Pは、1) 膜の直接的な浸透、2) エンドサイトーシスを介した移入、又は3) 一時的な構造の形成による転座により移入すると考えられている。

【 0 0 0 9 】

直接的な浸透は、近年、脂質二層の両側上の細胞浸透性ペプチドとリン酸塩基との間の強い相互作用、一時的な間隙の形成を核とする荷電した側鎖の挿入、その後の間隙表面上に拡散することによる細胞浸透性ペプチドの転座を伴うことが提唱されている。

【 0 0 1 0 】

エンドサイトーシスは、原形質膜が内側に向かって折りたたまれ、細胞内に物質を運ぶことによる細胞摂取のプロセスであるが、大部分はエネルギー依存性であると考えられている。

【 0 0 1 1 】

これとは対照的に、C P Pの第三クラスは、古典的なエンドサイトーシスとは無関係のメカニズムを介して細胞によって内在化される性質を持っている。このメカニズムの物理的性質はあまり理解されていないが、他のクラスとは異なり、クラス3のペプチドは、膜を横断することができるが、生体表面の受容体や細胞由来のA T Pのエネルギーを必要としない。

【 0 0 1 2 】

アンテナペディアペプチド配列 (p A n t) に加え、このクラス3の例には、最も一般的に用いられているC P Pの一つであり、アンテナペディアホメオプロテインのD N A 結合ドメイン由来の16アミノ酸ペプチドである、合成由来のペネトラチン^{T M}がある。

【 0 0 1 3 】

クラス3のアンテナペディアペプチド配列 (p A n t) は、生き物のゲノムの中でヒト、マウス、ハエおよび単純なミミズと同じくらい多様であることがわかっているが、真核生物のタマホコリカビ属のアメーバのゲノム内にはアンテナペディア配列はない。

【 0 0 1 4 】

発明者らは、本明細書において、社会性アメーバであるキイロタマホコリカビ (Dictyostelium discoideum) のゲノムから、その起源に関連してC U P I D AおよびC U P I D B (Cellular Permeating peptides In Dictyostelium) と称する2つの新規なクラス3 C P Pの同定を開示する。組換え法を用いて、より大きなポリペプチドまたはタンパク質配列にこれらの配列を組み込むことにより、そのポリペプチドまたはタンパク質の機能を保持しながら、細胞を透過することができる製品を提供する。有利なことに、これらのC U P I D ペプチドは、一般的に用いられるペネトラチン^{T M}などの他の試験C P Pと比較して、細胞内へのカーゴの輸送に優れていることが示された。したがって、C U P I D ペプチドは他の細胞不浸透性分子の細胞内送達のための改良された輸送性能を提供する。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 5 】

本発明の第一の態様によると、

i) RRVQIWFQNKRAKVKR、

ii) RSVQIWFQNRRAKAR、又は

iii) i) 又はii) のペプチドに少なくとも75%相同な配列

を含む群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを含む、選択された分子ないしは薬剤を細胞膜を越えて輸送するための細胞浸透性ペプチド (C P P) が提供される。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 6 】

本明細書においてC P Pへの言及は、短いペプチド、典型的には30未満のアミノ酸であり、少なくとも一つの選択された分子と結合した場合に原形質膜の位置を変え、それによって前記分子の細胞ないしは細胞小器官内への輸送を促す能力を有するペプチドを指す。

【 0 0 1 7 】

本明細書において細胞性の膜ないしは細胞膜の言及には、生体膜又は、真核性起源又は原核性起源の生体膜（原形質膜およびすべての細胞内の膜）と同じないしは類似する性質に基づくか、その性質を有する人工ないしは合成の膜への言及が包含される。

【 0 0 1 8 】

本発明の好適な実施形態では、前記細胞性の膜は生体膜である。

【 0 0 1 9 】

本明細書において生体膜への言及は、人工ないしは合成の膜とは対照的に、天然に生じらないしは生きている膜に関する。

【 0 0 2 0 】

当業者には明らかであろうが、本明細書において選択された分子ないしは薬剤への言及は、細胞又は細胞小器官へ輸送することを目的としてC P Pに結合ないしはコンジュゲートされうる任意のカーゴを指し、例として、限定するものではないが、小分子、ペプチドを含むタンパク質および超分子粒子、タンパク質、プラスミドDNA、siRNAおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む核酸配列、化学物質、治療薬、抗体、有機染料、蛍光標識、または量子ドットやナノ粒子などの造影剤を指す。

【 0 0 2 1 】

当業者には明らかであろうが、前記生体膜は細胞を囲む膜であってよい。これには、限定するものではないが、単純な原形質膜などの膜や、より特殊化した膜構造、例えば、心尖部、基底外側、シナプス前およびシナプス後の膜、鞭毛、繊毛、微絨毛、糸状仮足および葉状仮足の膜、筋肉細胞の筋細胞膜、ならびにニューロンの特化ミエリンおよび樹状突起棘の膜が包含されうる。これには、細胞小器官、限定するものではないが例として、エンドソーム；滑面小胞体および粗面小胞体；筋小胞体；ゴルジ体；リソソーム；ミトコンドリア（内側と外側の膜）；核（内側と外側の膜）；ペルオキシソーム；液胞；細胞質顆粒；細胞小胞（ファゴソーム、オートファゴソーム、クラスリン被覆小胞、C O P I被覆小胞およびC O P I I被覆小胞）および分泌小胞が包含されうる。

【 0 0 2 2 】

さらに、前記生体膜には真核性起源又は原核性起源の任意の膜への言及が包含される。

【 0 0 2 3 】

本発明のC P Pの相同物又は誘導体も本発明の文脈で用いられうることは当業者に明らかであろう。ゆえに、例えば、一又は複数の付加、欠損、置換などを含むC P Pは本発明に包含される。さらに、一つのアミノ酸を他の類似の「タイプ」のものに置き換えることも可能である。例えば、一つの疎水性のアミノ酸を他のものに置き換えることは、アミノ酸配列を比較するためのC L U S T A Lプログラムなどのプログラムを用いてよい。このプログラムは、アミノ酸配列を比較し、適切に配列内にスペースを挿入することにより適切なアライメントを見つける。ある適切なアライメントについてアミノ酸の同一性又は類似性（アミノ酸型の同一性と保存）を算出することができる。B L A S T xのようなプログラムは、最も長い範囲の類似配列を整列し、その一致度に値を割り当てる。ゆえに、いくつかの領域に類似が見られる場合の比較を行い、それぞれに異なるスコアを得ることができる。両方のタイプの分析が本発明で検討される。

【 0 0 2 4 】

本明細書で用いられる「相同」なる用語は、RRVQIWFQNKRAKVKR又はRSVQIWFQNRRAKARのアミノ酸配列に少なくとも75%相同ないしは同一な配列を有し、RRVQIWFQNKRAKVKR又はRSVQIWFQNRRAKARの生物学的活性又は膜輸送機能を保持するアミノ酸配列を指す。相同性は、i) 又はii) のペプチド配列に少なくとも75%相同であることが好ましく、順に、R

10

20

30

40

50

RVQIWFQNKRAKVKR又はRSVQIWFQNRRAKARに少なくとも76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%相同であることが好ましい。

【0025】

本発明の第一の態様のさらに好適な実施形態では、前記CPPは、配列RRVQIWFQNKRAKVKR又はRSVQIWFQNRRAKARを含むか、又はそれからなる。

【0026】

本発明の第二の態様によると、膜、典型的には限定するものではないが、生体膜を越えて選択される分子又は薬剤を輸送することを目的として、前記CPPと、前記CPPに共有結合ないしは非共有結合するか又は会合している少なくとも一つの選択された分子又は薬剤とを含むコンジュゲートが提供される。

10

【0027】

本発明の第二の態様の好適な実施形態では、前記選択された薬剤は、当業者に知られる多くの方法によって前記CPPに接着されてよく、例えば限定するものではないが、共有又は非共有連結がある。あるいは、より好ましくは、前記カーゴはインビボ又はインビトロの組換えによって前記CPPに付加されうる。

【0028】

理想的には、前記選択された薬剤はそのアミノ末端又はカルボキシ末端で前記CPP分子にコンジュゲートされうる。

20

【0029】

本発明の第二の態様のさらに好適な実施形態では、前記選択された分子又は薬剤は、前記CPPのアミノ酸残基のすぐ隣に又は前記CPPのアミノ酸残基にコンジュゲートされる。あるいは、前記選択された分子又は薬剤は、少なくとも一つのさらなるアミノ酸残基又は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19および20のアミノ酸残基を含む群から選択される数のアミノ酸残基で好ましくは表されるスペーサーの存在により、前記CPPのアミノ酸残基から遠位に位置する。当業者には明らかであろうが、これにより選択された薬剤の透過性が改善されうるが、同様に機能しうる他のスペーサーが本発明の実施に用いられてよい。

【0030】

30

本発明の第三の態様では、細胞性の膜を越えて少なくとも一つの選択された分子又は薬剤を輸送する方法であって、前記膜を越えて輸送する少なくとも一つの分子又は薬剤と共有結合又は非共有結合的に結合した少なくとも一つの前記CPPの使用を含む方法が提供される。

【0031】

本発明のさらなる態様では、選択された分子又は薬剤と共有結合又は非共有結合的に結合した、本発明に係る少なくとも一つのCPPを含み、前記分子又は薬剤が治療薬である、治療薬が提供される。

【0032】

当業者には明らかであろうが、前記治療薬は、小分子化学的阻害因子又は活性因子、タンパク質、ペプチドを含む超分子粒子、プラスミドDNA、siRNAおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む核酸配列、化学物質、治療的薬剤又は抗体であってよい。ゆえに、これには、発現が欠損しているか又は発現が正しくない遺伝子産物の発現を達成する遺伝子治療のための、細胞質又はこの細胞小器官、例えば核内で治療的作用を発揮するために細胞内への薬剤の輸送、疾患治療のためのリソソーム内の欠損するリソソーム酵素の輸送、および癌治療のためのミトコンドリアでのアポトーシス促進性の抗癌薬の輸送が包含される。

40

【0033】

他の態様では、治療薬に共有結合又は非共有結合的に結合した少なくとも一つのCPPと、一つのさらなる治療薬とを含む併用治療薬が提供される。ゆえに、治療ないしは予防

50

する疾患や症状に適する又は効果的と思われるような、他の活性な物質があってもよい。例えば、併用治療は抗生物質又は抗菌薬を含んでもよい。

【0034】

理想的には、前記併用治療薬は、本発明に係る複数のC P Pを含み、それぞれが治療薬と共有結合的に又は非共有結合的に結合している。理想的には、前記薬剤は、同じ症状、理想的にはその異なる態様や症状を治療するために選択されるが、場合によっては、患者が患っている異なる症状を治療するように選択されてよい。ゆえに、本発明のC P Pは、治療薬の選択と組み合わせで、オーダーメイドの治療を可能としうる。

【0035】

他の態様では、本発明は、本発明に係る治療薬又は本発明に係る併用治療薬の有効量を治療する個体に投与することを含む、治療方法を提供する。

10

【0036】

本発明の他の態様では、本発明に係る治療薬又は本発明に係る併用治療薬を、薬学的に許容可能な担体とともに含む、薬学的組成物が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0037】

担体、2以上存在する場合にはそれぞれの担体は、製剤の他の成分と混合可能であり、受容者に有害でないという意味では許容されるものでなければならない。

【0038】

製剤には、経口、直腸、経鼻、気管支（吸入器）、局所（点眼剤、頬および舌下を含む）、経膈または非経口投与（皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮内を含む）に適したものが含まれ、製薬業界でよく知られる任意の方法によって調製されてよい。

20

【0039】

投与経路は治療する症状に応じるが、好ましい組成物は、静脈内、非経口、経口、経鼻、気管支または局所の投与のために製剤化される。

【0040】

組成物は、本発明の治療薬又は本発明の併用治療薬と担体とを結合させることによって調製してよい。一般に、製剤は、活性剤を、液体担体又は細かくした固形担体あるいはこの両方と均一かつ密接に関連させて、必要があれば生成物を成形することによって調製される。本発明は、本発明のペプチドを薬学的または獣医学的に許容可能な担体またはビヒクルと併せる、または関連させることを含む、薬学的組成物の調整方法に関する。

30

【0041】

本発明における経口投与用の製剤は、カプセル、小袋又は錠剤といったそれぞれが所定量の活性剤を含む個別の単位として、粉末または顆粒として、水溶液または非水溶液中の活性剤の溶液または懸濁液として、あるいは水中油型液体エマルジョンまたは油中水型液体エマルジョンとして、又はボラス等として提示されてよい。

【0042】

経口投与用の組成物（例えば錠剤およびカプセル剤）のために、「許容可能な担体」なる用語には、一般的な賦形剤などのビヒクル、例えば結合剤、例えばシロップ、アカシア、ゼラチン、ソルビトール、トラガカント、ポリビニルピロリドン（ポビドン）、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロースおよび澱粉；充填剤および担体、例えばトウモロコシデンプン、ゼラチン、乳糖、ショ糖、微結晶性セルロース、カオリン、マンニトール、リン酸二カルシウム、塩化ナトリウムおよびアルギン酸；およびステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウムおよび他の金属ステアリン酸塩、ステアリン酸グリセロール、ステアリン酸、シリコン油、タルクワックス、油およびコロイド状シリカなどの潤滑剤が包含される。ペパーミント、ウィンターグリーン油、チェリーフレーバーなどの香味剤を使用することもできる。剤形を容易に識別可能にするために着色剤を添加することが望ましい場合がある。錠剤はまた、当分野でよく知られる方法によってコーティングしてよい。

40

50

【 0 0 4 3 】

錠剤は、場合により 1 又は複数の補助成分とともに、圧縮または成型することにより製造されてよい。圧縮錠剤は、場合により結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、保存剤、界面活性剤または分散剤と混合して、粉末または顆粒のような流動形態に活性成分を好適な機械で圧縮することにより調製されてよい。成型錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末状化合物の混合物を好適な機械で成型することにより製造されてよい。これらの錠剤は場合により被覆または刻み目をつけてよく、活性成分の遅延放出性または徐放性を与えるように製剤化してもよい。

【 0 0 4 4 】

経口投与に好適な他の製剤には、通常スクロースおよびアカシアゴムまたはトラガカントゴムなどの矯味基剤中に活性剤を含んでなるトローチ剤；ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアゴムなどの不活性基剤に活性剤を含んでなる香錠；および好適な液体担体に活性剤を含んでなる口中洗浄剤が包含される。

10

【 0 0 4 5 】

皮膚への局所適用のための、組成物は、クリーム、軟膏、ゼリー、溶液又は懸濁液等に作製されてよい。薬剤に用いられうるクリームまたは軟膏製剤は、当分野においてよく知られる従来の製剤であり、例えば、英国薬局方などの薬剤学の標準的教科書に記載されている。

【 0 0 4 6 】

非経口製剤は通常滅菌される。

20

【 0 0 4 7 】

本発明の他の態様によると、本発明に係る C P P をコードする核酸分子が提供される。

【 0 0 4 8 】

本発明の他の態様によると、本発明に係るコンジュゲート又は治療薬をコードする核酸分子が提供される。

【 0 0 4 9 】

本発明の他の態様によると、前記核酸分子を含むベクターが提供される。

【 0 0 5 0 】

本発明の他の態様によると、前記ベクターを形質移入又は形質導入した宿主細胞が提供される。

30

【 0 0 5 1 】

本発明の他の態様によると、前記 C P P、又は前記コンジュゲート、又は前記治療薬の製造方法であって、本発明に係る前記 C P P 又は前記コンジュゲート又は前記治療薬をコードする核酸分子を形質移入した宿主細胞を、前記 C P P および / 又は前記コンジュゲートおよび / 又は前記治療薬の転写および翻訳が起こる条件下で培養することと、それらを回収することを含む方法が提供される。

【 0 0 5 2 】

本明細書の記載および請求項を通して、「含む」および「含有する」なる用語、ならびにこれらが変化した用語、例えば「含んでいる」および「（ 3 人称単数が主語の ）含む」は、「これらだけに限定されないが含んでいる」ことを意味し、他の部分、添加物、成分、整数値またはステップを排除するものではない。本明細書の記載および請求項を通して、文脈が別に求める場合を除いて、単数は複数を包含する。特に、不明確な物品が使用される場合、本明細書は、文脈が別に求める場合を除いて、単独と同様に複数も考慮するものとして理解されたい。

40

【 0 0 5 3 】

あらゆる特許または特許出願を含む、本明細書において引用される全ての参考文献は、出典明記により本明細書に組み込まれる。いかなる参考文献も先行技術を構成するものと認められない。さらに、先行技術のいずれも、当該技術分野における共通の一般的知識の一部を構成するものと認められない。

【 0 0 5 4 】

50

本発明の各態様の好ましい特徴は、他の態様のいずれかと関連して記載される場合がある。

【0055】

本発明の他の特徴は、以下の実施例から明らかになるであろう。一般的に言えば、本発明は、（添付の特許請求の範囲および図面を含む）本明細書に開示された特徴の任意の新規な1つ、または任意の新規な組合せにまで及ぶ。ゆえに、本発明の特定の態様、実施形態、または実施例に関連して記載された特徴、整数、特性、化合物または化学的部分は、本明細書に記載された任意の他の態様、実施形態、または実施例に、それらと適合しないことがない限り、適用できることは理解されているはずである。

【0056】

さらに、他の記述がない限り、本明細書で開示された任意の特徴は、同じまたは類似した目的を果たす代替の特徴に置き換えられてもよい。

【0057】

本発明を、以下の実施例および図面を参照としてのみ用いて実施例により記載する。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】培養1時間後に細胞に移入する蛍光標識したペプチド（10 μM）。（A）タマホコリカビ細胞中のFITC-Cupid A。（B）タマホコリカビ細胞中のFITC-Cupid B、（C）ヒト線維芽細胞中のFITC-Cupid B、（D）ヒト腎細胞中のFITC-Cupid B。

【図2】培養したタマホコリカビ細胞内の蛍光標識したペプチド（10マイクロモルのCupid A、Cupid B又はpANT）蓄積の時間経過。

【図3】蛍光標識したCupid Bペプチド（10マイクロモル）の蓄積を培養したタマホコリカビ細胞においてモニターした。（A～C）4分後（A）、16分後（B）、32分後（C）。32分後に培養液を洗い流し、細胞蛍光をモニターした。（D～F）洗浄後4分（D）、16分（E）、32分（F）。

【図4】調製し乾燥させたペプチドのSDS PAGEゲル。ゲルはクーマシーブルータンパク質染料により染色し、Cupid-PKI（A）、Cupid B（B）および分子量の基準（C）のバンドを可視化した。

【図5】蛍光標識したCupid B-PKIペプチド、10マイクロモルを培養したタマホコリカビ細胞に添加し1時間置いた。次いで細胞を洗浄し、光学（A）および蛍光（B）顕微鏡にて分析した。

【図6】Cupidは細胞内に小分子カーゴを輸送することができる。欠乏させたタマホコリカビ細胞の培養物を、ペプチドなし（A）、Cupid Bペプチド（B）、PKIペプチド（C）およびCupid B-PKIペプチド（D）にて処理し、凝集について分析した。未処理の培養物（A）又は10マイクロモルのCupid Bペプチド（B）又はPKIペプチド（C）にて処理した培養物では、細胞が密接な塊に凝集した。対照的に、10マイクロモルのCupid-PKIペプチドにて処理した培養物（D）は凝集しなかった。

【図7】蛍光標識したCupid B-PTENペプチド、10マイクロモルを培養したタマホコリカビ細胞に添加し、1時間置いた。次いで細胞を洗浄し、蛍光顕微鏡用に調整した。

【図8】Cupidは細胞内に大分子カーゴを輸送することができる。欠乏させたタマホコリカビ培養物を、ペトリ皿の欠乏バッファ中に置き、10時間後に可視化した。未処理の野生型（WT）培養物（A）では、細胞は凝集中心へ一体となって移動し、細胞から細胞へのシグナル伝達により連動した。PTENヌル変異体培養物（B）、又は10マイクロモルのCupid-PTENペプチドにて処理したWT培養物（C）では、細胞は連動や凝集を生じなかった。

【図9】欠乏させた野生型タマホコリカビ細胞における4つのイノシトール・リン脂質（PI、PIP、PIP2およびPIP3）のレベルを、細胞培養物の溶媒抽出法にて測定

10

20

30

40

50

し、薄層クロマトグラフィを用いて分析した。Cupid B - PTENペプチド処理（10マイクロモル、1時間）の影響を基準（未処理）レベルに対するパーセント変化として算出した。

【図10】欠乏させたタマホコリカビ培養物において、いくつかのタンパク質は、投与したサイクリックAMPに反応して急速なリン酸化／脱リン酸化を起こす。この反応の強さはPTEN酵素活性によって制限される。この応答は、cAMPの投与後に示される時点で抽出した培養物から調製したリンタンパク質の抗体検出を用いてSDSゲル上で可視化した。野生型（WT）培養物と比較して、10マイクロモルのCupid - PTENペプチドにて1時間前処理した培養物では、細胞が非常に大きなリン酸化反応を示し、これによりPTEN活性の減少が示唆される。

10

【図11】Cupidは生物活性が可能である細胞内へ大きなカーゴを輸送することができる。蛍光のない精製Cupid - GFP（表1に示される配列）を、終濃度40マイクロモルで細胞培地に添加し、1時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、Fluorsave（メルク）を用いてスライド上にマウントし、顕微鏡により観察した。細胞は、位相差顕微鏡（A）および蛍光顕微鏡（B）下で観察した。GFPを観察し、Cupid - 緑色蛍光タンパク質ペプチド（Cupid - GFP）が細胞に浸透し、リフォールディングし、細胞が蛍光を発するという結論を導いた。

【実施例】

【0059】

材料および方法

20

Cupid結合ペプチドの生成

Cupid Bベクターの作製

ベクターの基本骨格

pBR322（ニュー・イングランド・バイオラボ社）DNAベクターをEcoRIおよびClaI DNA制限酵素（ニュー・イングランド・バイオラボ社）で切断した。試料は、製造業者提供の制限酵素緩衝液中でインキュベートし、EcoRI（1μl）およびClaI（1μl）制限酵素とともに37℃でインキュベートし、直鎖状DNA分子（a）とした。この分子は、両端に「スティッキー」EcoRIおよびClaI部位を持つという特徴を有する。試料は、氷上で保存するか又は-20℃に凍結した。

【0060】

30

Cupid B挿入物配列

はじめのCupid B挿入物配列である[GAATCCATGCACCATCACCATCACCATAGAAGAGTTCAAA TTTGGTTCCAAAATAAACGTGCTAAAGTAAAGAGAATCGAT]は、2本の相補的なDNA鎖として合成した（シグマ社、英国）。これは、EcoRI制限酵素部位（GAATCC）、開始コドン（ATG）、6×ヒスチジン（CACCATCACCATCACCAT）、Cupid B配列（AGAAGAGTTCAAATTTG GTTCCAAAATAAACGTGCTAAAGTAAAGAGA）、およびClaI制限酵素部位（ATCGAT）に特徴を有する。

【0061】

これら相補的な鎖を、混合、加熱および冷却によりアニーリングし、EcoRIおよびClaI DNA制限酵素（ニュー・イングランド・バイオラボ社）で切断した。試料は、製造業者提供の制限酵素緩衝液中でインキュベートし、EcoRI（1μl）およびClaI（1μl）制限酵素とともに37℃でインキュベートし、EcoRIおよびClaIの「スティッキー末端」を有する二本鎖Cupid B挿入DNA（b）とした。試料は、氷上で保存するか又は-20℃に凍結した。

40

【0062】

Cupid Bベクター

直鎖状のDNAベクター（a）をCupid挿入物（b）と混合し、DNAリガーゼキット（ニュー・イングランド・バイオラボ社）にて、「スティッキー末端」を介して円形にライゲートした。このDNAを大腸菌にクローニングし、アンピシリン（100マイクログラム/mL）を補充したLBアガープレートに播いた。プラスミドDNAをアンピシ

50

リン耐性バクテリアコロニーから抽出し、プラスミド配列を決定した（ダンディーシーケンス、英国）。正しい配列を含むクローンを増殖させ、プラスミドを抽出し（プラスミド抽出キット、キアゲン社）、完成したCupid Bプラスミドベクター（c）の供給源を得た。簡単に言うと、クローンを、アンピシリン（100マイクログラム/mL）を補充したLBアガープレート上で増殖させた。単一コロニーを採取し、37℃で8時間アンピシリンを含むLB培地中で増殖させた。培養物を、アンピシリンを補充したLB中で1/500に希釈し、37℃で一晩増殖させた。製造業者の説明書に従って、培養物を遠心分離によってペレット化し、その後溶解および精製した（プラスミド抽出キット、キアゲン社）。

【0063】

Cupid B - カーゴDNAプラスミドの作製

カーゴDNA挿入物

カーゴDNA挿入物は、PCR増幅技術を用いてゲノムDNAから作製した。この反応のためのプライマーは、シグマ社（英国）から合成・注文した。

フォワードプライマー：[ClaI部位] - カーゴ開始DNA

リバースプライマー：カーゴ終末DNA - 停止コドン - [HindIII部位]

【0064】

PCR反応から増幅されたDNAは、ClaIおよびHindIII制限酵素にて処理して精製し（PCR精製キット、キアゲン社）、ゲル精製（ゲル精製キット、キアゲン社）を行った。この最終的なカーゴDNA挿入物（e）分子は両端の「スティッキー」ClaIおよびHindIII部位に特徴を有する。

【0065】

Cupid Bベクター（c）をClaIおよびHindIII DNA制限酵素（ニュー・イングランド・バイオラボ社）で切断した。試料は、製造業者提供の制限酵素緩衝液中でインキュベートし、HindIII（1μl）およびClaI（1μl）制限酵素とともに37℃でインキュベートし、直鎖状DNA分子（d）とした。この分子は、両端に「スティッキー」ClaIおよびHindIII部位を持つという特徴を有する。試料は、氷上で保存するか又は-20℃に凍結した。

【0066】

直鎖状のCupid BベクターDNA（d）をカーゴ挿入物DNA（e）と混合し、DNAリガーゼキット（ニュー・イングランド・バイオラボ社）にて、「スティッキー末端」を介して円形にライゲートした。このDNAを大腸菌にクローニングし、アンピシリン（100マイクログラム/mL）を補充したLBアガープレートに播いた。プラスミドDNAをアンピシリン耐性バクテリアコロニーから抽出し、プラスミド配列を決定した（ダンディーシーケンス、英国）。正しい配列を含むクローンを増殖させ、上記のようにプラスミドを抽出し（プラスミド抽出キット、キアゲン社）、完成したCupid B - カーゴDNAプラスミド（f）を提供した。

【0067】

大腸菌株BL21（DE3）を10ngの適当なプラスミドにて形質転換し、アンピシリン（100μg/mL）を補充した1LのLB培地に移し、対数期中期（A600 = 0.5 ~ 0.6）になるまで37℃で一晩増殖させた。ペプチドは、1mMのIPTGにより3時間かけて誘導し、細菌を遠心分離により回収した。細菌ペレットを、4体積の緩衝液A（50mMリン酸塩緩衝液、15のpH7.5、400mM NaCl、2mM EDTA、1mM PMSF）中で超音波処理により溶解した。遠心分離（16000gで15分間）の後、上清をNi-NTA His結合樹脂に通過させた。必要があれば、従来技術を用いてポリヒスチジンアミノテールをコンストラクトに添加し、生成物がNi-NTA His結合樹脂に接着し、混入物質から分離するようにした。結合したペプチドは、緩衝液Aで洗浄し、イミダゾール勾配（緩衝液A中0 ~ 0.5M）を適用することにより溶出した。溶出したペプチド（培養物の3mg/L）を50mMリン酸緩衝液（pH7.5）、150mM NaClにより一晩透析した。長期保存のために、ペプチドを最

10

20

30

40

50

終的に乾燥させ、使用するまで - 20 で保存した。

【0068】

ペプチドの蛍光標識および顕微鏡

ペプチドは、指示書（ピアース社、英国）にあるように、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識キットを用いてFITCで標識した。細胞培養物に添加した場合、標識したペプチドは、488 nmのスペクトル線、アルゴンイオンレーザー（494 nmの励起波長および518 nmの発光波長）にてFITCを励起することによって蛍光顕微鏡を用いて可視化した。

【0069】

タマホコリカビの細胞培養

A X 2 野生型タマホコリカビ細胞は、アエロバクター・エロゲネス菌（クレブシエラ・エロゲネスともいう）を食料源として播種したSMアガープレート上で増殖させた。

【0070】

結果

Cupid AおよびCupid BがCPPであることの確認

Cupid A (RSVQIWFQNRRAKAR) と Cupid B (RRVQIWFQNKRAKVKR) は、化学的に合成し、アミノ末端でFITCにて標識した。ペプチドをキイロタマホコリカビアメーバの培養した真核細胞に加え、最大2時間の時間量を変えた。次いで、細胞を洗浄し、蛍光顕微鏡下で検査のために調製した（図1）。浸透の時間経過はクラス3のCPP、アンテナペディアペプチド、化学合成でFITC標識したpANTと比較した（図2）。

【0071】

他の実験においても、発明者らは、ヒト線維芽細胞、ヒト胎児腎臓細胞（図1）およびニワトリニューロン（図示せず）を含む、試験したすべての細胞へ広がることのできるCupidペプチドの透過能力を見出した。

【0072】

発明者らは、20マイクロモルのFITC標識Cupid AおよびCupid Bペプチドがいずれも可視化された細胞へ30分以内に急速に浸透することができたことを観察した。取り込みはいずれのペプチドに関しても100分以内に最大に達し、最大半量の透過にかかる時間はFITC - Cupid Bでは17分、FITC - Cupid Aでは28分であった。同じ条件下でFITC - pANTは23分で最大半量の透過を達成した。FITC - Cupid Bの透過は可逆性であり、FITCペプチドを含む培地をペプチドを含まない培地と交換した場合には、ペプチドは同様の期間内に細胞の外へ透過した（図3）。

【0073】

(i) 様々な生きている細胞に進入する能力、(ii) 進入するだけでなく生きている細胞から出て行く機能、および(iii) アンテナペディアペプチドとのサイズおよび主構造の類似性により、Cupid AおよびBは、CPPの第三クラスの新規なメンバーに分類されることが証明された。

【0074】

Cupidが生きている細胞内へ生物活性ペプチドカーゴを輸送することができることの確認

内在化され生物活性カーゴを輸送するCupid Bの能力を調べるために、キイロタマホコリカビモデルシステムを用いた。

【0075】

飢餓 (starvation) によりタマホコリカビに発生プログラムを開始させ、自由生活性 (free-living) アメーバの凝集を促した。遺伝的研究により、環状アデノシンリン酸 (cAMP) がタマホコリカビのcAMP依存性プロテインキナーゼ (DdPKA) による初期凝集過程において細胞外化学誘引物質として統合するように機能するという重要な役割を明らかにした。DdPKAは、PKAの阻害因子由来の20アミノ酸ペプチド配列であるPKIがPKAの触媒ユニットに直接結合することによって阻害されうる。Cupi

10

20

30

40

50

d B - P K I 融合タンパク質を作製することによって、発明者らは、飢餓タマホコリカビ細胞のインビボでの凝集が妨げられることを確認することを目的とした。

【 0 0 7 6 】

生きている細胞に添加した C u p i d B - P K I ペプチドを用いた実験

記載のように C u p i d 結合ペプチドを生成し、S D S 存在下でのゲル電気泳動法により分析し、C u p i d B 又は C u p i d B - P K I ペプチドに相当する分子量の主バンドが存在することを確認した (図 4) 。

【 0 0 7 7 】

C u p i d B - P K I 融合タンパク質が生きている細胞に透過することができることを示すために、発明者らは、フルオレセインペプチド標識キット (ピアース社、英国) を用いてペプチドを蛍光標識した。10 マイクロモルの F I T C - C u p i d B - P K I をタマホコリカビ細胞に添加し、1 時間後に蛍光顕微鏡にて観察したところ、C u p i d B - P K I は細胞透過性であることが示された (図 5) 。

【 0 0 7 8 】

発明者らは、C u p i d B - P K I が細胞への進入に有効であり、10 マイクロモルの濃度ではタマホコリカビの凝集の P K A 依存性プロセスが完全に減弱されることを報告する (図 6 D) 。同様な用量では、C u p i d B ペプチドも P K I ペプチドも単独では凝集に何の影響も示さなかった。 (図 6 B および図 C)

【 0 0 7 9 】

C u p i d は大きなペプチドカーゴを細胞内へ輸送することができる

大きなペプチドカーゴを生きている細胞へ輸送するために C u p i d B を用いて、カーゴが生物学的および生化学的な性質の生物活性を保持していることを示した。これを行うために、P T E N タンパク質の 1 6 7 アミノ酸領域を選択し、上記の方法を用いて C u p i d B ペプチドに融合した。この長さのアミノ酸 (ヒト P T E N の 1 8 6 ~ 3 5 2 番目) は C 2 領域であり、P T E N 酵素活性の自己抑制に関与することが知られている。この大きな融合ペプチドが生きている細胞に透過することができることを示すために、フルオレセインペプチド標識キット (ピアース社、英国) を用いてペプチドを蛍光標識した。20 マイクロモルの F I T C - C u p i d B - P T E N をタマホコリカビ細胞に添加し、1 時間後に蛍光顕微鏡にて観察したところ、C u p i d B - P T E N は細胞透過性であることが示された (図 7) 。

【 0 0 8 0 】

タマホコリカビにおいて、P T E N 遺伝子を欠損している遺伝子変異体は表現型の顕著な変化を示す。例えば、低速度撮影画像解析により、飢餓条件の間の P T E N ヌル変異株は、細胞は凝集しようとするが繰り返しそれに失敗するという特徴的な凝集行動を示す (図 8 B) 。野生型のタマホコリカビ細胞は同じ条件下で 10 マイクロモル用量の C u p i d B - P T E N ペプチドが与えられると、P T E N ヌル細胞株と同じ特徴的な行動を示す (図 8 C) 。

【 0 0 8 1 】

P T E N タンパク質は、イノシトールベースの脂質からリン酸基を除去するように機能するホスホリパーゼ酵素活性を有し、それ自体、細胞表面に存在する様々な種類のイノシトールリン脂質の間のバランスを維持することに関与している。飢餓を受けた野生型細胞では、3 と 4 のリン酸基 (P I P 2 および P I P 3) を有するイノシトールリン脂質は、主として P T E N の作用により、低く保たれている。

【 0 0 8 2 】

発明者らは、タマホコリカビ培養物におけるイノシトールリン脂質レベルに対する C u p i d B - P T E N ペプチドの効果を決定した。C u p i d B - P T E N ペプチド処理した細胞 (10 マイクロモル、1 時間) はタマホコリカビ細胞におけるイノシトールリン脂質の基礎レベルを変化させる。P I P 2 および P I P 3 のレベルは、それぞれ未処理の基礎レベルの + 7 5 % および + 1 5 0 % に上昇し、これは P T E N のホスホリパーゼ活性の阻害と一致する (図 9) 。

【 0 0 8 3 】

飢餓タマホコリカビ培養物では、サイクリックAMPの投与にตอบสนองしていくつかのタンパク質が迅速なリン酸化/脱リン酸化事象を受けている。この最初のリン酸化反応の強さはPTEN酵素活性によって制限され、PIP2およびPIP3イノシトールリン脂質レベルの変化と関連している。10マイクロモルのCupid B-PTENペプチドで予め1時間処理した培養物中のリン酸化パターンは未処理の培養物と比較すると、サイクリックAMPに対して非常に強い初期リン酸化反応を示し、これによりPTEN活性の減少が裏付けられた(図10)。

【 0 0 8 4 】

これらのデータをまとめると、Cupid B-PTENペプチドは、生きている細胞の培養物に添加された場合には、透過し、PTEN活性を阻害するという考えと一致している。これは、発明者らの方法によって生成された大きなCupid B連結ペプチドの細胞透過生物活性は小さなカーゴに限定されないことを示す。

10

【 0 0 8 5 】

Cupidペプチドは大きなカーゴを輸送することが可能であり、カーゴ機能を妨げないCupidが細胞透過ペプチド担体として働くのに有効であることを示すために、発明者らは、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*、クラゲ; UniProt 寄託番号P42212)由来の野生型緑色蛍光タンパク質(GFP)に連結したCupidペプチド配列を合成した。GFPは、青~紫外線領域の光に曝されると明るい緑色蛍光を示す238アミノ酸タンパク質である。

20

【 0 0 8 6 】

表1に示すCupidペプチドにGFPを添加した。Cupid-GFPを粉末に精製し、滅菌水に溶解した場合、Cupid-GFP粉末もCupid-GFP溶液(1ミリモル)も蛍光発色しなかった。しかしながら、Cupid-GFPを細胞培養物に添加した場合(40マイクロモル、1時間)、蛍光顕微鏡下で観察するとCupid-GFPは細胞へ透過し、蛍光発色し始めることがわかった(図11)。

【 0 0 8 7 】

GFPに連結したCPPを用いた以前の研究はTATとArgx8 CPPSによるものであった(Lundberg, Wikstrom S, Johansson M. Mol Ther. 2003 Jul;8(1):143-50. PMID: 12842437)。これらGFPペプチドは既に蛍光発色していた。著者らは、CPPペプチド(および融合タンパク質)両方の主な特性は細胞表面接着を媒介することであり、これらCPPの内在化はエンドサイトーシスによって生じたと結論付けた。しかしながら、本明細書では、精製したCupid-GFPは(誤って折りたたまれているために)蛍光発色しないので、緑色蛍光として検出されることは、Cupid-GFPが、細胞のタンパク質機構により正しく折りたたまれている細胞に透過したことを示唆する。これにより、Cupidの真の細胞透過性ペプチドとしての役割が裏付けられ、生物活性が可能である生きている細胞内へ大きなカーゴペプチドを運ぶことが可能である。

30

【 0 0 8 8 】

まとめ

本発明者らは、本明細書において、生物学的な膜などの細胞性の膜を横断し、それによって細胞透過性ペプチド(CPP)として作用することができる新規のペプチド配列(一般的にCupidと称する)の同定を開示する。したがって、これら新規のCPPは、生物学的な障害壁を越えて分子又は薬剤を輸送および運送するために使用することが可能であり、幅広い治療学的又は生物学的な分子の細胞内輸送への使用にも繋がる。

40

【 0 0 8 9 】

表1：開示した分子のアミノ酸配列。

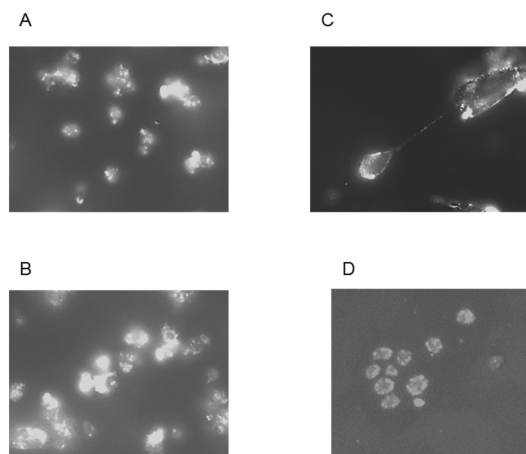
【表 1】

アミノ酸	配列
Cupid A	RSVQIWFQNRRAKAR
Cupid B	RRVQIWFQNKRAKVKR
アンテナペディア	RQIKIWFQNRMRKWKK
PKI	TTYADFIASGRTGRRNAIHD
PTEN	LDYRPVALLFHKMMFETIPMFSGGTCNPQFVVCQLKVKIYSSNS GPTRREDKFMFYFEPQPLPVCGLDIKVEFFHKQNKMLKKDKMFH FWVNTFFIPGPEETSEKVENGLCDQEIDSICSIERADNDKEYLV LTLTKNDLDKANKDKANRYFSPNFKVKLYFTKTVE
Cupid B-PKI	HHHHHHRRVQIWFQNKRAKVKRIDTTYADFIASGRTGRRNAIH D
Cupid B-PTEN	HHHHHHRRVQIWFQNKRAKVKRIDL DYRPVALLFHKMMFETIP MFSGGTCNPQFVVCQLKVKIYSSNSGPTRREDKFMFYFEPQPL PVCGLDIKVEFFHKQNKMLKKDKMFHFWVNTFFIPGPEETSEKV ENGLCDQEIDSICSIERADNDKEYLVLTTLTKNDLDKANKDKAN RYFSPNFKVKLYFTKTVE
Cupid-GFP	MRRVQIWFQNKRAKVKR SKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTCLKICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVSQ CFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVIYIMADK QKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHY LSTQSALS KDPNEKRDMVLLEFVTAAGITHGMDELYK

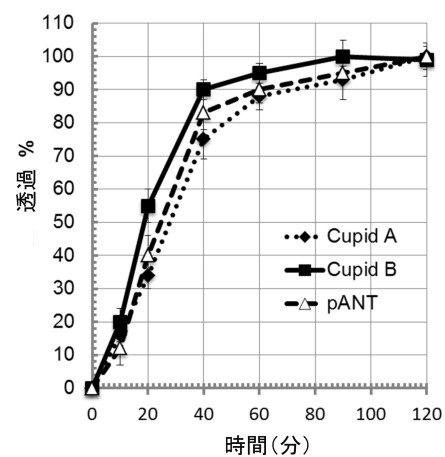
10

20

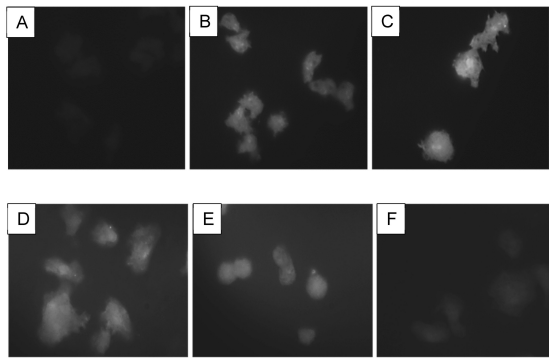
【図 1】



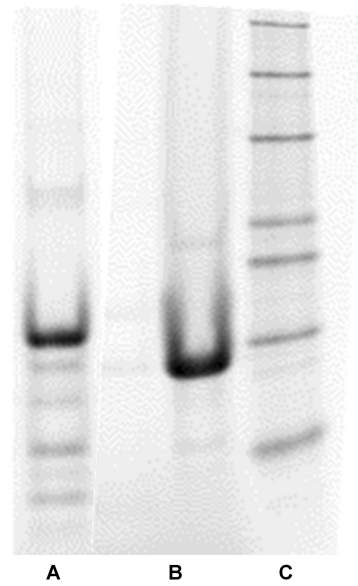
【図 2】



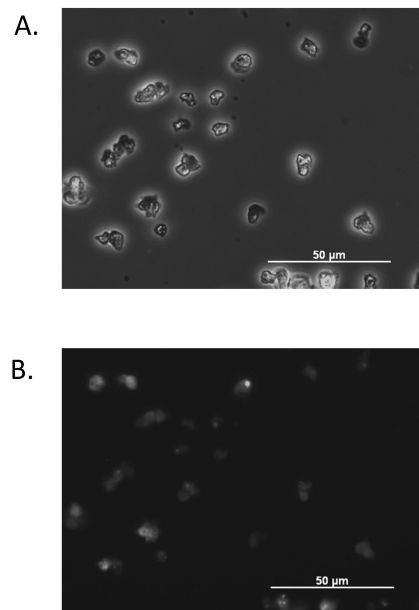
【図 3】



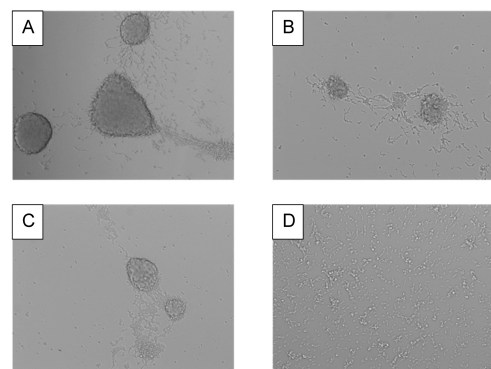
【図 4】



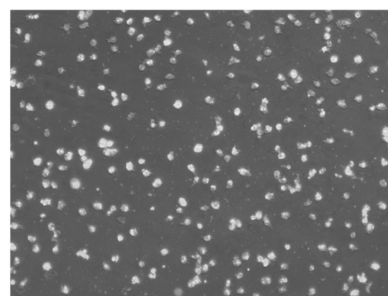
【図 5】



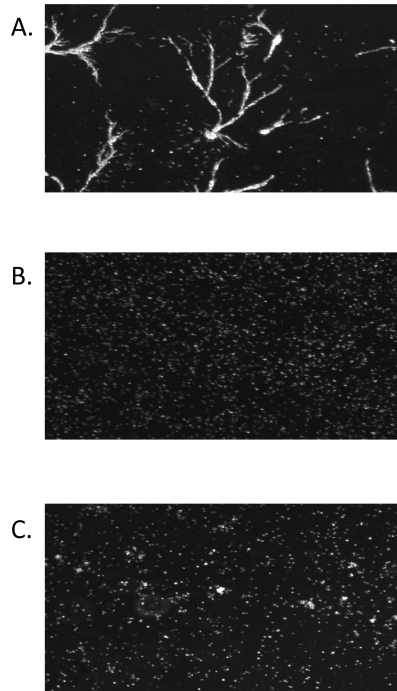
【図 6】



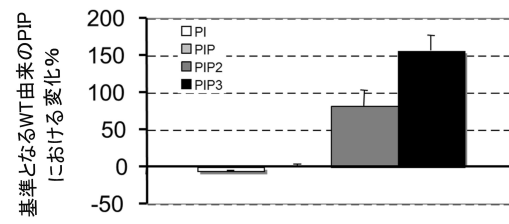
【図 7】



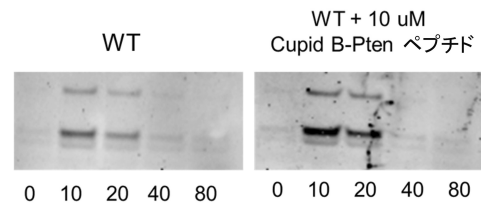
【図 8】



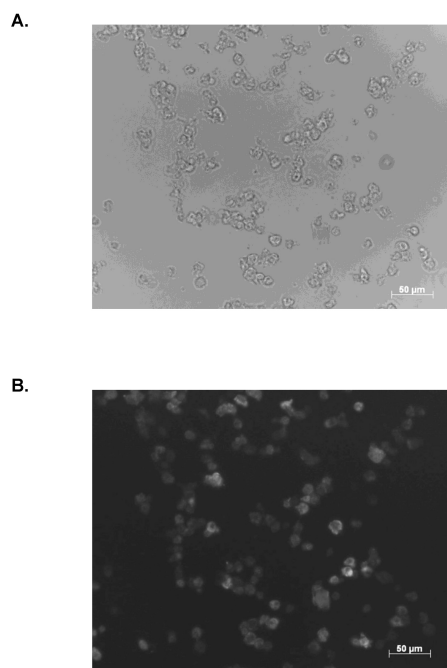
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【配列表】

0006576355000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	14/37	(2006.01)	C 0 7 K	14/37	
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K	7/08	
C 0 7 K	14/435	(2006.01)	C 0 7 K	14/435	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	38/04	(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	38/04	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	A
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	39/395	H
			A 6 1 K	45/00	
			A 6 1 K	47/42	

- (56)参考文献 国際公開第2005/016387(WO, A1)
 国際公開第2002/072807(WO, A1)
 特表平10-510577(JP, A)
 特表2006-520745(JP, A)
 特表2002-519392(JP, A)
 特表2009-527251(JP, A)
 Genome Biology, 2011年, Vol.12, R20
 Molecular Biotechnology, 2006年, Vol.33, p.123-131
 Nature, 2005年, Vol.435, p.43-57
 Genome Research, 2011年, Vol.21, p.1882-1891

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 7 / 0 8
 C 0 7 K 1 4 / 4 3 5
 A 6 1 K 4 7 / 4 2
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)