

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-508521

(P2014-508521A)

(43) 公表日 平成26年4月10日 (2014.4.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-554886 (P2013-554886)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月22日 (2012.2.22)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年10月18日 (2013.10.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/053036
 (87) 国際公開番号 W02012/113846
 (87) 国際公開日 平成24年8月30日 (2012.8.30)
 (31) 優先権主張番号 11155275.8
 (32) 優先日 平成23年2月22日 (2011.2.22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 513212752
 セベプ ザ サード アクチボラゲット
 スウェーデン エスー104 30 スト
 ックホルム ビーオーボックス 4502
 9
 (74) 代理人 100092093
 弁理士 辻居 幸一
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治
 (74) 代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫

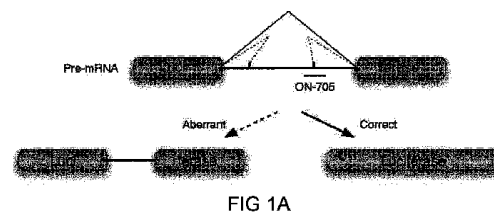
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞内へのカーゴ送達のためのシステム

(57) 【要約】

本発明は、Nick Fectという名の細胞内カーゴ送達のためのシステムであって、細胞透過性ペプチドB及び/又はペプチド性若しくは非ペプチド性構築物Cに共有結合した少なくとも1種の成分Aを含むシステムに関連する。該送達システムNick Fectは、効率的細胞のために非共有結合的又は共有結合的にカーゴと複合化した化学的に改変された新規細胞透過性ペプチド(CPP)に関連する。

【選択図】 1 A



【特許請求の範囲】

【 請 求 項 1 】

細胞内へのカーゴ送達のための、細胞透過性ペプチド B で構成されるシステムであって

該細胞透過性ペプチド B が、共有結合した成分 A、及び、細胞内へカーゴを送達するための標的部分としての共有結合的又は非共有結合的に結合したペプチド性又は非ペプチド性構築物 C を含んでもよいことを特徴とする、システム。

【請求項 2】

ペプチド B が、主鎖に共有結合した脂肪酸（例えばステアリン酸）を有する細胞透過性ペプチド T P 1 0 の化学的改変物を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

3位のTyrが、Lys、Orn、Thr、Ser、Asp、又は、Gluで置換される、請求項1又は2に記載のシステム。

【 請 求 項 4 】

8位のIleが、Lys、Orn、Thr、Ser、Tyr、Asp、Glu、又は、他の親水性アミノ酸で置換される、請求項1～3のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項 5】

少なくとも1つのLeuが、ロイシンの異性体及び/又は類似体(例えばノルロイシン)で置換される、請求項1~4のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項 6】

少なくとも 1 つのリシンが、リシンの異性体及び / 又は類似体（例えばオルニチン）で置換される、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 7】

ペプチド B が、リシン又はその類似体の、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ - アミノ基を介して、両親媒性若しくはノ及び α - ヘリックス性のペプチド又はノ並びにペプチド部分（例えば NP Y、サブスタンス P、ブラジキニン、 $(Ala - Leu)_n$ のようなモデル配列、TP 10、ガラニン、マストパラン）に結合された、脂肪酸改変 TP 10 ペプチド又はノ及びその部分（例えばガラニン、マストパラン）から成る分岐ペプチドである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 8】

1 種又はそれ以上の成分 A が、直接的又はスパーサーを介してペプチド B と共役する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の送達システム。

【請求項 9】

結合した複数の成分 A が、異なってもよい、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の送達システム。

【請求項 10】

成分 A が、リン酸基 (PO_3) 若しくは (Asp 、 Glu 、炭水化物から成るがこれらに限定されるわけではない群から選択される) 負電荷を有する部分を含むか、又は、全体として負電荷を有するペプチド配列でさえあり得る、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 1 1】

標的部分である少なくとも１種の成分Ｃを含む、請求項１～１０のいずれか１項に記載のシステム。

【請求項 1 2】

前記標的部分が、細胞若しくは腫瘍ホーミングペプチド、アプタマー、受容体リガンド、不活性化ペプチドに結合した開裂可能部位を含むスパーサー、ペプチドリガンド、細胞障害性ペプチド、公知若しくは非公知の受容体に対する生物活性ペプチドリガンド、特定の組織若しくは細胞型に選択的に結合するペプチド配列、又は、核局在配列（NLS）である、請求項１１に記載のシステム。

【請求項 13】

さらにカーゴを含み、１種又は数種のカーゴが共有結合的又は／及び非共有結合的に成分Ｂと結合する、請求項１～１２のいずれか１項に記載のシステム。

【請求項１４】

１種又はそれ以上の成分Ａ、１種又はそれ以上の成分Ｃ、及び、１種又はそれ以上のカーゴが、ペプチドＢに取り付けられる、請求項１～１３のいずれか１項に記載のシステム。

【請求項１５】

２種以上のペプチドＢを含む、請求項１～１４のいずれか１項に記載のシステム。

【請求項１６】

成分Ｃ及びカーゴの少なくとも１種が、スペーサーアームに取り付けられる、請求項１～１５のいずれか１項に記載のシステム。

【請求項１７】

前記カーゴが、一本鎖オリゴヌクレオチド（ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ、ＬＮＡ及びそれらの類似体）、二本鎖オリゴヌクレオチド（ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、デコイＤＮＡ）、プラスミド、及び、他のそれらのさまざまな合成ヌクレオチド類似体を含むオリゴヌクレオチド及びその改変型から成るがこれらに限定されるわけではない群から選択される、請求項１～１６のいずれか１項に記載のシステム。

【請求項１８】

前記カーゴが、細胞若しくは腫瘍ホーミングペプチド、アプタマー、受容体リガンド、不活性化ペプチドに結合した開裂可能部位を含むスペーサー、ペプチドリガンド、細胞障害性ペプチド、生物活性ペプチド、抗体、診断剤、タンパク質、例えば抗癌剤である薬剤、又は、抗生物質から成る群から選択される、請求項１～１６のいずれか１項に記載のシステム。

【請求項１９】

さらに少なくとも１種の造影剤及び／又は標識分子を含む、請求項１～１７のいずれか１項に記載のシステム。

【請求項２０】

ＰＥＧのような循環クリアランス調整剤を組み合わせて含む、請求項１～１９のいずれか１項に記載のシステム。

【請求項２１】

形成されたペプチドＢ及びカーゴナノ粒子の全表面電荷が負である、請求項１～２０のいずれか１項に記載のシステム。

【請求項２２】

請求項１～２１のいずれか１項に記載の送達システムを２種以上含む組成物。

【請求項２３】

請求項１～２２のいずれか１項に記載のシステムの、疾患の診断における、研究ツールとしての、標的化システムとしての、及び、医薬組成物としての使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ＮｉｃｋＦｅｃｔという名の細胞内カーゴ（ｃａｒｇｏ）送達のためのシステムであって、細胞透過性ペプチドＢ及び／又はペプチド性若しくは非ペプチド性構築物Ｃに共有結合した少なくとも１種の成分Ａを含むシステムに関連する。該送達システムＮｉｃｋＦｅｃｔは、効率的細胞のために非共有結合的又は共有結合的にカーゴと複合化した化学的に改変された新規細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）に関連する。より正確には、本発明は、安定性が高くエンドソーム－リソソーム区画から逃れるのにより有力な、非毒性ペプチド送達ベクターを含む構築物に関連し、血清の存在下でも原形を保つカーゴと安定な複合体を形成することができる。

【０００２】

本発明は、全体として負電荷の、オリゴヌクレオチド送達のために形成されたナノ粒子

10

20

30

40

50

を有する送達システムに関連する。

本発明はまた、分岐ＣＰＰを含む送達システムであって、脂肪酸改変ＴＰ１０又はその部分が、リシン又はその類似体の、
、
、
-アミノ基を介して、両親媒性若しくは
ノ及び
-ヘリックス性のペプチド又はペプチド部分に結合する、送達システムに関連する。

【０００３】

さらに、本発明は、インビトロ又はインビボで標的細胞の細胞質又は核内ヘカーゴ（Ｒ
ＮＡ、ＤＮＡ、薬物、プラスミド、ミニサークルなど）を送達する方法に関連する。それは
また、前記システムの疾患の診断における、研究ツールとしての、及び、標的化システ
ムとしての使用、前記システムを含む組成物、特に医薬組成物、前記システムで覆われた
材料、並びに、材料内への送達システムを有する材料に関連する。最後に、それはまた、
新規細胞透過性ペプチドに関連する。

10

【背景技術】

【０００４】

疎水性の細胞膜は、細胞内容物を包み込む脂質二重膜である。通常は小さい及びノ又は
疎水性の分子しか越えられない障壁として機能し、裸のＤＮＡ、ＲＮＡ又はタンパク質の
ような他の高分子が細胞の内面に接近するのを防ぐ。この１０年間では、この問題を解決
することを目的とした戦略はほとんどなかったが、形質膜を越えられないことは、依然と
して現在の薬物研究開発（Ｒ＆Ｄ）の成功のために克服すべき主要な障害の１つである。

【０００５】

20

過去４０年間は、いくつかのオリゴヌクレオチド（ＯＮ）-ベースの方法が、遺伝子発
現を制御する目的で開発された。この方法の効率性は、数ある要因のうちで、細胞内への
ＯＮの効率的な取り込み及びそれに続くエンドソームの回避に依存している。遺伝子制御
のための他の最も基本的な方法は、目的の遺伝子を発現するための細菌ベクターの使用を
含む。種々の遺伝子の機能的側面の評価に加えて、これは臨床の場、すなわち遺伝子治療
において利用するための高度に魅力的な戦略である。もともと遺伝子治療は、例えばスプ
ライス修正用（*s p l i c e - c o r r e c t i n g*）オリゴヌクレオチドによる、遺伝
性遺伝子疾患のための矯正治療として役立つと考えられていた。しかしながら、他の後天
性疾患もまた研究されているけれども、過去１５年間にわたって、癌疾患のための実験的
遺伝子治療が最もよくある応用となった〔１〕。

30

【０００６】

より短いＯＮ配列を利用して遺伝子発現を妨げる他の汎用的戦略が出現した。遺伝子サ
イレncingをもたらしするために利用される２０～２５ヌクレオチドの長さの干渉ＲＮＡ（
s i R N A）である二本鎖ＲＮＡ分子、又は、スプライシングパターンの操作のために適
用されるスプライス修正用ＯＮ（*S C O*）に基づいたアンチセンスアプローチが、最近厳
密に利用されている〔２、３〕。遺伝子発現を制御するのに有効な生体分子ではあるけれ
ども、それらの親水性及び大きさ（プラスミドの場合１ＭＤａ以上の大きさ）が、細胞内
在化を妨げている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【０００７】

このように、現在の遺伝子治療を進展させるために、細胞内に種々の分子を輸送するた
めのさまざまな細胞送達システムが求められているが、それらの多くは、高い細胞毒性、
特有の免疫原性、低いトランスフェクション効率などのようないくつかの欠点を有してい
る（表１）。

【０００８】

表１：送達ベクター

【表 1】

トランスフェクション試薬	欠点
ウイルスベクター（アデノウイルス、組換えレンチウイルスベクターなど）	内因性の組換え、発癌作用及び免疫学的反応
カチオン性リポソーム（Lipofectamine™2000—Invitrogenにより製造販売されている、広く用いられているトランスフェクション試薬）	高い細胞毒性、インビボでは利用できず、細胞集団全体にはトランスフェクトできない
ペプチドベースの試薬（Transduction™—Dr. Steven Dowdy（UCSD School of Medicine及びTraversa Therapeutics、Inc）によって開発された研究用途のための送達試薬）	血清感受性、siRNAトランスフェクションのためには大量の生体分子が求められる、主にsiRNAトランスフェクションのために用いられる
カチオン性ポリマー	非生分解性、低溶解性、高細胞毒性
物理的方法（例えばエレクトロポレーション）	細胞障害及び非特異的輸送
リポプレックス	低効率性及び乏しい送達再現性

10

20

【0009】

したがって、細胞透過性ペプチドは、インビトロ及びインビボの送達ベクターとして大きな可能性を持っており望みがあるので、それらは研究及び医薬分野で用いられ得る。タンパク質導入ドメイン（PTDs）とも呼ばれる細胞透過性ペプチド（CPP）は、ここ数十年において、広範なカーゴの送達のための非毒性担体として多くの注目を集めているペプチドの種類である。これらのペプチドは、長さが30アミノ酸（aa）未満で、正味の正電荷及び／又は両親媒性を有し、インビトロ及びインビボの両方で細胞膜を越えて積載物を送達することができる[5]。今日では、何百ものCPPが知られている。細胞内送達を促進するために、CPPは、共有結合的又は非共有結合的な方法でカーゴ（オリゴヌクレオチド、プラスミド、ミニサークルなど）と結合すべきだろう。ペプチドをON又は他の生体分子へ共有結合することは骨の折れる手順であり、意味のある生物学的反応を得るためには、通常は高濃度のペプチド共役体が必要とされる。非共有結合複合体の場合には、効率的な濃度はナノモル範囲であり、非共有結合複合体の形成は、1時間水中でペプチド及び生体分子溶液と一緒に混合することで達成され得る。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

（発明の概要）

本発明は、毒性に加えて低調で不均一な送達という非共有結合的遺伝子送達の欠点を克服する新シリーズの細胞透過性ペプチドを含む、細胞内カーゴ送達のためのシステムを提供する。

40

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】改変ルシフェラーゼ遺伝子のmRNA前駆体。ヌクレオチド705番に点突然変異を有するB-グロビン遺伝子由来のイントロン2を、ルシフェラーゼ遺伝子内に挿入する。SCOでこの部位を遮断すると、機能的なmRNAにスプライシングが切り替わる。

【図1B】NickFect送達システムの一般的な構造図であり、実線は共有結合を示し、点線は非共有結合である。

50

【図1C】Nick Fect送達システムの一般的な構造図であり、実線は共有結合を示し、点線は非共有結合である。

【図2】200 nMのSCOと組み合わせたリン酸化CPP (NF1、NF5) 又はステアシル-TP10及びLipofectamine 2000による処理後のスプライス修正 (splice correction)。Hela pLuc 705細胞を、4時間無血清DMEM中で種々のモル比 (5:1、7:1、10:1) でのペプチド: 2'-OMe ON複合体により処理し、その後培地を完全増殖培地と置換して、さらに20時間インキュベートした。Lipofectamine 2000は、製品プロトコールに従って使用した。結果は、スプライス修正効率を上げるためには、リン酸化に加えて該ペプチドの主鎖の改変が必要であることを明らかに示している。

10

【図3】Nick Fectは、低いペプチド: ONモル比における効率的なトランスフェクションベクターである。複合体を、1:1、3:1、5:1、7:1、10:1、15:1のモル比で、SFM中 (A) 及びFM中 (B) のHela pLuc 705細胞に対して、200 nMのON濃度で適用した。Lipofectamine 2000は、製品プロトコールに従って使用した。Nick Fect 1はスプライス修正の劇的な増加を誘導したが、生物学的反応を引き起こすために必要なペプチドは非常に少量である。

【図4】化学的改変ステアシル-TP10類似体 (NF11) のチロシン又はトレオニン部分におけるリン酸基の導入の、スプライス修正活性に対する影響。複合体を、3:1、5:1、7:1のモル比で、SFM中 (A) 及びFM中 (B) のHela pLuc 705細胞に対して、200 nMのON濃度で適用した。Lipofectamine 2000は、製品プロトコールに従って使用した。新規リン酸化CPPはスプライス修正の劇的な増加を誘導したが、生物学的反応を引き起こすために必要なペプチド及びONは非常に少量である。NF1は、NF2と比較して、完全培地中でより有効に作用した。

20

【図5】リソソーム指向性 (lysosomotropic) 試薬であるクロロキンの、スプライス修正活性に対する影響。クロロキンの存在下又は不存在下で、SFM中のペプチド-ON複合体であるNF1、NF2及びステアシル-TP10を、最も効率的なモル比 (7:1) で細胞に対して200 nMのON濃度で適用した。

【図6】LipofectamineTM 2000と比較した、オリゴヌクレオチド-ペプチド複合体のHeLa細胞の生存率に対する影響。細胞生存率は、ペプチド: 2'-OMe ON複合体を種々のモル比で添加した後の24時間後に、MTSアッセイによって測定した。適用されたONは、200 nMの濃度だった。NF1及びNF2は、最も有効な濃度において有毒ではなかった。

30

【図7】NF1、NF2は、GFPタンパク質を安定に発現しているEGFP-CHO細胞内へのsiRNA送達を仲介した。細胞を、無血清DMEM培地中のMR20、MR25、MR30、MR40によるsiRNA: ペプチド複合体で4時間処理し、HAM完全培地で20時間処理した。その後細胞を洗浄し、トリプシン処理して、フローサイトメトリーにより解析した。

【図8】HEK293細胞におけるpGL3プラスミドのトランスフェクションのための送達ベクターとしてのNF51、NF52、NF53及びNF61。

【図9】CHO細胞におけるpGL3プラスミドのトランスフェクションのための送達ベクターとしてのNF51、NF52、NF53及びNF61。

40

【発明を実施するための形態】

【0012】

(発明の詳細な説明)

本発明は、TP10配列 (AGYLLGKINLKALAA LAKKIL-NH₂) に基づいた、非共有結合的又は共有結合的アプローチを用いたインビトロ又はインビボにおける標的細胞の細胞質及び/又は核内への種々のカーゴ (RNA、DNA、プラスミド、ミニサークル、薬物など) の効率的な送達に利用され得る、新規の化学的改変送達ベクター、Nick Fectのシリーズを提供する。該新規送達システム、Nick Fectは、安定で、密に詰まった、均一で、球状の、カーゴを含むナノ粒子を形成することができ

50

る。形成されたナノ粒子は、血漿及び／又は核膜とのより良い相互作用特性を有しており、より効率的に細胞内に内在化することができる。

【0013】

上述のNickFectは、疾患の診断において、遺伝子治療において、腫瘍の治療において、及び、他の薬学的用途のために、研究ツールとして及び標的化システムとして用いられ得る。

より正確には、本発明は、非毒性であり、安定性が高くエンドソーム-リソソーム区画から逃れるのにより有力であって、血清の存在下でも原形を保つカーゴとの安定な複合体を形成することができる構築物に関連する。

【0014】

NickFect送達ベクターは、細胞の内側へ種々のON及びプラスミドを運搬するのに、市販のトランスフェクション試薬であるLipofectamine™2000よりも効果的であるが、毒性は低い。NickFectの毒性が低いことで、それは敏感な細胞及びインビトロにおけるトランスフェクションに適したものとなるが、Lipofectamine™2000は、必要な濃度で毒性が高いためインビトロでしか使用できない。

NickFectは、細胞集団の100%にトランスフェクトするが、Lipofectamineは、細胞株による最適化工程後でも60~80%にしかトランスフェクトしない。

NickFectは、粉末として長期間保存できるが、Lipofectamine™2000の安定性について、製造者は+4でたった6月の間しか保証しない。

さらに、NickFect送達ベクターは、RNA及びDNAの細胞送達のために従来使用されたCPPよりも強力である。最も重要なことには、生物学的反応を得るために非常に少量のペプチド及びONしか必要とされない。

【0015】

NickFectは、細胞の核内で作用するON化合物を輸送するために機能するだけでなく、細胞質で作用するsiRNAなどのONの送達のためにも有効に利用される。NF1は、細胞内へのsiRNAの送達のためには、Lipofectamine2000と同程度に機能する。Lipofectamine/siRNA複合体が、いかなるsiRNA濃度においても80%より大きい遺伝子発現の下方制御を生み出すことはめったにないが、siRNAと複合体化したNickFect1は、低いsiRNA濃度でほぼ完全なRNAiを与える。

【0016】

本発明は、NickFectという名の細胞内カーゴ送達のためのシステムであって、ある場合には共有結合した成分A及び／又は標的部分であるペプチド性若しくは非ペプチド性構築物Cを含む少なくとも1種の細胞透過性ペプチドBを含むシステムに関連する。該送達システムNickFectは、共有又は非共有結合によってカーゴを送達することができる(図1B)。

該細胞送達システムは、カーゴなしに任意の順序で連結した、2種以上のペプチドB、2種以上の成分A、及び、2種以上の標的用成分Cを含んでもよい。

上述の送達システムは、細胞、組織内へ、又は、細胞層を越えて送達されてもよい1種又はそれ以上のカーゴに連結されてもよい。

【0017】

本発明はまた、NickFect構築物の製造方法だけでなく、新規の細胞透過性ペプチドにも関連する。

標的部分としての成分Cは、目的の特定の細胞又は組織に到達することができる。該標的部分は、アプタマー又はホーミングペプチド若しくは受容体リガンドなどの標的ペプチドであってもよい。

天然アミノ酸の非天然アミノ酸(例えばオルニチン)による置換、及び、ペプチド結合形成のために非-アミノ基を用いることによるその二次構造の変形が、CPPを安定化

10

20

30

40

50

し、NickFectをプラスミドの効率的細胞内送達のための非常に強力なベクターにすることが示された。

【 0 0 1 8 】

成分 A

成分 A は、リン酸基 (PO_3) 又は負に荷電した部分 (Asp 、 Glu 、炭水化物など) を含む。成分 A は、全体として負の電荷を有するペプチド配列でさえあり得る。1 種の直鎖脂肪族成分 A がペプチド B と結合されてもよく、又は、類似の若しくは異なった 2 種の成分 A がリシン分岐スペーサーを介してペプチド B と結合されてもよい。

細胞透過性ペプチドは正味の正電荷を有していることが知られているので、1種又は数種の負に荷電した部分を挿入することは新しい方針である。

【 0 0 1 9 】

ペプチド B

ペプチド B は、ペプチド主鎖に共有結合した脂肪酸（例えばステアリン酸）を有する細胞透過性ペプチド TP 10 の化学的改変物を含む。

ペプチド B はまた、細胞透過性ペプチドである脂肪酸改変 T P 1 0 であって、その 3 位において、T y r を、負に荷電した分子又は官能基を後で追加するために L y s、O r n によって、チロシン類似体として使用するために T h r、S e r によって、及び、ペプチド主鎖にカルボキシル基を挿入するために A s p 又は G l u によって置換したものを含む。

ペプチドBはまた、細胞透過性ペプチドである脂肪酸改変TP10であって、その8位において、Ileを、Thr、Ser、Tyr、As、Glu、又は、他の親水性アミノ酸で置換し、 α -ヘリックスの親水特性を向上させたものを含む。

ペプチド B はまた、脂肪酸改変 TP 10 であって、少なくとも 1 つのロイシンを、ロイシン異性体及び / 又は類似体（例えばノルロイシン）で置換したものであってもよい。

ペプチド B はまた、脂肪酸改変 TP 10 であって、少なくとも 1 つのリシンをリシン異性体及び / 若しくは誘導体、又は、オルニチン異性体若しくは / 及び類似体で置換したもののあってもよい。

天然アミノ酸を非天然アミノ酸で置換すると、ペプチドが血清プロテアーゼに対してより安定になる。

ペプチド B は、リシン又はその類似体の、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ - アミノ基を介して、両親媒性若しくはノ及びヘリックス性のペプチド又はノ及びペプチド部分（例えば N P Y、サブスタンス P、ブラジキニン、(Ala - Leu)_nのようなモデル配列、T P 1 0、ガラニン、マストパラン）に結合した脂肪酸改変 T P 1 0 ペプチド又はノ及びその部分（例えばガラニン、マストパラン）から成る分岐ペプチドであってもよい（図 1 C）。

これらの改変のいくつかを、同時に行うこともできる。

【 0 0 2 0 】

構築物 C

ペプチド性又は非ペプチド性構築物 C は、共有結合的又は非共有結合的にペプチド B と結合した、目的の特定の細胞又は組織に到達することができる標的成分を含む。

構築物 C は、細胞又は腫瘍ホーミングペプチド、アプタマー、受容体リガンド、不活性化ペプチドに結合した開裂可能部位を含むスパーサー、ペプチドリガンド、細胞障害性ペプチド、公知若しくは非公知の受容体に対する生物活性ペプチドリガンド、特定の組織若しくは細胞型に選択的に結合するペプチド配列、又は、核局在配列（NLS）である。

【 0 0 2 1 】

ス ぺ ー サ ー

スぺーサーは、成分 A、C 及びカーゴを成分 B に取り付けるために使用してもよい。

該スぺーサーは、１種又は数種のリシン及び／又はオルニチン残基から成る直鎖又は分岐部分であってもよい。

【 0 0 2 2 】

カ - ゴ

カーゴは、共有結合アセンブリ又は複合体形成によって、前記送達システムに取り付けられる。

該カーゴは、オリゴヌクレオチド及びその改変型、一本鎖オリゴヌクレオチド（DNA、RNA、PNA、LNA 及び合成オリゴヌクレオチド）、二本鎖オリゴヌクレオチド（siRNA、shRNA、デコイドsDNA など）、プラスミド、ミニサークル及びそれらの他の型、ウイルス複製の阻害の目的又は抗ウイルスONのための合成ヌクレオチド類似体から成る群から選択されてもよい。

該カーゴは、検出マーカー、造影剤、標識分子、蛍光マーカー、アプタマー、受容体リガンド、不活性化ペプチドに結合した開裂可能部位を含むスペーサー、ペプチドリガンド、細胞障害性ペプチド、生物活性ペプチド、抗体、診断剤、タンパク質、例えば抗癌剤である薬剤、又は、抗生物質であってもよい。

カーゴとしての抗癌剤は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、及び、細胞障害性抗生剤から選択されてもよい。

【0023】

本発明のさらなる局面では、本発明に係る構築物は、疾患の診断において、遺伝子治療において、研究ツールとして、標的化システムとして、及び、医薬組成物として使用されてもよい。

本発明は次に、図面の簡潔な説明、材料及び方法、見本の配列だけでなく図表及び図表の説明文を含む実施例によって、さらに説明されるが、本発明の範囲は具体的に述べられる態様又は詳細のいずれにも限定されないことが理解されるべきである。

【0024】

表2：Nick Fectの見本配列（NF - s）

10

20

【表 2】

名称	配列
NickFect 1	ステアリル- AGY(PO ₃)LLGKTNLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 2	ステアリル- AGYLLGKT(PO ₃)NLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 3	ステアリル- AGY(PO ₃)LLGKT(PO ₃)NLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 4	AGY(PO ₃)LLGK(ステアリル)TNLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 5	ステアリル- AGY(PO ₃)LLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 6	ステアリル- AGK(K-2PO ₃)LLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 7	AGK(K-2PO ₃)LLGK(ステアリル)INLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 11	ステアリル- AGYLLGKTNLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 12	ステアリル- AGYLLGKSNLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 13	ステアリル- AGYLLGKYNLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 14	ステアリル- AGDLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 15	ステアリル- AGELLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 21	AGYLLGK(ステアリル)TNLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 22	AGYLLGK(ステアリル)SNLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 23	AGYLLGK(ステアリル)YNLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 24	AGDLLGK(ステアリル)INLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 25	AGELLGK(ステアリル)INLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 31	ステアリル- AGK(K-Glu ₂)LLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 32	ステアリル- AGK(K-Asp ₂)LLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 33	ステアリル- AGK(K-Asp, Glu)LLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 34	ステアリル- AGYLLGK(K-Glu ₂)INLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 35	ステアリル- AGYLLGK(K-Asp ₂)INLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 36	ステアリル- AGYLLGK(K-Asp, Glu)INLKALAALAKKIL-NH ₂
NickFect 37	ステアリル- AGO(K-Glu ₂)LLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂

10

20

30

40

NickFect 38	ステアリル- AGO(K-Asp ₂)LLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 39	ステアリル- AGO(K-Glu, Asp)LLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 41	AGK(K-Glu ₂)LLGK(ステアリル)INLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 42	AGK(K-Asp ₂)LLGK(ステアリル)INLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 43	AGK(K-Asp, Glu)LLGK(ステアリル)INLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 51	δ - (ステアリル-AGYLLG) O INLKALAALAKKIL-NH ₂	10
NickFect 52	α, ε (ステアリル-AGYLLG) ₂ K INLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 53	ε - (ステアリル- AGYLLG) K INLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 54	α-(RPPGFSPFR)-ε-(ステアリル-AGYLLG) - K INLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 55	α-(ALALL)-ε-(ステアリル-AGYLLG)- K INLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 56	α-(RPKPQQFGLM)-δ-(ステアリル-AGYLLG) O INLKALAALAKKIL-NH ₂	20
NickFect 64	ステアリル- AGYLLGOINLOALAALAOOIL-NH ₂	
NickFect 71	AGYLLGO(ステアリル)INLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 72	AGYLLGO(ステアリル)INLOALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 73	AGYLLGO(ステアリル)INLOALAALAOKIL-NH ₂	
NickFect 73	AGYLLGO(ステアリル)INLOALAALAOOIL-NH ₂	30
NickFect 81	ステアリル- AGYLLGKIN-Nle-KALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 82	ステアリル- AGYL-Nle-GKIN-Nle-KALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 82	ステアリル- AGYL-Nle-GKIN-Nle-KA-Nle-AALAKKIL-NH ₂	
NickFect 91	K (Asp ₂)AGYLLGK(ステアリル)INLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 92	K (Glu ₂)AGYLLGK(ステアリル)INLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 93	K (Asp, Glu)AGYLLGK(ステアリル)INLKALAALAKKIL-NH ₂	40
NickFect 94	K (Asp, ステアリル)AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	
NickFect 95	O (Asp ₂)AGYLLGK(ステアリル)INLKALAALAKKIL-NH ₂	

【 0 0 2 5 】

実施例及び実験

以下本発明は、NickFect及びPepFectシステム、並びに、陽性対照として今日の市場をリードするインビトロ用トランスフェクション試薬であるLipofect

tamine 2000を用いた、実施例及び比較例によって説明される。まず、送達ベクターの改善及び改造が説明される。そして、Nick Effectsがスプライス修正用オリゴヌクレオチド、プラスミド及びsiRNAの送達にどれだけ汎用性があるかを示す種々の方法が説明される。加えて、メーカーのプロトコールに従って適用されたLipofectamine 2000と比較した、Nick Effectペプチドの全体的な改善は、より低い細胞毒性で、均一で、効率的なトランスフェクションによって示される。すべての実験は、2種以上の細胞型について行われ、多くの場合には血清存在下で行われた。

【0026】

材料及び方法

ペプチドの合成

固相としてRinkアミドMBHA（メチルベンジルヒドリルアミン（methyl benzyl hydryl amine））樹脂（Fluka）を用いたFmoc（フルオレニルメチルオキシカルボニル）固相ペプチド合成法（Fields及びNoble、1990）を利用して、自動ペプチド合成機（Applied Biosystems、ABI 433A、USA）によって、ペプチドを0.1 mmol規模の段階的なやり方で合成し、C末端がアミド化されたペプチドを取得した。室温で一晩、ジメチルホルムアミド/ジクロロメタン（1：1）中において、5当量のステアリン酸（Sigma、ドイツ）、3当量のHOBt及び3当量のHBTU（Multi Syn tech、ドイツ）、6当量のDIEA（Sigma、ドイツ）でペプチジル樹脂を処理することによって、ステアリン酸を該ペプチドのN末端に手動で結合した。リン酸化ペプチドの合成のためには、ホスホトレオニンFmoc-Thr（PO（OBzl）OH）-OH（Fluka、ドイツ）及びホスホチロシンFmoc-Tyr（PO（OBzl）OH）-OH（Merck、ドイツ）単量体を使用し、収率を上げるために、DCM/DMF/NMP/DMSO（3：3：3：1；v：v：v：v）混合物中において、室温で3時間、3当量のホスホ単量体、3当量のHOBt及び3当量のHBTU、6当量のDIEAでペプチジル樹脂を処理することによって、手動で結合を行った。最後の切断は、標準的なプロトコール（95% TFA/2.5% TIS/2.5% H₂O）を利用して行った。0.1%のTFAを含む20-80%の勾配のアセトニトリル/水を用いたC18カラム（Phenomenex Jupiter C4、5 µm、300 Å、250 x 10 mm）を利用した逆相HPLCによって、ペプチドを精製した。ペプチドの同定は、マトリックスとして -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸（Sigma-Aldrich）を用いたポジティブリニアモードでのMALDI-TOF質量分析（Voyager-DETM PRO BiospectrometryTMシステム）によって解析された。該ペプチドのモル濃度は、正確に秤量された物質の希釈に基づいて決定した。該ペプチドの配列を表1に示す。

Cy5標識及び未標識のホスホチオエート2'-O-メチルRNAオリゴヌクレオチド（CCU CUU ACC UCA GUU ACA）は、Microsynth AG、スイスから購入した。

【0027】

細胞培養

R. Kole及びB. Leblueからご提供いただいたHeLa pLuc 705細胞、及び、HEK293細胞は、0.1 mMの非必須アミノ酸、1.0 mMのビルビン酸ナトリウム、10%のFBS、100 U/mlペニシリン、100 mg/mlのストレプトマイシンを添加したグルタマックス（glutamax）を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）中で、37℃、5% CO₂で培養した。CHO細胞は、0.1 mM非必須アミノ酸、1.0 mMビルビン酸ナトリウム、10% FBS、100 U/mlペニシリン、及び100 mg/mlストレプトマイシンを添加したグルタマックスを含むDMEM-F12培地中で培養した。細胞は、5% CO₂雰囲気において37℃で培養した。すべての培地及び化学物質は、PAA Laboratories GmbH（ドイツ）から購入した。

【0028】

複合体形成

S C O / C P P 複合体の形成：ホスホロチオエート 2' - O M e オリゴヌクレオチドを、最終処理容量の 10 % (すなわち 50 μ l) の d d H₂O 中で、C P P と種々のモル比 (1 : 0 - 1 : 20) で混合した。室温 1 時間で複合体を形成し、その一方で、24 ウェルプレート中で細胞培地を新鮮な無血清 D M E M (450 μ l) と交換した。その後、複合体を各ウェルへ添加した。L i p o f e c t a m i n eTM 2000 (I n v i t r o g e n、U S A) を使用した場合には、複合体は O P T I M E M 培地 (I n v i t r o g e n、U S A) 中でメーカーのプロトコールに従って調製した。

プラスミド / C P P 複合体の形成：0.5 μ g の p G L 3 ルシフェラーゼ発現 p l a s m i d 又は p E G F P 緑色蛍光タンパク質発現ベクターを、最終処理容量の 1 / 10 (50 μ l) の d d H₂O 中で、C P P と種々の電荷比 (1 : 1 - 1 : 5) で混合した。1 時間後、複合体を 450 μ l の新鮮な無血清培地中で培養した細胞に添加した。L i p o f e c t a m i n e 2000 を使用した場合には、複合体はメーカーのプロトコール (P r o m e g a、U S A) に従って調製した。

【0029】

ゲル遅延度アッセイ

オリゴヌクレオチド / C P P 複合体の形成は、トリス - 酢酸 - E D T A (T A E) 緩衝液の 2 % アガロースゲルで複合体を 100 V で 30 分間電気泳動した後に、C y 5 標識 O N を利用して T y p h o o n V a r i a b l e M o d e I m a g e r (A m e r s h a m、スウェーデン) によって解析した。

プラスミド / C P P 複合体は、エチジウムブロマイド (S i g m a、ドイツ) を含む T A E 緩衝液の 2 % アガロースゲルにおける 100 V で 1 時間の電気泳動で解析した。

【0030】

スプライス修正アッセイ

細胞 (50,000) を実験の 24 時間前に 24 ウェルプレート内に播いて、播種後 1 日で約 60 % 集密状態にした。細胞を、500 μ l の無血清又は血清含有培地中、200 nM のオリゴヌクレオチド濃度で、6 通りのモル比 (1 : 1、3 : 1、5 : 1、7 : 1、10 : 1、15 : 1) でのペプチド：2' - O M e O N 複合体により 4 時間処理した後、1 ml の 10 % 血清含有培地を添加して、さらに 20 時間インキュベートした。その後、該細胞を P B S 緩衝液で洗浄し、100 μ l の H E P E S - クレブス - リンガー (H K R) 緩衝液中 0.1 % T r i t o n X - 100 を用いて 4 で 30 分間溶解した。ルシフェラーゼ活性は、メーカーによる提案に従って、G L O M A XTM 96 マイクロプレートルミノメーター (P r o m e g a、スウェーデン) のプロメガのルシフェラーゼアッセイシステムを利用して測定し、タンパク質濃度測定のために D C タンパク質決定アッセイ (B i o - R a d、U S A) を使用することによって、タンパク質含量で規格化した。L i p o f e c t a m i n eTM 2000 をトランスフェクション効率の測定における陽性対照として使用し、裸のオリゴヌクレオチドを陰性対照として使用した。

【0031】

1 - ナフチルリン酸ナトリウム一水和物 - N 7000 (最終濃度 200 μ M) での実験においては、阻害剤を、ペプチド：2' - O M e O N 複合体による細胞の処理の 30 分前に培地に添加した。細胞へ該複合体を添加して 2 時間後、阻害剤の有毒な効果を避けるために、培地を除去して新鮮な培地と交換した。クロロキンをを用いた実験では、エンドソームの回避を促すために、クロロキン (最終濃度 100 μ M) をペプチド：2' - O M e O N 複合体と一緒に細胞に添加した。細胞に該複合体及びクロロキンを添加して 4 時間後、クロロキンの有毒な効果を避けるために、培地を除去して新鮮な培地と交換した。

【0032】

プラスミドのトランスフェクション

50000 個の C H O (チャイニーズハムスター卵巣細胞) 又は H E K 293 (ヒト胎児腎臓 293 細胞) 細胞を、実験の 24 時間前に 24 ウェルプレート内に播いた。細胞は、無血清又は完全培地中で 4 時間、種々の電荷比 (1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 5) で

10

20

30

40

50

のプラスミド：CPP複合体により処理した。Lipofectamine™2000 (Invitrogen、スウェーデン)はメーカーのプロトコールに従って使用した。

4時間の処理後、500 µlの完全成長培地を添加して、さらに20時間インキュベートした。その後、細胞をHKRで2回洗浄して、100 µlのHKR緩衝液中0.2% Triton X-100を用いて室温で30分間溶解した。pGL3プラスミドの場合には、ルシフェラーゼ活性はGLOMAX™96マイクロプレートルミノメーター (Promega、スウェーデン)のプロメガのルシフェラーゼアッセイシステムを利用して測定し、pEGFPベクターの場合には、フルオレセイン測定はBiotek Synergy Mxモノクロメーターに基づくマルチモードマイクロプレートリーダー (BioTek Instruments、Inc.、USA)で行った。データは、DCタンパク質決定キット (Bio-Rad Laboratories、Inc、USA)を用いて測定したタンパク質含量で規格化した。

10

【0033】

FACS (siRNA下方制御)

EGFP-CHO細胞(10000)を、実験の24時間前に96ウェルプレートに播いて、実験当日に60%集密状態にした。複合体形成においては、ペプチド(100 µMのストック溶液)を最終処理容量の1/10(すなわち10 µl)のMQ水中でsiRNA(10 µMのストック溶液)と混合した。無血清DMEM中最終濃度100 nMのsiRNA、MR20、MR25、MR30、MR40を使用した。

複合体を室温60分間で形成して、100 µlの成長培地中の細胞に添加した。4時間後、100 µlの新鮮培地をウェルに添加して、細胞をさらに20時間インキュベートした。LF2000での処理は、メーカー(Invitrogen)の推奨に従って行った。24時間後、培地を除去した。細胞をPBSでリンスし、37分間のPBS中トリプシン/EDTAを利用してプレートからはがした。細胞は5%のウシ胎児血清(FBS)を含有するPBSで懸濁した。

20

フローサイトメトリー解析は、BD FACS Cantoフローサイトメーター (BD Biosciences、San Jose、CA、USA)で実施した。生細胞集団を、散布図すなわち前方散乱光(FSC)対側方散乱光(SSC)のプロットから決定した。1試料あたり生細胞集団からの最低10,000イベントを解析した。

30

【0034】

毒性測定

細胞増殖を、メーカーの使用説明書に従い、Cell Titer 96 (R) AQueous非放射性細胞増殖アッセイ(MTS)で調査した。簡単に言うと、1ウェルあたり10000個のHela pLuc 705細胞を、実験の1日前に完全DMEMで96ウェルプレート上に播いた。細胞を、無血清培地中で4時間、4通りのモル比(5:1、7:1、10:1及び20:1)でのペプチド:2'-OMe ON複合体により処理した後、10%血清含有培地を添加し、さらに20時間インキュベートした。MTSをメーカーの一般的なプロトコール(Promega Biotech AB、スウェーデン)に従って添加した。MTSの水性の可溶性ホルマザンへの変換は、代謝的に活性な細胞中に見られる脱水素酵素によって達成される。ホルマザン生成物の吸光度を490 nmで測定したが、これは培養中の生細胞数に直接比例する。吸光度はTecan Sunriseマイクロプレート吸光度リーダー(Tecan Group Ltd.、スイス)で測定し、生細胞の比率はGraphPad Prismソフトウェア5.0(Graphpad Software、CA、USA)を利用して決定した。

40

【0035】

参考文献

1. Cross, D. & Burmester, J.K. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin Med Res* **4**, 218-27 (2006).
2. Kim, D.H. & Rossi, J.J. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* **8**, 173-84 (2007).
3. Mercatante, D.R., Sazani, P. & Kole, R. Modification of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy for cancer and other diseases. *Curr Cancer Drug Targets* **1**, 211-30 (2001).
4. EL-Andaloussi, S., Holm, T. & Langel, Ü. Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications. *Curr Pharm Des* **11**, 3597-611 (2005).
5. Mae, M. & Langel, U. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 509-14 (2006). 10
6. El-Andaloussi, S., Jarver, P., Johansson, H.J. & Langel, U. Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *Biochem J* **407**, 285-92 (2007).
7. Abes, S. et al. Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)₄ peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents. *J Control Release* **116**, 304-13 (2006).
8. Bendifallah, N. et al. Evaluation of cell-penetrating peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid (PNA). *Bioconjug Chem* **17**, 750-8 (2006).
9. Lundberg, P., El-Andaloussi, S., Sutlu, T., Johansson, H. & Langel, U. Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *Faseb J* **21**, 2664-71 (2007). 20
10. Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* **269**, 10444-50 (1994).
11. Soomets, U. et al. Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta* **1467**, 165-76 (2000).
12. El-Andaloussi, S., Johansson, H.J., Holm, T. & Langel, U. A Novel Cell-penetrating Peptide, M918, for Efficient Delivery of Proteins and Peptide Nucleic Acids. *Mol Ther* **15**, 1820-6 (2007).
13. Wender, P.A. et al. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13003-8 (2000). 30
14. Kang, S.H., Cho, M.J. & Kole, R. Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry* **37**, 6235-9 (1998).
15. Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F. & Divita, G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **25**, 2730-6 (1997).
16. Morris, M.C., Chaloin, L., Mery, J., Heitz, F. & Divita, G. A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res* **27**, 3510-7 (1999). 40
17. Du, L., Pollard, J.M. & Gatti, R.A. Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6007-12 (2007).
18. Garcia-Blanco, M.A., Baraniak, A.P. & Lasda, E.L. Alternative splicing in disease and therapy. *Nat Biotechnol* **22**, 535-46 (2004).

【図 1 B】

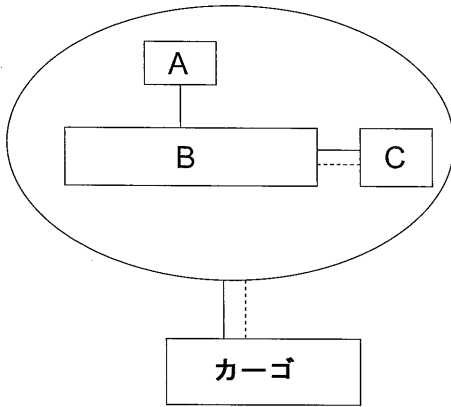


FIG 1B

【図 1 C】

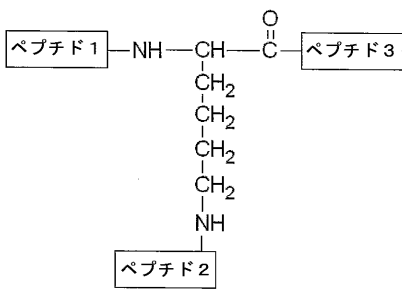


FIG 1C

【図 2】

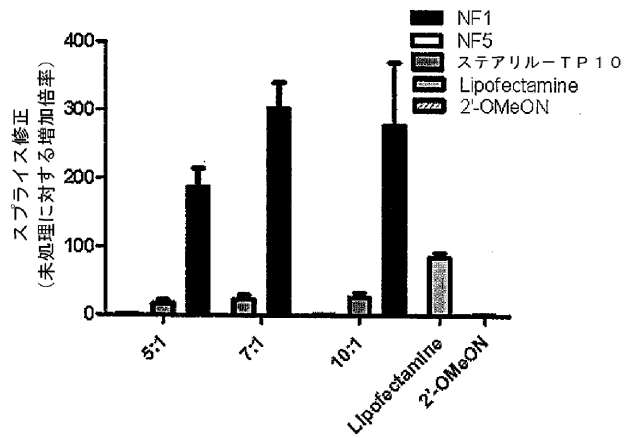


FIG 2

【図 3】

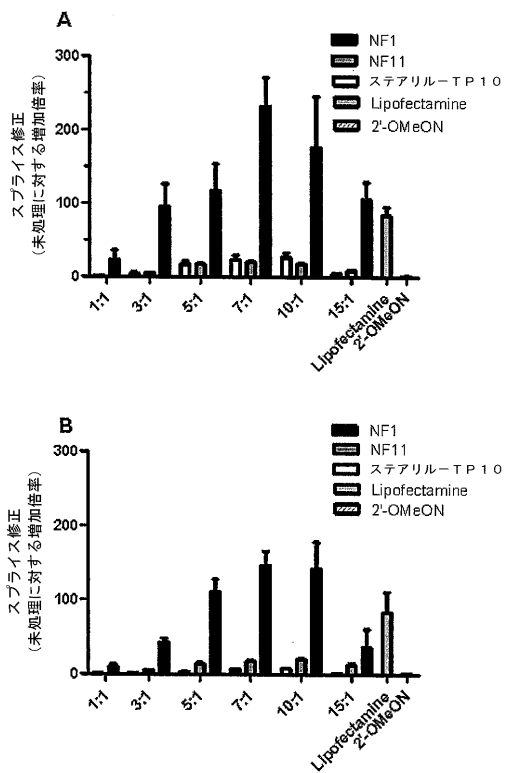


FIG 3

【図 4】

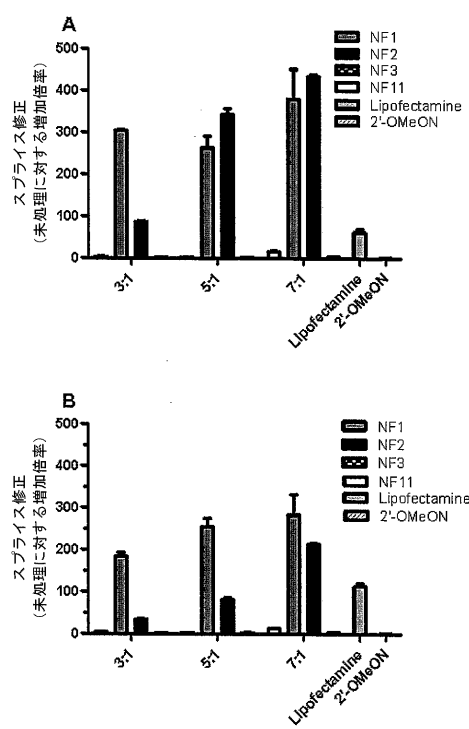


FIG 4

【 図 5 】

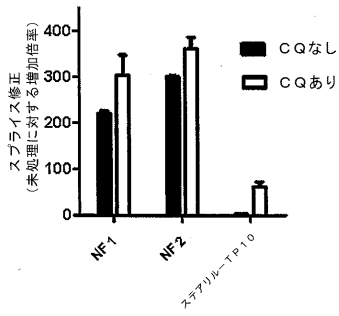


FIG 5

【 図 6 】

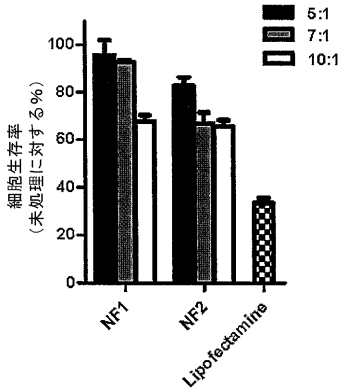


FIG 6

【 図 7 】

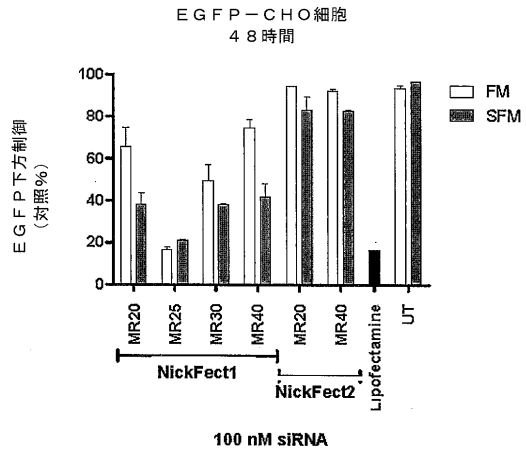


FIG 7

【 図 8 】

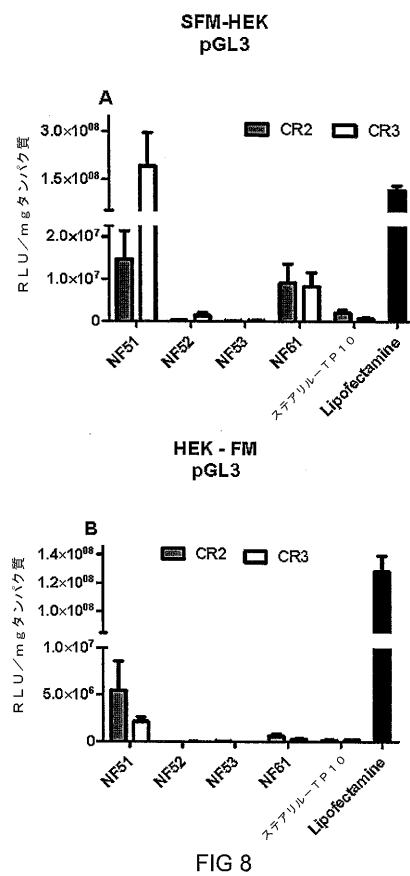


FIG 8

【 図 9 】

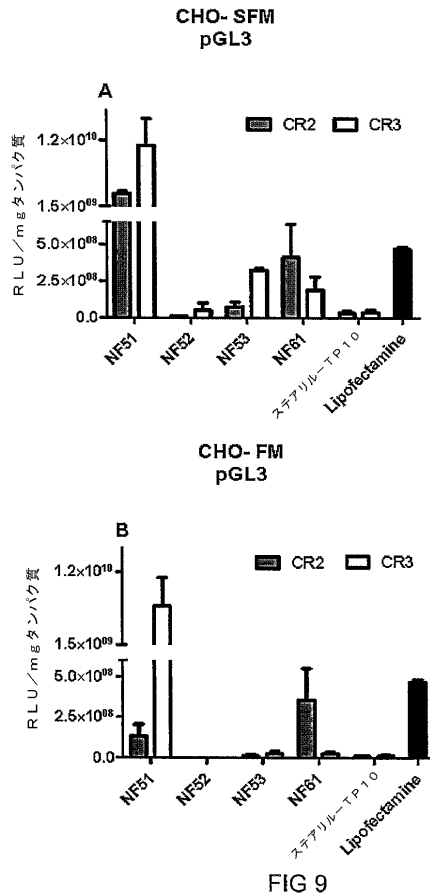


FIG 9

【図 1 A】

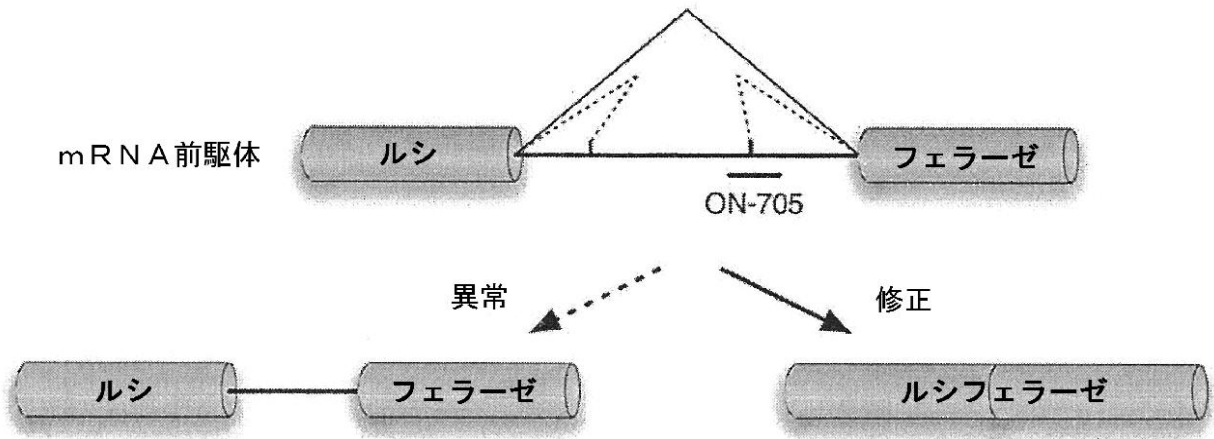


FIG 1A

【配列表】

2014508521000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/053036

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 C12N15/87
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/039088 A1 (AHMED KARIEM [SE]; EL ANDALOUSSI SAMIR [SE]; GUTERSTAM PETER [SE]; HAE) 8 April 2010 (2010-04-08) page 5, lines 34-35 page 12 - pages 24-28 page 14, lines 1-6 page 18, paragraph 1 - paragraph 4 page 20, lines 1-5 page 22, paragraph 2 page 23, paragraph 3 page 24, paragraph 1 claims 1-3, 19 -----	1-3,7-23

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

* Special categories of cited documents :

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

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 April 2012

Date of mailing of the international search report

12/06/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Barnas, Christoph

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/053036**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
3(completely); 1, 2, 8-23(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2012/ 053036

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 3(completely); 1, 2, 8-23(partially)

A system for cargo delivery into the cells comprising of cell penetrating peptide B which may comprise covalently linked component A and covalently or non-covalently linked peptide or non-peptide construct C, as targeting moiety for delivering cargo into cells, where Tyr in position 3 is replaced by Lys, Orn, Thr, Ser, Asp or Glu.

2. claims: 4(completely); 1, 2, 8-23(partially)

A system for cargo delivery into the cells comprising of cell penetrating peptide B which may comprise covalently linked component A and covalently or non-covalently linked peptide or non-peptide construct C, as targeting moiety for delivering cargo into cells, where Ile in position 8 is replaced by Lys, Orn, Thr, Ser, Tyr, Asp, Glu or any other hydrophilic amino acid.

3. claims: 5(completely); 1, 2, 8-23(partially)

A system for cargo delivery into the cells comprising of cell penetrating peptide B which may comprise covalently linked component A and covalently or non-covalently linked peptide or non-peptide construct C, as targeting moiety for delivering cargo into cells, where at least one Leu is replaced by leucine's isomers and/or analogues (e.g. Norleucine).

4. claims: 6(completely); 1, 2, 8-23(partially)

A system for cargo delivery into the cells comprising of cell penetrating peptide B which may comprise covalently linked component A and covalently or non-covalently linked peptide or non-peptide construct C, as targeting moiety for delivering cargo into cells where, at least one lysine is replaced by lysine's isomers and/or analogues (e.g. Ornithine).

5. claims: 1, 2, 7-23(all partially)

A system for cargo delivery into the cells comprising of cell penetrating peptide B which may comprise covalently linked component A and covalently or non-covalently linked peptide or non-peptide construct C, as targeting moiety for delivering cargo into cells, wherein peptide B is a branched peptide comprising of fatty acid modified TP10 peptide or/and its segments (e.g. Galanin, Mastoparan) linked

International Application No. PCT/ EP2012/ 053036

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

through amino groups of lysine or their analogues to amphipatic peptides.

6. claims: 1, 2, 7-23(all partially)

A system for cargo delivery into the cells comprising of cell penetrating peptide B which may comprise covalently linked component A and covalently or non-covalently linked peptide or non-peptide construct C, as targeting moiety for delivering cargo into cells, wherein peptide B is a branched peptide comprising of fatty acid modified TP10 peptide or/and its segments (e.g. Galanin, Mastoparan) linked through amino groups of lysine or their analogues to alpha-helical peptides.

7. claims: 1, 2, 7-23(all partially)

A system for cargo delivery into the cells comprising of cell penetrating peptide B which may comprise covalently linked component A and covalently or non-covalently linked peptide or non-peptide construct C, as targeting moiety for delivering cargo into cells, wherein peptide B is a branched peptide comprising of fatty acid modified TP10 peptide or/and its segments (e.g. Galanin, Mastoparan) linked through amino groups of lysine or their analogues to amphipatic and alpha-helical peptides.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/053036

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010039088	A1	08-04-2010	EP 2355852 A1 17-08-2011
			JP 2012502985 A 02-02-2012
			US 2011212028 A1 01-09-2011
			WO 2010039088 A1 08-04-2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 45/08 (2006.01)	A 6 1 K 45/08	

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

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(72)発明者 ランゲル ウーロ

エストニア イーイー 5 1 0 1 3 タルトゥ ヴェイケ - トウル 5 - 2 3

(72)発明者 アルクースク ピレット

エストニア イーイー 5 1 0 0 6 タルトゥ バイカーカーレ 2 6 アー

(72)発明者 オスコルコフ ニキータ

エストニア イーイー 5 0 7 0 5 タルトゥ ジャーマ 1 8 9 - 7 2

(72)発明者 コポロヴィッチ ダナ マリア

ルーマニア アール - 4 2 0 1 4 6 ビストリツァ ユデット ビストリツァ ナサウド ストラ
ーダ イオシフ パルカン ブロック 3 スカラ シー アpartment 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA11 DA02 EA10 GA11 HA08 HA17 HA20
4C076 AA95 BB11 CC27 CC29 CC32 CC41 EE23A EE41A EE59A FF34
FF36 FF63
4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 AA27 BA44 MA05 MA16 MA66 NA13
ZB211 ZB261 ZB351
4C085 AA13 BB31 CC21 CC22 DD11 DD51 EE01 EE07 GG01 HH01
JJ01 KA26 KA27 KB82 LL18
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA07 NA13 ZB21 ZB26 ZB35