

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年1月30日(30.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/023312 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 19/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01) C12M 3/00 (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)

LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/026723

(22) 国際出願日: 2024年7月25日(25.07.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-121675 2023年7月26日(26.07.2023) JP

(71) 出願人: 株式会社高研(KOKEN CO., LTD.) [JP/
JP]; 〒1120004 東京都文京区後楽 1 丁目
4 番 1 4 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(72) 発明者: 井手 賢司(IDE Kenji); 〒9970011 山形
県鶴岡市宝田 1 - 1 8 - 3 6 株式会社高研内
Yamagata (JP). 藤本 一朗(FUJIMOTO Ichiro);
〒9970011 山形県鶴岡市宝田 1 - 1 8 - 3
6 株式会社高研内 Yamagata (JP).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則5.2(a))

(74) 代理人: 庄 司 隆, 外 (SHOJI Takashi et al.);
〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目 6
番 1 3 号 御幸ビル 3 0 7 号 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,

(54) Title: COLLAGEN-BINDING MEMBRANE-PERMEABLE PEPTIDE, AND CARRIER THAT CONTAINS SAID PEPTIDE AND COLLAGEN OR COLLAGEN DERIVATIVE

(54) 発明の名称: コラーゲン結合型膜透過性ペプチド、並びに、該ペプチド及びコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a carrier for easily introducing a medicine or the like into cells. It was found that the problem can be solved by: a collagen-binding membrane-permeable peptide comprising a collagen-binding domain, a membrane fusion domain, and a membrane-permeable domain; and a carrier comprising said peptide and collagen or a collagen derivative. Due to the foregoing, the present disclosure was completed.

(57) 要約: 医薬品等を簡便に細胞に導入する運搬体を提供することである。コラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含むコラーゲン結合型膜透過性ペプチド並びに該ペプチド及びコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体は、上記課題を解決できることを見出して、本開示を完成した。

WO 2025/023312 A1

明 細 書

発明の名称：

コラーゲン結合型膜透過性ペプチド、並びに、該ペプチド及びコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体

技術分野

[0001] 本開示は、所望のタンパク質、ペプチド、核酸、低分子化合物等を標的細胞へ導入するためのコラーゲン結合型膜透過性ペプチド、該ペプチド及びコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体、該運搬体を含む細胞培養器具、医療用具、薬剤、並びに該運搬体を使用した標的細胞の性質を変える方法、に関する。

本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願2023-121675号優先権を請求する。

背景技術

[0002] (コラーゲンをを用いた運搬体)

コラーゲンは、薬剤の徐放担体として知られており（参照：特許文献1～2、非特許文献1）、さらに、核酸を標的細胞に導入するためのキットも市販されている（参照：非特許文献2）。

[0003] (特許文献1)

特許文献1は、「アテロコラーゲン、核酸導入剤及び核酸を備えた核酸導入用セルトランスフェクションアレイ」を開示している。

[0004] (特許文献2)

特許文献2は、「アテロコラーゲンと、所望の核酸とを含む複合体粒子であって、核酸が1本鎖又は2本鎖であり、粒子の長径が100 μ m以下である複合体粒子」を開示している。

該特許文献に開示の複合体粒子の構成は、本開示の運搬体の構成とは異なる。

[0005] (特許文献3)

特許文献3は、「細胞膜透過性ペプチドを付加したコラーゲン又はコラーゲン誘導体を含む運搬体」を開示している。

該特許文献に開示の細胞膜透過性ペプチドを付加したコラーゲンの構成は、本開示のコラーゲン結合型膜透過性ペプチドの構成とは異なる。詳しくは、該特許文献に開示の細胞膜透過性ペプチドは運搬体と共有結合している。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2006-6262

特許文献2：特許4081436

特許文献3：特開2014-210730

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Cancer Res. 2004 May15;64(10):3365-70

非特許文献2：<http://www.atelocollagen.com/ate logene/japanese/index.html/>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 核酸医薬品のDDSとして脂質ナノ粒子、リポソーム、アプタマーが報告されている。核酸医薬品に修飾を施す高額な機器の導入やPEG修飾によるアレルギー反応など様々な課題がある。ペプチドベースのDDSも研究されているが、核酸医薬品やキャリアタンパク質へ共有結合で連結したデザインのため、標的物質毎に合成する必要がある。

上記課題に対応するために、本課題は、医薬品等を簡便に細胞に導入する運搬体を提供することである。

[0009] 本開示者らは、上記課題を解決するために研究した結果、コラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含むコラーゲン結合型膜透過性ペプチド並びに該ペプチド及びコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体は、上記課題を解決できることを見出して、本開示を完成した。

[0010] 本開示は以下の通りである。

1. コラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含む、コラーゲン結合型膜透過性ペプチド。

2. 各ドメイン間にリンカーが挿入されている、前項1に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド。

3. 前記コラーゲン結合ドメインはTKKTLRT（配列番号1）であり、

前記膜融合ドメインは X_1 FVIX₅AX₇VLX₁₀ALX₁₃X₁₄X₁₅IX₁₇X₁₈I（配列番号2）又はPFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYK（配列番号36）であり、ここで、 X_1 はP又はA、 X_5 はG又はA、 X_7 はG又はA、 X_{10} はG又はA、 X_{13} はG又はA、 X_{14} はT又はA、 X_{15} はG又はA、 X_{17} はG又はA、並びに、 X_{18} はG又はAであり、

前記膜透過ドメインはYGRKKRRQRRR（配列番号3）、RKKRRQRRR（配列番号4）、RQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号5）、GRKKRRQRRRPQ（配列番号6）、rrrrrrrrrr（配列番号7）、AFLGWLGAWGTMGWSPKKKRRK（配列番号8）、RGGRLSYSRRRFSTSTGR（配列番号9）、RRLSYSRRRF（配列番号10）、PIRRRKLLRRLK（配列番号11）、RRQRRTSKLMKR（配列番号12）、RRRRNRTRNRNRVR（配列番号13）、KMTRAQRRAARRNRWTAR（配列番号14）、TRRQRTRRRARRNR（配列番号15）、GRKKRRQRRRPPQ（配列番号16）、GRRRRRRRRRPPQ（配列番号17）、GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL（配列番号18）、KLALKLALKLALALKLA（配列番号19）、MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV（配列番号20）又はGALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV（配列番号21）である、

前項1又は2に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド。

4. 前記コラーゲン結合ドメインはTKKTLRT（配列番号1）であり、

前記膜融合ドメインはPFVIGAGVLGALGTGIGGI（配列番号22）であり、

前記膜透過ドメインはYGRKKRRQRRR（配列番号3）、RKKRRQRRR（配列番号4）又はRQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号5）である、

前項3に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド。

5. 前記コラーゲン結合ドメインはTKKTLRT（配列番号1）であり、

前記膜融合ドメインはPFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYK（配列番号36）で

あり、

前記膜透過ドメインはYGRKKRRQRRR（配列番号3）、RKKRRQRRR（配列番号4）又はRQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号5）である、

前項3に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド。

6. 前項4に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド並びにコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体。

7. 前項5に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド並びにコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体。

8. さらに、運搬対象を含む前項6に記載の運搬体。

9. さらに、運搬対象を含む前項7に記載の運搬体。

10. 前記運搬対象が、タンパク質、ペプチド、核酸、及び／又は低分子化合物である前項8に記載の運搬体。

11. 前記コラーゲン結合型膜透過性ペプチド、前記コラーゲン若しくはコラーゲン誘導体及び／又は前記運搬対象が複合体を形成している、前項8に記載の運搬体。

12. 前項8に記載の運搬体が表面に塗布されている医療用具。

13. 前項8に記載の運搬体が細胞培養面に塗布されている細胞培養器具。

14. 前項8に記載の運搬体を含む薬剤。

15. コラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含むコラーゲン結合型膜透過性ペプチド、コラーゲン若しくはコラーゲン誘導体、並びに運搬対象として癌治療剤を含む、癌治療用運搬体であって、

該コラーゲン結合ドメインはTKKTLRT（配列番号1）であり、該膜融合ドメインはPFVIGAGVLGALGTGIGGI（配列番号22）又はPFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYYK（配列番号36）であり、該膜透過ドメインはYGRKKRRQRRR（配列番号3）、RKKRRQRRR（配列番号4）又はRQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号5）である、癌治療用運搬体。

16. 以下の工程を含む、運搬対象を標的細胞に投与する方法、

コラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含むコラーゲン結合型膜透過性ペプチド、コラーゲン若しくはコラーゲン誘導体並びに運搬対象を含む運搬体を、ヒトを含む哺乳類に投与する工程、

ここで、該コラーゲン結合ドメインはTKKTLRT（配列番号1）であり、

該膜融合ドメインは X_1 FVIX $_5$ AX $_7$ VLX $_{10}$ ALX $_{13}$ X $_{14}$ X $_{15}$ IX $_{17}$ X $_{18}$ I（配列番号2）又はPFVI GAGVLGALGTGIGGITTSTQFYK（配列番号36）であり、ここで、 X_1 はP又はA、 X_5 はG又はA、 X_7 はG又はA、 X_{10} はG又はA、 X_{13} はG又はA、 X_{14} はT又はA、 X_{15} はG又はA、 X_{17} はG又はA、並びに、 X_{18} はG又はAであり、

該膜透過ドメインはYGRKKRRQRRR（配列番号3）、RKKRRQRRR（配列番号4）、RQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号5）、GRKKRRQRRRPQ（配列番号6）、rrrrrrrr（配列番号7）、AFLGWLGAWGTMGWSPKKKRRK（配列番号8）、RGGRLSYSRRRF STSTGR（配列番号9）、RRLSYSRRRF（配列番号10）、PIRRRKLLRRLK（配列番号11）、RRQRRTSKLMKR（配列番号12）、RRRRNRTRNRNRVR（配列番号13）、KMTRAQRRAAARRNRWTAR（配列番号14）、TRRQRTRRRARRNR（配列番号15）、GRKKRRQRRRPPQ（配列番号16）、GRRRRRRRRRPPQ（配列番号17）、G WTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL（配列番号18）、KLALKLALKLALALKLA（配列番号19）、MGLGLHLLVLAAALQGAWSQPKKKRRKV（配列番号20）又はGALFLGWLGAAG STMGAWSQPKKKRRKV（配列番号21）である、

運搬対象を標的細胞に投与する方法。

17. 前記運搬対象は癌治療剤であり、かつ標的細胞は癌細胞である、前項16に記載の投与方法。

18. コラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含む、コラーゲン結合型膜透過性ペプチドを運搬体の製造としての使用であって、

ここで、該コラーゲン結合ドメインはTKKTLRT（配列番号1）であり、

該膜融合ドメインは X_1 FVIX $_5$ AX $_7$ VLX $_{10}$ ALX $_{13}$ X $_{14}$ X $_{15}$ IX $_{17}$ X $_{18}$ I（配列番号2）又はPFVI GAGVLGALGTGIGGITTSTQFYK（配列番号36）であり、ここで、 X_1 はP又はA、 X_5 はG又はA、 X_7 はG又はA、 X_{10} はG又はA、 X_{13} はG又はA、 X_{14} はT又はA、 X_{15} はG又はA

、 X_{17} はG又はA、並びに、 X_{18} はG又はAであり、

該膜透過ドメインはYGRKKRRQRRR（配列番号3）、RKKRRQRRR（配列番号4）、RQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号5）、GRKKRRQRRRPQ（配列番号6）、rrrrrrrr（配列番号7）、AFLGWLGAWGTMGWSPKKKRRK（配列番号8）、RGGRLSYSRRRFSTSTGR（配列番号9）、RRLSYSRRRF（配列番号10）、PIRRRKKLRLK（配列番号11）、RRQRRTSKLMKR（配列番号12）、RRRRNRTRNRNRVR（配列番号13）、KMTRAQRRAAARRNRWTAR（配列番号14）、TRRQRTRRRARRNR（配列番号15）、GRKKRRQRRRPPQ（配列番号16）、GRRRRRRRRRPPQ（配列番号17）、GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL（配列番号18）、KLALKLALKLALALKLA（配列番号19）、MGLGLHLLVLAAALQGAWSQPKKKRRKV（配列番号20）又はGALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRRKV（配列番号21）である、

使用。

発明の効果

[0011] 本開示のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド並びに該ペプチド及びコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体は、下記のいずれか1以上の効果を有する。

（1）運搬対象の標的細胞内導入効率が高い。

（2）コラーゲン結合型膜透過性ペプチド、コラーゲン若しくはコラーゲン誘導体及び運搬対象を混合するだけで複合体（特に、三元複合体）を形成する。

（3）コラーゲン結合型膜透過性ペプチドの各ドメイン間にリンカー（特に、Hisリンカー）を導入すれば、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインの種類を容易に置換することができる。

（4）運搬対象を導入しにくい標的細胞でも運搬対象を高効率で導入することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本開示のコラーゲン結合型膜透過性ペプチドの合成スキーム。

[図2]本開示のCBD-S19-TATの合成確認。

[図3]本開示のCBD-S19-Penetratinの合成確認。

[図4]Niアフィニティーカラムを用いたプルダウンアッセイの概要図。

[図5]本開示の運搬体（アテロコラーゲン(AC)とコラーゲン結合型膜透過性ペプチド）の複合体形成の確認。

[図6]「ACと運搬対象（siRNA）」の複合体形成の確認。

[図7]本開示の「運搬対象を含む運搬体」の細胞毒性評価。

[図8]本開示の運搬体によるRNA干渉（RNAi）の評価。

[図9]本開示のCBD-S19-TATを含む運搬体によるRNAi効果の確認。

[図10]本開示のCBD-S19-Penetratinを含む運搬体によるRNAi効果の確認。

[図11]本開示の運搬体に含まれる運搬対象の各細胞での取り込み量の確認。

[0013]（本開示の対象）

本開示の対象は、「コラーゲン結合型膜透過性ペプチド（以後、「本開示のペプチド」と称する場合がある）」、「該ペプチド並びにコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体（以後、「本開示の運搬体」と称する場合がある）」、「該運搬体が細胞培養面に塗布されている細胞培養器具（以後、「本開示の細胞培養器具」と称する場合がある）」及び「該運搬体を含む薬剤（以後、「本開示の薬剤」と称する場合がある）」である。

[0014] 本開示の「運搬体」は、運搬対象を細胞（標的細胞（運搬対象を導入する細胞））に運搬する作用を有する。さらに、本開示の運搬体は、単に運搬対象を細胞に運搬するだけでなく、徐放性作用、標的細胞への長時間滞留作用、標的細胞周辺特異的な局在作用、運搬対象の生体内分解からの保護作用のいずれか1以上を有する。

[0015]（本開示のペプチド）

本開示のペプチドは、少なくとも、コラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含む。さらに、必要に応じて、各ドメイン間に自体公知のリンカー（特に、Hisリンカー（連続したHisが2、3、4、5、6、7、8、9又は10個から構成されている））を導入しても良い。

加えて、ペプチド中の各ドメインの順番（N末端からC末端）は特に限定さ

れないが、以下を例示できる。

コラーゲン結合ドメインー膜融合ドメインー膜透過ドメイン

コラーゲン結合ドメインー膜透過ドメインー膜融合ドメイン

膜融合ドメインーコラーゲン結合ドメインー膜透過ドメイン

膜融合ドメインー膜透過ドメインーコラーゲン結合ドメイン

膜透過ドメインーコラーゲン結合ドメインー膜融合ドメイン

膜透過ドメインー膜融合ドメインーコラーゲン結合ドメイン

本開示のペプチドは、以下で示す各ドメインを含むペプチドの保護化誘導体、糖鎖修飾体、アシル化誘導体、若しくはアセチル化誘導体も含む。

また、本開示のペプチドは、以下で示す各ドメインを含むペプチドと90～99%（95～99%、97～99%、98～99%）以上の同一性を有しかつ該ペプチドと実質的同質の作用を持つペプチドも含む。

さらに、本開示のペプチドは、以下で示す各ドメインを含むペプチドにおいて、1～5個（1個、2個、3個又は4個）のアミノ酸が置換、欠損、挿入及び／又は付加しておりかつ該ペプチドと実質的同質の作用を持つペプチドも含む。

なお、ペプチド（アミノ酸）の変異の導入や置換において、当該ペプチド（アミノ酸）の基本的な性質（物性、機能、生理活性又は免疫学的活性等）を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等）の間での相互の置換は容易に想定される。

[0016] （コラーゲン結合ドメイン）

コラーゲン結合ドメインは、本開示のペプチドがコラーゲンに結合することができる配列であれば特に限定されない。例えば、TKKTLRT（配列番号1）を例示することができる。

[0017] （膜融合ドメイン）

膜融合ドメインは、本開示のペプチドが細胞膜に融合することができる配

列であれば特に限定されない。例えば、以下の配列を例示することができる。

X₁FVIX₅AX₇VLX₁₀ALX₁₃X₁₄X₁₅IX₁₇X₁₈I（配列番号 2）

PFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYK（配列番号 3 6）

X₁はP又はA、X₅はG又はA、X₇はG又はA、X₁₀はG又はA、X₁₃はG又はA、X₁₄はT又はA、X₁₅はG又はA、X₁₇はG又はA、並びに、X₁₈はG又はAである。

より詳しくは、以下の通りである。

PFVIGAGVLGALGTGIGGI（配列番号 2 2）

AFVIGAGVLGALGTGIGGI（配列番号 2 6）

PFVIAAGVLGALGTGIGGI（配列番号 2 7）

PFVIGA AVL GALGTGIGGI（配列番号 2 8）

PFVIGAGVLAALGTGIGGI（配列番号 2 9）

PFVIGAGVLGALATGIGGI（配列番号 3 0）

PFVIGAGVLGALGAGIGGI（配列番号 3 1）

PFVIGAGVLGALGTAIGGI（配列番号 3 2）

PFVIGAGVLGALGTGIAGI（配列番号 3 3）

PFVIGAGVLGALGTGIGAI（配列番号 3 4）

PFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYK（配列番号 3 6）

なお、配列番号 2 6～配列番号 3 4 及び配列番号 3 6 に記載のペプチドである膜融合ドメインは、配列番号 2 2 に記載のペプチドである膜融合ドメインと同様の効果を有する（参照：Biochemical and Biophysical Research Communications 586（2022）63-67、Journal of Biological Chemistry 298(7)（2022）102097）。

[0018]（膜透過ドメイン）

膜透過ドメインは、本開示のペプチドが細胞膜を透過することができる配列であれば特に限定されない。例えば、以下の公知の配列を例示することができる。

YGRKKRRQRRR（配列番号 3）

RKKRRQRRR (配列番号 4)
RQIKIWFQNRRMKWKK (配列番号 5)
GRKKRRQRRRPQ (配列番号 6)
rrrrrrrr (配列番号 7)
AFLGWLGAWGTMGWSPKKRK (配列番号 8)
RGGRLSYSRRRFSTSTGR (配列番号 9)
RRLSYSRRRF (配列番号 10)
PIRRRKLRRLK (配列番号 11)
RRQRRTSKLMKR (配列番号 12)
RRRRNRTRNRNRVR (配列番号 13)
KMTRAQRRAARRNRWTAR (配列番号 14)
TRRQRTRRARRNR (配列番号 15)
GRKKRRQRRRPPQ (配列番号 16)
GRRRRRRRRRPPQ (配列番号 17)
GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (配列番号 18)
KLALKLALKLALALKLA (配列番号 19)
MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKRKV (配列番号 20)
GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKRKV (配列番号 21)

[0019] (コラーゲン又はコラーゲン誘導体)

本開示での「コラーゲン若しくはコラーゲン誘導体」とは、通常、医療分野、化粧品分野、工業分野及び食品分野で用いられているあらゆる「コラーゲン若しくはコラーゲン誘導体」を意味する。コラーゲンは、可溶性又は可溶化コラーゲンを用いることが好ましい。

可溶性コラーゲンとは、酸性又は中性の水や塩溶液に可溶である。可溶化コラーゲンとは、酵素により可溶化される酵素可溶化コラーゲン、アルカリにより可溶化されるアルカリ可溶化コラーゲンがあり、いずれも孔サイズが1マイクロメートルのメンブレンフィルターを通過できることが好ましい。また、コラーゲンは、いかなる動物種から抽出されたものでも用いることが出

来るが、好ましくは脊椎動物から抽出されたもの、さらに好ましくは哺乳類、鳥類、魚類から抽出されたもの、より好ましくは変性温度が高い哺乳類、鳥類から抽出されたコラーゲンが望ましい。

コラーゲンのタイプもいかなるタイプのコラーゲンでも良いが、動物体内の存在量からⅠ～Ⅴ型が好ましい。具体的には例えば、哺乳動物の真皮から酸抽出したⅠ型コラーゲンが挙げられ、より好ましくは例えば、仔牛の真皮から酸抽出したⅠ型コラーゲン、遺伝子工学的に生産されるⅠ型コラーゲンなどが挙げられる。

また、安全性の面から抗原性の高いテロペプチドを酵素的に除去したアテロコラーゲン又は遺伝子工学的に生産されるアテロコラーゲンが望ましく、1000残基あたりチロシン残基が3以下であるアテロコラーゲンがより好ましい。

なお、本開示の好ましいコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体は、アテロコラーゲンである。

[0020] (本開示の運搬体の作製方法)

本開示の運搬体の作製方法は、自体公知の方法により、本開示のペプチドと本開示でのコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体と運搬対象を混合することにより作製できる。

これにより、複合体（特に、三元複合体）を形成することにより、以下の効果を有する。

(1) 生体内でヌクレアーゼから運搬体である核酸を保護する役割を担う。

(2) 本開示のペプチドが本開示でのコラーゲン/運搬体（例、核酸）と結合することで、効率的に運搬体を細胞内（細胞質内）へ侵入させることができる。

本開示のコラーゲン結合型膜透過性ペプチドは、好ましくは運搬体中で共有結合していない。

[0021] (本開示の運搬体の組成)

本開示の運搬体は、本開示のペプチド、本開示でのコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体、運搬体に加えて、生体親和性材料、添加剤等も含むこともできる。

生体親和性材料としては、例えば、ゼラチン、フィブリン、アルブミン、ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、キチン、キトサン、アルギン酸、ペクチン、アガロース、ハイドロキシアパタイト、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリジメチルシロキサン、又はグリコール酸、乳酸もしくはアミノ酸の重合体もしくはこれらの共重合体、又はこれらの生体親和性材料の2種類以上の混合物等が挙げられる。

添加剤としては、注射剤として用いる場合の等張化剤、pH調節剤、無痛化剤、又は固形剤として用いる場合の賦形剤、崩壊剤、コーティング剤が挙げられる。具体的にはpHを6～8に保つため、又は細胞と等張に保つために用いられる塩類や糖類が挙げられる。

さらに、本開示の運搬体は、固体状であっても溶液状であってもよい。本開示の運搬体が固体状である場合、そのままの状態又は精製水、生理的食塩水、生体と等張な緩衝液等を用いて溶液状とし、所望の細胞に負荷する。

[0022] (本開示の運搬体の用途)

本開示の運搬体の用途は、特に限定されないが、薬剤（特に、ガン治療剤）、医療器具、細胞培養器具、化粧品原料、肥料、食品添加物、標識剤等に使用することができる。

[0023] (本開示の運搬体の投与方法)

本開示の運搬体を生体（ヒトを含む動物、特に、ヒトを含む哺乳類）に投与方法としては、経口、注射、点眼、点鼻、経肺、皮膚を介した吸収のいずれでも良く、好ましくは注射である。投与部位は疾患に応じて選択できるが、手術時に必要な部位（例、ガン細胞、ガン組織）に直接留置することもできる。例えば、本開示の運搬体を、静脈注射（点滴等）による全身投与、患部（癌細胞・癌組織等）に注射することによる局所投与等が挙げられる。

[0024] (運搬対象)

本開示における「運搬対象」は、特に限定されないが、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子化合物等を例示することができる。

[0025] (タンパク質)

酵素や標的受容体に対するアゴニスト・アンタゴニスト、受容体そのもの、抗体等が挙げられるが、特に限定されるものではない。

(ペプチド)

低分子のタンパクであり酵素活性を有するものや機能性たんぱく質の一部を合成したもの、標的受容体に対するアゴニスト・アンタゴニスト等が挙げられるが、特に限定され

るものではない。

(低分子化合物)

低分子医薬である抗癌剤等の腫瘍細胞の死滅に特異的に効果を示すものや、細胞の生理的活性を亢進又は抑制させるものが挙げられるが、特に限定されるものではない。

(核酸)

本開示における「運搬対象である核酸」は、ポリヌクレオチドであってもオリゴヌクレオチドであってもよく、またDNAでもRNA分子でもあり得る。DNA分子の場合、プラスミドDNA、cDNA、ゲノミックDNA又は合成DNAであってもよい。またDNA及びRNAはいずれも2本鎖でも1本鎖でもあり得る。1本鎖の場合、コード鎖又は非コード鎖であり得る。「核酸」にはDNA誘導体又はRNA誘導体が含まれ、該誘導体とはホスホロチオエート結合を有する核酸、又は酵素による分解を避ける為にインターヌクレオチドのリン酸部位、糖部分、塩基部分に化学修飾を施した核酸を意味する。また、「核酸」にはアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスも含まれる。

核酸がプラスミドDNA又はウイルス等の遺伝子治療に用いられるベクターである場合、細胞内に導入されたとき、コードした遺伝情報を細胞内で発現するように構成された形態が好ましく、プロモーター等、目的遺伝子の発現に

必要な要素を含有する、又は染色体への組み込みを可能とする要素を含有するベクター等である。

[0026] (医療用具又は細胞培養器具)

本開示は、本開示の運搬体が表面に塗布されている医療用具又は細胞培養器具も対象とする。

本開示の運搬体を固相表面に塗布し、そこへ標的細胞を接触させると、標的細胞の上から本開示の運搬体を滴加するよりも、運搬対象の導入効率が向上する。

本開示の医療用具とは、人工臓器、より具体的には、人工血管、血管を補強する医療用具ステント、粘着シート又は人工心臓が含まれる。

本開示の細胞培養器具とは、細胞培養実験に通常用いられているシャーレ、フラスコ、96穴マイクロプレート、三次元培養担体等が挙げられる。

[0027] (標的細胞における遺伝子又はタンパク質の機能を調べる方法)

本開示の運搬体を使用すれば、遺伝子又はタンパク質の標的細胞内での機能を容易に調べることができる。例えば、細胞内に機能を調べたい遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを導入して発現させることによってその遺伝子の機能を調べる方法、又は機能を調べたい遺伝子の発現を抑制するsiRNA核酸を細胞内に導入して遺伝子の発現を抑制することによってその遺伝子の機能を調べる方法が有用である。

具体的な測定方法としては、機能を解明したい遺伝子を発現するプラスミドDNA、アデノウイルスベクター又は機能を解明したい遺伝子の発現を抑制するsiRNA核酸と本開示の運搬体を混合し、培養プレート固相上に塗布、整列配置する。塗布した運搬体を乾燥して固相上に固定した後、細胞を播種し、数日間プレート上で培養する。塗布された運搬体は、塗布された部分に接着した細胞に効率的に導入され、機能を調べたい遺伝子を発現又はその発現を長期間抑制する。数日後、細胞の増殖率、形態（表現型）や細胞内での遺伝子発現の状態（遺伝子発現レベル）、又は細胞から産生されたタンパク質の種類や量を調べることによって標的とした遺伝子の機能を明らかにすることが

できる。

[0028] (疾患を処置できる運搬対象をスクリーニングする方法)

本開示の運搬体を使用すれば、遺伝子疾患、癌、AIDS、慢性関節リウマチ、生活習慣病等の様々な疾患を処置し得る候補物質をスクリーニングすることができる。例えば、固相上に疾患の治療効果を調べたい候補物質（例、核酸）と本開示の運搬体を混合し、培養プレート固相上に塗布、整列配置する。塗布した運搬体を乾燥して固相上に固定した後、細胞を播種し、数日間プレート上で培養する。

核酸の効果は、細胞の表現型の変化、細胞死、細胞の増殖、細胞内での遺伝子発現のパターン、産生されるタンパク質の種類や量により解析することができる。

[0029] (運搬体を使用した標的細胞の性質を変える方法)

本開示の運搬体を使用すれば、標的細胞の性質を変えることができる。例えば、特定の細胞内受容体の活性を抑えるアンタゴニストを運搬対象として、標的細胞に投与すれば、該標的細胞は、該アンタゴニストが投与されていない標的細胞と比較して、受容体の活性を低くすることができる（標的細胞の性質を変えることができる）。

加えて、特定のmRNAを分解できるsiRNAを運搬対象として標的細胞に投与すれば、該mRNAを分解し、そのmRNAがコードする機能性タンパク質の発現量を低減させた細胞を得ることができる。

[0030] (標識剤)

本開示は、本開示の運搬体を含む標識剤も対象とする。例えば、標的細胞等を特異的に認識する物質（標的細胞に特異的に結合するペプチド、タンパク質等）に標識物質を結合させた運搬対象を生体に投与すれば、標的細胞を標識することができる。

[0031] (本開示のペプチドの合成方法)

本開示のペプチドの合成方法は、自体公知の方法（有機合成系、細胞系合成系、無細胞合成系等）を利用することができる。

本開示のペプチドの各ドメインの組合せを容易に変更することを考慮すると、In-Fusion反応によるプラスミド合成を使用することが好ましい。各ドメインを各ベクターに担持させ、それらを融合したプラスミドを公知の合成系（例、大腸菌系）に導入して、目的のペプチドを合成することができる（参照：図1）。

[0032] 本開示の運搬体が複合体（特に、三元複合体）を形成していることを確認するために、各ドメイン間にリンカー（例、Hisリンカー）を導入することが好ましい。リンカー（例、Hisリンカー）が導入されているペプチドは、該リンカーと結合するカラム（例、Niアフィニティーカラム）を用いたプルダウンアッセイにより、本開示の運搬体が複合体（特に、三元複合体）を形成していることを確認することができる。

[0033] （本開示の癌治療用運搬体）

本開示の癌治療用運搬体は、上記説明した、コラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含むコラーゲン結合型膜透過性ペプチド、コラーゲン若しくはコラーゲン誘導体、並びに運搬対象として癌治療剤を含む。

[0034] （本開示の運搬対象を標的細胞に投与する方法）

本開示の運搬対象を標的細胞に投与する方法は、以下の工程を含む。

（1）コラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含むコラーゲン結合型膜透過性ペプチド、コラーゲン若しくはコラーゲン誘導体並びに運搬対象を含む運搬体を、ヒトを含む哺乳類に投与する工程。

なお、本開示の方法において、好ましくは、運搬対象は癌治療剤であり、かつ標的細胞・組織は癌細胞・癌組織である。

[0035] （本開示のコラーゲン結合型膜透過性ペプチドを運搬体の製造としての使用）

本開示のコラーゲン結合型膜透過性ペプチドを運搬体の製造としての使用では、上記説明したコラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含む、コラーゲン結合型膜透過性ペプチドを運搬体の製造として使

用する。

[0036] (本開示のペプチドの構成例)

本開示のペプチドは、上記に記載したように、以下の構成を例示することができる。

CBD-S19-YGRKKRRQRRR or RKKRRQRRR or RQIKIWFQNRRMKWKK

CBD-S28-YGRKKRRQRRR or RKKRRQRRR or RQIKIWFQNRRMKWKK

加えて、上記例示したペプチド中の各ドメインの順番 (N末端からC末端) を必要に応じて変更することができる。

さらに、上記例示したペプチド中の各ドメインは、他のペプチドの各ドメインと変更して、本開示のペプチドを構成することもできる。

[0037] 以下、本開示を実施例によりさらに詳細に説明するが、下記の実施例は本開示についての具体的認識を得る一助とみなすべきものであり、本開示の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0038] (本開示のコラーゲン結合型膜透過性ペプチドの合成)

図1に記載の大腸菌発現系により、以下の本開示のコラーゲン結合型膜透過性ペプチドを合成した。

CBD-S19-TAT : MTKKTLRT-HHHHHH-PFVIGAGVLGALGTGIGGI-HHHHHH-YGRKKRRQRRR
(配列番号23)

CBD-S19-Penetratin : MTKKTLRT-HHHHHH-PFVIGAGVLGALGTGIGGI-HHHHHH-RQIKIWFQNRRMKWKK (配列番号24)

[0039] 線状化pET21a(+)ベクターと、CBD, S19, TATおよびPenetratinの各断片を調製し、適当なベクターおよび断片をIn-Fusion^(登録商標) Snap Assembly Master Mix (タカラバイオ) で接続させてプラスミドを調製した。調製したプラスミドの塩基配列は、シーケンス解析 (AZENTA社へ委託) で確認した。得られたプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)株を形質転換し、50 μ g/mlアンピシリンを含む1 LのLB培地にてOD₆₀₀が約0.8になるまで37°Cで振盪培養した。氷上で30分間冷やしてから0.1 mM IPTG (終濃度)を添加した後、16°Cで68~72時

間振盪培養することでタンパク質発現を誘導した。遠心分離 ($4,700 \times g$, 20分) して大腸菌塊を回収し、 -80°C で保存した。培地500 ml分の大腸菌塊をLysate buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 1%(v/v) TritonX-100) 15 mlに懸濁させ、超音波破碎した。遠心分離後のペレットをBind buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM イミダゾール, 6 M グアニジン塩酸) に懸濁させて 37°C で120分振盪し、不溶性タンパク質を変性させて抽出した。遠心分離後の上清を $0.45 \mu\text{m}$ フィルターに通した後、HisTrap FFへ通した。非特異的に結合したタンパク質を50 mM イミダゾールで洗浄後、特異的に結合したタンパク質を1 Mイミダゾールで溶出した。溶出画分をAmiconで限外ろ過し、フィルターを通り抜けた精製タンパク質試料を透析し、純水へ置換した。各画分の成分をSDS-PAGEで分析し、標的物質の有無と純度を測定した。溶媒置換した精製タンパク質試料を液体窒素で凍結させ、一晚 -80°C で保存した。凍結乾燥物の重量を測定し、PBS(-)で10 mMに調製した。

[0040] 本開示のCBD-S19-TATは合成されていることを確認した (図2)。

詳しくは、図2のSDS-PAGEにより、大腸菌発現系の構築に成功していることを確認した。図2のアミノ酸分析により、大腸菌発現系からの精製物がCBD-S19-TATであることを確認した。

[0041] 本開示のCBD-S19-Penetratinは合成されていることを確認した (図3)。

詳しくは、図3のSDS-PAGEにより、大腸菌発現系の構築に成功していることを確認した。図3のアミノ酸分析により、大腸菌発現系からの精製物がCBD-S19-Penetratinであることを確認した。

実施例 2

[0042] (本開示の運搬体の複合体形成)

本実施例では、本開示の運搬体である「ACとコラーゲン結合型膜透過性ペプチド」及び「ACと運搬対象 (siRNA)」が複合体を形成していることを確認した。なお、ACの線維化を防ぐため、電気泳動以外の操作は冷蔵室で実施した。

[0043] (1) 本開示の運搬体である「ACとコラーゲン結合型膜透過性ペプチド」の

複合体形成

0.1% AC（高研社製）とPBS(-)を250 μ lずつ混合し、20分間転倒混和させた。CBD-S19-Penetratinを添加し、ピペティングで混合した（終濃度;AC:0.05%, 機能性ペプチド: 25 μ M）。HisTrap FFに通し、5 mlのPBS(-)で洗浄したのち1.5 mlのElute bufferでカラム結合成分を溶出させた。5-20% Gradient gelによるSDS-PAGEで各画分のタンパク質を分析した。

[0044] (2) 「ACと運搬対象 (siRNA)」の複合体形成

ACとPBS(-)もしくはPBS(-)で調製したsiRNAを1;1で混合・ピペティングし、20分静置してインキュベートした（終濃度; AC: 0.05%, siRNA:500 nM）。各サンプル20 μ lに50% Glycerolを4 μ l添加し、ピペティングで混合した。0.5%アガロースゲルで50 V, 30分間、[+→-]方向に電気泳動した。SYBR Gold染色で核酸の検出・観測を行った後、CBB染色でタンパク質成分の検出・観察を行った。

[0045] アガロースゲル電気泳動によるNiアフィニティーカラムを用いたプルダウンアッセイにより、本開示の運搬体の複合体形成を確認した。プルダウンアッセイの原理を図4に示す。

図5の結果により、ACのバンドがコラーゲン結合型膜透過性ペプチドによってカラム結合画分へシフトしたことを確認した。

これにより、本開示の運搬体は複合体を形成していることを確認した。

[0046] 図6の結果により、運搬対象であるsiRNAのバンドがACによってシフトしたことを確認した。

これにより、「ACと運搬対象 (siRNA)」は複合体を形成していることを確認した。

[0047] 図5及び図6の結果により、コラーゲン結合型膜透過性ペプチド、コラーゲン若しくはコラーゲン誘導体、及び／又は運搬の対象は混合されるだけで複合体を形成されることができる。

実施例 3

[0048] 本実施例では、運搬対象 (siRNA) を含む運搬体が細胞毒性に影響を与えな

い濃度を確認した。

[0049] HepG2（ヒト肝癌由来細胞株）-eGFPの細胞数をセルカウンターで測定して 1.0×10^5 cells/mlに調製し、96ウェルプレートに100 μ lずつ播種し、37°C, 5% CO₂で一晩培養した。4°C下でACとPBS(-)を1:1で混合して、20分間転倒混和した。eGFPの発現を抑制するsiRNA（5'-CUACAACAGCCACAACGUCdTdT（配列番号25）-3'）は0.5-2 μ M, 本開示のペプチドは0.02-1 mMとなるようPBS(-)で調製した。HepG2-eGFPを培養しているウェルへPBS(-)で調製したACを5-20 μ l, siRNAおよび本開示のペプチドを10 μ lずつ添加した（終濃度; AC: 0.005-0.02%, siRNA: 50-200 nM, 機能性ペプチド: 2-100 μ M）。プレートを前後左右に10回程度揺らして培地を混和した。37°C, 5% CO₂でインキュベートし、48時間後に顕微鏡観察した。各ウェルにCCK-8を10 μ lずつ添加し、1時間培養した。CCK-8で反応した各ウェルの培地を新たな96ウェルプレートに移した後、GloMax（登録商標）で450 nmの吸収を測定した。

[0050] 「運搬対象を含む運搬体」の細胞毒性評価を図7に示す。

図7の結果により、本開示の「運搬対象を含む運搬体」は、細胞毒性に大きな影響を与えないことを確認した。

実施例 4

[0051] 本実施例では、運搬対象（siRNA）を含む運搬体の運搬対象の標的細胞内導入効率を確認した。

[0052] HepG2-eGFPの細胞数をセルカウンターで測定して 1.5×10^5 cells/mlに調製し、48ウェルプレートに200 μ lずつ播種し、37°C, 5% CO₂で一晩培養した。各ウェルをPBS (-)で2回洗浄し、培地160-200 μ lと交換した。運搬対象であるeGFP の発現を抑制するsiRNAをPBS(-)で希釈した。ACと各濃度のsiRNA溶液を1:1で混合し、冷蔵室で20分間転倒混和させた。1 mMの本開示のペプチド1 μ lもしくは2 μ lを添加・混合した。培地を交換した各ウェルにAC-siRNA-本開示のペプチドの複合体を40 μ l直接添加し、プレートを前後左右に10回ずつ揺らして混和した（終濃度; AC: 0.01%, siRNA: 100 or 200 nM (20 or 40 pmol), 本開示のペプチド: 5 or 10 μ M)。37°C, 5% CO₂でインキュベートし、

48時間後に顕微鏡観察した。観察後、各ウェルをPBS (-)で2回洗浄後、TrypLE Expressで細胞を剥離して2% FBSを含むPBS(-)300 μ lで回収した。細胞懸濁液をセルストレーナーに通した後、桌上フローサイトメーターで細胞の蛍光強度を測定した。

[0053] 顕微鏡観察の結果を図8に示す。「+ 10 μ M CBD-S19-TAT」及び「+ 10 μ M CBD-S19-Penetratin」に関し、運搬対象であるeGFPの発現を抑制するsiRNA濃度を上昇させると蛍光強度が減少していることを確認した。

CBD-S19-TATを含む運搬体によるRNAi効果の測定結果を図9に示す。siRNA濃度依存的に蛍光強度が減少していることを確認した。特に、「0.01% AC + 200 nM siRNA+ 10 μ M CBD-S19-TAT」の蛍光強度は、「0.01% AC + 200 nM siRNA」と比較して、約1/3 (18.3/55.1) に減少していることを確認した。これはCBD-S19-TATによって運搬対象によるRNAi効果が向上したことを示しており、CBD-S19-TATによって運搬対象の細胞内活性化効率が3倍増加したことに起因している。

CBD-S19-Penetratinを含む運搬体によるRNAi効果の測定結果を図10に示す。siRNA濃度依存的に蛍光強度が減少していることを確認した。特に、「0.01% AC + 200 nM siRNA+ 10 μ M CBD-S19-Penetratin」の蛍光強度は、「0.01% AC+ 200 nM siRNA」と比較して、約1/6 (9.4/55.1) に減少していることを確認した。これはCBD-S19-Penetratinによって運搬対象によるRNAi効果が向上したことを示しており、CBD-S19-Penetratinによって運搬対象の細胞内活性化効率が6倍増加したことに起因している。

実施例 5

[0054] 本実施例では、実施例3及び実施例4に記載の方法と同様に、非小細胞肺癌細胞であるH1299細胞を使用して、運搬対象 (siRNA) を含む運搬体が細胞毒性に影響を与えないことを確認し、さらに、運搬対象の標的細胞内導入を確認した。

[0055] H1299-ZsGreen1細胞の細胞数をセルカウンターで測定して 1.0×10^5 cells/mlに調製し、96ウェルプレートに100 μ lずつ播種し、37°C, 5% CO₂で一晩培養

した。

4℃下でACとPBS(-)を1:1で混合して、20分間転倒混和した。ZsGreen1の発現を抑制するsiRNA (5'-CCTCCTGCGAGAAGATCATdTdT-3' (配列番号35))及び本開示のペプチド(実施例1で合成)をPBS(-)で調製した。H1299-ZsGreen1細胞を培養しているウェルへPBS(-)で調製したAC、siRNAおよび本開示のペプチドを添加した。

各終濃度は、ACは0.01%、siRNAは50-200 nM及び本開示のペプチド2-50 μMであった。

プレートを前後左右に10回程度揺らして培地を混和した。37℃, 5% CO₂でインキュベートし、48時間後に顕微鏡観察した。各ウェルにCCK-8を10 μlずつ添加し、1時間培養した。CCK-8で反応した各ウェルの培地を新たな96ウェルプレートに移した後、GloMax (登録商標)で450 nmの吸収を測定した。

本開示の「運搬対象を含む運搬体」は、非小細胞肺癌細胞に細胞毒性を与えないことを確認した。

[0056] H1299-ZsGreen1細胞の細胞数をセルカウンターで測定して 1.5×10^5 cells/mlに調製し、48ウェルプレートに200 μlずつ播種し、37℃, 5% CO₂で一晩培養した。

各ウェルをPBS (-)で2回洗浄し、培地160-200 μlと交換した。運搬対象であるZsGreen1の発現を抑制するsiRNA (配列番号35)をPBS(-)で希釈した。ACと各濃度のsiRNA溶液を1:1で混合し、冷蔵庫で20分間転倒混和させた。1 mMの本開示のペプチド1 μlもしくは2 μlを添加・混合した。培地を交換した各ウェルにAC-siRNA-本開示のペプチドの複合体を40 μl直接添加し、プレートを前後左右に10回ずつ揺らして混和した(終濃度; AC: 0.01%, siRNA: 20, 50, 100 or 200 nM, 本開示のペプチド: 10 μM)。37℃, 5% CO₂でインキュベートし、48時間後に顕微鏡観察した。観察後、各ウェルをPBS (-)で2回洗浄後、TrypLE Expressで細胞を剥離して2% FBSを含むPBS(-) 300 μlで回収した。細胞懸濁液をセルストレーナーに通した後、卓上フローサイトメーターで細胞の蛍光強度を測定した。

CBD-S19-TAT・Penetratinは、非小細胞肺癌細胞でもヒト肝癌由来細胞と同様な運搬対象の標的細胞内導入効果を示した。

実施例 6

[0057] 本実施例では、膜融合ドメインであるS28（配列番号36：PFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYK）を使用して、実施例5に記載の方法と同様に、運搬対象（siRNA）を含む運搬体の運搬対象の標的細胞（H1299-ZsGreen1細胞）内導入を確認した。

[0058] 実施例1の方法に従い、以下の本開示のコラーゲン結合型膜透過性ペプチドを合成し、精製した。

CBD-S28-TAT：MTKKTLRT-HHHHHH-PFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYK-HHHHHH-YGRKKRRQRRR（配列番号37）

[0059] 実施例5に記載の方法に従い、CBD-S28-TAT導入によるZsGreen1の減少率を確認した。

CBD-S28-TATは、CBD-S19-TATと同様な運搬対象の標的細胞内導入効果を示した。

実施例 7

[0060] 本実施例では、運搬体に含まれる運搬対象の各細胞での取り込み量を確認した。

[0061] 本実施例3-5の方法に従い、図11に記載の培養時間、運搬対象（siRNA）の有無、本開示のコラーゲン結合型膜透過性ペプチドの量及びACの量になるように調整した。

CBD-S28-TAT導入によるH1299細胞又はHepG2細胞それぞれに対してsiRNAが細胞内へ導入された細胞数の割合（1時間）を確認した結果を図11に示す。

また、CBD-S19-TAT導入又はCBD-S19-Penetration導入によるH1299細胞又はHepG2細胞それぞれに対してsiRNAが細胞内へ導入された細胞数の割合（1時間）を確認した結果を図11に示す。

なお、フローサイトメーターで5000個の細胞をカウントし、その中で

蛍光標識したsiRNA（運搬対象）が細胞内へ移行している細胞数を抽出して算出しているため、カウントされた全細胞5000個を100%とした。

図11の結果から明らかなように、本開示のコラーゲン結合型膜透過性ペプチドは、迅速に運搬対象（siRNA）を標的細胞に導入するだけでなく、運搬対象を導入しにくい細胞（例、48時間での導入率5.3%のHepG2細胞）でも高効率で導入することができる。

産業上の利用可能性

[0062] 本開示は、コラーゲン結合型膜透過性ペプチド、並びに該ペプチド及びコラーゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] コラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含む、コラーゲン結合型膜透過性ペプチド。
- [請求項2] 各ドメイン間にリンカーが挿入されている、請求項1に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド。
- [請求項3] 前記コラーゲン結合ドメインはTKKTLRT（配列番号1）であり、
 前記膜融合ドメインは $X_1FVIX_5AX_7VLX_{10}ALX_{13}X_{14}X_{15}IX_{17}X_{18}I$ （配列番号2）又はPFVIGAGVLGALGTGIGITTSTQFYK（配列番号36）であり、ここで、 X_1 はP又はA、 X_5 はG又はA、 X_7 はG又はA、 X_{10} はG又はA、 X_{13} はG又はA、 X_{14} はT又はA、 X_{15} はG又はA、 X_{17} はG又はA、並びに、 X_{18} はG又はAであり、
 前記膜透過ドメインはYGRKKRRQRRR（配列番号3）、RKKRRQRRR（配列番号4）、RQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号5）、GRKKRRQRRRPQ（配列番号6）、rrrrrrrr（配列番号7）、AFLGWLGAWGTMGWSPKKKRK（配列番号8）、RGGRLSYSRRRFSTSTGR（配列番号9）、RRLSYSRRRF（配列番号10）、PIRRRKLRRLK（配列番号11）、RRQRRTSKLMKR（配列番号12）、RRRRNRTRNRRRVR（配列番号13）、KMTRAQRRAAARRNRWTAR（配列番号14）、TRRQRTRRARRNR（配列番号15）、GRKKRRQRRRPPQ（配列番号16）、GRRRRRRRRRPPQ（配列番号17）、GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL（配列番号18）、KLALKLALKLALALKLA（配列番号19）、MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV（配列番号20）又はGALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV（配列番号21）である、
 請求項1又は2に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド。
- [請求項4] 前記コラーゲン結合ドメインはTKKTLRT（配列番号1）であり、
 前記膜融合ドメインはPFVIGAGVLGALGTGIGGI（配列番号22）であり、
 前記膜透過ドメインはYGRKKRRQRRR（配列番号3）、RKKRRQRRR（配列番号4）又はRQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号5）である、

請求項 3 に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド。

[請求項5] 前記コラーゲン結合ドメインはTKKTLRT（配列番号 1）であり、
前記膜融合ドメインはPFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYK（配列番号 3
6）であり、
前記膜透過ドメインはYGRKKRRQRRR（配列番号 3）、RKKRRQRRR（配
列番号 4）又はRQIKIWFQNRMKWKK（配列番号 5）である、
請求項 3 に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド。

[請求項6] 請求項 4 に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド並びにコラー
ゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体。

[請求項7] 請求項 5 に記載のコラーゲン結合型膜透過性ペプチド並びにコラー
ゲン若しくはコラーゲン誘導体を含む運搬体。

[請求項8] さらに、運搬対象を含む請求項 6 に記載の運搬体。

[請求項9] さらに、運搬対象を含む請求項 7 に記載の運搬体。

[請求項10] 前記運搬対象が、タンパク質、ペプチド、核酸、及び／又は低分子
化合物である請求項 8 に記載の運搬体。

[請求項11] 前記コラーゲン結合型膜透過性ペプチド、前記コラーゲン若しくは
コラーゲン誘導体及び／又は前記運搬対象が複合体を形成している、
請求項 8 に記載の運搬体。

[請求項12] 請求項 8 に記載の運搬体が表面に塗布されている医療用具。

[請求項13] 請求項 8 に記載の運搬体が細胞培養面に塗布されている細胞培養器
具。

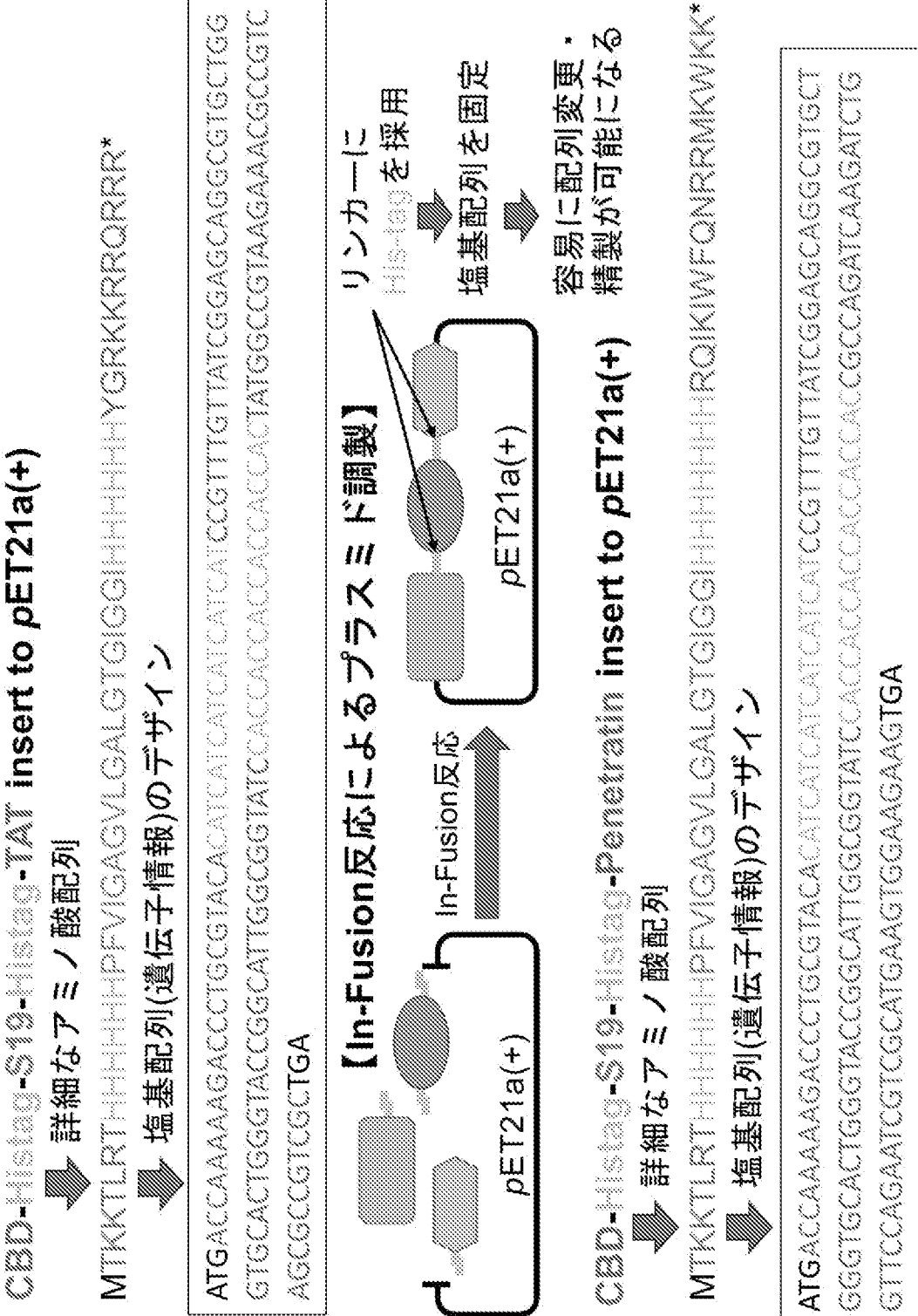
[請求項14] 請求項 8 に記載の運搬体を含む薬剤。

[請求項15] コラーゲン結合ドメイン、膜融合ドメイン及び膜透過ドメインを含むコラーゲン結合型膜透過性ペプチド、コラーゲン若しくはコラーゲン誘導体、並びに運搬対象として癌治療剤を含む、癌治療用運搬体であって、

 該コラーゲン結合ドメインはTKKTLRT（配列番号1）であり、該膜融合ドメインはPFVIGAGVLGALGTGIGGI（配列番号22）又はPFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYK（配列番号36）であり、該膜透過ドメインはYGRKKRRQRRR（配列番号3）、RKKRRQRRR（配列番号4）又はRQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号5）である、

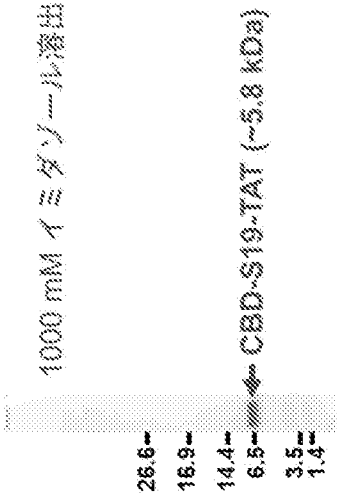
 癌治療用運搬体。

[図1]



[図2]

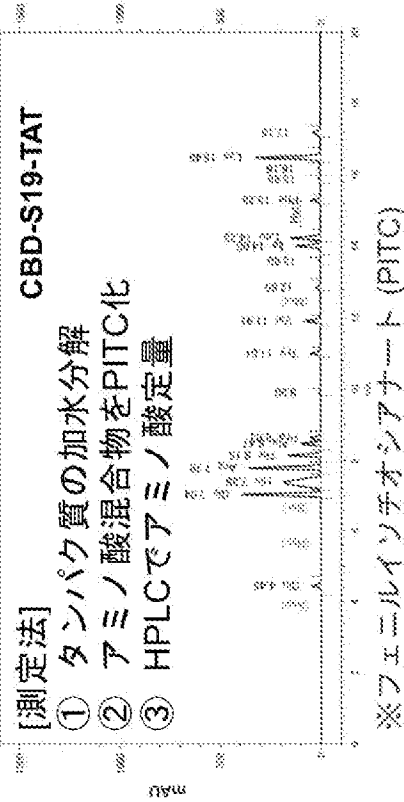
＜大腸菌発現系と精製の条件＞
タンパク質発現誘導後の大腸菌BL21(DE3)株
↓超音波破碎・遠心分離
ペレット（不溶性画分）
↓6 Mグアニジン塩酸塩による変性
↓Niアフィニティー精製
↓限外ろ過精製（30 kDa cut offフィルター）
↓透析(RO水への溶媒置換)
SDS-PAGEによる確認



＜アミノ酸分析＞

ワコーPTC-アミノ酸分析システム 測定波長：254 nm

アミノ酸分布



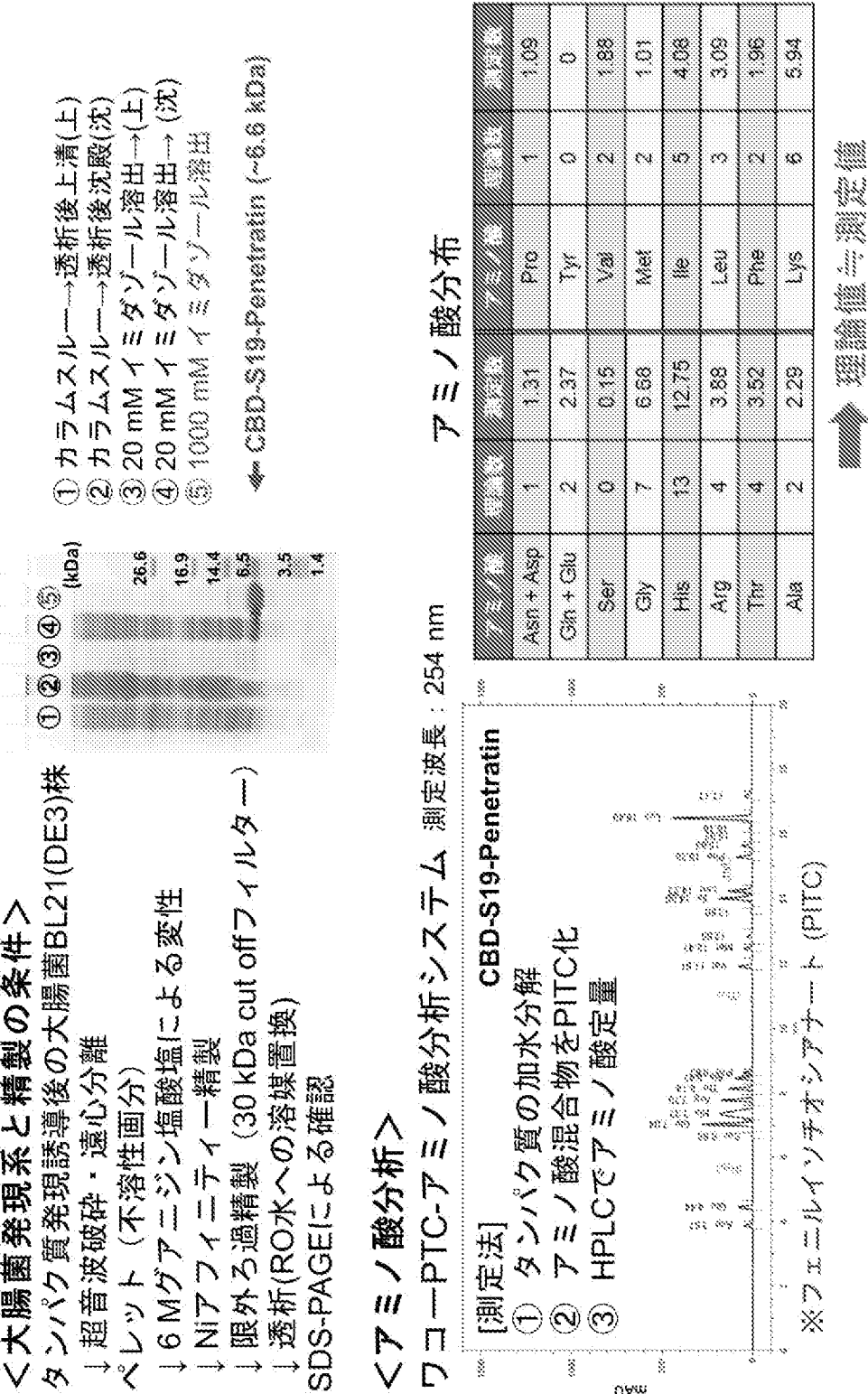
[測定法]

- ① タンパク質の加水分解
- ② アミノ酸混合物をPITC化
- ③ HPLCでアミノ酸定量

アミノ酸	理論値	測定値	アミノ酸	理論値	測定値
Asn + Asp	0	0	Pro	1	1.09
Gln + Glu	1	1.14	Tyr	1	0.98
Ser	0	0	Val	2	1.69
Gly	8	8.24	Met	1	0
His	12	12.66	Ile	3	2.44
Arg	7	7.14	Leu	3	3.10
Thr	4	3.94	Phe	1	1.02
Ala	2	2.17	Lys	4	3.92

理論値と測定値

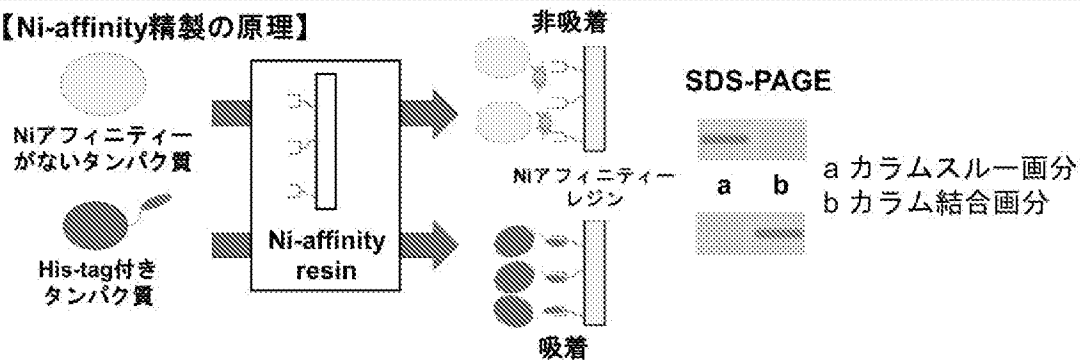
[図3]



[図4]

Niアフィニティーカラムを用いたプルダウンアッセイ

【Ni-affinity精製の原理】



【プルダウンアッセイの原理】 タンパク質間相互作用解析の1つ

< 複合体を形成する場合 >

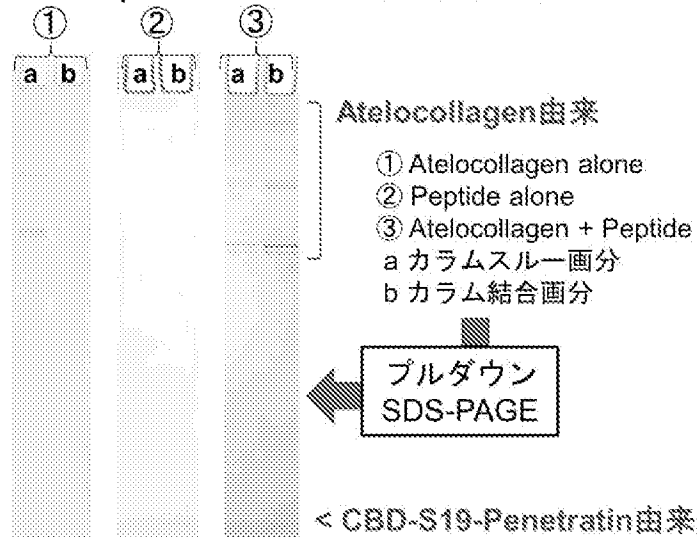


< 複合体を形成しない場合 >



[図5]

< HisTrap FFによるプルダウンアッセイ >

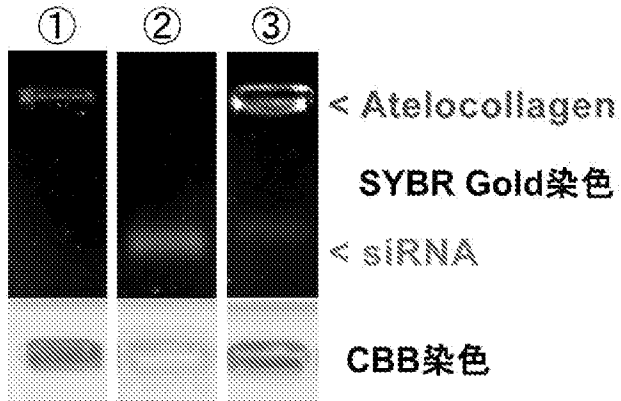


[図6]

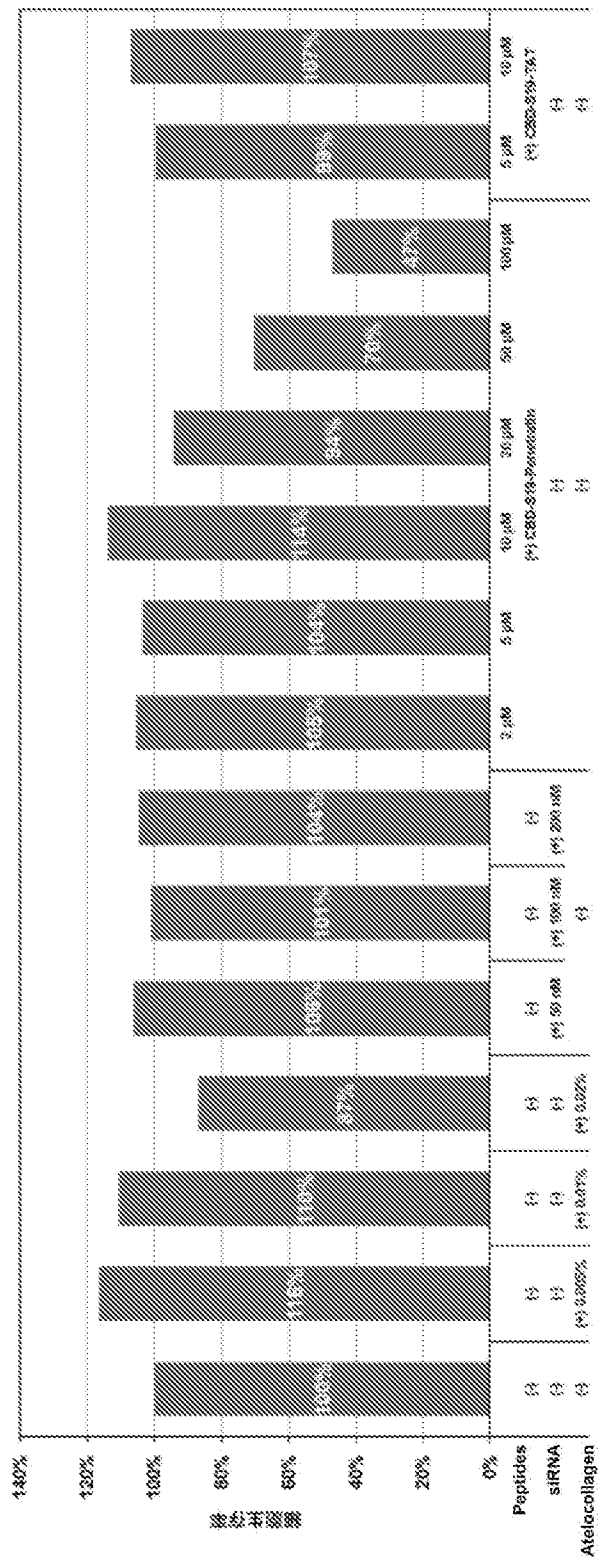
< アガロースゲル電気泳動 >

- ① Atelocollagen alone
- ② siRNA alone + 50% Glycerol
- ③ Atelocollagen + siRNA

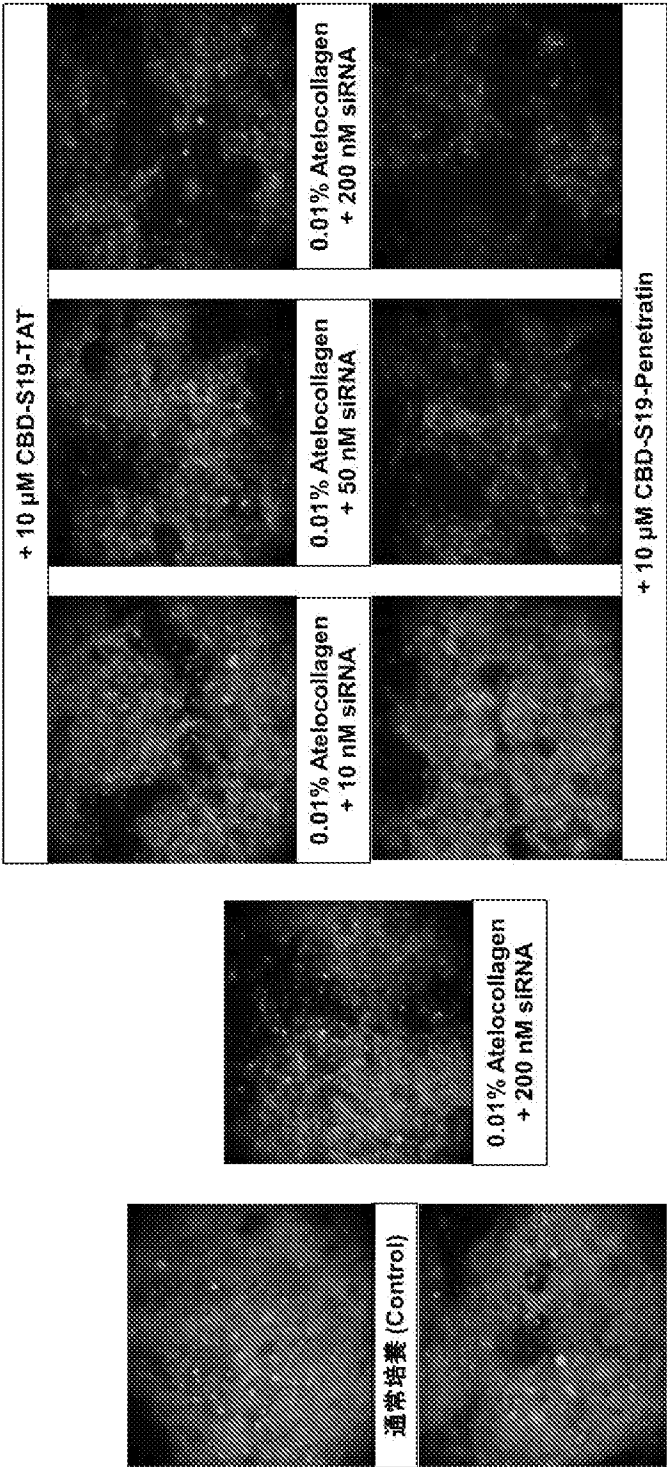
↓
0.5%アガロースゲルで電気泳動



WST-8による生細胞測定

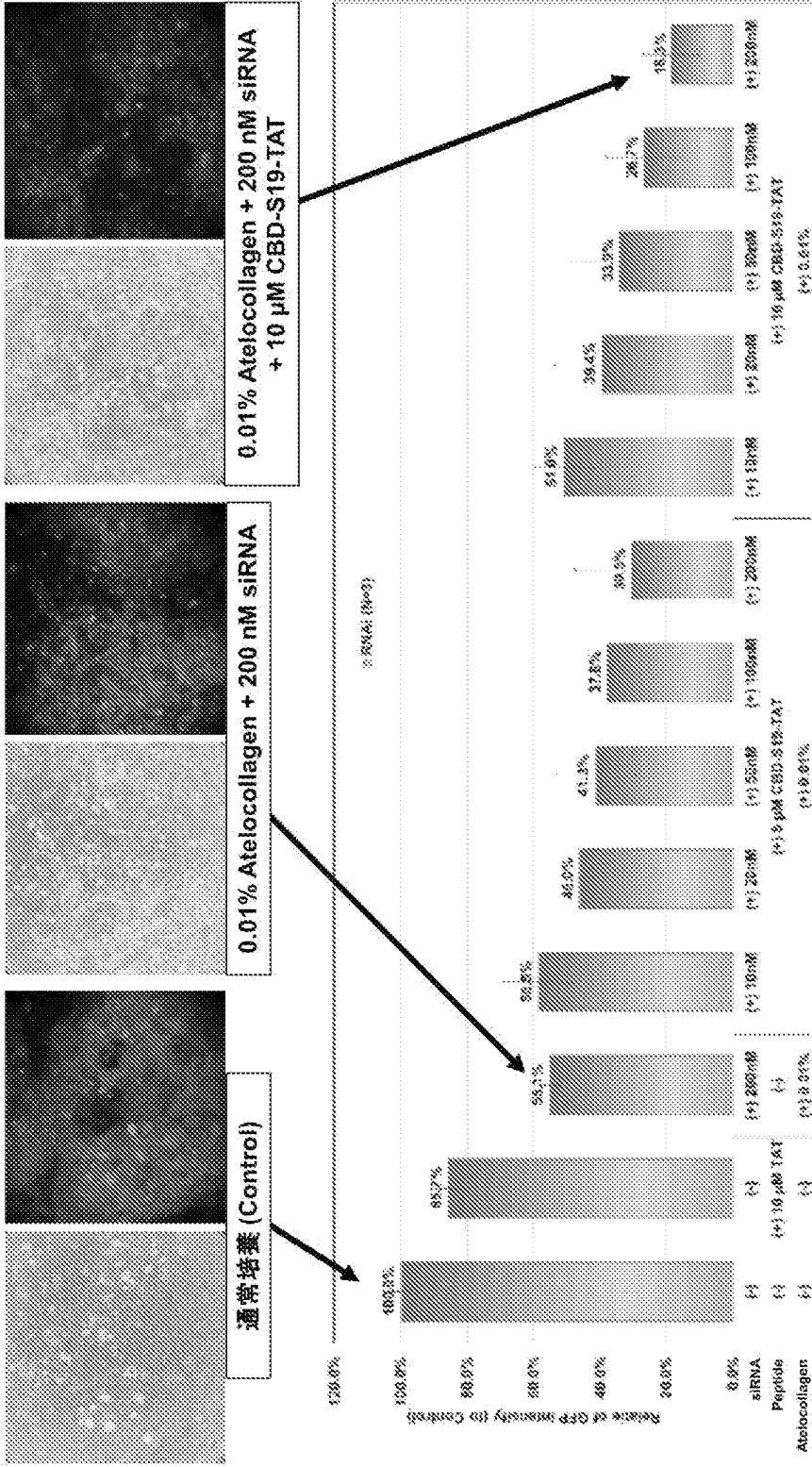


[8]



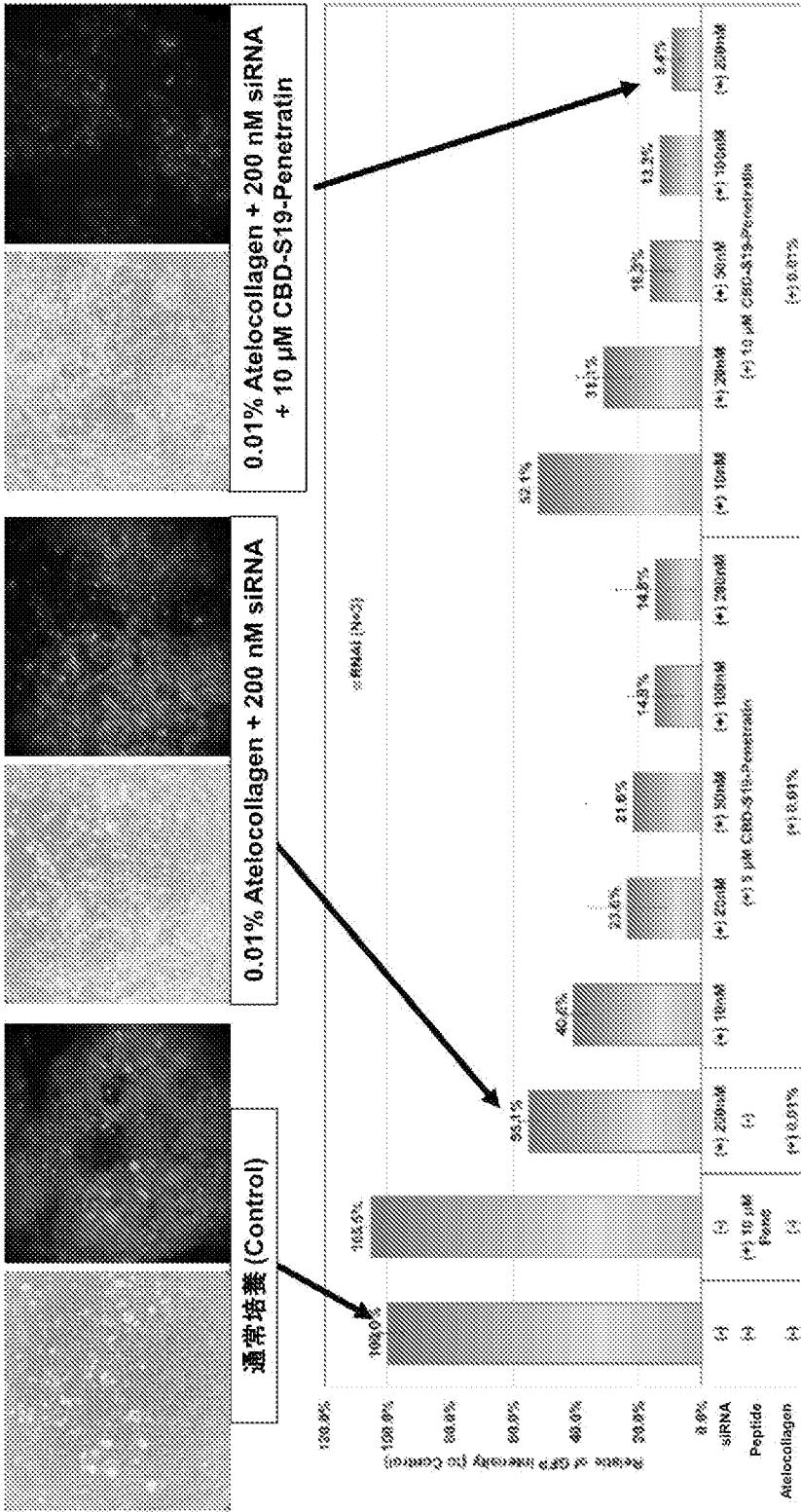
[図9]

ヒト肝がん細胞 HepG2-eGFP ※ 露光時間：位相差-0.3 ms/ 蛍光-5 ms

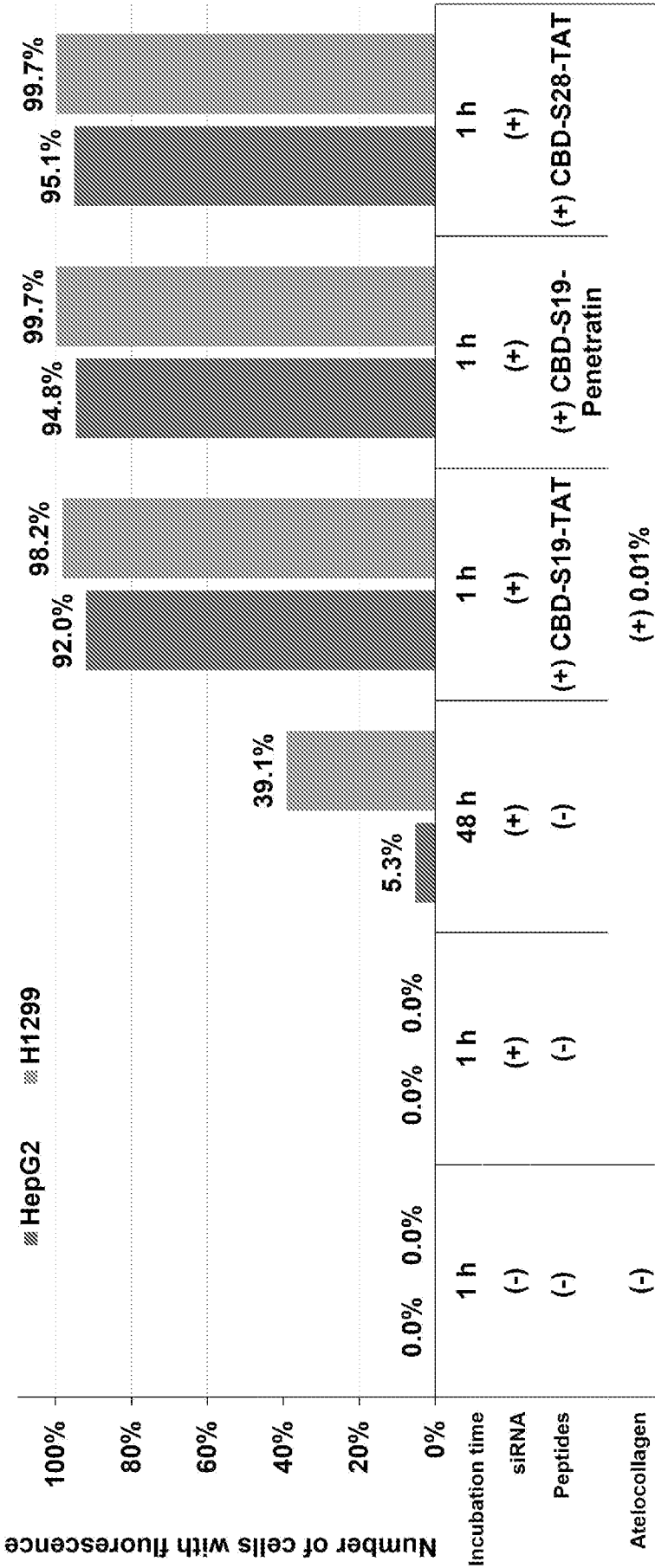


[図10]

ヒト肝がん細胞 HepG2-eGFP ※ 露光時間：位相差-0.3 ms/ 蛍光-5 ms



[11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/026723

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i; **A61K 45/00**(2006.01)i; **A61K 47/42**(2017.01)i; **A61L 31/10**(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i; **C12M 1/00**(2006.01)i; **C12M 3/00**(2006.01)i; **C12N 15/11**(2006.01)i
FI: C07K19/00 ZNA; C12M3/00 A; C12M1/00 A; A61L31/10; A61K47/42; A61K45/00; A61P43/00 111; C12N15/11

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)

C07K1/00-19/00; A61K45/00-45/08; A61K47/00-47/69; A61L15/00-33/18; A61P1/00-43/00; C12M1/00-3/10; C12N15/00-15/90

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	田苗見 綾 他, アテロコラーゲン結合型膜透過性ペプチドの開発とそのメカニズム解析, 第 3 6 回日本 D D S 学会学術集会プログラム予稿集, 10 August 2020, P-65, (TANAMI, Aya et al.), non-official translation (Development of atelocollagen-binding membrane-permeabilizing peptide and its mechanism analysis. Preprints of the 36th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System.) lines 1-8	1-2, 6-11, 14
Y		3-5, 12-13, 15
X	藤本 一朗 他, 核酸デリバリーにおけるアテロコラーゲンと種々の機能性ペプチドのメカニズム解析, 第 3 7 回日本 D D S 学会学術集会プログラム予稿集, 07 June 2021, P-133, (FUJIMOTO, Ichiro et al.), non-official translation (Mechanism analysis of atelocollagen and various functional peptides in nucleic acid delivery. Preprints of the 37th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System.) lines 1-8	1-2, 6-11, 14
Y		3-5, 12-13, 15



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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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

07 August 2024

Date of mailing of the international search report

03 September 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/026723

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/199674 A1 (KEIO UNIVERSITY) 15 December 2016 (2016-12-15) claims, paragraphs [0069], [0084], [0094]	1-15
Y	WO 2023/090381 A1 (PUROTECH BIO, INC.) 25 May 2023 (2023-05-25) claims, paragraph [0062]	3-5, 15
Y	JP 2020-526493 A (SYMIC IP LLC) 31 August 2020 (2020-08-31) claims, paragraph [0056]	3-5, 15
Y	JP 2019-534922 A (CORNELL UNIVERSITY) 05 December 2019 (2019-12-05) claims, paragraph [0027]	3-5, 15
Y	WO 2022/125673 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER) 16 June 2022 (2022-06-16) claims, table 3	3-5, 15
Y	JP 2014-210730 A (KOKEN CO., LTD.) 13 November 2014 (2014-11-13) claims	12-13
Y	WO 2016/068228 A1 (KOKEN CO., LTD.) 06 May 2016 (2016-05-06) claims	12-13
Y	JP 2008-067717 A (SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.) 27 March 2008 (2008-03-27) claims	12-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/026723

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/026723

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016/199674	A1	15 December 2016	US	2018/0237482	A1	
				claims, paragraphs [0079], [0094], [0103]			
				EP	3309178	A1	
WO	2023/090381	A1	25 May 2023	(Family: none)			
JP	2020-526493	A	31 August 2020	US	2021/0290726	A1	
				claims, paragraph [0058]			
				EP	3648775	A1	
JP	2019-534922	A	05 December 2019	US	2019/0231811	A1	
				claims, paragraph [0031]			
				EP	3523339	A1	
WO	2022/125673	A1	16 June 2022	(Family: none)			
JP	2014-210730	A	13 November 2014	(Family: none)			
WO	2016/068228	A1	06 May 2016	(Family: none)			
JP	2008-067717	A	27 March 2008	US	2004/0266004	A1	
				claims			
				EP	1407787	A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C07K 19/00(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; A61L 31/10(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i
FI: C07K19/00 ZNA; C12M3/00 A; C12M1/00 A; A61L31/10; A61K47/42; A61K45/00; A61P43/00 111; C12N15/11

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C07K1/00-19/00; A61K45/00-45/08; A61K47/00-47/69; A61L15/00-33/18; A61P1/00-43/00; C12M1/00-3/10; C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2024年
日本国実用新案登録公報 1996-2024年
日本国登録実用新案公報 1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	田苗見 綾 他, アテロコラーゲン結合型膜透過性ペプチドの開発とそのメカニズム解析, 第36回日本DDS学会学術集会プログラム予稿集, 2020.08.10, P-65 第1行~第8行	1-2, 6-11, 14
Y		3-5, 12-13, 15
X	藤本 一朗 他, 核酸デリバリーにおけるアテロコラーゲンと種々の機能性ペプチドのメカニズム解析, 第37回日本DDS学会学術集会プログラム予稿集, 2021.06.07, P-133 第1行~第8行	1-2, 6-11, 14
Y		3-5, 12-13, 15
A	WO 2016/199674 A1 (学校法人慶應義塾) 15.12.2016 (2016-12-15) 特許請求の範囲、「0069」、「0084」、「0094」	1-15
Y	WO 2023/090381 A1 (ピューロテックバイオ株式会社) 25.05.2023 (2023-05-25) 特許請求の範囲、「0062」	3-5, 15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 07.08.2024

国際調査報告の発送日 03.09.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

松本 淳 4I 4675

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2020-526493 A (サイミック アイピー、 エルエルシー) 31.08.2020 (2020 - 08 - 31) 特許請求の範囲、 「 0 0 5 6 」	3-5, 15
Y	JP 2019-534922 A (コーネル ユニヴァーシティー) 05.12.2019 (2019 - 12 - 05) 特許請求の範囲、 「 0 0 2 7 」	3-5, 15
Y	WO 2022/125673 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER) 16.06.2022 (2022 - 06 - 16) Claims, Table3	3-5, 15
Y	JP 2014-210730 A (株式会社高研) 13.11.2014 (2014 - 11 - 13) 特許請求の範囲	12-13
Y	WO 2016/068228 A1 (株式会社高研) 06.05.2016 (2016 - 05 - 06) 特許請求の範囲	12-13
Y	JP 2008-067717 A (大日本住友製薬株式会社) 27.03.2008 (2008 - 03 - 27) 特許請求の範囲	12-13

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/026723

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2016/199674	A1	15.12.2016	US 2018/0237482 A1 Claims, [0079], [0094], [0103] EP 3309178 A1	
WO	2023/090381	A1	25.05.2023	(ファミリーなし)	
JP	2020-526493	A	31.08.2020	US 2021/0290726 A1 Claims, [0058] EP 3648775 A1	
JP	2019-534922	A	05.12.2019	US 2019/0231811 A1 Claims, [0031] EP 3523339 A1	
WO	2022/125673	A1	16.06.2022	(ファミリーなし)	
JP	2014-210730	A	13.11.2014	(ファミリーなし)	
WO	2016/068228	A1	06.05.2016	(ファミリーなし)	
JP	2008-067717	A	27.03.2008	US 2004/0266004 A1 Claims EP 1407787 A1	