



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201207111 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：100116711

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 05 月 12 日

(51)Int. Cl. : C12N15/87 (2006.01)

A61K47/42 (2006.01)

(30)優先權：2010/05/14 美國

12/780,497

(71)申請人：國立清華大學(中華民國) NATIONAL TSING HUA UNIVERSITY (TW)

新竹市光復路 2 段 101 號

(72)發明人：張大慈 CHANG, MARGARET DAH TSYR (TW)；方韶瓏 FANG, SHUN LUNG

(TW)；周維宜 CHOU, WEI I (TW)；林淑娟 LIN, SHU CHUAN (TW)

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：8 共 48 頁

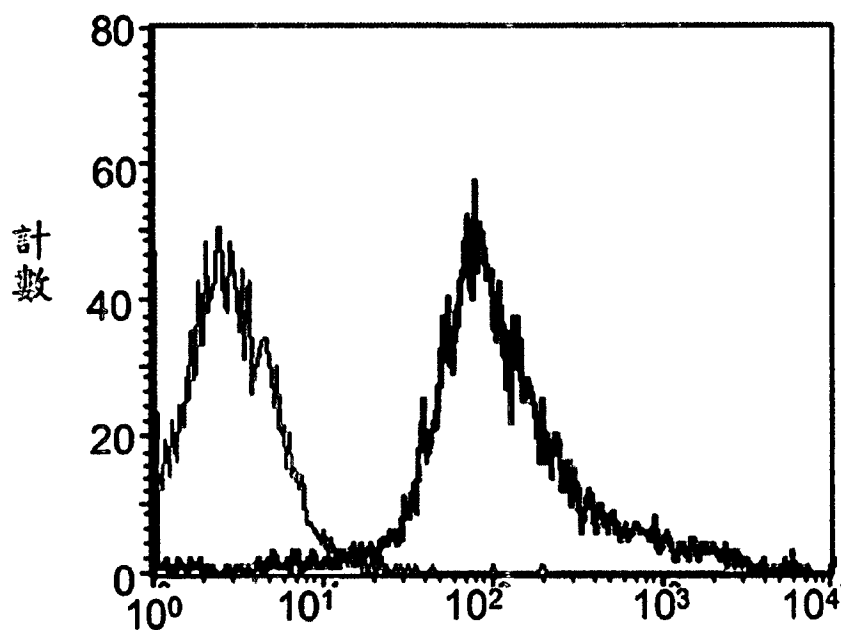
(54)名稱

用於胞內輸送之細胞穿透胜肽

CELL PENETRATING PEPTIDES FOR INTRACELLULAR DELIVERY

(57)摘要

本發明提供一種細胞穿透胜肽，其具有下列胺基酸序列：NYBX₁BX₂BNQX₃。本發明進一步提供一種胞內輸送之方法，包括：(a)提供一本發明之細胞穿透胜肽，及(b)將該細胞穿透胜肽與目標細胞進行培養。本發明亦提供一種複合物，其包含本發明之細胞穿透胜肽及一種選自由治療劑、診斷探針、胜肽、核苷酸、反義寡核苷酸、蛋白質、奈米粒子、微脂體、小分子及標記物質所組成之群組的物質。



樣本

MFI

— 控制組

4.54±0.89

— ECP (32-41)

101.79±2.27



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201207111 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：100116711

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 05 月 12 日

(51)Int. Cl. : C12N15/87 (2006.01)

A61K47/42 (2006.01)

(30)優先權：2010/05/14 美國

12/780,497

(71)申請人：國立清華大學(中華民國) NATIONAL TSING HUA UNIVERSITY (TW)

新竹市光復路 2 段 101 號

(72)發明人：張大慈 CHANG, MARGARET DAH TSYR (TW)；方韶瓏 FANG, SHUN LUNG

(TW)；周維宜 CHOU, WEI I (TW)；林淑娟 LIN, SHU CHUAN (TW)

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：8 共 48 頁

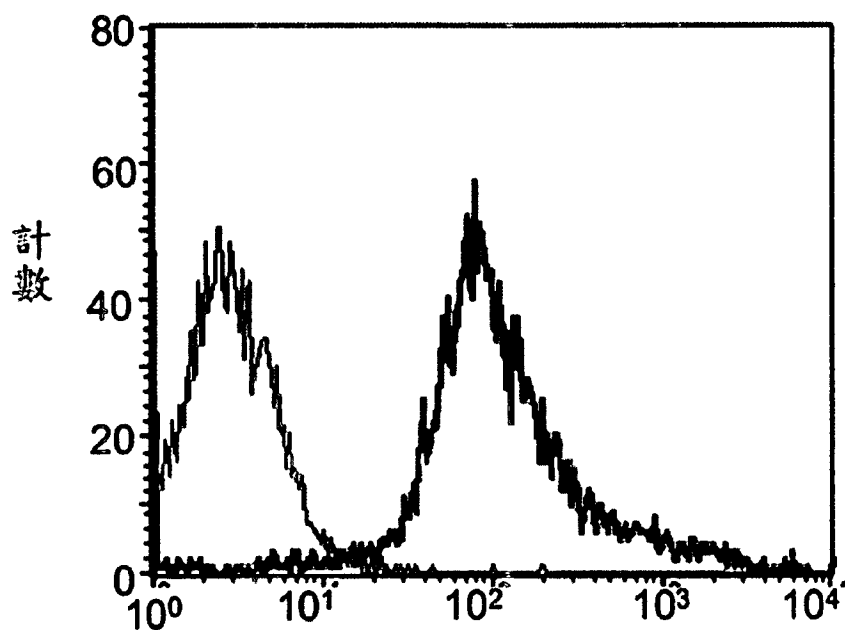
(54)名稱

用於胞內輸送之細胞穿透胜肽

CELL PENETRATING PEPTIDES FOR INTRACELLULAR DELIVERY

(57)摘要

本發明提供一種細胞穿透胜肽，其具有下列胺基酸序列：NYBX₁BX₂BNQX₃。本發明進一步提供一種胞內輸送之方法，包括：(a)提供一本發明之細胞穿透胜肽，及(b)將該細胞穿透胜肽與目標細胞進行培養。本發明亦提供一種複合物，其包含本發明之細胞穿透胜肽及一種選自由治療劑、診斷探針、胜肽、核苷酸、反義寡核酸、蛋白質、奈米粒子、微脂體、小分子及標記物質所組成之群組的物質。



樣本

MFI

— 控制組

4.54±0.89

— ECP (32-41)

101.79±2.27

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於分子的胞內輸送，例如：胜肽、反義寡核
酸、奈米粒子、蛋白質或核苷酸。具體而言，本發明係關於一
種衍生自嗜酸性白血球陽離子蛋白質（eosinophil cationic
protein, ECP）的新穎細胞穿透胜肽（cell penetrating peptide,
CPP），其具有高細胞穿透效率及低毒性。

【先前技術】

通常細胞膜的屏障使得蛋白質、核酸或大型親水性治療
藥劑無法穿透細胞內，因此運送各種分子由細胞外進入細胞
內，為藥物輸送領域的一項挑戰。為解決此問題，目前已經開
發出數種載體輸送系統，其中之一為以胜肽為基礎的輸送系
統。具有細胞穿透特性的胜肽擁有許多優勢，不僅可修改序列
使胜肽載體應用於不同的細胞中，同時可針對不同的目的結合
各式藥物或小分子物質。細胞穿透胜肽（例如：由果蠅觸角足
突變衍生的穿膜肽和人類免疫缺陷病毒的 Tat 胜肽）已廣泛用
於傳遞胜肽、蛋白質和寡核苷酸進入細胞，其應用領域的範圍
從細胞生物學到生物醫學研究。細胞穿透胜肽的免疫相關性對
生物醫學研究非常重要，然而目前大多數使用的細胞穿透胜肽

都非源自人類，可能誘發體內免疫反應，尤其當細胞穿透胜肽與蛋白質或奈米粒子結合時。因此，從人類蛋白質序列中發現的細胞穿透胜肽（例如：衍生自人體降血鈣素的胜肽、與人類蛋白訊息序列相關的胜肽）是極具發展性的載體。

由活化的嗜酸性白血球分泌的人類嗜酸性白血球陽離子蛋白質（ECP）具有 133 個胺基酸、等電點（pI）為 10.8，因不同糖基化程度，其分子量範圍為 16 至 22 kDa。人類嗜酸性白血球陽離子蛋白對革蘭氏陽性菌（例如：金黃色葡萄球菌（*S. aureus*））和革蘭氏陰性菌（包括大腸桿菌（*E. coli*））都具有抗菌活性。除了抗菌活性，人類嗜酸性白血球陽離子蛋白亦具有蠕蟲毒性（helminthotoxic）和抗呼吸融合病毒（RSV）活性。過去的研究指出人類 ECP(1-45)胜肽具有抗菌能力，其中必要的胺基酸序列為 ECP(24-45)。已知細胞表面的葡萄胺聚糖（GAGs）（特別是硫酸乙醯肝素蛋白多糖（HSPGs））會促進 ECP 經巨胞飲作用（macropinocytosis）進入細胞。本研究結果顯示位於 ECP(34-38)區域內且含有帶電胺基酸和芳香胺基酸的序列可調節 ECP 和肝素之間的作用。美國專利第 7,595,374 號中也揭露該序列的特性。

此外，已經證實抗菌胜肽和細胞穿透胜肽具有相似的功能特性。例如，源自南非爪蛙 *Xenopus laevis* 皮膚的爪蟾抗菌肽（Magainin 2）不但能進入哺乳動物細胞還表現出抗菌活性。

【發明內容】

本發明中揭露一種源自於嗜酸性白血球陽離子蛋白質（ECP）的新穎細胞穿透胜肽的生物功能和潛在應用，此細胞穿透胜肽包含一肝素結合序列。

本發明提供一種細胞穿透胜肽，其包含下列胺基酸序列：NYBX₁BX₂BNQX₃，其中 N 代表天門冬醯胺，Y 代表酪胺酸，B 代表一鹼性胺基酸，X₁ 代表一具有一芳基、一疏水性或一不帶電之側鏈的胺基酸，X₂ 代表任何胺基酸，Q 代表麩醯胺酸，且 X₃ 代表天門冬醯胺或不存在。

在本發明之一具體實施例中，上述胺基酸序列中的 X₁ 代表色胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸。在另一具體實施例中，上述胺基酸序列中的 X₂ 代表一極性且不帶電之胺基酸。在另一具體實施例中，上述胺基酸序列中的 X₂ 代表半胱胺酸。

在本發明之一具體實施例中，該細胞穿透胜肽之胺基酸序列係 SEQ ID NO: 1。在本發明之另一具體實施例中，該細胞穿透胜肽之胺基酸序列係 SEQ ID NO: 2。

在本發明的一個態樣中，該細胞穿透胜肽進一步包含一種物質。本文中所使用之術語「物質」包括但不限於治療劑、診斷探針、胜肽、核苷酸、反義寡核苷酸、蛋白質、奈米粒子、微脂體、小分子及標記物質。

術語「反義寡核酸」或「反義化合物」可交互使用且代表一種環狀單元之序列，各單元具有鹼基配對部分，藉由單元間鏈結連接使得該些鹼基配對部分得以由華生-克立克鹼基配對雜交至一核苷酸型式的目標序列（通常為一 RNA），以在該目標序列中形成一核苷酸：寡聚合物非互補雙螺旋。該環狀單元係以核糖或其他五碳糖或者，在一較佳具體實施例中為一嗎啉基（嗎啉基）為主。該寡聚合物可具有與該目標序列完全或相近的序列互補性；一般而言在靠近寡聚合物終端序列變異比在內部序列變異為佳。

術語「標記物質」包含放射性同位素（例如： ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、或 ^{32}P ）、酵素（例如：鹼性磷酸酵素（alkaline phosphatase）、山葵過氧化酵素（horseradish peroxidase）、冷光素（luciferase）、或 β -半乳糖酵素（ β -galactosidase））、螢光物質（例如：螢光素（fluorescein）、羅丹明（rhodamine）、藻紅素（phycoerythrin）、綠色螢光蛋白（GFP）或藍色螢光蛋白（BFP））、發光物質（例如：QdotTM 奈米粒子，由 Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA 所提供）、或磁性物質等。

本發明亦提供一種胞內輸送的方法，一種胞內輸送之方法，包括：a. 提供一胺基酸序列為 $\text{NYBX}_1\text{BX}_2\text{BNQX}_3$ 之細胞穿透胜肽，其中 N 代表天門冬醯胺，Y 代表酪胺酸，B 代表一鹼性胺基酸， X_1 代表一具有一芳基、一疏水性或不帶電之

側鏈的胺基酸， X_2 代表任何胺基酸， Q 代表麩醯胺酸，且 X_3 代表天門冬醯胺或不存在，及 b. 將該細胞穿透胜肽與目標細胞進行培養。

在本發明之一具體實施例中，該細胞穿透胜肽進一步包含一種選自由治療劑、診斷探針、胜肽、核苷酸、反義寡核酸、蛋白質、奈米粒子、微脂體、小分子及標記物質組成之群組的物質。在本發明之另一具體實施例中，該目標細胞為肺臟細胞、卵巢細胞、胃細胞或腸細胞。

本發明進一步提供一種複合物，其包含本發明之胜肽及一種選自由治療劑、診斷探針、胜肽、核苷酸、反義寡核酸、蛋白質、奈米粒子、微脂體、小分子及標記物質所組成之群組的物質，其中該物質較佳係選自由標記物質、胜肽及蛋白質組成之群組。在一具體實施態樣中，本發明係關於利用一種細胞穿透胜肽，或如上述之複合物，以製備一種用於治療或科學研究之醫藥組合物。

本發明亦提供一種用於將一物質輸送至一主體內之方法，包含：a. 製備一複合物，其包含本發明之細胞穿透胜肽及一種選自由治療劑、診斷探針、胜肽、核苷酸、反義寡核酸、蛋白質、奈米粒子、微脂體、小分子及標記物質組成之群組的物質，其中該物質較佳係選自由標記物質、胜肽及蛋白質組成之群組；及 b. 經口腔、關節內、腹腔內、脊椎腔內、動脈內、

鼻內、實質細胞內、皮下、肌肉內、靜脈內、皮膚、直腸內或局部將該複合物施予該主體，其中該主體係一種脊椎動物，或更具體而言，係一斑馬魚。在一較佳具體實施例中，該物質較佳係選自由標記物質、胜肽及蛋白質組成之群組。

【實施方式】

實例 1

鑑定 ECP(32-41)的特定肝素結合胺基酸

細胞培養

將人類支氣管上皮細胞 (Beas-2B) 培養於 RPMI 1640 培養基 (Gibco, Invitrogen, USA)，輔以熱滅活性十分之一的胎牛血清 (FBS) (Gibco, Invitrogen, USA) 和百分之一的麩醯胺酸—青黴素—鏈黴素 (biosera)。將細胞加入 100 毫米的培養皿中，放置於攝氏三十七度、含百分之五二氧化碳的培養箱中培養。

蛋白表現和純化

為進行細胞結合試驗，選用 pMAL-C2G 載體 (New

England Biolabs) 表現和純化重組人類嗜酸性白血球陽離子蛋白質。以 *EcoRI* 和 *XbaI* 區間融合 *N*-端麥芽糖結合蛋白質 (MBP)，並以可溶形式表現於在大腸桿菌中。利用 QuickChange 定點突變技術將人類嗜酸性白血球陽離子蛋白的胺基酸中第 34 個精胺酸、第 35 個色胺酸、第 36 個精胺酸和第 38 個離胺酸個別以其他胺基酸取代，本實驗使用的引子對列於下表：

突變位	SEQ ID NO:	引子序列 (5 端-3 端)
R34A	8	GCAATTAACAATTATGCATGGCGTTGCAAAAACC
	9	GGTTTTTGCAA CGCCATGCATAATTGTTAATTGC
R34K	10	GCAATTAACAATTATAAATGGCGTTGCAAAAACC
	11	GGTTTTTGCAACGCCATTTATAATTGTTAATTGC
W35A	12	ATTAACAATTATCGAGCGCGTTGCAAAAACC
	13	GGTTTTTG CAACGCGCTCGATAATTGTTAAT
W35F	14	ATTAACAATTATCGATTTCGTTGCAAAAACC
	15	GGTTTTTGCAACGAAATCGATAATTGTTAAT
W35Y	16	ATTAACAATTATCGATCTCGTTGCAAAAACC
	17	GGTTTTTGCAACGAGATCGATAATTGTTAAT
R36A	18	CAATTATCGATGGGCTTGCAAAAACCAAATACT
	19	GTATTTTGGTTTTTTGCAAGCCCATCGATAATTG
R36K	20	CAATTATCGATGGAAATGCAAAAACCAAATACT
	21	GTATTTTGGTTTTTTGCAATTTTCATCGATAATTG
K38A	22	TATCGATGGCGTTGCGCAAACCAAATACT
	23	AAAGTATTTTGGTTTTGCGCAACGCCATCGAT
K38R	24	TATCGATGGCGTTGCAAAAACCAAATACT
	25	AAAGTATTTTGGTTTTTGGCAACGCCATCGAT

*R 代表精胺酸；A 代表丙胺酸；K 代表離胺酸；W 代表色胺酸；F 代表苯丙胺酸；及 Y 代表酪胺酸。

以氯化鈣法製備大腸桿菌勝任細胞，並以傳統方法進行質體的轉殖。重組正常型 MBP-ECP 和其單點突變 MBP-ECP，經 IPTG 誘導劑誘導表現蛋白，以親和層析法進行蛋白質純化。

細胞酵素連結免疫吸附分析法（細胞免疫吸附分析法 ELISA）

將人類支氣管上皮細胞（Beas-2B）接種於 96 孔培養皿，接種密度為每孔 2×10^4 細胞，並在攝氏三十七度、含百分之五二氧化碳的環境培養 24 小時。將人類支氣管上皮細胞（Beas-2B）在 96 孔培養皿中分別加入不同濃度的野生型或突變 MBP-ECP 處理，置於攝氏 4 度的環境 1 小時。接著用冰磷酸鹽緩衝液潤洗細胞，以 2 % 三聚甲醛於室溫固定 15 分鐘，之後在室溫以 2 % 小牛血清蛋白／磷酸鹽緩衝液混合 90 分鐘。最後以增強型化學冷光檢測技術（ECL）檢測系統測量 MBP-ECP 與細胞結合的訊息強度，以小鼠單株抗麥芽糖結合蛋白抗體檢測 MBP-ECP，並加入接合 HRP 的山羊抗小鼠 IgG 為第二級抗體。

為分析肝素結合區域的序列相關性，將人類支氣管上皮細胞與各濃度的正常型 MBP-ECP 或單點突變 MBP-ECP (200、400、600 和 800 nM) 在攝氏 4 度培養 1 小時後，以 λ_{ex} 為 570 奈米偵測螢光。將 800 nM 正常型 MBP-ECP 與人類支氣管上皮細胞結合的平均值設為 100%，其他單點突變 MBP-ECP 與細胞結合量都以 800 nM 正常型 MBP-ECP 為依據計算相對結合親和力。圖 1 為正常型 MBP-ECP 與單點突變 MBP-ECP 對人類支氣管上皮細胞的相對結合能力比較，利用丙胺酸掃描式突變法判別與肝素結合時必需的胺基酸。單點突變 MBP-ECP 中 R34A、R36A 和 R38A 突變蛋白與人類支氣管上皮細胞結合能力減弱，證明結合區域中帶正電的胺基酸與肝素分子間交互作用具有相關性 (圖 1A)。此外，以同類帶電胺基酸取代的突變 MBP-ECP 包括 R34K、R36K 和 K38R，對人類支氣管上皮細胞的結合能力與正常型 MBP-ECP 相當 (圖 1B)，顯示結合反應主要為正負電結合，而非特定胺基酸序列。接著以單點突變 MBP-ECP 中 W35F 或 W35Y 蛋白確定肝素結合是否需要 ECP 第 35 個位置的芳香族胺基酸。結果顯示單點突變 W35F 或 W35Y 仍然能夠與人類支氣管上皮細胞結合 (圖 1B)。因此 Trp35 可以其他胺基酸取代，包括酪胺酸、苯丙胺酸和丙胺酸 (圖 1A)，顯示此位置可容忍多種胺基酸突變。綜合上述，可定義 ECP 的肝素結合區域為一致序列：BXXBXB，其係由鹼性 (B) 和疏水性或不帶電的 (X) 胺基酸

組成。

實例 2

ECP(32-41) 的細胞穿透性

流式細胞儀

將細胞（人類支氣管上皮細胞，每孔 2.0×10^5 細胞）接種於 6 孔微孔培養皿，於含十分之一熱滅活性牛血清的 RPMI1640 培養液在攝氏 37 度環境下培養 24 小時。細胞貼附完成後，更換成新鮮含血清之培養液，於培養基中加入以螢光物質標定的胜肽，之後再以磷酸鹽緩衝液潤洗。接著在攝氏 37 度以 0.25% 胰蛋白酶處理細胞 10 分鐘，之後再加入磷酸鹽緩衝液，於攝氏 4 度以 $300 \times g$ 離心 5 分鐘。將上清液移除，以磷酸鹽緩衝液潤洗細胞，在攝氏 4 度以 $300 \times g$ 離心 5 分鐘。再次重複潤洗程序，再將細胞懸浮於磷酸鹽緩衝液中，以 488 奈米的雷射激發 515-545 奈米的散射光，用 FACScalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 流式細胞儀進行螢光分析。

為評估胜肽運輸，人類支氣管上皮細胞以 $20 \mu M$ FITC(對照組) 或 FITC-ECP(32-41) (SEQ ID No: 1) 處理 30 分鐘。隨

後以胰蛋白酶移除結合在細胞表面外的 FITC-ECP(32-41) 螢光。以胰蛋白酶處理細胞後，再經離心及潤洗步驟，以流式細胞儀量化 FITC-ECP(32-41) 螢光標記胜肽的細胞穿透性。加入 FITC-ECP(32-41) 處理後的細胞可發現明顯螢光訊號（圖 2），此結果顯示 ECP(32-41) 可穿透人類支氣管上皮細胞。

實例 3

ECP(32-41) 的細胞內分佈

共軛焦顯微鏡

將細胞（ 1.0×10^4 細胞/孔）接種於 18 mm 的玻璃底培養皿（Marienfeld, Germany），培養於含十分之一熱滅活性胎牛血清的培養皿達 24 小時。附著完成後，移除細胞培養基，然後在含螢光標記胜肽的新鮮培養基中繼續培養。將細胞以磷酸鹽緩衝液潤洗，在磷酸鹽緩衝液中以百分之二的三聚甲醛（PFA）固定 15 分鐘，加入含 50 mM 氯化銨的磷酸鹽緩衝液消去三聚甲醛的螢光。隨後以共軛焦雷射顯微鏡（Zeiss）分析細胞內螢光標記胜肽的分佈情形。

運用共軛焦顯微鏡研究 Beas-2B 細胞中的

FITC-ECP(32-41) 胞內分佈情形。以 5 μ M FITC-ECP(32-41) 處理 5 分鐘後，可在 Beas-2B 細胞內觀察到明顯螢光訊號，表示 ECP(32-41) 可在短時間內進入細胞。當細胞以 FITC-ECP(32-41) 處理 60 分鐘後，可得到更強的訊號。如圖 3 所示，在細胞質和細胞核中都觀察到細胞內 ECP(32-41) 的分佈，證明 ECP(32-41) 穿透細胞之運輸過程與時間相關。

實例 4

ECP(32-41) 穿透能力與長度相關

ECP(32-41) 由 10 個胺基酸組成，屬於長度中等的細胞穿透胜肽，其包含能夠讓 ECP 和細胞表面硫酸乙醯肝素蛋白多糖作用的肝素結合區域。為找出細胞穿透活性的最低序列要求，合成移除 C 端序列的短胜肽，並用短胜肽處理人類支氣管上皮細胞，接著利用共軛焦顯微鏡進行分析。圖 4 顯示 ECP(32-41) 和 ECP(32-41) D1 (SEQ ID No: 2) 兩者皆可以進入人類支氣管上皮細胞，而 ECP(32-41) D2 (SEQ ID No: 3) 則不能。然而以 ECP(32-41) 處理的細胞，觀察到較強的螢光訊號，表示有效的細胞吸收所需要的長度為 10 個胺基酸。

實例 5

ECP(32-41)的蛋白質傳遞

蛋白質表現和純化

使用增強型綠螢光蛋白（eGFP）融合蛋白進行細胞穿透試驗。利用標準的聚合酵素連鎖反應複製生成含 eGFP 和 eGFP-ECP(32-41) 的基因片段碼。eGFP 和 eGFP-ECP(32-41) 基因片段碼係衍生自 pEGFP-N1 載體（Clontech），本實驗使用的引子對列於下表：

基因片段碼	SEQ ID NO:	引子序列 (5 端-3 端)
eGFP	26	CATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
	27	CGAGTGCGGCCGCGAATTCACCTTCTTGTACAGCTCGTCA
eGFP-ECP (32-41)	28	CATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
	29	GAATTCAATTTTGGTTTTTGCAACGCCATCGATAATTCTTCTGTACAGCTCGTCCATG

將聚合酵素連鎖反應產物單獨複製到 pET-28a 載體（New England Biolab，Beverly，MA）*NdeI* 和 *EcoRI* 區間，以產生重組的 pET-28a-eGFP 和 pET-28a-eGFP-ECP(32-41) 質體，兩質體分別轉型入大腸桿菌中以表現重組蛋白質。將 5 毫升的隔夜培養物接種到含 100 微克/毫升青黴素的 250 毫升

LB 中，並在攝氏 37 度的環境培養 4 小時。加入最終濃度為 0.5 mM 的 IPTG 誘導劑，在攝氏 20 度培養 4 小時後收集菌體。利用親和性層析法純化在細菌細胞裂解液中可溶的重組 eGFP 和 eGFP-ECP(32-41) 融合蛋白。

運輸多種物質至細胞內的能力，是細胞穿透胜肽的重要特徵，此特徵使細胞穿透胜肽在生物和生物醫學研究有應用價值。本文中證明 ECP(32-41)可運輸物質至細胞內。首先，製備含 Dp2 (SEQ ID No: 4，屋塵蟎第 2 類過敏原) 胜肽的重組 Dp2-ECP(32-41) (SEQ ID No: 5)。於 Beas-2B 細胞加入 5 μ M FITC-Dp2 或 FITC-Dp2-ECP(32-41) 在攝氏 37 度培養 30 分鐘後分析各胜肽進入細胞量。結果顯示只有 Dp2-ECP(32-41) 能夠進入細胞 (圖 5)。另一個經由 ECP(32-41) 轉運物質的實例為分子量 28 kDa 的增強型綠螢光蛋白 (eGFP)。將 5 μ M eGFP-ECP(32-41)加入 Beas-2B 細胞，並於攝氏 37 度培養 1 小時，接著以 488 nm 波長監測 eGFP-ECP(32-41)進入細胞之情況。如圖 6 所示，僅加入 eGFP 並未產生螢光訊號移轉，加入 eGFP-ECP(32-41)後則螢光訊號產生顯著移轉，證明 eGFP 確實經由 ECP(32-41)送入細胞中。上述兩個傳遞實例均證明 ECP(32-41)序列可以協助運輸蛋白質或胜肽至細胞內。

實例 6

促使細胞凋亡胜肽的細胞內傳遞

細胞培養

將中國倉鼠卵巢（CHO）細胞和胃腺癌上皮（AGS）細胞分別培養在含十分之一熱滅活性胎牛血清（Gibco，Invitrogen，USA）的 F-12 營養混合物中（Ham's F-12）。將 Beas-B2 細胞培養於 RPMI 1640 培養基（Gibco，Invitrogen，USA），輔以十分之一的熱滅活性胎牛血清（FBS）（Gibco，Invitrogen，USA），和百分之一的穀胺醯胺—青黴素—鏈黴素（biosera）。將 A549 細胞培養於 DME（Gibco，Invitrogen，USA），輔以十分之一的熱滅活性胎牛血清（FBS）（Gibco，Invitrogen，USA），和百分之一的穀胺醯胺—青黴素—鏈黴素（biosera）。於培養基（MEM；Gibco BRL Life Technologies，Scotland）、十分之一胎牛血清（FBS）、百分之一非必要胺基酸（Gibco）、百分之一的左旋穀胺醯胺（Biowhittaker）和百分之一的穀胺醯胺—青黴素—鏈黴素（biosera）中培養 Caco-2 細胞。所有細胞在攝氏 37 度、5%之二氧化碳環境進行培養。

活性測定

運用 3-(4,5-二甲基-2-基)-2,5-二苯基溴化（MTT）（US

Biological, Marblehead, MA) 比色檢定測定胜肽對細胞生長的細胞毒性。將細胞接種於 96 孔培養皿(每孔 1.0×10^4 細胞)，並在攝氏 37 度隔夜培養，使每樣本與指定濃度 (1-100 μM) 的胜肽培養。以指定胜肽處理 24 小時後，以 MTT 試劑進行染色，測定波長 570 nm 之吸光值以代表粒線體的活性，即活細胞數目。

先前文獻記載的促使細胞凋亡胜肽： $(\text{KLAKLAK})_2$ (SEQ ID No: 6) 可選擇性破壞帶負電荷的粒線體膜，但並不能直接與真核細胞的細胞膜作用穿透細胞。因此，可將該胜肽與運輸載體結合進入特定細胞後誘導細胞死亡，評估運輸系統的能力。為評估 ECP(32-41)在體外的輸送功能，利用標準固態胜肽合成法製備與 ECP(32-41)接合的類胜肽藥物 $(\text{KLAKLAK})_2\text{-ECP}(32-41)$ ，並測試類胜肽藥物的細胞毒性。

雖然 $(\text{KLAKLAK})_2$ 和 ECP(32-41)各自缺乏細胞穿透活性和細胞毒性，但 $(\text{KLAKLAK})_2\text{-ECP}(32-41)$ (SEQ ID No: 7) 在 Beas-2B 細胞上能誘導細胞死亡 (圖 7A)。 $(\text{KLAKLAK})_2\text{-ECP}(32-41)$ 的 IC_{50} 值為 7.2 μM 。

在不同細胞株包含 CHO-K1、A549、Beas-2B、Caco-2 及 AGS 細胞的實驗中， $(\text{KLAKLAK})_2\text{-ECP}(32-41)$ 對各細胞活性的影響均顯示強烈的細胞毒性 (圖 7B-C)。綜合上述，證明利用 ECP(32-41)進行活體外誘發凋亡胜肽的特定輸送係可實

施的。

實例 7

ECP(32-41) 於活生物體內的活體輸送

體內輸送

為進行顯微注射，將受精 72 小時後 (hpf) 的斑馬魚幼魚浸泡在含 0.17 微克/毫升的胺基苯甲酸乙酯 (tricaine) (Sigma) 的水中麻醉，以 1.2 % 低熔點瓊脂凝膠固定。根據先前文獻中描述的標準作法 (Levraud, J. P., Colucci-Guyon, E., Redd, M. J., Lutfalla, G., and Herbomel, P. (2008) *Methods Mol Biol* 415, 337-63)，將 4.6 nl 5 mM FITC 或 FITC-ECP(32-41) 顯微注射至幼魚血管中。以螢光顯微鏡偵測 FITC 訊號。為經由培養環境直接傳遞，將受精 72 天後 (dpi) 的斑馬魚幼魚浸泡於含 1 mM FITC-ECP(32-41) 的水中 24 小時。然後，將斑馬魚幼魚移到淡水飼養 2 天，再以螢光顯微鏡觀察。

本文中以斑馬魚作為模型系統研究 ECP(32-41) 的輸送效果。將 5 mM FITC 或 FITC-ECP(32-41) 注入受精 72 小時 (hpf) 的斑馬魚幼魚循環系統。注射後 24 小時之內，FITC 本身的

螢光幾乎完全消失（圖 8A）。然而，注射 2 天後，可於幼魚體內發現明顯之螢光 FITC-ECP(32-41)訊號（圖 8B）。以下實驗提供另一成功體內傳遞的證據：將孵化後 7 天（dpf）的斑馬魚幼魚浸泡於含 1 mM FITC-ECP(32-41)的水中 1 天後，換不含胜肽的水再飼養 2 天。幼魚體內明顯的螢光訊號與之前的實驗結果一致（圖 8C），強烈顯示 ECP(32-41) 可傳遞螢光物質到活的有機體內，並於斑馬魚體內長時間保持穩定。

雖然本發明以充分細節描述和舉例，供本領域技術製作和使用，但在不偏離本發明精神和範圍下，尚有各種替代方案、修飾和改良。

技術領域中具有通常知識者很容易地領會到本發明適於實現所提及的，以及其中所固有的目的，並得到其目標與優點。用於達成或製造本發明之動物、製程或方法係較佳具體實施例之代表，僅作為例式性，而非意圖限制本發明之範疇。技術領域中具有通常知識者將可想到其中的修飾及它種用途。該些修飾係被包含於本發明之精神中，且係由申請專利範圍之範疇而定義。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示正常型 MBP-ECP 或單點突變 MBP-ECP 與 Beas-2B

細胞的相對結合活性。(A) R34A、W35A、R36A 及 K38A; (B) R34K、W35F、W35Y、R36K 及 K38R。將 Beas-2B 細胞以帶有單點突變的 MBP-ECP 在 RPMI-1640 培養液中在攝氏 4 度處理 1 小時。該些細胞以磷酸鹽緩衝液清洗並以 PFA 固定。運用 ELISA 測定結合至細胞表面 MBP-ECP 的量。以 MBP-ECP (800 nM) 做為 100% 結合的正控制組，且以此計算單點突變 MBP-ECP 之相對結合親和力。實驗結果代表三重複實驗之平均值。誤差槓顯示三重複實驗之標準差。

第 2 圖顯示 ECP(32-41) 穿透細胞活性。將 Beas-2B 細胞與 20 μ M FITC (控制組) 或 FITC-ECP(32-41) 在攝氏 37 度培養 30 分鐘。處理結束後，以 500 μ l 磷酸鹽緩衝液清洗細胞並以胰蛋白酶於攝氏 37 度處理 10 分鐘以去除黏附在細胞外之胜肽。將細胞重新懸浮在 500 μ l 磷酸鹽緩衝液中，並利用流式細胞儀 FACScalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 測定平均螢光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) 以分析細胞活性。實驗結果代表三重複實驗之平均值。

第 3 圖顯示 ECP(32-41) 於胞內分佈情形。將 Beas-2B 細胞與 5 μ M FITC-ECP(32-41) 在攝氏 37 度培養 5 或 60 分鐘。以 1 ml 磷酸鹽緩衝液緩衝液洗滌兩次之後，運用共軛焦雷射掃描顯微鏡分析細胞所吸收之胜肽。放大倍率：63X。比例尺：50 μ m。

第 4 圖顯示 ECP(32-41) 所需的最短長度。將 Beas-2B 細胞分別

與 5 μ M FITC-ECP(32-41) 、 FITC-ECP(32-41) D1 及 FITC-ECP(32-41) D2 在攝氏 37 度培養 30 分鐘。以 1 ml 磷酸鹽緩衝液緩衝液洗滌兩次之後，運用共軛焦雷射掃描顯微鏡分析細胞所吸收的胜肽。放大倍率：40X。比例尺：50 μ m。

第 5 圖顯示體外試驗 ECP(32-41)的胜肽運輸。將 Beas-2B 細胞與 5 μ M FITC(控制組)、FITC-Dp2 或 FITC-Dp2-ECP(32-41) 在攝氏 37 度培養 1 小時。處理後，以 500 μ l 磷酸鹽緩衝液洗滌細胞並以胰蛋白酶在攝氏 37 度處理 10 分鐘以去除黏附在細胞外之胜肽。將細胞再懸浮於 500 μ l 磷酸鹽緩衝液中，並運用流式細胞儀 FACScalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 之平均螢光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) 分析細胞吸收活性。實驗結果代表三重複實驗之平均值。

第 6 圖顯示體外試驗下 ECP(32-41)的蛋白質運輸。Beas-2B 細胞與 5 μ M FITC(控制組)、eGFP 或 eGFP-ECP(32-41) 在攝氏 37 度下培養 1 小時。處理後，以 500 μ l 磷酸鹽緩衝液洗滌細胞並以胰蛋白酶在 37 度處理 10 分鐘以去除黏附在細胞外之蛋白。將細胞再懸浮於 500 μ l 磷酸鹽緩衝液中並藉由流式細胞儀進行分析。細胞穿透活性利用 FACScalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 流式細胞儀中平均螢光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) 表示。實驗結果代表三重複實驗之平均值。

第 7 圖顯示體外試驗 ECP(32-41)的仿胜肽藥物(peptidomimetic drug)運輸。(A) 細胞存活試驗；將 Beas-2B 細胞與 50 μ M (KLAKLAK)₂-ECP(32-41)、ECP(32-41)或(KLAKLAK)₂ 在攝氏 37 度培養 24 小時。(B) (KLAKLAK)₂-ECP(32-41)對 Beas-2B、A549 及 CHO-K1 細胞的細胞存活率的影響。(C) (KLAKLAK)₂-ECP(32-41)對 Caco-2 及 AGS 細胞的細胞存活率的影響。各組別的細胞存活率係以 MTT 試驗測定，且各實驗皆重複三次。

第 8 圖顯示活體試驗 ECP(32-41)的運輸。(A) 將受精後 72 小時(72 hpf)的斑馬魚幼魚以顯微注射注入 4.6 nl 的 5 mM FITC 並在注射後 1 天 (1 dpi) 時以螢光顯微鏡觀察。(B) 由顯微注射 FITC-ECP(32-41)。將受精後 72 小時 (72 hpf) 的斑馬魚幼魚以顯微注射注入 4.6 nl 的 5 mM FITC-ECP(32-41)，並在注射後 2 天 (2 dpi) 時以螢光顯微鏡觀察。(C) 經由培養環境輸送 FITC-ECP(32-41)。將受精後 7 天 (72 dpf) 的斑馬魚幼魚浸泡在含有 1 mM FITC-ECP(32-41)的水中，另外再培養於淡水中 2 天，並接著以螢光顯微鏡進行觀察。圖式放大倍率：(A) 4 倍，(B) 20 倍，及 (C) 10 倍。

【主要元件符號說明】

無。

序列表

<110> 國立清華大學

<120> 用於胞內輸送之細胞穿透胜肽

<130> 1115-NTHU-TW

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ECP(32-41)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

<400> 1

Asn Tyr Arg Trp Arg Cys Lys Asn Gln Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ECP(32-41)D1

<220>

<221> 胜肽

<222> (1)..(9)

201207111

<400> 2

Asn Tyr Arg Trp Arg Cys Lys Asn Gln
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ECP(32-41)D2

<220>

<221> 胜肽

<222> (1)..(8)

<400> 3

Asn Tyr Arg Trp Arg Cys Lys Asn
1 5

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Dp2

<220>

<221> 胜肽

<222> (1)..(13)

<400> 4

Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val
1 5 10

201207111

<210> 5
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Dp2-ECP(32-41)

<220>
<221> 胜肽
<222> (1)..(23)

<400> 5

Ile	Ile	His	Arg	Gly	Lys	Pro	Phe	Gln	Leu	Glu	Ala	Val	Asn	Tyr	Arg
1				5				10					15		

Trp	Arg	Cys	Lys	Asn	Gln	Asn
			20			

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (KLAKLAK)2

<220>
<221> 胜肽
<222> (1)..(14)

<400> 6

Lys	Leu	Ala	Lys	Leu	Ala	Lys	Lys	Leu	Ala	Lys	Leu	Ala	Lys
1			5					10					

<210> 7

<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (KLAKLAK)2-ECP(32-41)

<220>
<221> 胜肽
<222> (1)..(24)

<400> 7

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Asn Tyr
1 5 10 15

Arg Trp Arg Cys Lys Asn Gln Asn
20

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (R34A) 顺向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(34)

<400> 8
gcaattaaca attatgcatg gcgttgcaaa aacc 34

<210> 9
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列



<220>
<223> (R34A) 反向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(34)

<400> 9
ggtttttgca acgccaatgca taattgttaa ttgc 34

<210> 10
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (R34K) 顺向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(34)

<400> 10
gcaattaaca attataaatg gcgttgcaaa aacc 34

<210> 11
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (R34K) 反向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(34)

<400> 11
ggtttttgca acgccaattta taattgttaa ttgc 34

<210> 12
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (W35A) 順向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)

<400> 12
attaacaatt atcgagcgcg ttgcaaaaac c 31

<210> 13
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (W35A) 反向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)

<400> 13
ggtttttgca acgcgctcga taattgttaa t 31

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (W35F) 順向引子



<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)

<400> 14
attaacaatt atcgatttcg ttgcaaaaac c 31

<210> 15
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (W35F) 反向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)

<400> 15
ggttttttgca acgaaatcga taattgttaa t 31

<210> 16
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (W35Y) 順向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)

<400> 16
attaacaatt atcgatctcg ttgcaaaaac c 31

<210> 17

<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (W35Y) 反向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)

<400> 17
ggtttttgca acgagatcga taattgttaa t 31

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (R36A) 順向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(33)

<400> 18
caattatcga tgggcttgca aaaaccaaaa tac 33

<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (R36A) 反向引子

<220>
<221> misc_feature



<222> (1)..(33)

<400> 19
gtatttttgggt ttttgcaagc ccatcgataa ttg

33

<210> 20
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (R36K) 順向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(33)

<400> 20
caattatcga tggaaatgca aaaaccaaaa tac

33

<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (R36K) 反向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(33)

<400> 21
gtatttttgggt ttttgcaatt tcatcgataa ttg

33

<210> 22
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> (K38A) 順向引子

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<400> 22

tatcgatggc gttgcgcaaa ccaaaatact

30

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> (K38A) 反向引子

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(31)

<400> 23

aaagtatttt ggtttgcgca acgcatcga t

31

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> (K38R) 順向引子

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<400> 24

tatcgatggc gttgcaaaaa ccaaaatact 30

<210> 25
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (K38R) 反向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)

<400> 25
aaagtatttt ggtttttgca acgccatcga t 31

<210> 26
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (eGFP) 顺向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)

<400> 26
catatgggtga gcaagggcga ggagctg 27

<210> 27
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (eGFP) 反向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(39)

<400> 27
cgagtgcggc cgccaattca cttcttgtac agctcgtca 39

<210> 28
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> eGFP-ECP(32-41) 順向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)

<400> 28
catatgggtga gcaagggcga ggagctg 27

<210> 29
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> eGFP-ECP(32-41) 反向引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(58)

<400> 29
gaattcaatt ttggtttttg caacgccatc gataattcctt ctgtacagct cgtccatg 58



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：100116711

※ 申請日：100 年 05 月 12 日

※IPC 分類： C12N^{15/87} (2006.01)
A61K^{47/42} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於胞內輸送之細胞穿透胜肽/CELL PENETRATING PEPTIDES
FOR INTRACELLULAR DELIVERY

二、中文發明摘要：

本發明提供一種細胞穿透胜肽，其具有下列胺基酸序列：
NYBX₁BX₂BNQX₃。本發明進一步提供一種胞內輸送之方法，包括：(a) 提供一本發明之細胞穿透胜肽，及 (b) 將該細胞穿透胜肽與目標細胞進行培養。本發明亦提供一種複合物，其包含本發明之細胞穿透胜肽及一種選自由治療劑、診斷探針、胜肽、核苷酸、反義寡核酸、蛋白質、奈米粒子、微脂體、小分子及標記物質所組成之群組的物質。

三、英文發明摘要：

The present invention provides a cell penetrating peptide which has following sequence: NYBX₁BX₂BNQX₃. The present invention

further provides a method of intracellular delivery comprising: (a) providing a cell penetrating peptide of the present invention, and (b) incubating the cell penetrating peptide with targeted cells. The present invention also provides a complex comprising the cell penetrating peptide of the present invention and a cargo selected from the group consisting of therapeutic agents, diagnostic probes, peptides, nucleic acids, antisense oligonucleotides, proteins, nanoparticles, liposomes, small molecules and labeled materials.

七、申請專利範圍：

1. 一種細胞穿透胜肽，其包含下列胺基酸序列：

NYBX₁BX₂BNQX₃，其中 N 代表天門冬醯胺，Y 代表酪胺酸，B 代表一鹼性胺基酸，X₁ 代表一具有一芳基、一疏水性或一不帶電之側鏈的胺基酸，X₂ 代表任何胺基酸，Q 代表麩醯胺酸，且 X₃ 代表天門冬醯胺或不存在。

2. 如申請專利範圍第 1 項之細胞穿透胜肽，其中 X₁ 代表色胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸。

3. 如申請專利範圍第 1 項之細胞穿透胜肽，其中 X₂ 代表一極性且不帶電之胺基酸。

4. 如申請專利範圍第 3 項之細胞穿透胜肽，其中 X₂ 代表半胱胺酸。

5. 如申請專利範圍第 1 項之細胞穿透胜肽，其係 SEQ ID NO: 1。

6. 如申請專利範圍第 1 項之細胞穿透胜肽，其係 SEQ ID NO: 2。

7. 一種胞內輸送之方法，包括：

a. 提供一如申請專利範圍第 1 項之細胞穿透胜肽，及

b. 將該細胞穿透胜肽與目標細胞進行培養。

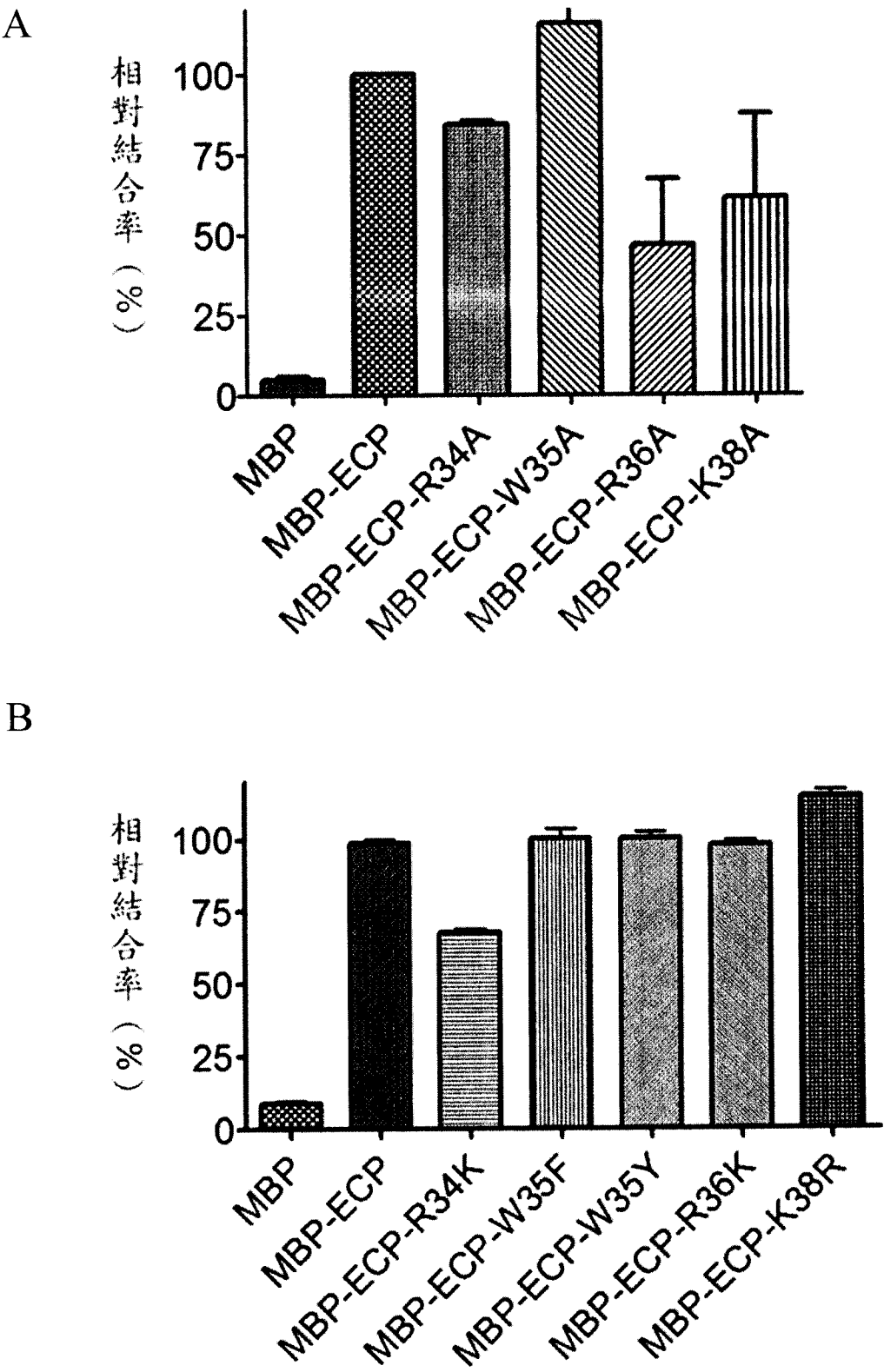
8. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該細胞穿透胜肽進一步包含一種選自由治療劑、診斷探針、胜肽、核苷酸、反義寡核苷酸、蛋白質、奈米粒子、微脂體、小分子及標記物質組成之群組的

物質。

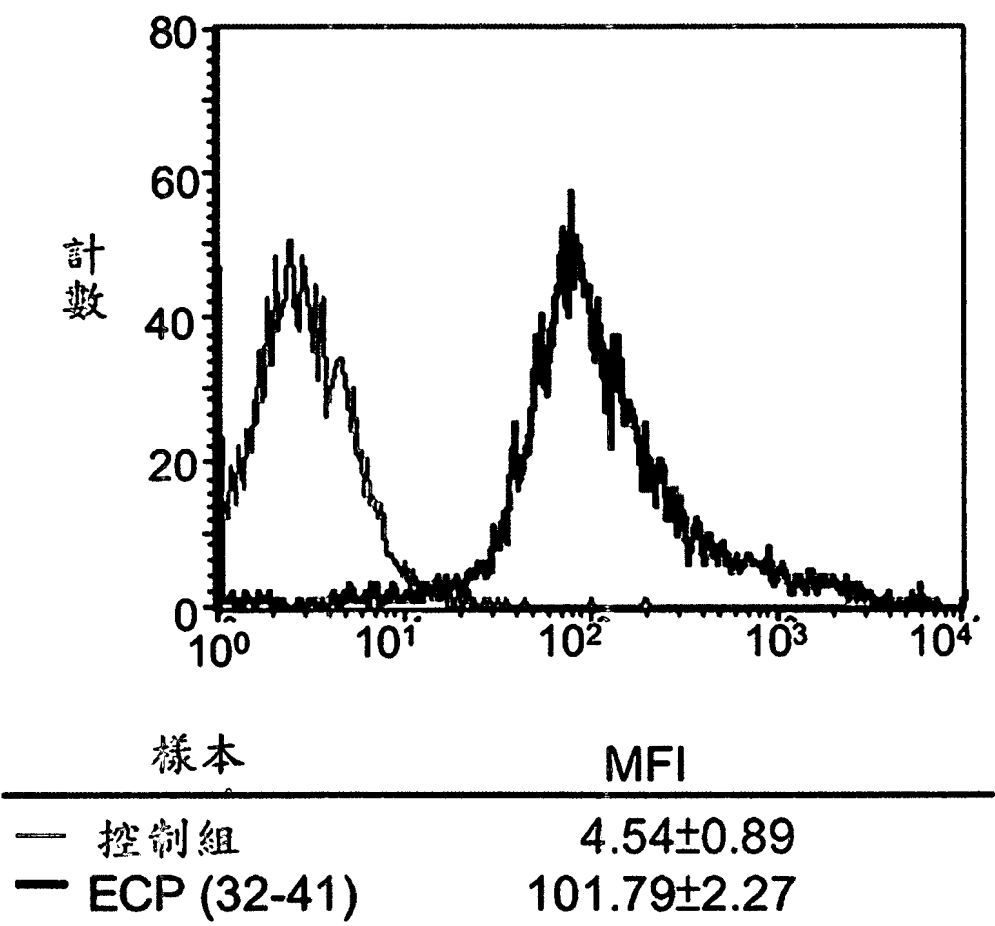
9. 一種複合物，其包含如申請專利範圍第 1 項之細胞穿透胜肽及一種選自由治療劑、診斷探針、胜肽、核苷酸、反義寡核酸、蛋白質、奈米粒子、微脂體、小分子及標記物質組成之群組的物質。
10. 如申請專利範圍第 9 項之複合物，其中該物質係選自標記物質、胜肽或蛋白質。

八、圖式：

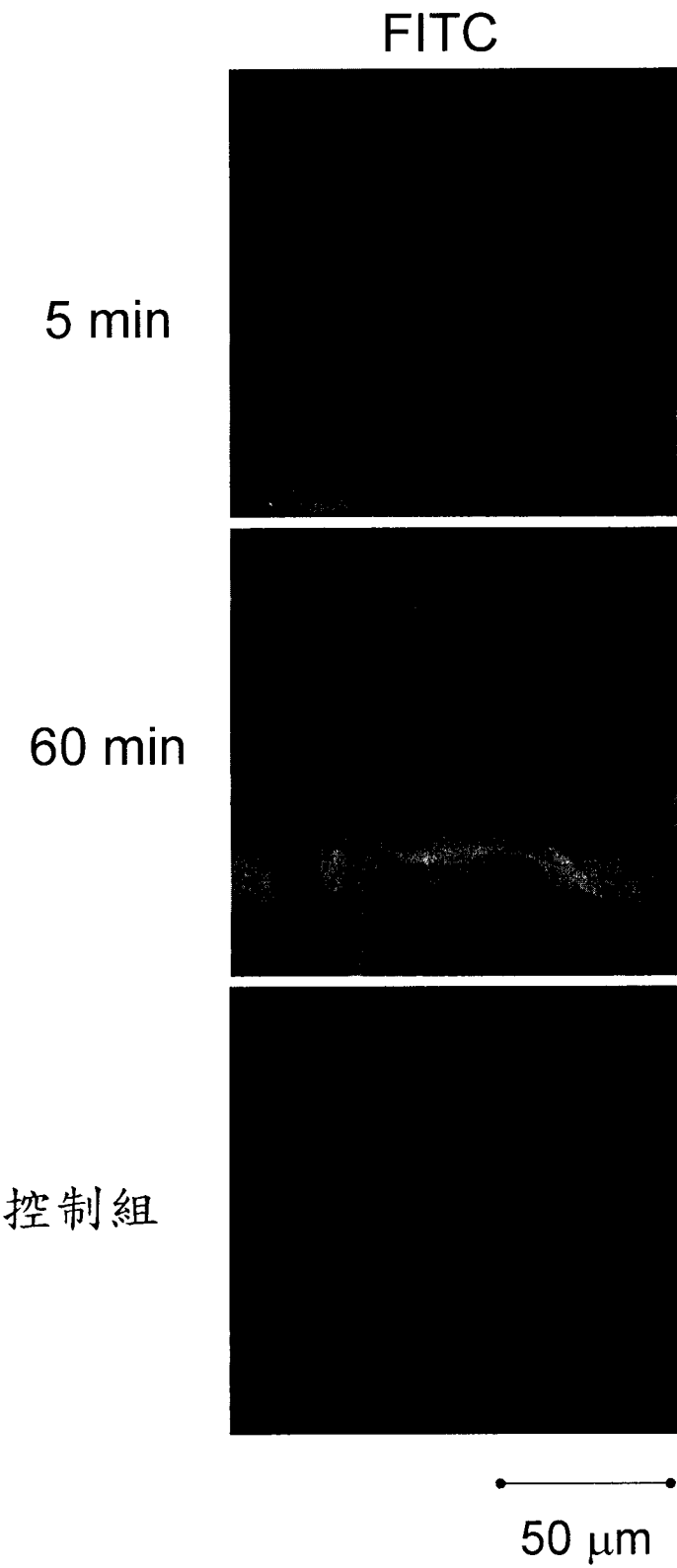
圖式 1



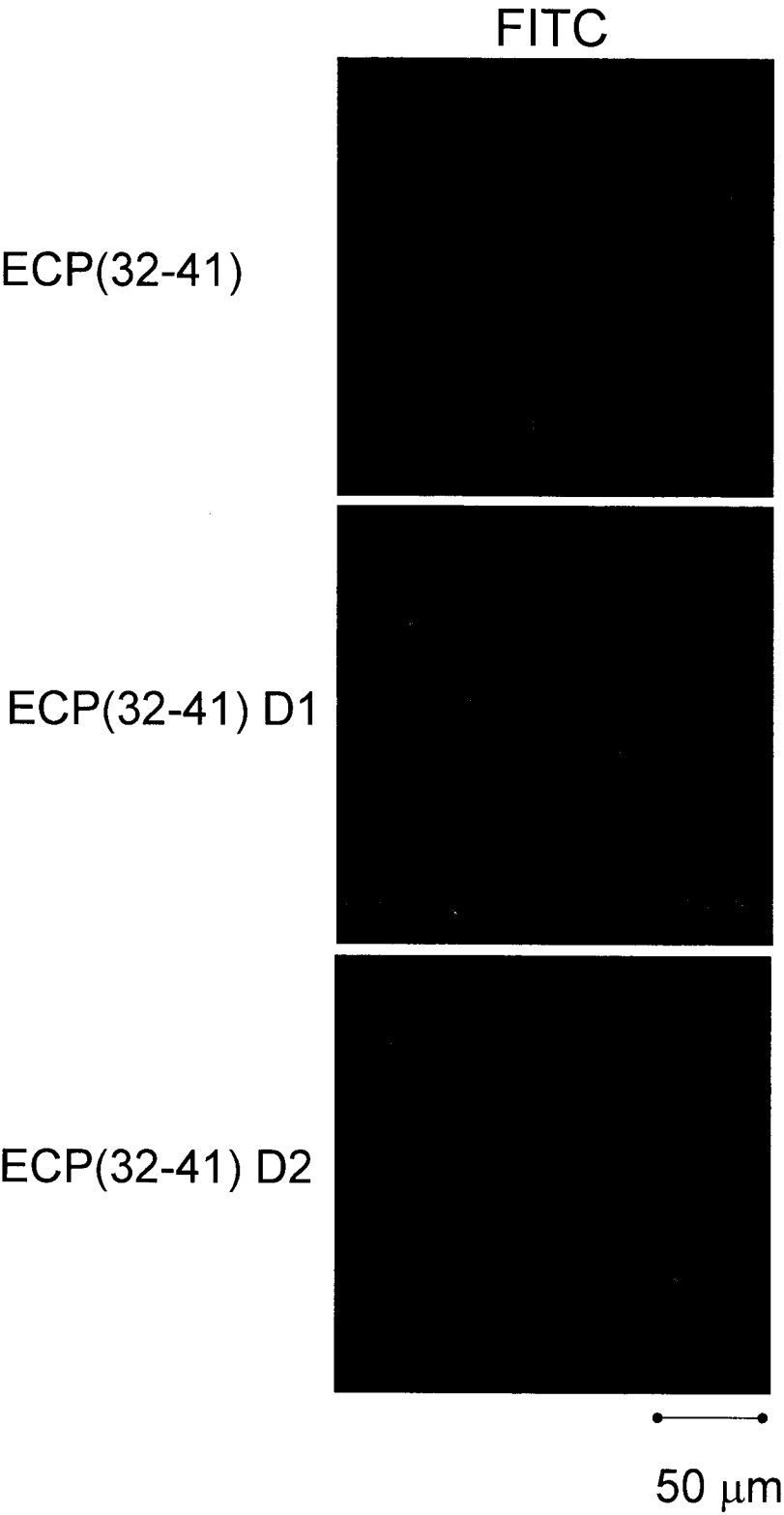
圖式 2



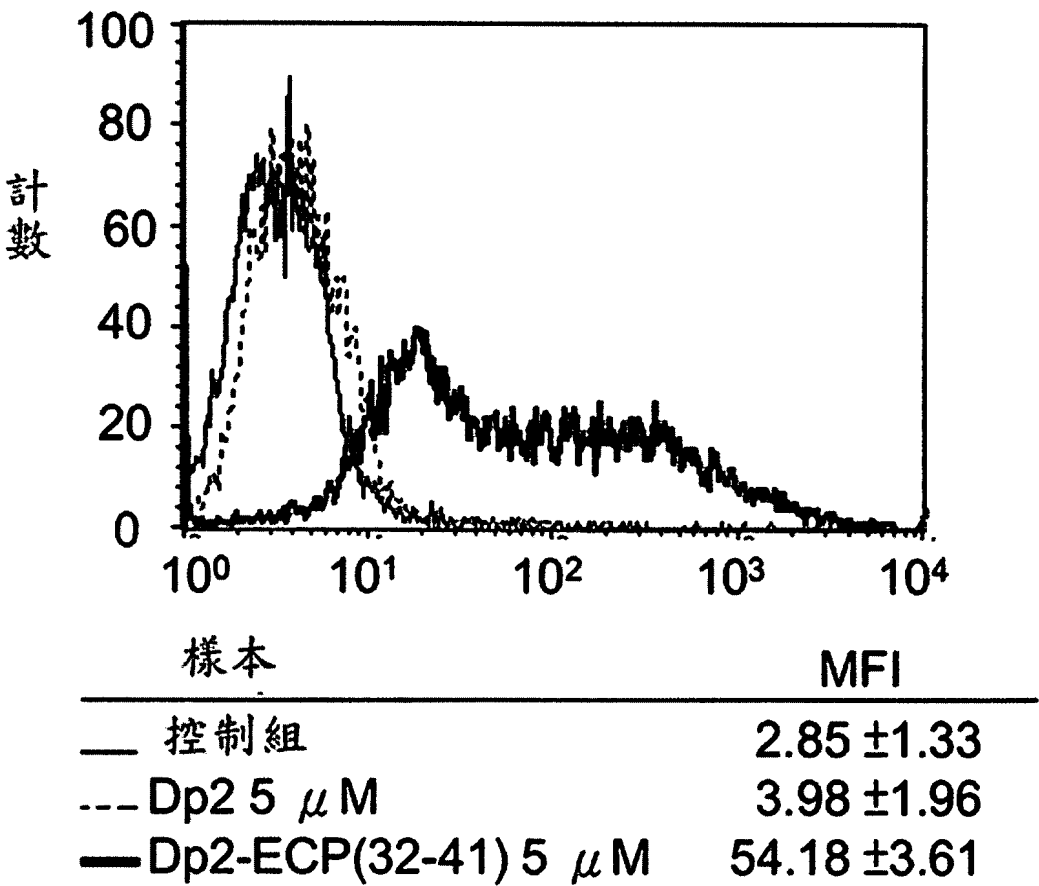
圖式 3



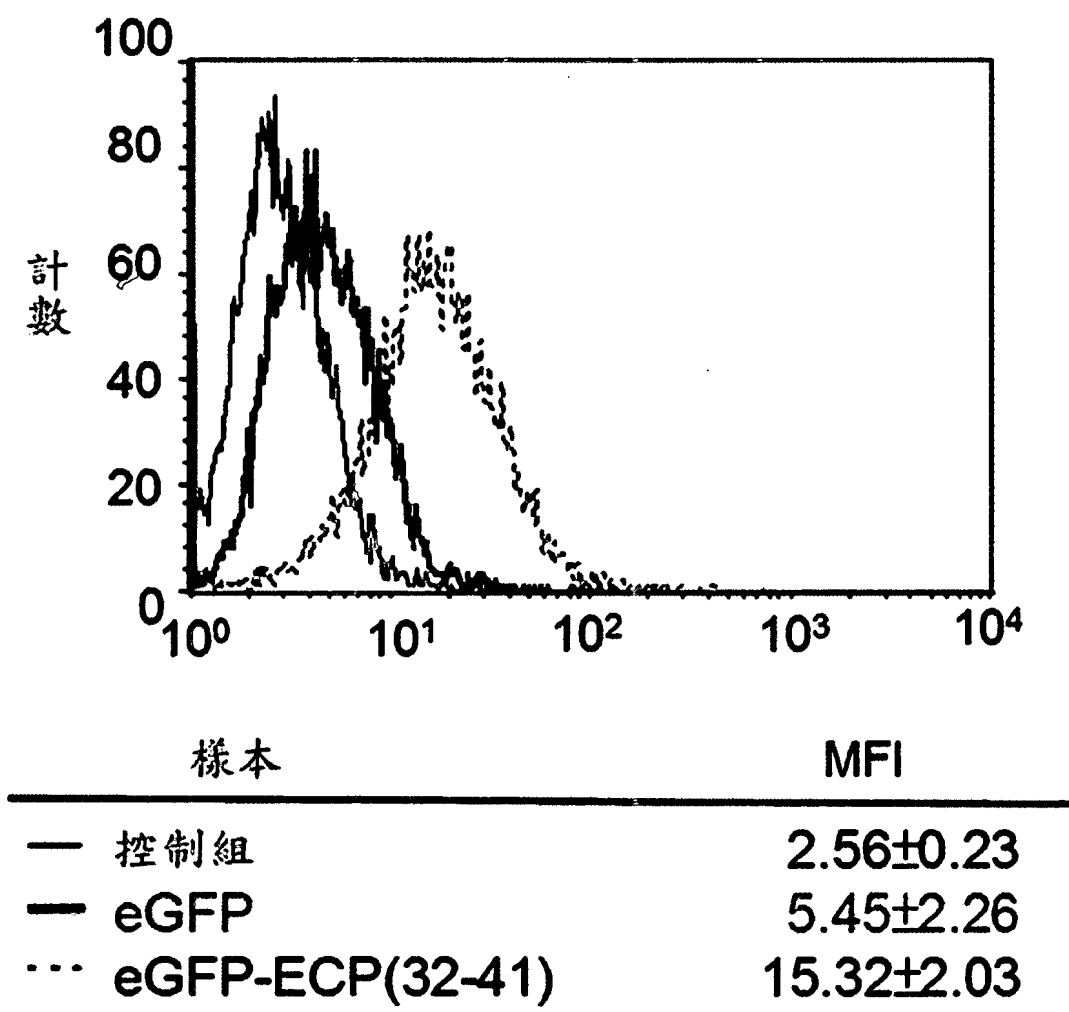
圖式 4



圖式 5

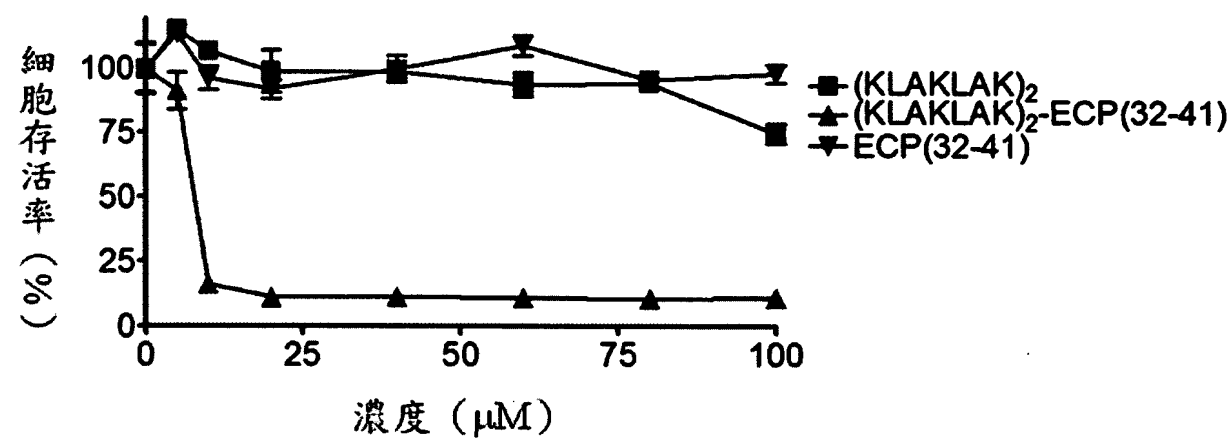


圖式 6

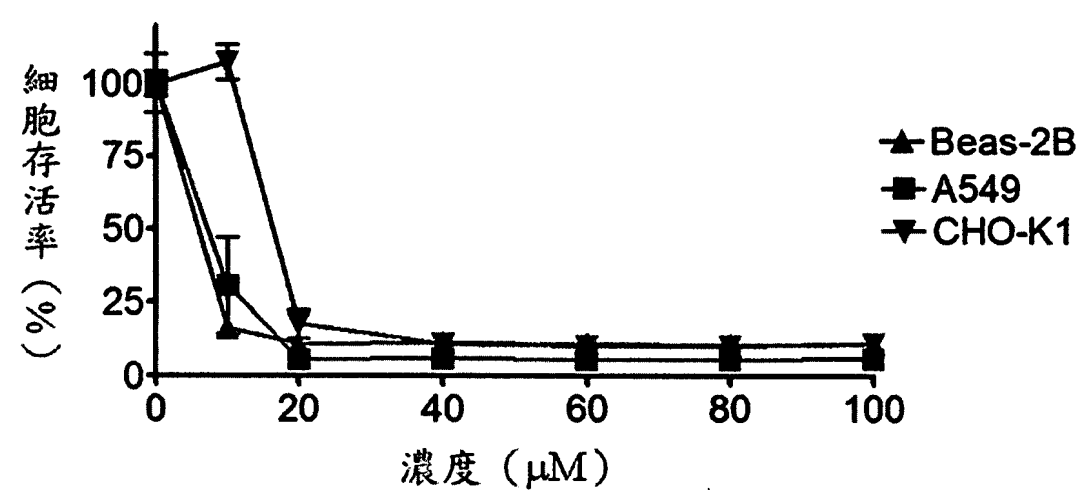


圖式 7

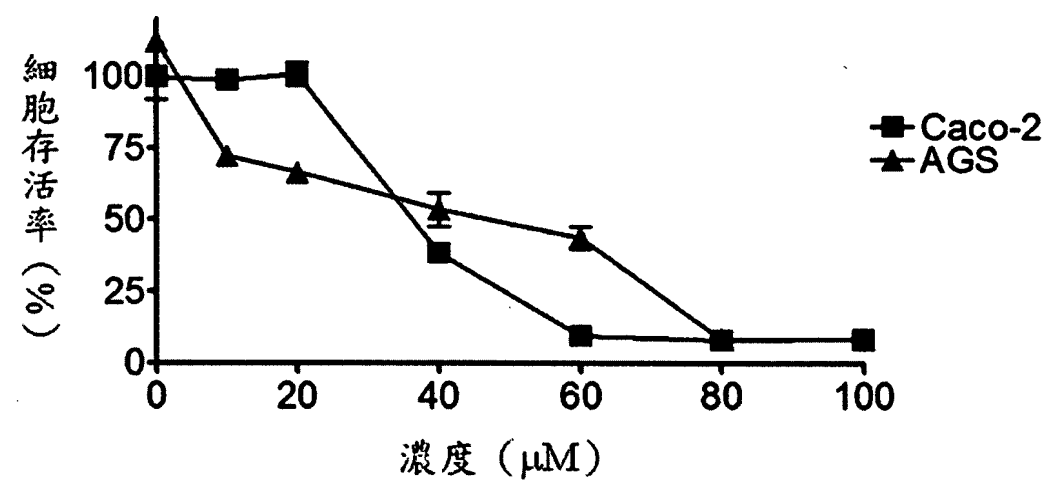
A



B

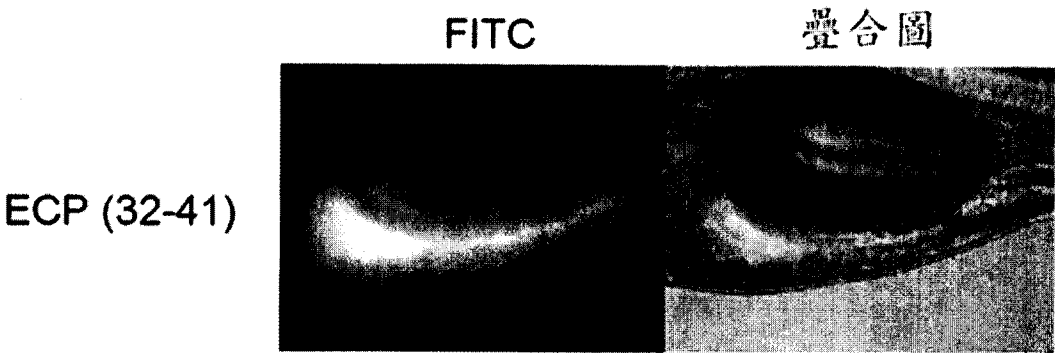


C

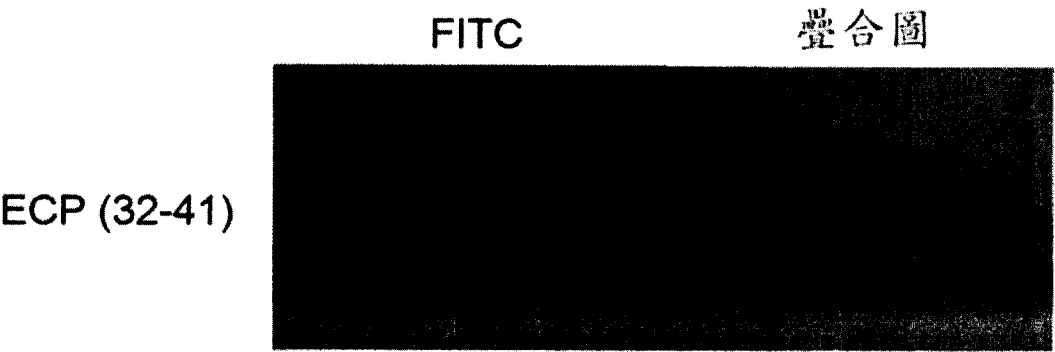


圖式 8

A



B



四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(二)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。