

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6517692号  
(P6517692)

(45) 発行日 令和1年5月22日 (2019.5.22)

(24) 登録日 平成31年4月26日 (2019.4.26)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 Z

C 0 7 K 7/08 (2006.01)

C 0 7 K 7/08 Z N A

A 6 1 K 47/50 (2017.01)

A 6 1 K 47/50

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 49/00 (2006.01)

A 6 1 K 49/00

請求項の数 20 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-532967 (P2015-532967)  
 (86) (22) 出願日 平成25年9月17日 (2013.9.17)  
 (65) 公表番号 特表2016-500513 (P2016-500513A)  
 (43) 公表日 平成28年1月14日 (2016.1.14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2013/008459  
 (87) 国際公開番号 W02014/046490  
 (87) 国際公開日 平成26年3月27日 (2014.3.27)  
 審査請求日 平成28年9月16日 (2016.9.16)  
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0104173  
 (32) 優先日 平成24年9月19日 (2012.9.19)  
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)  
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0104144  
 (32) 優先日 平成24年9月19日 (2012.9.19)  
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 514286826  
 ジェムバックス アンド カエル カンパ  
 ニー, リミティド  
 大韓民国, デジョン, ユソン-ク テクノ  
 1 1 - ロ, 5 8  
 (73) 特許権者 514286848  
 キム サン チェ  
 大韓民国, ソウル 1 3 5 - 9 4 7, カン  
 ナム-ク, クアンピョン-ロ 1 0 - キル  
 , 1 5, サンノクス アパートメント, 1  
 0 1 - 4 0 5  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞透過性ペプチド、それを含んだコンジュゲート、及びそれを含んだ組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞透過性運搬ペプチド及び有効成分のコンジュゲートであって、前記運搬ペプチドは、配列番号 2 ~ 配列番号 7 9、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 1 0 及び配列番号 1 2 1のうちいずれか一つのアミノ酸配列から成るペプチドである、前記コンジュゲート。

【請求項 2】

前記有効成分は、タンパク質、核酸、ペプチド、脂質、糖脂質、ミネラル、糖、ナノ粒子、生物学的製剤、造影物質、薬物及び化学物質のうちから選択される一つ以上である、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3】

前記運搬ペプチドと有効成分は、共有結合によって連結され、リンカーによって選択的に媒介されて連結される、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

前記運搬ペプチドと有効成分は、非共有結合によって連結される、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

前記有効成分は、タンパク質またはペプチドである、請求項 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6】

前記有効成分は、サイトカイン、抗体、抗体断片、治療用酵素、可溶性受容体またはリガンドである、請求項 5 に記載のコンジュゲート。

【請求項 7】

前記造影物質は、放射線非透過性造影物質、常磁性造影物質、超常磁性造影物質及び CT 造影物質からなる群から選択される、請求項 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

前記造影物質は鉄に基づく、請求項 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 9】

前記造影物質はフェロセンカルボン酸である、請求項 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 9 のうちいずれか 1 項に記載のコンジュゲートを含む造影剤。

【請求項 11】

細胞を造影するためのものである、請求項 10 に記載の造影剤。

【請求項 12】

前記細胞は幹細胞である、請求項 11 に記載の造影剤。

【請求項 13】

有効成分として、請求項 1 ～ 9 のうちいずれか 1 項に記載のコンジュゲートを含む組成物。

【請求項 14】

前記有効成分は、疾病の治療または予防のための有効成分であり、前記組成物は、医薬組成物である、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記有効成分は、機能性化粧品の有効成分であり、前記組成物は、化粧品組成物である、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記有効成分は、機能性健康食品の有効成分であり、前記組成物は、健康食品組成物である、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 17】

細胞透過性ペプチドであって、前記ペプチドは、配列番号 2 ～ 配列番号 79、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 104、配列番号 105、配列番号 110 及び配列番号 121 のうちいずれか 1 つの配列から成る、細胞透過性ペプチド。

【請求項 18】

請求項 17 に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 19】

請求項 18 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 20】

請求項 19 に記載のベクターを含む形質転換細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、テロメラーゼ由来の細胞透過性ペプチド、その細胞透過性ペプチドと有効成分とのコンジュゲート、及び該コンジュゲートを含んだ組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

低分子物質、核酸、タンパク質またはナノ粒子などは、分子レベルの治療物質として、大きい潜在力を有しているが、組織浸透及び細胞膜の浸透に対する抵抗性のために使用が制限されてしまう。前記物質を細胞内に移動させるシステムの開発は、分子的方法の治療において、イシューとなってきた。低分子物質、核酸またはナノ粒子の場合、多様な試薬、電気穿孔法 (electroporation) または熱衝撃 (heat shock) などの方法で、細胞内輸送を可能としたが、タンパク質の場合、活性をそのまま維持しながら、細胞内に移動す

10

20

30

40

50

ることは、非常に困難な問題であり、解決の糸口を見い出せないでいた。ところで、1980年代に、HIVの細胞膜を透過する研究過程で、特定11個のアミノ酸配列からなるHIV-TATタンパク質が、細胞内への送達過程で、重要な役割を行うと明かされ、1990年代から、本格的にタンパク質の細胞内送達研究が進められた。

【0003】

テロメア (telomere) は、染色体の末端に反復して存在する遺伝物質であり、当該染色体の損傷や、他の染色体との結合を防止すると知られている。細胞が分裂するたびに、テロメアの長さは少しずつ短くなるが、一定回数以上の細胞分裂があれば、テロメアは、非常に短くなり、その細胞は、分裂を止めて死亡する。一方、テロメアを長くすれば、細胞の寿命が延長されると知られており、その例として、癌細胞では、テロメラーゼ (telomerase) という酵素が分泌され、テロメアが短くなることを防ぐため、癌細胞が死亡せず、続けて増殖可能であると知られている。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の一側面は、新規ペプチドを提供するものである。

【0005】

本発明の一側面は、新規ペプチドをコーディングするポリヌクレオチドを提供するものである。

【0006】

20

本発明の一側面は、細胞透過性ペプチドを提供するものである。

【0007】

本発明の一側面は、細胞内有効成分送達体として有用なペプチドを提供するものである。

【0008】

本発明の他の側面は、細胞内有効成分送達体として、特に、ミトコンドリアに局所送達する有用なペプチドを提供するものである。

【0009】

本発明の他の側面は、ミトコンドリア関連の疾病または障害の改善用、予防用または治療用の有効成分を、ミトコンドリアに局所送達する有用なペプチドを提供するものである。

30

【0010】

本発明の一側面は、細胞透過性ペプチドと有効成分とが接合された (conjugated) コンジュゲート (conjugate) を提供するものである。

【0011】

本発明の一側面は、細胞透過性ペプチドと有効成分とのコンジュゲートを含む組成物を提供するものである。

【0012】

本発明の一側面は、細胞透過性ペプチドと有効成分とのコンジュゲートを含む薬剤学的組成物を提供するものである。

40

【0013】

本発明の一側面は、細胞透過性ペプチドと有効成分とのコンジュゲートを含む機能性化粧品組成物を提供するものである。

【0014】

本発明の一側面は、細胞透過性ペプチドと有効成分とのコンジュゲートを含む健康食品組成物を提供するものである。

【0015】

本発明の一側面は、細胞透過性ペプチドと有効成分とのコンジュゲートを含む造影剤を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

50

## 【 0 0 1 6 】

本発明の一側面によるコンジュゲートは、細胞透過性運搬ペプチド (carrier peptide) 及び有効成分のコンジュゲート (conjugate) であり、前記運搬ペプチドは、配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のうちいずれか一つ以上を含むペプチド、前記ペプチド配列と 8 0 % 超の配列相同性を有するペプチド、またはその断片であり、前記 8 0 % 超の配列相同性を有するペプチド及び断片は、配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のうちいずれか 1 つのペプチドの細胞透過性を保有したコンジュゲートである。

## 【 0 0 1 7 】

本発明の他の側面によるコンジュゲートにおいて、前記断片は、3 個以上のアミノ酸で構成された断片でもある。

10

## 【 0 0 1 8 】

本発明の他の側面によるコンジュゲートにおいて、前記運搬ペプチドは、3 0 個以下のアミノ酸から構成されたペプチドでもある。

## 【 0 0 1 9 】

本発明の他の側面によるコンジュゲートにおいて、前記運搬ペプチドは、配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のうちいずれか 1 つの配列を有するペプチド、または前記ペプチド配列と 8 0 % 超の配列相同性を有するペプチドでもある。

## 【 0 0 2 0 】

本発明の一側面による造影剤は、前述のいずれか 1 つのコンジュゲートを含む造影剤でもある。

20

## 【 0 0 2 1 】

本発明の他の側面による造影剤において、前記造影物質は、細胞を造影するためのものでもある。

## 【 0 0 2 2 】

本発明の他の側面による造影剤において、前記細胞は、幹細胞でもある。

## 【 0 0 2 3 】

本発明の一側面による組成物は、前述のいずれか 1 つのコンジュゲートを含んでもよい。

## 【 0 0 2 4 】

本発明の他の側面による組成物において、前記有効成分は、疾病の治療または予防のための有効成分であり、前記組成物は、医薬組成物でもある。

30

## 【 0 0 2 5 】

本発明の他の側面による組成物において、前記有効成分は、機能性化粧品の有効成分であり、前記組成物は、化粧品組成物でもある。

## 【 0 0 2 6 】

本発明の他の側面による組成物において、前記有効成分は、機能性健康食品の有効成分であり、前記組成物は、健康食品組成物でもある。

## 【 0 0 2 7 】

本発明の一側面による方法は、有効成分を細胞内に送達するための方法として、前述のコンジュゲートのうちいずれか 1 つのコンジュゲートを、これを必要とする対象に投与することを含み、運搬ペプチドは、細胞透過性ペプチドであり、前記有効成分の細胞内送達を行うペプチドであり、8 0 % 超の配列相同性を有するペプチド及び断片は、配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のうちいずれか 1 つのペプチドの細胞透過性を保有したものである。

40

## 【 0 0 2 8 】

本発明の他の側面による、有効成分を細胞内に送達するための方法は、有効成分を細胞内ミトコンドリアに局所送達するものでもある。

## 【 0 0 2 9 】

本発明の一側面による細胞透過性ペプチドは、配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のうちいずれか一つを含むペプチド、またはその断片でもある。

50

## 【 0 0 3 0 】

本発明の一側面によるポリヌクレオチドは、前述の細胞透過性ペプチドをコーディングするポリヌクレオチドでもある。

## 【 0 0 3 1 】

本発明の一側面によるベクターは、前記ポリヌクレオチドを含むベクターでもある。

## 【 0 0 3 2 】

本発明の一側面による形質転換細胞は、前記ベクターを含む形質転換細胞でもある。

## 【発明の効果】

## 【 0 0 3 3 】

本発明によるペプチド、または前記ペプチドと有効成分とが結合されたコンジュゲート  
10  
を利用すれば、細胞内に透過され難い有効成分を容易に細胞内に送達することができる。  
これを介して、有効成分の効能を高め、その結果、投与量を減らすことができるので、薬  
物投与による副作用を最小化し、治療効率を高めることができる。特に、ミトコンドリア  
に局所送達することにより、ミトコンドリア関連の疾病または障害の改善、予防または治  
療の効能を高めることができる。化粧品の場合にも、極少量の有効成分だけでも、すぐれ  
た効果を出すことができる。造影物質とのコンジュゲートを利用すれば、細胞治療での細  
胞移植過程、または移植された細胞をモニタリングするための造影剤に活用される。特に  
、生体内に注入された幹細胞のための造影剤として効果的に利用される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 3 4 】

【図 1】配列番号 1 のペプチド p e p 1 に F I T C を結合させた後、H e L a 細胞株に処  
理し、流細胞分析器 ( F A C S ) での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面  
20  
である。対照群は、F I T C のみを処理したものである。

【図 2】配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドに F I T C を結合させた後、それぞ  
れ H e L a 細胞株に処理し、流細胞分析器 ( F A C S ) での分析結果、細胞uptakeされた  
細胞の数を示した図面である。対照群は、F I T C のみを処理したものである。

【図 3】配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドに F I T C を結合させた後、それぞ  
れ H e L a 細胞株に処理し、流細胞分析器 ( F A C S ) での分析結果、細胞uptakeされた  
細胞の数を示した図面である。対照群は、F I T C のみを処理したものである。

【図 4】配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドに F I T C を結合させた後、それぞ  
れ H e L a 細胞株に処理し、流細胞分析器 ( F A C S ) での分析結果、細胞uptakeされた  
細胞の数を示した図面である。対照群は、F I T C のみを処理したものである。

【図 5】配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドに F I T C を結合させた後、それぞ  
れ H e L a 細胞株に処理し、流細胞分析器 ( F A C S ) での分析結果、細胞uptakeされた  
細胞の数を示した図面である。対照群は、F I T C のみを処理したものである。

【図 6】配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドに F I T C を結合させた後、それぞ  
れ H e L a 細胞株に処理し、流細胞分析器 ( F A C S ) での分析結果、細胞uptakeされた  
細胞の数を示した図面である。対照群は、F I T C のみを処理したものである。

【図 7】配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドに F I T C を結合させた後、それぞ  
れ H e L a 細胞株に処理し、流細胞分析器 ( F A C S ) での分析結果、細胞uptakeされた  
細胞の数を示した図面である。対照群は、F I T C のみを処理したものである。

【図 8】配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドに F I T C を結合させた後、それぞ  
れ H e L a 細胞株に処理し、流細胞分析器 ( F A C S ) での分析結果、細胞uptakeされた  
細胞の数を示した図面である。対照群は、F I T C のみを処理したものである。

【図 9】配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドに F I T C を結合させた後、それぞ  
れ H e L a 細胞株に処理し、流細胞分析器 ( F A C S ) での分析結果、細胞uptakeされた  
細胞の数を示した図面である。対照群は、F I T C のみを処理したものである。

【図 10】配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドに F I T C を結合させた後、それ  
ぞれ H e L a 細胞株に処理し、流細胞分析器 ( F A C S ) での分析結果、細胞uptakeされ  
た細胞の数を示した図面である。対照群は、F I T C のみを処理したものである。

10

20

30

40

50

【図 27】配列番号 2 ないし配列番号 178 のペプチドに FITC を結合させた後、それぞれ HeLa 細胞株に処理し、流細胞分析器 (FACS) での分析結果、細胞 uptake され

50

【図 4 4】配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドに FITC を結合させた後、それ

50

【図 5 8】配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドに F I T C を結合させた後、それぞれヒト T リンパ球細胞株 (Jurkat) に処理し、流細胞分析器 (F A C S) での分析結果、細胞 uptake された細胞の数を示した図面である。対照群は、F I T C のみを処理したも

50



のである。

【図59】配列番号2ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれヒトTリンパ球細胞株(Jurkat)に処理し、流細胞分析器(FACS)での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面である。対照群は、FITCのみを処理したものである。

【図60】配列番号2ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれヒトTリンパ球細胞株(Jurkat)に処理し、流細胞分析器(FACS)での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面である。対照群は、FITCのみを処理したものである。

【図61】配列番号2ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれヒトTリンパ球細胞株(Jurkat)に処理し、流細胞分析器(FACS)での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面である。対照群は、FITCのみを処理したものである。

10

【図62】配列番号2ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれヒトTリンパ球細胞株(Jurkat)に処理し、流細胞分析器(FACS)での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面である。対照群は、FITCのみを処理したものである。

【図63】配列番号2ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれヒトTリンパ球細胞株(Jurkat)に処理し、流細胞分析器(FACS)での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面である。対照群は、FITCのみを処理したものである。

20

【図64】配列番号2ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれヒトTリンパ球細胞株(Jurkat)に処理し、流細胞分析器(FACS)での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面である。対照群は、FITCのみを処理したものである。

【図65】配列番号2ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれヒトTリンパ球細胞株(Jurkat)に処理し、流細胞分析器(FACS)での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面である。対照群は、FITCのみを処理したものである。

【図66】配列番号2ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれヒトTリンパ球細胞株(Jurkat)に処理し、流細胞分析器(FACS)での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面である。対照群は、FITCのみを処理したものである。

30

【図67】配列番号2ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれヒトTリンパ球細胞株(Jurkat)に処理し、流細胞分析器(FACS)での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面である。対照群は、FITCのみを処理したものである。

【図68】配列番号2ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれヒトTリンパ球細胞株(Jurkat)に処理し、流細胞分析器(FACS)での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面である。対照群は、FITCのみを処理したものである。

40

【図69】配列番号2ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれヒトTリンパ球細胞株(Jurkat)に処理し、流細胞分析器(FACS)での分析結果、細胞uptakeされた細胞の数を示した図面である。対照群は、FITCのみを処理したものである。

【図70】配列番号1のペプチドpep1にFITCを結合させた後、それぞれHeLa細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図71】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それぞれHeLa細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図72】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにFITCを結合させた後、それ

50

ぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図73】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図74】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図75】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図76】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図77】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図78】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図79】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図80】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図81】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図82】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図83】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図84】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図85】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【図86】配列番号1ないし配列番号178のペプチドにF I T Cを結合させた後、それぞれH e L a細胞株に処理して培養した後、細胞生存率と毒性とを測定した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0035】

タンパク質、核酸、ペプチドまたはウイルスなどは、治療物質として大きい潜在力を有しているが、分子レベルの大きさを有するので、組織及び細胞膜を侵透することができず、その使用が非常に制限的であった。また、小サイズの物質であるとしても、その性質や構造上、細胞膜の脂質二重層を透過することができない場合が多い。そのため、電気穿孔法(electroporation)または熱衝撃(heat shock)などにより、タンパク質、核酸、ペプチドまたはウイルスなどを細胞内に移動させる試みがあったが、細胞膜に損傷を与えずに、同時に前記物質の活性をそのまま維持しながら、前記物質を細胞内に移動させることは困難であった。そのような中、ヒト免疫欠乏ウイルス(H I V : human immuno-deficiency virus)由来のT A T (trans-activating transcriptional activator)タンパク質が、巨大活性物質を細胞内に移動させることができる細胞透過性ペプチド(cell penetrating peptide)として作用することができるということが明らかになりつつ、これに対する研究が活発に進められた。具体的には、細胞内毒性を引き起こすと知られたT A Tタンパク質とは異なり、生体内毒性を引き起こさず、さらに効果的に、タンパク質、核酸、ペプチドまたはウイルスのような巨大分子を、標的細胞内に移動させることができる物質に対する研究が進められた。それにより、本発明者らは、持続的な研究を介して、テロメラゼ由来のペプチドが、細胞毒性がほとんどなく、かつ細胞透過性ペプチドとしてすぐれた効果を有するということを発見した。

【0036】

配列番号1ないし配列番号178に記載されたペプチドは、下記表1ないし表5の通り

である。配列番号 179 は、ヒトテロメラーゼ全長タンパク質の配列である。配列番号 1 は、テロメラーゼ由来のペプチドであり、16 個アミノ酸から構成されたペプチドである。配列番号 2 ないし配列番号 77 のペプチドは、配列番号 1 の配列を含むペプチドである。配列番号 78 ないし配列番号 178 のペプチドは、配列番号 1 のペプチドの断片である。下記表 1 の「名称」は、ペプチドを区別するために名付けたものである。本発明の他の一側面で、配列番号 1 ないし配列番号 178 に記載されたペプチドのうち一つ以上のペプチドは、テロメラーゼに含まれたペプチドのうち、当該位置のペプチドを選別して合成した「合成ペプチド」を含む。本明細書において、「p e p」というのは、配列番号 1 の配列、または配列番号 2 ないし配列番号 178 のうちいずれか 1 つの配列を有するペプチド、またはその配列と 80 % 超の配列相同性を有するペプチド、または前記配列の断片を総称する用語である。

【 0 0 3 7 】

【表 1】

表 1

配列 番号	名称	70マーゼ 上の位置	配列	長さ
1.	pep1	[611-626]	EARPALLTSRLRFIPK	16 aa
2.	pep-RIA-1	[610-626]	REARPALLTSRLRFIPK	17 aa
3.	pep-RIA-2	[609-626]	HREARPALLTSRLRFIPK	18 aa
4.	pep-RIA-3	[608-626]	QHREARPALLTSRLRFIPK	19 aa
5.	pep-RIA-4	[607-626]	RQHREARPALLTSRLRFIPK	20 aa
6.	pep-RIA-5	[606-626]	VRQHREARPALLTSRLRFIPK	21 aa
7.	pep-RIA-6	[605-626]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPK	22 aa
8.	pep-RIA-7	[604-626]	AEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	23 aa
9.	pep-RIA-8	[603-626]	EAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	24 aa
10.	pep-RIA-9	[602-626]	SEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	25 aa
11.	pep-RIA-10	[601-626]	LSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	26 aa
12.	pep-RIA-11	[600-626]	ELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	27 aa
13.	pep-RIA-12	[599-626]	RELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	28 aa
14.	pep-RIA-13	[598-626]	LRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	29 aa
15.	pep-RIA-14	[597-626]	QLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	30 aa
16.	pep-RIA-15	[610-627]	REARPALLTSRLRFIPKP	18 aa
17.	pep-RIA-16	[609-627]	HREARPALLTSRLRFIPKP	19 aa
18.	pep-RIA-17	[609-628]	HREARPALLTSRLRFIPKPD	20 aa
19.	pep-RIA-18	[610-628]	REARPALLTSRLRFIPKPD	19 aa
20.	pep-RIA-19	[608-627]	QHREARPALLTSRLRFIPKP	20 aa
21.	pep-RIA-20	[608-628]	QHREARPALLTSRLRFIPKPD	21 aa
22.	pep-RIA-21	[608-629]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDG	22 aa
23.	pep-RIA-22	[609-629]	HREARPALLTSRLRFIPKPDG	21 aa
24.	pep-RIA-23	[610-629]	REARPALLTSRLRFIPKPDG	20 aa
25.	pep-RIA-24	[607-627]	RQHREARPALLTSRLRFIPKP	21 aa
26.	pep-RIA-25	[607-628]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPD	22 aa
27.	pep-RIA-26	[607-629]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDG	23 aa
28.	pep-RIA-27	[607-630]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	24 aa
29.	pep-RIA-28	[608-630]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	23 aa
30.	pep-RIA-29	[609-630]	HREARPALLTSRLRFIPKPDGL	22 aa
31.	pep-RIA-30	[610-630]	REARPALLTSRLRFIPKPDGL	21 aa
32.	pep-RIA-31	[606-627]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKP	22 aa
33.	pep-RIA-32	[606-628]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPD	23 aa
34.	pep-RIA-33	[606-629]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDG	24 aa
35.	pep-RIA-34	[606-630]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	25 aa
36.	pep-RIA-35	[606-631]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	26 aa
37.	pep-RIA-36	[607-631]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	25 aa
38.	pep-RIA-37	[608-631]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	24 aa
39.	pep-RIA-38	[609-631]	HREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	23 aa
40.	pep-RIA-39	[610-631]	REARPALLTSRLRFIPKPDGLR	22 aa

【表 2】

表 2

41.	pep-RIA-40	[605-627]	EVQRHREARPALLTSRLRFIPKP	23 aa
42.	pep-RIA-41	[605-628]	EVQRHREARPALLTSRLRFIPKPD	24 aa
43.	pep-RIA-42	[605-629]	EVQRHREARPALLTSRLRFIPKPDG	25 aa
44.	pep-RIA-43	[605-630]	EVQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	26 aa
45.	pep-RIA-44	[605-631]	EVQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	27 aa
46.	pep-RIA-45	[605-632]	EVQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	28 aa
47.	pep-RIA-46	[606-632]	VRQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	27 aa
48.	pep-RIA-47	[607-632]	RQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	26 aa
49.	pep-RIA-48	[608-632]	QHRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	25 aa
50.	pep-RIA-49	[609-632]	HREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	24 aa
51.	pep-RIA-50	[610-632]	REARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	23 aa
52.	pep-RIA-51	[604-627]	AEVQRHREARPALLTSRLRFIPKP	24 aa
53.	pep-RIA-52	[604-628]	AEVQRHREARPALLTSRLRFIPKPD	25 aa
54.	pep-RIA-53	[604-629]	AEVQRHREARPALLTSRLRFIPKPDG	26 aa
55.	pep-RIA-54	[604-630]	AEVQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	27 aa
56.	pep-RIA-55	[604-631]	AEVQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	28 aa
57.	pep-RIA-56	[604-632]	AEVQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	29 aa
58.	pep-RIA-57	[604-633]	AEVQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	30 aa
59.	pep-RIA-58	[605-633]	EVQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	29 aa
60.	pep-RIA-59	[606-633]	VRQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	28 aa
61.	pep-RIA-60	[607-633]	RQRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	27 aa
62.	pep-RIA-61	[608-633]	QHRHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	26 aa
63.	pep-RIA-62	[609-633]	HREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	25 aa
64.	pep-RIA-63	[610-633]	REARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	24 aa
65.	pep-RIA-64	[611-627]	EARPALLTSRLRFIPKP	17 aa
66.	pep-RIA-65	[611-628]	EARPALLTSRLRFIPKPD	18 aa
67.	pep-RIA-66	[611-629]	EARPALLTSRLRFIPKPDG	19 aa
68.	pep-RIA-68	[611-631]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLR	21 aa
69.	pep-RIA-69	[611-632]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	22 aa
70.	pep-RIA-70	[611-633]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	23 aa
71.	pep-RIA-71	[611-634]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIV	24 aa
72.	pep-RIA-72	[611-635]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVN	25 aa
73.	pep-RIA-73	[611-636]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNM	26 aa
74.	pep-RIA-74	[611-637]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMD	27 aa
75.	pep-RIA-75	[611-638]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDY	28 aa
76.	pep-RIA-76	[611-639]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYV	29 aa
77.	pep-RIA-77	[611-640]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVV	30 aa
78.	pep-RIA-78	[611-625]	EARPALLTSRLRFIP	15 aa
79.	pep-RIA-79	[611-624]	EARPALLTSRLRFI	14 aa
80.	pep-RIA-80	[611-623]	EARPALLTSRLRF	13 aa

【表 3】

表 3

81.	dep-RIA-81	[611-622]	EARPALLTSRLR	12 aa
82.	dep-RIA-82	[611-621]	EARPALLTSRL	11 aa
83.	dep-RIA-83	[611-620]	EARPALLTSR	10 aa
84.	dep-RIA-84	[611-619]	EARPALLTS	9 aa
85.	dep-RIA-85	[611-618]	EARPALLT	8 aa
86.	dep-RIA-86	[611-617]	EARPALL	7 aa
87.	dep-RIA-87	[611-616]	EARPAL	6 aa
88.	dep-RIA-88	[611-615]	EARPA	5 aa
89.	dep-RIA-89	[611-614]	EARP	4 aa
90.	dep-RIA-90	[611-613]	EAR	3 aa
91.	dep-RIA-91	[612-626]	ARPALLTSRLRFIPK	15 aa
92.	dep-RIA-92	[613-626]	RPALLTSRLRFIPK	14 aa
93.	dep-RIA-93	[614-626]	PALLTSRLRFIPK	13 aa
94.	dep-RIA-94	[615-626]	ALLTSRLRFIPK	12 aa
95.	dep-RIA-95	[616-626]	LLTSRLRFIPK	11 aa
96.	dep-RIA-96	[617-626]	LTSRLRFIPK	10 aa
97.	dep-RIA-97	[618-626]	TSRLRFIPK	9 aa
98.	dep-RIA-98	[619-626]	SRLRFIPK	8 aa
99.	dep-RIA-99	[620-626]	RLRFIPK	7 aa
100.	dep-RIA-100	[621-626]	LRFIPK	6 aa
101.	dep-RIA-101	[622-626]	RFIPK	5 aa
102.	dep-RIA-102	[623-626]	FIPK	4 aa
103.	dep-RIA-103	[624-626]	IPK	3 aa
104.	dep-RIA-104	[612-625]	ARPALLTSRLRFIP	14 aa
105.	dep-RIA-105	[613-624]	RPALLTSRLRFI	12 aa
106.	dep-RIA-106	[614-623]	PALLTSRLRF	10 aa
107.	dep-RIA-107	[615-622]	ALLTSRLR	8 aa
108.	dep-RIA-108	[616-621]	LLTSRL	6 aa
109.	dep-RIA-109	[617-620]	LTSR	4 aa
110.	dep-RIA-110	[612-624]	ARPALLTSRLRFI	13 aa
111.	dep-RIA-111	[612-623]	ARPALLTSRLRF	12 aa
112.	dep-RIA-112	[612-622]	ARPALLTSRLR	11 aa
113.	dep-RIA-113	[612-621]	ARPALLTSRL	10 aa
114.	dep-RIA-114	[612-620]	ARPALLTSR	9 aa
115.	dep-RIA-115	[612-619]	ARPALLTS	8 aa
116.	dep-RIA-116	[612-618]	ARPALLT	7 aa
117.	dep-RIA-117	[612-617]	ARPALL	6 aa
118.	dep-RIA-118	[612-616]	ARPAL	5 aa
119.	dep-RIA-119	[612-615]	ARPA	4 aa
120.	dep-RIA-120	[612-614]	ARP	3 aa

【 0 0 4 0 】

【表 4】

表 4

121	dep-RIA-121	[613-625]	RPALLTSRLRFIP	13 aa
122	dep-RIA-122	[613-623]	RPALLTSRLRF	11 aa
123	dep-RIA-123	[613-622]	RPALLTSRLR	10 aa
124	dep-RIA-124	[613-620]	RPALLTSR	8 aa
125	dep-RIA-125	[613-619]	RPALLTS	7 aa
126	dep-RIA-126	[613-618]	RPALLT	6 aa
127	dep-RIA-127	[613-617]	RPALL	5 aa
128	dep-RIA-128	[613-616]	RPAL	4 aa
129	dep-RIA-129	[613-615]	RPA	3 aa
130	dep-RIA-130	[614-625]	PALLTSRLRFIP	12 aa
131	dep-RIA-131	[614-624]	PALLTSRLRFI	11 aa
132	dep-RIA-132	[614-622]	PALLTSRLR	9 aa
133	dep-RIA-133	[614-621]	PALLTSRL	8 aa
134	dep-RIA-134	[614-620]	PALLTSR	7 aa
135	dep-RIA-135	[614-619]	PALLTS	6 aa
136	dep-RIA-136	[614-618]	PALLT	5 aa
137	dep-RIA-137	[614-617]	PALL	4 aa
138	dep-RIA-138	[614-616]	PAL	3 aa
139	dep-RIA-139	[615-625]	ALLTSRLRFIP	11 aa
140	dep-RIA-140	[615-623]	ALLTSRLRF	9 aa
141	dep-RIA-141	[615-621]	ALLTSRL	7 aa
142	dep-RIA-142	[615-620]	ALLTSR	6 aa
143	dep-RIA-143	[615-619]	ALLTS	5 aa
144	dep-RIA-144	[615-618]	ALLT	4 aa
145	dep-RIA-145	[615-617]	ALL	3 aa
146	dep-RIA-146	[616-625]	LLTSRLRFIP	10 aa
147	dep-RIA-147	[616-624]	LLTSRLRFI	9 aa
148	dep-RIA-149	[616-622]	LLTSRLR	7 aa
149	dep-RIA-150	[616-620]	LLTSR	5 aa
150	dep-RIA-151	[616-619]	LLTS	4 aa
151	dep-RIA-152	[616-618]	LLT	3 aa
152	dep-RIA-153	[617-625]	LTSRLRFIP	9 aa
153	dep-RIA-154	[617-624]	LTSRLRFI	8 aa
154	dep-RIA-155	[617-623]	LTSRLRF	7 aa
155	dep-RIA-156	[617-622]	LTSRLR	6 aa
156	dep-RIA-157	[617-621]	LTSRL	5 aa
157	dep-RIA-158	[617-619]	LTS	3 aa
158	dep-RIA-159	[618-625]	TSRLRFIP	8 aa
159	dep-RIA-160	[618-624]	TSRLRFI	7 aa
160	dep-RIA-161	[618-623]	TSRLRF	6 aa

【 0 0 4 1 】

【表 5】

表 5

161.	pep-RIA-162	[618-622]	TSRLR	5 aa
162.	pep-RIA-163	[618-621]	TSRL	4 aa
163.	pep-RIA-164	[618-620]	TSR	3 aa
164.	pep-RIA-165	[619-625]	SRLRFIP	7 aa
165.	pep-RIA-166	[619-624]	SRLRFI	6 aa
166.	pep-RIA-167	[619-623]	SRLRF	5 aa
167.	pep-RIA-168	[619-622]	SRLR	4 aa
168.	pep-RIA-169	[619-621]	SRL	3 aa
169.	pep-RIA-170	[620-625]	RLRFIP	6 aa
170.	pep-RIA-171	[620-624]	RLRFI	5 aa
171.	pep-RIA-172	[620-623]	RLRF	4 aa
172.	pep-RIA-173	[620-622]	RLR	3 aa
173.	pep-RIA-174	[621-625]	LRFIP	5 aa
174.	pep-RIA-175	[621-624]	LRFI	4 aa
175.	pep-RIA-176	[621-623]	LRF	3 aa
176.	pep-RIA-177	[622-625]	RFIP	4 aa
177.	pep-RIA-178	[622-624]	RFI	3 aa
178.	pep-RIA-179	[623-625]	FIP	3 aa
179.	Telomerase	[1-1132]	MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPATFVRR LGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDA RPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGA NVLAFCFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNT VTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCAL FVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHA SGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGAR RRGGSASRSLPLPKRPRGAPEPERTPVGGG SWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPAEAEATSLE GALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWD TPCPPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSL RPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRL PQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCP LRAAVTPAAGVCAREKPGGSVAPEEEDTDPR RLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLW GSRHNERRFLRNTKKFI SLGKHAKLSLQELTW KMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHLREEILA KFLHWM SVYVVELLSFFYVTETTFQKNRLF FYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEV RQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDY VVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSLNYERA RRPGLLGASVGLDDIHRWRTFVLRVRAQDP PPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIK PQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTL TDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAAVIEQSSSL NEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQG IPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGL LLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEY	1132 aa

## 【0042】

本発明の一側面は、配列番号2ないし配列番号178を含むペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチド、またはその断片をコーディングするポリヌクレオチドを提供する。前記ポリヌクレオチドを利用して、ペプチドを量産することができる。例えば、ペプチドをコーディングするポリヌクレオチドを含むベクターを、宿主細胞に入れて培養することにより、ペプチドを量産することができる。



## 【 0 0 4 3 】

本明細書に開示されたペプチドは、80%超、85%超、90%超、95%超、96%超、97%超、98%超、99%超の配列相同性を有するペプチドを含んでもよい。また、本明細書に開示されたペプチドは、配列番号2ないし配列番号178のうちいずれか一つ以上を含むペプチドまたはその断片と、1個以上のアミノ酸、2個以上のアミノ酸、3個以上のアミノ酸、4個以上のアミノ酸、5個以上のアミノ酸、6個以上のアミノ酸または7個以上のアミノ酸が変化したペプチドを含んでもよい。

## 【 0 0 4 4 】

本発明の一側面において、アミノ酸変化は、ペプチドの物理化学的特性を変更させる性質に属する。例えば、ペプチドの熱安定性を向上させ、基質特異性を変更させ、最適のpHを変化させるようなアミノ酸変化が行われる。

10

## 【 0 0 4 5 】

本明細書において、「アミノ酸」とは、自然にペプチドに統合される22個の標準アミノ酸だけではなく、D-アイソマー及び変形されたアミノ酸を含む。それにより、本発明の一側面においてペプチドは、D-アミノ酸を含むペプチドでもある。一方、本発明の他の側面においてペプチドは、翻訳後変形 (post-translational modification) された非標準アミノ酸などを含んでもよい。翻訳後変形の例は、リン酸化 (phosphorylation)、糖化 (glycosylation)、アシル化 (acylation) (例えば、アセチル化 (acetylation)、ミリストイル化 (myristoylation) 及びパルミトイル化 (palmitoylation) を含む)、アルキル化 (alkylation)、カルボキシル化 (carboxylation)、ヒドロキシル化 (hydroxylation)、糖化反応 (glycation)、ピオチニル化 (biotinylation)、ユビキチニル化 (ubiquitinylation)、化学的性質の変化 (例えば、ベータ-除去脱イミド化、脱アミド化) 及び構造的変化 (例えば、二硫化物ブリッジの形成) を含む。また、ペプチドコンジュゲートを形成するための架橋剤 (crosslinker) との結合過程で起こる化学反応によって生ずるアミノ酸の変化、例えばアミノ基、カルボキシル基または側鎖での変化のようなアミノ酸の変化を含む。

20

## 【 0 0 4 6 】

本明細書に開示されたペプチドは、自然そのままの供給源から同定及び分離した野生型ペプチドでもある。一方、本明細書に開示されたペプチドは、配列番号2ないし178の断片であるペプチドと比較し、一つ以上のアミノ酸が置換え、欠失及び/または挿入されたアミノ酸配列を含む人工変異体でもある。人工変異体においてだけではなく、野生型ポリペプチドでのアミノ酸変化は、タンパク質のフォールディング (folding) 及び/または活性に、有意の影響を及ぼさない保存性アミノ酸置換を含む。保存性置換の例は、塩基性アミノ酸 (アルギニン、リシン及びヒスチジン)、酸性アミノ酸 (グルタミン酸及びアスパラギン酸)、極性アミノ酸 (グルタミン及びアスパラギン)、疎水性アミノ酸 (ロイシン、イソロイシン、バリン及びメチオニン)、芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン)、及び小さいアミノ酸 (グリシン、アラニン、セリン及びトレオニン) の群の範囲内にある。一般的に、特異的活性を変更させないアミノ酸置換が本分野に公知されている。最も一般的に発生する交換は、Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、及びAsp/Gly、及びそれらと反対であるものである。保存的置換の他の例は、次の表6の通りである。

30

40

【表 6】

表 6

本来のアミノ酸	例示的な残基置換	望ましい残基置換
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	Leu
Leu (L)	norleucine; ile ; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe ; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	Leu

## 【 0 0 4 7 】

ペプチドの生物学的特性における実在的な変形は、( a ) 置換領域内のポリペプチド骨格の構造、例えば、シートまたは螺旋立体構造の維持におけるそれらの効果、( b ) 標的部位での前記分子の電荷または疎水性の維持におけるそれらの効果、または( c ) 側鎖のバルク維持におけるそれらの効果が、相当に異なる置換部を選択することによって行われる。天然残基は、一般的な側鎖特性に基づいて、次のグループに区分される：

- ( 1 ) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- ( 2 ) 中性親水性：cys、ser、thr；
- ( 3 ) 酸性：asp、glu；
- ( 4 ) 塩基性：asn、gln、his、lys、arg；
- ( 5 ) 鎖方向に影響を及ぼす残基：gly、pro；及び
- ( 6 ) 芳香族：trp、tyr、phe。

## 【 0 0 4 8 】

非保存的置換は、それら部類のうち1つの構成員を、他の部類で交換することによって行われる。ペプチドの適当な立体構造の維持と関連がないいかなるシステイン残基も、一般的にセリンで置換され、前記分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋結合を防止することができる。逆に言えば、システイン結合を、前記ペプチドに加え、その安定性を向上させることができる。

## 【 0 0 4 9 】

ペプチドの他の類型のアミノ酸変異体は、抗体のグリコシル化パターンが変化したものである。変化という意味は、ペプチドで発見された一つ以上の炭水化物残基の欠失、及び(

または) ペプチド内に存在しない一つ以上のグリコシル化部位の付加を示す。

【0050】

ペプチドのグリコシル化は、典型的に、N - 連結されたり、あるいはO - 連結されたものである。N - 連結されたということは、炭水化物残基がアスパラギン残基の側鎖に付着したということを用いる。トリペプチド配列であるアスパラギン - X - セリン及びアスパラギン - X - トレオニン(ここで、Xは、プロリンを除いた任意のアミノ酸である)は、炭水化物残基をアスパラギン側鎖に酵素的に付着させるための認識配列である。従って、それらトリペプチド配列のうち一つがポリペプチドに存在することにより、潜在的なグリコシル化部位が生成される。O - 連結されたグリコシル化は、糖N - アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースのうち一つを、ヒドロキシアミノ酸に付着させることをいう。最も一般的には、セリンまたはトレオニンに付着させることを意味するが、5 - ヒドロキシプロリンまたは5 - ヒドロキシリシンを使用することもできる。

10

【0051】

ペプチドへのグリコシル化部位の付加は、一つ以上の前述のトリペプチド配列を含むように、アミノ酸配列を変化させることによって便利に行われる(N - 連結されたグリコシル化部位の場合)。そのような変化は、一つ以上のセリン残基またはトレオニン残基を、最初の抗体の配列に付加するか、あるいはそれら残基で置換することによってもなされる(O - 連結されたグリコシル化部位の場合)。

【0052】

本発明の一側面は、細胞透過性ペプチドであって、配列番号2ないし配列番号178のうちいずれか1つの配列、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチドを提供する。本発明の一側面は、一つ以上の有効成分を送達するための薬物送達体であって、配列番号2ないし配列番号178を含むペプチドまたはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチドを含む医薬組成物を提供する。配列番号2ないし配列番号178を含むペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチドは、安全でありながらも、すぐれた細胞透過性ペプチドとして作用するので、薬物と結合し、薬物を細胞内に効果的に送達することができる。

20

【0053】

本発明の一側面は、配列番号2ないし配列番号178の配列のうちいずれか1つのペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチドと、移動対象である有効成分とが、互いにコンジュゲーションされたコンジュゲートを提供する。本発明の一側面において、有効成分は、タンパク質、核酸、ペプチド、脂質、糖脂質、ミネラル、糖、造影物質、薬物(drugs)及び化学物質(compounds)のうちから選択された一つ以上である。本発明の一側面において、前記有効成分は、ペプチドでもある。本発明の一側面において、前記有効成分であるペプチドは、サイトカイン、抗体、抗体断片、治療用酵素、可溶性受容体、またはリガンドでもある。

30

【0054】

本明細書において、「細胞透過性ペプチド(CPP: cell penetrating peptide)」は、インビトロ(in vitro)及び/またはインビボ(in vivo)で、移動対象(cargo)を細胞内に移動させることができるペプチドを意味する。本明細書において、「移動対象」は、細胞透過性ペプチドと結合し、細胞内に移動することができる物質をいずれも含み、例えば、細胞透過効率を高めることを所望する全ての物質、具体的には、薬物、化粧品または健康食品の有効物質、さらに具体的には、一般的な経路を介しては、細胞内への移動が容易ではない物質、一層具体的には、タンパク質、核酸、ペプチド、ミネラル、ブドウ糖を例として挙げることができる、糖、ナノ粒子、生物学的製剤、ウイルス、造影物質、またはその他化学物質を含むが、それらに制限されるものではない。本明細書において、「薬物」は、疾病、傷または特定症状を緩和、予防、治療または診断するための物質を含む広範囲な概念である。

40

【0055】

50

本明細書において、「運搬ペプチド(carrier peptide)」は、有効成分と結合し、有効成分を、所望する部位に移動させる役割を行うペプチドを意味する。

【0056】

本発明の一側面において、移動対象としてのタンパク質またはペプチドは、ホルモン、ホルモン類似体、酵素、酵素阻害剤、信号伝達タンパク質(または、ペプチド)、抗体及びワクチンのうち一つ以上を含むが、それらに制限されるものではない。本発明の一側面において、核酸は、自然発生的または人工的なDNA分子またはRNA分子でもあり、一本鎖または二本鎖でもある。核酸分子は、一つ以上でもあるが、同一類型(例えば、同一ヌクレオシド配列を有する)の核酸分子でもあり、他の類型として、核酸分子でもある。DNA、cDNA、decoy DNA、RNA、siRNA、miRNA、shRNA、stRNA、snRNA、sRNA、PNA、アンチセンスオリゴマー(antiosense oligomer)、プラスミド(plasmid)、及びその他変形された核酸のうち一つ以上を含むが、それらに制限されるものではない。本発明の一側面において、ウイルスは、ウイルス全体、またはウイルスの核酸を含むウイルスコアを含んでもよい。本発明の一側面において、化学物質は、薬物として機能することができる化学物質を含む広範囲な概念であり、天然または合成の化学物質を含む。

10

【0057】

本発明の一側面において、細胞透過性ペプチドによって細胞内に送達する薬物は、リボソーム、ミセル、ナノ粒子、磁性粒子または量子ドットのような薬物送達体をさらに含んでもよい。

20

【0058】

本明細書において、「造影物質」というのは、医学的映像撮影(imaging)において、生体内構造または流体の造影のために使用される全ての物質を含む広範囲な概念である。適する造影物質は、放射性非透過造影物質(radiopaque contrast agent)、常磁性造影物質(paramagnetic contrast agent)、超常磁性造影物質(superparamagnetic contrast agent)、CT(computed tomography)造影物質及びその他造影物質を含むが、それらに制限されるものではない。例えば、放射性非透過造影物質(X線映像用)は、無機ヨード化合物及び有機ヨード化合物(例えば、ジアトリゾ酸)、放射性非透過金属及びその塩(例えば、銀、金、白金など)、並びにその他放射性非透過化合物(例えば、カルシウム塩、硫酸バリウムのようなバリウム塩、タンタル及び酸化タンタル)を含む。適する常磁性造影物質(MR映像用)は、ガドリニウムジエチレントリアミン五酢酸(Gd-DTPA: gadolinium diethylene triaminepentaacetic acid)及びその誘導体、並びにその他のガドリニウム、マンガン、鉄、ジスプロシウム(dysprosium)、銅、ユロピウム(europium)、エルビウム(erbium)、クロム、ニッケル及びコバルトの複合体、例えば、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸(DOTA)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, -N', N''-三酢酸(D03A)、1, 4, 7-トリアザシクロノナン-N, N', N''-三酢酸(NOTA)、1, 4, 8, 10-テトラアザシクロテトラデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸(TETA)、ヒドロキシベンジルエチレン-ジアミン二酢酸(HBED)などを含む。適する超常磁性造影物質(MR映像用)は、磁鉄鉱(magnetite)、超常磁性酸化鉄(SPIO: super-paramagnetic iron oxide)、超小超常磁性酸化鉄(USPIO: ultrasmall superparamagnetic iron oxide)及び単結晶性(monocrystalline)酸化鉄を含む。他の適する造影物質は、ヨード化及び非ヨード化(non-iodinated)、イオン性及び非イオン性のCT造影物質、並びにスピン標識(spin-label)のような造影物質、またはその他診断活性剤(diagnostically effective agent)である。

30

40

【0059】

造影物質の他の例は、-ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼなどを含むが、それらに限定されないものではない、細胞で発現される場合、容易に検出可能なタンパク質をコーディングするマーカー遺伝子を含む。放射線

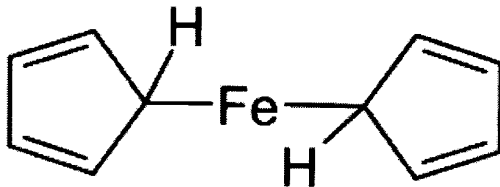
50

核種 (radionuclide)、蛍光物質 (fluor)、酵素、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害剤、リガンド (特に、ハプテン) のような多様な標識が利用される。

【 0 0 6 0 】

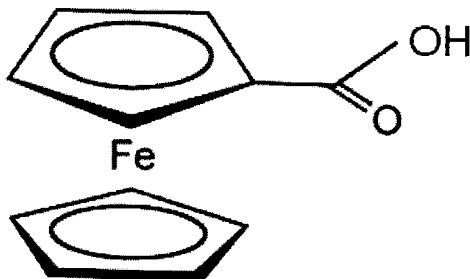
本発明の一実施例において、造影物質は、下記化学式 2 のフェロセンカルボン酸 (ferrocenecarboxylic acid) でもある。フェロセンの構造は、化学式 1 に示されている。

【 化 1 】



10

【 化 2 】



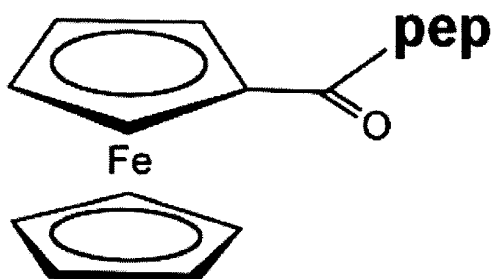
20

【 0 0 6 1 】

本発明の一実施例において、細胞透過性ペプチドと造影物質とのコンジュゲートは、下記化学式 3 のフェロセンカルボン酸 - p e p 1 (ferrocenecarboxylic - p e p 1) でもある。

30

【 化 3 】



40

【 0 0 6 2 】

本発明の一側面において、ペプチドまたは組成物は、一つ以上の検出可能な標識 (label) と融合される。該標識は、化学的、物理的、または酵素的な反応において、検出可能な化合物または信号を、直接的または間接的に発生させる化合物でもある。標識及びその後の検出は、当業界に公知の方法によって遂行される (例えば、Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001); Lottspeich, F., and Zorbach, H. (1998), Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, Germany)。該標識は、蛍光標識、酵素標識、発

50

色 (chromogenic) 標識、発光標識、放射線標識、ハプテン、ビオチン、金属複合体、金属及び金コロイドを含むが、それらに制限されるものではない。そのような全ての種類の標識は、当業界に周知されており、多様な供給メーカーから商業的に入手可能である。

#### 【0063】

本発明の一側面において、ペプチドに、移動対象 (cargo) を直接結合させることができる。本発明の他の一側面において、共有結合または非共有結合を例として挙げることができる多くの結合方法を介して、ペプチドに移動対象を結合させることができる。移動対象は、例えば、本発明の一側面によるペプチドのN末端またはC末端に結合することができる。例えば、ジスルフィド (disulfide) 結合、あるいはペプチドN - グルタメート (E) のアルファアミン ( -amine)、またはC末端リシン (K) 残基のアミンに移動対象を結合させる共有結合を介して、ペプチドに移動対象を結合させることができる。または、ペプチドと移動対象とのうちいずれかが一つが他の一つを、カプセル状を例として挙げることができる形態に覆い包む非共有結合を介して、ペプチドと移動対象とを結合させることができる。

10

#### 【0064】

本発明の他の一側面において、リンカー (linker) を介して、ペプチドと移動対象とを結合させることができる。例えば、ペプチドN - グルタメートのアルファアミン ( -amine)、またはC末端リシン残基のアミンに、6 - ヒドラジノピリジン - 3 - カルボン酸 (hynic: 6 - hydrazinopyridine - 3 - carboxylic acid) リンカーのようなリンカーを導入した後、リンカーに移動対象を結合させることにより、ペプチドに移動対象を結合させることができる。

20

#### 【0065】

本発明のさらに他の一側面において、移動対象がDNAまたはRNAである場合、ペプチドには、SH基 (チオール基) を導入し、DNAまたはRNAには、マレイミド基 (maleimide group) を導入した後、ペプチドのSH基と、DNAまたはRNAのマレイミド基とを結合させることによって、ペプチドに移動対象を結合させることができる。

#### 【0066】

本発明のさらに他の一側面において、移動対象がタンパク質またはペプチドである場合、移動対象を発現するDNAに、運搬ペプチドを発現するDNAを結合させた後、それを発現させることによって、移動対象とペプチドとの融合タンパク質形態で、運搬ペプチドと移動対象とを結合させることができる。融合タンパク質による結合の具体的な例は、次の通りである: 融合タンパク質を生産するためのプライマー (primer) 作製時、移動対象を発現するヌクレオチドの前に、運搬ペプチドをコーディングするヌクレオチドを付けた後、得られたヌクレオチドを、制限酵素としてpETベクターを例として挙げることができるベクターに挿入し、BL - 21 (DE3) を例として挙げることができる細胞に導入 (transformation) して発現させる。そのとき、IPTG (isopropyl-1-thio- -D-galactopyranoside) のような発現誘導剤を処理し、融合タンパク質を効果的に発現させることができる。その後、His tag精製 (purification) のような方法を介して発現させた融合タンパク質を精製した後、PBSを利用して透析し、キットに入れ、例えば、2,000ないし4,000rpmで、5ないし20分ほど遠心分離して濃縮させることができる。

30

40

#### 【0067】

本発明の一側面において、運搬ペプチドは、染色物質または蛍光物質、具体的には、イソチオシアン酸フルオレセイン (FITC: fluorescein isothiocyanate) または緑色蛍光タンパク質 (GFP) と結合することができる。本発明の一側面において、FITCは、運搬ペプチドのN末端LysまたはC末端Lysのアミノ基 ( $\text{NH}_3^+$ ) と結合することができる。末端にLysが存在しないペプチドである場合、Lysを含むリンカーにより、ペプチドとFITCとを結合させることができる。

#### 【0068】

運搬ペプチドとして機能する本明細書に開示された、配列番号2ないし配列番号178

50

のうちいずれか一つ以上含むペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチドは、移動対象と1:1のモル比で結合することができるが、それ以外のモル比で結合することも可能である。例えば、CPP:移動対象のモル比が2:1以上でもある。具体的には、2:1以上、3:1以上、4:1以上、5:1以上、6:1以上、7:1以上、8:1以上、9:1以上または10:1以上である。これは、複数個分子の運搬ペプチドが1つの移動対象分子と結合することができるということを意味する。複数個の運搬ペプチド分子は、互いに直列または並列に連結される。直列に連結されるということは、運搬ペプチドの末端アミノ酸部位で、互いに結合するということを意味し、並列に連結されるということは、運搬ペプチドの末端アミノ酸以外の部分で、互いに結合するということを意味する。反対に、運搬ペプチド:移動対象のモル比が1:2以上でもある。これは、1つの運搬ペプチド分子に、複数個の移動対象分子が結合することができるということを意味する。例えば、運搬ペプチド:移動対象のモル比が1:2でもある。具体的には、1:2以上、1:3以上、1:4以上、1:5以上、1:6以上、1:7以上、1:8以上、1:9以上または1:10以上である。

10

**【0069】**

イソチオシアン酸フルオレセインと結合したペプチドは、その移動経路を容易に把握することができるので、本発明の一側面による運搬ペプチドは、細胞イメージング用または細胞内薬物送達経路追跡用に活用される。

**【0070】**

本発明の一側面は、配列番号2ないし配列番号178のうちいずれか一つ以上を含むペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチドの、一つ以上の有効成分を送達するための薬物送達体としての用途を提供する。

20

**【0071】**

本発明の一側面は、薬物、及び配列番号2ないし配列番号178のうちいずれか一つ以上を含むペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチドを含む組成物を対象に適用することを含む、対象の細胞内に薬物を送達する方法を提供する。

**【0072】**

本発明の一側面は、配列番号2ないし配列番号178のうちいずれか一つ以上を含むペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチド、及び造影物質を対象に適用することを含む、対象の適用薬物送達経路追跡方法を提供する。

30

**【0073】**

本発明の一側面は、配列番号2ないし178のうちいずれか一つ以上を含むペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチドと造影物質とのコンジュゲートを、対象に適用することを含む、対象の適用薬物送達経路追跡方法を提供する。

**【0074】**

本発明の一側面は、配列番号2ないし配列番号178のうちいずれか一つ以上を含むペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチド、及び移動対象である薬物のコンジュゲートを含む組成物、並びに組成物の投与量、投与経路、投与回数及び適応症のうち一つ以上を開示した指示書を含む、対象の細胞内薬物送達用キットを提供する。

40

**【0075】**

本発明の一側面は、有効成分、及び配列番号2ないし配列番号178のうちいずれか一つ以上を含むペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチドを含む化粧品または食品の組成物を提供する。本発明の他の側面は、配列番号2ないし配列番号178のうちいずれか一つ以上を含むペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有

50

するペプチドと有効成分とのコンジュゲートを含む、化粧品または食品の組成物を提供する。

【0076】

本発明の一側面は、配列番号2ないし配列番号178のうちいずれか一つ以上を含むペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチドと有効成分とのコンジュゲートを含み、有効成分を細胞内に送達する効果にすぐれる医薬、化粧品または食品の組成物を提供する。

【0077】

ミトコンドリアは、有核細胞のエネルギー代謝の中心器官であり、ヒト疾病との関連性が最初に明らかにされた細胞内器官である (Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B: A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study, J Clin Invest 41: 1776-804, 1962)。

【0078】

ミトコンドリアは、細胞のエネルギー代謝と細胞死滅 (apoptosis) との調節に重要な役割を行うので、多様な治療薬物の主な標的として作用する。また、その器官は、細胞内カルシウム濃度調節に関与し、ミトコンドリア呼吸チェーンは、エネルギー生産に重要な電子伝達系として作用し、活性酸素の生産を引き起こす。結果として、ミトコンドリア機能異常は、糖尿病、心筋病症、不妊、失明、腎臓/肝臓疾患、脳卒中などの成人疾病と密接な関係がある (Modica-Napolitano KS, Singh KK: April mitochondria as targets for detection and treatment of cancer, Expert Rev Mol Med 11: 1-19, 2002)。同時に、ミトコンドリア遺伝子の突然変異は、老化、退行性神経疾患、癌疾患などの発病に關与する可能性が提起されている。

【0079】

本発明の一側面によれば、ミトコンドリア・ターゲッティング有効成分送達システムが提供される。前述のいずれか1つのコンジュゲートを含み、運搬ペプチドは、細胞内ミトコンドリアに局所的に移動するペプチドであり、前記有効成分のミトコンドリア局所送達を行うペプチドであり、80%超の配列相同性を有するペプチド及びその断片は、それに対応する配列番号2ないし配列番号178のうちいずれか1つのペプチドのミトコンドリア・ターゲッティング能を保有したミトコンドリア・ターゲッティング有効成分送達システムでもある。

【0080】

また、本発明の一側面によれば、ミトコンドリア活性調節用組成物が提供され、前述のコンジュゲートのうちいずれか1つのコンジュゲートを含み、運搬ペプチドは、細胞内ミトコンドリアに局所的に移動するペプチドであり、前記有効成分のミトコンドリア局所送達を行うペプチドであり、80%超の配列相同性を有するペプチド及びその断片は、それに対応する配列番号2ないし配列番号178のうちいずれか1つのペプチドのミトコンドリア・ターゲッティング能を保有したミトコンドリア活性調節用組成物でもある。

【0081】

本発明の一側面によるミトコンドリア活性調節用組成物において、前記組成物は、ミトコンドリア関連の疾病または障害の治療用、予防用、進行抑制用または症状緩和用の薬学的組成物であり、前記有効成分は、ミトコンドリア関連の疾病または障害の治療、予防、進行抑制または症状緩和の機能を示す成分でもある。

【0082】

本明細書において言及された「ミトコンドリア関連疾病」は、以下を含むが、それらに制限されるものではない：ハンチントン疾患；筋萎縮側の硬化症；MELAS (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidemia and stroke-like episodes；乳酸酸性血症、及び発作類似エピソードを有するミトコンドリア脳心筋病)；MERF (myoclonus, epilepsy, and myopathy with ragged red fibers；断片化されたレッドファイバーを有する間代性筋痙攣の癲癇及び筋障害)；NARP/MILS (neurogenic muscular



weakness, ataxia, retinitis pigmentosa / maternally inherited Leigh syndrome ; 神経性筋肉弱化、失調症及び色素性網膜炎 / 母系遺伝性ライ症候群 ) ; L H O N ( Lebers hereditary optic neuropathy ; レーバーの遺伝的視神経病、ミトコンドリア盲症 ) ; K S S ( Kearns-Sayre syndrome ; カーンズ・セイヤー症候群 ) ; P M P S ( Pearson marrow-pancreas syndrome ; ピアソン骨髓・脾臓症候群 ) ; C P E O ( chronic progressive external ophthalmoplegia ; 慢性進行性外眼筋麻痺 ) ; ライ症候群 ; アルパース症候群 ; 多発性 m t D N A 欠損症候群 ; m t D N A 消耗症候群 ; 複合体 I 欠陥 ; 複合体 I I ( S D H ) 欠陥 ; 複合体 I I I 欠陥 ; シトクロム c 酸化酵素 ( C O X 、 複合体 I V ) 欠陥 ; 複合体 V 欠陥 ; アテニンヌクレオチド輸送体 ( A N T ) 欠陥 ; ピルピン酸脱水素酵素 ( P D H ) 欠陥 ; 乳酸酸性血症を有するエチルマロン酸酸性尿症 ; 乳酸酸性血症を有する 3 - メチルグルタコン酸酸性尿症 ; 感染の間に衰微を示す無反応性癰瘍 ; 感染の間に衰微を示すアスパーger症候群 ; 感染の間に衰微を示す自閉症 ; 注意欠如多動性疾患 ( A D H D ) ; 感染の間に衰微を示す脳性マヒ ; 感染の間に衰微を示す失読症 ; 母系遺伝性血小板減少症 ; 白血病 ; M N G I E ( mitochondrial myopathy, peripheral and autonomic neuropathy, gastrointestinal dysfunction, and epilepsy ; ミトコンドリア筋障害、末梢神経障害及び自律神経障害、胃腸機能不全、及び癰瘍 ) ; M A R I A H S 症候群 ( mitochondrial ataxia, recrudescent infection, aphasia, hypouricemia/hypomyelination, seizure and dicarboxylic acid aciduria ミトコンドリア失調症、再発性感染、失語症、低尿酸血症 / 低髄鞘症、急発作、及びジカルボン酸性尿症 ) ; N D 6 異緊張症 ; 感染の間に衰微を示す循環性嘔吐症候群 ; 乳酸酸性血症を有する 3 - ヒドロキシイソ酪酸酸性尿症、乳酸酸性血症を有する糖尿病 ; ウリジン反応性神経性症候群 ( U R N S ) ; 家族性両側線条体壊死 ( F B S N ) ; アミノグリコシド関連難聴 ; 弛緩された心筋障害 ; 脾臓リンパ腫 ; ウォルフラム症候群 ; 多発性ミトコンドリア D N A 欠損症候群 ; 及び腎細尿管性酸症 / 糖尿 / 失調症候群。

10

20

#### 【 0 0 8 3 】

他の様態において、本発明は、前記ポリペプチッドをコーディングする、核酸分子を提供し、その塩基配列は例えば、GAA GCG CGC CCG GCG CTG CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA配列を有する。核酸分子は、当業者に公知の技法によって、宿主細胞内に導入される。例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム、電気穿孔法、ウイルスと細胞とを接触させることによる形質転換、または直接細胞内にマイクロ注射する方法などがある。宿主細胞は、高等真核細胞、例えば、哺乳類細胞、または下級真核細胞、例えば、酵母細胞、または原核細胞、例えば、バクテリア細胞でもある。形質転換に適する原核宿主としては、大腸菌、枯草菌、ネズミチフス菌、シュードモナス属、ストレプトマイセス属、マイクバクテリア属に属する種を例として挙げることができる。

30

#### 【 0 0 8 4 】

前記核酸分子を含むベクターは、一般的に、組換え発現ベクターであり、宿主細胞の形質転換が可能にする複製起源及び選択可能なマーカー（例えば、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、またはネオマイシン耐性、または大腸菌でのテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性、または *S. Cerevisiae* T R P 1 遺伝子）、及びタンパク質コーティング配列の転写を調節するプロモーターを含んでもよい。使用される有用な発現ベクターは、例えば、S V 4 0 ; p c D N A の誘導体 ; c o l E 1、p C R 1、p B R 3 2 2、p M a 1 - C 2、p E T、p G E X ( Smith, et al., Gene 67: 31-40 (1988) ) のような公知のバクテリアプラスミド ; p M B 9 及びその誘導体 R P 4 のようなプラスミド ; N M 9 8 9 のようなファージ I の数多い誘導体のようなファージ D N A ; M 1 3、及びフィラメント型一本鎖のファージ D N A のようなファージ D N A ; 酵母プラスミド、例えば、ファージ D N A b、または発現制御配列を使用するために変形されたプラスミドとファージ D N A との組み合わせから誘導されたベクターなどがある。哺乳類発現ベクターは、複製起源、適するプロモーター及びエンハンサーを含む。また、必須リポソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与体及びスプライス受容体の部位、転写終結配列、及び 5 ' プランキング非転写配列を含んでもよい。哺乳類発現ベクターは、誘

40

50

導性プロモーター、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーターを含むベクター、DHF R発現カセットを含むあらゆる発現ベクター、またはpEDのようなDHF R /メトトレキサート共増幅ベクター(Randal J, Kaufman, 1991, Randal J. Kaufman, Current Protocols in Molecular Biology, 16, 12 (1991))を含む。または、グルタミン合成酵素/メチオニンスルホキシミン共増幅ベクター、例えば、pEE14 (Celltech)、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、または核抗原(EBNA)の制御下で、エピソード性発現を指示するベクター、例えば、pREP4 (Invitrogen)、pCEP4 (Invitrogen)、pMEP4 (Invitrogen)、pREP8 (Invitrogen)、pREP9 (Invitrogen)及びpEBVHis (Invitrogen)が使用される。選択性哺乳類発現ベクターとしては、Rc /CMV (Invitrogen)、pRc /RSV (Invitrogen)などがある。本発明に使用されるワクチニアウイルス哺乳類発現ベクターは、pSC11、pMJ601、pTKgpTF1Sなどがある。

10

#### 【0085】

本発明に使用される酵母発現システムとしては、非融合pYES2ベクター (Invitrogen)、融合pYESHisA, B, C (Invitrogen)、pRSベクターなどがある。

#### 【0086】

前記ベクターは、多様な哺乳類細胞、特に、ヒト由来細胞や、バクテリア、酵母、真菌、昆虫、線虫類及び植物細胞に導入することができる。適する細胞の例としては、VERO細胞、HELA細胞、例えば、ATCC No. CCL2、CHO細胞株、例えば、ATCC No. CCL61、COS細胞、例えば、COS-7細胞及びATCC No. CRL1650細胞、W138、BHK、HepG2、3T3、例えば、ATCC No. CRL6361、A549、PC12、K562細胞、293細胞、Sf9細胞、例えば、ATCC No. CRL1711及びCv1細胞、例えば、ATCC No. CCL70などがある。

20

#### 【0087】

本発明に使用される他の適する細胞としては、原核宿主細胞菌株、例えば、大腸菌(例えば、DH5-菌株)、枯草菌、ネズミチフス菌、またはシュードモナス属、ストレプトマイセス属及びブドウ球菌属に属する菌株がある。

#### 【0088】

本発明の一側面による組成物は、配列番号配列番号2ないし178のうちいずれか一つ以上を含むペプチド、またはその断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%超の配列相同性を有するペプチドを、0.1µg/mgないし1mg/mg、具体的には、1µg/mgないし0.5mg/mg、さらに具体的には、10µg/mgないし0.1mg/mg含量で含んでもよい。前記範囲で含む場合、本発明の意図した効果を示すのに適切なだけでなく、組成物の安定性及び安全性をいずれも満足することができ、コスト対比効果の側面でも、前記範囲で含むことが適切である。

30

#### 【0089】

本発明の一側面による組成物は、ヒト、犬、ニワトリ、豚、牛、羊、ギニアピッグまたは猿を含む全ての動物に適用されてもよい。

#### 【0090】

本発明の一側面による医薬組成物は、経口、直腸、経皮、静脈内、筋肉内、腹腔内、骨髄内、硬膜内または皮下などに投与されてもよい。

40

#### 【0091】

経口投与のための剤形は、錠剤、丸剤、軟質または硬質のカプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤または乳濁剤でもあるが、それらに制限されるものではない。非経口投与のための剤形は、注射剤、点滴剤、ローション、軟膏、ゲル、クリーム、懸濁液剤、乳剤、坐剤、パッチまたは噴霧剤でもあるが、それらに制限されるものではない。

#### 【0092】

本発明の一側面による医薬組成物は、必要によっては、希釈剤、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、緩衝剤、分散剤、界面活性剤、着色剤、香料または甘味剤などの添加剤を含

50

んでもよい。本発明の一側面による医薬組成物は、当業界の一般的な方法によって製造される。

【0093】

本発明の一側面による医薬組成物の有効成分は、投与される対象の年齢、性別、体重、病理状態及びその深刻度、投与経路、または処方者の判断によって異なる。そのような因子に基づいた適用量決定は、当業者のレベル内にあり、その1日投与用量は、例えば、 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ ないし $1 \text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、具体的には $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ ないし $10 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、さらに具体的には $10 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ ないし $1 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、一層具体的には $50 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ ないし $100 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ になるが、それらに制限されるものではない。本発明の一側面による医薬組成物は、1日1回ないし3回投与されるが、それ

10

【0094】

本発明の一側面による化粧品組成物は、局所適用に適する全ての剤形として提供される。例えば、溶液、水相に油相を分散させて得たエマルジョン、油相に水相を分散させて得たエマルジョン、懸濁液、固体、ゲル、粉末、ペースト、泡沫 (foam) またはエアロゾルの剤形で提供される。そのような剤形は、当該分野の一般的な方法によって製造される。

【0095】

本発明の一側面による化粧品組成物は、主効果を損傷させない範囲内で、望ましくは、主効果に相乗効果を与えることができる他の成分を含んでもよい。また、本発明の一側面による化粧品組成物は、保湿剤、エモリエント剤、界面活性剤、紫外線吸収剤、防腐剤、殺菌剤、酸化防止剤、pH調整剤、有機または無機の顔料、香料、冷感剤または制汗剤をさらに含んでもよい。前記成分の配合量は、本発明の目的及び効果を損傷させない範囲内で、当業者が容易に選定可能であり、その配合量は、化粧品組成物全体重量を基準に、 $0.01$ ないし $5$ 重量%、具体的には $0.01$ ないし $3$ 重量%でもある。

20

【0096】

本発明の一側面による食品組成物の剤形は、特別に限定されるものではないが、例えば、錠剤、顆粒剤、粉末剤、液剤、固形製剤などで剤形化される。各剤形は、有効成分以外に、当該分野で一般的に使用される成分を剤形または使用目的によって、当業者が困難なしに、適宜選定して配合することができ、他の原料と同時に適用する場合、相乗効果が起

30

【0097】

前記有効成分の投与量決定は、当業者のレベル内にあり、その1日投与用量は、例えば、 $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ ないし $10 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、さらに具体的には $10 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ ないし $1 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、一層具体的には $50 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ ないし $100 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ でもあるが、それらに制限されるものではなく、投与する対象の年齢、健康状態、合併症など多様な要因によって異なる。

【0098】

本明細書で使用された用語は、特定具体例について説明するための目的のみに意図されたものであり、本発明を限定する意図ではない。名詞の前に個数が省略された用語は、数量を制限するものではなく、言及された名詞物品が一つ以上存在するということを示すものである。用語である「含む」、「有する」及び「含有する」は、開かれた用語と解釈される（すなわち、「含むが、それに限定されるものではない」という意味）。

40

【0099】

数値の範囲を言及するのは、ただその範囲内に属するそれぞれの別個の数値を個別的に言及することの代わりとする容易な方法だからであり、そうではないということが明示されていない限り、各別個の数値は、まさに個別的に明細書に言及されているように本明細書に統合される。全ての範囲の終値は、その範囲内に含まれ、独立して組み合わせ可能である。

【0100】

50

本明細書に言及された全ての方法は、異なって明示されているか、あるいは文脈によって明白に矛盾しない限り、適切な手順で遂行されてもよい。ある一実施例及び全ての実施例、または例示的言語（例えば、「～のような」）を使用するのは、特許請求の範囲に含まれていない限り、単に本発明をさらに良好に記述するためであり、本発明の範囲を制限するものではない。明細書のいかなる言語も、いかなる非請求の構成要素を、本発明の実施に必須なものであると解釈されてはならない。取り立てての定義がない限り、本明細書に使用される技術的及び科学的な用語は、本発明が属する技術分野で当業者によって、通常理解されるような意味を有する。

#### 【 0 1 0 1 】

本発明の望ましい具体例は、本発明を遂行するために、発明者に知られた最適のモードを含む。望ましい具体例の変動は、先行記載を読めば、当業者に明白になるであろう。本発明者らは、当業者がかような変動を適切に利用することを期待し、本明細書に記載されたところと異なる方式で本発明が実施されることを期待する。従って、本発明は、特許法によって許容されるように、添付された特許請求の範囲で言及された発明の要旨の均等物及び全ての変形を含む。さらに、全ての可能な変動内で、前述の構成要素のいかなる組み合わせでも、ここで反対に明示するか、あるいは文脈上明白に矛盾しない限り、本発明に含まれるものである。本発明は、例示的な具体例を参照し、具体的に示されて記述されたが、当業者であるならば、特許請求の範囲によって定義される発明の精神及び範囲を外れずとも、形態及びディテールにおいて、多様な変化が行われるということを十分に理解するであろう。

#### 【実施例】

#### 【 0 1 0 2 】

##### 実施例 1：ペプチドの合成

配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドを、従来公知の固相ペプチド合成法によって製造した。具体的には、ペプチドは、A S P 4 8 S (Peptron、I n c . , 大韓民国大田所在)を利用して、F m o c 固相合成法 (S P P S : solid phase peptide synthesis) を介して、C 末端からアミノ酸を一つずつカップリングすることによって合成した。次のように、ペプチドの C 末端の最初のアミノ酸が樹脂に付着したものを使用した。例えば、次の通りである：

#### 【 0 1 0 3 】

N H<sub>2</sub> - L y s ( B o c ) - 2 - chloro - Trityl Resin

N H<sub>2</sub> - A l a - 2 - chloro - Trityl Resin

N H<sub>2</sub> - A r g ( P b f ) - 2 - chloro - Trityl Resin

#### 【 0 1 0 4 】

ペプチド合成に使用した全てのアミノ酸原料は、N - termが F m o c によって保護され、残基は、いずれも酸で除去される T r t、B o c、t - B u ( t - butylester)、P b f ( 2 , 2 , 4 , 6 , 7 - pentamethyl dihydro - benzofuran - 5 - sulfonyl ) などによって保護されたものを使用した。例えば、次の通りである：

#### 【 0 1 0 5 】

F m o c - A l a - O H、F m o c - A r g ( P b f ) - O H、F m o c - G l u ( O t B u ) - O H、F m o c - P r o - O H、F m o c - L e u - O H、F m o c - I l e - O H、F m o c - P h e - O H、F m o c - S e r ( t B u ) - O H、F m o c - T h r ( t B u ) - O H、F m o c - L y s ( B o c ) - O H、F m o c - G l n ( T r t ) - O H、F m o c - T r p ( B o c ) - O H、F m o c - M e t - O H、F m o c - A s n ( T r t ) - O H、F m o c - T y r ( t B u ) - O H、F m o c - A h x - O H、T r t - Mercaptoacetic acid

#### 【 0 1 0 6 】

カップリング試薬 (coupling reagent) としては、H B T U [ 2 - ( 1 H - Benzotriazole - 1 - yl ) - 1 , 1 , 3 , 3 - tetramethylammonium hexafluorophosphate ] / H O B t [ N - Hydroxybenzotriazole ] / N M M [ 4 - Methylmorpholine ] を使用した。F m o

c 除去は、20%のDMF中のピペリジン (piperidine in DMF) を利用した。合成されたペプチドをResinから分離し、残基の保護基を除去するためには、切断カクテル (cleavage cocktail) [ TFA (trifluoroacetic acid) / TIS (triisopropylsilane) / EDT (ethanedithiol) / H<sub>2</sub>O = 92.5 / 2.5 / 2.5 / 2.5 ] を使用した。

【0107】

アミノ酸保護基が結合された出発アミノ酸が固相支持体に結合されている状態を利用して、ここに当該アミノ酸をそれぞれ反応させ、溶媒で洗浄した後、脱保護する過程を反復することにより、各ペプチドを合成した。合成されたペプチドを樹脂から切り取った後、HPLで精製し、合成いかんをMSで確認して凍結乾燥させた。

【0108】

10

ペプチド合成方法について、例えば、配列番号1のPEP1を例として挙げ、具体的な合成過程について説明すれば、次の通りである。

【0109】

#### 1) カップリング

NH<sub>2</sub>-Lys (Boc) - 2-chloro-Trityl Resinに保護されたアミノ酸 (8当量) と、カップリング試薬HBTU (8当量) / HOBT (8当量) / NMM (16当量) とをDMFに溶解させて添加した後、常温で2時間反応させ、DMF、MeOH、DMFの順に洗浄した。

【0110】

#### 2) Fmoc脱保護

20

20%のDMF中のピペリジン (piperidine in DMF) を加え、常温で5分間2回反応させ、DMF、MeOH、DMFの順に洗浄した。

【0111】

3) 1及び2の反応を反復して行い、ペプチド基本骨格NH<sub>2</sub>-E (OtBu) - A - R (Pbf) - P - A - L - L - T (tBu) - S (tBu) - R (Pbf) L - R (Pbf) - F - I - P - K (Boc) - 2-chloro-Trityl Resinを作った。

【0112】

4) 切断 (cleavage) : 合成が完了したペプチドResinに、切断カクテル (cleavage cocktail) を加え、ペプチドを樹脂から分離した。

【0113】

30

5) 得られた混合物 (mixture) に、cooling diethyl etherを加えた後、遠心分離して得られたペプチドを沈澱させる。

【0114】

6) Prep-HPLCで精製した後、LC/MSで分子量を確認して凍結させ、パウダーに製造した。

【0115】

### 実施例2: CPPとFITCとのコンジュゲート製造

#### (1) FITC - CPPコンジュゲートの製造

配列番号2ないし配列番号178のペプチドをFITCと接合させたコンジュゲートを、次のように製造した。例えば、配列番号1のpep1とFITCとのコンジュゲート、すなわち、FITC-linker-pep1を次のように製造した。

40

【0116】

前記実施例1のようにして得られたペプチド基本骨格NH<sub>2</sub>-linker-E (OtBu) - A - R (Pbf) - P - A - L - L - T (tBu) - S (tBu) - R (Pbf) L - R (Pbf) - F - I - P - K (Boc) - 2-chloro-trityl樹脂に、FITCを反応させた。具体的には、フルオレセイン-5-イソシアネート (FITC: fluorescein-5-isothiocyanate) (8当量) と、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA: N,N-diisopropylethylamine) (16当量) とをDMFに溶かして添加した後、常温で2時間反応させ、DMF、MeOH、DMFの順に洗浄した。その結果、FITC-linker-E (OtBu) - A - R (Pbf) - P - A - L - L - T (tBu) -

50

S ( t B u ) - R ( P b f ) L - R ( P b f ) - F - I - P - K ( B o c ) - 2 - chloro - trityl樹脂を得た。ここで、リンカーは、6 - アミノヘキサン酸 ( A h x : 6 - aminohexanoic acid ) である。前記合成が完了したペプチド樹脂に、T F A / T I S / H<sub>2</sub>O = 9 5 / 2 . 5 / 2 . 5 を加え、コンジュゲートを樹脂から分離させた。得られた混合物に、クーリングジエチルエーテル ( cooling diethyl ether ) を加えた後、遠心分離して得られたコンジュゲートを沈澱させた。その後、P r e p - H P L C で精製した後、分析的 ( analytical ) H P L C で純度を確認し、L C / M S で分子量を確認した。分子量確認を介して得られた物質が、F I T C - p e p 1 であるということが立証された。その後、凍結乾燥を行った。配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチドを F I T C と接合させたコンジュゲートも、前記配列番号 1 の p e p 1 と共に製造した。

10

#### 【 0 1 1 7 】

##### ( 2 ) C P P - F I T C コンジュゲートの製造

前記実施例 1 のように、ペプチド基本骨格 ( N H<sub>2</sub> - E ( O t B u ) - A - R ( P b f ) - P - A - L - L - T ( t B u ) - S ( t B u ) - R ( P b f ) L - R ( P b f ) - F - I - P - K ( D d e ) - 2 - chloro - trityl樹脂 ) を製造した。製造されたペプチド基本骨格の C - t e r m に、F I T C を選択的に導入するために、N - t e r m を B o c で保護した。その後、ジ - t e r t - ブチルジカーボネート ( 3 0 当量 ) と D I P E A ( 3 0 当量 ) とを D M F に溶かして添加した後、常温で 2 時間反応させ、D M F、M e O H、D M F の順に洗浄した。その結果、B o c - E ( O t B u ) - A - R ( P b f ) - P - A - L - L - T ( t B u ) - S ( t B u ) - R ( P b f ) L - R ( P b f ) - F - I - P - K ( D d e ) - 2 - chloro - trityl樹脂を得た。その後、C - t e r m K の残基に F I T C を付けるために、2 % D M F 中のヒドラジン ( hydrazine in D M F ) を処理し、C - t e r m L y s の残基保護基である D d e を除去した。その結果、B o c - E ( O t B u ) - A - R ( P b f ) - P - A - L - L - T ( t B u ) - S ( t B u ) - R ( P b f ) L - R ( P b f ) - F - I - P - K ( N H<sub>2</sub> ) - 2 - chloro - trityl樹脂を得た。その後、F I T C ( 8 当量 ) と D I P E A ( 1 6 当量 ) とを D M F に溶かして添加した後、常温で 2 時間反応させ、D M F、M e O H、D M F の順に洗浄した。その結果、B o c - E ( O t B u ) - A - R ( P b f ) - P - A - L - L - T ( t B u ) - S ( t B u ) - R ( P b f ) L - R ( P b f ) - F - I - P - K ( F I T C ) - 2 - chloro - trityl樹脂を得た。前記合成が完了したペプチド樹脂に、T F A / T I S / H<sub>2</sub>O = 9 5 / 2 . 5 / 2 . 5 を加え、ペプチドを樹脂から分離した。得られた混合物にクーリングジエチルエーテルを加えた後、遠心分離して得られたペプチドを沈澱させた。その後、P r e p - H P L C で精製した後、分析的 ( analytical ) H P L C で純度を確認し、L C / M S で分子量を確認した。その結果として得られた物質が p e p 1 - F I T C であるということが立証された。その後、乾燥を行った。

20

30

#### 【 0 1 1 8 】

配列番号 2 ないし配列番号 1 7 8 のペプチド - F I T C コンジュゲートも、前記 p e p 1 - F I T C と同じ方法で製造した。

#### 【 0 1 1 9 】

実施例 3 : フェロセンカルボン酸 ( ferrocenecarboxylic ) - C P P コンジュゲートの細胞透過能実験

40

##### 1 . フェロセンカルボン酸 ( ferrocenecarboxylic ) - C P P コンジュゲートの製造

カップリングのために N H<sub>2</sub> - L y s ( D d e ) - 2 - クロロ - トリチル樹脂に保護されたアミノ酸 ( 8 当量 ) と、カップリング試薬 H B T U ( 8 当量 ) / H O B t ( 8 当量 ) / N M M ( 1 6 当量 ) とを D M F に溶かして添加した後、常温で 2 時間反応させ、D M F、M e O H、D M F の順に洗浄した。その後、F m o c 脱保護 ( deprotection ) のために、2 0 % D M F 中のピペリジン ( piperidine in D M F ) を加え、常温で 5 分間 2 回反応させ、D M F、M e O H、D M F の順に洗浄した。前記反応を反復して行い、ペプチド基本骨格 ( N H<sub>2</sub> - E ( O t B u ) - A - R ( P b f ) - P - A - L - L - T ( t B u ) - S ( t B u ) - R ( P b f ) L - R ( P b f ) - F - I - P - K ( D d e ) - 2 - クロ

50

ロ - トリチル樹脂)を作った。ここに、2% DMF中のヒドラジン(hydrazine in DMF)を処理し、C末端Lysの残基保護基のDdeを除去した。その後、フェロセンカルボン酸(ferrocenecarboxylic acid)(Sigma Aldrich cat. # 46264、16当量)と、カップリング試薬HBTU(16当量)/HOBT(16当量)/NMM(32当量)とをDMFに溶かして添加した後、常温で2時間反応させ、DMF、MeOH、DMFの順に洗浄した。合成が完了したペプチド樹脂に、TFA/TIS/H<sub>2</sub>O = 95/2.5/2.5を加え、ペプチドを樹脂から分離した。得られた混合物に、クーリングジエチルエーテル(cooling diethyl ether)を加えた後、遠心分離して得られたペプチドを沈澱させた。これをHPLCで精製した後、MSで確認して凍結乾燥した。

【0120】

10

実施例4：pep-FITCコンジュゲートの細胞透過能実験

(1) HeLa細胞株での細胞透過能試験

細胞株培養

ATCCから得たHeLa細胞株をMEM(minimum essential medium)に、10%ウシ胎児血清(Invitrogen、米国)、Earle's salts、non-essential amino acids、ピルビン酸ナトリウム及び100 µg/mlペニシリン及び100 units/mlストレプトマイシンを添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>培養器で培養した。

【0121】

流細胞分析器(flow cytometry)

前記細胞株に、本発明の配列番号2ないし178のペプチド、pep(CPP)を処理し、controlとuptake程度を比較するために、流細胞分析器(flow cytometry)及び共焦点顕微鏡(confocal microscopy)の分析を実施した。

20

【0122】

細胞株を6ウェルプレートに分注し、培地に10%ウシ胎児血清(Invitrogen、米国)、100 µg/mlペニシリン及び100 units/mlストレプトマイシンを添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>培養器で12時間培養した。PBSで洗浄した後、MEM(minimum essential medium)で、1時間starvationを行わせる。各運搬ペプチド20 µMを処理し、37℃で1時間培養した。PBSで洗浄過程を3回反復し、Trypsin-EDTAで、37℃で10分間処理し、細胞外側に付いた運搬ペプチドを除去する。冷蔵されたPBSで細胞を収去した後、3回洗浄過程を遠心分離を介して反復した。その後、4%パラホルムアルデヒドが含まれた0.5 ml PBSに懸濁させ、FACS Calibur(Becton Dickinson)で蛍光を分析した。運搬ペプチドを処理していない細胞(対照群)と、多様な接合ペプチドとのcellular uptake様相をMFI(mean fluorescence intensity)で比較分析した。

30

【0123】

その結果は、図2ないし図29に示されている通りである。図1は、参照のために実施した配列番号1のpep1に係わる結果である。図2ないし図29に示された分析結果は、下記の表7に詳細に示した。

【0124】

【表 7】

表 7

	Pep-RIA-1	Pep-RIA-2	Pep-RIA-4	Pep-RIA-5	Pep-RIA-6	Pep-RIA-7	Pep-RIA-8
control	2.55±0.59	2.55±0.59	2.55±0.59	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87
peptide	24.3±0.61	20.56±1.23	27.25±0.79	20.24±0.34	16.09±2.52	16.49±1.35	14.12±0.79
	Pep-RIA-9	Pep-RIA-10	Pep-RIA-11	Pep-RIA-12	Pep-RIA-13	Pep-RIA-14	Pep-RIA-15
control	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	2.55±0.59	2.55±0.59
peptide	12.7±0.25	14.64±0.76	15.22±0.23	12.93±0.18	15.37±1.34	23.67±1.22	16.32±0.36
	Pep-RIA-16	Pep-RIA-17	Pep-RIA-18	Pep-RIA-22	Pep-RIA-23	Pep-RIA-24	Pep-RIA-25
control	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	2.55±0.59	3.98±0.87	3.98±0.87
peptide	15.96±2.37	13.61±0.22	13.4±0.34	14.42±0.28	16.57±0.68	19.42±0.72	17.41±0.32
	Pep-RIA-27	Pep-RIA-28	Pep-RIA-29	Pep-RIA-30	Pep-RIA-33	Pep-RIA-34	Pep-RIA-35
control	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87
peptide	19.69±0.49	14.8±0.32	15.26±0.95	15.34±0.55	15.04±0.68	16.37±0.97	13.22±0.34
	Pep-RIA-36	Pep-RIA-37	Pep-RIA-38	Pep-RIA-39	Pep-RIA-40	Pep-RIA-41	Pep-RIA-42
control	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87
peptide	14.07±0.41	16.73±0.28	18.02±0.71	15.84±0.79	15.14±3.52	13.58±2.78	15.27±1.65
	Pep-RIA-43	Pep-RIA-45	Pep-RIA-46	Pep-RIA-47	Pep-RIA-49	Pep-RIA-50	Pep-RIA-51
control	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87	3.98±0.87
peptide	15.34±1.35	14.23±1.65	15.35±0.92	17.6±0.82	15.15±0.62	15.47±0.73	15.13±1.03
	Pep-RIA-52	Pep-RIA-53	Pep-RIA-54	Pep-RIA-55	Pep-RIA-57	Pep-RIA-58	Pep-RIA-59
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	2.55±0.59	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	15.49±0.29	15.85±0.74	13.71±0.11	18.75±1.51	16.75±0.48	17.96±0.97	22.69±0.66
	Pep-RIA-60	Pep-RIA-62	Pep-RIA-63	Pep-RIA-64	Pep-RIA-65	Pep-RIA-66	Pep-RIA-68
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	15.93±1.84	18.89±0.75	19.72±0.33	15.51±0.58	12.84±1.11	13.46±0.19	14.94±1.88
	Pep-RIA-69	Pep-RIA-70	Pep-RIA-71	Pep-RIA-72	Pep-RIA-73	Pep-RIA-74	Pep-RIA-75
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	13.72±0.68	16.32±0.44	17.21±0.52	21.7±1.21	24.33±0.89	21.77±2.01	26.21±1.29
	Pep-RIA-76	Pep-RIA-77	Pep-RIA-78	Pep-RIA-79	Pep-RIA-80	Pep-RIA-81	Pep-RIA-82
control	4.03±0.26	2.39±0.23	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26

【 0 1 2 5 】



【表 8】

peptide	22.07±0.64	87.67±0.93	13.95±0.57	10.73±1.18	14.7±0.79	14.63±0.22	10.12±0.95
	<b>Pep-RIA-83</b>	<b>Pep-RIA-84</b>	<b>Pep-RIA-85</b>	<b>Pep-RIA-86</b>	<b>Pep-RIA-87</b>	<b>Pep-RIA-88</b>	<b>Pep-RIA-89</b>
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	10.27±0.25	10.32±0.49	10.1±0.34	9.95±2.34	9.6±1.76	8.89±0.61	9.13±0.77
	<b>Pep-RIA-90</b>	<b>Pep-RIA-91</b>	<b>Pep-RIA-92</b>	<b>Pep-RIA-93</b>	<b>Pep-RIA-94</b>	<b>Pep-RIA-95</b>	<b>Pep-RIA-96</b>
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	9.77±0.97	19.96±0.51	26.28±0.38	22.88±1.82	21.07±1.56	25.79±0.46	14.96±0.42
	<b>Pep-RIA-97</b>	<b>Pep-RIA-98</b>	<b>Pep-RIA-99</b>	<b>Pep-RIA-100</b>	<b>Pep-RIA-101</b>	<b>Pep-RIA-102</b>	<b>Pep-RIA-103</b>
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	13.68±0.37	14.04±1.55	17.45±0.19	14.69±1.48	12.35±0.28	12.64±0.44	10.44±0.18
	<b>Pep-RIA-104</b>	<b>Pep-RIA-105</b>	<b>Pep-RIA-106</b>	<b>Pep-RIA-107</b>	<b>Pep-RIA-108</b>	<b>Pep-RIA-109</b>	<b>Pep-RIA-110</b>
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	22.51±0.96	19.4±0.59	18.41±1.12	16.41±1.36	14.59±0.17	9.37±0.31	11.89±0.68
	<b>Pep-RIA-111</b>	<b>Pep-RIA-112</b>	<b>Pep-RIA-113</b>	<b>Pep-RIA-115</b>	<b>Pep-RIA-116</b>	<b>Pep-RIA-117</b>	<b>Pep-RIA-118</b>
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	20.53±0.21	15.96±1.24	11.54±1.57	12.13±0.34	11.32±0.99	15.06±0.58	11.41±1.03
	<b>Pep-RIA-119</b>	<b>Pep-RIA-120</b>	<b>Pep-RIA-121</b>	<b>Pep-RIA-122</b>	<b>Pep-RIA-123</b>	<b>Pep-RIA-125</b>	<b>Pep-RIA-126</b>
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	11.19±0.61	10.04±0.53	20.72±0.33	23.8±1.54	17.31±0.68	11.07±0.55	11.51±1.84
	<b>Pep-RIA-127</b>	<b>Pep-RIA-128</b>	<b>Pep-RIA-129</b>	<b>Pep-RIA-130</b>	<b>Pep-RIA-131</b>	<b>Pep-RIA-132</b>	<b>Pep-RIA-133</b>
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	12.15±0.89	12.41±0.16	11.18±0.97	18.54±1.64	13.66±0.87	13.72±0.52	12.95±0.69
	<b>Pep-RIA-134</b>	<b>Pep-RIA-137</b>	<b>Pep-RIA-138</b>	<b>Pep-RIA-139</b>	<b>Pep-RIA-140</b>	<b>Pep-RIA-142</b>	<b>Pep-RIA-143</b>
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	2.39±0.23	2.39±0.23	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	13.28±0.75	10.71±1.99	10.8±0.78	34.19±1.43	21.18±0.11	13.23±0.57	13.24±0.37
	<b>Pep-RIA-144</b>	<b>Pep-RIA-145</b>	<b>Pep-RIA-146</b>	<b>Pep-RIA-147</b>	<b>Pep-RIA-149</b>	<b>Pep-RIA-150</b>	<b>Pep-RIA-151</b>
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26
peptide	14.54±0.21	13.85±0.38	17.43±0.49	14.93±1.55	16.2±0.22	14.51±0.81	8.81±0.83
	<b>Pep-RIA-152</b>	<b>Pep-RIA-154</b>	<b>Pep-RIA-155</b>	<b>Pep-RIA-156</b>	<b>Pep-RIA-157</b>	<b>Pep-RIA-158</b>	<b>Pep-RIA-159</b>
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26

【 0 1 2 6 】

【表 9】

peptide	12.58±0.47	12.21±1.29	14.31±0.55	12.21±0.24	11.42±0.32	9.91±1.44	12.58±1.08
	<b>Pep-RIA-161</b>	<b>Pep-RIA-165</b>	<b>Pep-RIA-166</b>	<b>Pep-RIA-169</b>	<b>Pep-RIA-174</b>		
control	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26	4.03±0.26		
peptide	14.41±0.81	5.75±0.41	6.97±0.53	5.64±0.65	5.66±0.33		

10

## 【0127】

## (2) H u h 7 細胞株での細胞透過能試験

## 細胞株培養

ヒト肝細胞癌の細胞株である H u h 7 (human hepatocellular carcinoma cell line) の浮遊細胞株を使用した (A T C C (American Type Cell Culture) から購入)。H u h 7 細胞株は、R P M I 1640 培地を使用する。培地には、10%ウシ胎児血清 (Invitrogen、米国)、100  $\mu$ g / ml ペニシリン及び 100 units / ml ストレプトマイシンを添加し、37、5% C O<sub>2</sub> 培養器で培養した。

## 【0128】

## 流細胞分析を介した細胞浸透能スクリーニング

ペプチドの細胞浸透能を調べるために、配列番号 2 ないし配列番号 178 のペプチドを処理した H u h 7 細胞株において、流細胞分析を行った。分析方法は、前記 (1) の H e l a 細胞株分析に記載された通りである。分析結果は、図 30 ないし図 51 に示した。

20

## 【0129】

## (3) ヒト T リンパ球細胞株での細胞透過能試験

## 細胞株培養

ヒト T リンパ球細胞株 Jurkat (human T - cell leukemia cell line) の浮遊細胞株を使用した (A T C C (American Type Cell Culture) から購入)。Jurkat 細胞株は、R P M I 1640 培地を使用する。培地には、10%ウシ胎児血清 (Invitrogen、米国)、100  $\mu$ g / ml ペニシリン及び 100 units / ml ストレプトマイシンを添加し、37、5% C O<sub>2</sub> 培養器で培養した。

30

## 【0130】

ヒト由来リンパ球 (lymphocyte) 分離は、健常者から血液を採血 (50 ml) した後、Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin、ドイツ) を使用し、P B M C (peripheral blood mononuclear cells) 層及びリンパ球を回収する。

## 【0131】

## ヒト T リンパ球細胞株の細胞浸透能分析

ペプチドの細胞浸透能を調べるために、配列番号 2 ないし配列番号 178 のペプチドを処理したヒト T リンパ球細胞株で流細胞分析を行った。分析方法は、前記 (1) の H e l a 細胞株分析に記載された通りである。分析結果は、図 52 ないし図 69 に示した。

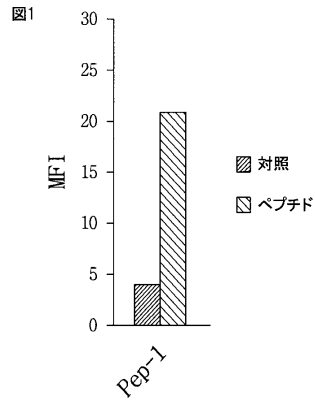
40

## 【0132】

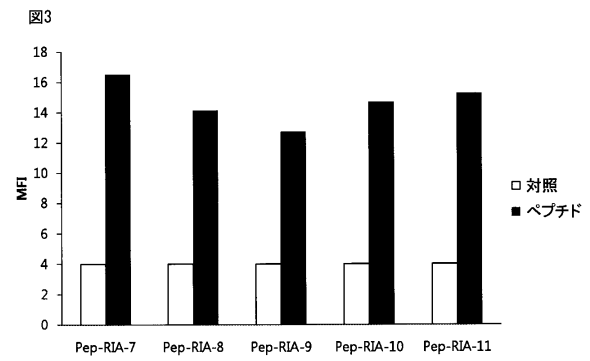
## (4) 細胞生存率及び毒性の分析

一方、前記実施例 4 (1) で培養された H e l a 細胞株を 96 - ウェルプレートに分注し、培地に 10%ウシ胎児血清 (Invitrogen、米国)、100  $\mu$ g / ml ペニシリン及び 100 units / ml ストレプトマイシンを添加し、37、5% C O<sub>2</sub> 培養器で 12 時間培養した。P B S 洗浄後、M E M (minimum essential medium) で 1 時間の starvation を行わせた。各運搬ペプチド 20  $\mu$ M で処理し、37 で 24 時間培養した後、M T T assay 方法を利用して、細胞生存率及び毒性を分析した。その結果は、図 70 ないし図 86 に示されている通りである。

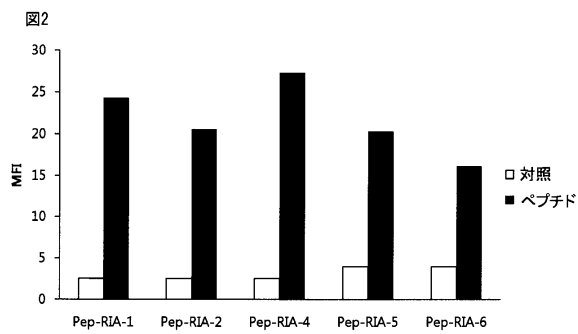
【図 1】



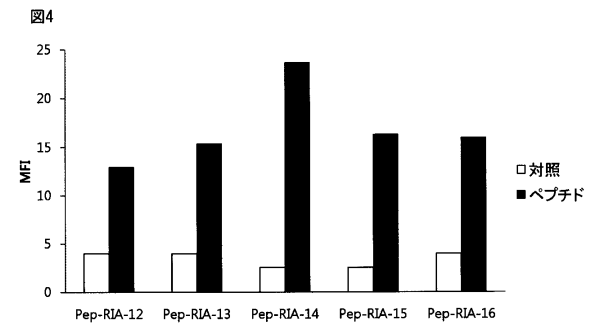
【図 3】



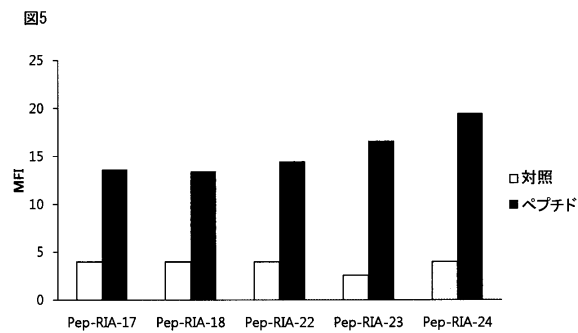
【図 2】



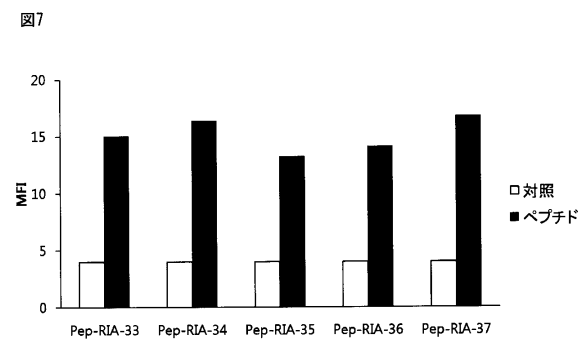
【図 4】



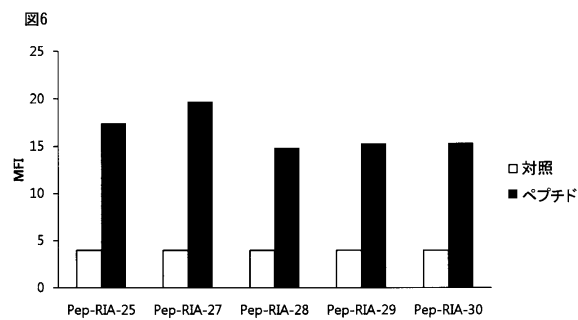
【図 5】



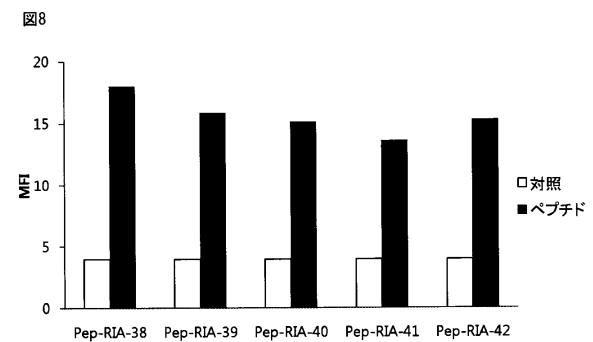
【図 7】



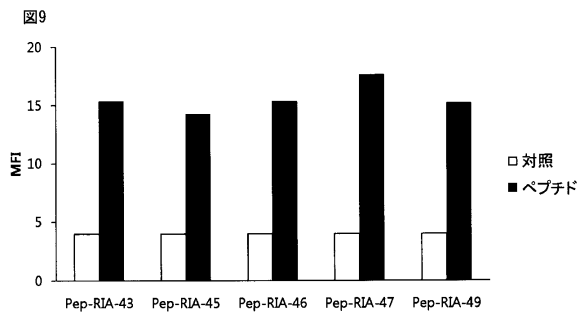
【図 6】



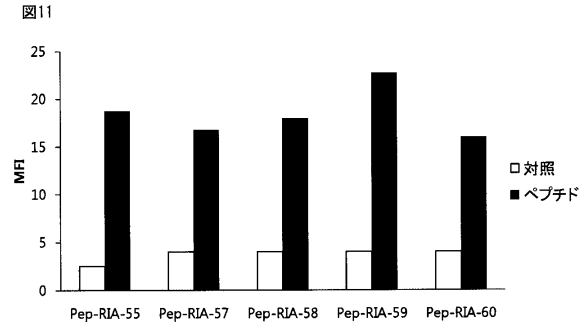
【図 8】



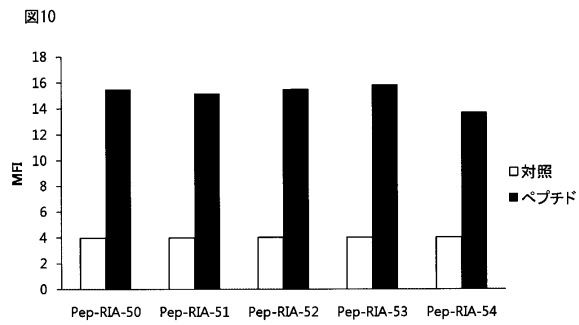
【図 9】



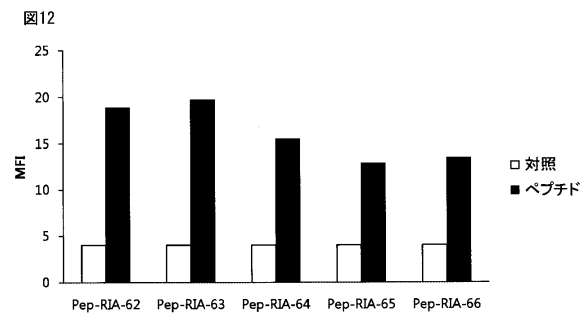
【図 11】



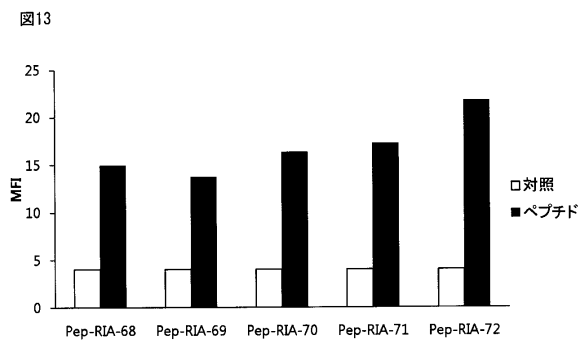
【図 10】



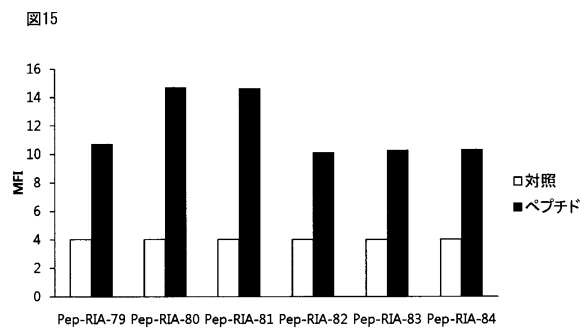
【図 12】



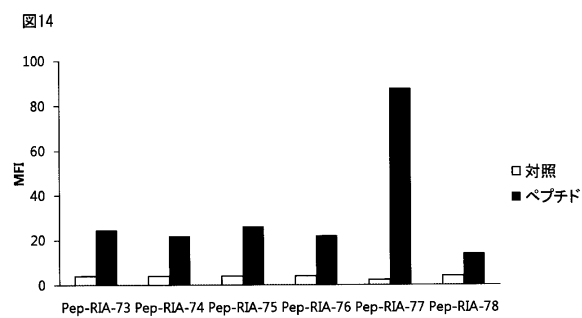
【図 13】



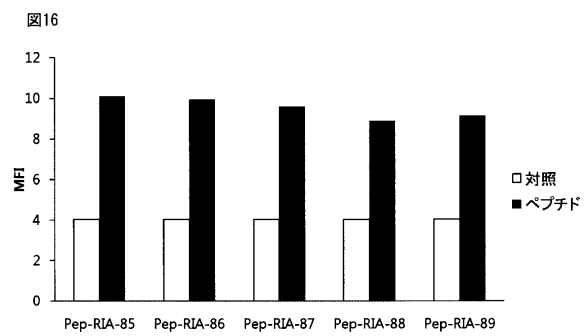
【図 15】



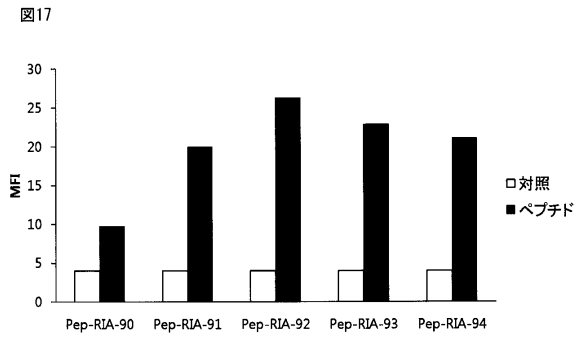
【図 14】



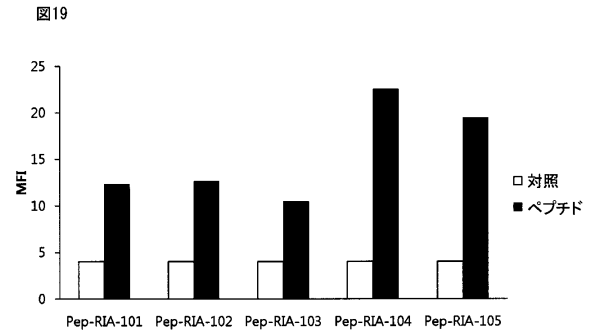
【図 16】



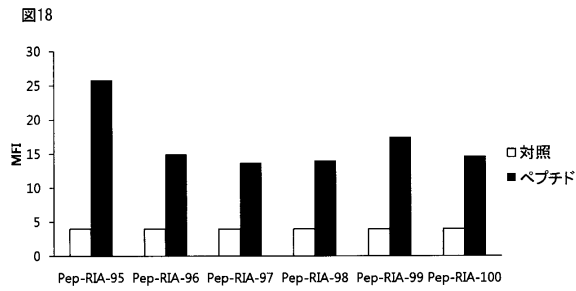
【図 17】



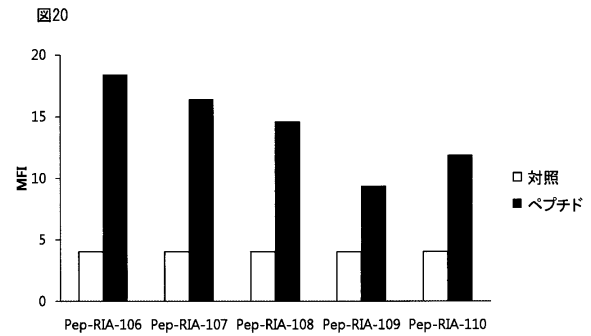
【図 19】



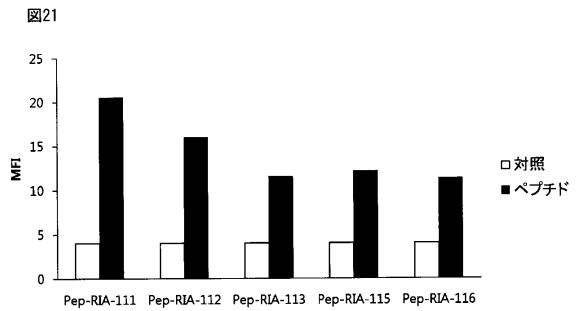
【図 18】



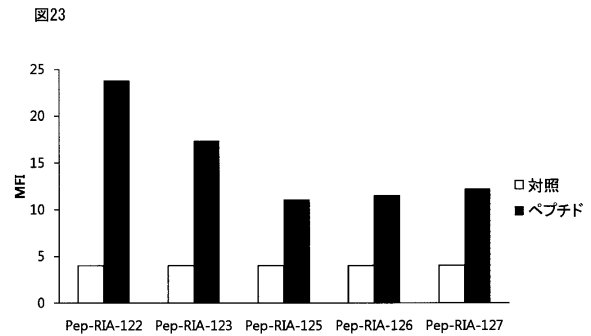
【図 20】



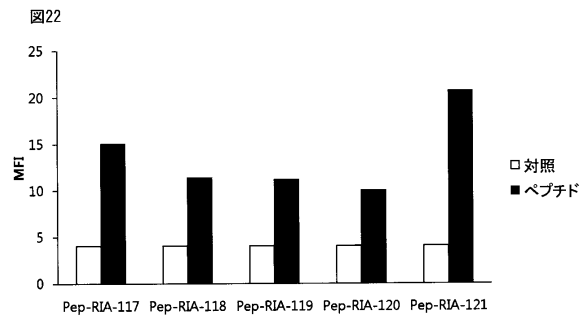
【図 21】



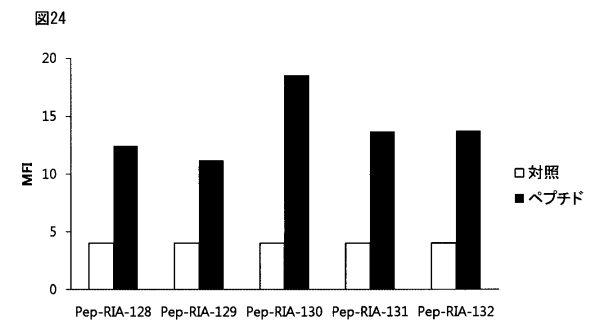
【図 23】



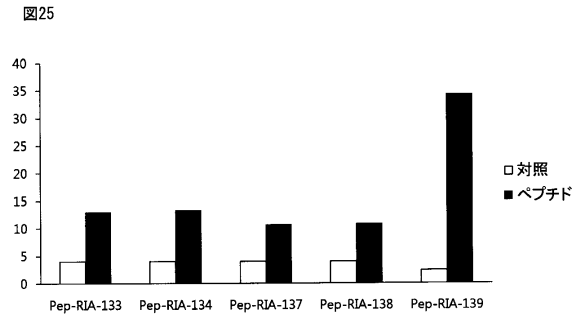
【図 22】



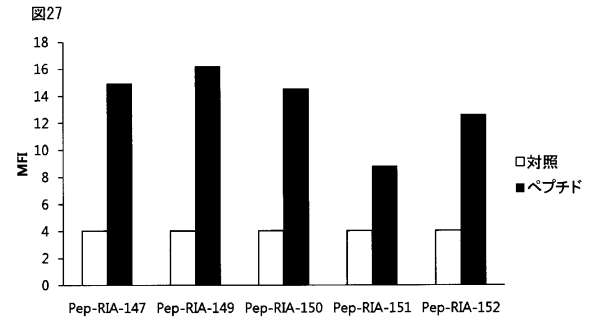
【図 24】



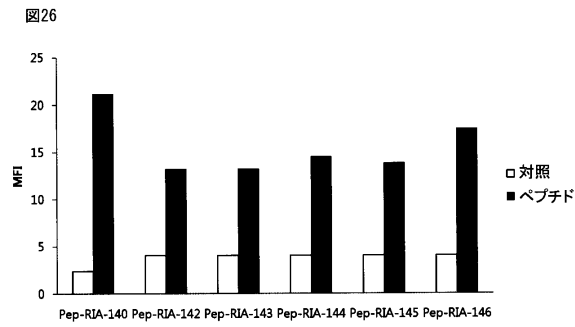
【図 25】



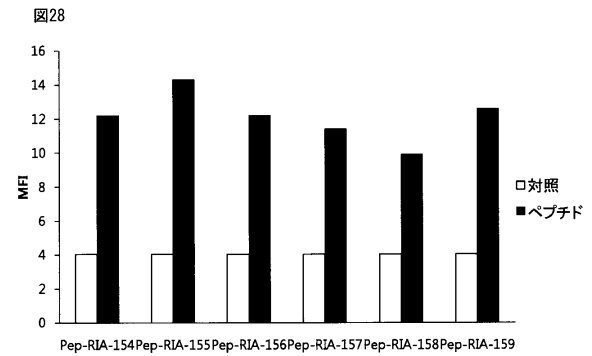
【図 27】



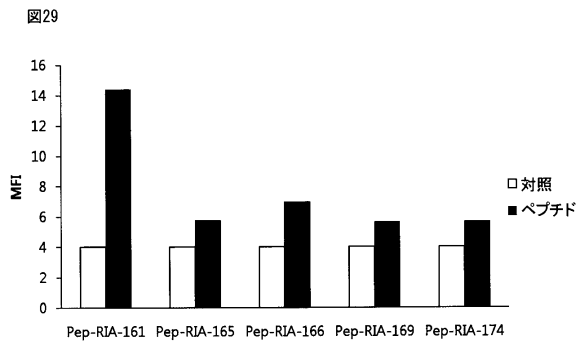
【図 26】



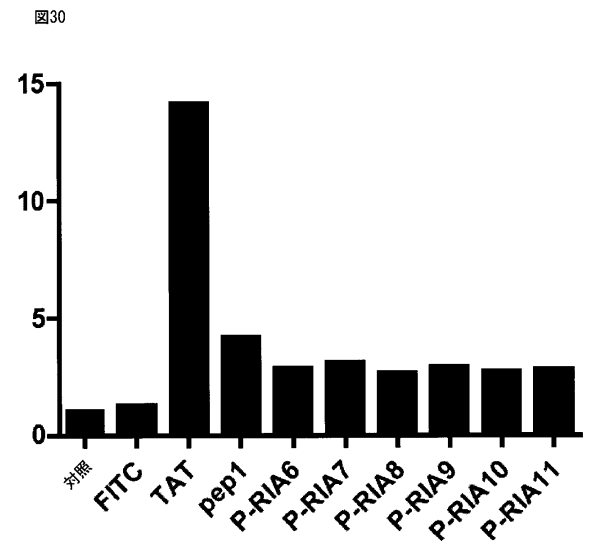
【図 28】



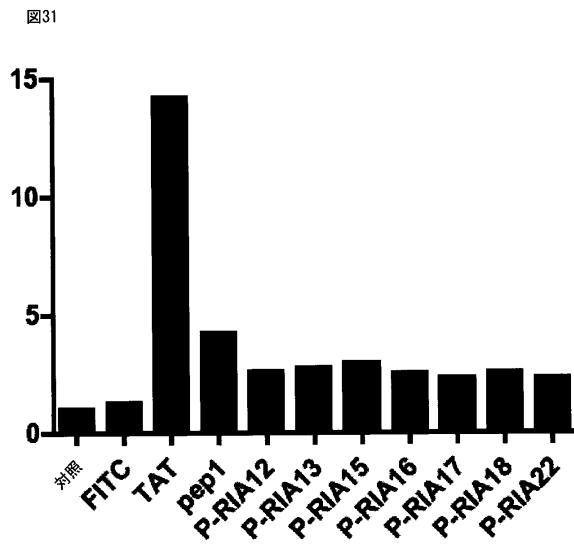
【図 29】



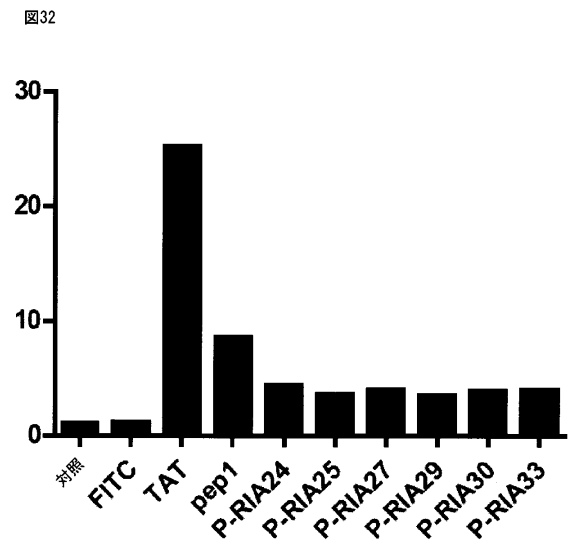
【図 30】



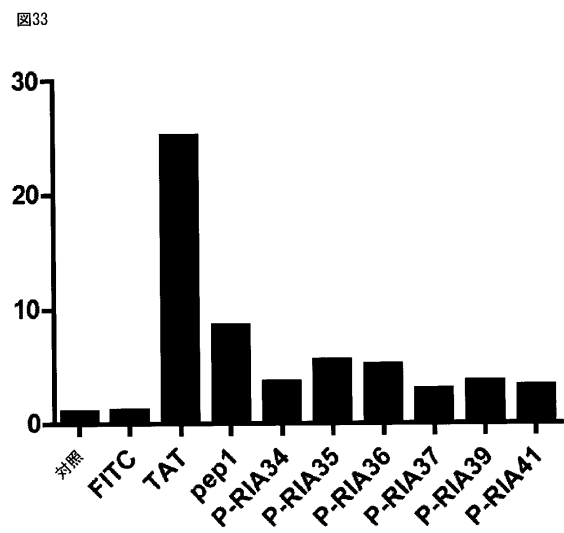
【 図 3 1 】



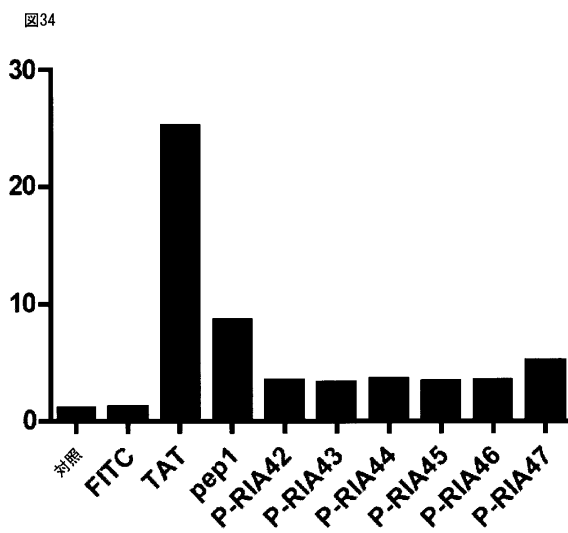
【 図 3 2 】



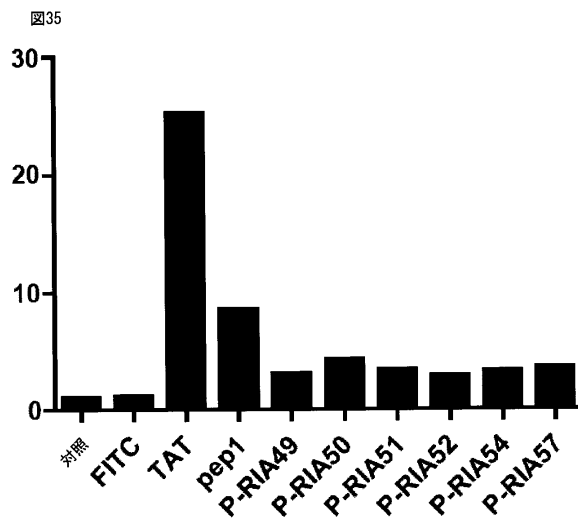
【 図 3 3 】



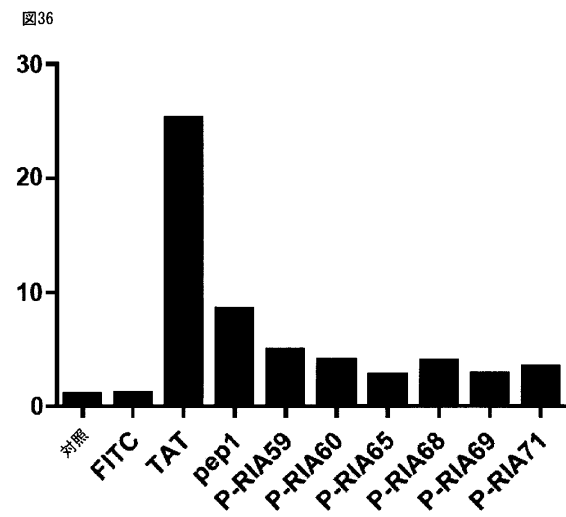
【 図 3 4 】



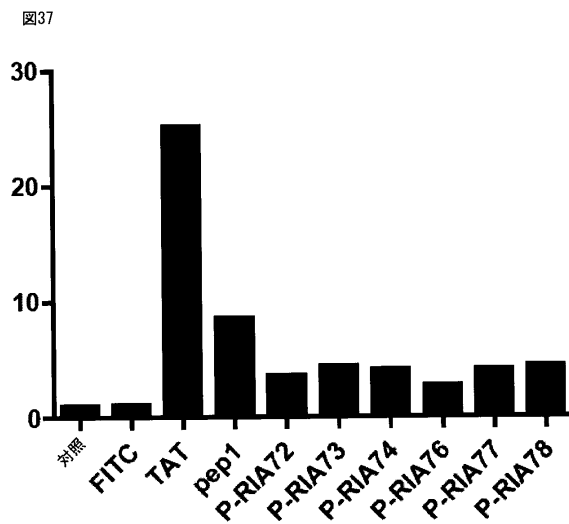
【 図 3 5 】



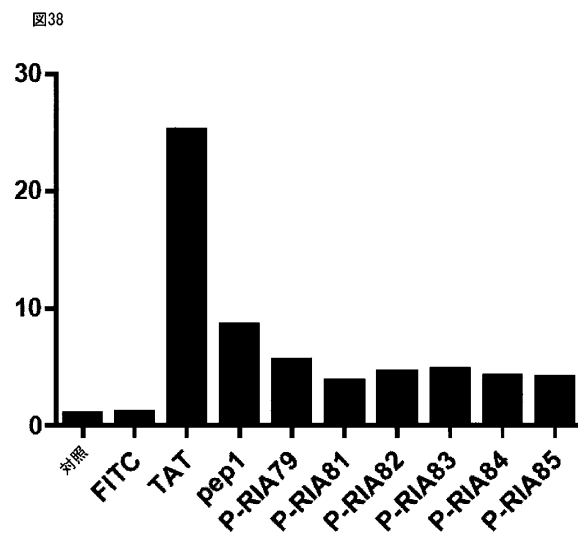
【 図 3 6 】



【 図 3 7 】

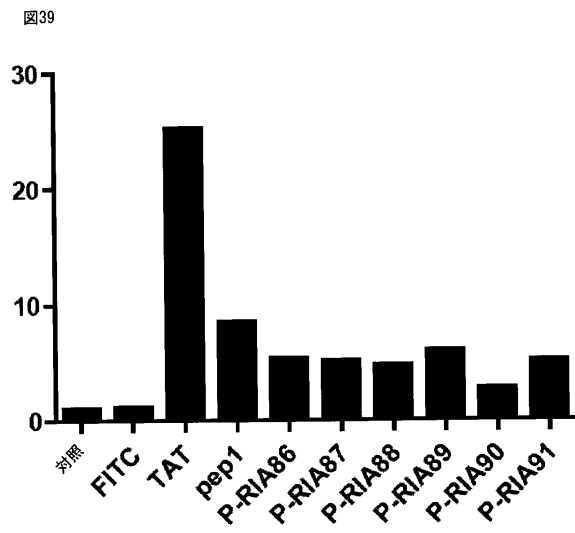


【 図 3 8 】

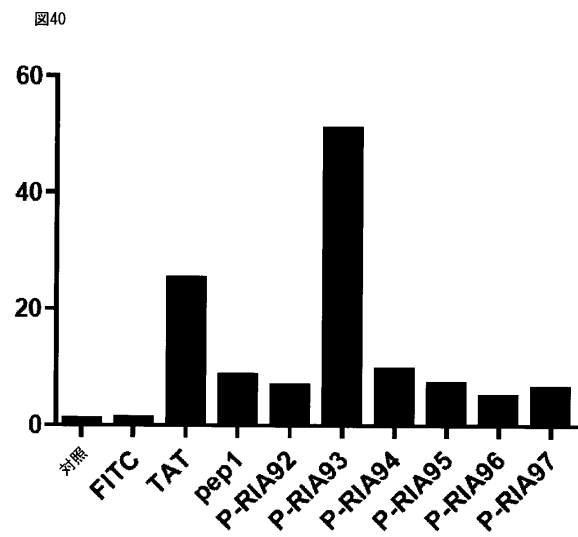




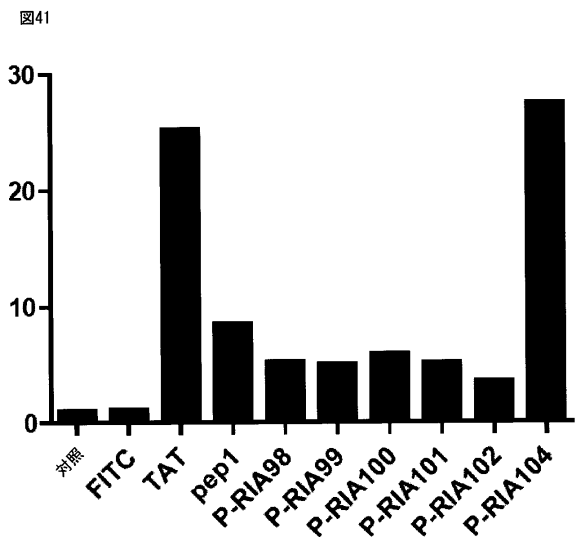
【 图 3 9 】



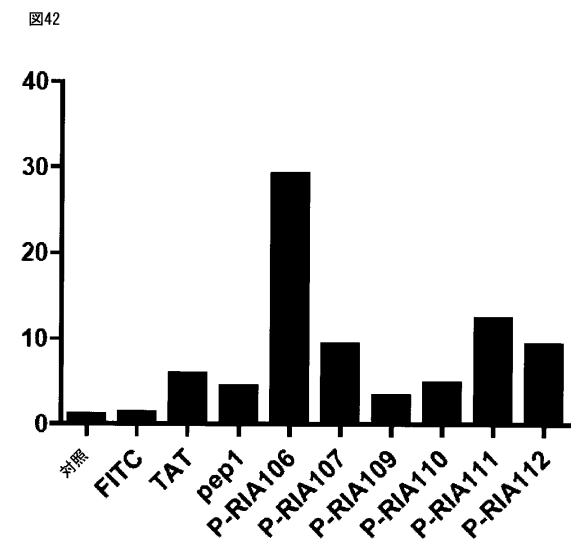
【 图 4 0 】



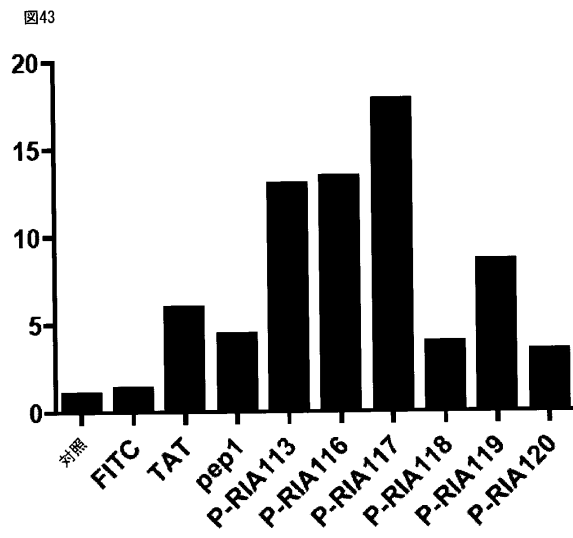
【 图 4 1 】



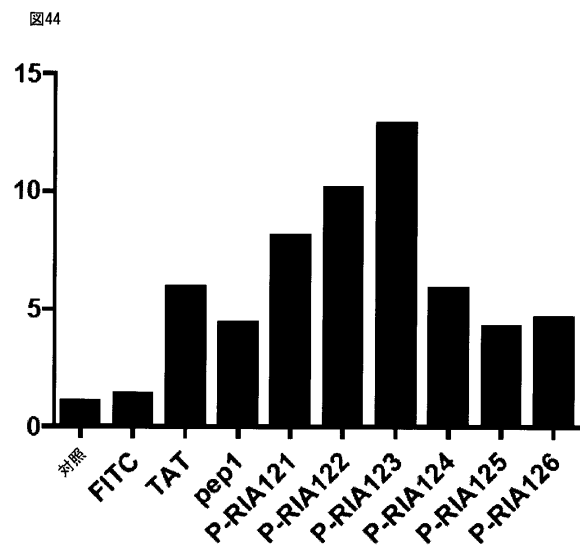
【 图 4 2 】



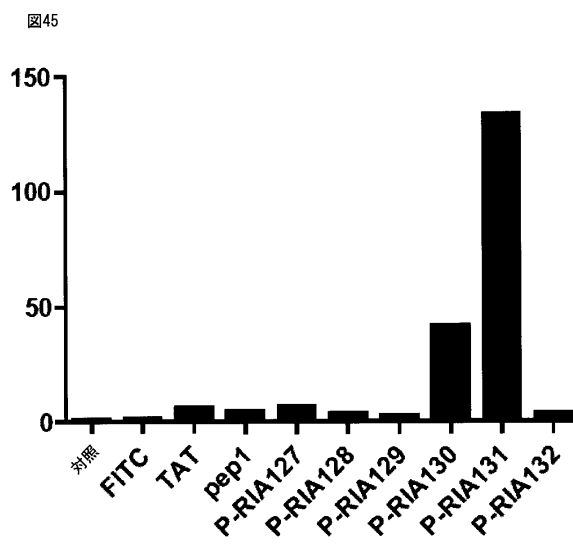
【 图 4 3 】



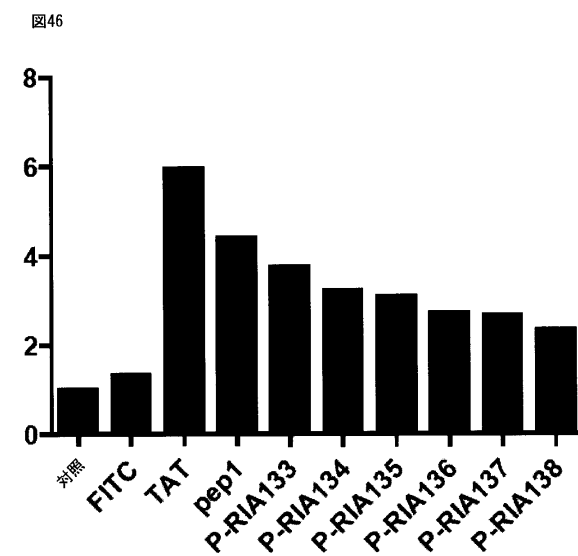
【 图 4 4 】



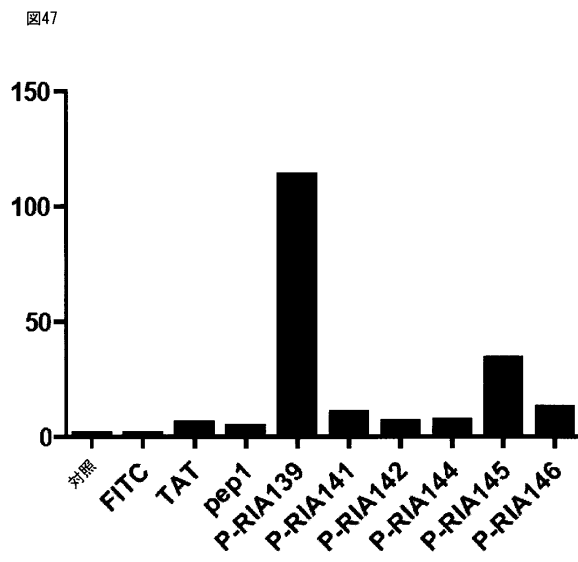
【 图 4 5 】



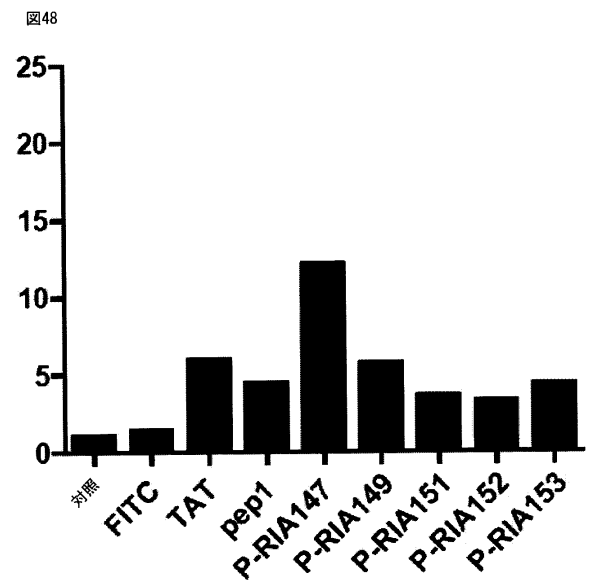
【 图 4 6 】



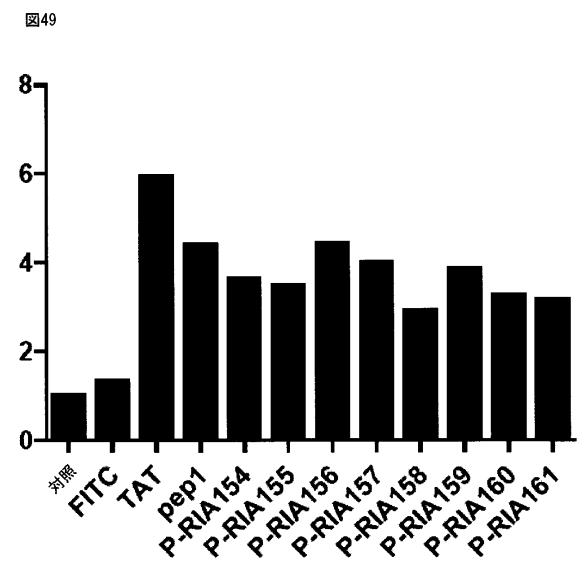
【 図 4 7 】



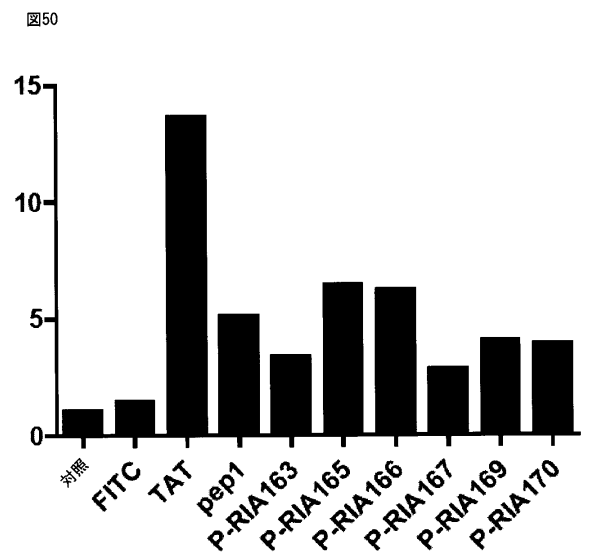
【 図 4 8 】



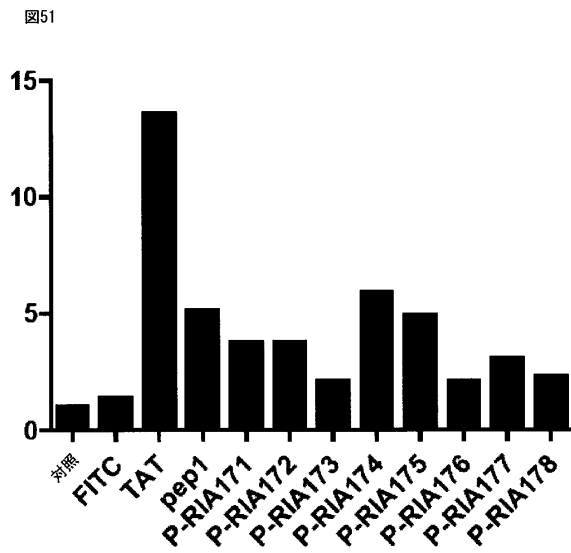
【 図 4 9 】



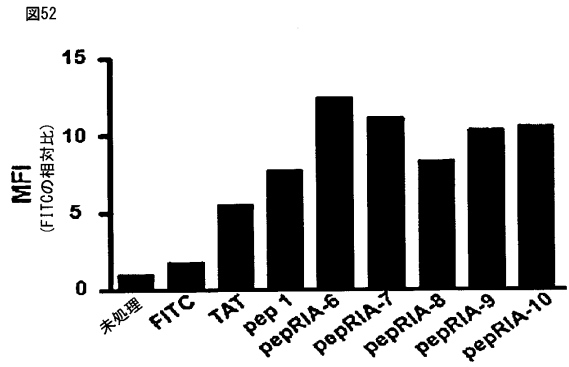
【 図 5 0 】



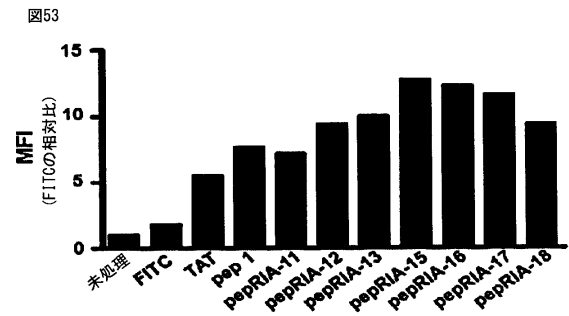
【図 5 1】



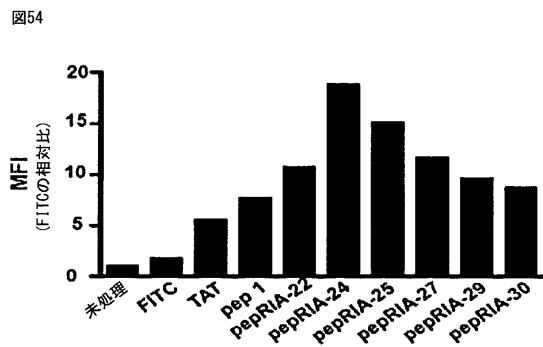
【図 5 2】



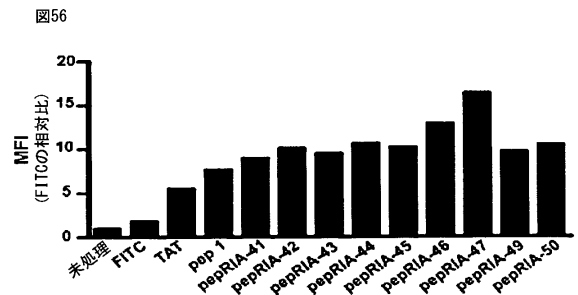
【図 5 3】



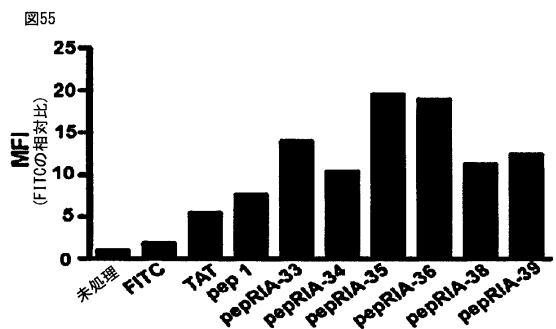
【図 5 4】



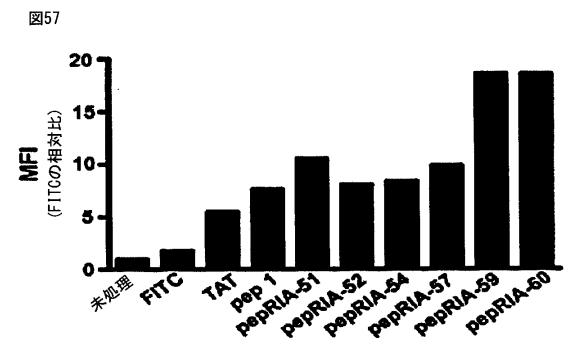
【図 5 6】



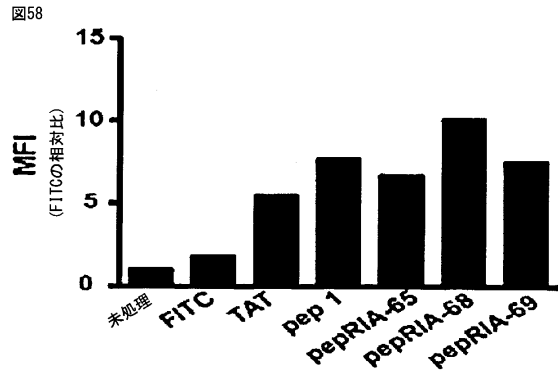
【図 5 5】



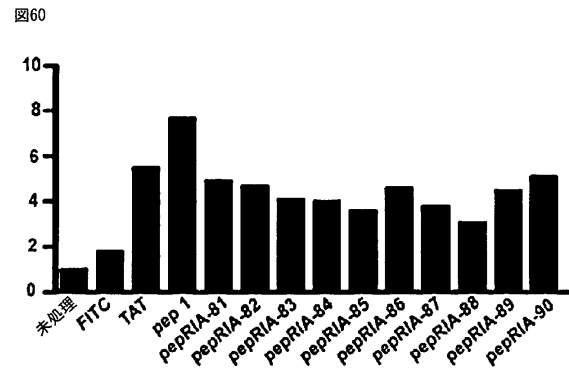
【図 5 7】



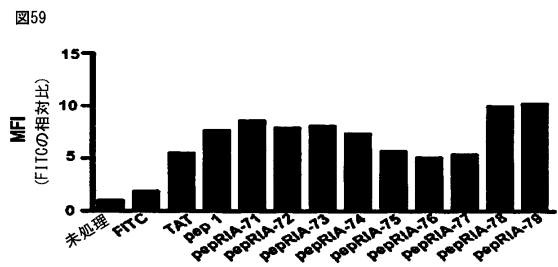
【図58】



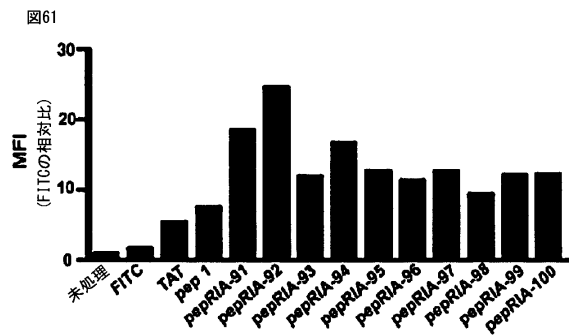
【図60】



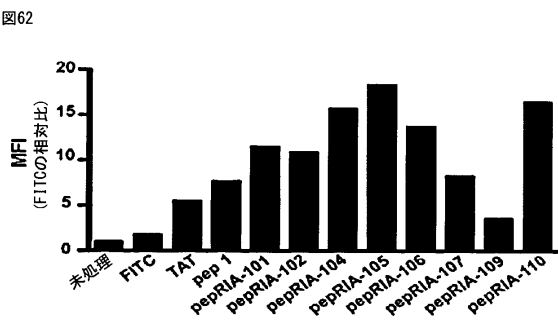
【図59】



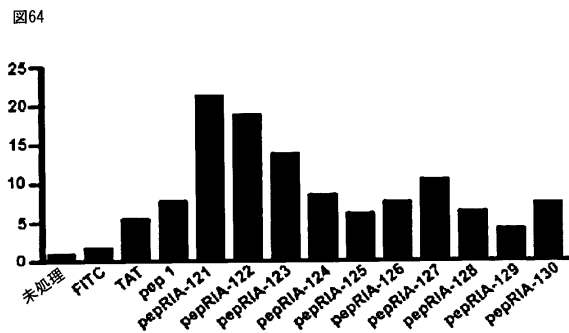
【図61】



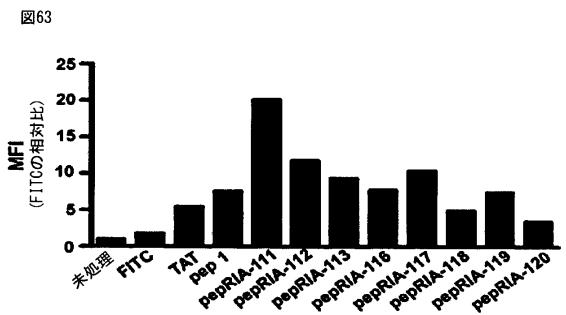
【図62】



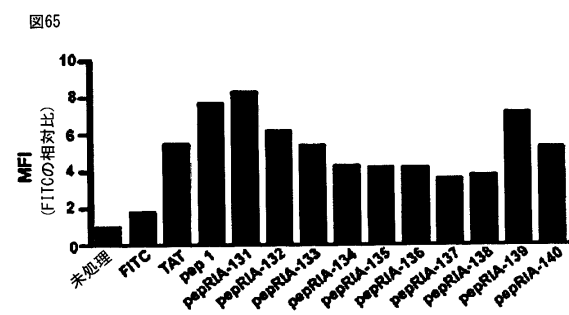
【図64】



【図63】

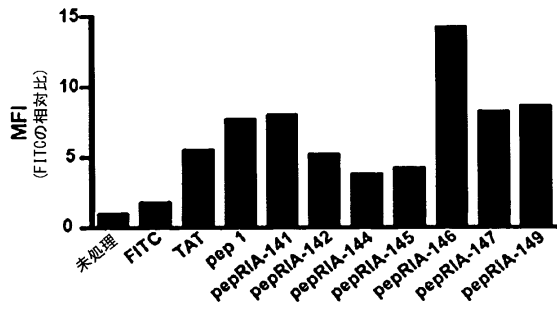


【図65】



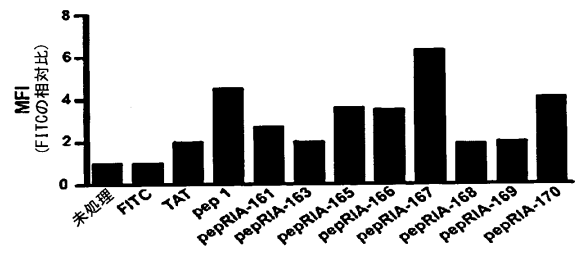
【図 6 6】

図66



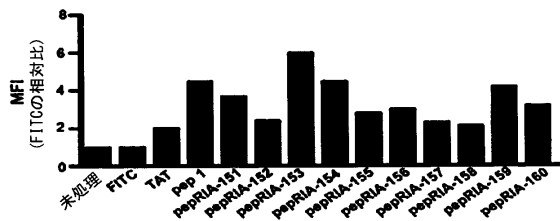
【図 6 8】

図68



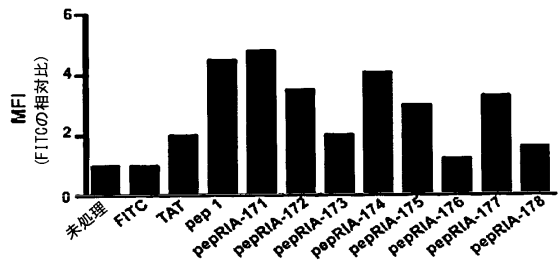
【図 6 7】

図67



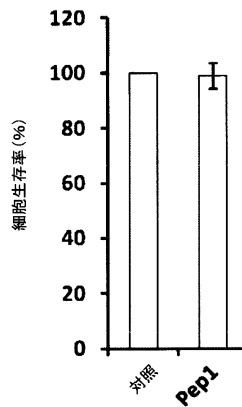
【図 6 9】

図69



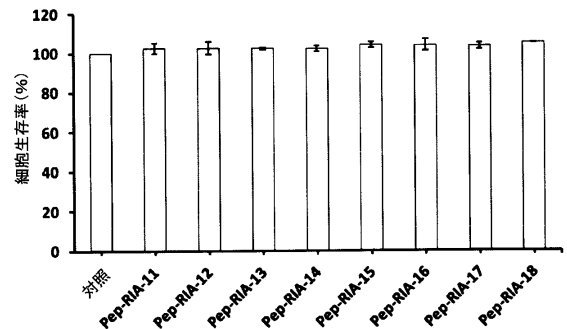
【図 7 0】

図70



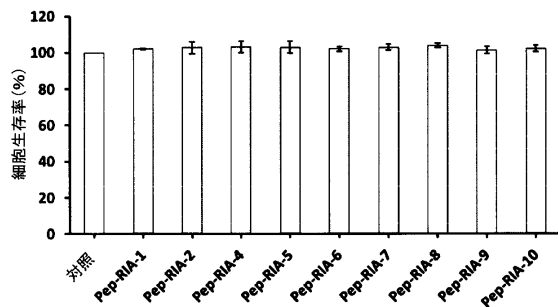
【図 7 2】

図72



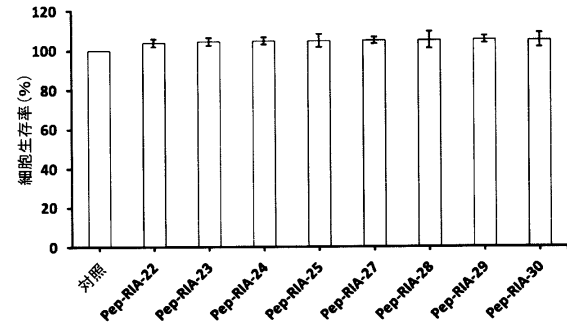
【図 7 1】

図71

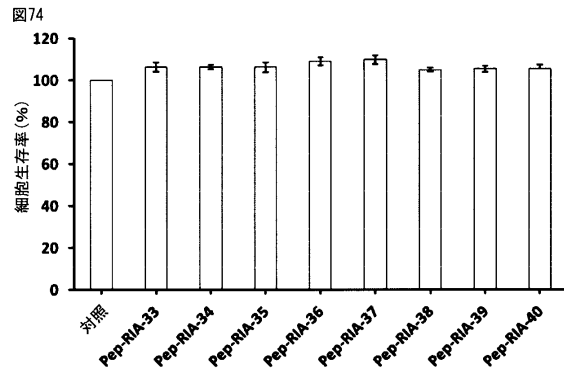


【図 7 3】

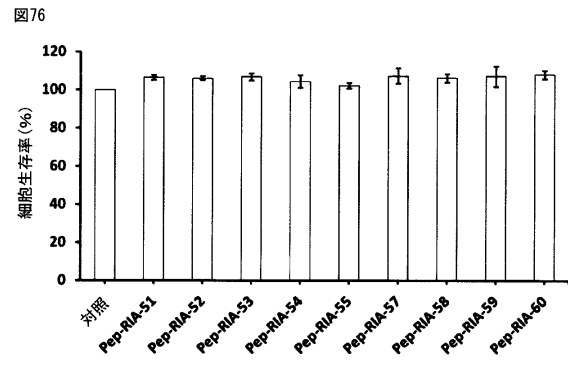
図73



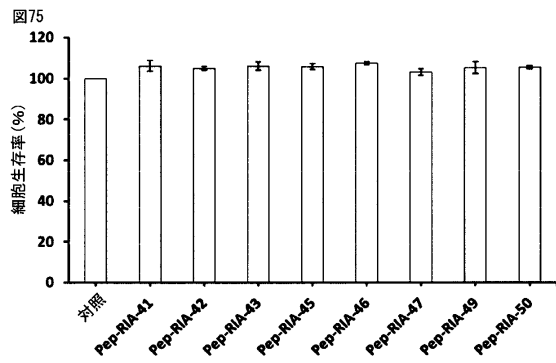
【図 7 4】



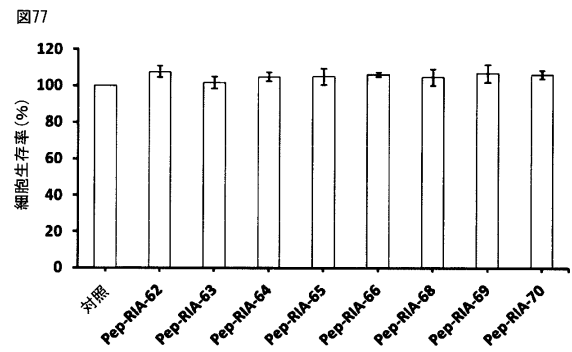
【図 7 6】



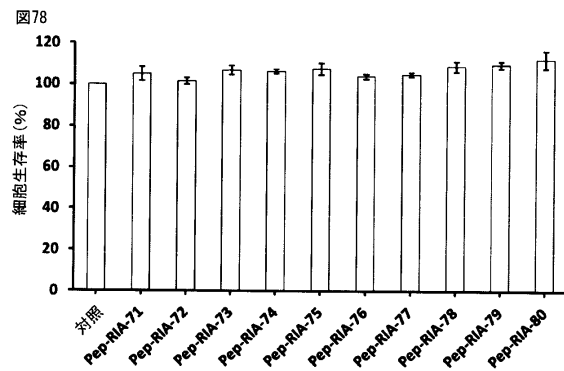
【図 7 5】



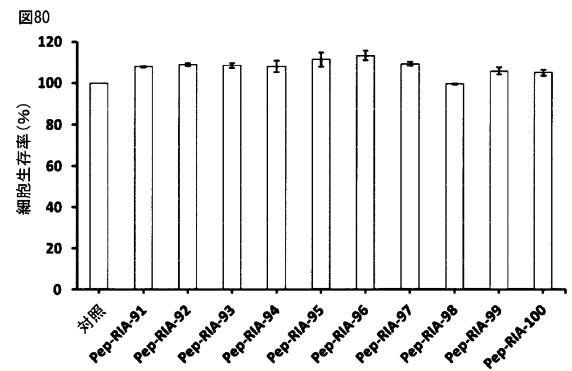
【図 7 7】



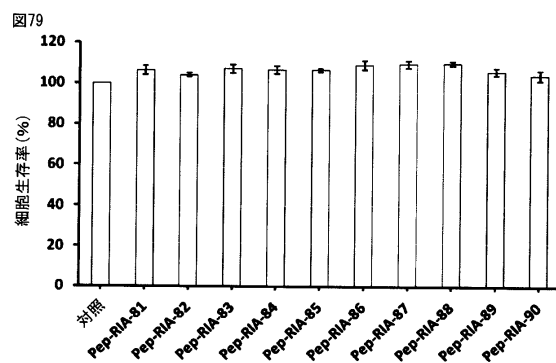
【図 7 8】



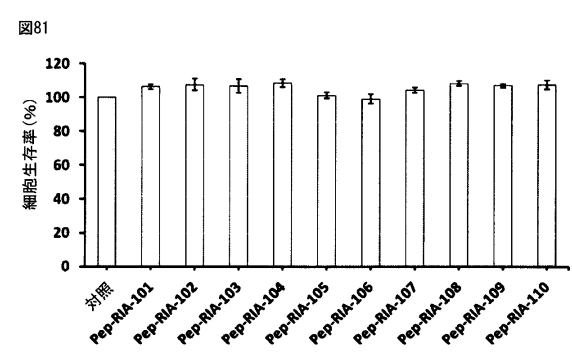
【図 8 0】



【図 7 9】

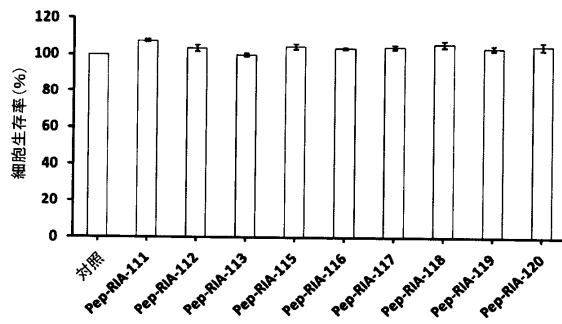


【図 8 1】



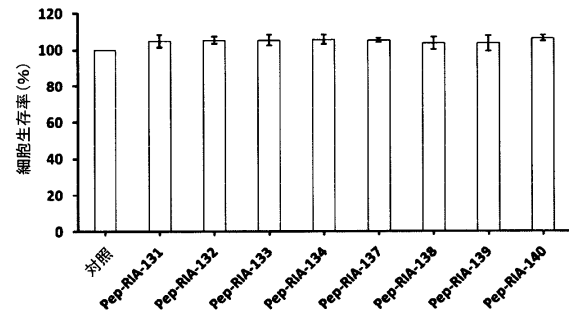
【 図 8 2 】

図82



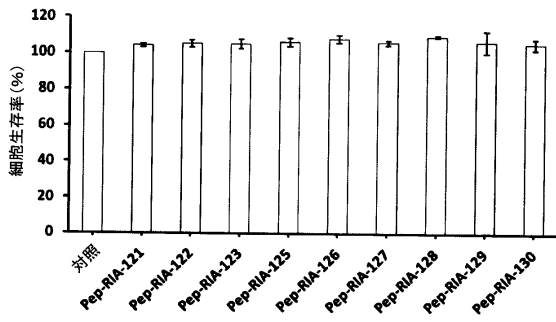
【 図 8 4 】

図84



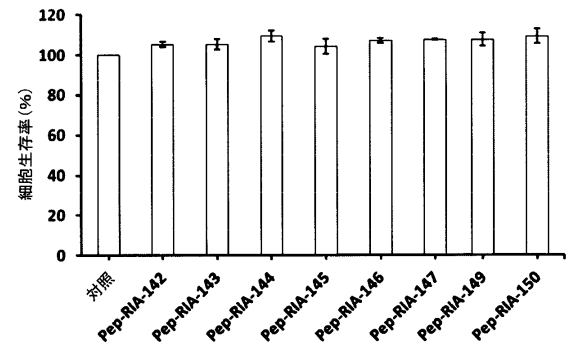
【 図 8 3 】

図83



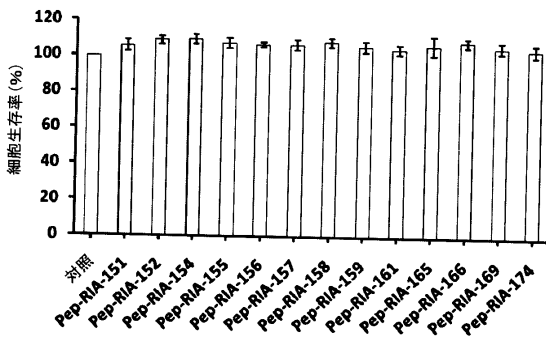
【 図 8 5 】

図85



【 図 8 6 】

図86





【配列表】

0006517692000001.app

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.			F I		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	8/64	(2006.01)	A 6 1 K	8/64	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	47/42	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	5/10	(2006.01)	C 0 7 K	5/10	
C 0 7 K	5/08	(2006.01)	C 0 7 K	5/08	
A 2 3 L	33/17	(2016.01)	A 2 3 L	33/17	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	

(31)優先権主張番号 10-2012-0109207

(32)優先日 平成24年9月28日(2012.9.28)

(33)優先権主張国 韓国(KR)

(31)優先権主張番号 10-2012-0109216

(32)優先日 平成24年9月28日(2012.9.28)

(33)優先権主張国 韓国(KR)

(31)優先権主張番号 10-2013-0017046

(32)優先日 平成25年2月18日(2013.2.18)

(33)優先権主張国 韓国(KR)

(74)代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100164563

弁理士 佐々木 貴英

(72)発明者 キム サン チェ

大韓民国, ソウル 135-947, カンナム - ク, クアンピョン - ロ 10 - キル, 15, サン  
ノクス アパートメント, 101-405

審査官 植原 克典

(56)参考文献 国際公開第2008/145603(WO, A1)

特表2002-520293(JP, A)

Br. J. Pharmacol., 2009年, Vol. 157, pp. 195-206

Oncoimmunology, 2012年 8月, Vol. 1, pp. 670-686

Chem. Commun., 2010年, Vol. 46, pp. 7190-7192

J. Pept. Res., 1998年, Vol. 51, pp. 235-243

pTAT-HA, addgene[online], [retrieved on 8.9.2017], URL, <https://media.addgene.org/d>

ata/29/00/1191889c-5e33-11e1-8b69-003048dd6500.pdf

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

UniProt/GeneSeq

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)