

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6574175号  
(P6574175)

(45) 発行日 令和1年9月11日(2019.9.11)

(24) 登録日 令和1年8月23日(2019.8.23)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01)
A 61 K 47/64	(2017.01)
A 61 K 45/00	(2006.01)
A 61 P 17/00	(2006.01)
A 61 P 29/00	(2006.01)
C 12 N	15/09
A 61 K	47/64
A 61 K	45/00
A 61 P	17/00
A 61 P	29/00

請求項の数 11 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-525289 (P2016-525289)
(86) (22) 出願日	平成26年7月11日 (2014.7.11)
(65) 公表番号	特表2016-523558 (P2016-523558A)
(43) 公表日	平成28年8月12日 (2016.8.12)
(86) 國際出願番号	PCT/KR2014/006257
(87) 國際公開番号	W02015/005723
(87) 國際公開日	平成27年1月15日 (2015.1.15)
審査請求日	平成29年7月3日 (2017.7.3)
(31) 優先権主張番号	10-2013-0082265
(32) 優先日	平成25年7月12日 (2013.7.12)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)
(31) 優先権主張番号	10-2013-0165071
(32) 優先日	平成25年12月27日 (2013.12.27)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	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, ユソンーク テクノ 11-ロ, 58
(73) 特許権者	514286848 キム サン チェ 大韓民国, ソウル 135-947, カンナムーク, 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
(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(74) 代理人	100123582 弁理士 三橋 真二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞透過性ペプチド、及びそれを含むコンジュゲート

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

有効成分を細胞に輸送するための、前記有効成分と配列番号 1 のアミノ酸配列からなる細胞透過性運搬ペプチドとのコンジュゲートを含む薬学組成物であつて、皮膚病、炎症疾患、膵臓癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、胃癌、肝細胞癌、上皮細胞癌、非小細胞性肺癌、皮膚上皮細胞癌、月経過多症、子宮内膜症、子宮腺筋腫症、子宮線維瘍、女性または男性の不妊、小児性早熟症、前立腺肥大、上皮細胞増殖による皮膚疾患、Tリンパ球作用による炎症、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される疾患の治療または予防のための、薬学組成物。

## 【請求項 2】

抗癌治療または癌予防のための、請求項 1 に記載の薬学組成物。

## 【請求項 3】

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た 1 以上であることを特徴とする、請求項 1 に記載の薬学組成物。

## 【請求項 4】

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ことを特徴とする、請求項 1 に記載の薬学組成物。

## 【請求項 5】

前記有効成分は、疾患の治療または予防のための有効成分であることを特徴とする、請

求項 1 に記載の薬学組成物。

【請求項 6】

前記有効成分は、抗癌剤であることを特徴とする、請求項5に記載の薬学組成物。

【請求項 7】

前記抗癌剤は、S T A T 3 阻害剤であることを特徴とする、請求項6に記載の薬学組成物。

【請求項 8】

前記抗癌剤は、パクリタキセルであることを特徴とする、請求項6に記載の薬学組成物。

【請求項 9】

前記運搬ペプチドと有効成分は、共有結合または非共有結合によって、またはリンカーによって媒介されることにより、接合されることを特徴とする、請求項 1 に記載の薬学組成物。

【請求項 10】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなる細胞透過性運搬ペプチドと、有効成分と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 1 以上を開示した指示書を含む、細胞内薬物伝達用キット。

【請求項 11】

皮膚病、炎症疾患、膵臓癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、胃癌、肝細胞癌、上皮細胞癌、非小細胞性肺癌、皮膚上皮細胞癌、月経過多症、子宮内膜症、子宮腺筋腫症、子宮線維瘍、女性または男性の不妊、小児性早熟症、前立腺肥大、上皮細胞増殖による皮膚疾患、T リンパ球作用による炎症、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される疾患の治療または予防のための、有効成分を細胞内に伝達するための細胞内有効成分伝達システムであって、前記有効成分伝達システムは、配列番号 1 のアミノ酸配列からなる細胞透過性運搬ペプチドと、有効成分とのコンジュゲートを含み、前記ペプチドは当該有効成分の細胞内伝達を行う細胞透過性を有する、細胞内有効成分伝達システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、テロメラーゼに由來した細胞透過性ペプチド ( C P P : cell penetrating peptide ) 、その細胞透過性ペプチドと有効成分、例えば、抗癌剤とのコンジュゲート、及び前記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、イッシャーとなってきた。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、H I V 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 H I V - T A T タンパク質が、細胞内への伝達過程で、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伝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づつ短くなるが、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 ( telome

10

20

30

40

50

rase) 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。

#### 【0004】

S T A T 3 阻害剤は、細胞死滅、新生血管阻害、免疫回避遮断の複合的抗癌メカニズムを介して、腫瘍を制御する効果を示す。N S C 7 4 8 5 9 は、S T A T 3 阻害剤の一つである化学的合成薬品であり、投与するとき、用量依存的 (dose-dependent) に正常細胞死滅の副作用が報告されている。従って、少用量を投与しながらも、同一であるか、あるいはさらに大きい腫瘍制御効果を発生させる方法の必要性が提起されている。

#### 【0005】

パクリタキセルは、卵巣癌、乳癌、肺癌または胃癌の治療に使用されるが、パクリタキセルの投与時、用量依存的に骨髄阻害による白血球、赤血球、血小板の減少のような副作用が報告されている。従って、パクリタキセルもまた、少用量投与し、同一であるか、あるいはさらに大きい癌治療効果を発生させる効果的な方法の必要性が提起されている。

#### 【先行技術文献】

##### 【特許文献】

##### 【0006】

【特許文献1】U S 2 0 0 3 0 0 7 7 2 8 9 A 1

【特許文献2】E P 2 6 9 4 5 2 9 A 2

##### 【非特許文献】

##### 【0007】

【非特許文献1】Lin et al., The STAT3 inhibitor NSC 74859 is effective in hepatocellular cancers with disrupted TGF-beta signaling, Oncogene, Vol. 19, No. 28(7), pp. 961-972(2009)

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【0008】

食品、医薬品、健康補助剤などにおいて、体内吸収率を高める必要がある有用な有効成分、例えば、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 (drugs) 及び化学物質 (chemical compounds) などにおいて、細胞内伝達能は非常に重要である。

##### 【0009】

例えば、抗癌剤の場合、抗癌効果を発現させるために、有効量以上の抗癌剤を使用することになるが、従来の抗癌剤は、高用量を投与すれば、骨髄阻害による白血球、赤血球、血小板の減少、正常細胞の死滅のような高い副作用が報告されている。従って、低用量を投与し、同一であるか、あるいはさらに大きい効果を発生させる方法の必要性が提起されている。

##### 【0010】

本発明の目的は、細胞伝達性が高い細胞透過性ペプチド、及びそれを含むコンジュゲートを提供するところにある。

##### 【0011】

本発明の他の目的は、癌特異的な抗癌剤伝達に効果的な手段として、細胞透過性ペプチドと抗癌剤とを結合したコンジュゲート、及びそれを含む薬学組成物を提供するところにある。

##### 【0012】

本発明のさらに他の目的は、S T A T 3 阻害剤伝達に効果的な手段として、細胞透過性ペプチドとS T A T 3 阻害剤とを結合したコンジュゲート、及びそれを含む薬学組成物を提供するところにある。

##### 【0013】

本発明のさらに他の目的は、パクリタキセル伝達に効果的な手段として、細胞透過性ペプチドとパクリタキセルとを結合したコンジュゲート、及びそれを含む薬学組成物を提供

10

20

30

40

50

するところにある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の一側面によれば、テロメラーゼに由来した細胞透過性運搬ペプチド (cell penetrating carrier peptide) であって、前記ペプチドが配列番号1のアミノ酸配列、配列番号1と80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列、またはそれらの断片を含む細胞透過性運搬ペプチドであるものが提供される。

【0015】

本発明の一側面による細胞透過性運搬ペプチドにおいて、前記断片は、3個以上のアミノ酸から構成された断片でもある。

10

【0016】

本発明の他の一側面によれば、細胞透過性運搬ペプチドと有効成分とのコンジュゲート (conjugate) であって、前記細胞透過性運搬ペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列、配列番号1と80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列、またはそれらの断片を含むコンジュゲートが提供される。

【0017】

本発明の他の一側面によるコンジュゲートにおいて、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 (drugs) 及び化学物質 (chemical compounds) のうちから選択されたものでもある。

【0018】

本発明の他の一側面によるコンジュゲートにおいて、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もある。

20

【0019】

本発明の他の一側面によるコンジュゲートにおいて、前記有効成分は、疾患の治療または予防のためのものもある。

【0020】

本発明の他の一側面によるコンジュゲートにおいて、前記疾患は、皮膚病、膵臓癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、胃癌、肝細胞癌、上皮細胞癌、非小細胞性肺癌 (NSCLC) 、皮膚上皮細胞癌、月経過多症 (menorrhagia) 、子宮内膜症 (endometriosis) 、子宮腺筋腫症 (adenomyosis) 、子宮線維瘍 (uterine fibroids) 、女性または男性の不妊 (female or male infertility) 、小児性早熟症 (precocious puberty in children) 、前立腺肥大、上皮細胞増殖による皮膚疾患、Tリンパ球 (T-lymphocyte) 作用による炎症、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるものもある。

30

【0021】

本発明の他の一側面によるコンジュゲートにおいて、前記有効成分は、抗癌剤でもある。

【0022】

本発明の他の一側面によるコンジュゲートにおいて、前記抗癌剤は、S T A T 3 阻害剤でもある。

【0023】

40

本発明の他の一側面によるコンジュゲートにおいて、前記抗癌剤は、パクリタキセル (paclitaxel) でもある。

【0024】

本発明の他の一側面によるコンジュゲートにおいて、前記運搬ペプチドと有効成分は、共有結合または非共有結合によって、またはリンカーによって媒介されることにより、接合されるものもある。

【0025】

本発明のさらに他の一側面によれば、コンジュゲートを含む薬学組成物が提供される。

【0026】

本発明のさらに他の一側面による薬学組成物において、前記薬学組成物は、疾患の治療

50

または予防のためのものもある。

【0027】

本発明のさらに他の一側面による薬学組成物において、前記薬学組成物は、皮膚病、臓癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、胃癌、肝細胞癌、上皮細胞癌、非小細胞性肺癌、皮膚上皮細胞癌、月経過多症、子宮内膜症、子宮腺筋腫症、子宮線維瘍、女性または男性の不妊、小児性早熟症、前立腺肥大、上皮細胞増殖による皮膚疾患、Tリンパ球作用による炎症、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される疾患の治療または予防のためのものもある。

【0028】

本発明のさらに他の一側面による薬学組成物において、前記薬学組成物は、抗癌治療または癌予防のためのものもある。 10

【0029】

本発明のさらに他の一側面によれば、配列番号1を含むペプチド、その断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%以上の配列相同性を有する細胞透過性運搬ペプチドと、有効成分と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1以上を開示した指示書；を含む対象の細胞内薬物伝達用キットが提供される。

【0030】

本発明のさらに他の一側面によれば、有効成分を細胞内に伝達するための細胞内有効成分伝達システムであって、前記有効成分伝達システムは、本発明の他の一側面によるコンジュゲートを含み、前記細胞透過性運搬ペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列、配列番号1と80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列、またはそれらの断片を含み、前記有効成分の細胞内伝達を行うことができる細胞透過性を保有したものである細胞内有効成分伝達システムが提供される。 20

【0031】

本発明のさらに他の一側面によれば、細胞透過性運搬ペプチドによって、有効成分を細胞内に伝達するための方法であって、本発明の他の一側面によるコンジュゲートを、それを必要とする対象に投与することを含み、前記細胞透過性運搬ペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列、配列番号1と80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列、またはそれらの断片を含み、前記有効成分の細胞内伝達を行うことができる細胞透過性を保有したものである有効成分の細胞内伝達方法が提供される。 30

【0032】

本発明のさらに他の一側面による伝達方法において、前記方法は、有効成分を細胞内ミトコンドリアに局所伝達するものもある。

【0033】

本発明のさらに他の一側面によれば、本発明の一側面によるペプチドをコーディングするポリヌクレオチドが提供される。

【0034】

本発明のさらに他の一側面によれば、本発明のさらに他の一側面によるポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。 40

【0035】

本発明のさらに他の一側面によれば、本発明のさらに他の一側面によるベクターを含む形質転換細胞が提供される。

【0036】

本発明のさらに他の一側面による、有効成分を細胞内に伝達するための前記細胞透過性運搬ペプチドの用途が提供される。

【発明の効果】

【0037】

本発明による細胞透過性ペプチドを利用すれば、有効成分、特に、癌特異的な抗癌剤伝達に効果的な手段を提供することができる。さらに具体的には、本発明の細胞透過性ペプ 50

チドと抗癌剤とを結合したコンジュゲートを製造し、既存抗癌剤の適用濃度を低下させ、癌特異性を付与することができ、治療過程での副作用低減効果を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】本発明によるペプチド、及び従来の抗癌剤コンジュゲートの抗癌活性に係わるメカニズムを図式化したダイヤグラムである。

【図2】本発明によるペプチドと造影物質（FITC）とのコンジュゲートを投与した場合、細胞内移入様相を示したグラフである。

【図3】本発明によるペプチドを単独で投与した場合、濃度による癌細胞及び正常細胞に対する死滅能を示したグラフである。 10

【図4】既存のSTAT3阻害性抗癌剤であるNSC74859を単独で投与した場合、濃度による癌細胞及び正常細胞に対する死滅能を示したグラフである。

【図5】本発明によるペプチドとNSC74859とのコンジュゲートを投与した場合、濃度による癌細胞及び正常細胞に対する死滅能を示したグラフである。

【図6】既存の抗癌剤であるパクリタキセルを単独で投与した場合、濃度による癌細胞及び正常細胞に対する死滅能を示したグラフである。

【図7】本発明によるペプチドとパクリタキセルとのコンジュゲートを投与した場合、濃度による癌細胞及び正常細胞に対する死滅能を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0039】

2013年7月12日に出願された韓国特許出願番号10-2013-0082265号と、2013年12月27日に出願された韓国特許出願番号10-2013-0165071号は、全ての目的において、全体が本明細書に参照として含まれる。また、本出願は、その全体が、本明細書において参照として含まれる韓国特許出願番号10-2013-0082265号と、韓国特許出願番号10-2013-0165071号との利益を主張する。 20

【0040】

本発明は、多様な変換を加えることができ、さまざまな実施例を有することができますが、以下、本発明についてさらに具体的に説明する。しかし、それらは、本発明を特定の実施形態について限定するものではなく、本発明の思想及び技術範囲に含まれる全ての変換、均等物ないし代替物を含むものであると理解されなければならない。本発明についての説明において、関連公知技術に係わる具体的な説明が本発明の要旨を不明確にすると判断される場合、その詳細な説明を省略する。 30

【0041】

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るに、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（HIV：human immuno-deficiency virus）由来のTAT（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TAT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、テロメラー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 40

た効果を有するということを発見した。

【0042】

最近注目されている抗癌治療において、治療過程において、患者の生の質を低下させる副作用の憂慮が高い既存の抗癌剤を代替するために、正常細胞と異なり、癌細胞のみに、成長促進などの役割を有する癌特異的なターゲット分子を確認する試みが持続的に進められており、一部癌腫を対象にするGleevec、Iressaのような癌分子標的治療剤を開発して実際臨床で活用中にある。

【0043】

そのように、癌特異的な分子標的治療剤の開発が頻繁に追求されているが、依然として広く利用されている抗癌剤が、5-FU、Cisplatin、Doxorubicin、Docetaxelのように、癌細胞非特異的な伝統的な毒性製剤という点において、それらの癌特異的な伝達手段の開発は、分子標的治療剤の他の開発手段であるといえる。 10

【0044】

そのような状況において、癌特異的な抗癌剤伝達手段の開発は、正常細胞より癌細胞に多く吸収される物質に、細胞毒性薬物(cytotoxic drug)を付着させたり、癌特異的な抗原を認知する抗体と抗癌物質とを結合させたり、癌特異的な周辺環境に反応し、抗癌剤を露出させるナノカプセルなどを開発したりして達成することもできる。

【0045】

本発明による細胞透過性ペプチドを利用すれば、癌特異的な抗癌剤伝達に効果的な手段を提供することができる。さらに具体的には、本発明によって、細胞透過性ペプチドと抗癌剤とを結合したコンジュゲートを製造し、既存抗癌剤の適用濃度を低下させながらも、癌特異性を付与することができ、治療過程での副作用低減効果を得ることができる。 20

【0046】

S T A T 3 阻害剤は、細胞死滅、新生血管阻害、免疫回避遮断の複合的抗癌メカニズムを介して、腫瘍を制御することによって効果を示す。S T A T 3 阻害剤の一種であるN S C 7485は、肝細胞癌、上皮細胞癌、非小細胞性肺癌(N S C L C)などT G F - bet a信号伝達異常機能による癌；上皮細胞増殖による皮膚病治療；及びリンパ球に係わる炎症に対する抗炎に卓越な効果を示す化学薬物である。

【0047】

パクリタキセルは、「タキセン」、「antimicrotubule agent」「plant alkaloids」に分類される抗癌剤であり、イチイの木から作られる。パクリタキセルは、細胞周期選択的に、多様な細胞分裂周期において、多様な段階の癌細胞を攻撃する。該薬物は、細胞分裂過程中、分裂と自家複製との機構である微細小管(microtubule)が分離される過程を妨害することにより、癌細胞の増殖を阻害し、卵巣癌、乳癌、非小細胞性肺癌、皮膚上皮細胞癌などの治療に使用される。 30

【0048】

本明細書で使用される細胞透過性ペプチドは、下記表1に開示された配列番号1の「p e p 9 8」である。本発明の実施例では、p e p 9 8と共に、テロメラーゼに由来したp e p 1(16個のアミノ酸から構成されたペプチド)の活性が共に検討された。配列番号3は、テロメラーゼ全長タンパク質の配列である。本明細書において「p e p」とは、本発明において、下記配列を有するペプチド、またはその配列と80%以上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。 40

【0049】

【表1】

配列番号	名称	テロメラーゼ上の位置	配列	長さ
1.	pep98	[961-980]	NRGFKAGRNMRRKLFGVRL L	20 aa
2.	テロメラーゼ	[1-1132]	MPRAPRCRAVRSLRLSHYRE VLPLATFVRR LGPQGWRLVQRGDPAAFRA LVAQCLVCVPWDARPPPAA PSFRQVSCLKELVARVLQRL CERGAKNVLAFGFALLDGA RGGPPEAFTTSVRSYLPNTV TDALRGSGAWGLLLRRVGD	1132 aa

【0050】

10

【表2】

		DVLVHLLARCALFVLVAPSC AYQVCGPLYQLGAATQAR PPPHASGPRLGCERAWN HSVREAGVPLGLPAPGARRR GGSASRSLPLPKPRRGAAAP EPERTPVGQGSWAHPGRTR GPSDRGFCVVSPARPAEEAT SLEGALSGTRHSHPSVGRQH HAGPPSTSRRPPRWDTCP VYAETKHFLYSSGDKEQLRP SFLLSSLRPSLTGARRLVETI FLGSRPWMPGTPRRLPRLPQ RYWQMRPLFLELLGNHAQC PYGVLLKTHCPLRAAVTPA AGVCAREKPQGSVAAPEEE DTDPRRLVQLLRQHSSPWQ VYGFVRACLRLVPPGLWG SRHNERRFLRNTKKFISLGK HAKLSLQELTW KMSVRDCAWLRRSPGVGCV PAAEHLREEILAKFLHWLM SVYVVELLRSFFYVTETTFQ KNRLFFYRKSVWSKLQSIGIR QHLKRVQLRELSEAEVHQHR EARPALLTSRLRFIPKPDGLR PIVNMDYVVGARTFRREKRA ERLTSRVKALFSVLNYERAR RPGLLGASVGLDDIHRAWR TFVLRVRAQDPPPELYFVKV DVTGAYDTIPQDRLTEVIASI IKPQNTYCVRRYAVVQKAA HGHVRKAFKSHVSTLTDLQ PYMRQFVAHLQETSPLRDA VVIEQSSSLNEASSGLFDVFL RFMCHHAVRIRGKSYVQCQ GIPQGSILSTLLCSLCYGDME NKLFAIGIRRDGLLRLVDDF LLVTPHLTHAKTFLRTLVR GVPEYGCVVNLRKTVVNFP VEDEALGGTAFVQMPAHGL FPWCGLLDTRTLEVQSDYS SYARTSIRASLTFNRGFKAG RNMRRKLFGVRLKCHSLFL	10 20 30 40
--	--	---	----------------------

【0051】

【表3】

		DLQ VNSLQTVCTNIYKILLQAY RFHACVLQLPFHQQQVWKNP TFFLRVISDTASLCYSILKAK NAGMSLGAKGAAGPLPSEA VQWLCHQAFLLKLTRHRVT YVPLLGSRLTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAAANPALPSDF KTILD	
--	--	--	--

10

## 【0052】

本発明の一側面は、配列番号1を含むペプチド、または前記ペプチド配列と80%以上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。

## 【0053】

20

本明細書に開示されたペプチドは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上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1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。

## 【0054】

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。

30

## 【0055】

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)、ビオチニル化(biotinylation)、ユビキチニル化(ubiquitinylolation)、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)及び構造的变化(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。

40

## 【0056】

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ある。人工変異体においてだけではなく、野生型ポ

50

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2の通りである。

【0057】

【表4】

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

【0058】

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、相當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) 鎌方向に影響を及ぼす残基：gly、pro；及び
- (6) 芳香族：trp、tyr、phe。

【0059】

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

10

20

30

40

50

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、前記分子の酸化的安定性を向上させ、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。

#### 【0060】

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。

#### 【0061】

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いう。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。

#### 【0062】

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なされる(O-連結されたグリコシル化部位の場合)。

#### 【0063】

本発明の一側面は、配列番号1を含むペプチド、その断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%以上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(chemical 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。

#### 【0064】

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。

#### 【0065】

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。

#### 【0066】

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。

10

20

30

40

50

## 【0067】

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、snorRNA、snrRNA、PNA、アンチセンスオリゴマー（antisense 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。

## 【0068】

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伝達する薬物は、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伝達体をさらに含んでもよい。

## 【0069】

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もの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一つが他の一つを、カプセル状を例として挙げ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。

## 【0070】

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。

## 【0071】

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1を含むペプチド、その断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%以上の配列相同性を有するペプチドは、移動対象（cargo）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。

#### 【0072】

本発明の一側面は、配列番号1を含むペプチド、その断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%以上の配列相同性を有するペプチドの、1以上の有効成分を伝達するための薬物伝達体としての用途を提供する。

#### 【0073】

本発明の一側面は、薬物；及び配列番号1を含むペプチド、その断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%以上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伝達する方法を提供する。 10

#### 【0074】

本発明の一側面は、配列番号1を含むペプチド、その断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%以上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1以上を開示した指示書；を含む対象の細胞内薬物伝達用キットを提供する。

#### 【0075】

本発明の一側面は、配列番号1を含むペプチド、その断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%以上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伝達する効果にすぐれる薬学組成物を提供する。 20

#### 【0076】

本発明の一側面による組成物は、配列番号1を含むペプチド、その断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%以上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の含量で含んでもよい。前記範囲で含む場合、本発明が意図した効果を示すのに適切なだけではなく、組成物の安定性及び安全性をいざれも満足することができ、費用対比効果の側面でも、前記範囲で含むことが適切である。

#### 【0077】

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。 30

#### 【0078】

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

#### 【0079】

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もあるが、それらに制限されるものではない。

#### 【0080】

本発明の一側面による薬学組成物は、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んでもよい。本発明の一側面による薬学組成物は、当業界の一般的な方法によって製造される。 40

#### 【0081】

本発明の一側面による薬学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、0.1μg/kg/日ないし1g/kg/日、具体的には1μg/kg/日ないし10mg/kg/日、さらに具体的には10μg/kg/日ないし1mg/kg/日、一層具体的には50μg/kg/日ないし100μg/kg/日になるが、それらに制限されるもの 50

ではない。本発明の一側面による薬学組成物は、1日1回ないし3回投与されるが、それに制限されるものではない。

#### 【0082】

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）。

#### 【0083】

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。

10

#### 【0084】

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なければならない。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。

20

#### 【0085】

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。

30

#### 【0086】

以下、実施例を挙げ、本発明の構成及び効果についてさらに具体的に説明する。しかし、以下の実施例は、本発明に対する理解の一助とするために、例示的目的のみに提供されたであり、本発明の範疇及び範囲は、それらによって制限されるものではない。

40

#### 【0087】

下記実施例では、配列番号1と記載した配列を有するペプチド（P E P 9 8）及び抗癌剤のコンジュゲートを製造し、癌特異的な伝達効果を確認するものである。

#### 【実施例】

#### 【0088】

##### 1：ペプチドの製造

##### 実施例1：p e p 9 8 及び p e p 1 の製造

配列番号1のペプチド（p e p 9 8）、及び比較のためのp e p 1（16aa長のテロメラーゼ由来ペプチド）を、従来周知の固相ペプチド合成法によって製造した。

#### 【0089】

具体的には、ペプチドは、A S P 4 8 S（Peptron, Inc., 大韓民国大田所在）を

50

利用して、Fmoc 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。

#### 【0090】

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：

NH<sub>2</sub> - L e u - 2 - chloro - trityl樹脂)。

#### 【0091】

ペプチド合成に使用した全てのアミノ酸原料は、N-termがFmocによって保護され、残基は、いずれも酸で除去されるTrt、Boc、t-Bu (t-butylester)、Pbf (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：

Fmoc - A s n (Trt) - OH、Fmoc - A l a - OH、Fmoc - A r g (Pbf) - OH、Fmoc - P h e - OH、Fmoc - L e u - OH、Fmoc - L y s (Boc) - OH、Fmoc - M e t - OH、Fmoc - G l y - OH、Fmoc - V a l - OH。

#### 【0092】

カップリング試薬 (coupling reagent) としては、HBTU [2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate] / HOBt [N-Hydroxybenzotriazole] / NMM [4-Methylmorpholine] を使用した。

#### 【0093】

Fmoc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。

#### 【0094】

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。

#### 【0095】

合成されたペプチドを樹脂から切り取った後、HPLCで精製し、合成いかんをMSで確認して凍結乾燥させた。

#### 【0096】

Peptide 98 の具体的な合成過程について説明すれば、次の通りである。

##### 1) カップリング

NH<sub>2</sub> - L e u - 2 - chloro - trityl樹脂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に溶かして添加した後、常温で2時間反応させ、DMF、MeOH、DMFの順序で洗浄した。

##### 2) Fmoc 脱保護

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の順序で洗浄した。

3) 1)と2)との反応を反復して行い、ペプチド基本骨格NH<sub>2</sub>-N(Trt)-R(Pbf)-G-F-K(Boc)-A-G-R(Pbf)-N(Trt)-M-R(Pbf)-R(Pbf)-K(Boc)-L-F-G-V-L-R(Boc)-L-2-chloro-trityl樹脂を作った。

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

5) 得られた混合物 (mixture) に冷却ジエチルエーテル (cooling diethylether) 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。

10

20

30

40

50

6 ) P r e p - H P L C で精製した後、 L C / M S で分子量を確認して凍結し、粉末 ( powder ) に製造した。

#### 【 0 0 9 7 】

前記製造方法は、 p e p 9 8 を基準に行い、 p e p 1 も、 p e p 9 8 の製造方法のような方法で製造した。

#### 【 0 0 9 8 】

##### 2 : 細胞透過性ペプチドの細胞内移入様相

##### 実施例 2 : p e p 9 8 の細胞内移入様相の分析

###### ( 1 ) 細胞株培養

細胞透過性ペプチドの細胞内移入様相を調べるために、韓国人の頭頸部癌細胞 ( S N U - 1 0 4 1 、 S N U - 1 0 7 6 ) 、 M D Anderson cancer center で確立した頭頸部癌細胞 ( O S C 1 9 、 H N 5 ) 、及び正常細胞である D P S C ( dental pulp stem cell ) を使用した。 10

#### 【 0 0 9 9 】

前記細胞株は、適切な培養溶液である R P M I - 1 6 4 0 または D M E M に、 1 0 % F B S と、 Antibiotic-antimycotic 抗生剤とを添加し、 1 0 0 c m<sup>2</sup> 培養皿に各細胞を撒布 ( seeding ) し、 インキュベーター ( incubator ) ( 3 7 ° 、 5 % C O<sub>2</sub> ) で培養した。 各細胞の成長速度及び成長状態を毎日確認しながら、 2 - 5 日間隔で、 サブ培養 ( sub-culture ) を介して細胞の状態を良好に維持した。 20

#### 【 0 1 0 0 】

( 2 ) 流細胞分析 ( flow cytometry ) を利用した頭頸部癌細胞での p e p 9 8 移入傾向及び移入特性の分析

2 4 時間の前に、 6 ウェルプレートに、 6 0 - 7 0 % レベルで癌細胞を準備して培養した後、 F I T C ( 1 0 μ M ) 、 p e p 1 - F I T C ( 1 0 μ M ) 、 F I T C - T A T ( 1 0 μ M ) をそれぞれ処理し、 2 . 5 時間後に培養液を除去し、 食塩水で洗浄 ( washing ) し、 Trypsin - E D T A 酵素処理を介して cell を分離し、 1 0<sup>6</sup> cells / m l でチューブ ( tube ) に準備し、 F A C S 測定を行った。 20

#### 【 0 1 0 1 】

確認結果、 p e p 9 8 及び p e p 1 を、 造影物質 F I T C とコンジュゲートした場合、 F I T C 単独の場合よりはるかに高い細胞透過性を示した。 30

#### 【 0 1 0 2 】

同時に、 H N 5 及び O S C 1 9 のように、 p e p 1 - F I T C の移入率が比較的弱い頭頸部癌細胞における p e p 9 8 - F I T C の細胞移入率は、 対照群と p e p 1 - F I T C とに比べ、 1 0 0 - 2 0 0 倍上昇するということ確認された。

#### 【 0 1 0 3 】

また、 p e p 1 の移入率が高い頭頸部癌細胞 S N U - 1 0 4 1 ( 4 1 と表示 ) 、 S N U - 1 0 7 6 ( 7 6 と表示 ) における p e p 9 8 - F I T C は、 p e p 1 - F I T C と類似した移入様相を示した ( 図 2 参照 ) 。 40

#### 【 0 1 0 4 】

そのような結果は、 p e p 9 8 とのコンジュゲートが常時高い細胞透過性を示すものであり、 p e p 9 8 の細胞透過能を、 コンジュゲートを介して活用することができ、特に、 コンジュゲートされる有効成分として、 癌細胞特異的な抗癌剤の活用を介して、 抗癌治療の副作用軽減及び効能増大を追求することができることを示唆するといえる。 40

#### 【 0 1 0 5 】

##### 3 : 抗癌剤と細胞透過性ペプチドとのコンジュゲート製造

##### 実施例 3 : S T A T 3 阻害剤 ( N S C 7 4 8 5 9 ) と細胞透過性ペプチド ( p e p 9 8 ) とのコンジュゲート製造

###### ( 1 ) カップリングのための p e p 9 8 基本骨格ペプチド樹脂の製造 :

カップリングのために、 N H<sub>2</sub> - amino - 2 - chloro - trityl 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 50

6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の順序で洗浄した。

#### 【0106】

その後、Fmoc脱保護のために、20%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の順序で洗浄した。

#### 【0107】

前記反応を反復して行い、ペプチド pep98 の基本骨格(NH<sub>2</sub>-N(Trt)-R(Pbf)-G-F-K(Boc)-A-G-R(Pbf)-N(Trt)-M-R(Pbf)-R(Pbf)-K(Boc)-L-F-G-V-L-R(Boc)-L-2-chloro-trityl樹脂)を作る。  
10

#### 【0108】

(2) STAT3 阻害剤(NSC 74859)とのカップリング

NSC 74859 (Sigma Aldrich cat. # SML0330、4当量)と、coupling reagent HBTU (4当量)/HOBT (4当量)/NMM (8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の順序で洗浄する。  
20

#### 【0109】

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する。

#### 【0110】

HPLCで精製した後、MS確認を行って凍結乾燥する。

#### 【0111】

実施例4：パクリタキセルと細胞透過性ペプチド(pep98)とのコンジュゲート製造

(1) マレイミド(maleimide)が導入されたパクリタキセルの合成：

pep98とパクリタキセル(Sigma-Aldrich Inc.、セントルイス、米国)との接合(conjugation)のために、リンカー(4-マレイミド酪酸)をパクリタキセルに導入し、チオール(thiol)反応性のある(reactive)マレイミド作用基を導入した。

#### 【0112】

パクリタキセル1g(1.17mmol、1eq)、4-マレイミド酪酸210mg(1.17mmol、1eq)、ジメチルアミノピリジン(DMAP)140mg(2.34mmol、2eq)、ジシクルロヘキシリカルボジイミド(DCC)480mg(1.17mmol、1eq)を100ml丸フラスコ(round flask)に入れ、塩化メチレン50mlを入れた後、常温で攪拌して反応させた。  
30

#### 【0113】

反応の進行は、TLC(thin layer chromatography)法を利用して観察し、反応が終われば、蒸溜水(DW)50mlを入れて振って混ぜた(work up)(Rf value = 0.43、ヘキサン：酢酸エチル=1:1)。

#### 【0114】

有機層を集め、硫酸マグネシウムで水分を除去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィ(silica gel column chromatography)を利用して分離した(ヘキサン：酢酸エチル=1:1)。シリカゲルカラムクロマトグラフィを介して得た物質を濃縮し、マレイミドが導入されたパクリタキセルの化合物620mgを得た。  
40

#### 【0115】

(2) チオール変形された(modified)ペプチド(pep98)(メルカプトアセチル-Ahx-NRGFKAGRNMRRKLFGVLRL)の合成：

配列番号1のペプチド(pep98)を、従来知られた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、ASP48S(peptron Inc.、大韓民国大田)を利用して、Fmoc固相合成法を介して、C末端からアミノ酸一つずつカップリングする  
50

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：

NH<sub>2</sub> - Leu - 2-chloro-trityl樹脂。

【0116】

ペプチド合成に使用した全てのアミノ酸原料は、N末端がFmocで保護(protection)され、残基は、いずれも酸で除去されるTrt、Boc、t-Bu、Pbf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：

Fmoc - Asn(Trt) - OH、Fmoc - Ala - OH、Fmoc - Arg(Pbf) - OH、Fmoc - Phe - OH、Fmoc - Leu - OH、Fmoc - Lys(Boc) - OH、Fmoc - Met - OH、Fmoc - Gly - OH、Fmoc - Val - OH、Fmoc - Ahx - OH(Ahx = 6-アミノヘキサン酸であり、ペプチド合成には、Fmoc - Ahx - OHを使用した)。

【0117】

カップリング試薬としては、HBTU[2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,3,3-tetamethylaminium hexafluorophosphate] / HOBT[N-hydroxybenzotriazole] / NMM[4-methylmorpholine]を使用した。

【0118】

Fmoc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樹脂からの分離、及び残基の保護期除去には、切断カクテル(cleavage cocktail)[TFA(trifluoroacetic acid) / EDT(ethanedithiol) / TIS(triisopropylsilane) / H<sub>2</sub>O = 92.5 / 2.5 / 2.5 / 2.5]を使用した。

【0119】

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、そこに当該アミノ酸をそれぞれ反応させ、溶媒で洗浄した後で脱保護する過程を反復することによって各ペプチドを合成した。

【0120】

合成されたペプチドを樹脂から切った後、HPLCで精製し、合成いかんをMSで確認して凍結乾燥した。

【0121】

具体的な過程について説明すれば、次の通りである。

1) カップリング

NH<sub>2</sub>-Leu-2-chloro-trityl樹脂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に溶かして添加した後、常温で2時間反応させ、DMF、MeOH、DMFの順序で洗浄した。

2) Fmoc脱保護

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の順序で洗浄した。

3) 1)と2)との反応を反復し、ペプチド基本骨格Trt-メルカブトアセチル-Ahx-N(Trt)-R(Pbf)-G-F-K(Boc)-A-G-R(Pbf)-N(Trt)-M-R(Pbf)-R(Pbf)-K(Boc)-L-F-G-V-L-R(Boc)-L-2-chloro-trityl樹脂を作った。

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

5) 得られた混合物に冷却ジエチルエーテル(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。

6) Prep-HPLCで精製した後、LC / MSで分子量を確認して凍結し、粉末に製造した。

【0122】

(3) マレイミドが導入されたパクリタキセルと、チオール変形されたペプチド(pe

10

20

30

40

50

p 9 8 と ) のコンジュゲーション製造 :

1 ) 前述の合成したマレイミドが導入されたパクリタキセル 1 0 0 m g ( 9 8 m o l , 1 e q ) を 1 m l D M S O に溶かした。

2 ) 前述の合成したチオール変形された p e p 9 8 1 0 0 m g ( 4 8 m o l , 2 e q ) を 1 m l D M S O に溶かした後、該溶液を 1 ) で準備した溶液に添加した。

3 ) そこに、ジイソプロピルエチルアミン ( D I P E A ) 2 ~ 3 滴を入れた後、vortex で 5 分間反応させた。

4 ) 反応の終結は、Elman 試薬で確認し、黄色が消えれば、得られた混合物に冷却ジエチルエーテルを加えた後、遠心分離して得られた化合物を沈澱させた。

5 ) Prep - H P L C で精製した後、L C / M S で分子量を確認して凍結し、粉末を作った。 10

#### 【 0 1 2 3 】

##### 4 . 抗癌剤と細胞透過性ペプチドとのコンジュゲートの抗癌活性

###### 実施例 5 : S T A T 3 阻害剤 ( N S C 7 4 8 5 9 ) と細胞透過性ペプチド ( p e p 9 8 ) とのコンジュゲートの抗癌活性確認

###### ( 1 ) 細胞株培養

細胞株は、前記実施例 2 で言及した細胞及び細胞培養方法と同一に製造して使用した。

###### ( 2 ) 抗癌活性の確認

下記のように、 p e p 9 8 、 N S C 7 4 8 5 9 及び N S C 7 4 8 5 9 - p e p 9 8 コンジュゲート別に、投与量による癌細胞株及び正常細胞株での細胞死滅程度を測定して確認した。 20

#### 【 0 1 2 4 】

24 時間前に、 9 6 ウエルプレートに、 3 0 - 4 0 % レベルで、癌細胞及び正常細胞を先撒布 ( pre-seeding ) して培養した後、当該薬物をそれぞれ処理した後、 24 時間 / 48 時間 / 72 時間、顕微鏡観察を介して、細胞形態 ( cell shape ) 分析を介した殺傷能の予備評価後、 72 時間、 M T T アッセイ ( M T T ( 3 - ( 4 , 5 - dimethylthiazol - 2 - yl ) - 2 , 5 - diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole ) assay ) を介した光学密度 ( O D : optical density ) 測定を介して定量分析を実施した。

#### 【 0 1 2 5 】

p e p 9 8 を単独処理する場合、癌細胞の増殖 ( proliferation ) に影響がほとんどないことを確認し、 p e p 9 8 は、自主的に癌細胞死滅能を保有しているのではないかということを確認することができた ( 図 3 参照 ) 。 30

#### 【 0 1 2 6 】

N S C 7 4 8 5 9 は、単独で処理したとき、頭頸部癌細胞で、 5 0 μ M から癌細胞死滅を始め、 2 0 0 μ M で、ほぼ全ての癌細胞を死滅させた。正常細胞である D P S C の場合には、 1 0 0 μ M まで大きな変化はなく、 2 0 0 μ M で細胞死滅が示された ( 図 4 参照 ) 。

#### 【 0 1 2 7 】

一方、 p e p 9 8 - N S C 7 4 8 5 9 の場合、 5 μ M から癌細胞を死滅させ始め、 2 0 μ M で、ほぼ全ての癌細胞死滅を確認することができた。 40

#### 【 0 1 2 8 】

また、 p e p 9 8 - N S C 7 4 8 5 9 の場合、全ての癌細胞を死滅させる範囲の濃度においても、正常細胞である D P S C を死滅させないということを確認することができた ( 図 5 参照 ) 。

#### 【 0 1 2 9 】

前記実施例の結果を基に、 N S C 7 4 8 5 9 - p e p 9 8 コンジュゲートは、 p e p 9 8 との結合を介して、癌細胞特異的な伝達が可能であり、 N S C 7 4 8 5 9 の抗癌活性によって、癌細胞殺傷が誘発されるということと、 D P S C ( 正常細胞 ) の場合、 N S C 7 4 8 5 9 による正常細胞の細胞死滅が起こらない範囲内で、 N S C 7 4 8 5 9 が癌細胞に対する細胞死滅を完了させることにより、本発明によるコンジュゲートが抗癌剤の 50

副作用を低減させるという結論を下すことができる。

【0130】

実施例6：パクリタキセルと細胞透過性ペプチド（p e p 9 8）とのコンジュゲートの抗癌活性確認

(1) 細胞株培養

細胞株は、前記実施例2で言及した細胞及び細胞培養方法と同一に製造して使用した。

(2) 抗癌活性確認

下記のように、パクリタキセル及びパクリタキセル-p e p 9 8 コンジュゲート別に、投与量による癌細胞株での細胞死滅程度を測定して確認した。

【0131】

10

S N U - 1 0 4 1、S N U - 1 0 7 6、H N 5、O S C - 1 9 の各頭頸部癌細胞株を、9 6 ウエル培養容器に準備した後、3 7 細胞培養器で、2 4 時間、安定化過程を事前に進めた。その後、7 2 時間、パクリタキセル(0 μM、0 . 5 μM、1 μM、2 μM、5 μM、1 0 μM)及びパクリタキセル-p e p 9 8 コンジュゲート(0 μM、0 . 2 5 μM、0 . 5 μM、1 μM、2 μM、5 μM)をそれぞれ処理した後、MTTを処理し、3 時間後、5 7 0 nmで吸光度を測定し、細胞成長能変化をモニタリングした。

【0132】

確認結果、4種の頭頸部癌細胞株全て(S N U - 1 0 4 1、S N U - 1 0 7 6、H N 5、O S C - 1 9)において、パクリタキセルのみを単独投与した場合には、5ないし1 0 μM投与区間で癌細胞死滅が示された(図6参照)。

20

【0133】

一方、4種の頭頸部癌細胞株全て(S N U - 1 0 4 1、S N U - 1 0 7 6、H N 5、O S C - 1 9)において、パクリタキセル-p e p 9 8 コンジュゲートを投与した場合には、0 . 5 μM投与区間から癌細胞死滅が示されるということを確認した(図7参照)。

【0134】

前述の結果を基に、パクリタキセル-p e p 9 8 コンジュゲートは、パクリタキセルの単独投与と比較するとき、低濃度の投与でも、癌細胞特異的な伝達が可能であるという結論を下すことができる。

【0135】

30

前記実施例において提示された全ての抗癌活性確認実験の結果は、p e p 9 8 を活用して少量の抗癌剤(例えば、S T A T 3 阻害剤であるN S C 7 4 8 5 9、パクリタキセル)を介して、大きい抗癌効果を示すことができるということを意味し、それを介して、抗癌治療の副作用軽減、及び抗癌剤の効果増大を達成することができるということを示唆するといえる。

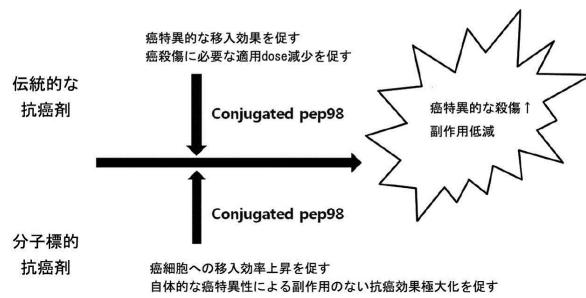
【0136】

それに加え、p e p 9 8 とのコンジュゲーションを媒介に、N S C 7 4 8 5 9 と類似したプローブ形態の小分子量の薬物、例えば、Tリンパ球関連炎症疾患をターゲットとする抗炎剤、上皮細胞増殖に係わる皮膚病治療剤、またはパクリタキセルと類似して、天然物質から抽出された抗癌、抗炎に効果を示す薬物が細胞透過も増加し、さらに高い効果を示すところに寄与することができると予測することができる。

40

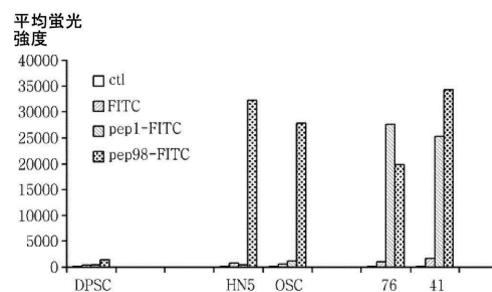
【図1】

図1



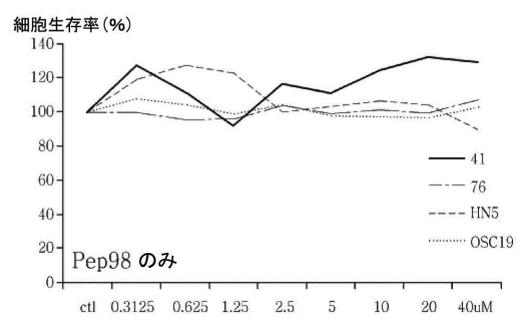
【図2】

図2



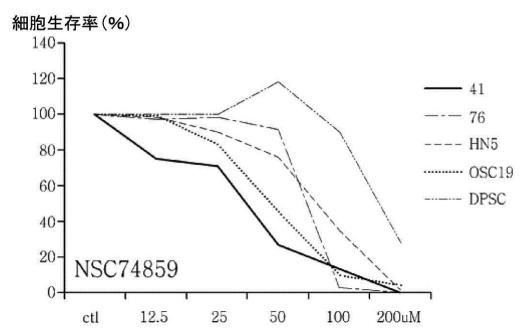
【図3】

図3



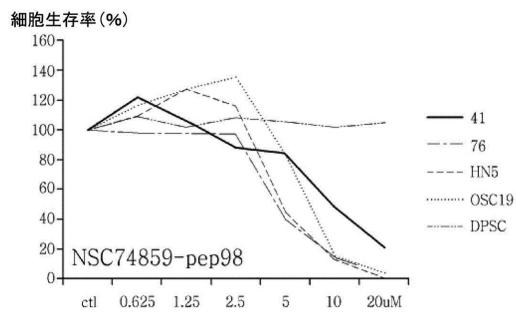
【図4】

図4



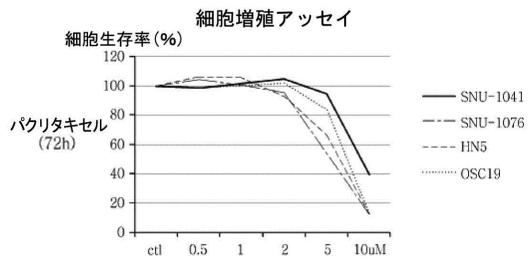
【図5】

図5



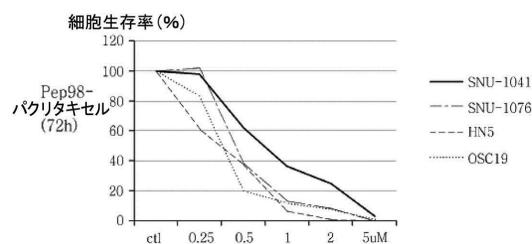
【図6】

図6



【図7】

図7



【配列表】

0006574175000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	31/337	(2006.01)	A 6 1 K	31/337	
C 0 7 K	9/00	(2006.01)	C 0 7 K	9/00	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	

## 前置審査

(74)代理人 100092624  
 弁理士 鶴田 準一

(74)代理人 100114018  
 弁理士 南山 知広

(74)代理人 100117019  
 弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100173107  
 弁理士 胡田 尚則

(72)発明者 キム サン チエ  
 大韓民国, ソウル 135-947, カンナム-ク, クァンピョン-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 米国特許出願公開第2003/0225027(US, A1)  
 国際公開第2003/038047(WO, A1)  
 特開2017-158561(JP, A)  
 特表2015-530404(JP, A)  
*Biomaterials*, 2013年 7月 1日, 34, 7495-7505

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 7 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 UniProt/GenSeq  
 JST Plus/JMED Plus/JST7580(JDream III)  
 Caplus/REGISTRY(STN)  
 Caplus/WPI DS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)