

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年9月27日(27.09.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/174158 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C07K 14/435* (2006.01) SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/011406 (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) 国際出願日: 2018年3月22日(22.03.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2017-055508 2017年3月22日(22.03.2017) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 二木 史朗(FUTAKI, Shiroh); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 坂本 健太郎(SAKAMOTO, Kentarou); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 秋柴 美沙穂(AKISHIBA, Misao); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪府中央区道修町1 - 7 - 1 北浜T N Kビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

添付公開書類:

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

(54) Title: PEPTIDE FOR CYTOSOLIC DELIVERY

(54) 発明の名称: 細胞質送達ペプチド

(57) Abstract: The present invention provides a peptide represented by formula (I): $R^1-IWLTALX^5FLGX^6X^1AAX^7X^2X^3AX^8QX^4LSX^9L-R^2$ (wherein $X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8, X^9, R^1$ and R^2 are as defined in the description).

(57) 要約: 本発明は、下記式(1): $R^1-IWLTALX^5FLGX^6X^1AAX^7X^2X^3AX^8QX^4LSX^9L-R^2$ (1) (式中、 $X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8, X^9, R^1, R^2$ は、明細書に定義されるとおりである。)で表されるペプチドを提供するものである。



WO 2018/174158 A1

明 細 書

発明の名称：細胞質送達ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、目的物質を細胞質に送達するためのペプチド、細胞質送達剤及び物質導入剤に関するものである。

背景技術

[0002] タンパク質、核酸の生細胞内への導入は細胞機能の計測・解析や細胞機能の調節に非常に有用なアプローチである。例えば、現在、蛍光タンパク質との融合により、種々の細胞内タンパク質の局在や挙動の観察が行われている。しかし、蛍光タンパク質の融合による細胞内局在や挙動への影響やタンパク質活性への影響は捨てきれず、また、融合タンパク質の細胞内発現量の調節も難しい。従って、これらの厳密な評価においては、複数の方法での検証が望ましい。融合する蛍光タンパク質の蛍光特性にも制約があり、適切な蛍光団で化学標識したタンパク質を細胞内に導入できればこの問題の解決に資する。また、近年、天然タンパク質の認識能を活用した種々のバイオセンサーが開発されてきており（非特許文献1）、細胞内計測への応用が期待されている。しかし、このような化学修飾されたタンパク質を細胞外から細胞内へと導入しようとする際に、細胞外から加えたタンパク質の少なからぬ量がエンドソームに保持され、細胞質へと放出・拡散しないために、これらのタンパク質の細胞内可視化や計測の所望の機能を発揮できない場合が多い。

[0003] 一方、近年、種々のバイオ高分子医薬品の開発が急速に進んでいる。中でも抗体は非常に高い標的特異性を持つため、低分子医薬品に代わる分子標的薬として世界中で開発が進められている。しかし、一般に抗体は細胞質内に移行しないため、その標的は細胞膜上の受容体もしくは細胞外の疾患関連因子に限られているのが現状である。細胞質中には細胞骨格関連タンパク質や、キナーゼ関連因子など種々の疾病治療に際して標的となりうるものが多い。そのため、高分子の効率的細胞内導入法が確立すれば、抗体医薬の適用範

囲は大幅に拡大する。さらにsiRNAなどの核酸(DNA、RNA)、医薬も細胞内導入の目的物質である。

- [0004] 以上により、抗体を始めとする生理活性タンパク質、核酸、医薬を生細胞の細胞質へ効果的に導入する方法の確立が求められている。
- [0005] エンドソームに内包されたタンパク質や薬物を細胞質に放出する代表的なエンドソーム不安定化ペプチドとして、GALA（非特許文献2）、インフルエンザ・ヘマグルチニンHA2タンパク質由来ペプチド（非特許文献3）などが挙げられる。これらは、pH依存的膜融合ペプチドであり、エンドソーム内のpHが5程度になると膜融合性を発揮し、エンドソーム膜を傷害し、内包物を細胞質に放出するとされる。また、膜透過ペプチドとして知られるHIV-1 TatペプチドとHA2ペプチドの連結体（非特許文献4）なども報告されており、CreとTatの融合タンパク質等の生理活性タンパク質の細胞内導入に用いられた例が報告されている。
- [0006] また、高い膜傷害性を有するハチ毒メリチンにおいて、塩基性アミノ酸のリジンにpH感受性のマレイン酸誘導体で保護し、エンドソーム内でのpH低下により保護基が脱離することにより、エンドソーム膜を選択的に損傷させ、エンドソーム内包物を細胞質に放出される試みも報告されている（非特許文献5）。
- [0007] さらに、ポリエチレンイミンなどのポリカチオン性ポリマーのプロトン化の程度がpHの低下に伴い上昇することにより、エンドソームの膨潤を誘起し、内容物（核酸など）を細胞質に放出することが報告されている（プロトンスポンジ効果：非特許文献6）。また種々のpH感受性ポリマーが遺伝子導入に用いられている（特許文献1）。
- [0008] 特許文献2は、抗体をはじめとするタンパク質を生細胞に導入することができるペプチドを開示しているが、その導入効率に改善の余地があった。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：特開2009-007547

特許文献2 : W02016/052442

非特許文献

[0010] 非特許文献1 : Takaokaら、Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 4088

非特許文献2 : Subbaraoら、Biochemistry 1987, 26, 2964

非特許文献3 : Maedaら、PNAS 1981, 78, 4133

非特許文献4 : Wadiaら、Nature Med. 2004, 10, 310

非特許文献5 : Rozemaら、Bioconjug. Chem., 2003, 14, 51

非特許文献6 : Boussifら、PNAS 1995, 92, 7297

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 効果的な細胞機能の計測・解析のためには、細胞外から導入する生理活性タンパク質、核酸、医薬、あるいは蛍光標識タンパク質やセンサー分子の大部分が機能・活性発現の場である細胞質に導入できることが望ましい。しかし、従来の方法では、細胞の生理的取込機構であるエンドサイトーシスにより取り込まれたこれらの分子を、満足できる効率でエンドソームから細胞質へ放出することができないことが問題点であった。バイオ医薬品の細胞内への送達という観点からも、エンドサイトーシスで取り込まれた抗体などのタンパク質、核酸、医薬を効果的に細胞質に送達することが期待されるが、抗体などのタンパク質、核酸、医薬を満足できる効率で細胞質に放出できる方法は報告されていない。

[0012] 本発明は、エンドサイトーシスで取り込まれたタンパク質、核酸、医薬などの目的物質を高効率で細胞質に送達することを目的とする。

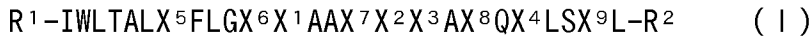
課題を解決するための手段

[0013] 本発明者は、塩基性両親媒性ペプチドLycotoxinのアミノ酸の一部を酸性アミノ酸と置換することで、抗体やセンサー分子、核酸、医薬などの目的物質のエンドソームから細胞質への放出を亢進させ得ることを見出した。

[0014] 本発明は以下のペプチド、タンパク質、核酸、医薬などの目的物質の細胞

質送達剤及び物質導入剤を提供するものである。

[0015] 項1. 下記式(1) :



(式中、 X^1 及び X^2 は、同一又は異なってH又はAを示す。 X^3 はE、L-2-amino adipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸又は2-アミノスベリン酸を示す。

X^4 はQ、L-2-amino adipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸、2-アミノスベリン酸又はEを示す。 $X^5 \sim X^9$ は、同一又は異なって、Lys(K)、Arg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン又は2-amino-7-guanidinoheptanoic acidを示す。

但し $X^1=H$ 、 $X^2=H$ 、 $X^3=E$ 、 $X^4=Q$ 、かつ、 $X^5 \sim X^9=K$ の場合を除く、並びに、

$X^4=E$ 、かつ、 $X^5 \sim X^9=K$ のとき、 X^1 と X^2 の一方または両方がAである。

R^1 は水素原子、アルキル基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基又は目的物質を示す。 R^2 は水酸基(OH)、アミノ基(NH₂)、モノアルキルアミノ基、モノアリールアミノ基、モノシクロアルキルアミノ、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基又は目的物質を示す。)

で表されるペプチド。

[0016] 項2. 下記の(1a)～(1e)のいずれかで表される項1に記載のペプチド。



(XはL-2-amino adipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸又は2-アミノスベリン酸を示し、 R^1 は水素原子、アルキル基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基又は目

的物質を示す。R²は水酸基(OH)、アミノ基(NH₂)、モノアルキルアミノ基、モノアリールアミノ基、モノシクロアルキルアミノ、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基又は目的物質を示す。X⁵~X⁹は、同一又は異なって、Lys(K)、Arg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン又は2-amino-7-guanidinoheptanoic acidを示す。)

[0017] 項3. 下記の(1a)~(1c)のいずれかで表される項2に記載のペプチド。



(XはL-2-aminoadipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸又は2-アミノスベリン酸を示し、R¹は水素原子、アルキル基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基又は目的物質を示す。R²は水酸基(OH)、アミノ基(NH₂)、モノアルキルアミノ基、モノアリールアミノ基、モノシクロアルキルアミノ、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基又は目的物質を示す。X⁵~X⁹は、同一又は異なって、Lys(K)、Arg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン又は2-amino-7-guanidinoheptanoic acidを示す。)

[0018] 項4. 項1~3のいずれか1項に記載のペプチドからなる細胞質送達剤。

[0019] 項5. 項1~3のいずれか1項に記載のペプチドをベクターに含む、細胞質を標的とする物質導入剤。

[0020] 項6. 項1~3のいずれか1項に記載のペプチドと目的物質が直接あるいはスペーサーを介して共有結合されてなる、細胞質を標的とする物質導入剤。

[0021] 項7. 項1~3のいずれか1項に記載のペプチドと目的物質が直接、あるいは目的物質と相互作用する他分子を介して非共有結合的な複合体を形成してなる、細胞質を標的とする物質導入剤。

[0022] 項8. 目的物質をベクターに内包する、項5に記載の細胞質を標的とする

物質導入剤。

[0023] 項 9. 前記ペプチドがベクターの構成成分に直接又はスペーサーを介して結合されている、項 5 に記載の物質導入剤。

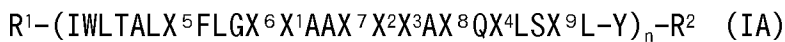
[0024] 項 10. 前記ペプチドと前記ペプチドの標的細胞へ親和性を高める分子とのコンジュゲートを含む、項 4, 5, 6 又は 7 に記載の物質導入剤。

[0025] 項 11. 前記ペプチドが目的物質とともにベクターに内包されている、項 5, 8 又は 9 に記載の物質導入剤。

[0026] 項 12. 前記ベクターが、リポソーム、リピッドマイクロスフェア、高分子ミセル、高分子中空キャリア、ナノゲル、高密度リポタンパク質 (HDL)、合成ポリマー、自己集合型核酸由来ベクター、ウイルス外殻タンパク質由来ベクター又はナノ粒子である、項 5, 8 又は 9 に記載の物質導入剤。

[0027] 項 13. ベクターの構成成分がコレステロールあるいはリン脂質であり、前記ベクターがコレステロールあるいはリン脂質と項 1~3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む複合体を含む、項 9 に記載の物質導入剤。

[0028] 項 14. 下記式 (IA)



(式中、 X^1 及び X^2 は、同一又は異なって H 又は A を示す。 X^3 は E、L-2-amino adipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸又は 2-アミノスベリン酸を示す。

X^4 は Q、L-2-amino adipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸、2-アミノスベリン酸又は E を示す。 $X^5 \sim X^9$ は、同一又は異なって、Lys(K)、Arg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン又は 2-amino-7-guanidinoheptanoic acid を示す。

但し $X^1 = H$ 、 $X^2 = H$ 、 $X^3 = E$ 、 $X^4 = Q$ 、かつ、 $X^5 \sim X^9 = K$ の場合を除く、並びに、

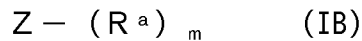
$X^4 = E$ 、かつ、 $X^5 \sim X^9 = K$ のとき、 X^1 と X^2 の一方または両方が A である。

R^1 は水素原子、アルキル基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基又は目的物質を示す。 R^2 は水酸基 (OH

)、アミノ基(NH₂)、モノアルキルアミノ基、モノアリアルアミノ基、モノシクロアルキルアミノ、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリアルオキシ基又は目的物質を示す。Yは単結合またはスペーサーを示す。nは2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9または10である。)

で表されるペプチド。

[0029] 項15. 下記式 (IB) :



(式中、Zは分岐型の多価リンカーを示し、R^aは、同一または異なって、R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-Y-を示すか、Y-IWLTALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-R²を示す。X¹及びX²は、同一又は異なってH又はAを示す。X³は、L-2-aminoadipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸又は2-アミノスベリン酸を示す。X⁴はQ、L-2-aminoadipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸、2-アミノスベリン酸又はEを示す。X⁵~X⁹は、同一又は異なって、Lys(K)、Arg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン又は2-amino-7-guanidinoheptanoic acidを示す。

但しX¹=H、X²=H、X³=E、X⁴=Q、かつ、X⁵~X⁹=Kの場合を除く、並びに、

X⁴=E、かつ、X⁵~X⁹=Kのとき、X¹とX²の一方または両方がAである。

R¹は水素原子、アルキル基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、アリアルオキシカルボニル基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリアルオキシ基又は目的物質を示す。R²は水酸基(OH)、アミノ基(NH₂)、モノアルキルアミノ基、モノアリアルアミノ基、モノシクロアルキルアミノ、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリアルオキシ基又は目的物質を示す。Yは単結合またはスペーサーを示す。mは2~8の整数である。)

発明の効果

[0030] 本発明のペプチドは、細胞表面と効果的に相互作用することにより、抗体などのタンパク質、核酸、医薬などの目的物質(細胞内導入分子)とともに

、エンドソーム内に取り込まれる効果を奏する。

[0031] 本発明のペプチドは、エンドソーム内におけるpHの減少ならびにエンドソーム成熟化に伴う膜構成成分の変化に伴いエンドソーム膜の不安定化を誘起し、ペプチドとともにエンドソーム内に移行した抗体やセンサー分子、核酸、医薬などの目的物質の細胞質への放出を促進する効果を奏する。

[0032] 本発明のペプチドは、蛍光標識をはじめとした化学修飾を施したタンパク質やセンサー分子などの目的物質の細胞質内への送達を通して、当該目的物質の細胞内局在や挙動、また、細胞内環境の計測・制御を可能にする効果を奏する。

[0033] 本発明のペプチドは、抗体、核酸のようなサイズの大きな生理活性物質を細胞質内に送達する効果を奏する。

[0034] 本発明の第1の好ましい実施形態は、12位と16位のヒスチジン残基のアラニン置換である。

[0035] 特許文献2のL17Eは二つのヒスチジン(H)を含んでいる。ヒスチジンは細胞外のpHでは荷電せず、エンドソーム内のpHでは正に荷電すると考えられる。L17Eのエンドソーム膜選択的な傷害性は、ヒスチジンの正電荷により向上すると考えられたが、意外にもヒスチジン残基により低下することが分かった。このため、12位と16位のヒスチジン残基をアラニンで置換することでエンドソーム膜選択的な傷害性の向上を図った。

[0036] 2つのヒスチジン残基をアラニンで置換したHA/E1はL17Eに比べ高いヘリックス性を示し(図1)、高分子薬物モデルとしてのAlexa488-dextranのエンドソームからの放出活性は大きく向上した(図2)。

[0037] さらに、21位をGlu(E)で置換したH12A/H16A/L17E/Q21E置換体(=HA/E2)は、酸性脂質膜存在下で高いヘリックス性を示し(図1)、HA/E1と同等のエンドソーム内包物放出活性を有していた(図2)。また、L17Eに比べて有意に高いエンドソーム内包物放出活性を有していた。

[0038] 12位、16位のヒスチジンをアラニン以外の親水性アミノ酸(グルタミン、セリン)に置換したH12Q/H16Q/L17E/Q21E、H12S/H16S/L17E/Q21Eの活性はL17

Eに比べて劣るものであり、ヒスチジンの置換は、アラニンが望ましいと結論された。

[0039] 本発明の第2の好ましい実施形態は、17位(E)、21位(Q)の2-アミノアジピン酸(Aad)、2-アミノピメリン酸又は2-アミノスベリン酸への置換である。

[0040] さらにペプチドのヘリックス構造の安定化と膜親和性の向上を期待して、細胞膜に対してのエンドソーム膜の選択的不安定化に重要な役割を担うL17E中の17位のグルタミン酸(E)を、側鎖のメチレン鎖が一つ多い2-アミノアジピン酸(Aad)に置換した誘導体(L17Aad)を合成した。ヒスチジン残基が配列中に存在しているために、L17Aadのヘリックス含量自体はあまり向上しなかったが(図1)、図3に示すようにL17Eに比べて有意に高いエンドソーム内包物放出活性を示すことが明らかとなった。

[0041] 本発明の第3の好ましい実施形態は、12位と16位のヒスチジン残基をアラニン置換し、さらに17位のグルタミン酸残基の2-アミノアジピン酸(Aad) 2-アミノピメリン酸又は2-アミノスベリン酸への置換である。

[0042] 第1及び第2の好ましい実施形態で得られた結果を基に、L17Eのヒスチジンをアラニンに置換すると共に17位のグルタミン酸をアミノアジピン酸に置換したペプチドHAadを合成した。HAadは図1に示すように酸性脂質膜存在下に高いヘリックス性を示すことが明らかとなり、図4ならびに実施例に示すようにL17Eに比べてエンドソームに取り込まれた薬物を格段に効果的に細胞質に放出する活性を有することが明らかとなった。

[0043] 本発明の第4の好ましい実施形態は、5個のLys(K)残基のArg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン又は2-amino-7-guanidinoheptanoic acidへの置換である。

図面の簡単な説明

[0044] [図1]ペプチドのPOPC/POPG (3:1)リポソーム存在下でのCDスペクトル(左)とヘリックス含量(右)。ヘリックス含量はY H Chen et al, 1972の方法により、222 nmのモル楕円率($[\theta]_{222}$)をもとにHelicity (%) = $-([\theta]_{222} + 2340) / 30300 * 100$ を用いて計算した。

[図2]細胞質へのモデル高分子薬物Alexa488-dextran (10 kDa)の放出が見られた細胞(%). Cells; HeLa, peptides; 40 μ M, Alexa488-dextran (10kDa); 200 μ g/mL, treatment; 1hr in α -MEM(-). Results are presented as means \pm SE (n=3). ***; $p < 0.001$, ****; $p < 0.0001$, n.s.; not significantly different (One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer honestly significant difference test (post hoc test))

[図3]細胞質へのモデル高分子薬物Alexa488-dextran (10 kDa)の放出が見られた細胞(%). Cells; HeLa, peptides; 40 μ M, Alexa488-dextran (10kDa); 200 μ g/mL, treatment; 1hr in α -MEM(-). Results are presented as means \pm SE (n=3). **; $p < 0.01$ (Student's t-test)

[図4]細胞質へのモデル高分子薬物Alexa488-dextran (10 kDa)の放出が見られた細胞(%). HAad、HA/E2、L17AadはL17Eに比べてより高いエンドソーム内容物放出活性を有していた。Cells; HeLa, peptides; 40 μ M, Alexa488-dextran (10kDa); 200 μ g/mL, treatment; 1hr in α -MEM(-). Results are presented as means \pm SE (n=3). *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$ (One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer honestly significant difference test (post hoc test))

[図5]デキストラン(10 kDa)の細胞内放出効率比較 (1)

[図6]デキストラン(10 kDa)の細胞内放出効率比較 (2)

[図7]ヒト免疫グロブリン(IgG、 \sim 160 kDa)の細胞内放出効率比較 (1)

[図8]ヒト免疫グロブリン(IgG、 \sim 160 kDa)の細胞内放出効率比較 (2)

[図9]ヒト免疫グロブリン(IgG、 \sim 160 kDa)の細胞内放出効率比較 (3)

[図10]毒素タンパク質saporinの細胞内送達による殺細胞アッセイ

[図11]Creタンパク質の細胞内送達による遺伝子組換えアッセイ

[図12]ペプチド処理におけるミトコンドリアに対する傷害性

[図13]NLS-EGFPの核集積。核局在化シグナル(NLS)と緑色蛍光タンパク質(EGFP)との融合タンパク質(細胞内に移行したタンパク質を核に集積させることで内在化を確認):HAadの高いエンドソーム内包物放出活性をこの系でも確認

[図14]血清存在下ペプチド処理24時間後の細胞生存率の評価

[図15]実施例16で得られたペプチドによるAlexa488-dextran (10 kDa)の細胞質への放出活性

発明を実施するための形態

[0045] 本発明のペプチドは、特許文献2に記載の以下のL17Eの誘導体である。

L17E: IWLTALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HEAX⁸QLSX⁹L-amide (配列番号1)

(式中、X⁵~X⁹はLys(K)である。)

具体的には、本発明のペプチドは、Lycotoxin 1のX¹に対応する12位のH(His)、X²に対応する16位のH(His)、X³に対応する17位のE(Glu)、X⁴に対応する21位のQ(Gln)の少なくとも1種を置換したペプチドである。12位と16位のH(His)はA(Ala)に置換されてもよく、17位のE(Glu)と21位のQ(Gln)はX(L-2-aminoadipic acid, Aad、2-アミノピメリン酸又は2-アミノスベリン酸)に置換されてもよい。また、5個のLys(K)残基はArg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン又は2-amino-7-guanidinoheptanoic acid残基で置換されてもよい。

[0046] 本発明の一般式(1)のペプチドは、以下の17種のペプチド(I-1)~(I-17)を含む。

R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-R² (1)

R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶AAAX⁷HEAX⁸QLSX⁹L-R² (I-1)

R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶HAAX⁷AEAX⁸QLSX⁹L-R² (I-2)

R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HXAX⁸QLSX⁹L-R² (I-3)

R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HEAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-4)

R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AEAX⁸QLSX⁹L-R² (I-5)

R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AEAX⁸QELSX⁹L-R² (I-6)

R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶AAAX⁷HXAX⁸QLSX⁹L-R² (I-7)

R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶AAAX⁷HEAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-8)

R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶HAAX⁷AXAX⁸QLSX⁹L-R² (I-9)

R¹-IWLTALX⁵FLGX⁶HAAX⁷AEAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-10)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HXAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-11)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AXAX⁸QQLSX⁹L-R² (I-12)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AXAX⁸QEL SX⁹L-R² (I-13)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AEAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-14)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷HXAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-15)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷AXAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-16)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AXAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-17)

(式中、X、X¹、X²、X³、X⁴、X⁵、X⁶、X⁷、X⁸、X⁹、R¹、R²は前記に定義される通りである。)

[0047] 本発明の好ましいペプチドは、以下の5種のペプチドである。

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AEAX⁸QEL SX⁹L-R² (I-6)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HXAX⁸QQLSX⁹L-R² (I-3)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AXAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-17)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AEAX⁸QQLSX⁹L-R² (I-5)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HXAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-11)

[式中、X、R¹、R²、X⁵、X⁶、X⁷、X⁸、X⁹は、前記に定義されるとおりである。]

[0048] 本発明のさらに好ましいペプチドは、以下の3種のペプチドである。

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AEAX⁸QEL SX⁹L-R² (I-6)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HXAX⁸QQLSX⁹L-R² (I-3)

R^1 -IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AXAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-17)

[式中、X、R¹、R²、X⁵、X⁶、X⁷、X⁸、X⁹は、前記に定義されるとおりである。]

[0049] 本発明の特に好ましいペプチドを以下に示す。

HA/E2: IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AEAX⁸QEL SX⁹L-amide

L17Aad: IWL TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HXAX⁸QQLSX⁹L-amide

HAad: IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AXAX⁸QXLSX⁹L-amide

HA/E1: IWL TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AEAX⁸QQLSX⁹L-amide

L17Aad /Q21Aad: IWL⁵TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HXAX⁸QXLSX⁹L-amide

[X=L-2-aminoadipic acid (Aad)、X⁵~X⁹=Lys(K)]

HAad-homoR: IWL⁵TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AXAX⁸QXLSX⁹L-amide

[X=L-2-aminoadipic acid (Aad)、X⁵~X⁹=ホモアルギニン]

[0050] 本発明の最も好ましいペプチドを以下に示す。

HA/E2: IWL⁵TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AEAX⁸QELSX⁹L-amide

L17Aad: IWL⁵TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HXAX⁸QQLSX⁹L-amide

HAad: IWL⁵TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AXAX⁸QXLSX⁹L-amide

[X=L-2-aminoadipic acid (Aad)、X⁵~X⁹=Lys(K)]

HAad-homoR: IWL⁵TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AXAX⁸QXLSX⁹L-amide

[X=L-2-aminoadipic acid (Aad)、X⁵~X⁹=ホモアルギニン]

1文字記号で表される本発明のペプチドの各アミノ酸はL型アミノ酸でもよく、D型アミノ酸でもよい。本発明のペプチドがD型アミノ酸を含む場合、D型アミノ酸の数は1個でも2個以上でもよいが、好ましくは全てのアミノ酸がL型アミノ酸であるか、全てのアミノ酸がD型アミノ酸である。なお、G(Gly)は不斉炭素を有しないので、本明細書においてL型アミノ酸として扱う。

[0051] 本発明のペプチドはエンドソームから細胞質に目的物質を高効率で放出させることができる。

[0052] R¹が水素原子のとき、N末端はアミノ基(NH₂)であり、R¹がアルキル基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基のときN末端は、各々モノアルキルアミノ、アシルアミノ、或いはアルコキシカルボニルアミノ、アラルキルオキシカルボニルアミノ、アリールオキシカルボニルアミノなどのウレタンになる。

[0053] 本発明のペプチドのN末端は2個のアルキル基で置換されたジアルキルアミノ基であってもよい。

[0054] R²が水酸基(OH)のときC末端はカルボキシル基(COOH)であり、R²がアミノ基(NH₂)のとき、C末端はアミド基(CONH₂)になる。

- [0055] 好ましいR¹は、水素原子(H)、アルキル基、アルコキシカルボニル基又はアシル基であり、より好ましくは水素原子である。
- [0056] 好ましいR²は、水酸基(OH)、アルコキシ基又はアミノ基(NH₂)である。
- [0057] アルキル基としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどの直鎖又は分岐を有する炭素数1~6のアルキル基が挙げられる。
- [0058] モノアルキルアミノ基としては、メチルアミノ、エチルアミノ、n-プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、n-ブチルアミノ、イソブチルアミノ、sec-ブチルアミノ、tert-ブチルアミノ、ペンチルアミノ、ヘキシルアミノなどの直鎖又は分岐を有する炭素数1~6のアルキル基で置換されたアミノ基が挙げられる。
- [0059] ジアルキルアミノ基としては、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジn-プロピルアミノ、ジイソプロピルアミノ、ジn-ブチルアミノ、ジイソブチルアミノ、ジsec-ブチルアミノ、ジtert-ブチルアミノ、ジペンチルアミノ、ジヘキシルアミノなどの直鎖又は分岐を有する炭素数1~6のアルキル基でジ置換されたアミノ基が挙げられる。
- [0060] アシル基としては、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリル、イソバレリル、ピバロイル、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、イソステアロイル、オレオイル、リノロイルなどの炭素数2~22、好ましくは2~18の直鎖又は分岐を有するアシル基が挙げられる。また、1-ピレンアセチル、1-ピレンブチリルなどのように芳香族基を含むアシル基であってもよい。
- [0061] アルコキシカルボニル基としては、コレステリルオキシカルボニル基、tert-ブチルオキシカルボニル基、フィトステリルオキシカルボニル基、ステアリルオキシカルボニル基、パルミチルオキシカルボニル基、2-オクチルドデシルオキシカルボニル基、ベヘニルオキシカルボニル基などが挙げられる。
- [0062] アラルキルオキシカルボニル基としては、ベンジルオキシカルボニル基、

フェネチルオキシカルボニル基、フルオレニルメチルオキシカルボニル基、アントリルメチルオキシカルボニル基、ビフェニルメチルオキシカルボニル基、テトラヒドロナフチルメチルオキシカルボニル基、クロマニルメチルオキシカルボニル基、2, 3-ジヒドロ-1, 4-ジオキサナフタレニルメチルオキシカルボニル基、インダニルメチルオキシカルボニル基及びフェナントリルメチルオキシカルボニル基などが挙げられる。

[0063] アリールオキシカルボニル基としては、フルオレニルオキシカルボニル基、フェニルオキシカルボニル基、ナフチルオキシカルボニル基、アントリルオキシカルボニル基、ビフェニルオキシカルボニル基、テトラヒドロナフチルオキシカルボニル基、クロマニルオキシカルボニル基、2, 3-ジヒドロ-1, 4-ジオキサナフタレニルオキシカルボニル基、インダニルオキシカルボニル基及びフェナントリルオキシカルボニル基などが挙げられる。

[0064] モノアリールアミノ基としては、フェニルアミノ、ナフチルアミノ、アントリルアミノ、ビフェニルアミノ、テトラヒドロナフチルアミノ、クロマニルアミノ、フルオレニルアミノ、2, 3-ジヒドロ-1, 4-ジオキサナフタレニルアミノ、インダニルアミノ及びフェナントリルアミノが挙げられる。

[0065] モノシクロアルキルアミノとしては、シクロプロピルアミノ、シクロブチルアミノ、シクロペンチルアミノ、シクロヘキシルアミノ、シクロヘプチルアミノ、シクロオクチルアミノなどの炭素数3~8のシクロアルキルアミノが挙げられる。

[0066] アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基又はアリールオキシカルボニル基は、本発明のペプチドと直接結合してもよいが、PEG(ポリエチレングリコール)、アミド基(-CONH-, -NHCO-)、エステル基(-COO-, -O-CO-)、エーテル基(-O-)、アミノ基(-NH-)、アルキレン(メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレンなど)、アミノ酸(例えば天然の20種のアミノ酸)などの適当なスペーサーを介して本発明のペプチドと結合してもよい。例えば、コレステリル基、あるいはリン脂質(例えば、

ホスファチジルエタノールアミン) がスペーサーを介して本発明のペプチドに結合され、その結合体がリポソームなどのベクターの構成成分を構成してもよい。

[0067] R^2 が水酸基のとき、C末端はCOOHであり、 R^2 がアミノ基のときC末端はCONH₂になり、 R^2 がアルコキシ、アラルキルオキシ、アリアルオキシのとき、C末端は対応するエステルになる。 R^2 がモノアルキルアミノ基、モノアリアルアミノ基、モノシクロアルキルアミノ、ジアルキルアミノ基のとき、C末端は対応するアミドになる。

[0068] アルコキシ基としては、コレステリルオキシ基、フィステリルオキシ基、ステアリルオキシ基、パルミチルオキシ基、2-オクチルドデシルオキシ基、ベヘニルオキシ基などが挙げられる。

[0069] アラルキルオキシ基としては、ベンジルオキシ基、フェネチルオキシ基、フルオレニルメチルオキシ基、アントリルメチルオキシ基、ビフェニルメチルオキシ基、テトラヒドロナフチルメチルオキシ基、クロマニルメチルオキシ基、2,3-ジヒドロ-1,4-ジオキサナフタレニルメチルオキシ基、インダニルメチルオキシ基及びフェナントリルメチルオキシ基などが挙げられる。

[0070] アリアルオキシ基としては、フルオレニルオキシ基、フェニルオキシ基、ナフチルオキシ基、アントリルオキシ基、ビフェニルオキシ基、テトラヒドロナフチルオキシ基、クロマニルオキシ基、2,3-ジヒドロ-1,4-ジオキサナフタレニルオキシ基、インダニルオキシ基及びフェナントリルオキシ基などが挙げられる。

[0071] 細胞質に送達する目的物質としては、生理活性物質、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、医薬、糖あるいはこれらの標識物質、また、合成高分子、リポソーム、有機/無機/半導体微粒子などが挙げられる。タンパク質、ペプチド、核酸、医薬、糖あるいはこれらの標識物質、合成高分子、リポソーム、有機/無機/半導体微粒子などの生理活性物質は、適当なスペーサーを介して、IWL¹TALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹Lで表されるペプチド部分の

N末端又はC末端に結合されていてもよい。また、生理活性物質は、IWL⁵TALX⁵F⁵LGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹Lで表されるペプチド部分のN末端又はC末端にスペーサーを介さずに直接結合されていてもよい。

[0072] R¹とR²の一方又は両方が目的物質である本発明のペプチドは、以下のものを含み得る：

(生理活性物質)-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-(生理活性物質)

(生理活性物質)-(スペーサー)-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-(スペーサー)-(生理活性物質)

(生理活性物質)-(スペーサー)-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-(生理活性物質)

(生理活性物質)-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-(スペーサー)-(生理活性物質)

(生理活性物質)-(スペーサー)-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-R²
(R²≠目的物質)

R¹-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-(スペーサー)-(生理活性物質)
(R¹≠目的物質)

(生理活性物質)-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-R² (R²≠目的物質)

R¹-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶X¹AAX⁷X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-(生理活性物質) (R¹≠目的物質)

(式中、X¹、X²、X³、X⁴、X⁵、X⁶、X⁷、X⁸、X⁹は前記に定義される通りである。R¹、R²は、目的物質以外の前記に定義されるものである。

)

タンパク質としては抗体、酵素、細胞情報伝達因子、転写因子、DNAあるいはRNA結合タンパク質、核・ミトコンドリア・細胞骨格などの細胞内器官構成タンパク質、ユビキチンや熱ショックタンパク質などのユビキチン-プロテアソーム系関連タンパク質やカスパーゼなどのアポトーシス関連タンパク質、p53などの細胞周期調節タンパク質、レクチンなどが挙げられる。また、Creリコンビナーゼ、TALEN、Cas9などの遺伝子切断・組み換え能を有するタンパク質も含まれる。抗体に関しては、免疫グロブリン

ンに加え、その断片タンパク質やラクダ科動物由来の一本鎖抗体も含まれる。これらの抗体の標的としては、キナーゼ類、HIF-1などの転写因子類、微小管などの細胞骨格タンパク質類などが挙げられる。ペプチドとしては、細胞内タンパク質相互作用を調節するヘリックスペプチドや環状ペプチド、細胞内タンパク質の断片ペプチド、DNA/RNA結合ペプチド、各種酵素基質・阻害剤、がんワクチン産生のための抗原ペプチドなどが挙げられる。医薬としては抗腫瘍剤、抗ウイルス剤などが挙げられ、糖としてはデキストラン、シアル酸などが挙げられ、核酸としてはDNA、RNA（好ましくはsiRNA、miRNA、shRNA、rRNA、リボザイム、アンチセンスRNAなど）、DNA/RNAアプタマーならびにこれらの化学修飾体が挙げられる。また、Cas9/sgRNAなどのタンパク質と核酸の複合体も生理活性物質に含まれる。また、細胞内での生理活性や機能の向上のために上記の生理活性物質に必要なに応じて化学修飾を施した誘導体を目的物質として細胞内に導入することも可能である。

[0073] 細胞内可視化・計測・相互作用解析のために上記のタンパク質や核酸などの生理活性物質を蛍光団、量子ドット、放射性同位元素、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、光架橋団等で修飾を行ったものや、細胞内NMR測定などのための安定同位体標識タンパク質も目的物質として挙げられる。蛍光団としては、必要に応じて細胞内環境に応じて蛍光特性が変化する蛍光団で修飾することも可能である。

[0074] 細胞内に導入される目的物質は特に以上のものに限定される必要はなく、膜透過性を有するペプチド、各種トランスフェクション試薬など他の細胞導入剤と併用し、これらの細胞質内移行効率の更なる向上のために本発明を用いることも可能である。

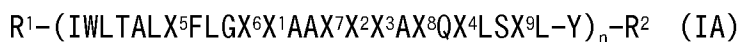
[0075] R¹とR²がともに目的物質ではない本発明のペプチドは、目的物質と組み合わせる組成物、好ましくは医薬組成物として脊椎動物、好ましくはヒトを含む哺乳動物に投与してもよい。目的物質が本発明のペプチドに結合していない場合、目的物質はタンパク質、ペプチド、核酸、医薬、糖あるいはこれ

らの標識物質、合成高分子、リポソーム、有機／無機／半導体微粒子などから構成され、スペーサーを含まない。

[0076] 本発明のペプチドと目的物質を含む組成物または医薬組成物において、目的物質100質量部に対し、本発明のペプチドを1～10000質量部、好ましくは5～200質量部、より好ましくは10～200質量部含む。

[0077] 本発明のペプチドは、目的物質に直接あるいは適当なスペーサーを介して共有結合的に結合してもよく、直接あるいは目的物質と相互作用する他分子を介して非共有結合的に結合して複合体を形成してもよい。さらに、エンドソームに内包されるベクター(細胞導入剤)に含ませてもよい。例えば、本発明のペプチドは、ベクターの内部に含まれていてもよく、ベクターの構成成分に直接又はスペーサーを介して結合されていてもよい。あるいは、本発明のペプチドがベクターの構成成分と相互作用する他分子を介して非共有結合的に複合体を形成することで、ベクターの表面に含ませてもよい。さらにベクターの内部に目的物質とともに本発明のペプチドを内包させて、目的物質がエンドソームに取り込まれた後に、エンドソームから細胞質への移行を促進することができる。本発明のペプチドと目的物質が非共有結合的に結合した複合体は、本発明の組成物または医薬組成物に包含される。

[0078] 本発明のペプチドは、二量体あるいは多量体の形態であってもよい。二量体あるいは多量体は、例えば以下の式 (IA) で表わされる。



(式中、 R^1 、 R^2 、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 、 X^6 、 X^7 、 X^8 、 X^9 は、前記に定義される通りである。 Y は単結合またはスペーサーを示す。 n は2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9または10であり、好ましくは2～6、より好ましくは2～4の整数である。)

本明細書において、スペーサーとしては、エステル結合(-CO-O-、-O-CO-)、エーテル結合(-O-)、アミド結合(NHCO, CONH)、糖鎖リンカー、ポリエチレングリコールリンカー、ペプチドリリンカーなどが挙げられる。ペプチドリリンカーとしては、タンパク質を構成する天然の20種のアミノ酸の少な

くとも1種を含むリンカーが挙げられ、ペプチドリッカーのアミノ酸の数としては、1～20個、1～15個、1～12個、1～10個、1～8個、1～6個あるいは1～4個が挙げられるがこれらに限定されない。ペプチドリッカーとして、アルギニンダイマー、アルギントリマー、アルギニンテトラマー、リジンダイマー、リジントリマー、リジンテトラマー、グリシンドダイマー、グリシントリマー、グリシンテトラマー、グリシンペンタマー、グリシンヘキサマー、アラニン-アラニン-チロシン (AA^Y)、イソロイシン-ロイシン-アラニン (ILA)、アルギニン-バリン-リジン-アルギニン (RVKR) 等が例示される。スペーサーは2価であっても多価であってもよい。

[0079] 本発明のペプチドが多量体の場合、デンドリマーのような分岐型の多価リンカー、あるいは金属錯体等で連結されたものであってもよい。デンドリマーは、例えば以下の式 (IB) で表わされる。

[0080] $Z - (R^a)_m$ (IB)

(式中、Zは分岐型の多価リンカーを示し、R^aは、同一または異なって、R¹-IWL⁵TALX⁶FLGX⁷X¹AA⁸X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-Y-を示すか、Y-IWL⁵TALX⁶FLGX⁷X¹AA⁸X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹L-R²を示す。R¹、R²、X¹、X²、X³、X⁴、X⁵、X⁶、X⁷、X⁸、X⁹、Yは、前記に定義される通りである。mは3、4又は5である。)

Zで表わされる分岐型の多価リンカーとしては、ジエチレントリアミン、スペルミン、スペルミジン、トリエタノールアミン、エチレンジアミンテトラアセテート (EDTA)、ペンタエリスリトール、アジド-プロピル(アルキル)アミン、リジン、オルニチン、アスパラギン酸、グルタミン酸、多官能性ペプチド (リジン、オルニチン、アスパラギン酸又はグルタミン酸を含むジペプチド、トリペプチド又はテトラペプチド)、有機多価アミノ化合物 (例えば、ポリ(アミドアミン) (PAMAM)、トリス(エチレンアミン)アンモニア、ポリ(プロピレンイミン) (Astramol (商標)) など) が挙げられる。mは、2～8の整数、好ましくは2～6の整数、さらに好ましくは2～4の整数、例えば3又は4である。例えば、IWL⁵TALX⁶FLGX⁷X¹AA⁸X²X³AX⁸QX⁴LSX⁹Lで表わされるペプチドのN末端 (あるいはC末端) 同士

を連結したダイマーは、本発明のデンドリマーに包含される。さらに、前記ペプチドのN末端側同士をつないでダイマーとしたもの」と「C末端同士をつないでダイマーとしたもの」を更に連結した4量体も本発明のデンドリマーに包含される。

[0081] 本発明のペプチドを目的物質と共存させると、目的物質のエンドソームから細胞質への移行を促進することができるが、特定の細胞へ導入するための特異性はない。したがって、本発明のペプチドと目的物質をDDSにより標的細胞に供給するか、細胞特異的なベクターと本発明のペプチドを組み合わせることにより、特定細胞の細胞質に目的物質を導入することができる。細胞特異的なベクターとして、細胞特異的な抗体、リガンドなどが表面に導入されたベクターが例示される。ベクターとしてはリポソーム（カチオニックリポソーム、アニオニックリポソーム）、リピッドマイクロスフェア、リポフェクタミン、親水性セグメントと内核形成セグメント（疎水性セグメント、カチオン性セグメント、金属錯体形成セグメント等）を含むブロックコポリマーから構成される高分子ミセル、高分子中空キャリア（特許第5142313号に記載のポリサルコシン誘導体を含む薬物担体、W02004/105799に記載の非荷電性セグメントと荷電性セグメントとを有するブロック共重合体からなる静電結合型高分子ミセルなど）、ナノゲル、高密度リポタンパク質（HDL）、合成ポリマーやナノ粒子などが挙げられる。自己集合型核酸由来ベクター、ウイルス外殻タンパク質由来ベクターであってもよい。例えばベクターがリポソームの場合には、R¹として炭素数10以上のアシル基を使用するか、N末端にコレステリルオキシカルボニル基やC末端にコレステリル基などの脂溶性の大きい基、あるいはホスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質を必要に応じて適当なスペーサーを介してエステル結合又はアミド結合で本発明のペプチドと結合させることで、本発明のペプチドを含むリポソームを得ることができる。スペーサーとしては、PEG(ポリエチレングリコール)、アミド基(-CONH-, -NHCO-)、エステル基(-COO-, -O-CO-)、エーテル基(-O-)、アミノ基(-NH-)、アルキレン（メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレ

ン、ペンチレン、ヘキシレンなど)、アミノ酸などが挙げられる。アミノ酸は側鎖のCOOHまたはNH₂基を介して結合してもよい。ウイルス(外殻タンパク質)由来ベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、センダイウイルスベクター等が挙げられる。自己集合型核酸由来ベクターとしては、例えばWO 2012144560 A1、W02016/006628に記載のものが挙げられる。「本発明のペプチドの標的細胞へ親和性を高める分子」と本発明のペプチドとのコンジュゲーションにより、当該細胞のエンドソーム内に本発明のペプチドをより効率的/効果的に移行・蓄積させることで、エンドソーム膜の不安定化効果と目的物質の細胞質への送達効果を高めることも可能である。「本発明のペプチドの標的細胞への親和性を高める分子」としては、細胞の表面に提示される受容体(葉酸受容体、トランスフェリン受容体、グルコース等の糖類の受容体、上皮細胞増殖因子(EGF)や血管内皮増殖因子(VEGF)などの増殖因子受容体等)に結合するリガンド、あるいは脂肪酸、疎水性ペプチド、ポリアルギニンなどの塩基性ペプチド、糖鎖などがある。

- [0082] さらに、本発明のペプチドと目的物質は、直接、あるいは目的物質と相互作用する他分子を介して非共有結合的な複合体を形成することができる。このような非共有結合的な複合体としては、
- (a) [抗体と親和性を示すペプチド(ファージディスプレイ系などを用いて選択)と本発明のペプチドのコンジュゲート]と抗体との複合体
 - (b)核酸と本発明のペプチドとの非共有結合的な複合体
 - (c) [本発明のペプチドと核酸相互作用分子とのコンジュゲート]と核酸との非共有結合的な複合体
- 等が挙げられる。

- [0083] 目的物質を細胞に送達すべき生物種は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物としては、例えば、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット等が挙げられる。

実施例

[0084] 以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

1. ペプチドの構造及び製造

L17E (L17): IWL⁵TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HEAX⁸QQLSX⁹L-amide (配列番号 1、R1=H, R2=NH₂)

L17E/Q21E (L17Q21): IWL⁵TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HEAX⁸QELSX⁹L-amide (配列番号 2、R1=H, R2=NH₂)

HA/E2: R¹-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AEAX⁸QELSX⁹L-R² (I-6)

L17Aad: R¹-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HXAX⁸QQLSX⁹L-R² (I-3)

HAad: R¹-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AXAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-17)

HA/E1: R¹-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶AAAX⁷AEAX⁸QQLSX⁹L-R² (I-5)

L17Aad /Q21Aad: R¹-IWL⁵TALX⁵FLGX⁶HAAX⁷HXAX⁸QXLSX⁹L-R² (I-11)

(式中、R¹はHである。R²はNH₂である。XはL-2-aminoadipic acid (Aad)である。X⁵~X⁹はLys(K)である。)

特許文献 2 の実施例に記載のL17Eの配列中の12位、16位、17位、21位のアミノ酸を置換することにより、エンドソーム膜選択的に不安定化するペプチドを得た。ペプチドは、固相合成により得た。得られたペプチドの物性値を以下に示す。

L17E (L17)の物性値(MALDI-TOFMS): 理論値(M+H)⁺ 2860.6; 実測値 2860.5

L17E/Q21Eの物性値: 理論値(M+H)⁺ 2861.4; 実測値 2860.4

HA/E2の物性値: 理論値(M+H)⁺ 2727.6; 実測値 2727.4

L17Aadの物性値: 理論値(M+H)⁺ 2873.7; 実測値 2873.5

HAadの物性値: 理論値(M+H)⁺ 2755.7; 実測値 2755.6

HA/E1の物性値: 理論値(M+H)⁺ 2726.6; 実測値 2726.2

L17Aad /Q21Aadの物性値: 理論値(M+H)⁺ 2887.7; 実測値 2886.7

[0085] 実施例 2. ヘリックス含量

実施例 1 で得たペプチド (L17E、L17E/Q21E、L17Aad、HA/E1、HA/E2、HAad

) について、Y H Chen et al, 1972の方法により、222 nmのモル楕円率($[\theta]_{222}$)をもとにHelicity (%) = $-([\theta]_{222} + 2340) / 30300 * 100$ を用いて、POPC/POPG (3:1)リポソーム存在下でのヘリックス含量を計算し、さらにCDスペクトルを測定した。図1にCDスペクトル(左)とヘリックス含量(右)を示す。

[0086] 実施例3. 高分子薬物モデル(10 kDa dextran)の細胞内導入(1)

実施例1で得られたペプチド(L17E、L17E/Q21E、HA/E1、HA/E2) (40 μ M)存在下又は非存在下(コントロール、no peptide)、HeLa細胞とAlexa488-dextran (Molecular Probes、10 kDa) (200 μ g/mL)を α -MEM(-)中1 h処理、細胞を洗浄し、共焦点顕微鏡で観察した。結果を図2に示す。

[0087] 本発明のペプチド存在下ではAlexa488-dextran (10 kDa) の有意な細胞質への流出・拡散が見られた。

[0088] 実施例4. 高分子薬物モデル(10 kDa dextran)の細胞内導入(2)

実施例1で得られたペプチド(L17E、L17Aad) (40 μ M)存在下又は非存在下(コントロール、no peptide)、HeLa細胞とAlexa488-dextran (Molecular Probes、10 kDa) (200 μ g/mL)を α -MEM(-)中1 h処理、細胞を洗浄し、共焦点顕微鏡で観察した。結果を図3に示す。

[0089] 本発明のペプチド(L17Aad)存在下では、公知のL17Eに対しAlexa488-dextran (10 kDa) の有意な細胞質への流出・拡散が見られた。

[0090] 実施例5. 高分子薬物モデル(10 kDa dextran)の細胞内導入(3)

実施例1で得られたペプチド(HAad、HA/E2、L17Aad、L17E) (40 μ M)存在下又は非存在下(コントロール、no peptide)、HeLa細胞とAlexa488-dextran (Molecular Probes、10 kDa) (200 μ g/mL)を α -MEM(-)中1 h処理、細胞を洗浄し、共焦点顕微鏡で観察した。結果を図4に示す。

[0091] 本発明のペプチド(HAad、HA/E2、L17Aad)存在下では、公知のL17Eに対しAlexa488-dextran (10 kDa) の有意な細胞質への流出・拡散が見られた。

[0092] 実施例6. デキストラン(10 kDa)の細胞内放出効率比較(1)

HAad (40 μ M)存在下にHeLa細胞を高分子薬物モデルとしてのAlexa488-dextran (10 kDa) (200 μ g/mL)と α -MEM(-)培地中で1 hインキュベーションする

ことにより、約75%の細胞内（サイトゾル）へのAlexa488-dextranの放出が見られた。一方、L17Eを用いた際には約50%であった。

[0093] 細胞内に放出されたAlexa488-dextranのシグナルを50%の細胞に対して認めるために必要なペプチド濃度は、HAadが20 μ Mであるのに対し、L17Eは40 μ Mであった(EC_{50} が1/2)。

[0094] 実施例7. デキストラン(10 kDa)の細胞内放出効率比較 (2)

HeLa細胞に較べて細胞内へのデキストランの放出が難しいNIH3T3細胞において、実施例6と同様に、HAad、HA/E2、L17E (各40 μ M)存在下に細胞とデキストラン(10 kDa)をDMEM(-)培地中で1 hインキュベーションしたところ、全体のそれぞれ約35%、25%、17%の細胞で細胞内へのデキストランの放出が認められた(HAad処理による細胞内放出はL17Eによるものの2倍)。

[0095] 実施例8. ヒト免疫グロブリン(IgG、 \sim 160 kDa)の細胞内放出効率比較 (1)

実施例6と同様に、HAad、HA/E2、L17E (各40 μ M)存在下に細胞とAlexa488で蛍光標識したヒト免疫グロブリン(IgG、 \sim 160 kDa)(500 μ g/mL)を α -MEM(-)培地中で1 hインキュベーションしたところ、全体のそれぞれ約70%、45%、35%の細胞で細胞内へのヒト免疫グロブリンの放出が認められた(図7、HAad処理による細胞内放出はL17Eによるものの2倍)。

[0096] 実施例9. ヒト免疫グロブリン(IgG、 \sim 160 kDa)の細胞内放出効率比較 (2)

実施例8で、HAadが高いエンドソーム内包IgGの細胞内への放出能を有することが確認された。これを基に、投与するIgG量の低減可能かに関して検討した。

[0097] HAad、L17E (各40 μ M)存在下に細胞とAlexa488で蛍光標識したヒト免疫グロブリン(IgG、 \sim 160 kDa)(50 μ g/mL:実施例8の1/10量)を α -MEM(-)培地中で1 hインキュベーションしたところ、HAadで処理した細胞では、全体の約50%の細胞で細胞内へのヒト免疫グロブリンの放出が認められたのに対し、L17Eで処理した場合は約10%の細胞でしかこれが認められなかった(図8、HAad処理による細胞内放出はL17Eによるものの5倍。また、50%の細胞内でIgGの放出が認められるのに必要なIgG量は1/10)。

[0098] 実施例 10. ヒト免疫グロブリン(IgG、~160 kDa)の細胞内放出効率比較 (3)

実施例 8 及び 9 で、HAad がより低い IgG 投与量でも高いエンドソーム内包 IgG の細胞内への放出能を有することが確認された。これを基に、投与するペプチド量が低減可能かに関して検討した。

[0099] HAad、L17E (各 20 μ M: 実施例 8 及び 9 の 1/2 量) 存在下に細胞と Alexa488 で蛍光標識したヒト免疫グロブリン(IgG、~160 kDa) (500 μ g/mL: 実施例 8 と同量) を α -MEM(-) 培地中で 1 h インキュベーションしたところ、HAad 20 μ M で処理した細胞では、全体の約 37% の細胞で細胞内へのヒト免疫グロブリンの放出が認められたのに対し、L17E で処理した場合は約 15% の細胞でしかこれが認められなかった(図 9, 低濃度における HAad 処理による細胞内放出は L17E によるものの 2.5 倍。また、細胞内に放出されたヒト免疫グロブリンのシグナルを 35% の細胞に対して認めるために必要なペプチド濃度は、L17E が 40 μ M であるのに対し、HAad はその半分の 20 μ M である)。

[0100] 実施例 11. 毒素タンパク質 saporin の細胞内送達による殺細胞アッセイ

細胞内への送達によりがん細胞を死滅される細胞毒として saporin が知られている。HAad、HA/E2、L17E (各 40 μ M) 存在下に RAW264.7 細胞と saporin (10 μ g/mL) を α -MEM(-) 培地中で 1 h インキュベーションし、その後、細胞を洗浄し、培地を DMEM(+) に交換し更に 6 h インキュベーションした。WST-8 assay で細胞生存率を検定した(図 10)。この結果、HAad および HA/E2 存在下で saporin を処理した細胞の生存率はそれぞれ 4、6% と L17E 存在下での生存率 (16%) と比較して有意に減少し、また HAad 存在下の生存率は、L17E 存在下の 1/4 であった。

[0101] 実施例 12. Cre タンパク質の細胞内送達による遺伝子組換えアッセイ

特許文献 2 の実施例と同様にして作製した loxP-DsRed-loxP-EGFP をコードするプラスミドをトランスフェクションした HeLa 細胞に、His-tag 融合 Cre (Cre-His₆) (10 μ M) を HAad、HA/E2、L17E (各 40 μ M) 存在下、 α -MEM(-) 中 1 h インキュベーションした。この系は、Cre タンパク質が細胞内に放出される

ことで遺伝子組換えが誘起されるとEGFPが発現するように設計してある。細胞を洗浄し、 α -MEM(+)で24 h培養後、共焦点顕微鏡観察した(図11)。ペプチド処理細胞群では、コントロール細胞群(Cre-His₆のみ投与)に比べ有意にEGFP発現細胞の割合が増加した。HAad、HA/E2、L17E処理時のEGFP発現細胞の割合はそれぞれ41%、36%、30%であった。放出ペプチド非投与時のEGFP発現効率は9%であったことを考慮すると、ペプチド投与時には遺伝子組換えが、非投与時に比べ32%、27%、22%上昇したと考えることが可能であり、HAad投与時にはL17E投与時に比べ有意に遺伝子組換えが促進された。

[0102] 実施例13. ペプチド処理におけるミトコンドリアに対する傷害性

ミトコンドリア膜は細胞膜に比べより酸性脂質に富んでいると言われていることから、上記のペプチドのミトコンドリア膜への影響をJC-1アッセイにより調べた。JC-1試薬はミトコンドリア膜が健常に保たれ、膜電位が保たれている場合は赤色(J-aggregate)の、ミトコンドリア膜が傷害され、膜電位が正常に保たれていない場合は緑色(J-monomer)の蛍光を発する。HeLa細胞を α -MEM(-)中、HAad、HA/E2、L17E (40 μ M)と1 hインキュベーションした後、JC-1アッセイを行い、フローサイトメトリーにより赤色蛍光を発する細胞の割合を検定した。ATP合成を阻害する脱共役剤(carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine, FCCP) [α -MEM(-)中、40 μ M、1 hインキュベーション]、カチオン性の遺伝子のトランスフェクション試薬であるリポフェクタミン LTXとpCI vector (空ベクター)との複合体(標準プロトコルに従い α -MEM(+))中、一夜インキュベーション)の影響についても同様に検討した(図12)。

[0103] 結果として、FCCP処理の細胞ではほとんどの細胞が緑色の蛍光を発するように変化した。一方、L17E処理細胞では赤色を示す細胞の割合がペプチド未処理の場合と比べて僅かに低下したのに対して、HA/E2、HAad処理した場合には未処理の場合と有意な差が見られなかった。したがって、これらのペプチドのミトコンドリア膜に対しての影響はほとんど無く、HA/E2、HAadの傷害性はL17Eよりも一層低いことが示唆された。汎用されているリポフェクタミン

には若干のミトコンドリア傷害活性を有するが、本発明のペプチドHA/E2、HAadにはミトコンドリア傷害性がみられないことが示された。

[0104] 実施例 1 4. 核局在化シグナル融合緑色蛍光タンパク質 (NLS-EGFP) の核集積

実施例 6 と同様に、HAad, L17E (各40 μ M) 存在下に細胞とNLS-EGFP (10 μ M) を α -MEM(-)培地中で1 hインキュベーションした。NLS-EGFPが活性を保持したまま細胞内に放出されていれば、NLSにより緑色の蛍光が核に局在する様子が観察される。結果として、全体のそれぞれ約84%、56%の細胞で核へのNLS-EGFPの局在が認められた (図 1 3)。HAadの高いエンドソーム内包物放出活性をこの系でも確認することができた。

[0105] 実施例 1 5. 血清存在下ペプチド処理24時間後の細胞生存率の評価

HAad, HA/E2, L17E (各10, 20, 40 μ M) で細胞を α -MEM(+)培地中で24 hインキュベーションした後の細胞生存率をWST-8 assayにより評価した (図 1 4)。どのペプチドのどの濃度においても24時間後の生存率はほぼ100%で、L17Eと同様に、HA/E2およびHAadに顕著な毒性は見られなかった。

[0106] 実施例 1 6

1) H-IWLTALZFLGZAAAZAXAZQXLSZL-amide [HAad-homoR] (Z=homoarginine、X = L-2-aminoadipic acid)の調製

Francesco L. Brancia., et al., Anal. Chem., 2004, 76 (10), 2748-2755に従って標記化合物を合成した。ヘミ硫酸0-メチルイソ尿素(1.23 g)の水溶液にアンモニア水を添加しpH 11.0とする。HAad[H-IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-amide]の水溶液(1.3 mM, 38 μ L)をこれに加え、ヘミ硫酸0-メチルイソ尿素、1cの最終濃度がそれぞれ0.5M、5 μ M、総液量10 mLとする。室温一夜反応。1% トリフルオロ酢酸水溶液を同体積加えて反応停止後、凍結乾燥、逆相HPLCで精製し、質量分析(MALDI TOFMS)で目的物が得られたことを確認した[実測値2965.8; 理論値 2965.8 (M+H)⁺]。

2) H-IWLTALZFLGZAAAZAXAZQXLSZL-amideのAlexa488-dextran (10 kDa)の細胞質への放出活性

HeLa細胞とAlexa488-dextran (Molecular Probes、10 kDa) (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とHAad、あるいはHAad-homoR (20 μM)を α -MEM(-)中1 h処理、細胞を洗浄し、共焦点顕微鏡で観察した。HAad処理細胞では約40%の細胞で細胞質へのAlexa488-dextranの放出が見られたのに対し、HAad-homoR処理細胞では75%の細胞でこれが観察された。

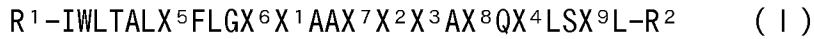
[0107] 5個のLys(K)のアミノ基をグアニジノ基に変換してホモアルギニンにすることにより、細胞内に導入されたタンパク質の細胞質への放出活性が顕著に増大することが明らかになった。

産業上の利用可能性

- [0108] 1. 生細胞へのタンパク質・生理活性物質導入試薬・導入キット
2. 分子細胞生物学・医学分野における基礎研究（細胞内可視化、計測、相互作用解析、細胞活性制御等）
3. 創薬分野における抗体医薬品・バイオ医薬品等の細胞内活性評価のための基礎研究（バイオ医薬品設計支援手法）
4. 抗体医薬品・核酸医薬品・バイオ医薬品のex vivo・in vivo細胞内送達

請求の範囲

[請求項1] 下記式 (1) :



(式中、 X^1 及び X^2 は、同一又は異なってH又はAを示す。 X^3 はE、L-2-aminoadipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸又は2-アミノスベリン酸を示す。 X^4 はQ、L-2-aminoadipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸、2-アミノスベリン酸又はEを示す。 $X^5 \sim X^9$ は、同一又は異なって、Lys(K)、Arg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン又は2-amino-7-guanidinoheptanoic acidを示す。

但し $X^1=H$ 、 $X^2=H$ 、 $X^3=E$ 、 $X^4=Q$ 、かつ、 $X^5 \sim X^9=K$ の場合を除く、並びに、

$X^4=E$ 、かつ、 $X^5 \sim X^9=K$ のとき、 X^1 と X^2 の一方または両方がAである。 R^1 は水素原子、アルキル基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基又は目的物質を示す。 R^2 は水酸基(OH)、アミノ基(NH₂)、モノアルキルアミノ基、モノアリールアミノ基、モノシクロアルキルアミノ、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基又は目的物質を示す。)

で表されるペプチド。

[請求項2] 下記の(1a)～(1e)のいずれかで表される請求項1に記載のペプチド。



(XはL-2-aminoadipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸又は2-アミ

ノスベリン酸を示し、 R^1 は水素原子、アルキル基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基又は目的物質を示す。 R^2 は水酸基(OH)、アミノ基(NH_2)、モノアルキルアミノ基、モノアリールアミノ基、モノシクロアルキルアミノ、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基又は目的物質を示す。 $X^5 \sim X^9$ は、同一又は異なって、Lys(K)、Arg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン又は2-amino-7-guanidinoheptanoic acidを示す。)

[請求項3] 下記の(1a)～(1c)のいずれかで表される請求項2に記載のペプチド。



(XはL-2-aminoadipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸又は2-アミノスベリン酸を示し、 R^1 は水素原子、アルキル基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基又は目的物質を示す。 R^2 は水酸基(OH)、アミノ基(NH_2)、モノアルキルアミノ基、モノアリールアミノ基、モノシクロアルキルアミノ、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基又は目的物質を示す。 $X^5 \sim X^9$ は、同一又は異なって、Lys(K)、Arg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン又は2-amino-7-guanidinoheptanoic acidを示す。)

[請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチドからなる細胞質送達剤。

[請求項5] 請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチドをベクターに含む、細胞質を標的とする物質導入剤。

[請求項6] 請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチドと目的物質が直接あるいはスペーサーを介して共有結合されてなる、細胞質を標的とする物

質導入剤。

[請求項7] 請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチドと目的物質が直接、あるいは目的物質と相互作用する他分子を介して非共有結合的な複合体を形成してなる、細胞質を標的とする物質導入剤。

[請求項8] 目的物質をベクターに内包する、請求項5に記載の細胞質を標的とする物質導入剤。

[請求項9] 前記ペプチドがベクターの構成成分に直接又はスペーサーを介して結合されている、請求項5に記載の物質導入剤。

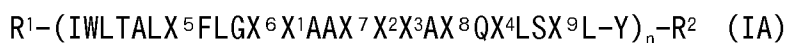
[請求項10] 前記ペプチドと前記ペプチドの標的細胞へ親和性を高める分子とのコンジュゲートを含む、請求項4, 5, 6又は7に記載の物質導入剤。

[請求項11] 前記ペプチドが目的物質とともにベクターに内包されている、請求項5, 8又は9に記載の物質導入剤。

[請求項12] 前記ベクターが、リポソーム、リピッドマイクロソフェア、高分子ミセル、高分子中空キャリア、ナノゲル、高密度リポタンパク質(HDL)、合成ポリマー、自己集合型核酸由来ベクター、ウイルス外殻タンパク質由来ベクター又はナノ粒子である、請求項5, 8又は9に記載の物質導入剤。

[請求項13] ベクターの構成成分がコレステロールあるいはリン脂質であり、前記ベクターがコレステロールあるいはリン脂質と請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチドを含む複合体を含む、請求項9に記載の物質導入剤。

[請求項14] 下記式 (IA)



(式中、 X^1 及び X^2 は、同一又は異なってH又はAを示す。 X^3 はE、L-2-amino adipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸又は2-アミノスベリン酸を示す。 X^4 はQ、L-2-amino adipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸、2-アミノスベリン酸又はEを示す。 $X^5 \sim X^9$ は、同一又は異なって、Lys(K)、Arg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン

又は2-amino-7-guanidinoheptanoic acidを示す。

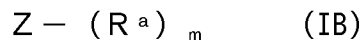
但し $X^1=H$ 、 $X^2=H$ 、 $X^3=E$ 、 $X^4=Q$ 、かつ、 $X^5\sim X^9=K$ の場合を除く、並びに、

$X^4=E$ 、かつ、 $X^5\sim X^9=K$ のとき、 X^1 と X^2 の一方または両方がAである。 R^1 は水素原子、アルキル基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基又は目的物質を示す。 R^2 は水酸基(OH)、アミノ基(NH₂)、モノアルキルアミノ基、モノアリールアミノ基、モノシクロアルキルアミノ、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基又は目的物質を示す。 Y は単結合またはスペーサーを示す。 n は2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9または10である。)

で表されるペプチド。

[請求項15]

下記式 (IB) :



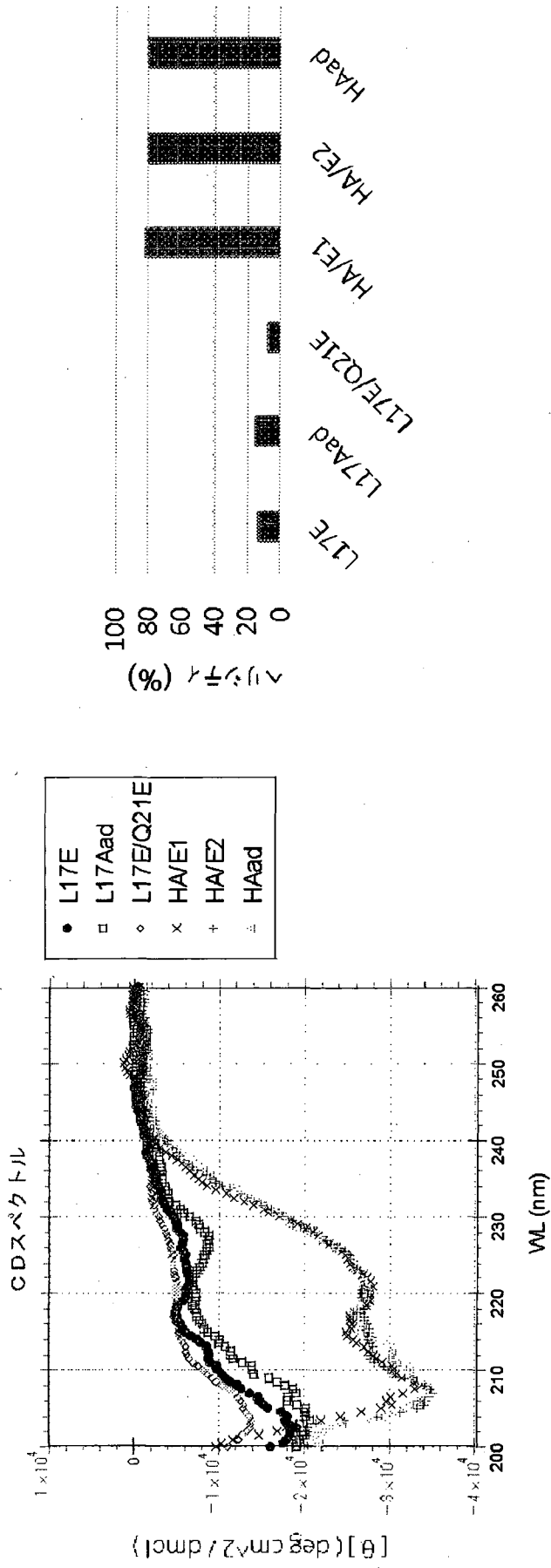
(式中、 Z は分岐型の多価リンカーを示し、 R^a は、同一または異なって、 $R^1\text{-IWL TALX}^5\text{FLGX}^6\text{X}^1\text{AAX}^7\text{X}^2\text{X}^3\text{AX}^8\text{QX}^4\text{LSX}^9\text{L-Y}$ を示すか、 $\text{Y-IWL TALX}^5\text{FLGX}^6\text{X}^1\text{AAX}^7\text{X}^2\text{X}^3\text{AX}^8\text{QX}^4\text{LSX}^9\text{L-R}^2$ を示す。 X^1 及び X^2 は、同一又は異なってH又はAを示す。 X^3 はE、L-2-aminoadipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸又は2-アミノスベリン酸を示す。 X^4 はQ、L-2-aminoadipic acid (Aad)、2-アミノピメリン酸、2-アミノスベリン酸又はEを示す。 $X^5\sim X^9$ は、同一又は異なって、Lys(K)、Arg(R)、ホモアルギニン、オルニチン、ホモリジン又は2-amino-7-guanidinoheptanoic acidを示す。

但し $X^1=H$ 、 $X^2=H$ 、 $X^3=E$ 、 $X^4=Q$ 、かつ、 $X^5\sim X^9=K$ の場合を除く、並びに、

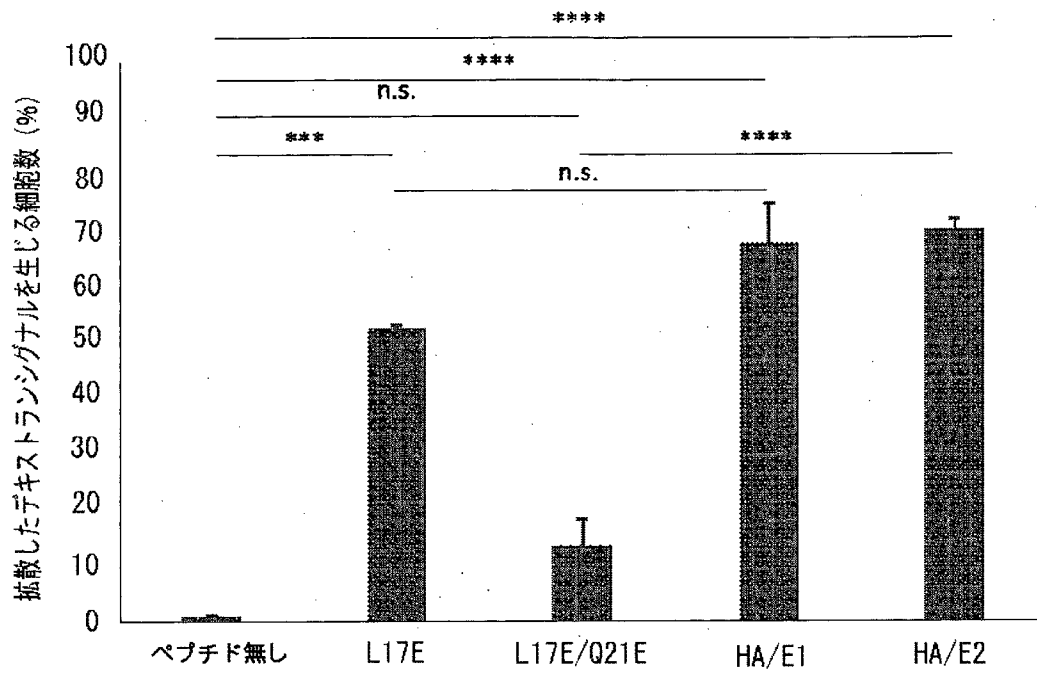
$X^4=E$ 、かつ、 $X^5\sim X^9=K$ のとき、 X^1 と X^2 の一方または両方がAである。 R^1 は水素原子、アルキル基、アシル基、アルコキシカル

ボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、アリアルオキシカルボニル基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリアルオキシ基又は目的物質を示す。R²は水酸基(OH)、アミノ基(NH₂)、モノアルキルアミノ基、モノアリアルアミノ基、モノシクロアルキルアミノ、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリアルオキシ基又は目的物質を示す。Yは単結合またはスペーサーを示す。mは2～8の整数である。)

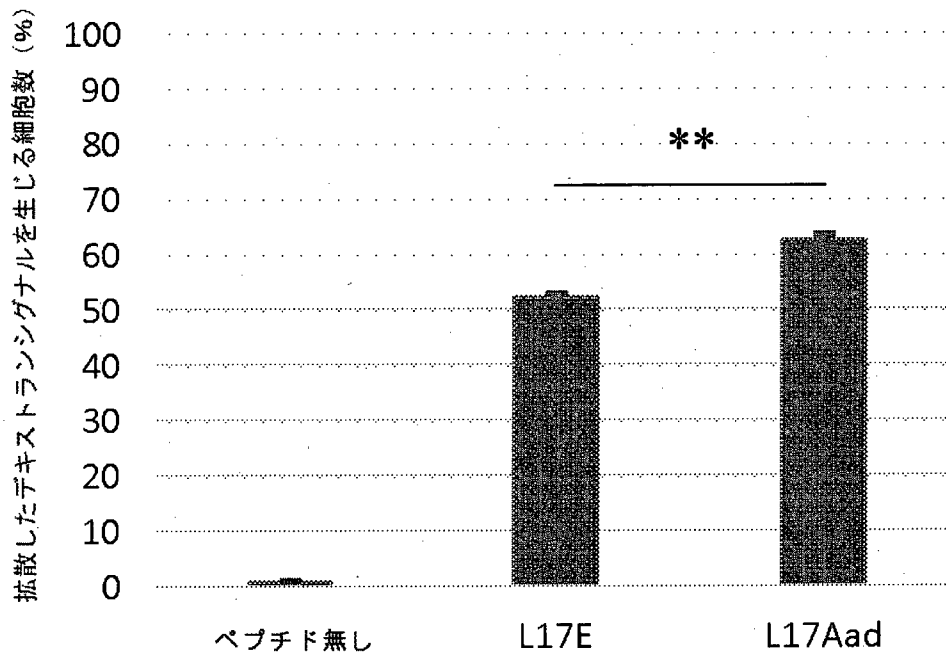
[図 1]



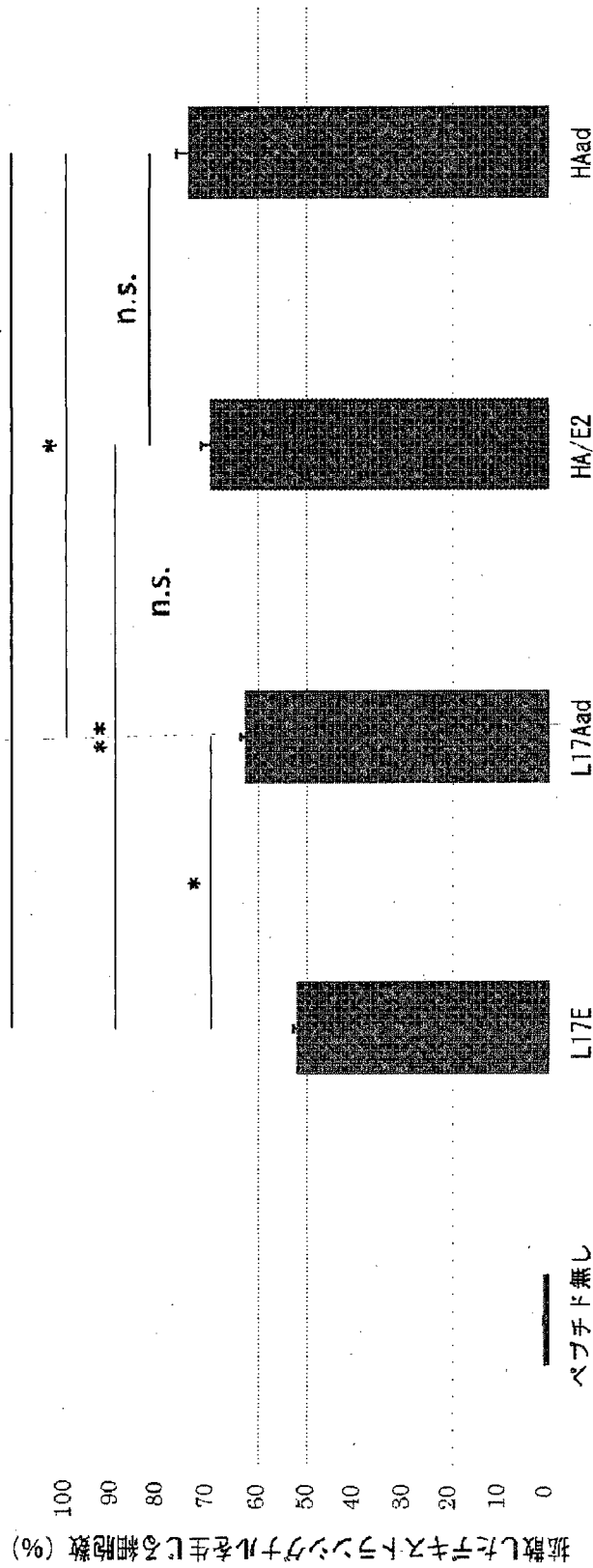
[図 2]



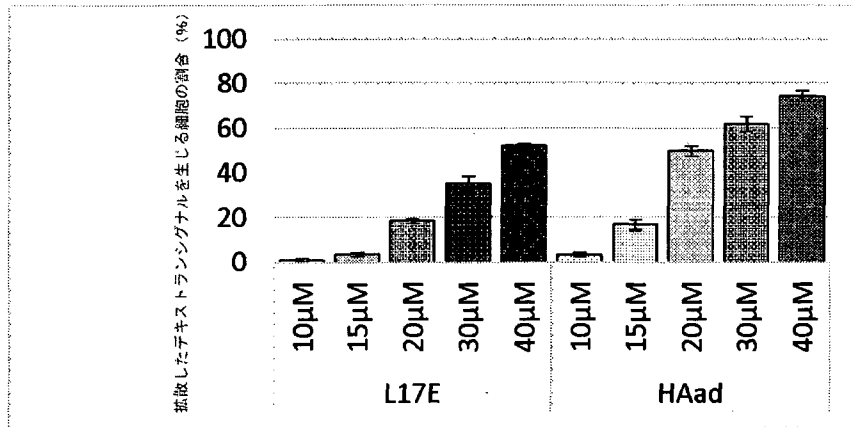
[図 3]



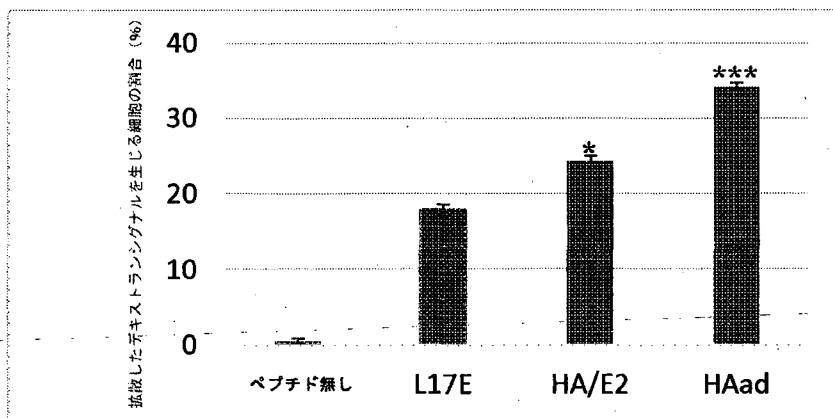
[図 4]



[図 5]



[図 6]



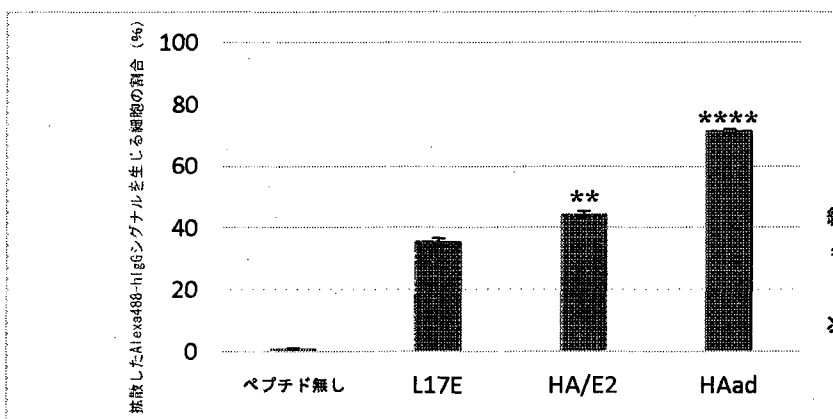
結果は平均±SE (n=3) を示す。

* ; p<0.05, *** ;

p<0.001 vs L17E (一元配置分散分析(ANOVA))

次いでDunnett's多重比較事後検定)

[図 7]



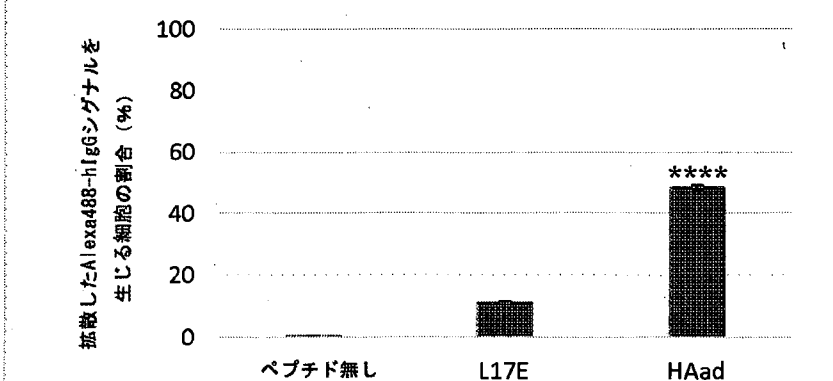
結果は平均±SE (n=3) を示す。

** ; p<0.01, **** ; p<0.0001 vs L17E

(一元配置分散分析(ANOVA))

次いでDunnett's多重比較事後検定)

[図 8]



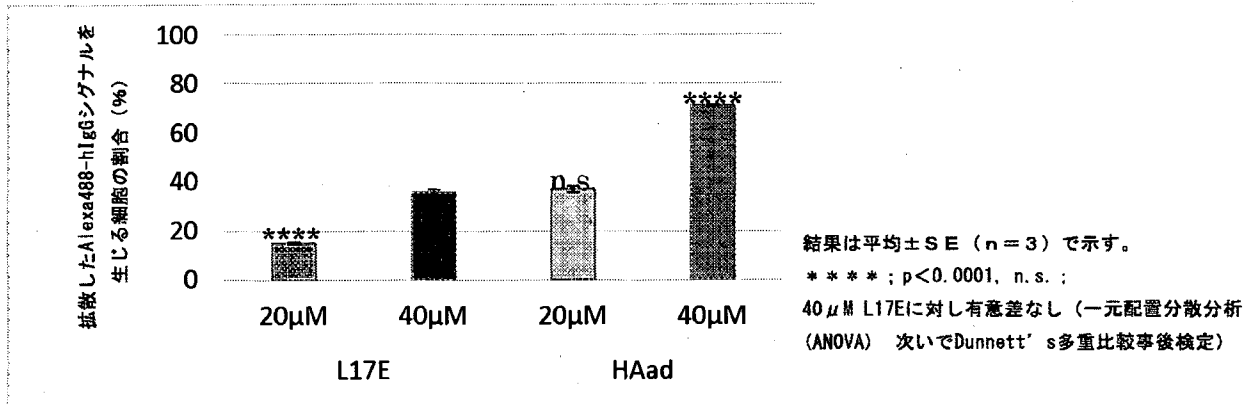
結果は平均±SE (n=3) を示す。

L17Eに対して**** ; p<0.0001 vs L17E

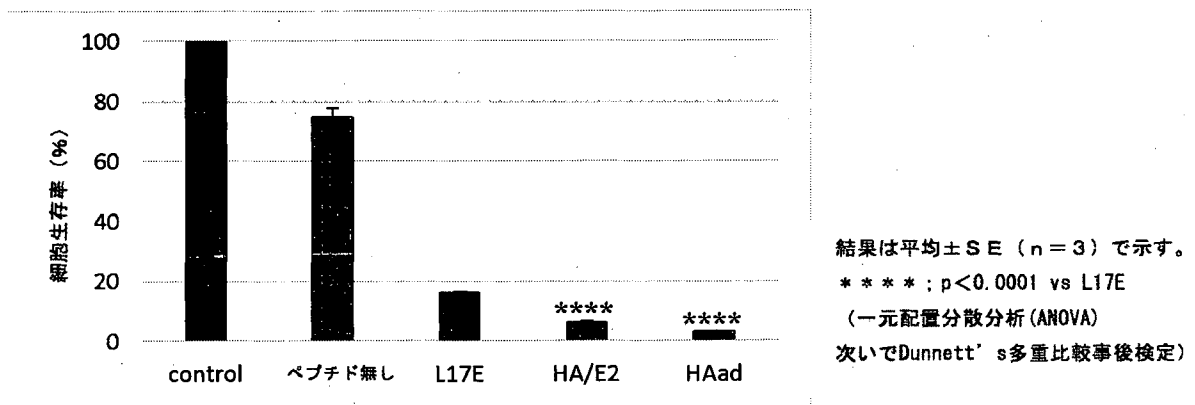
(一元配置分散分析(ANOVA))

次いでDunnett's多重比較事後検定)

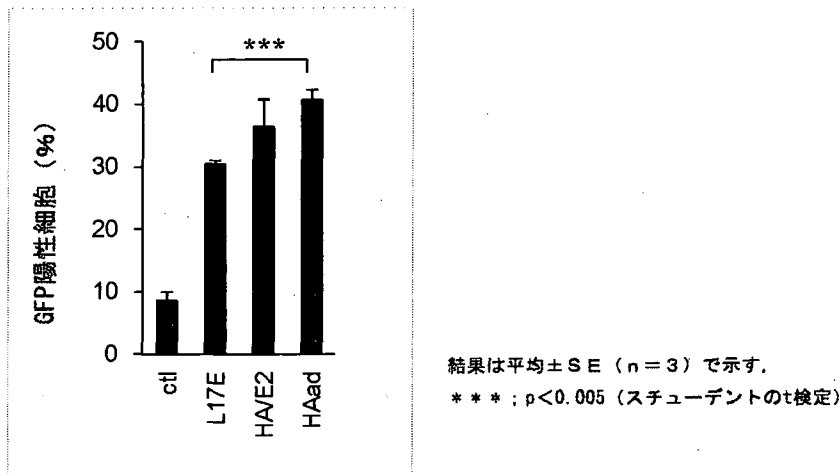
[図 9]



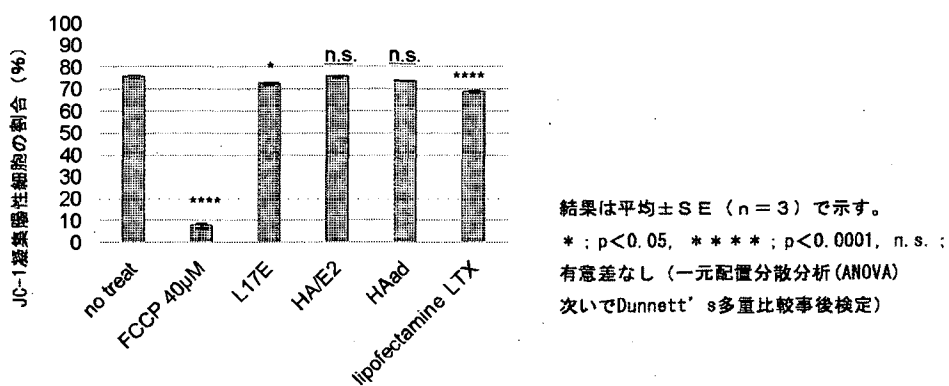
[図 10]



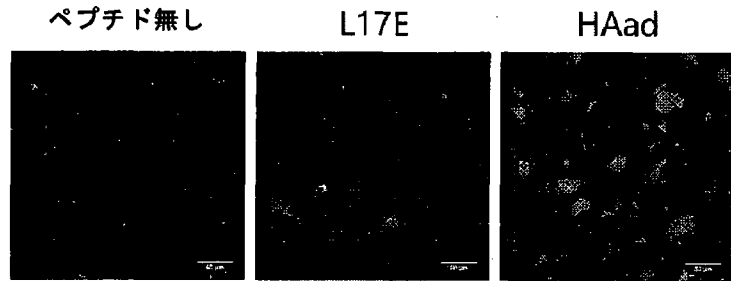
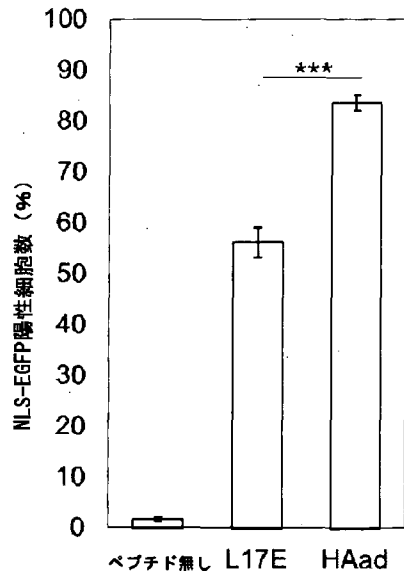
[図 11]



[図 12]

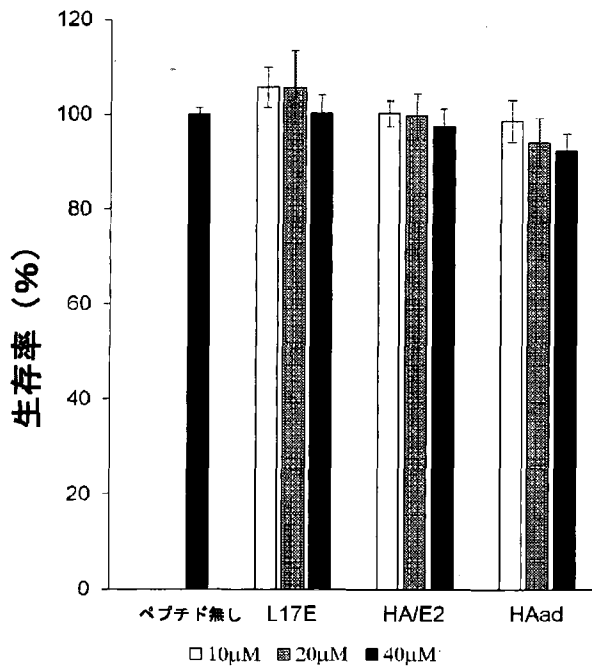


[図 13]



[細胞: HeLa, ペプチド: 40 μM, NLS-EGFP-His6: 10 μM, 処理: α-MEM(-)中1時間]
結果は平均±SE (n=3) で示す。***; p<0.001 スチューデントのt検定.

[図 14]

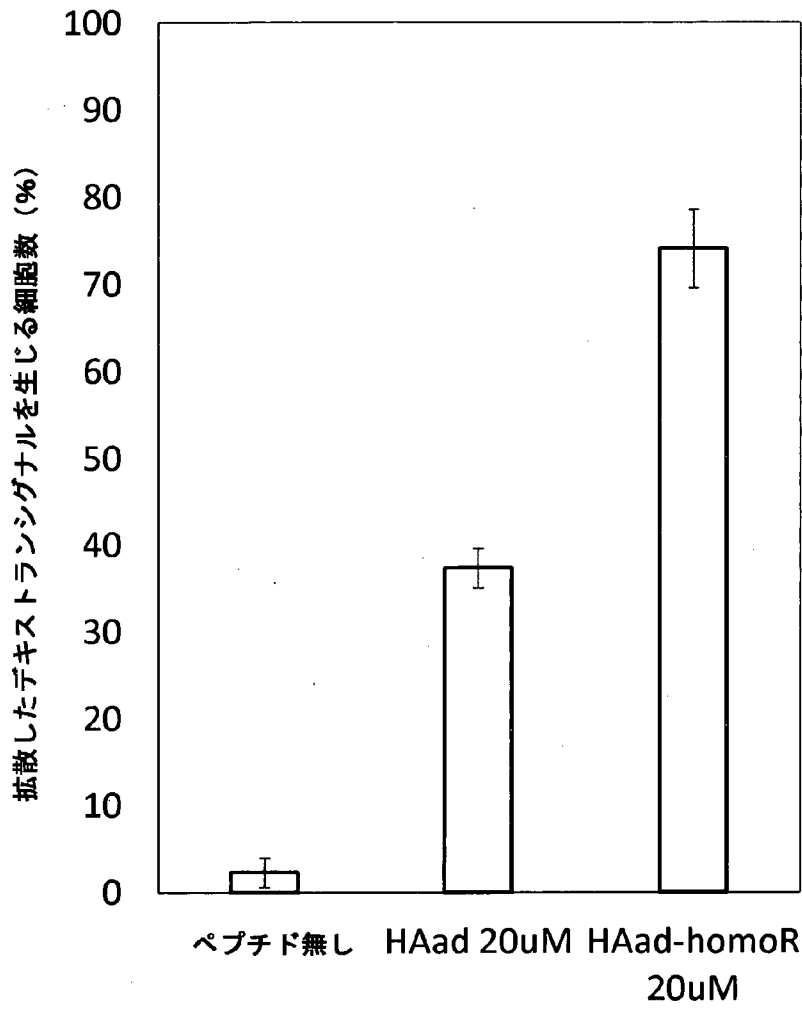


方法

- ↓ 96ウェルプレートに5000HeLa細胞播種
- ↓ インキュベーション(0/N)
- ↓ α-MEM(+)中にペプチド溶解(10, 20, 40 μM)
- ↓ 細胞洗浄w/PBS(-)
- ↓ 各ウェルにペプチド溶液を添加
- ↓ インキュベーション(37°C, 24h)
- ↓ 細胞洗浄w/PBS(-)
- ↓ 細胞染色w/WST-8溶液
- ↓ 450nmで吸光度測定

[細胞: HeLa, ペプチド: 40 μM, 処理: α-MEM(-)中24時間]
結果は平均±SE (n=3) で示す。

[図 15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/011406

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N15/09 (2006.01) i, C07K14/435 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N15/09, C07K14/435

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

| | |
|--|-----------|
| Published examined utility model applications of Japan | 1922-1996 |
| Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2018 |
| Registered utility model specifications of Japan | 1996-2018 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2018 |

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

JSTPlus/JST7580 (JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------------|--|-----------------------------|
| X A A | WO 2016/052442 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 07 April 2016, claims, example 1 (Family: none) 坂本健太郎ほか, エンドソーム不安定化ペプチド L17E の活性向上に向けた設計と評価, 日本薬学会年会要旨集, 05 March 2017, vol. 137, no. 25R-pm02S, entire text, non-official translation (SAKAMOTO, Kentaro et al., "Design and evaluation of activity improvement in endosome-destabilizing peptide L17E", Annual abstracts of the Pharmaceutical Society of Japan) | 1, 4-15 2, 3 1-15 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 June 2018 (14.06.2018)

Date of mailing of the international search report

26 June 2018 (26.06.2018)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/011406

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|--------------|--|-----------------------|
| A | HUGHES, SR. et al., "Cell-penetrating recombinant peptides for potential use in agricultural pest control applications", <i>Pharmaceuticals</i> , 2012, vol. 5, pp. 1054-1063, abstract | 1-15 |
| A | AKISHIBA, M. et al., "Novel Peptide Sequence for Endosome Disruption Derived from Natural Hemolytic Peptide", <i>Pept. Sci.</i> , 2015, vol. 2014, pp. 33-34, entire text | 1-15 |
| A | YAN, S. et al., "Detailed folding structures of M-lycotoxin-Hcla and its mutageneses using 2D HP model", <i>Molecular Simulation</i> , 2012, vol. 38, pp. 809-822, abstract | 1-15 |
| A | ADAO, R. et al., "Membrane structure and interactions of a short Lycotoxin I analogue", <i>J. Pept. Sci.</i> , 2008, vol. 14, pp. 528-534, abstract | 1-15 |
| P, X P, A | AKISHIBA, M. et al., "Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide", <i>Nat. Chem.</i> , 22 May 2017, vol. 9, pp. 751-761, table 1 | 1, 4-15 2, 3 |
| P, X | 坂本健太郎ほか, ヒスチジン残基に注目したエンドソーム不安定化ペプチドの活性向上とその評価, 日本薬学会年会要旨集, 05 March 2018, vol. 138, no. 26V-pm13S, entire text, non-official translation (SAKAMOTO, Kentaro et al., "Improvement of activity in endosome-destabilizing peptide, and evaluation thereof, paying attention to histidine residue", Annual abstracts of the Pharmaceutical Society of Japan) | 1-15 |
| P, X P, A | 秋柴美沙穂ほか, エンドソーム不安定化ペプチドを用いた細胞内への機能性タンパク質の導入, 日本薬学会年会要旨集, 05 March 2018, vol. 138, no. GS02-7, entire text, non-official translation (AKISHIBA, Misaho et al., "Introduction of functional protein into cell using endosome-destabilizing peptide", Annual abstracts of the Pharmaceutical Society of Japan) | 1, 4-15 2, 3 |
| P, X P, A | 秋柴美沙穂ほか, 細胞への入り口をひらく, 現代化学, 16 January 2018 (acceptance date), no. 563, pp. 32-36, fig. 3, (Chemistry today), non-official translation (AKISHIBA, Misaho et al., Opening entrance to cell) | 1, 4-15 2, 3 |

| | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|---------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i | | | | | | | | | | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C07K14/435 | | | | | | | | | | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table> | | | | 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | 日本国公開実用新案公報 | 1971-2018年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2018年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2018年 |
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | | | | | | | | | | |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2018年 | | | | | | | | | | |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2018年 | | | | | | | | | | |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2018年 | | | | | | | | | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JST7580 (JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq | | | | | | | | | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | | | | | | | | | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 | | | | | | | | | |
| X A | WO 2016/052442 A1 (国立大学法人京都大学) 2016.04.07, 特許請求の範囲、実施例1 (ファミリーなし) | 1, 4-15 2, 3 | | | | | | | | | |
| A | 坂本健太郎ほか, エンドソーム不安定化ペプチドL17Eの活性向上に向けた設計と評価, 日本薬学会年会要旨集, 2017.03.05, Vol.137, NO.25R-pm02S, 全文 | 1-15 | | | | | | | | | |
| ☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。 | | ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | | | | | | | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献 | | | | | | | | | |
| 国際調査を完了した日 14.06.2018 | | 国際調査報告の発送日 26.06.2018 | | | | | | | | | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 西村 亜希子 | 4N 3435 | | | | | | | | |
| | | 電話番号 03-3581-1101 内線 | 3488 | | | | | | | | |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|----------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| A | HUGHES SR et al., Cell-penetrating recombinant peptides for potential use in agricultural pest control applications, Pharmaceuticals, 2012, Vol.5, pp.1054-1063, Abstract | 1-15 |
| A | AKISHIBA M et al., Novel Peptide Sequence for Endosome Disruption Derived from Natural Hemolytic Peptide, Pept. Sci., 2015, Vol.2014, pp.33-34, 全文 | 1-15 |
| A | YAN S et al., Detailed folding structures of M-lycotoxin-Hc1a and its mutageneses using 2D HP model, Molecular Simulation, 2012, Vol.38, pp.809-822, Abstract | 1-15 |
| A | ADAO R et al., Membrane structure and interactions of a short Lycotoxin I analogue, J. Pept. Sci., 2008, Vol.14, pp.528-534, Abstract | 1-15 |
| P, X P, A | AKISHIBA M et al., Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide, Nat. Chem., 2017.05.22, Vol.9, pp.751-761, Table1 | 1,4-15 2,3 |
| P, X | 坂本健太郎ほか, ヒスチジン残基に注目したエンドソーム不安定化ペプチドの活性向上とその評価, 日本薬学会年会要旨集, 2018.03.05, Vol.138, NO.26V-pm13S, 全文 | 1-15 |
| P, X P, A | 秋柴美沙穂ほか, エンドソーム不安定化ペプチドを用いた細胞内への機能性タンパク質の導入, 日本薬学会年会要旨集, 2018.03.05, Vol.138, NO.GS02-7, 全文 | 1,4-15 2,3 |
| P, X P, A | 秋柴美沙穂ほか, 細胞への入り口をひらく, 現代化学, 2018.01.16 (受入日), No.563, pp.32-36, 図3 | 1,4-15 2,3 |