

(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
2020年4月2日(02.04.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/066343 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 14/00 (2006.01) A61K 47/65 (2017.01)
A61K 47/64 (2017.01) C07K 7/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/031670
- (22) 国際出願日: 2019年8月9日(09.08.2019)
- (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 2018-180130 2018年9月26日(26.09.2018) JP
- (71) 出願人: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 松田 優佳 (MATSUDA, Yuka); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 北寛士 (KITA, Hiroshi); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 高津慶士 (TAKATSU, Keishi); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 馬渡達也 (MOUTAI, Tatsuya); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 北野光昭 (KITANO, Mitsuaki); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アスフィ国際特許事務所 (USFI PATENT ATTORNEYS INTERNATIONAL OFFICE); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番16号 フジタ東洋紡ビル9階 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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).

(54) Title: CELL-PENETRATING PEPTIDE

(54) 発明の名称: 細胞膜透過性ペプチド

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a novel cell-penetrating peptide which has excellent cell membrane permeability. A cell-penetrating peptide according to the present invention or salt thereof is characterized by having a sequence represented by formula (I) or (II). (I): X-(A-B-C)_l-(D)_m-(Arg)_n (II): X-(Arg)_n-(D)_m-(A-B-C)_l (In the formulae, X represents a biologically active peptide; A, B and C represent aliphatic amino acids; D represents an arbitrary amino acid; l represents an integer of from 1 to 4 (inclusive); m represents an integer of from 0 to 5 (inclusive); if l is 1, n is an integer of 8 or more; if l is 2, n is an integer of 6 or more; if l is 3, n is an integer of 4 or more; and if l is 4, n is an integer of 4 or more.)

(57) 要約: 本発明は、細胞膜透過性に優れた新規細胞膜透過性ペプチドを提供することを目的とする。本発明に係る細胞膜透過性ペプチドまたはその塩は、下記式 (I) または (II) で表される配列を有することを特徴とする。X-(A-B-C)_l-(D)_m-(Arg)_n・・・(I) X-(Arg)_n-(D)_m-(A-B-C)_l・・・(II) [式中、Xは生理活性ペプチドであり、A、BおよびCは脂脂肪族アミノ酸であり、Dは任意のアミノ酸であり、lは、1以上、4以下の整数であり、mは、0以上、5以下の整数であり、lが1のとき、nは8以上の整数であり、lが2のとき、nは6以上の整数であり、lが3のとき、nは4以上の整数であり、lが4のとき、nは4以上の整数である。]



WO 2020/066343 A1

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)）

明 細 書

発明の名称：細胞膜透過性ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、細胞膜透過性に優れた細胞膜透過性ペプチドに関するものである。

背景技術

[0002] 近年、特定のタンパク質や遺伝子を標的として攻撃する分子標的薬が注目を集めており、細胞内タンパク質-タンパク質相互作用（PPI）は魅力的な創薬ターゲットの一つである。しかし、タンパク質間の相互作用面は広く、親水性が高いため、既存の低分子がPPIを阻害することは難しい。それに対して、ペプチド等の中分子はPPIを阻害することが可能であるが、その多くは細胞膜透過性を持たない。

[0003] ペプチドを細胞内に送達する方法として、細胞膜透過性ペプチド（CPPs）をカーゴ分子に結合させて細胞膜透過性を付与する方法が知られている。既存のCPPsとしては、HIV-1ウイルス由来のTATペプチド（特許文献1）、シヨウジヨウバエのAntennapediaのホメオドメインに由来するペネトラチンの改変型（特許文献2）、オリゴアルギニン（非特許文献1～3）などが知られており、その他、非特許文献4にも様々なCPPsが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開平10-33186号公報
特許文献2：特表2002-530059号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Futaki, S. ら, J. Biol. Chem., 2001, 276, pp. 5836-5840
非特許文献2：Dana Maria Copolovici ら, ACS N

ano, 2014, 8, p. 1972

非特許文献3: James R. Maioloら, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1712 (2005), pp. 161-172

非特許文献4: Paul A. Wenderら, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97 (24) 8, pp. 13003-13008

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 上述したように、細胞膜透過性ペプチドは種々知られているが、実際に臨床に適用されているものは少なく、より優れた新規細胞膜透過性ペプチドが模索されている。

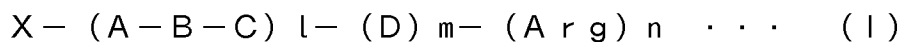
そこで本発明は、細胞膜透過性に優れた新規細胞膜透過性ペプチドを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた。その結果、優れた細胞膜透過性能を有するペプチドを見出し、細胞内に送達すべき生理活性ペプチドにかかるペプチドを結合させることにより、生理活性ペプチドを細胞内へ効率的に送達することが可能になることを見出して、本発明を完成した。

以下、本発明を示す。

[0008] [1] 下記式(1)または式(11)で表される配列を有することを特徴とする細胞膜透過性ペプチドまたはその塩。



[式中、

Xは生理活性ペプチドであり、

A、BおよびCは、独立して、アラニン、2-メチルアラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから選択される脂肪族アミノ酸であり、

Dは任意のアミノ酸であり、
lは、1以上、4以下の整数であり、
mは、0以上、5以下の整数であり、
lが1のとき、nは8以上の整数であり、
lが2のとき、nは6以上の整数であり、
lが3のとき、nは4以上の整数であり、
lが4のとき、nは4以上の整数である。]

[0009] [2] AおよびBがロイシンである上記[1]に記載の細胞膜透過性ペプチドまたはその塩。

[0010] [3] Dがグリシンである上記[1]または[2]に記載の細胞膜透過性ペプチドまたはその塩。

[0011] [4] Cが2-メチルアラニンである上記[1]～[3]のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチド。

[0012] [5] 生理活性ペプチドが環状化されたものである上記[1]～[4]のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチドまたはその塩。

[0013] [6] C末端がアミド化されている上記[1]～[5]のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチド。

発明の効果

[0014] 本発明に係る細胞膜透過性ペプチドは、優れた細胞膜透過性能を有することから、生理活性物質を細胞内へ効率的に送達することができる。よって本発明に係る細胞膜透過性ペプチドは、優れた分子標的薬となり得ることから、産業上非常に優れている。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、様々なペプチドコンジュゲートの細胞膜透過性試験によって得られた蛍光強度比の対数値を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明に係る細胞膜透過性ペプチドに含まれる生理活性ペプチドは、細胞内へ送達すべきものであり、細胞内で何らかの生理的作用を示すものであれ

ば特に制限されない。かかる生理活性ペプチドは、細胞内に送達されるべきものであることから、生理活性ペプチドを構成するアミノ酸残基数としては、4以上、20以下が好ましい。生理活性ペプチドの中には、アミノ酸残基数が4であっても生理活性を示すものがある。また、当該アミノ酸残基数が20以下であれば、より確実に細胞内に送達され得る。当該アミノ酸残基数としては、5以上、15以下がより好ましい。

[0017] 生理活性ペプチドは、細胞膜透過促進ペプチド、即ち $(A-B-C)_l - (D)_m - (Arg)_n$ または $(Arg)_n - (D)_m - (A-B-C)_l$ と結合するためのリンカーを有していてもよい。リンカーは、アミノ酸残基やペプチドの他、一般的なリンカー基であってもよい。かかるリンカー基としては、例えば、特に制限されるものではないが、 C_{1-6} アルキレン基、アミノ基 ($-NH-$)、イミノ基 ($>C=N-$ または $-N=C<$)、エーテル基 ($-O-$)、チオエーテル基 ($-S-$)、カルボニル基 ($-C(=O)-$)、チオニル基 ($-C(=S)-$)、エステル基 ($-C(=O)-O-$ または $-O-C(=O)-$)、アミド基 ($-C(=O)-NH-$ または $-NH-C(=O)-$)、スルホキシド基 ($-S(=O)-$)、スルホニル基 ($-S(=O)_2-$)、スルホニルアミド基 ($-NH-S(=O)_2-$ および $-S(=O)_2-NH-$)、並びにこれら基が2以上結合して形成された基を挙げることができる。上記基が2以上結合してリンカー基を形成する場合の結合数としては、10以下または5以下が好ましく、3以下がより好ましい。上記基が2以上結合して形成されたリンカー基としては、例えば、アミノ基、イミノ基、エーテル基、チオエーテル基、カルボニル基、チオニル基、エステル基、アミド基、スルホキシド基、スルホニル基、および／またはスルホニルアミド基を一端または両端に有する C_{1-6} アルキレン基を挙げることができる。また、リンカーがペプチドである場合、リンカーを形成するアミノ酸残基数としては1以上、20以下が好ましい。また、当該リンカーペプチドは、生理活性ペプチドの活性に影響を与えないものであることが好ましい。リンカーペプチドとしては、GSリンカーやGGSリンカーを挙げることができる。GGSリン

カーは、G G S 配列が1回以上、6回以下程度繰り返される配列からなる。一方、G S リンカーは、G G G S 配列が1回以上、6回以下程度、特に3回繰り返される配列である。

[0018] 生理活性ペプチドは、可能であれば環状化してもよい。環状化により生体内においてプロテアーゼなどによる攻撃を受け難くなり安定化する他、細胞膜透過性がより一層向上する可能性もある。環状化には、生理活性ペプチドに含まれるアミノ酸残基の側鎖反応性基を利用すればよい。側鎖反応性基としては、例えば、S e r や T h r の水酸基、C y s のチオール基、A s p や G l u のカルボキシ基、L y s のアミノ基を挙げることができる。

[0019] 生理活性ペプチドの環状化のための架橋化合物としては、上記側鎖反応性基と反応する反応性基を複数有する化合物を用いればよい。反応性基の数としては2が好ましい。当該反応性基としては、カルボキシ基、活性エステル基、酸クロライド基、酸ブロマイド基、ハロゲノ基、エポキシ基、水酸基、アミノ基などを挙げることができる。環状化の際には、反応を促進するために塩基や縮合剤などを添加してもよい。

[0020] 架橋化合物における複数の反応性基を連結するリンカー基としては、生理活性ペプチドとN-末端側部とを結合するための上記リンカー基と同様のものを挙げることができる。当該リンカー基の長さは、環状化に利用するアミノ酸残基間の残基数や、所望の環の大きさなどにより適宜調整すればよい。

[0021] 生理活性ペプチドを架橋するための架橋化合物としては、例えば、以下の化合物を挙げることができる。

[0022]

。本発明においては、[A r g] 単位に加えて少なくとも [A - B - C] 単位を用いることにより、[A r g] 単位単独の場合に比べて細胞膜透過性を顕著に改善している。[A r g] 単位の数、即ち n は、[A - B - C] 単位の数にもよるが、4 以上である。[A - B - C] 単位との関係で、[A - B - C] 単位が少ないほど [A r g] 単位は多いことが好ましい。具体的には、[A - B - C] 単位の数である l が 1 のとき n としては 8 以上の整数が好ましく、 l が 2 のとき n としては 6 以上の整数が好ましく、 l が 3 または 4 のとき n としては 4 以上の整数が好ましい。[A r g] 単位の数の上限は特に制限されないが、例えば 16 以下とすることができ、14 以下または 12 以下が好ましく、10 以下がより好ましい。

[0026] 細胞膜透過促進ペプチドにおいて [A - B - C] 単位は、細胞膜透過性にとり極めて重要な単位である。本発明者らの実験的知見によれば、オリゴアルギニンに [A - B - C] 単位を 1 つ加えたのみでも、細胞膜透過性は顕著に向上する。その理由は必ずしも明らかではないが、[L e u - L e u - A i b] の繰り返し配列はヘリックス構造をとることが知られているため、当該単位の二次構造が細胞膜透過性の向上に寄与している可能性がある。[A - B - C] 単位の数、即ち l は、1 以上、4 以下である。本発明者らによる実験的知見によれば、[A - B - C] 単位が無い場合には、ペプチドの細胞膜透過性能は全く十分ではない。一方、[A - B - C] 単位が過剰であると、ペプチドの水溶性が低下して取扱い難くなる可能性があり得るため、 l としては 4 以下がより好ましい。

[0027] 細胞膜透過促進ペプチドにおいて [D] 単位は、主に [A r g] 単位と [A - B - C] 単位を結合するリンカーの役割を有する。D は任意のアミノ酸であり、例えば、G l y ; A l a ; V a l、L e u、I l e の分枝アミノ酸 ; S e r、T h r のヒドロキシアミノ酸 ; C y s、M e t の含硫アミノ酸 ; A s n、G l n の酸アミドアミノ酸 ; P r o ; P h e、T h r、T r p の芳香族アミノ酸 ; A s p、G l u の酸性アミノ酸 ; L y s、A r g、H i s の塩基性アミノ酸を挙げることができ、G l y、A l a、分枝アミノ酸、ヒド

ロキシアミノ酸、含硫アミノ酸、酸アミドアミノ酸から選択される中性アミノ酸が好ましく、G l y、A l a、V a l、L e u、およびI l eから選択されるアミノ酸がより好ましく、G l yがより更に好ましい。[D] 単位の数、即ちmは、0以上、5以下である。mとしては1以上が好ましく、2以上がより好ましく、また、4以下が好ましく、3以下がより好ましい。

[0028] 本発明に係る細胞膜透過性ペプチドにおいては、 $(A-B-C)_m$ の位置と $(A r g)_n$ の位置は、互いに入れ替わっていてもよいが、式(1)で表される配列がより好ましい。

[0029] 本発明に係る細胞膜透過性ペプチドは、式(1)または式(11)で表される配列を有する限り、例えば、N末端またはC末端に別のペプチドが結合していてもよい。末端に付加される別のペプチドは、本発明ペプチドの細胞膜透過性を阻害しない限り特に制限されないが、例えば、そのアミノ酸残基数としては1以上、10以下が好ましく、5以下がより好ましい。本発明に係る細胞膜透過性ペプチドの配列は、式(1)または式(11)で表される配列のみからなることが好ましく、式(1)で表される配列のみからなることがより好ましい。

[0030] 本発明に係る細胞膜透過性ペプチドのN末端またはC末端は、化学的に修飾されていてもよい。例えば、C末端は $-COOH$ または $-COO^-$ であってもよいし、アミド化($-CONH_2$)、アルキルアミド化($-CONHR$)、またはエステル化($-COOR$)されていてもよく、また、N末端は $-NH_2$ または $-NH_3^+$ であってもよいし、アシル化($-NHCOR$)されていてもよい。Rは、 C_{1-6} アルキル基を示す。特に、C末端はアミド化することが好ましい。C末端をアミド化することで、エキソプロテアーゼに対する分解耐性が向上したり、また、ペプチド合成時における分子内縮合反応や分子間縮合反応を抑制できる。

[0031] 「 C_{1-6} アルキル基」は、炭素数1以上、6以下の直鎖状または分枝鎖状の一価飽和脂肪族炭化水素基をいう。例えば、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、*s*-ブチル、*t*-ブチル、*n*-ペ

ンチル、*n*-ヘキシル等である。好ましくはC₁₋₄アルキル基であり、より好ましくはC₁₋₂アルキル基であり、最も好ましくはメチルである。

[0032] 本発明に係る細胞膜透過性ペプチドは、塩の形態であってもよい。かかる塩は、薬学上許容されるものが好ましい。かかる塩を構成するカウンターカチオンとしては、例えば、金属イオン、アンモニウムイオン (NH₄⁺)、有機塩基イオン、塩基性アミノ酸イオンを挙げることができ、カウンターアニオンとしては、例えば、無機酸イオン、有機酸イオン、および酸性アミノ酸イオンを挙げることができる。

[0033] 金属塩を構成する金属イオンとしては、例えば、リチウムイオン、ナトリウムイオン、カリウムイオンなどのアルカリ金属イオン；カルシウムイオン、バリウムイオンなどのアルカリ土類金属イオン；マグネシウムイオンなどが挙げられる。有機塩基塩を構成する有機塩基としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-ピリジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンが挙げられる。塩基性アミノ酸塩を構成する塩基性アミノ酸としては、リシン、アルギニン、ヒスチジンが挙げられる。

[0034] 無機酸塩を構成する無機酸としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などが挙げられる。有機酸塩を構成する有機酸としては、例えば、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などが挙げられる。酸性アミノ酸塩を構成する酸性アミノ酸としては、アスパラギン酸とグルタミン酸が挙げられる。

[0035] 本発明に係る細胞膜透過性ペプチドは常法により製造することができるが、総アミノ酸残基数が比較的少ないため、例えば固相合成法により製造することができる。具体的には、細胞膜透過性ペプチドのアミノ酸配列をデザインした後、固体樹脂にアミノ基と必要に応じて側鎖反応性基が保護されたC

末端アミノ酸残基を結合し、以後、アミノ基の脱保護と次のアミノ酸残基の結合を繰り返し、最後にペプチドの固体樹脂からの切り離しと脱保護を行う。また、各反応の後には洗浄を行う。

[0036] 生理活性ペプチドを環状化する場合には、ペプチドが固体樹脂に結合された状態で環状化してもよいし、ペプチドを固体樹脂から切り離してから環状化してもよいが、製造工程数がより少ないことからペプチドを固体樹脂から切り離してから生理活性ペプチドを環状化することが好ましい。なお、細胞膜透過促進ペプチドは、側鎖に反応性基を有さないアミノ酸残基で構成されているため、原則として架橋化合物により生理活性ペプチドが環状化されると考えられる。

[0037] 本発明に係る細胞膜透過性ペプチドにより、生理活性ペプチドが細胞膜を透過して細胞内まで送達されるため、副作用が比較的少なく且つ生理活性ペプチドの作用効果が効果的に発揮されると考えられる。本発明の細胞膜透過性ペプチドはペプチドであることから、注射投与されることが好ましい。

[0038] 本発明の細胞膜透過性ペプチドを含む注射剤の溶媒としては、水が好ましい。更に、本発明ペプチドの水溶性によっては、エタノール、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどの水混和性有機溶媒を含んでいてもよい。その他、塩化ナトリウムなどの塩、緩衝成分、防腐剤などの添加成分を含んでいてもよい。勿論ではあるが、注射剤は等張液または略等張液である必要がある。

[0039] 本発明に係る細胞膜透過性ペプチドの投与量は、投与されるべき患者の重篤度、年齢、性別、体重、症状などにより適宜調整すればよい。例えば、投与量を 0.001 mg/kg/day 以上、 100 mg/kg/day 以下、好ましくは 0.005 mg/kg/day 以上、 50 mg/kg/day 以下の範囲で調整することができる。

[0040] 本願は、2018年9月26日に出願された日本国特許出願第2018-180130号に基づく優先権の利益を主張するものである。2018年9月26日に出願された日本国特許出願第2018-180130号の明細書

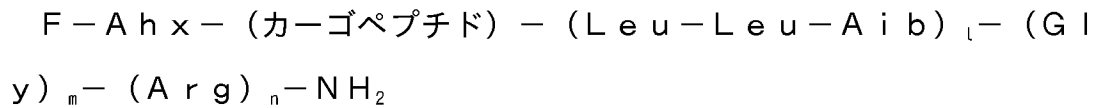
の全内容が、本願に参考のため援用される。

実施例

[0041] 以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はもとより下記実施例によって制限を受けるものではなく、前・後記の趣旨に適合し得る範囲で適当に変更を加えて実施することも勿論可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に包含される。

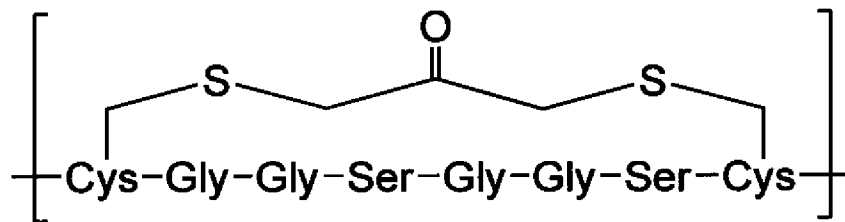
[0042] 実施例 1～9, 比較例 1～6: ペプチドコンジュゲートの合成

マイクロウェーブを用いた固相合成法により、Rink Amide樹脂 (0.2 mmol/g) 上で、以下の配列を有するペプチドコンジュゲートのペプチド鎖部分を合成した。



[式中、Fは蛍光基であるフルオロセイン含有基を示し、Ahxは6-アミノヘキサン酸を示し、Aibは2-アミノイソ酪酸(2-メチルアラニン)を示し、カーゴペプチドは以下の構造を有する。]

[0043] [化2]



[0044]

[表1]

	配列番号	l	m	n
比較例1	1	0	0	0
比較例2	2	0	0	8
実施例1	3	3	3	9
実施例2	4	3	3	6
実施例3	5	1	3	9
比較例3	6	1	3	6
比較例4	7	1	3	3
実施例4	8	4	3	9
実施例5	9	1	0	9
比較例5	10	1	3	7
比較例6	11	2	3	5
実施例6	12	2	3	6
実施例7	13	3	3	5

[0045] 実施例8（配列番号14）： $F-Ahx-(\text{カーゴペプチド})-(Arg)_9-(Gly)_3-(Leu-Leu-Aib)-NH_2$

実施例9（配列番号15）： $F-Ahx-(\text{カーゴペプチド})-(Leu-Leu-Ala)-(Gly)_3-(Arg)_9-NH_2$

ペプチドを形成した樹脂を、トリフルオロ酢酸（TFA）／水／トリイソプロピルシラン（TIS）／3，6-ジオキサ-1，8-オクタンジチオール（DODT）＝92.5／2.5／2.5／2.5（容量比）の混合溶液に3時間浸漬し、ペプチドを樹脂から切り出した。

得られたペプチドをN，N-ジメチルホルムアミド（DMF）と水の混合溶媒に溶解し、1，3-ジブromoアセトン（1.5当量）とN，N-ジイソプロピルエチルアミン（3.0当量）で1時間処理することにより、カーゴペプチドを環状化した。

ペプチドを反応溶液から逆相HPLCにより精製し、凍結乾燥した。次いで、DMF中でフルオレセインイソチオシアネート（FITC，1.5当量）とN，N-ジイソプロピルエチルアミン（3.0当量）で4時間処理してN末端を蛍光標識した後、逆相HPLCにより精製することにより、実施例1～9および比較例1～6のペプチドコンジュゲートを合成した。

[0046] 試験例1：細胞膜透過能評価

HeLa細胞 (Human cervix adenocarcinoma cell) を、実施例1～9または比較例1～6のペプチドコンジュゲート2 μ Mを含む培養液中、37°Cで2時間培養した。次いで、細胞を回収し、ヨウ化プロピジウム溶液で染色後、フローサイトメーターで蛍光強度を測定し、下記式によって比較例2に対する蛍光強度比を算出した。結果を図1と表2に示す。

$$\text{蛍光強度比} = (F_n - F_1) / (F_2 - F_1)$$

F_n : 被検化合物の蛍光強度最頻値

F_1 : 比較例1の被検化合物の蛍光強度最頻値

F_2 : 比較例2の被検化合物の蛍光強度最頻値

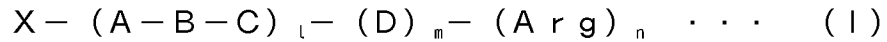
[0047] [表2]

	蛍光強度比		蛍光強度比
実施例1	2.05	比較例2	1.00
実施例2	1.72	比較例3	0.45
実施例3	3.73	比較例4	0.00
実施例4	4.00	比較例5	1.00
実施例5	3.63	比較例6	0.81
実施例6	1.14		
実施例7	2.92		
実施例8	2.74		
実施例9	3.34		

[0048] 図1と表2に示される結果の通り、培養2時間後の比較例2に対する蛍光強度を比較した結果、本発明に係る実施例1～9のペプチドコンジュゲートは、従来、細胞膜透過性を有するとされている [A r g] 単位鎖を有する一方で [L e u - L e u - A i b] 単位を有さない比較例2よりも、細胞膜透過性能に優れることが実証された。

請求の範囲

[請求項1] 下記式 (I) または式 (II) で表される配列を有することを特徴とする細胞膜透過性ペプチドまたはその塩。



[式中、

Xは生理活性ペプチドであり、

A、BおよびCは、独立して、アラニン、2-メチルアラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから選択される脂肪族アミノ酸であり、

Dは任意のアミノ酸であり、

lは、1以上、4以下の整数であり、

mは、0以上、5以下の整数であり、

lが1のとき、nは8以上の整数であり、

lが2のとき、nは6以上の整数であり、

lが3のとき、nは4以上の整数であり、

lが4のとき、nは4以上の整数である。]

[請求項2] AおよびBがロイシンである請求項1に記載の細胞膜透過性ペプチドまたはその塩。

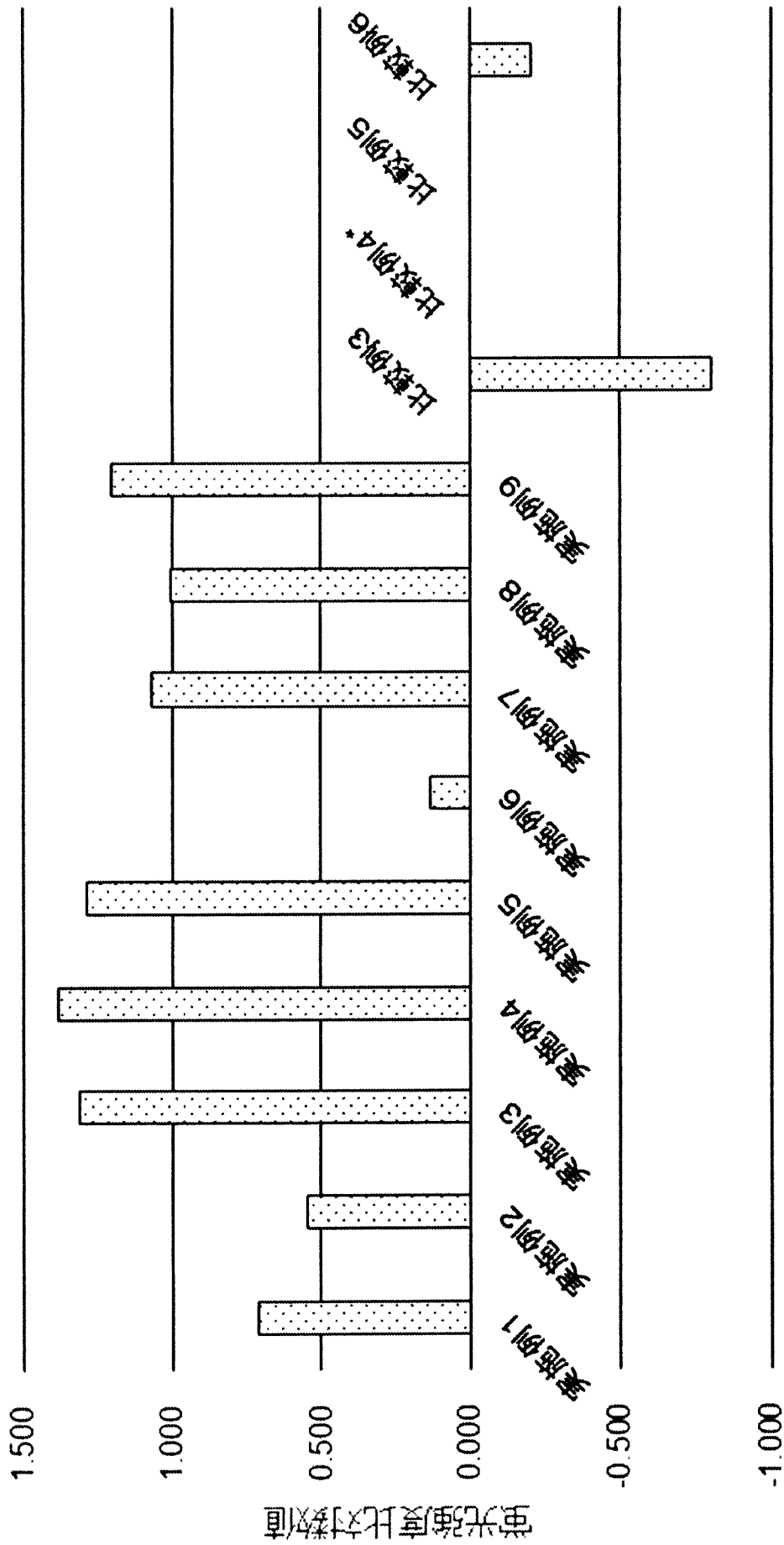
[請求項3] Dがグリシンである請求項1または2に記載の細胞膜透過性ペプチドまたはその塩。

[請求項4] Cが2-メチルアラニンである請求項1～3のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチド。

[請求項5] 生理活性ペプチドが環状化されたものである請求項1～4のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチドまたはその塩。

[請求項6] C末端がアミド化されている請求項1～5のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチド。

[図1]



*比較例4の蛍光強度は比較例1と同値

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/031670

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. C07K14/00 (2006.01) i, A61K47/64 (2017.01) i, A61K47/65 (2017.01) i, C07K7/08 (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. C07K14/00, A61K47/64, A61K47/65, C07K7/08 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 1971-2019 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MISAWA, T. et al., Development of helix-stabilized amphipathic cell-penetrating peptides for siRNA delivery, Journal of Peptide Science, 35th European Peptide Symposium, 31 August 2018, vol. 24, supplement 2, p. S169, abstract, no. P247, whole document	1-6
Y	三澤隆史ほか, 親水性分子を細胞内導入を志向した膜透過生ペプチドの開発, 日本薬学会第137年会要旨集, 05 March 2017, abstract, no. 26U-am13, whole document, (MISAWA, Takashi et al., Abstracts of the 137th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan in Sendai), non-official translation (Development of transmembrane biopeptides intended for intracellular introduction of hydrophilic molecules)	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 17.10.2019		Date of mailing of the international search report 29.10.2019
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/JP2019/031670

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-531988 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 15 August 2013, claims 8-9 & US 2013/0164219 A1, claims 8-9 & WO 2011/157713 A2 & EP 2394665 A1 & CN 103096932 A	1-6
Y	JP 2015-522264 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 06 August 2015, claim 5, paragraph [0003] & US 2015/0183827 A1, claim 5, paragraph [0003] & WO 2014/001229 A2 & EP 2864348 A2 & CN 104428310 A	1-6
Y	JP 2006-514602 A (CEPEP AB) 11 May 2006, claim 51, paragraphs [0046], [0057], SEQ ID NO.: 14228 & US 2008/0234183 A1, claim 51, paragraphs [0049], [0060], SEQ ID NO.: 14228 & WO 2003/106491 A2 & EP 1516184 A2	1-6
P, X	JP 2019-118307 A (JAPAN HEALTH SCIENCES FOUNDATION) 22 July 2019, claim 1, paragraph [0023] (Family: none)	1-6
A	OOKUBO, N. et al., The transdermal inhibition of melanogenesis by a cell-membrane-permeable peptide delivery system based on poly-arginine, Biomaterials, 2014, vol. 35, pp. 4508-4516	1-6
A	PARK, J. H. et al., Amphiphilic peptide carrier for the combined delivery of curcumin and plasmid DNA into the lungs, Biomaterials, 2012, vol. 33, pp. 6542-6550	1-6
A	JP 2006-169242 A (KOBE UNIVERSITY) 29 June 2006 & WO 2006/054773 A1	1-6
A	WO 2011/020188 A1 (UNIVERSITY OF WATERLOO) 24 February 2011 (Family: none)	1-6
A	WO 2015/069586 A1 (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 14 May 2015 & WO 2015/069586 A2 & EP 3065783 A1	1-6
P, A	CN 109517071 A (UNIV HUAZHONG SCIENCE TECH) 26 March 2019, claim 1, SEQ ID NO.: 5 (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/00(2006.01)i, A61K47/64(2017.01)i, A61K47/65(2017.01)i, C07K7/08(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. C07K14/00, A61K47/64, A61K47/65, C07K7/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2019年 日本国実用新案登録公報 1996-2019年 日本国登録実用新案公報 1994-2019年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq, PubMed			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	MISAWA T et al., Development of Helix-Stabilized Amphipathic Cell-Penetrating Peptides for siRNA Delivery, Journal of Peptide Science, 35th European Peptide Symposium, 2018.08.31, Vol.24, Supplement 2, p.S169 Abstract No.P247, 文献全体	1-6	
Y	三澤隆史ほか, 親水性分子を細胞内導入を志向した膜透過生ペプチドの開発, 日本薬学会第137年会要旨集, 2017.03.05, Abstract No.26U-am13, 文献全体	1-6	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 17.10.2019		国際調査報告の発送日 29.10.2019	
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) 伊藤 良子	4 B 3 6 4 4
		電話番号 03-3581-1101 内線	3 4 4 8

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
Y	JP 2013-531988 A (エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー) 2013.08.15, 請求項 8-9 & US 2013/0164219 A1, Claims 8-9 & WO 2011/157713 A2 & EP 2394665 A1 & CN 103096932 A	1-6
Y	JP 2015-522264 A (エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー) 2015.08.06, 請求項 5, [0003] & US 2015/0183827 A1, Claim 5, [0003] & WO 2014/001229 A2 & EP 2864348 A2 & CN 104428310 A	1-6
Y	JP 2006-514602 A (シーイービーイービー エービー) 2006.05.11, 請求項 51, [0046], [0057], 配列番号 14228 & US 2008/0234183 A1, Claim 51, [0049], [0060], SEQ. ID. NO. 14228 & WO 2003/106491 A2 & EP 1516184 A2	1-6
P, X	JP 2019-118307 A (公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2019.07.22, 請求項 1, [0023] (ファミリーなし)	1-6
A	OOKUBO N et al., The transdermal inhibition of melanogenesis by a cell-membrane-permeable peptide delivery system based on poly-arginine, Biomaterials, 2014, Vol. 35, p. 4508-4516	1-6
A	PARK J H et al., Amphiphilic peptide carrier for the combined delivery of curcumin and plasmid DNA into the lungs, Biomaterials, 2012, Vol. 33, p. 6542-6550	1-6
A	JP 2006-169242 A (国立大学法人神戸大学) 2006.06.29, & WO 2006/054773 A1	1-6
A	WO 2011/020188 A1 (UNIVERSITY OF WATERLOO) 2011.02.24, (ファミリーなし)	1-6
A	WO 2015/069586 A1 (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 2015.05.14, & WO 2015/069586 A2 & EP 3065783 A1	1-6
P, A	CN 109517071 A (華中科技大学) 2019.03.26, 請求項 1, SEQ ID NO:5 (ファミリーなし)	1-6