

(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



(10) 国際公開番号

WO 2011/074578 A1

(43) 国際公開日

2011年6月23日(23.06.2011)

PCT

- (51) 国際特許分類:
C07K 7/06 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/072485
- (22) 国際出願日: 2010年12月14日(14.12.2010)
- (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 2009-283091 2009年12月14日(14.12.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市中央区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 原島 秀吉 (HARASHIMA Hideyoshi). 藤原 孝博 (FUJIWARA Takahiro). 秋田 英万 (AKITA Hidetaka).
- (74) 代理人: 佐川 慎悟, 外 (SAGAWA Shingo et al.); 〒0600042 北海道札幌市中央区大通西5丁目1

1番1号 電通恒産札幌ビル3階 佐川慎悟
国際特許事務所 Hokkaido (JP).

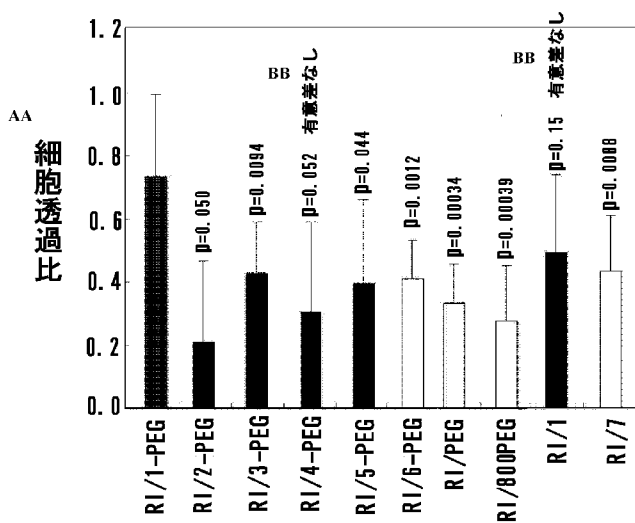
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: PEPTIDES IMPARTING CELL PERMEABILITY TO LIPID MEMBRANE STRUCTURE AND/OR ENHANCING CELL PERMEABILITY OF LIPID MEMBRANE STRUCTURE, AND LIPID MEMBRANE STRUCTURE COMPRISING LIPID BOUND TO SUCH PEPTIDE AS CONSTITUENT LIPID AND HAVING CELL PERMEABILITY OR SHOWING ENHANCED CELL PERMEABILITY

(54) 発明の名称: 脂質膜構造体に細胞透過能を付与および/または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチド、ならびにそれらペプチドと結合した脂質を構成脂質として含む、細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体

[図1]



AA CELL PERMEATION RATIO
BB NO SIGNIFICANT DIFFERENCE

(57) Abstract: Provided are peptides imparting cell permeability to a lipid membrane structure and/or enhancing the cell permeability of a lipid membrane structure, and a lipid membrane structure which comprises, as a constituent lipid, a lipid bound to such a peptide and has cell permeability or shows enhanced cell permeability. The amino acid sequences of the peptides imparting cell permeability to a lipid membrane structure and/or enhancing the cell permeability of a lipid membrane structure are represented by: $LX_1X_2X_1X_1X_1L$, $LLX_2X_1X_1X_1L$ and $LX_1X_2X_1X_1L$ (wherein L represents a leucine residue; X_1 represents a polar amino acid residue; and X_2 represents a polar, non-charged and branched chain amino acid residue).

(57) 要約: 【課題】 脂質膜構造体に細胞透過能を付与および/または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチド、ならびにそれらペプチドと結合した脂質を構成脂質として含む、細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体を提供する。

【解決手段】 脂質膜構造体に細胞透過能を付与および/または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドのアミノ酸配列が下記 $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ (式中、Lはロイシン残基を、 X_1 は極性アミノ酸残基を、 X_2

は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。)である。

WO 2011/074578 A1

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 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：

脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチド、ならびにそれらペプチドと結合した脂質を構成脂質として含む、細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体

技術分野

[0001] 本発明は、脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチド、ならびにそれらペプチドと結合した脂質を構成脂質として含む、細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体に関する。

背景技術

[0002] タンパク質、薬剤、あるいは核酸などの物質を、生物個体の標的部位に確実に送達するためのベクターやキャリアーの開発が盛んに行われている。例えば、目的の遺伝子を標的細胞へ導入するためのベクターとして、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルスなどのウイルスベクターが開発されている。しかしながら、ウイルスベクターは、大量生産の困難性、抗原性、毒性などの問題があるため、このような問題点が少ないリポソームベクターに代表される脂質膜構造体やペプチドキャリアーが注目を集めている。

[0003] リポソームベクターは、人工的に調製される脂質二重膜を基本構成とする脂質膜構造体であり、様々な物質を内包して標的細胞内に送り込む能力を有している。リポソームベクターは、その表面に抗体、タンパク質、糖鎖などの機能性分子を導入することにより、標的部位に対する指向性を向上させることができるという利点の他、物質が内包されるために生体内の分解作用や代謝作用から保護されるという利点や、標的以外の部位で物質が作用を奏すること（副作用）を防止するという利点を有している。

[0004] 一方、タンパク質や薬剤、核酸などの物質を内包した脂質膜構造体、あるいはタンパク質や薬剤、核酸などと結合したペプチドキャリアーなどの高分子化合物を血中に投与する場合、血中から標的部位への到達が大きな課題となる。血管内皮細胞は多くの組織において細胞間に密着結合を形成しており、血管内皮細胞間の間隙は約0.4 nmから約4 nmと極めて狭いため、血中に投与された高分子化合物が、この間隙を通過して標的部位へ到達することは困難である。

[0005] そこで、密着結合を形成した血管内皮細胞層を超えて標的部位へ到達する脂質膜構造体やペプチドキャリアーが研究開発されており、例えば、アルブミン、アルブミン結合タンパク質であるGP60あるいは抗GP60抗体から選択される、上皮細胞におけるトランスサイトーシスを促進するペプチド（特許文献1）、エンドサイトーシスレセプターであるメガリンの結合部分からなる、血液脳関門におけるトランスサイトーシスを促進するペプチド（特許文献2）、密着結合形成タンパク質であるオクルディンの合成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドと、脂質膜構造体あるいはペプチドキャリアーとを共投与する方法（特許文献3）などが開発されている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特表平11-512451号公報
特許文献2：特表2007-526227号公報
特許文献3：特表2001-517436号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、特許文献1および特許文献2に記載されたトランスサイトーシスを促進するそれぞれのペプチドは、いずれも薬剤に直接結合するペプチドキャリアーであり、細胞透過能を有する脂質膜構造体を提供するものではない。また、特許文献3に記載された方法は、密着結合の崩壊に伴い、目

的物質以外の血管内容物が漏出する虞がある。

[0008] 本発明は、このような問題点を解決するためになされたものであって、脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチド、ならびにそれらペプチドと結合した脂質を構成脂質として含む、細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体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

[0009] 本発明者らは、鋭意研究の結果、アミノ酸配列が下記 $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ （式中、 L はロイシン残基を、 X_1 は極性アミノ酸残基を、 X_2 は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。）であるペプチドが、上皮細胞において脂質膜構造体に細胞透過能を付与することや脂質膜構造体の細胞透過能を増強することを見出し、下記の各発明を完成した。

[0010] (1) アミノ酸配列が $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ （式中、 L はロイシン残基を、 X_1 は極性アミノ酸残基を、 X_2 は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。）である、脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチド。

[0011] (2) 極性無電荷側鎖アミノ酸残基 X_2 が Q （ Q はグルタミン残基を表す。）である、(1)に記載のペプチド。

[0012] (3) 極性アミノ酸残基 X_1 が R 、 K 、 S および D （ R はアルギニン残基を、 K はリシン残基を、 S はセリン残基を、 D はアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。）からなる群より選択される同じまたは異なるアミノ酸残基である、(1)または(2)に記載のペプチド。

[0013] (4) アミノ酸配列が $LRQRRL$ 、 $LLQRRL$ 、 $LRQRRL$ 、 $LKQKKL$ 、 $LLQKKL$ （配列番号38）、 $LKQKKL$ （配列番号39）、 $LRQSSL$ 、 $LLQSSL$ （配列番号40）、 $LRQSSL$ （配列番号41）、 $LRQRDDL$ 、 $LLQRDDL$ （配列番号42）また

はLRQRDL（配列番号43）（式中、Lはロイシン残基を、Rはアルギニン残基を、Qはグルタミン残基を、Kはリシン残基を、Sはセリン残基を、Dはアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。）である、（1）から（3）のいずれかに記載のペプチド。

[0014]（5）細胞が上皮細胞である、（1）から（4）のいずれかに記載のペプチド。

[0015]（6）脂質ラフトに存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンを介して細胞に取り込まれる、（1）から（5）のいずれかに記載のペプチド。

[0016]（7）（1）から（6）のいずれかに記載のペプチドと結合した脂質を構成脂質として含む、細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体。

[0017]（8）ペプチドと結合した脂質が、ペプチドのC末端にチロシン残基、システイン残基、親水性ポリマーおよび脂質がこの順で結合してなるペプチドと結合した脂質である、（7）に記載の脂質膜構造体。

[0018]（9）親水性ポリマーがポリエチレングリコールである、（8）に記載の脂質膜構造体。

[0019]（10）構成脂質総量に占めるペプチドが結合した脂質の割合Pが $1\text{mol}\% \leq P \leq 10\text{mol}\%$ である、（7）から（9）のいずれかに記載の脂質膜構造体。

[0020]（11）細胞が上皮細胞である、（7）から（10）のいずれかに記載の脂質膜構造体。

[0021]（12）脂質ラフトに存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンを介して細胞に取り込まれる、（7）から（11）のいずれかに記載の脂質膜構造体。

[0022]（13）アミノ酸配列が $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ （式中、Lはロイシン残基を、 X_1 は極性アミノ酸残基を、 X_2 は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。）であるペプチドを有効成分とする、脂質膜構造体に対する細胞透過能付与および／または細胞透過能増強剤。

- [0023] (14) 極性無電荷側鎖アミノ酸残基 X_2 が Q (Q はグルタミン残基を表す。) である、(13) に記載の細胞透過能付与および/または細胞透過能増強剤。
- [0024] (15) 極性アミノ酸残基 X_1 が R、K、S および D (R はアルギニン残基を、K はリシン残基を、S はセリン残基を、D はアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。) からなる群より選択される同じまたは異なるアミノ酸残基である、(13) または (14) に記載の細胞透過能付与および/または細胞透過能増強剤。
- [0025] (16) アミノ酸配列が LRQRRL、LLQRRL、LRQRRL、LKQKKKL、LLQKKKL、LKQKKL、LRQSSL、LLQSSL、LRQSSL、LRQRDDL、LLQRDDL または LRQRDL (式中、L はロイシン残基を、R はアルギニン残基を、Q はグルタミン残基を、K はリシン残基を、S はセリン残基を、D はアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。) である、(13) から (15) のいずれかに記載の細胞透過能付与および/または細胞透過能増強剤。
- [0026] (17) 細胞が上皮細胞である、(13) から (16) のいずれかに記載の細胞透過能付与および/または細胞透過能増強剤。
- [0027] (18) ペプチドが脂質ラフトに存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンを通じて細胞に取り込まれるペプチドである、(13) から (17) のいずれかに記載の細胞透過能付与および/または細胞透過能増強剤。
- [0028] (19) 細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体を製造する方法であって、アミノ酸配列が $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ (式中、L はロイシン残基を、 X_1 は極性アミノ酸残基を、 X_2 は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。) であるペプチドで脂質膜構造体を修飾する工程を有する前記方法。
- [0029] (20) 極性無電荷側鎖アミノ酸残基 X_2 が Q (Q はグルタミン残基を表す。) である、(19) に記載の方法。
- [0030] (21) 極性アミノ酸残基 X_1 が R、K、S および D (R はアルギニン残基を

、Kはリシン残基を、Sはセリン残基を、Dはアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。)からなる群より選択される同じまたは異なるアミノ酸残基である、(19)または(20)に記載の方法。

[0031] (22) アミノ酸配列がLRQRRRL、LLQRRRL、LRQRRL、LKQKKKL、LLQKKKL、LKQKKL、LRQSSSL、LLQSSSL、LRQSSL、LRQRDDL、LLQRDDLまたはLRQRDL(式中、Lはロイシン残基を、Rはアルギニン残基を、Qはグルタミン残基を、Kはリシン残基を、Sはセリン残基を、Dはアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。)である、(19)から(21)のいずれかに記載の方法。

[0032] (23) ペプチドで脂質膜構造体を修飾する工程が、ペプチドのC末端にチロシン残基、システイン残基、親水性ポリマーおよび脂質をこの順で結合させることによりペプチドで脂質膜構造体を修飾する工程である、(19)から(22)のいずれかに記載の方法。

[0033] (24) 細胞が上皮細胞である、(19)から(23)のいずれかに記載の方法。

[0034] (25) ペプチドが脂質ラフトに存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンを紹介して細胞に取り込まれるペプチドである、(19)から(24)に記載の方法。

発明の効果

[0035] 本発明のペプチドを結合することにより、あるいは本発明の細胞透過能付与および/または細胞透過能増強剤を用いることにより、脂質膜構造体に対して優れた細胞透過能を付与することや脂質膜構造体の細胞透過能を増強することができる。また、本発明のペプチドを結合した脂質を構成脂質として含む脂質膜構造体は、細胞を透過して標的部位へ到達し、内包物を放出することができることから、標的部位において高い薬効が得られ、かつ安全性が高く、大量生産が容易な優れた薬物ベクターとして利用することができる。

図面の簡単な説明

[0036] [図1] PEGを介してペプチドを修飾したリポソーム (RI/1-PEG、RI/2-PEG、RI/3-PEG、RI/4-PEG、RI/5-PEG、RI/6-PEG)、PEGを修飾したリポソーム (RI/PEG、RI/800PEG) およびペプチドを修飾したリポソーム (RI/1、RI/7) の細胞透過比を示す図である。図中、白抜きで示されたRI/6-PEG、RI-PEG、RI/800PEGおよびRI/7は比較例であることを示す。

[図2] PEGを介してペプチド1を修飾したリポソーム (RI/1-PEG) および、PEGを介さずにペプチド1を修飾したリポソーム (RI/1) の細胞内取り込み比を示す図である。

[図3] Filipin IIIを添加しない場合と比較した、Filipin IIIを添加することにより脂質ラフトの機能を阻害した場合の、RI/1-PEGの細胞透過比割合を示す図である。

[図4] Filipin IIIを添加しない場合と比較した、Filipin IIIを添加することにより脂質ラフトの機能を阻害した場合の、RI/1-PEGおよびRI/1の細胞内取り込み比割合を示す図である。

[図5] RI/1-PEGの細胞透過比を100 (%)とした場合の、RI/8-PEG、RI/9-PEG、RI/10-PEG、RI/11-PEG、RI/12-PEGおよびRI/13-PEGの細胞透過比割合を示す図である。

[図6] RI/1-PEGの細胞透過比を100 (%)とした場合の、RI/14-PEG、RI/15-PEG、RI/16-PEGおよびRI/17-PEGの細胞透過比割合を示す図である。

[図7] RI/1-PEGの細胞透過比を100 (%)とした場合の、RI/18-PEGおよびRI/19-PEGの細胞透過比割合を示す図である。

[図8] RI/1-PEGの細胞透過比を100 (%)とした場合の、RI/20-PEGおよびRI/21-PEGの細胞透過比割合を示す図である。

[図9] RI/1-PEGの細胞透過比を100 (%)とした場合の、RI/2

2-PEGおよびRI/23-PEGの細胞透過比割合を示す図である。

[図10] RI/1-PEGの細胞透過比を100(%)とした場合の、RI/24-PEGおよびRI/25-PEGの細胞透過比割合を示す図である。

[図11] RI/1-PEGの細胞透過比を100(%)とした場合の、RI/26-PEGおよびRI/27-PEGの細胞透過比割合を示す図である。

[図12] RI/1-PEGの細胞透過比を100(%)とした場合の、RI/28-PEG、RI/29-PEG、RI/30-PEG、RI/31-PEGおよびRI/32-PEGの細胞透過比割合を示す図である。

[図13] RI/1-PEGの細胞透過比を100(%)とした場合の、RI/33-PEG、RI/34-PEG、RI/35-PEG、RI/36-PEGおよびRI/37-PEGの細胞透過比割合を示す図である。

[図14] 修飾脂質1の割合を1%、5%または10%としたRI/1-PEGの細胞透過比を示す図である。

[図15] ヘパリン処理を行わないRI/1-PEG、RI/DOTAP/DOPEおよびRI/7のそれぞれの細胞内取り込み比を100(%)とした場合の、ヘパリン処理を行ったRI/1-PEG、RI/DOTAP/DOPEおよびRI/7の細胞内取り込み比割合を示す図である。

[図16] ヘパリン処理を行ったRhο/1-PEGおよびRhο/DOTAP/DOPEと、ヘパリン処理を行わないRhο/1-PEGおよびRhο/DOTAP/DOPEとの、細胞内取り込み状態を蛍光観察した結果を示す図である。

[図17] MBEC4細胞における、Rhο/1-PEG、初期エンドソーム、後期エンドソームおよびリソソームの細胞内局在を蛍光観察した結果を示す図である。

[図18] CHO-K1細胞における、Rhο/1-PEG、初期エンドソーム、後期エンドソームおよびリソソームの細胞内局在を蛍光観察した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0037] 以下、本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチド、ならびにそれらペプチドと結合した脂質を構成脂質として含む、細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体について詳細に説明する。
- [0038] 本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドは、リポソームに代表される脂質膜構造体に細胞を透過することができる機能（細胞透過能）を付与し、あるいはリポソームに代表される脂質膜構造体の細胞透過能を増強する。すなわち、本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドは、細胞透過能を有さない脂質膜構造体に対しては細胞透過能を付与し、あるいは細胞透過能を付与するとともにその細胞透過能を増強し、細胞透過能を有する脂質膜構造体に対しては細胞透過能を増強する。
- [0039] ここで、本発明において「細胞透過」とは、細胞膜のある特定の区域から細胞内に取り込まれた物質が、その区域とは異なる、細胞膜のある特定の区域から細胞外へ放出されることをいい、例えば、トランスサイトーシスを代表的な例として挙げることができる。トランスサイトーシスは、血管内皮細胞や胎児小腸上皮細胞などの上皮細胞において、主として行われており、例えば、血管内皮細胞では、細胞外受容体に結合したアルブミンなどの特定の物質がエンドサイトーシスによって管内腔（血液側）から取り込まれた後、エキソサイトーシスによって管外腔（血管周囲の組織）へ放出される。また、胎児小腸上皮細胞では、母体由来の I g G がエンドサイトーシスによって母体の血液から取り込まれた後、エキソサイトーシスによって胎児血液へ放出される。
- [0040] 本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドは、アミノ酸配列が $L X_1 X_2 X_1 X_1 X_1 L$ 、 $L L X_2 X_1 X_1 X_1 L$ または $L X_1 X_2 X_1 X_1 L$ （式中、Lはロイシン残基を、 X_1 は極性アミノ酸残基を、 X_2 は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞ

れ表す。)である。

- [0041] 本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および/または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドのアミノ酸配列 $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ において、 X_1 は極性アミノ酸残基を表す。極性アミノ酸は、グリシン (G)、アスパラギン (N)、システイン (C)、グルタミン (Q)、セリン (S)、トレオニン (T)、チロシン (Y)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、アルギニン (R)、ヒスチジン (H) およびリシン (K) のいずれでもよいが、アルギニン (R)、リシン (K)、セリン (S) およびアスパラギン酸 (D) が好ましい。 X_1 で示される 4 アミノ酸残基または 3 アミノ酸残基は、これらの群から選択される、異なる 2~4 種類または 2、3 種類のアミノ酸残基であってもよく、また、同じアミノ酸残基であってもよい。
- [0042] また、本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および/または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドのアミノ酸配列 $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ において、 X_2 は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を表す。極性無電荷側鎖アミノ酸は、グリシン (G)、アスパラギン (N)、システイン (C)、グルタミン (Q)、セリン (S)、トレオニン (T) およびチロシン (Y) のいずれでもよいが、グルタミン (Q) が好ましい。
- [0043] 本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および/または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドの、より好ましいアミノ酸配列は、LRQRRRL (配列番号 1)、LLQRRRL (配列番号 14)、LRQRRRL (配列番号 26)、LKQKKKL (配列番号 15)、LLQKKKL (配列番号 38)、LKQKKL (配列番号 39)、LRQSSSL (配列番号 35)、LLQSSSL (配列番号 40)、LRQSSL (配列番号 41)、LRQRDDL (配列番号 37)、LLQRDDL (配列番号 42) または LRQRDL (配列番号 43) (式中、L はロイシン残基を、R はアルギニン残基を、Q はグルタミン残基を、K はリシン残基を、S はセリン残基

を、Dはアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。)である。

[0044] なお、本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドは、 $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ （式中、Lはロイシン残基を、 X_1 は極性アミノ酸残基を、 X_2 は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。）のアミノ酸配列からなるが、本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドには、脂質膜構造体に細胞透過能を付与、脂質膜構造体の細胞透過能を増強、もしくは脂質膜構造体に細胞透過能を付与するとともにその細胞透過能を増強する機能を有する限り、これらアミノ酸配列の1または複数の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなるペプチドが包含される。

[0045] 本発明において、保存的アミノ酸置換とは、生じる分子の生理学的活性を変化させることなく一般的になされ得る範囲、すなわち保存的置換の範囲で認められるもの（Watson et al., Molecular Biology of Geneなど）であり、例えば、アスパラギン酸およびグルタミン酸の酸性アミノ酸；リシン、アルギニンおよびヒスチジンの塩基性アミノ酸；アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファンの非極性アミノ酸；グリシン、アスパラギン、システイン、グルタミン、セリン、トレオニンおよびチロシンの極性無電荷側鎖アミノ酸；フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンの芳香族アミノ酸といった側鎖に類似性のあるアミノ酸同士（アミノ酸のファミリー内部）で起こる置換を挙げることができる。同様に、アスパラギン酸およびグルタミン酸の酸性アミノ酸；リシン、アルギニンおよびヒスチジンの塩基性アミノ酸、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリンおよびトレオニンの脂肪族アミノ酸（セリンおよびトレオニンの脂肪族-ヒドロキシアミノ酸と分類することもできる）；フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンの芳香族アミノ酸；アスパラギンおよびグルタミンのアミド）；システインおよびメチオニンの含硫アミノ酸とい

った分類をすることができる。

[0046] また、本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドには、脂質膜構造体に細胞透過能を付与、脂質膜構造体の細胞透過能を増強、もしくは脂質膜構造体に細胞透過能を付与するとともにその細胞透過能を増強する機能を有する限り、1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、上述した保存的アミノ酸置換を除く置換、挿入および／または付加されたペプチドが包含される。欠失に関する具体的範囲は、通常1～3個、好ましくは1～2個、より好ましくは1個であり、保存的アミノ酸置換を除く置換に関する具体的範囲は、通常1～3個、好ましくは1～2個、より好ましくは1個であり、挿入に関する具体的範囲は、通常1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個であり、付加に関する具体的範囲は、通常1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個である。

[0047] 例えば、後述するように、本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドを脂質膜構造体に結合させる際に、 $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ （式中、Lはロイシン残基を、 X_1 は極性アミノ酸残基を、 X_2 は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。）のアミノ酸配列のC末端側にチロシン残基およびシステイン残基を付加するなど、脂質膜構造体に細胞透過能を付与する機能、脂質膜構造体の細胞透過能を増強する機能、もしくは脂質膜構造体に細胞透過能を付与するとともにその細胞透過能を増強する機能を保持しつつ、脂質膜構造体に結合させるために1個もしくは数個のアミノ酸を付加する場合があるが、係るペプチドも依然として本発明のペプチドに含まれる。

[0048] 本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドは、その配列を基にして、当業者によって適宜選択可能な方法を用いて合成することができる。そのような方法としては、例えば、アミノ酸1つ1つを化学的に重合してポリペプチドを合成す

るペプチド合成法その他、本発明におけるペプチドをコードするDNAを含む組換えベクターを作製し、作製したベクターを適切な宿主細胞中に導入して得られる形質転換体を培地にて培養し、得られた培養物から採取する方法や、本発明におけるペプチドをコードするDNAを無細胞タンパク質合成系で発現させて得る方法などを挙げることができる。なお、いずれの合成法も、当業者により広く知られている一般的な方法その他、あらゆる方法を利用することができる。

[0049] 本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドは、特に、上皮細胞において、細胞透過能を脂質膜構造体に付与、脂質膜構造体の細胞透過能を増強、もしくは上皮細胞における細胞透過能を脂質膜構造体に付与するとともにその細胞透過能を増強する。ここで、上皮細胞とは、組織の表面において二次元的な層状構造を採ることにより上皮を形成する細胞であり、細胞間において密着結合を形成し、拡散や浸透による物質の通過を抑制する傍ら、トランスサイトーシスなどにより選択的に物質を細胞透過させる機能を有する。上皮細胞としては、例えば、上述した血管内皮細胞や胎児小腸上皮細胞その他、リンパ管内皮細胞、漿膜中皮細胞、尿管上皮細胞、腎盂上皮細胞、気道上皮細胞、気管上皮細胞、気管枝上皮細胞、消化管上皮細胞、表皮細胞、鼻腔上皮細胞、咽頭上皮細胞などを挙げることができる。なお、本実施例においては、血管内皮細胞が好適な上皮細胞として用いられている。

[0050] 本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドが結合することにより、細胞透過能が付与および／または増強された脂質膜構造体は、透過しない細胞においてはリソソームに移行して分解される。すなわち、本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドが結合することにより細胞透過能が付与および／または増強された脂質膜構造体に、薬剤やタンパク質、核酸などを内包させて血中投与することにより、その脂質膜構造体は、血管内皮細胞を透過して標的部位の細胞に到達し

た後、標的部位の細胞内で内包した物質を放出することから、薬剤送達ベクターとしての機能を適切に発揮することができる。

[0051] 本発明のペプチドが結合して細胞透過能が付与および／または増強された脂質膜構造体は、主として、脂質ラフトに存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンを通じて細胞内に取り込まれ、細胞を透過する。脂質ラフトは細胞膜上のマイクロドメインの一つであり、スフィンゴ脂質、糖脂質、コレステロール、受容体タンパク質、あるいは糖タンパク質（例えばヘパラン硫酸プロテオグリカンなど）などの分子が集合している、直径約100nm程度の領域である。これら集合した特有の分子の働きにより、脂質ラフトはシグナル伝達や物質輸送の窓口として機能している。

[0052] 本発明に係る細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体は、上述した本発明に係るペプチドと結合した脂質を構成脂質として含んでいる。脂質膜構造体の細胞透過能を確認する方法としては、例えば、細胞に密着結合を形成させ、これに脂質膜構造体を添加し、その透過率を算出する方法を挙げることができる。また、例えば、細胞透過性評価装置（特願2009-275877号）を用いる場合は、細胞が培養されていない場合の透過率（無細胞リポソーム透過率）と、密着結合を形成した細胞が培養されている場合の透過率（有細胞リポソーム透過率）とを算出し、その比（細胞透過比）を算出することにより、脂質膜構造体の細胞透過能を確認することができる。

[0053] 本発明において、脂質膜構造体の好ましい形態は、脂質二重層膜構造を有する閉鎖小胞であり、そのような脂質膜構造体としては、例えば、多重膜リポソーム（MLV）の他、SUV（small unilamella vesicle）、LUV（large unilamella vesicle）、GUV（giant unilamella vesicle）などのも一枚膜リポソームを挙げることができる。また、本発明において脂質膜構造体のサイズは特に限定されるものではないが、直径50nm～800nmであることが好ましく、直径80～150nmであることがより好ましい。

[0054] 本発明における脂質膜構造体を構成する脂質の種類は特に限定されるものではないが、リン脂質、糖脂質、ステロール、長鎖脂肪族アルコールあるいはグリセリン脂肪酸エステルが好ましく、カチオン性脂質、中性脂質、アニオン性脂質のいずれであるかも問わない。

[0055] リン脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン（例えば、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジラウロイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリンなど）、ホスファチジルグリセロール（例えば、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジラウロイルホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロールなど）、ホスファチジルエタノールアミン（例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（D S P E）、ジオレオイルグリセロフォスフォエタノールアミン（D O P E）など）、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、カルジオリピン、またはこれらの水素添加物、卵黄、大豆その他の動植物に由来する天然脂質（例えば、卵黄レシチン、大豆レシチンなど）などを挙げることができ、これらのうちの1種または2種以上を用いることができる。前記リン脂質は、脂質膜構造体の主要な構成成分として用いられる。その使用量は、脂質膜構造体の総脂質に対する量として10～100%（モル比）であることが好ましく、50～80%（モル比）であることがさらに好ましいが、これらの値に特に限定されるものではない。

[0056] 糖脂質としては、スフィンゴミエリン、スルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリドなどのグリセロ糖脂質、ガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシドなどのスフィンゴ

糖脂質などを挙げることができ、これらの1種または2種以上を用いることができる。

[0057] ステロールとしては、コレステロール、コレステロールコハク酸、ラノステロール、ジヒドロラノステロール、デスモステロール、ジヒドロコレステロールなどの動物由来のステロール、スチグマステロール、シトステロール、カンペステロール、ブラシカステロールなどの植物由来のステロール（フィトステロール）、チモステロール、エルゴステロールなどの微生物由来のステロールなどを挙げることができ、これらの1種または2種以上を用いることができる。これらのステロールは、一般には脂質二重層を物理的または化学的に安定させたり、膜の流動性を調節したりするために用いることができる。その使用量は、脂質膜構造体の総脂質に対する量として5～40%（モル比）であることが好ましく、10～30%（モル比）であることがさらに好ましいが、これらの値に特に限定されるものでない。

[0058] 長鎖脂肪酸または長鎖脂肪族アルコールとしては、炭素数10～20の脂肪酸またはそのアルコールを使用することができる。そのような長鎖脂肪酸または長鎖脂肪族アルコールとしては、例えば、パルミチン酸、ステアリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、アラキジン酸、マルガリン酸、ツベルクロステアリン酸などの飽和脂肪酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、アラキドン酸、バクセン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エレオステアリン酸などの不飽和脂肪酸、オレイルアルコール、ステアリルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール、リノリルアルコールなどを挙げることができ、これらの1種または2種以上を用いることができる。その使用量は、脂質膜構造体の総脂質に対する量として5～40%（モル比）であることが好ましく、10～30%（モル比）であることがさらに好ましいが、これらの値に特に限定されるものでない。

[0059] グリセリン脂肪酸エステルとしては、モノアシルグリセリド、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリドを挙げることができ、これらの1種または

2種以上を用いることができる。その使用量は、脂質膜構造体の総脂質に対する量として5～40%（モル比）であることが好ましく、10～30%（モル比）であることがさらに好ましいが、これらの値に特に限定されるものでない。

[0060] カチオン性脂質としては、上述した脂質の他、例えば、ジオクタデシルジメチルアンモニウムクロライド（dioctadecyldimethylammonium chloride、DODAC）、N-（2,3-オレイロキシ）プロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウム（N-（2,3-dioleyloxy）propyl-N,N,N-trimethylammonium、DOTMA）、ジドデシルアンモニウムブロミド（didodecylammonium bromide、DDAB）、1,2-ジオレイロキシ-3-トリメチルアンモニウムプロパン（1,2-dioleyloxy-3-trimethylammonio propane、DOTAP）、3 β -N-（N',N'-ジメチルアミノエタン）カルバモールコレステロール（3 β -N-（N',N',-dimethyl-aminoethane）-carbamol cholesterol、DC-Chol）、1,2-ジミリストイルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウム（1,2-dimyristoyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethyl ammonium、DMRIE）、2,3-ジオレイロキシ-N- [2（スペルミンカルボキサミド）エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアンモニウムトリフルオロアセテート（2,3-dioleyloxy-N- [2（spermincarboxamido）ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminum trifluoroacetate、DOSPA）などを挙げることができ、これらの1種または2種以上を用いることができる。なお、カチオン性脂質は細胞毒性を有するので、本発明のリポソームの細胞毒性を低減させる点からは、脂質二重層に含まれるカチオン性脂質の量を出来る限り少なくすることが好ましく、脂質二重層を構成する総脂

質に対するカチオン性脂質の割合は0～40%（モル比）であることが好ましく、0～20%（モル比）であることがさらに好ましい。

[0061] また、中性脂質としては、上述した脂質の他、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミドなどを挙げることができ、これらの1種または2種以上を用いることができる。また、アニオン性脂質としては、上述した脂質の他、例えば、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン（N-スクシニルPE）、ホスファチジルエチレングリコールなどを挙げることができ、これらの1種または2種以上を用いることができる。

[0062] 本発明に係る細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体を構成する脂質膜は、本発明に係るペプチドと結合した脂質を複数種類含んでいてもよい。例えば、本発明に係るペプチドと結合したリン脂質と本発明に係るペプチドと結合した別のリン脂質、本発明に係るペプチドと結合したリン脂質と本発明に係るペプチドと結合したステロール、本発明に係るペプチドと結合したリン脂質と本発明に係るペプチドと結合した糖脂質など、任意に選択することができる。

[0063] 本発明において、脂質膜構造体の脂質膜には、上述した脂質の他に、トコフェロール、没食子酸プロピル、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシトルエンなどの抗酸化剤、ステアリルアミン、オレイルアミンなどの正荷電を付与する荷電物質、ジセチルホスフェートなどの負荷電を付与する荷電物質、膜表在性タンパク質、膜内在性タンパク質などの膜タンパク質を含有させることができ、その含有量は適宜調節することができる。

[0064] また、本発明に係る細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体の好ましい態様は、本発明に係るペプチドのC末端に、チロシン残基、システイン残基および親水性ポリマーおよび脂質がこの順で結合してなるペプチドと結合した脂質を構成脂質として含む脂質膜構造体である。具体的には、本発明に係るペプチドが、そのC末端側に付加したシステイン残

基を介してマレイミド化された親水性ポリマーの一部に結合し、さらにこの親水性ポリマーがリポソームの構成成分、特に脂質と結合した構造を有する脂質膜構造体である。

[0065] なお、本発明において「ペプチドと結合した脂質」という場合は、ペプチドが脂質に直接結合したもののみならず、ペプチドが、他のアミノ酸残基や親水性ポリマーなどの何らかのリンカーを介して脂質に結合したものも包含する。本発明において、好ましいリンカーとしては、例えば、チロシン残基、システイン残基および親水性ポリマーがこの順に結合してなる高分子化合物や親水性ポリマーを挙げることができる。

[0066] 親水性ポリマーと本発明に係るペプチドとは、親水性ポリマーが有する官能基と、本発明に係るペプチドが有する官能基との間に共有結合を形成させて結合させることができる。一般的に、共有結合を形成できる官能基の組み合わせとしては、例えば、アミノ基／カルボキシル基、アミノ基／ハロゲン化アシル基、アミノ基／N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基、アミノ基／ベンゾトリアゾールカーボネート基、アミノ基／アルデヒド基、チオール基／マレイミド基、チオール基／ビニルスルホン基などを挙げることができるが、本発明に係るペプチドの場合には、3以上の極性アミノ酸残基（極性無電荷側鎖アミノ酸残基を含む）を含むペプチドであることから、本発明に係るペプチドにチオール基を有するアミノ酸残基を新たに付加させ、このチオール基を用いて親水性ポリマーと結合させることが好ましい。

[0067] チオール基を有するペプチド、あるいはシステインなどのチオール基を有するアミノ酸残基を付加させたペプチドを、チオール基を介して親水性ポリマーに結合させる方法、ならびにこの様な親水性ポリマーと脂質との結合は、Luら（J. Controlled release、2006年、第110巻、第505-513頁）によって報告されている。本発明のリポソームは、このLuらの方法を利用して調製することができるが、かかる方法には限定されない。チオール基を有するアミノ酸残基の付加は、本発明に係るペプチドのN末端側、C末端側のいずれでもよい。また、本発明に係るペプチ

ドのN末端あるいはC末端以外の部分にチオール基を有するアミノ酸残基を挿入してもよい。

[0068] 脂質は一般にカルボニル基、アミノ基または水酸基などの化学的に活性化可能な官能基を有しており、これらの適当な官能基と本発明に係るペプチドが有する官能基、本発明に係るペプチドに付加されたアミノ酸が有する官能基、あるいは前記ペプチドと結合した親水性ポリマーの有する官能基との間の化学反応によって、上述した調製法その他、本発明に係るペプチドと結合した脂質を調製することができる。例えば、脂質がホスファチジルエタノールアミン（PE）であり、これに前記高分子化合物を介して本発明に係るペプチドを結合させる場合には、Martinらの方法（*Biochem. Biophys. Acta*, 1992年、第1113巻、第171-199頁）が知られている。すなわち、前記ペプチドと結合した親水性ポリマーの水酸基をカルボン酸に変換し、そのカルボキシル基とPEのアミノ基との間で縮合反応を行うことで、本発明に係るペプチドと結合したPEを調製することができる。

[0069] 上述した高分子化合物を介して本発明に係るペプチドと結合したステロール類を作製する方法としては、Bhattacharyaらの報告（*Langmuir*, 2001年、第17巻、第2067-2075頁）が知られている。すなわち、ステロール類が有する水酸基をトシル基などで活性化し、上述のペプチドと結合した親水性ポリマーの水酸基によるSN2反応を有機溶媒中で用いることで、本発明に係るペプチドと結合したステロール類を調製することができる。

[0070] さらに、上述した高分子化合物を介して本発明に係るペプチドと結合した長鎖脂肪酸を調製する方法としては、上述のペプチドと結合した親水性ポリマーにアミノ基を導入し、このアミノ基と長鎖脂肪酸のカルボキシル基との間で縮合反応を行うことで、本発明に係るペプチドと結合した長鎖脂肪酸を調製することができる。

[0071] 本発明において用いることができる親水性ポリマーは、上述した高分子化

合物を構成でき、この高分子化合物を介して、本発明に係るペプチドと脂質とが結合でき、細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体を構成することができるものであれば特に限定されない。そのような親水性ポリマーとしては、例えば、ヒドロキシ基、カルボキシル基、カルボキシレート基、ヒドロキシエチル基、ポリオキシエチル基、ヒドロキシプロピル基、ポリオキシプロピル基、アミノ基、アミノエチル基、アミノプロピル基、アンモニウム基、アミド基、カルボキシメチル基、スルホン酸基、リン酸基などの親水性基を有するものを挙げることができ、具体的には、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、デンプン誘導体、カルボキシメチルセルロースおよびそのナトリウム塩、セルロースアセテート、アルギン酸ナトリウム、酢酸ビニルマレイン酸コポリマー類、スチレンマレイン酸コポリマー類、ポリアクリル酸類およびそれらの塩、ポリメタクリル酸類およびそれらの塩、ヒドロキシエチルメタクリレートのホモポリマーおよびコポリマー、ヒドロキシエチルアクリレートのホモポリマーおよびコポリマー、ヒドロキシプロピルメタクリレートのホモポリマーおよびコポリマー、ヒドロキシプロピルアクリレートのホモポリマーおよびコポリマー、ヒドロキシブチルメタクリレートのホモポリマーおよびコポリマー、ヒドロキシブチルアクリレートのホモポリマーおよびコポリマー、ポリエチレングリコール類、ヒドロキシプロピレンポリマー類、ポリビニルアルコール類、加水分解度が60モル%以上、好ましくは80モル%以上である加水分解ポリビニルアセテート、ポリビニルホルマール、ポリビニルブチラール、ポリビニルピロリドン、アクリルアミドのホモポリマーおよびコポリマー、メタクリルアミドのホモポリマーおよびポリマー、N-メチロールアクリルアミドのホモポリマーおよびコポリマー、アルコール可溶性ナイロン、2,2-ビス-(4-ヒドロキシフェニル)プロパンとエピクロロヒドリンとのポリエーテルなどを挙げることができるが、ポリエチレングリコールが好ましい。

[0072] また、本発明に係る細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体における、本発明に係るペプチドと結合した脂質の占める割合P

は、脂質膜を構成する脂質の総量を100(%)とした場合、 $1\text{mol}\% \leq P \leq 10\text{mol}\%$ が好ましい。

[0073] 本発明において、脂質膜構造体は、例えば、水和法、超音波処理法、エタノール注入法、エーテル注入法、逆相蒸発法、界面活性剤法、凍結・融解法などの公知の方法を用いて作製することができる。例えば水和法の場合、本発明に係るペプチドと結合した脂質、さらにはその他の脂質や先に記載した脂質膜に含まれる任意成分を有機溶剤に溶解した後、有機溶剤を蒸発除去することにより脂質膜を得た後、脂質膜を水和させ、攪拌または超音波処理することにより、本発明に係るペプチドと結合した脂質を膜の構成成分として含む脂質膜構造体を製造することができる。

[0074] なお、本発明に係る細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体は、上述した脂質やその他の脂質を有機溶剤に溶解した後、有機溶剤を蒸発除去することにより脂質膜を得、この脂質膜を水和させ、攪拌または超音波処理することによりリポソームを製造し、次いで、このリポソームの外液に本発明に係るペプチドを添加することにより、リポソームの表面にこれらのペプチドを導入することもできる。

[0075] 上述した方法において、有機溶媒として、例えば、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、シクロヘキサンなどの炭化水素類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、ベンゼン、トルエンなどの芳香族炭化水素類、メタノール、エタノールなどの低級アルコール類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類などを、単独でまたは2種以上を組み合わせて使用することができる。

[0076] また、所定のポアサイズのフィルターを通過させることにより、一定の粒度分布を持った脂質膜構造体を得ることができる。

[0077] 本発明の脂質膜構造体には、薬剤、核酸、ペプチド、タンパク質、糖またはこれらの複合体などの種々の生理活性物質を封入することができ、診断、治療などの目的に応じて適宜選択することができる。生理活性物質が水溶性である場合には、脂質膜構造体の製造にあたり脂質膜を水和する際に使用さ

れる水性溶媒に生理活性物質を添加することにより、脂質膜構造体内部の水相に生理活性物質を封入することができる。また、生理活性物質が脂溶性である場合には、脂質膜構造体の製造にあたり使用される有機溶剤に生理活性物質を添加することにより、脂質膜構造体の膜に生理活性物質を封入することができる。

[0078] 本発明において、脂質膜構造体は、生理食塩水、リン酸緩衝液、クエン緩衝液、酢酸緩衝液などの適当な水性溶媒に分散させて使用することができる。分散液には、糖類、多価アルコール、水溶性高分子、非イオン界面活性剤、抗酸化剤、pH調節剤、水和促進剤などの添加剤を適宜添加してもよい。また、本発明において脂質膜構造体は、前記の分散液を乾燥させた状態で保存することができる。さらに、本発明において、脂質膜構造体は、経口投与することができる他、静脈、腹腔内、皮下、経鼻などへの非経口投与も可能である。

[0079] 次に、本発明は、脂質膜構造体に対する細胞透過能付与および／または細胞透過能増強剤を提供する。本発明に係る脂質膜構造体に対する細胞透過能付与および／または細胞透過能増強剤は、アミノ酸配列がL X 1 X 2 X 1 X 1 X 1 L、L L X 2 X 1 X 1 X 1 LまたはL X 1 X 2 X 1 X 1 L（式中、Lはロイシン残基を、X 1は極性アミノ酸残基を、X 2は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。）であるペプチドを有効成分とする。すなわち、本発明に係る脂質膜構造体に対する細胞透過能付与および／または細胞透過能増強剤は、本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドを有効成分とする。

[0080] また、本発明は、細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体を製造する方法を提供する。本発明に係る細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体を製造する方法は、下記（a）の工程を有する；

（a）アミノ酸配列がL X 1 X 2 X 1 X 1 X 1 L、L L X 2 X 1 X 1 X 1 LまたはL X 1 X 2 X 1 X 1 L（式中、Lはロイシン残基を、X 1は極性アミ

ノ酸残基を、X2は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。)であるペプチドで脂質膜構造体を修飾する工程。

[0081] 工程(a)において、アミノ酸配列がLX1X2X1X1X1L、LLX2X1X1X1LまたはLX1X2X1X1L(式中、Lはロイシン残基を、X1は極性アミノ酸残基を、X2は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。)であるペプチドは、上述の本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および/または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチドと同様のものを用いることができる。また、工程(a)において、脂質膜構造体は、本発明に係る細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体に用いることのできる脂質膜構造体と同様のものを用いることができる。

[0082] 工程(a)において、ペプチドで脂質膜構造体を修飾する方法は特に限定されず、当業者が適宜選択可能な手法を用いて行うことができる。そのような方法としては、例えば、脂質膜構造体を調製した後にペプチドを添加し、その脂質膜構造体の構成脂質にペプチドを結合させる方法の他、ペプチドを先ず脂質分子に結合させた後、このペプチド結合脂質分子を構成脂質とする脂質膜構造体を調製する方法を挙げることができる。さらに、ペプチドと脂質膜構造体の構成脂質とは、直接結合させてもよく、上述したリンカーを介して結合させてもよい。なお、ペプチドを脂質分子に結合する方法、脂質膜構造体を調製する方法、脂質膜にペプチドを添加してその脂質膜構造体の構成脂質にペプチドを結合させる方法については、上述の通りである。

[0083] ペプチドと脂質膜構造体との結合様式としては、例えば、水素結合、イオン結合、疎水結合、ファンデルワールス結合などの非共有結合や、ジスルフィド結合、ペプチド結合などの共有結合を挙げることができる。

[0084] 以下、本発明に係る脂質膜構造体に細胞透過能を付与および/または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチド、ならびにそれらペプチドと結合した脂質を構成脂質として含む、細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体について、実施例に基づいて説明する。なお、本発明

の技術的範囲は、これらの実施例によって示される特徴に限定されない。

実施例

[0085] <実施例 1> 実験材料の調製

(1) Krebs 緩衝液の調製

滅菌水を溶媒として、以下の組成の Krebs 緩衝液 (pH 7.3) を調製した。

[0086] Krebs 緩衝液の組成

KCl (和光純薬工業社)	4.8 mmol/L
KH ₂ PO ₄ (和光純薬工業社)	1.0 mmol/L
MgSO ₄ (和光純薬工業社)	1.2 mmol/L
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) (和光純薬工業社)	12.5 mmol/L
CaCl ₂ (和光純薬工業社)	1.5 mmol/L
NaCl (ナカライテスク社)	120.0 mmol/L
NaHCO ₃ (和光純薬工業社)	23.8 mmol/L
グルコース (和光純薬工業社)	5.0 mmol/L

[0087] (2) in vivo フェージディスプレイによるペプチドの選択

特開 2008-31142 号に記載の方法に従って、in vivo フェージディスプレイを行って筋肉組織に集積するペプチドとして得られた中から、細胞透過能を付与する、あるいは細胞透過能を増強させるペプチドの候補として下記のペプチドを選択した。

[0088] ペプチド 1; LRQRRRL (配列番号 1)

ペプチド 2; RKRI RMR (配列番号 2)

ペプチド 3; RRRRQNI (配列番号 3)

ペプチド 4; RKRSRMR (配列番号 4)

ペプチド 5; IRQRRRR (配列番号 5)

(式中、向かって左端が N 末端を、向かって右端が C 末端を、L はロイシン

残基を、Rはアルギニン残基を、Qはグルタミン残基を、Kはリシン残基を、Iはイソロイシン残基を、Mはメチオニン残基を、Nはアスパラギン残基を、Sはセリン残基を、それぞれ表す。以下同じ。)

[0089] (3) ペプチド-PEG修飾脂質の調製

本実施例(1)で選択したペプチド、およびリポソームに一定の細胞内移行能を付与することが知られているペプチドであるR8 (RRRRRRRRR; 配列番号6) (小暮健太郎、YAKUGAKU ZASSHI、第127巻、第10号、第1685-1691頁、2007年)のC末にチロシン(Y)およびシステイン(C)を付加したアミノ酸配列からなるペプチドを、北海道システムサイエンス社に化学合成を委託することにより作製した。これらのペプチドと、maleimide基が付加された分子量2000のポリエチレングリコール(以下、単に「PEG」という場合がある。)およびL- α -distearoyl phosphatidylethanolamine(DSPE)の結合体であるMal-PEG2000-DSP(製品名: DSPE-020MA、日本油脂社)とを、それぞれ2mmol/Lとなるように純水中に溶かし、スターラーで攪拌しながら室温で24時間インキュベートし、以下のペプチド-PEG修飾脂質を調製した。

[0090] 修飾脂質1; LRQRRRL (配列番号1) -YC-PEG-DSP

修飾脂質2; RKRI RMR (配列番号2) -YC-PEG-DSP

修飾脂質3; RRRRQNI (配列番号3) -YC-PEG-DSP

修飾脂質4; RKRS RMR (配列番号4) -YC-PEG-DSP

修飾脂質5; IRQRRRR (配列番号5) -YC-PEG-DSP

修飾脂質6; RRRRRRRR (配列番号6) -YC-PEG-DSP

(式中、Yはチロシン残基を、Cはシステイン残基を、それぞれ表す。以下同じ。)

[0091] (4) リポソームの調製

[4-1] RI標識ペプチド-PEG修飾リポソームの調製

卵黄ホスファチジルコリン [L- α -Phosphatidylchol

ine, Egg (Powder); Avanti Polar Lipid社} とコレステロール {Cholesterol (Powder); Avanti Polar Lipids社} とを、(卵黄ホスファチジルコリン) : (コレステロール) = 7 : 3となるように混合することにより混合脂質粉末を調製した。続いて、この調製した混合脂質粉末を、 $1 \text{ nmol} / \mu\text{L}$ となるようにエタノールに溶解し、混合脂質エタノール溶液を調製した。(混合脂質) : (本実施例(3)で調製した修飾脂質)のmol%の比が95 : 5となり、かつ、液の総体積が $137.5 \mu\text{L}$ となるよう、混合脂質エタノール溶液および本実施例(3)で調製した修飾脂質の水溶液をガラス製試験管に注入した。これに、放射性同位体(RI)である ^3H -cholesteryl hexadecyl ether (CHE) 250万dpm~500万dpmおよびクロロホルム $112.5 \mu\text{L}$ を添加して、短時間ボルテックス処理をした後、常法に従い、窒素ガス気流を用いてエタノール溶媒を除去した。続いて、250mLのエタノールを添加して脂質を溶解し、前記常法に従ってエタノール溶媒の除去を再度行うことにより、RIで標識した脂質膜を調製した。常法に従い、HEPES (和光純薬工業社)を用いて調製した $10 \text{ mmol} / \text{L}$ のHEPES緩衝液(pH7.4)を、この脂質膜に $250 \mu\text{L}$ 添加し、室温で15分間置いて水和させた後、ソニケーターを用いて30秒間ソニケーションを行うことにより、以下のRI標識ペプチド-PEG修飾リポソームを調製した。

[0092] 修飾脂質1を5%含むリポソーム; RI/1-PEG

修飾脂質2を5%含むリポソーム; RI/2-PEG

修飾脂質3を5%含むリポソーム; RI/3-PEG

修飾脂質4を5%含むリポソーム; RI/4-PEG

修飾脂質5を5%含むリポソーム; RI/5-PEG

修飾脂質6を5%含むリポソーム; RI/6-PEG (比較例)

[0093] [4-2] RI標識ペプチド-PEG修飾リポソームのサイズの確認

本実施例(4) [4-1]に記載の方法に従って、RIを添加しないRI

非標識ペプチド-PEG修飾リポソームを調製し、動的光散乱測定装置（Zetasizer Nano ZS；Malvern社）によりサイズを測定したところ、リポソームの直径は約100nmであった。このことから、本実施例（4）[4-1]で調製したRI標識ペプチド-PEG修飾リポソームのサイズは、直径約100nmであることが明らかになった。

[0094] [4-3] RI標識PEG修飾リポソームの調製

ペプチド-PEG修飾脂質を、PEG2000-DSPE {製品名：1, 2-distearoyl-snGlycerol-3-Phosphoethanolamine-N-[Carboxy (Polyethylene Glycol) 2000] (Ammonium Salt)、社名：Avanti Polar Lipids社} に代えて、本実施例（4）[4-1]に記載の方法に従って、RI標識PEG修飾リポソームであるRI/PEG（比較例）を調製した。また、本実施例（4）[4-1]に記載の方法に従ってRIで標識した脂質膜を調製した後、HEPES（和光純薬工業社）を用いて常法に従い調製した10mmol/LのHEPES緩衝液（pH7.4）をこの脂質膜に250μL添加し、室温で15分間置いて水和させ、さらに数回手で振ることにより混和させて、直径約800nmのマイクロサイズのRI標識PEG修飾リポソームであるRI/800PEG（比較例）を調製した。

[0095] [4-4] RI標識ペプチド修飾リポソームの調製

プロテオグリカンを介しての物質の細胞内取り込みを誘起するカチオン性ペプチドであるK8（細胞内取り込みを誘起することについて「Ayman El-Sayedら、J. Biol. Chem.、第283巻、第34号、第23450-23461頁」を、カチオン性物質がプロテオグリカンを介して細胞内に取り込まれることについて「Christine K. Payneら、Traffic、第8巻、第389-401頁」を、それぞれ参照のこと）（KKKKKKKK；配列番号7）および本実施例（2）で選択したペプチド1の、それぞれC末にステアリン酸（STR）が付加された、以下

のペプチド修飾脂肪酸をKUROBO社より購入した。

[0096] 修飾脂肪酸 1 ; LRQRRRL (配列番号 1) -STR

修飾脂肪酸 7 ; KKKKKKKK (配列番号 7) -STR

[0097] 調製した修飾脂肪酸 1 および修飾脂肪酸 7 を用いて、本実施例 (4) [4-1] に記載の方法に従い、PEG を介さずにペプチドを修飾した以下のリポソームを調製した。

[0098] 修飾脂肪酸 1 を 5% 含むリポソーム ; RI / 1

修飾脂肪酸 7 を 5% 含むリポソーム ; RI / 7 (比較例)

[0099] [4-5] RI 標識カチオン性リポソームの調製

カチオン性脂質である 1, 2-di oleoyl-3-trimethyl ammonium-propane (DOTAP; Avanti Polar Lipids 社) と 1, 2-di oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE; Avanti Polar Lipids 社) とを、DOTAP : DOPE = 3 : 7 となるように混合することにより混合脂質粉末を調製した。続いて、調製した混合脂質粉末を、1 nmol / μ L となるようにエタノールに溶解し、これをガラス製試験管に 137.5 μ L 入れ、以下、本実施例 (4) [4-1] に記載の方法により、RI 標識カチオン性リポソームである RI / DOTAP / DOPE を調製した。

[0100] [4-6] 蛍光標識ペプチド 1 修飾リポソームの調製

混合脂質 : 本実施例 (3) で調製した修飾脂質の mol% の比を 95 : 5 とすることに代えて、混合脂質 : 本実施例 (3) で調製した修飾脂質 1 : ローダミンが DOPE に結合したローダミン結合脂質 (Rhodamine-DOPE; Phosphoethanolamine-N-Lissamine Rhodamine B Sulfonyl, [1, 2-Di oleoyl-sn-Glycero-3-], Ammonium Salt (Chloroform), Avanti Polar Lipids 社) の mol% の比を 90 : 5 : 5 とし、本実施例 (4) [4-1] に記載の方法により、

RI 標識のない蛍光標識ペプチド1修飾リポソームであるRh_o/1-PEGを調製した。

[0101] [4-7] 蛍光標識DOTAP/DOPEリポソームの調製

DOTAP (Avanti Polar Lipids社)、DOPE (Avanti Polar Lipids社) およびRhodamine-DOPE (Avanti Polar Lipids社) を、DOTAP:DOPE:Rhodamine-DOPE=30:65:5となるように混合することにより混合脂質粉末を調製した。続いて、調製した混合脂質粉末を、1nmol/μLとなるようにエタノールに溶解し、これをガラス製試験管に137.5μL入れ、RIを添加せずに、以下、本実施例(4) [4-1] に記載の方法により、蛍光標識DOTAP/DOPEリポソームであるRh_o/DOTAP/DOPEを調製した。

[0102] <実施例2> RI 標識修飾リポソームの細胞透過比の検討

(1) 無細胞リポソーム透過率の算出

細胞透過性評価装置(特願2009-275877号)の上層側の領域に、実施例1(1)で調製したKrebs緩衝液を100μL/ウェル入れ、さらに、実施例1(4) [4-1] で調製したRI/1-PEG、RI/2-PEG、RI/3-PEG、RI/4-PEG、RI/5-PEG、RI/6-PEG、実施例1(4) [4-3] で調製したRI/PEG、RI/800PEG、実施例1(4) [4-4] で調製したRI/1およびRI/7を、それぞれ100μL(約100万~200万dpm)/ウェル添加した。2時間後に下層側の領域からKrebs緩衝液を回収し、液体シンチレーションカウンターTRI/CARB 1600TR(PACKARD社)を用いて、回収したKrebs緩衝液に含まれるRI量を測定した。測定したRI量の割合を、上層側の領域に添加したリポソームのRI量に対して百分率で算出することにより、細胞透過性評価装置(特願2009-275877号)において細胞が培養されていない場合のリポソーム透過率(無細胞リポソーム透過率)とした。

[0103] (2) 有細胞リポソーム透過率の算出

[2-1] MBEC4細胞の培養

国立大学法人東京大学分子細胞生物学研究所の鶴尾隆氏および内藤幹彦氏より供与されたマウス脳毛細血管内皮細胞由来のMBEC4細胞をDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM培地)に、300000 cell/mLとなるよう懸濁した。細胞透過性評価装置(特願2009-275877号)の上層側の領域に、この懸濁液を400 μ L/ウェルとなるように入れ、5%CO₂雰囲気下、37°Cで3日間~5日間、培養した細胞が密着結合を形成するまで静置培養した。細胞が密着結合を形成したか否かの確認は、MILLICELL-ERS(ミリポア社)を用いて、膜間電気抵抗(TER)を測定することにより行った。

[0104] [2-2] 有細胞リポソーム透過率の算出

本実施例(2)[2-1]で培養した細胞の培養液を除去し、実施例1(1)で調製したKrebs緩衝液で1回洗浄した後、除去した培養液と等量のKrebs緩衝液を加え、さらに、実施例1(4)[4-1]で調製したRI/1-PEG、RI/2-PEG、RI/3-PEG、RI/4-PEG、RI/5-PEG、RI/6-PEG、実施例1(4)[4-3]で調製したRI/PEG、RI/800PEG、実施例1(4)[4-4]で調製したRI/1およびRI/7をそれぞれ100 μ L(約100万~200万dpm)/ウェル添加した。以下、本実施例(1)に記載の方法により、細胞透過性評価装置において細胞が培養されている場合のリポソーム透過率(有細胞リポソーム透過率)を算出した。

[0105] (3) RI標識修飾リポソームの細胞透過比の算出

実施例1(4)[4-1]で調製したRI/1-PEG、RI/2-PEG、RI/3-PEG、RI/4-PEG、RI/5-PEG、RI/6-PEG、実施例1(4)[4-3]で調製したRI/PEG、RI/800PEG、実施例1(4)[4-4]で調製したRI/1およびRI/7の細胞透過比を、次式により算出した。また、算出の結果、最も高い細胞透過比

が確認されたRI/1-PEGに対するt検定を行った。その結果を図1に示す。

細胞透過比 = 本実施例(2)で算出した有細胞リポソーム透過率 / 本実施例(1)で算出した無細胞リポソーム透過率

[0106] 図1に示すように、RI/1-PEGの細胞透過比が約0.72で最も高く、RI/1の細胞透過比が、RI/1-PEGと有意差はないものの、約0.49で次に高いことが明らかになった。また、RI/1-PEGおよびRI/1の細胞透過比は、リポソームに一定の細胞内移行能を付与することが知られているR8およびK8で修飾したRI/6-PEGおよびRI/7の細胞透過比よりも高いことが明らかになった。一方、RI/3-PEGおよびRI/5-PEGの細胞透過比は、RI/6-PEGおよびRI/7の細胞透過比とほぼ同じであり、RI/2-PEGの細胞透過比は最も低い結果となった。また、RI/4-PEGの細胞透過比は、RI/1-PEGと有意差はないものの、ペプチドを修飾していないRI/PEGおよびサイズが大きいRI/800PEGと同程度の低い細胞透過比であった。

[0107] これらの結果から、実施例1(2)で選択したペプチド1がリポソームへの細胞透過能の付与やリポソームにおける細胞透過能の増強に優れていることが確認された。

[0108] <実施例3> RI/1-PEGの細胞内取り込みにおけるPEGの必要性の検討

実施例2(2) [2-1]に記載の方法により、シャーレ上でMBEC4細胞を培養した後、培養液を除去し、実施例1(1)で調製したKrebs緩衝液を用いて1回洗浄した。続いて、除去した培養液と等量のKrebs緩衝液を加え、実施例1(4) [4-1]で調製したRI/1-PEGおよび実施例1(4) [4-4]で調製したRI/1をそれぞれ100 μ L(約100万~200万dpm)/ウェル添加した。2時間後、リポソームを含むKrebs緩衝液を除去し、40unit/mLのヘパリン(和光純薬工業社)を含むPBS(日水製薬社)1mLを用いて3回洗浄した。続いて3

NのNaOH水溶液に一晩浸漬することにより細胞を溶解し、液体シンチレーションカウンターTRI/CARB 1600TR (PACKARD社)を用いて、この細胞溶解液中のRI量を測定した。添加したRI量に対する、前記測定したRI量の割合を、リポソームの細胞内取り込み比として百分率で算出した。その結果を図2に示す。

[0109] 図2に示すように、RI/1-PEGの細胞内取り込み比は、RI/1の細胞内取り込み比に比べて大きいことが明らかになった。この結果から、PEGを介してペプチド1を修飾したリポソームの方が、PEGを介さずにペプチド1を修飾したリポソームと比べて、より多くMBEC4細胞に取り込まれることが確認された。

[0110] <実施例4> RI/1-PEGの細胞透過および細胞内取り込みにおける脂質ラフト関与の検討

(1) 細胞透過における脂質ラフト関与の検討

実施例1(4) [4-1]で調製したRI/1-PEGについて、実施例2に記載の方法に従い、細胞透過比を算出した。なお、無細胞リポソーム透過率および有細胞リポソーム透過率の算出時には、ウェルに実施例1

(1)で調製したKrebs緩衝液を入れると同時に、コレステロールに特異的に結合して脂質ラフトの機能を阻害する試薬であるFilipin III (SIGMA社)を $5\mu\text{mol/L}$ および $15\mu\text{mol/L}$ となるよう添加し、1時間インキュベートした後、RI/1-PEGを添加した。

[0111] 続いて、実施例2(3)で算出したRI/1-PEGの細胞透過比 (Filipin IIIを添加しない場合のRI/1-PEGの細胞透過比) に対する、Filipin IIIを $5\mu\text{mol/L}$ あるいは $15\mu\text{mol/L}$ となるよう添加して算出したRI/1-PEGの細胞透過比の割合を百分率で算出した。また、算出した値について、実施例2(3)で算出したRI/1-PEGの細胞透過比 (Filipin IIIを添加しない場合のRI/1-PEGの細胞透過比) に対するt検定を行った。その結果を図3に示す。

[0112] 図3に示すように、Filipin IIIを $5\mu\text{mol/L}$ 添加した場合

は、無添加の場合に比べて有意差はないものの、細胞透過比割合は約60%に低下し、 $15\mu\text{mol/L}$ 添加した場合の細胞透過比割合は約35%に低下した。すなわちFilipin IIIの添加量に比例して細胞透過比および細胞透過比割合は低下することが明らかになった。

[0113] これらの結果から、RI/1-PEGは、主として、脂質ラフトを介して細胞透過されることが確認された。

[0114] (2) 細胞内取り込みにおける脂質ラフト関与の検討

実施例1(4) [4-1]で調製したRI/1-PEGおよび実施例1(4) [4-4]で調製したRI/1について、実施例3に記載の方法に従い、細胞内取り込み比を算出した。なお、実施例1(1)で調製したKrebs緩衝液をシャーレに入れる際、脂質ラフトを阻害する試薬であるFilipin III (SIGMA社)を $5\mu\text{mol/L}$ あるいは $15\mu\text{mol/L}$ となるよう同時に添加し、1時間インキュベートした後、RI/1-PEGおよびRI/1をそれぞれ添加した。

[0115] 続いて、実施例3で算出したRI/1-PEGの細胞内取り込み比 (Filipin IIIを添加しない場合のRI/1-PEGの細胞内取り込み比) に対する、Filipin IIIを添加して算出したRI/1-PEGの細胞内取り込み比の割合を百分率で算出した。また、算出した値について、実施例3で算出したRI/1-PEGの細胞内取り込み比 (Filipin IIIを添加しない場合のRI/1-PEGの細胞内取り込み比) に対するt検定を行った。同様に、実施例3で算出したRI/1の細胞内取り込み比 (Filipin IIIを添加しない場合のRI/1-PEGの細胞内取り込み比) に対する、Filipin IIIを添加して算出したRI/1の細胞内取り込み比の割合を百分率で算出し、算出した値について、実施例3で算出したRI/1の細胞内取り込み比 (Filipin IIIを添加しない場合のRI/1-PEGの細胞内取り込み比) に対するt検定を行った。それらの結果を図4に示す。

[0116] 図4に示すように、Filipin IIIを $5\mu\text{mol/L}$ 添加した場合

のRI/1-PEGでは、Filipin III無添加の場合と比較して、細胞内取り込み比割合は約73%に低下し、15 $\mu\text{mol/L}$ 添加した場合のRI/1-PEGでは、Filipin III無添加の場合と比較して、細胞内取り込み比割合は約50%に低下した。すなわちFilipin IIIの添加量に比例して細胞内取り込み比および細胞内取り込み比割合は低下することが明らかになった。一方、Filipin IIIを5 $\mu\text{mol/L}$ 添加した場合のRI/1では、有意差はないものの、Filipin III無添加の場合と比較して、細胞内取り込み比割合は約142%に増加し、15 $\mu\text{mol/L}$ 添加した場合のRI/1-PEGでは、有意差はないものの、Filipin III無添加の場合と比較して、細胞内取り込み比割合は約180%に増加した。

[0117] これらの結果から、RI/1-PEGは主として脂質ラフトを介して細胞内に取り込まれることが確認され、RI/1は主として脂質ラフトを介さない経路で細胞内に取り込まれることが確認された。

[0118] <実施例5>ペプチド1における重要なアミノ酸配列の検討

ペプチド1のアミノ酸配列を変化させた以下のペプチドを、北海道システムサイエンス社に化学合成を委託することにより作製した。ペプチド1のアミノ酸配列を変化させた部分を下線で示す。なお、ペプチド8~13はペプチド1のアミノ酸配列のN末端およびC末端アミノ酸の少なくともいずれかを変化させたペプチドであり、ペプチド14はペプチド1のアミノ酸配列のN末端から2番目のRをLに変化させたペプチドであり、ペプチド15はペプチド1のアミノ酸配列の全てのRをKに変化させたペプチドであり、ペプチド16および17はペプチド1のアミノ酸配列のN末端から2番目のRの数を増加させたペプチドであり、ペプチド18および19はペプチド1のアミノ酸配列のN末端から3番目のQをRまたはAに変化させたペプチドであり、ペプチド20および21はペプチド1のアミノ酸配列のN末端およびC末端のLを固定したままでN末端から3番目のQの位置を変化させたペプチドであり、ペプチド22および23はペプチド1のアミノ酸配列の両末端に

LまたはRを付加してペプチドの長さを変化させたペプチドであり、ペプチド24および25はペプチド1のアミノ酸配列の並びを変化させたペプチドであり、ペプチド26~29はペプチド1のアミノ酸配列のN末端から4番目~6番目のRの数を減少または増加させたペプチドであり、ペプチド30~32はペプチド1のアミノ酸配列のN末端から6番目のRのC末端側にLまたはAを付加したペプチドであり、ペプチド33~37はペプチド1のアミノ酸配列のN末端から4番目~6番目のRを変化させたペプチドである。

- [0119] ペプチド8 ; RRQRRRL (配列番号8)
ペプチド9 ; LRQRRRR (配列番号9)
ペプチド10 ; RRQRRRR (配列番号10)
ペプチド11 ; SRQRRRS (配列番号11)
ペプチド12 ; IRQRRRI (配列番号12)
ペプチド13 ; VRQRRRV (配列番号13)
ペプチド14 ; LLQRRRL (配列番号14)
ペプチド15 ; LKQKKKL (配列番号15)
ペプチド16 ; LRRRQRRRL (配列番号16)
ペプチド17 ; LRRRQRRRL (配列番号17)
ペプチド18 ; LRRRRRRL (配列番号18)
ペプチド19 ; LRARRRL (配列番号19)
ペプチド20 ; LRRQRRRL (配列番号20)
ペプチド21 ; LRRRQRL (配列番号21)
ペプチド22 ; LLRQRRRLL (配列番号22)
ペプチド23 ; RLRQRRRLR (配列番号23)
ペプチド24 ; QRRLLRR (配列番号24)
ペプチド25 ; RRLLQRR (配列番号25)
ペプチド26 ; LRQRRL (配列番号26)
ペプチド27 ; LRQRL (配列番号27)
ペプチド28 ; LRQRRRRL (配列番号28)

ペプチド29 ; LRQRRRRRL (配列番号29)

ペプチド30 ; LRQRRRL (配列番号30)

ペプチド31 ; LRQRRRAL (配列番号31)

ペプチド32 ; LRQRRRAAL (配列番号32)

ペプチド33 ; LRQRLRL (配列番号33)

ペプチド34 ; LRQLRRRL (配列番号34)

ペプチド35 ; LRQSSSL (配列番号35)

ペプチド36 ; LRQRRDL (配列番号36)

ペプチド37 ; LRQRDDL (配列番号37)

[0120] これらのペプチド8～37について、実施例1(3)に記載の方法に従い、ペプチド-PEG修飾脂質を調製した後、実施例1(4)[4-1]に記載の方法に従って、以下のRI標識ペプチド-PEG修飾リポソームを調製した。

[0121] ペプチド8のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/8-PEG
ペプチド9のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/9-PEG
ペプチド10のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/10-PEG
ペプチド11のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/11-PEG
ペプチド12のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/12-PEG
ペプチド13のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/13-PEG
ペプチド14のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/14-PEG
ペプチド15のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/15-PEG
ペプチド16のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/16-PEG
ペプチド17のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/17-PEG
ペプチド18のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/18-PEG
ペプチド19のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/19-PEG
ペプチド20のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/20-PEG
ペプチド21のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/21-PEG
ペプチド22のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム ; RI/22-PEG

ペプチド23のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/23-PEG
ペプチド24のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/24-PEG
ペプチド25のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/25-PEG
ペプチド26のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/26-PEG
ペプチド27のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/27-PEG
ペプチド28のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/28-PEG
ペプチド29のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/29-PEG
ペプチド30のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/30-PEG
ペプチド31のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/31-PEG
ペプチド32のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/32-PEG
ペプチド33のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/33-PEG
ペプチド34のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/34-PEG
ペプチド35のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/35-PEG
ペプチド36のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/36-PEG
ペプチド37のPEG修飾脂質を5%含むリポソーム；RI/37-PEG

[0122] 続いて、これらのリポソームについて、実施例2に記載の方法に従い、細胞透過率を算出し、実施例2(3)で算出したRI/1-PEGの細胞透過比に対する、算出したそれぞれの細胞透過比の割合を百分率で算出した。RI/8-PEG~RI/13-PEGの結果を図5に、RI/14-PEG~RI/17-PEGの結果を図6に、RI/18-PEGおよびRI/19-PEGの結果を図7に、RI/20-PEGおよびRI/21-PEGの結果を図8に、RI/22-PEGおよびRI/23-PEGの結果を図9に、RI/24-PEGおよびRI/25-PEGの結果を図10に、RI/26-PEGおよびRI/27-PEGの結果を図11に、RI/28-PEG~RI/32-PEGの結果を図12に、RI/33-PEG~RI/37-PEGの結果を図13に、それぞれ示す。

[0123] 図5および図10に示すように、RI/8-PEG、RI/9-PEG、RI/10-PEG、RI/11-PEG、RI/12-PEG、RI/1

3-PEG、RI/24-PEGおよびRI/25-PEGの細胞透過比割合は、それぞれ約38.5%、約40%、約6.2%、約39%、約21.5%、約24.6%、約30%および約20%であった。これらの結果から、ペプチドがヘプタペプチドの場合、N末端のアミノ酸残基およびC末端のアミノ酸残基はいずれもLである場合に、リポソームの細胞透過能が向上することが確認された。

[0124] また、図6に示すように、RI/14-PEG、RI/16-PEGおよびRI/17-PEGの細胞透過比割合は、それぞれ約60%、約6%および約4%であった。これらの結果から、ペプチドがヘプタペプチドの場合、さらにN末端から2番目のアミノ酸残基がLまたは極性アミノ酸残基である場合に、リポソームへの細胞透過能が向上することが確認された。

[0125] また、図7、図8および図10に示すように、RI/18-PEG、RI/19-PEG、RI/20-PEG、RI/21-PEG、RI/24-PEGおよびRI/25-PEGの細胞透過比割合は、それぞれ約10%、約44.6%、約33.8%、約10%、約30%および約20%であった。これらの結果から、ペプチドがヘプタペプチドの場合、さらにN末端から3番目のアミノ酸残基が極性無電荷側鎖アミノ酸残基である場合に、リポソームの細胞透過能が向上することが確認された。

[0126] また、図6、図9および図12に示すように、RI/16-PEG、RI/17-PEG、RI/22-PEG、RI/23-PEG、RI/28-PEG、RI/29-PEG、RI/30-PEG、RI/31-PEGおよびRI/32-PEGの細胞透過比割合はそれぞれ約6%、約4%、約12.3%、約2.3%、約16.7%、約6.7%、約38.3%、約8.3%および約5%であった。これらの結果から、ペプチドの長さが8アミノ酸残基以上になると、リポソームの細胞透過能が低下することが確認された。

[0127] また、図10に示すように、RI/24-PEGおよびRI/25-PEGの細胞透過比割合はそれぞれ約30%および約20%であった。これらの

結果から、ペプチド1のアミノ酸配列の並びを変更したヘプタペプチドは、リポソームの細胞透過能が低下することが確認された。

[0128] また、図11に示すように、RI/26-PEGおよびRI/27-PEGの細胞透過比割合はそれぞれ約60%および約47%であった。これらの結果から、N末端およびC末端がLであり、N末端から2番目のアミノ酸残基が極性アミノ酸残基であり、かつN末端から3番目のアミノ酸が極性無電荷側鎖アミノ酸残基であるヘキサペプチドは、リポソームの細胞透過能が向上することが確認された。

[0129] また、図6、図12および図13に示すように、RI/15-PEG、RI/28-PEG、RI/29-PEG、RI/30-PEG、RI/31-PEG、RI/32-PEG、RI/33-PEG、RI/34-PEG、RI/36-PEGおよびRI/37-PEGの細胞透過比割合はそれぞれ約109%、約16.7%、6.7%、約38.3%、約8.3%、約5%、約13%、約36%、約98%、約49%および約80%であったことから、ペプチドがヘキサペプチドまたはヘプタペプチドの場合、さらにN末端から3番目の極性無電荷側鎖アミノ酸残基とC末端のLとの間の、それぞれ2または3アミノ酸残基が極性アミノ酸残基である場合に、リポソームの細胞透過能が顕著に向上することが確認された。

[0130] また、図12に示すように、RI/30-PEG、RI/31-PEGおよびRI/32-PEGの細胞透過比割合はそれぞれ約38.3%、約8.3%および約5%であったことから、ペプチド1のアミノ酸配列のN末端から6番目のRのC末端側にLまたはAを付加した場合は、リポソームの細胞透過能が低下することが確認された。

[0131] <実施例6>ペプチド修飾量の検討

ペプチド1について、実施例1(4) [4-1]に記載の方法に従い、RI標識ペプチド-PEG修飾リポソームを調製した。ただし、混合脂質エタノール溶液および実施例1(3)で調製したペプチド-PEG修飾脂質水溶液をガラス製試験管に入れる際に、(混合脂質) : (実施例1(3)で調製

したペプチド-PEG修飾脂質)のm o l %の比が99 : 1となるもの、95 : 5となるものおよび90 : 10となるものの3種類を準備した。すなわち、ペプチド1の修飾脂質のm o l %の比がそれぞれ1%、5%および10%である3種類のリポソームを調製し、それぞれRI / 1-PEG (1%)、RI / 1-PEG (5%) およびRI / 1-PEG (10%) とした。これらのリポソームについて、実施例2に記載の方法により、細胞透過比を算出した。また、算出した値について、RI / 1-PEG (5%) の細胞透過比に対するt検定を行った。その結果を図14に示す。

[0132] 図14に示すように、RI / 1-PEG (1%)、RI / 1-PEG (5%) およびRI / 1-PEG (10%) の細胞透過比はそれぞれ約0.42、約0.73、および約0.54であり、有意差はないものの、RI / 1-PEG (5%) の細胞透過比が最も高かった。これらの結果から、ペプチド1の修飾脂質のm o l %割合は、5%である場合に最も細胞透過率が高くなることが確認された。

[0133] <実施例7>ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)が介する細胞内取り込み阻害時におけるリポソームの細胞内取り込み比の検討

(1) リポソームのヘパリン処理

実施例1(4) [4-1]で調製したRI / 1-PEG、実施例1(4) [4-4]で調製したRI / 7および実施例1(4) [4-5]で調製したRI / DOTAP / DOPEの溶液それぞれ0.01mLに、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)に対して競合阻害効果を有するヘパリン(和光純薬工業社)100unitsを添加し、室温で15分間インキュベートすることにより、リポソームのヘパリン処理を行った。

[0134] (2) ヘパリン処理を行ったリポソームの細胞内取り込み比の測定

本実施例(1)でヘパリン処理を行ったRI / 1-PEG、RI / 7およびRI / DOTAP / DOPEについて、実施例3に記載の方法により、細胞内取り込み比を測定した。また同時に、コントロールとして、本実施例(1)のヘパリン処理を行っていない実施例1(4) [4-1]で調製したR

RI/1-PEG、実施例1(4)[4-4]で調製したRI/7および実施例1(4)[4-5]で調製したRI/DOTAP/DOPEについて、同様の方法により細胞内取り込み比を算出し、コントロールの細胞内取り込み比に対する、ヘパリン処理を行った場合の細胞内取り込み比の割合を百分率で算出した。その結果を図15に示す。

[0135] 図15に示すように、RI/1-PEGの細胞内取り込み比割合は約15.4%であり、ヘパリン処理を行わない場合と比べて顕著に減少したことが明らかになった。一方、RI/DOTAP/DOPEの細胞内取り込み比割合は、約93.8%であり、ヘパリン処理を行わない場合と比べてほとんど変化しないことが明らかになった。また、RI/7の細胞内取り込み比割合は、約75.4%であり、ヘパリン処理を行わない場合と比べてわずかに減少したことが明らかになった。

[0136] リポソームが、細胞表面のHSPGを介して細胞に取り込まれる場合、HSPGと類似の構造を有するヘパリンでリポソームを処理すると、そのリポソームの細胞内取り込み比は減少する。従って、上述した結果から、RI/1-PEGは主としてHSPGを介して細胞内に取り込まれていることが確認された。また、RI/1-PEGと同様にカチオン性を有するRI/DOTAP/DOPEおよびRI/7は、主としてHSPGを介さない経路で細胞内に取り込まれていることが確認された。

[0137] <実施例8>Rh o/1-PEGの細胞内取り込み状態の確認

(1) リポソームのヘパリン処理

実施例1(4)[4-6]で調製したRh o/1-PEGおよび実施例1(4)[4-7]で調製したRh o/DOTAP/DOPEについて、実施例7(1)に記載の方法によりヘパリン処理を行った。

[0138] (2) 蛍光顕微鏡観察によるリポソームの細胞内取り込み状態の確認

ガラスベースディッシュ(IWAKI社)上で、実施例2(2)[2-1]に記載の方法により細胞を培養した後、培養液を除去し、実施例1(1)で調製したKrebs緩衝液で1回洗浄し、除去した培養液と等量のKrebs

bs緩衝液を加え、本実施例（1）でヘパリン処理を行ったRh_o/1-PEGおよびRh_o/DOTAP/DOPEをそれぞれ100μL（約100万~200万dpm）/ウェルを添加した。1時間後、リポソームを含むKrebs緩衝液を除去し、40unit/mLのヘパリン（和光純薬工業社）を含むPBS（日水製薬社）1mLを用いて3回洗浄した後、カメラ付き顕微鏡（カメラ：浜松ホトニクス社、顕微鏡：ニコン社）を用いてローダミンの蛍光を観察した。また同時に、コントロールとして本実施例（1）のヘパリン処理を行っていない実施例1（4）[4-6]で調製したRh_o/1-PEGおよび実施例1（4）[4-7]で調製したRh_o/DOTAP/DOPEについて、同様の方法により細胞に取り込ませて蛍光観察を行い、コントロールとした。その結果を図16に示す。

[0139] 図16に示すように、Rh_o/1-PEGの場合、コントロールでは細胞内にローダミンの蛍光が観察されたのに対し、ヘパリン処理では、細胞内にローダミンの蛍光がほとんど観察されなかった。一方、Rh_o/DOTAP/DOPEの場合、ヘパリン処理でもコントロールと同様に細胞内においてローダミンの蛍光が観察された。

[0140] これらの結果から、Rh_o/1-PEGは主としてHSPGを介して細胞内に取り込まれていることが確認された。また、Rh_o/1-PEGと同様にカチオン性を有するRh_o/DOTAP/DOPEは、主としてHSPGを介さない経路で細胞内に取り込まれていることが確認された。

[0141] <実施例9>血管内皮細胞および非血管内皮細胞におけるRh_o/1-PEGリポソームの輸送経路の確認

（1）細胞における初期エンドソームの標識

初期エンドソームに局在する低分子量GTP結合タンパク質であるRab5と緑色蛍光タンパク質であるGFPとの融合タンパク質（Rab5-GFP）をコードする発現プラスミドをあらかじめ作製し、後述の本実施例（4）において蛍光観察を行う24時間前に、MBEC4細胞およびHSPGが発現していることが知られている非血管内皮細胞であるCHO-K1細胞（

チャイニーズハムスター卵巣細胞)に、遺伝子導入用カチオン性脂質(Lipofectamine PLUS、invitrogen)遺伝子導入することにより、初期エンドソームを蛍光標識した。

[0142] (2) 細胞における後期エンドソームの標識

後期エンドソームに局在する低分子量GTP結合タンパク質であるRab7とGFPとの融合タンパク質(Rab7-GFP)をコードする発現プラスミドをあらかじめ作製し、後述の本実施例(4)において蛍光観察を行う24時間前に、MBEC4細胞およびCHO-K1細胞に、遺伝子導入用カチオン性脂質(Lipofectamine PLUS、invitrogen)遺伝子導入することにより、後期エンドソームを蛍光標識した。

[0143] (3) 細胞におけるリソソームの標識

本実施例(1)で初期エンドソームを蛍光標識したMBEC4細胞、本実施例(1)で初期エンドソームを蛍光標識したCHO-K1細胞、本実施例(2)で後期エンドソームを蛍光標識したMBEC4細胞および本実施例(2)で後期エンドソームを蛍光標識したCHO-K1細胞の培地に、LysoTracker Blue DND-22(invitrogen社)を、添付の使用書に従ってそれぞれ添加し、30分間インキュベートすることによりリソソームを蛍光標識した。

[0144] (4) 蛍光顕微鏡観察によるリポソームの取り込み経路の確認

本実施例(3)でリソソームを蛍光標識した各細胞に、実施例8(2)に記載の方法により、実施例1(4)[4-6]で調製したRho/1-PEGを取り込ませ、蛍光顕微鏡を用いてローダミン、GFPおよびLysoTracker Blueの蛍光を観察した。MBEC4細胞の観察結果を図17に、CHO-K1細胞の観察結果を図18にそれぞれ示す。

[0145] 図17に示すように、初期エンドソームを蛍光標識したMBEC4細胞では、ローダミンの蛍光は、GFPの蛍光およびLysoTracker Blueの蛍光のいずれとも異なる場所で観察された。また、後期エンドソームを蛍光標識したMBEC4細胞においても同様、ローダミンの蛍光は、GFP

Pの蛍光およびLysoTracker Blueの蛍光のいずれとも異なる場所で観察された。これらの結果から、MBEC4細胞内に取り込まれたRho/1-PEGは、初期エンドソーム、後期エンドソームおよびリソソームに移行せずに、細胞透過されることが明らかになった。

[0146] また、図18に示すように、初期エンドソームを蛍光標識したCHO-K1細胞では、ローダミンの蛍光は、GFPの蛍光とは異なる場所で観察されるとともに、矢印で示す場所でLysoTracker Blueの蛍光と同じ場所に観察された。さらに、後期エンドソームを蛍光標識したCHO-K1細胞では、LysoTracker Blueの蛍光とは異なる場所で観察されるとともに、矢印で示す場所でGFPの蛍光と同じ場所に観察された。これらの結果から、CHO-K1細胞では、細胞内に取り込まれたRho/C195-PEGは、リソソームおよび後期エンドソームに移行することが明らかになり、細胞透過されずに通常の分解系に入ることが示唆された。

請求の範囲

- [請求項1] アミノ酸配列が $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ （式中、 L はロイシン残基を、 X_1 は極性アミノ酸残基を、 X_2 は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。）である、脂質膜構造体に細胞透過能を付与および／または脂質膜構造体の細胞透過能を増強するペプチド。
- [請求項2] 極性無電荷側鎖アミノ酸残基 X_2 が Q （ Q はグルタミン残基を表す。）である、請求項1に記載のペプチド。
- [請求項3] 極性アミノ酸残基 X_1 が R 、 K 、 S および D （ R はアルギニン残基を、 K はリシン残基を、 S はセリン残基を、 D はアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。）からなる群より選択される同じまたは異なるアミノ酸残基である、請求項1または請求項2に記載のペプチド。
- [請求項4] アミノ酸配列が $LRQRRRL$ 、 $LLQRRRL$ 、 $LRQRRL$ 、 $LKQKKKL$ 、 $LLQKKKL$ 、 $LKQKKL$ 、 $LRQSSSL$ 、 $LLQSSSL$ 、 $LRQSSL$ 、 $LRQRDDL$ 、 $LLQRDDL$ または $LRQRDL$ （式中、 L はロイシン残基を、 R はアルギニン残基を、 Q はグルタミン残基を、 K はリシン残基を、 S はセリン残基を、 D はアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。）である、請求項1から請求項3のいずれかに記載のペプチド。
- [請求項5] 細胞が上皮細胞である、請求項1から請求項4のいずれかに記載のペプチド。
- [請求項6] 脂質ラフトに存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンを通じて細胞に取り込まれる、請求項1から請求項5のいずれかに記載のペプチド。
- [請求項7] 請求項1から請求項6のいずれかに記載のペプチドと結合した脂質を構成脂質として含む、細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体。
- [請求項8] ペプチドと結合した脂質が、ペプチドのC末端にチロシン残基、シ

ステイン残基、親水性ポリマーおよび脂質がこの順で結合してなるペプチドと結合した脂質である、請求項 7 に記載の脂質膜構造体。

[請求項 9] 親水性ポリマーがポリエチレングリコールである、請求項 8 に記載の脂質膜構造体。

[請求項 10] 構成脂質総量に占めるペプチドが結合した脂質の割合 P が $1 \text{ mol} \% \leq P \leq 10 \text{ mol} \%$ である、請求項 7 から請求項 9 のいずれかに記載の脂質膜構造体。

[請求項 11] 細胞が上皮細胞である、請求項 7 から請求項 10 のいずれかに記載の脂質膜構造体。

[請求項 12] 脂質ラフトに存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンを介して細胞に取り込まれる、請求項 7 から請求項 11 のいずれかに記載の脂質膜構造体。

[請求項 13] アミノ酸配列が $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ (式中、 L はロイシン残基を、 X_1 は極性アミノ酸残基を、 X_2 は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。) であるペプチドを有効成分とする、脂質膜構造体に対する細胞透過能付与および/または細胞透過能増強剤。

[請求項 14] 極性無電荷側鎖アミノ酸残基 X_2 が Q (Q はグルタミン残基を表す。) である、請求項 13 に記載の細胞透過能付与および/または細胞透過能増強剤。

[請求項 15] 極性アミノ酸残基 X_1 が R 、 K 、 S および D (R はアルギニン残基を、 K はリシン残基を、 S はセリン残基を、 D はアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。) からなる群より選択される同じまたは異なるアミノ酸残基である、請求項 13 または請求項 14 に記載の細胞透過能付与および/または細胞透過能増強剤。

[請求項 16] アミノ酸配列が $LRQRRRL$ 、 $LLQRRRL$ 、 $LRQRRL$ 、 $LKQKKKL$ 、 $LLQKKKL$ 、 $LKQKKL$ 、 $LRQSSSL$ 、 $LLQSSSL$ 、 $LRQSSL$ 、 $LRQRDDL$ 、 $LLQRDDL$ ま

たはLRQRDL（式中、Lはロイシン残基を、Rはアルギニン残基を、Qはグルタミン残基を、Kはリシン残基を、Sはセリン残基を、Dはアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。）である、請求項13から請求項15のいずれかに記載の細胞透過能付与および／または細胞透過能増強剤。

[請求項17] 細胞が上皮細胞である、請求項13から請求項16のいずれかに記載の細胞透過能付与および／または細胞透過能増強剤。

[請求項18] ペプチドが脂質ラフトに存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンを通じて細胞に取り込まれるペプチドである、請求項13から請求項17のいずれかに記載の細胞透過能付与および／または細胞透過能増強剤。

[請求項19] 細胞透過能を有するまたは細胞透過能が増強された脂質膜構造体を製造する方法であって、

アミノ酸配列が $LX_1X_2X_1X_1X_1L$ 、 $LLX_2X_1X_1X_1L$ または $LX_1X_2X_1X_1L$ （式中、Lはロイシン残基を、 X_1 は極性アミノ酸残基を、 X_2 は極性無電荷側鎖アミノ酸残基を、それぞれ表す。）であるペプチドで脂質膜構造体を修飾する工程

を有する前記方法。

[請求項20] 極性無電荷側鎖アミノ酸残基 X_2 がQ（Qはグルタミン残基を表す。）である、請求項19に記載の方法。

[請求項21] 極性アミノ酸残基 X_1 がR、K、SおよびD（Rはアルギニン残基を、Kはリシン残基を、Sはセリン残基を、Dはアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。）からなる群より選択される同じまたは異なるアミノ酸残基である、請求項19または請求項20に記載の方法。

[請求項22] アミノ酸配列がLRQRRL、LLQRRL、LRQRRL、LKQKKKL、LLQKKKL、LKQKKL、LRQSSSL、LLQSSSL、LRQSSL、LRQRDDL、LLQRDDLまたはLRQRDL（式中、Lはロイシン残基を、Rはアルギニン残基

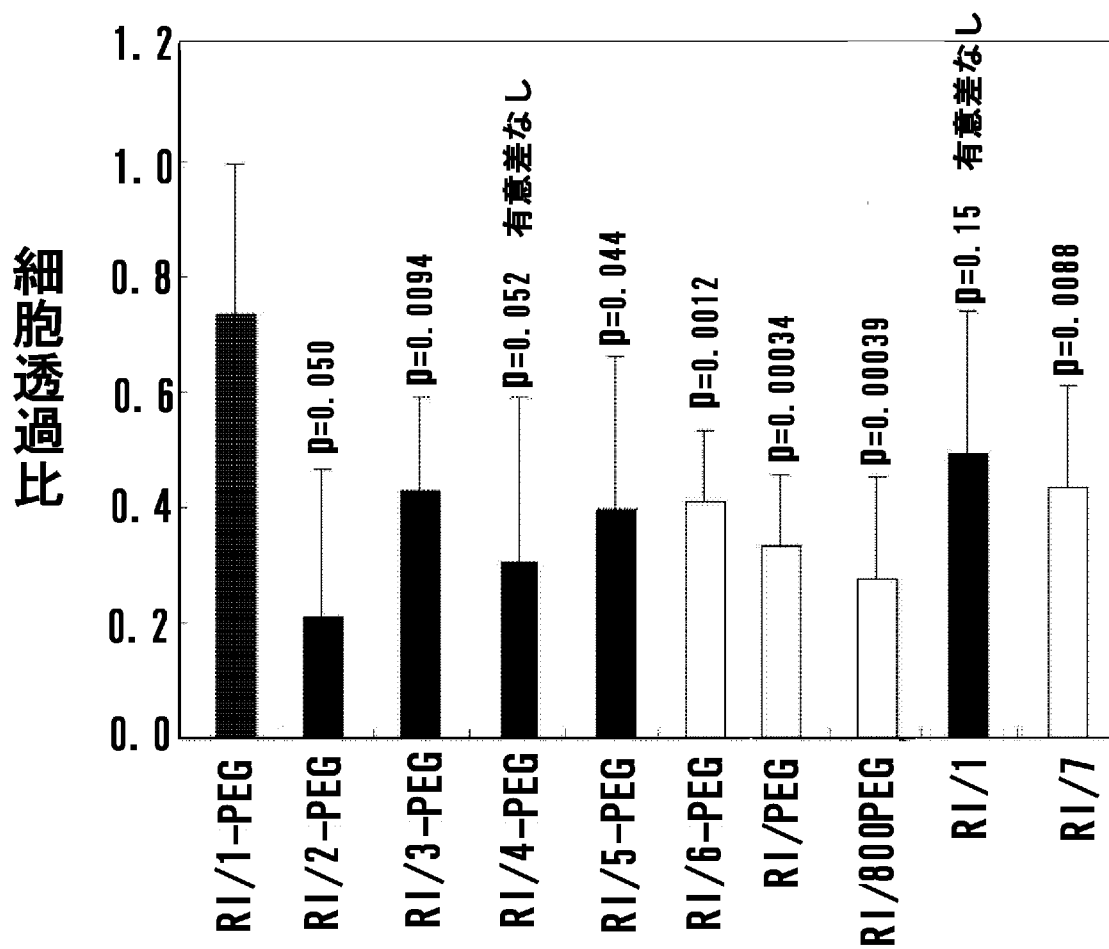
を、Qはグルタミン残基を、Kはリシン残基を、Sはセリン残基を、Dはアスパラギン酸残基を、それぞれ表す。)である、請求項19から請求項21のいずれかに記載の方法。

[請求項23] ペプチドで脂質膜構造体を修飾する工程が、ペプチドのC末端にチロシン残基、システイン残基、親水性ポリマーおよび脂質をこの順で結合させることによりペプチドで脂質膜構造体を修飾する工程である、請求項19から請求項22のいずれかに記載の方法。

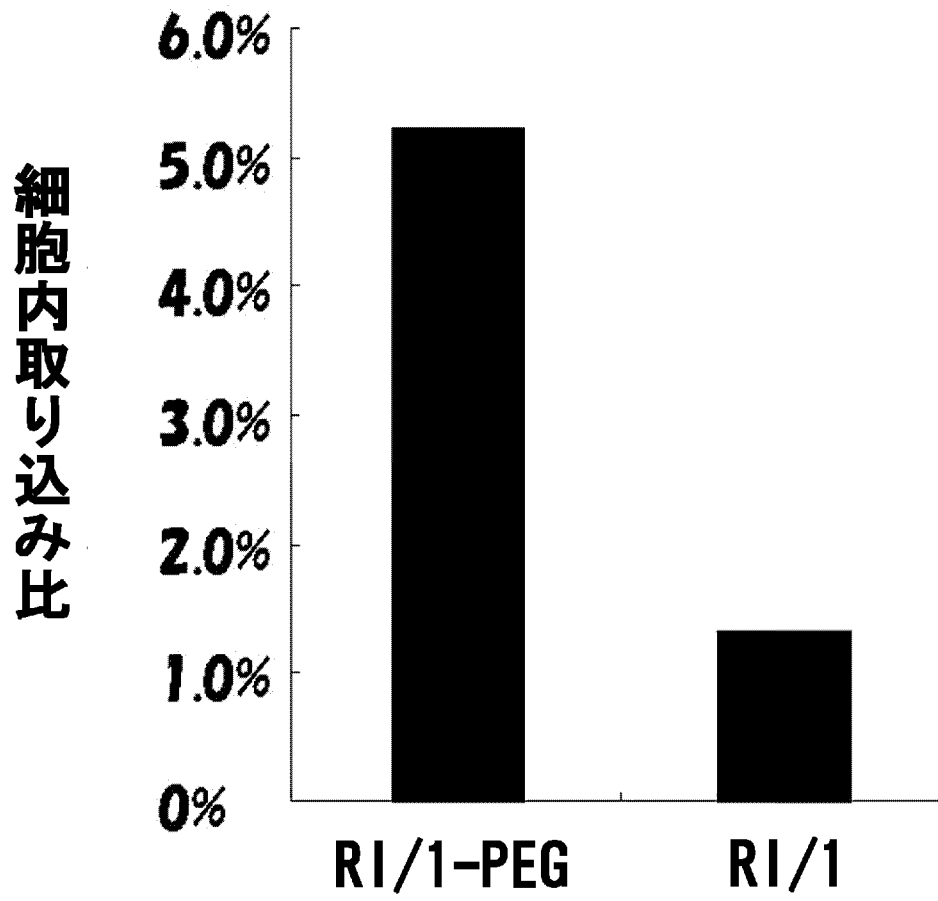
[請求項24] 細胞が上皮細胞である、請求項19から請求項23のいずれかに記載の方法。

[請求項25] ペプチドが脂質ラフトに存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンを通じて細胞に取り込まれるペプチドである、請求項19から請求項24に記載の方法。

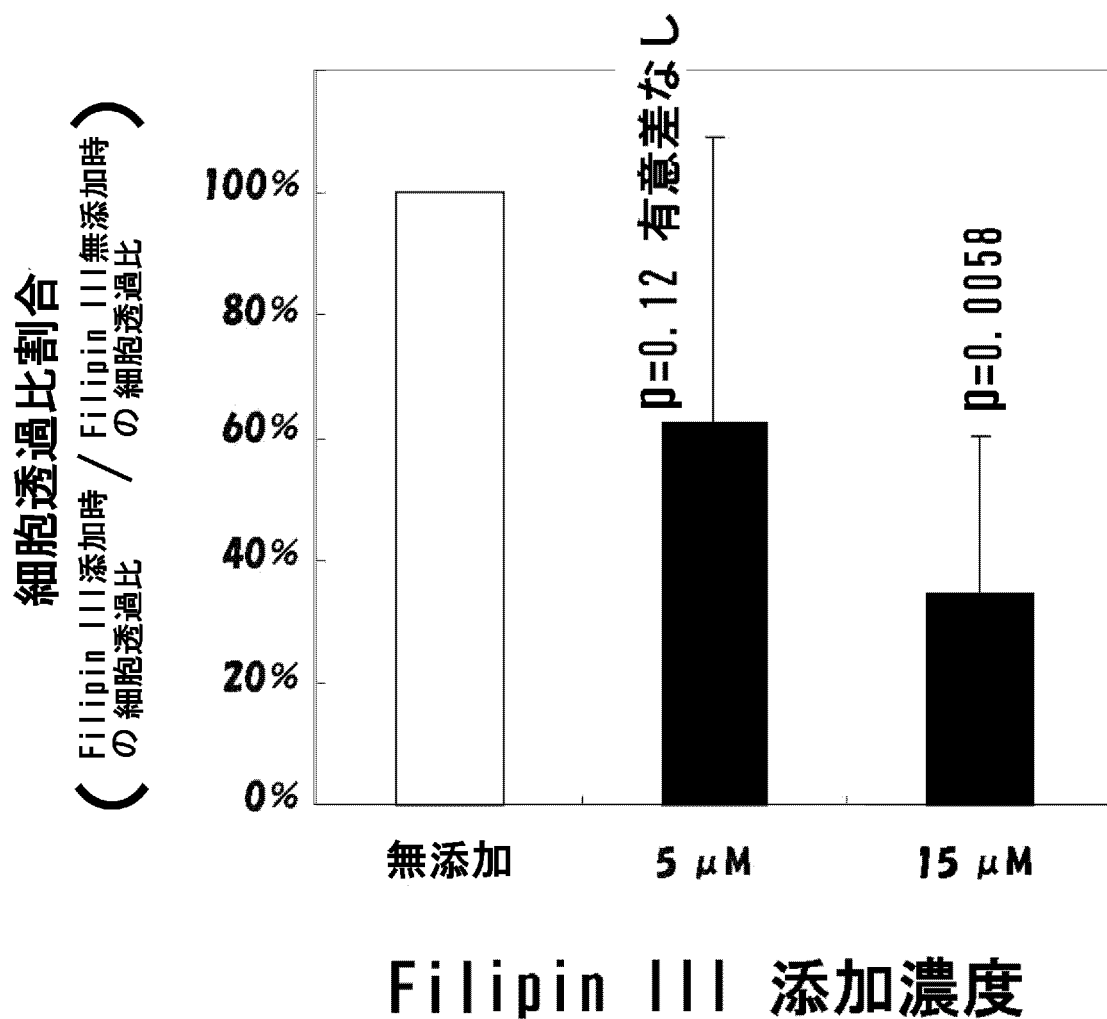
[図1]



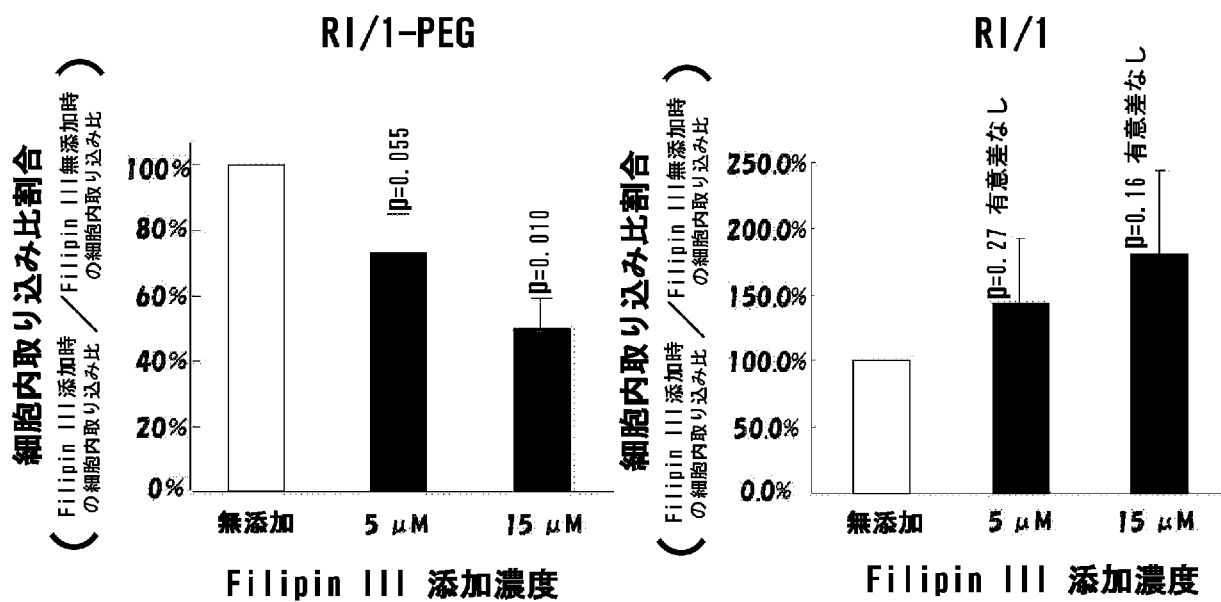
[図2]



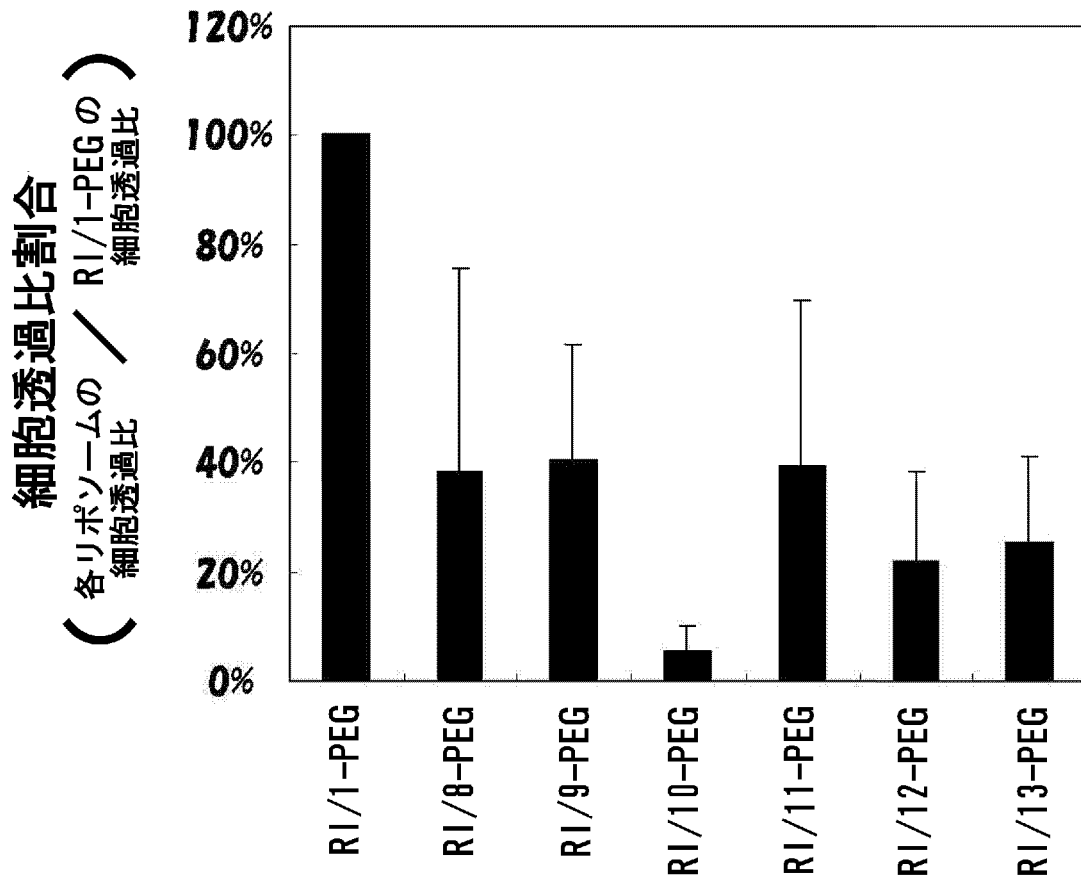
[図3]



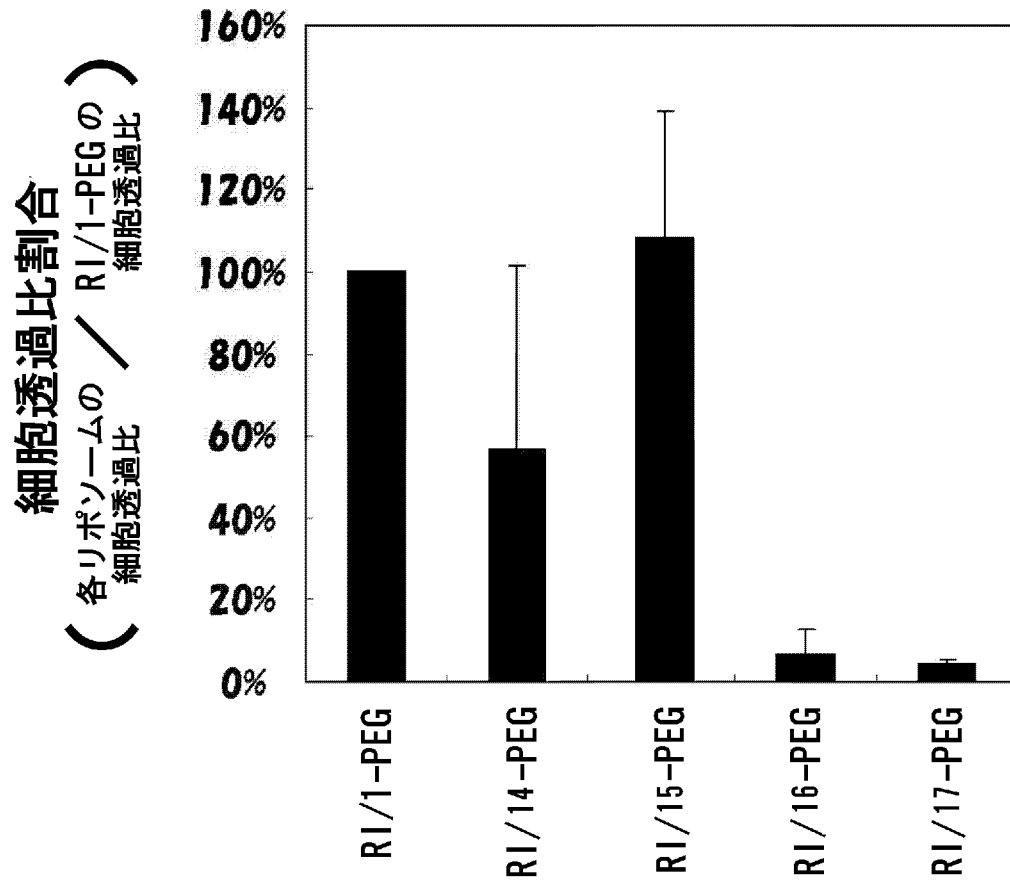
[図4]



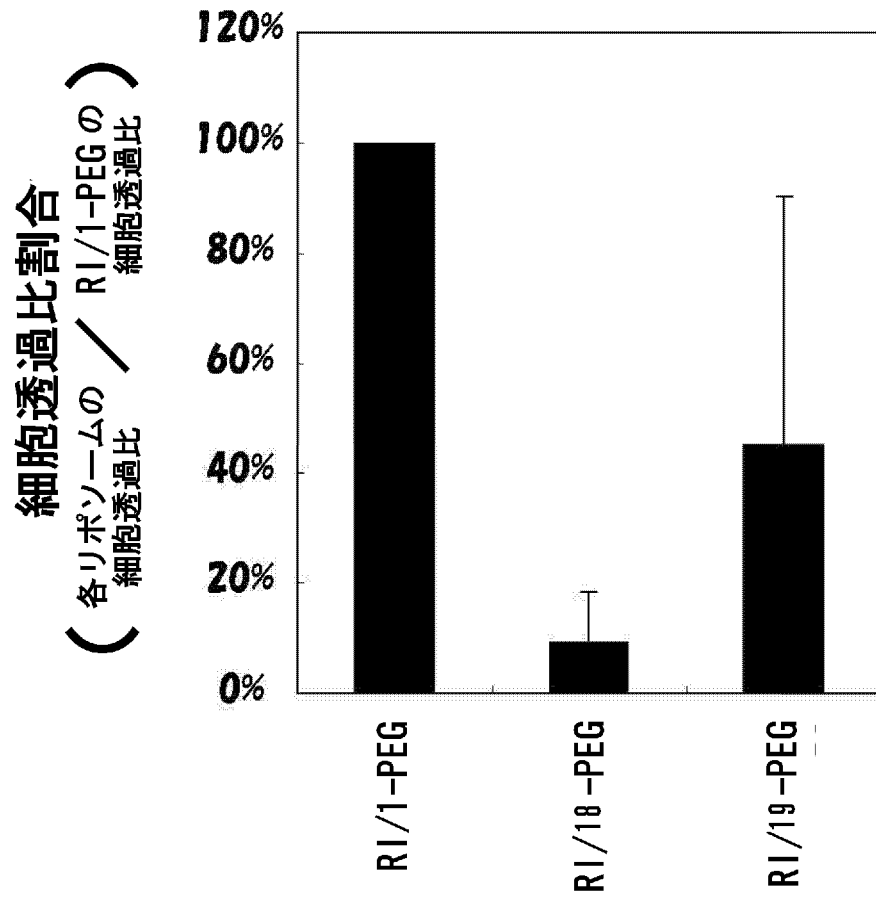
[図5]



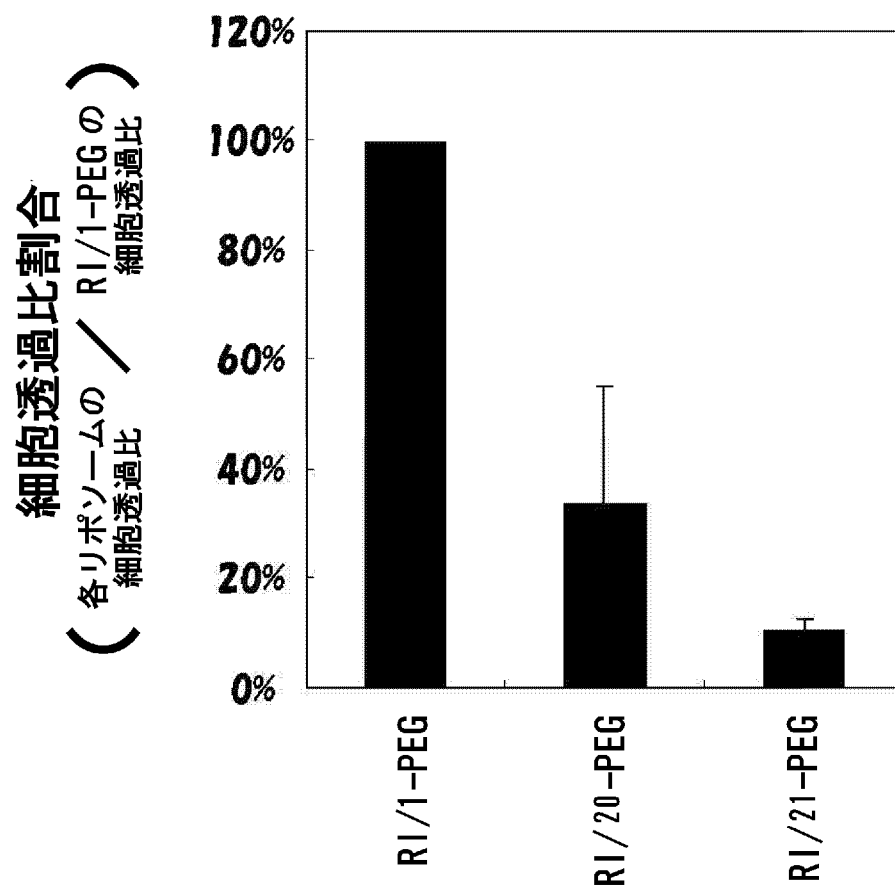
[図6]



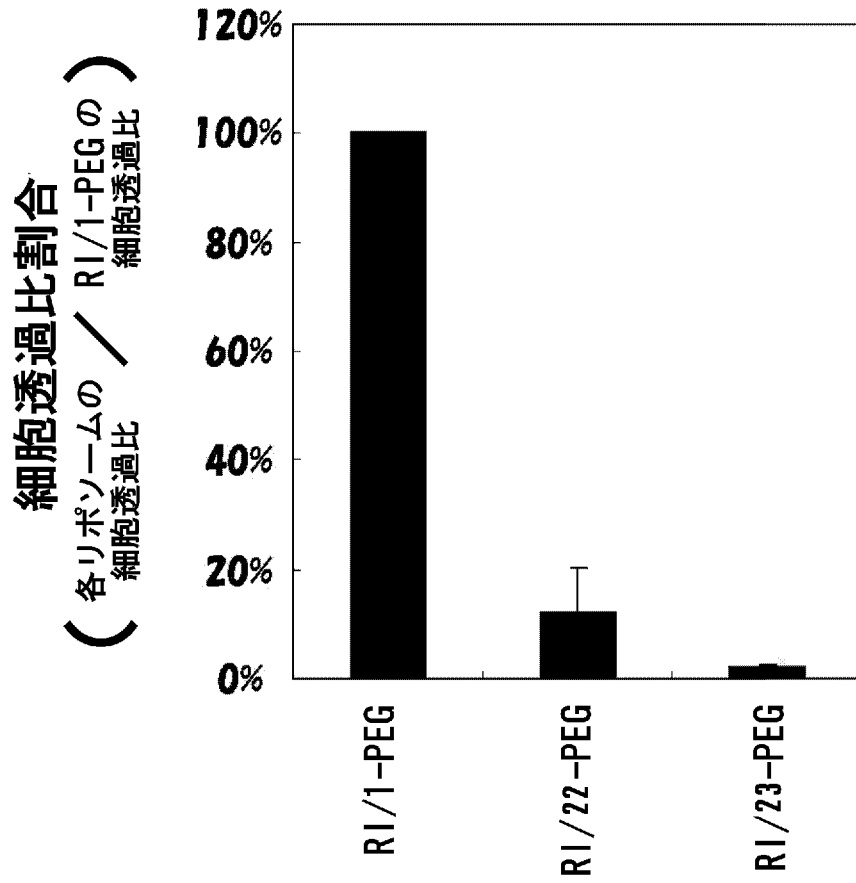
[図7]



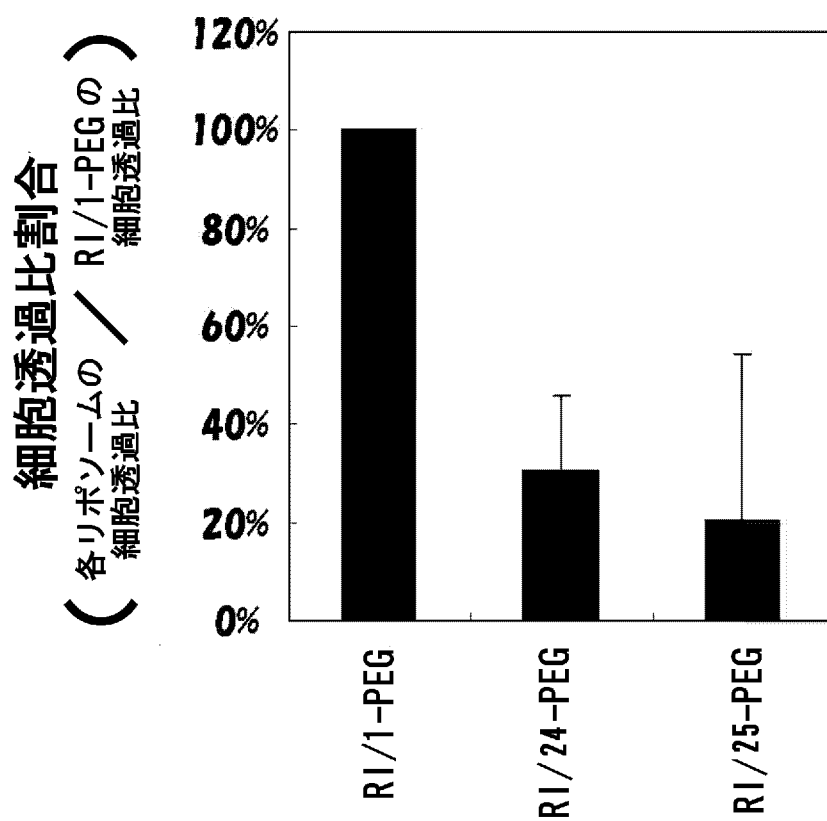
[図8]



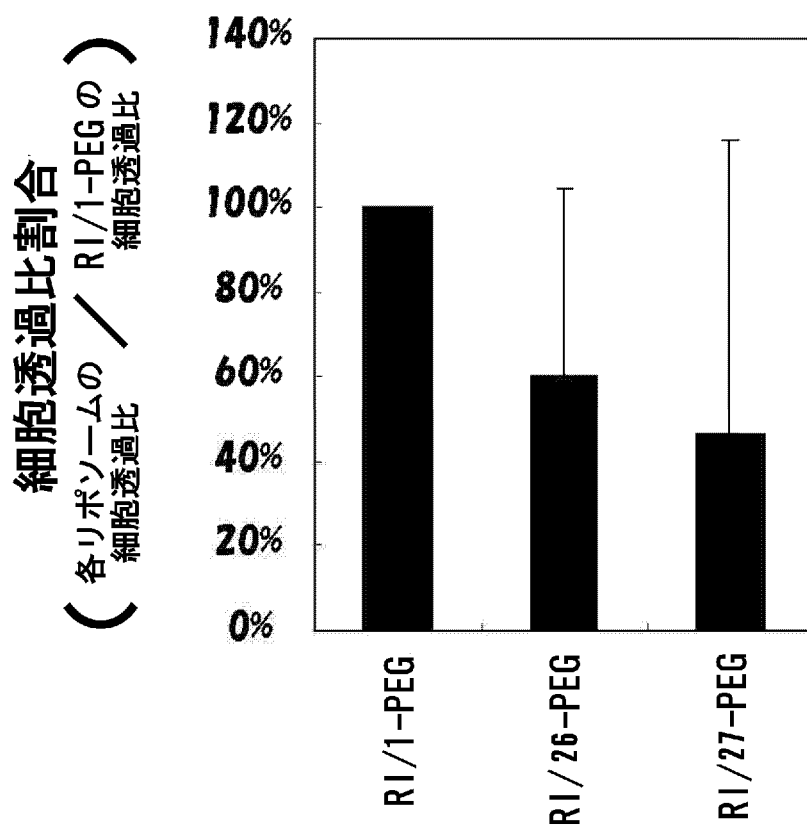
[図9]



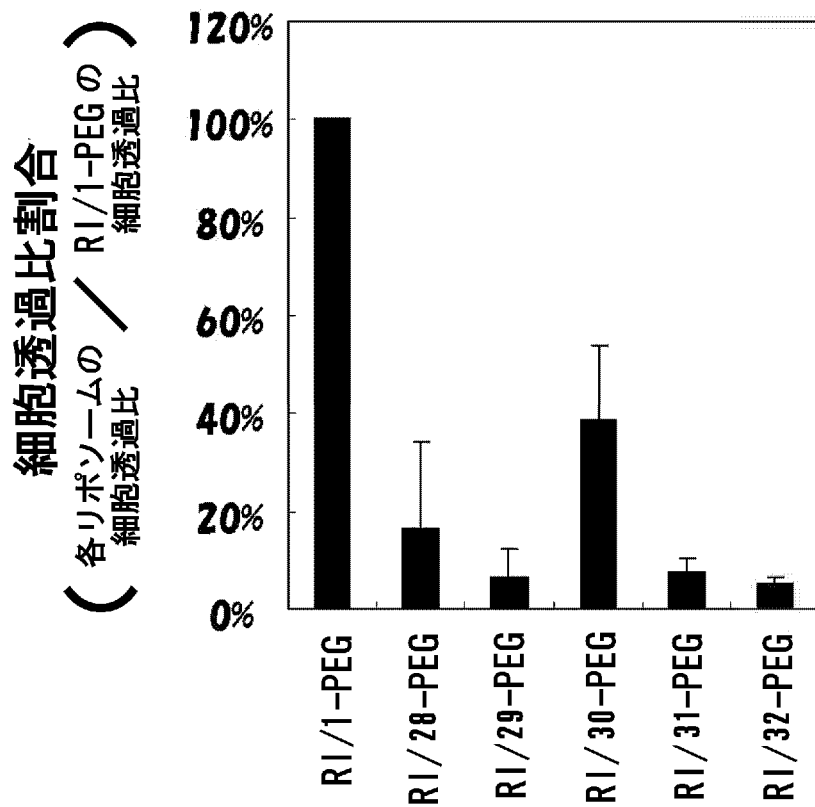
[図10]



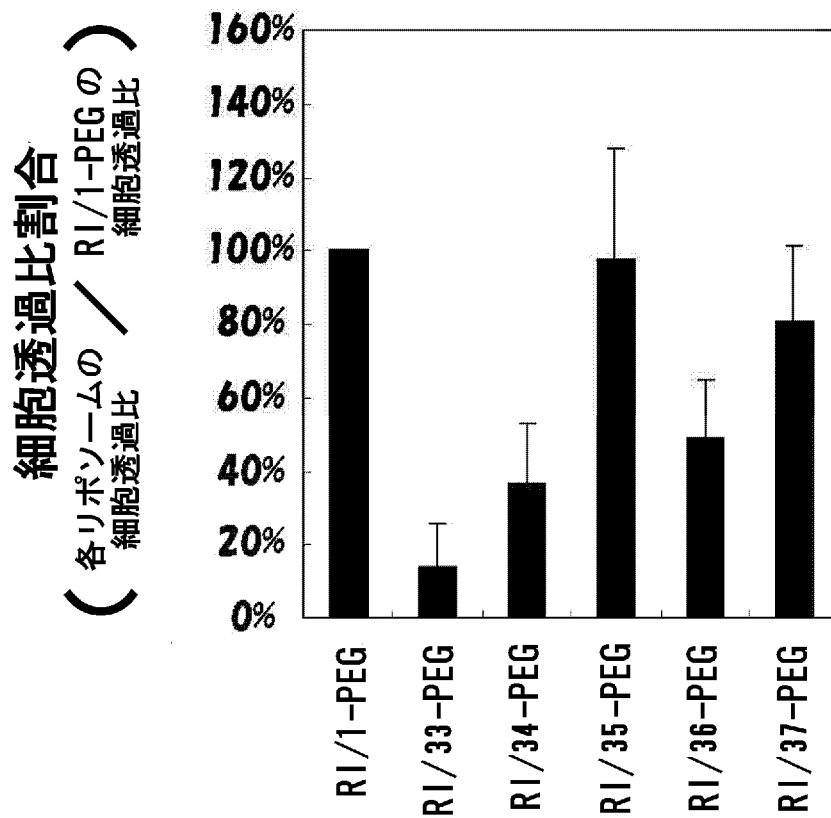
[図11]



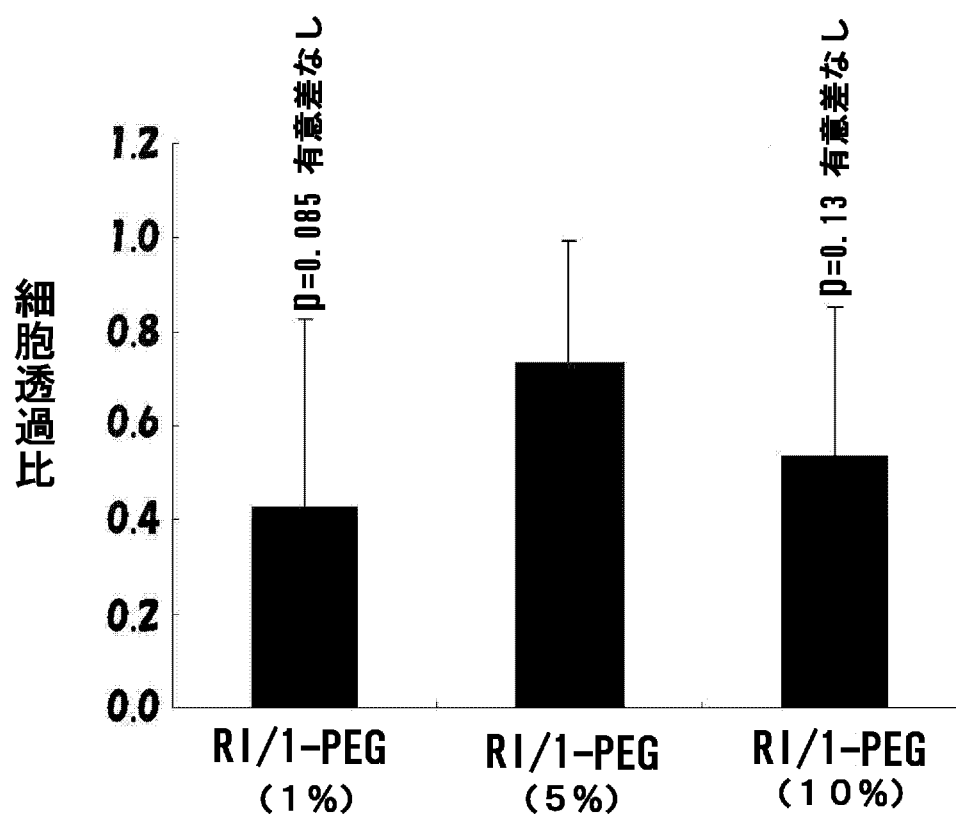
[図12]



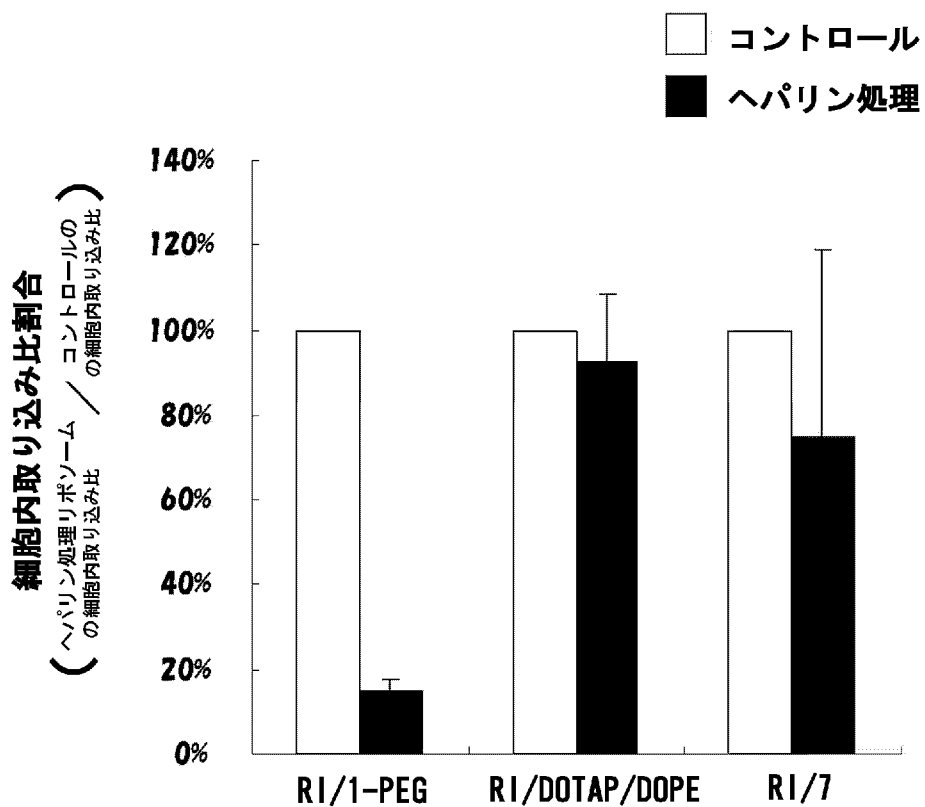
[図13]



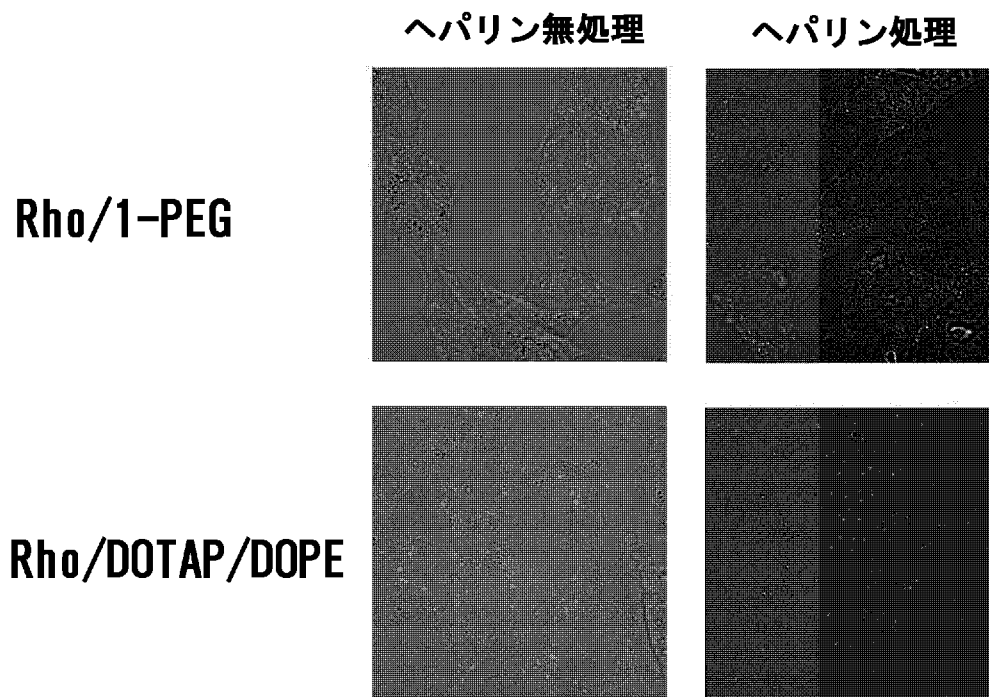
[図14]



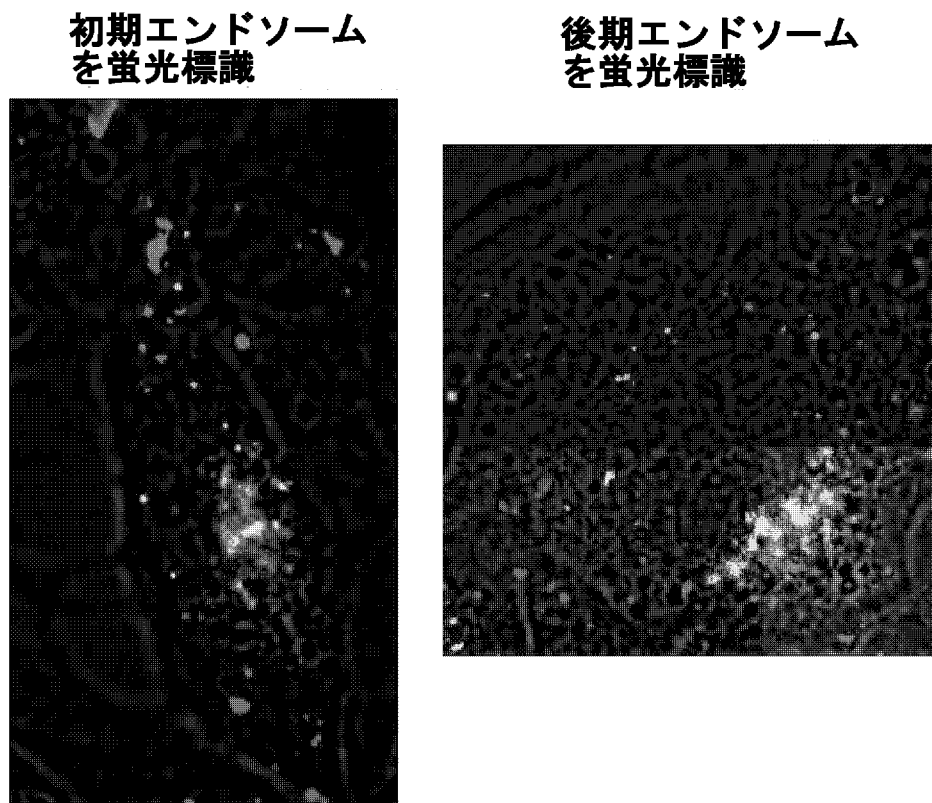
[図15]



[図16]

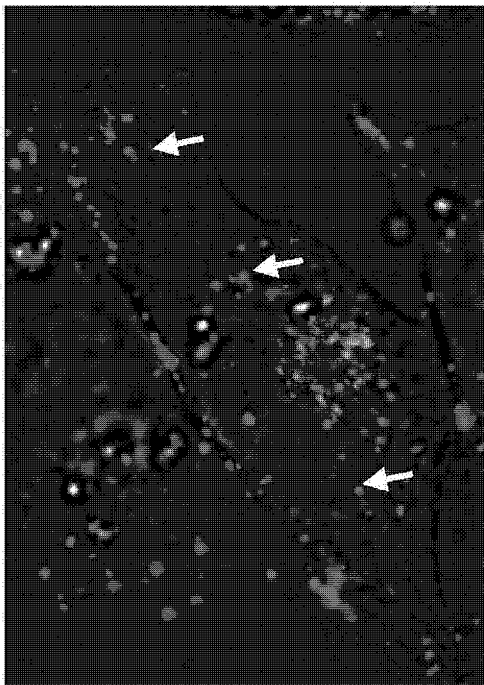


[図17]

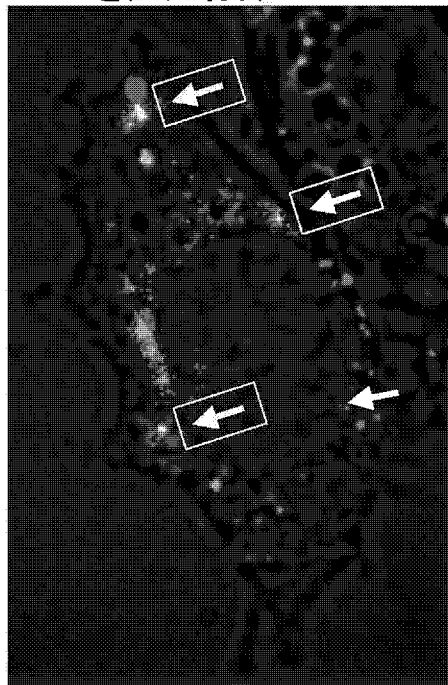


[図18]

初期エンドソーム
を蛍光標識



後期エンドソーム
を蛍光標識



→ ローダミン (リポソーム) と
LysoTracker Blue (リソソーム) とが共在

→ ローダミン (リポソーム) と
GFP (エンドソーム) とが共在

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/072485

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/06(2006.01) i, A61K9/127(2006.01) i, A61K47/42(2006.01) i, C07K14/47(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)

C07K7/06, A61K9/127, A61K47/42, C07K14/47

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/REGISTRY (STN), PubMed, JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-31142 A (National University Corporation Hokkaido University), 14 February 2008 (14.02.2008), entire text (Family: none)	1-25
Y	WO 2007/037444 A1 (National University Corporation Hokkaido University), 05 April 2007 (05.04.2007), entire text & EP 1930436 A1 & US 2008/0241917 A1	1-25
Y	Hideyoshi HARASHIMA et al., "Development of Multifunctional Envelope Type Artificial Viral like Gene Delivery System", Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 2007, vol.127, no.10, pages 1655 to 1672	1-25

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
02 March, 2011 (02.03.11)

Date of mailing of the international search report
15 March, 2011 (15.03.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07K7/06(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, C07K14/47(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. C07K7/06, A61K9/127, A61K47/42, C07K14/47

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 1971-2011年
 日本国実用新案登録公報 1996-2011年
 日本国登録実用新案公報 1994-2011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)
 CA/REGISTRY (STN), PubMed, JSTPlus (JDreamII)

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	JP 2008-31142 A (国立大学法人 北海道大学) 2008.02.14, 全文 (ファミリーなし)	1-25
Y	WO 2007/037444 A1 (国立大学法人 北海道大学) 2007.04.05, 全文 & EP 1930436 A1 & US 2008/0241917 A1	1-25
Y	原島 秀吉 他, 多機能エンベロープ型人工遺伝子デリバリーシステム の創製, 薬学雑誌, 2007, Vol. 127, No. 10, p. 1655-1672	1-25

☐ 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、一般的な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 02.03.2011	国際調査報告の発送日 15.03.2011
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) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4 N 9 2 8 1