

(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
2016 年 12 月 15 日(15.12.2016)



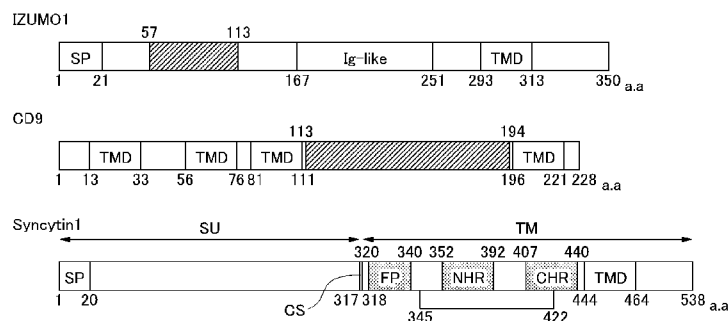
(10) 国際公開番号
WO 2016/199674 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 19/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/066455
- (22) 国際出願日: 2016 年 6 月 2 日(02.06.2016)
- (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 2015-118432 2015 年 6 月 11 日(11.06.2015) JP
- (71) 出願人: 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目 1 5 番
4 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 須藤 慧(SUDO, Kei); 〒2238522 神奈川県
横浜市港北区日吉 3 丁目 1 4 番 1 号 慶應義塾
大学理工学部内 Kanagawa (JP). 新倉 啓介
(NIIKURA, Keisuke); 〒2238522 神奈川県横浜市港
北区日吉 3 丁目 1 4 番 1 号 慶應義塾大学理工工
学部内 Kanagawa (JP). 土居 信英(DOI, Nobuhide);
〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉 3 丁目 1
- 4 番 1 号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa
(JP).
- (74) 代理人: 正林 真之, 外(SHOBAYASHI, Masayuki
et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内 1 - 7 -
1 2 サピアタワー Tokyo (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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), ユー
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),

[続葉有]

(54) Title: FUSION PROTEIN OR CONJUGATED PROTEIN, INTRACELLULAR DELIVERY CARRIER, PARTIAL PEPTIDE, CELL MEMBRANE PERMEATION ENHANCER, DNA, AND VECTOR

(54) 発明の名称: 融合タンパク質又は複合タンパク質、細胞内送達用担体、部分ペプチド、細胞膜透過促進剤、DNA、及びベクター



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a fusion protein or conjugated protein having excellent cell membrane permeability, containing a partial peptide derived from human, and suitable for intracellular delivery; an intracellular delivery carrier comprising such a fusion protein or conjugated protein; a partial peptide; a cell membrane permeation enhancer comprising the partial peptide; DNA; and a vector. The fusion protein or conjugated protein has a partial peptide comprising at least seven successive amino acid residues of an amino acid sequence encoded by a predetermined DNA, and a ligand directly or indirectly bound to the partial peptide and having the capability of binding to cell surfaces. The ligand is preferably an antibody. The intracellular delivery carrier comprises the fusion protein or conjugated protein. The cell membrane permeation enhancer comprises the partial peptide.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2016/199674 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

本発明の課題は、細胞膜透過性に優れかつヒト由来である部分ペプチドを含む、細胞内送達に適した融合タンパク質又は複合タンパク質、このような融合タンパク質又は複合タンパク質からなる細胞内送達用担体、部分ペプチド並びに部分ペプチドからなる細胞膜透過促進剤、DNA、及びベクターの提供である。融合タンパク質又は複合タンパク質は、所定のDNAがコードするアミノ酸配列のうち少なくとも7個の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチドと、該部分ペプチドと直接的又は間接的に結合され、かつ、細胞表面に対する結合能を有するリガンドと、を有する。リガンドが、好ましくは、抗体である。細胞内送達用担体は、上記融合タンパク質又は複合タンパク質からなる。細胞膜透過促進剤は、上記部分ペプチドからなる。

明 細 書

発明の名称：

融合タンパク質又は複合タンパク質、細胞内送達用担体、部分ペプチド、細胞膜透過促進剤、DNA、及びベクター

技術分野

[0001] 本発明は、融合タンパク質又は複合タンパク質、細胞内送達用担体、部分ペプチド、細胞膜透過促進剤、DNA、及びベクターに関する。

背景技術

[0002] 近年、薬物の過剰投与や副作用を抑制し、安全に、かつ、効果的に薬物投与を行うための手段である、ドラッグデリバリーシステム（Drug delivery system：DDS）に関する様々な研究・開発がなされている。

[0003] このDDSを利用して、様々な薬剤を細胞に送達するための試みがなされている一方で、例えば、タンパク質等の生体高分子のように、中には細胞膜透過性の低い薬剤も存在する。

[0004] そこで、このような細胞膜透過性の低い薬剤を、細胞内に効率よく送達させることが求められており、そのための技術として、近年、細胞膜透過性ペプチドが注目されている。

[0005] 例えば、細胞膜透過性ペプチドとしては、HIVの転写因子であるTATペプチドが知られている（特許文献1を参照）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開平10-33186号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] ところで、細胞膜透過における作用であるエンドサイトーシスにおいては

、まず、リガンドが細胞表面に存在する受容体を認識し、細胞表面に結合してから、細胞膜内に取り込まれ、エンドソームと結合する。そして、エンドソームとの結合後、リガンドがエンドソームから離脱し、細胞内にリガンドが放出されることで、細胞内にリガンドが取り込まれる。

[0008] 上記T A Tペプチドは、エンドソームからの離脱性（以下、本明細書において「エンドソーム離脱性」ということがある。）が低いため、細胞内に目的の活性成分を十分に放出できず、細胞膜透過性が低いという問題がある。

[0009] 他方、ウイルス感染時や受精時における膜融合に関わる因子である、H A 2（ウイルス由来）、B 1 8（ウニ由来）、B 5 5（ウニ由来）という膜融合ペプチドが知られている。これらのペプチドは、エンドソーム離脱性に優れているため、細胞膜透過性の高い細胞内送達のためのペプチドとして利用可能であるとも考えられる。

[0010] しかしながら、上記H A 2、B 1 8、B 5 5は、ヒト由来のペプチドではないため、D D Sに応用する際に免疫原性が生じることが懸念される。

[0011] そのため、細胞内送達のためのペプチドとして、細胞膜透過性に優れるだけでなく、免疫原性が生じにくいヒト由来のペプチドが求められている。

[0012] 本発明は、以上の実情に鑑みてなされたものであり、細胞膜透過性に優れ、かつ、ヒト由来である部分ペプチドを含む、細胞内送達に適した融合タンパク質又は複合タンパク質を提供することを目的とする。更に、本発明は、このような融合タンパク質又は複合タンパク質からなる細胞内送達用担体、部分ペプチド及び該部分ペプチドからなる細胞膜透過促進剤、該部分ペプチドをコードするD N A、並びに該D N Aが組み込まれたベクター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

[0013] 本発明者らは、ヒト由来の膜融合関連タンパク質であるI Z U M O 1、C D 9、S y n c y t i n 1の一部のアミノ酸残基からなる部分ペプチドが、優れたエンドソーム離脱性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。より具体的には、本発明は以下のようなものを提供する。

[0014] (1) 以下の (a) から (d) のいずれかに記載の DNA がコードするアミノ酸配列のうち少なくとも 7 個の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチドと、

該部分ペプチドと直接的又は間接的に結合され、かつ、細胞表面に対する結合能を有するリガンドと、

を有する、融合タンパク質又は複合タンパク質。

(a) 配列番号 1、2、又は 3 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 1、2、又は 3 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有する DNA

(c) 配列番号 1、2、又は 3 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する DNA

(d) 配列番号 1、2、又は 3 に記載のアミノ酸配列と 90% 以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる DNA

[0015] (2) 前記リガンドが、抗体である、(1) に記載の融合タンパク質又は複合タンパク質。

[0016] (3) (1) 又は (2) に記載の融合タンパク質。

[0017] (4) (1) 又は (2) に記載の融合タンパク質又は複合タンパク質からなる、細胞内送達用担体。

[0018] (5) 以下の (a) から (d) のいずれかに記載の DNA がコードするアミノ酸配列のうち少なくとも 7 個の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチド。

(a) 配列番号 1、2、又は 3 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 1、2、又は 3 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズできる

塩基配列を有するDNA

(c) 配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA

(d) 配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA

[0019] (6) (5)に記載の部分ペプチドからなる細胞膜透過促進剤。

[0020] (7) (1)又は(2)に記載の融合タンパク質又は(5)に記載の部分ペプチドをコードするDNA。

[0021] (8) (7)に記載のDNAが組み込まれたベクター。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、細胞膜透過性に優れ、かつ、ヒト由来である部分ペプチドを含む、細胞内送達に適した融合タンパク質又は複合タンパク質を提供することができる。更に、本発明によれば、このような融合タンパク質又は複合タンパク質からなる細胞内送達用担体、部分ペプチド及び該部分ペプチドからなる細胞膜透過促進剤、該部分ペプチドをコードするDNA、並びに該DNAが組み込まれたベクターを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]「IZUMO1」、「CD9」、「Syncytin1」のドメイン構造を示す図である。

[図2] eGFP融合タンパク質のDNAコンストラクトの模式図を示す図である。

[図3] eGFP-TAT含有融合タンパク質のDNAコンストラクトの模式図を示す図である。

[図4] eGFP-TAT融合タンパク質、eGFP-HA2-TAT融合タンパク質、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT融合タンパク質についての蛍光強度のグラフを示す。

[図5] eGFP-TAT融合タンパク質、eGFP-HA2-TAT融合タンパク質、eGFP-Syncytin1 (FP)-TAT融合タンパク質についての蛍光強度のグラフを示す。

[図6] eGFP-TAT融合タンパク質、eGFP-HA2-TAT融合タンパク質、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT融合タンパク質、eGFP-Syncytin1 (FP)-TAT融合タンパク質のHeLa細胞内に送達後における、細胞内のeGFPの蛍光がLysoTrackerの蛍光と共局在している面積のeGFPの蛍光に対する面積比（右軸）と、LysoTrackerの蛍光強度（左軸）のグラフを示す図である。

[図7] eGFP-TAT融合タンパク質（終濃度10 μM）、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質（終濃度1 μM）、eGFP-IZUMO1₈₁₋₁₁₃-TAT融合タンパク質（終濃度1 μM）、eGFP-IZUMO1₈₁₋₁₁₃-TAT融合タンパク質（終濃度10 μM）についての蛍光強度のグラフを示す。

[図8] eGFP-TAT融合タンパク質（終濃度10 μM）、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質（終濃度1 μM）、eGFP-IZUMO1₅₇₋₇₅-TAT融合タンパク質（終濃度1 μM）、eGFP-IZUMO1₅₇₋₇₅-TAT融合タンパク質（終濃度10 μM）、eGFP-IZUMO1₇₆₋₉₄-TAT融合タンパク質（終濃度1 μM）、eGFP-IZUMO1₇₆₋₉₄-TAT融合タンパク質（終濃度10 μM）、eGFP-IZUMO1₉₅₋₁₁₃-TAT融合タンパク質（終濃度1 μM）についての蛍光強度のグラフを示す。

[図9] ヒト由来細胞膜透過性ペプチドの候補であるIZUMO1₅₇₋₁₁₃、CD9₁₁₃₋₁₉₄、及びSyncytin1₃₂₀₋₄₄₀の二次構造予測について示した図である。

[図10] eGFP-TAT-NLS含有融合タンパク質のDNAコンストラクトの模式図を示す図である。

[図11] eGFP-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT融合タンパク質及び eGFP-TAT融合タンパク質について、HeLa（ヒト子宮頸癌細胞）、HA431（ヒト上皮様細胞癌細胞）、HepG2（ヒト肝癌細胞）、及び、SK-N-SH（ヒト神経芽腫細胞）に添加したときの蛍光強度のグラフを示す。

[図12] SNAP-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT融合タンパク質、SNAP-TAT融合タンパク質、 β -Gal-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT融合タンパク質及び β -Gal-TAT融合タンパク質についての蛍光強度のグラフを示す。

発明を実施するための形態

[0024] 以下、本発明の具体的な実施形態について詳細に説明するが、本発明は以下の実施形態に何ら限定されるものではなく、本発明の目的の範囲内において、適宜変更を加えて実施することができる。

[0025] <融合タンパク質又は複合タンパク質>

本発明の融合タンパク質又は複合タンパク質は、以下の（a）から（d）のいずれかに記載のDNAがコードするアミノ酸配列のうち少なくとも7個の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチドと、該部分ペプチドと直接的又は間接的に結合され、かつ、細胞表面に対する結合能を有するリガンドとを有する。

（a）配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA

（b）配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有するDNA

（c）配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA

（d）配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列と90%以上の相同

性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA

[0026] 本発明の融合タンパク質又は複合タンパク質は、部分ペプチドが上記構成を有することで、高いエンドソーム離脱性を有するため、優れた細胞膜透過性を奏することができる。なお、本発明の「融合タンパク質」とは、該部分ペプチドと、他の1種以上のタンパク質とが結合されたタンパク質のことを指す。また、本発明の「複合タンパク質」とは、該部分ペプチドと、タンパク質以外の成分（例えば、低分子化合物、核酸、糖鎖、ナノ粒子等）とが結合された複合体のことを指す。

[0027] (部分ペプチド)

本発明の融合タンパク質又は複合タンパク質における部分ペプチドは、上記(a)から(d)のいずれかに記載のDNAがコードするアミノ酸配列のうち少なくとも7個の連続するアミノ酸残基からなるペプチドである。

[0028] 配列番号1に記載のアミノ酸配列は、ヒト由来の膜融合関連タンパク質IZUMO1のN末端付近の融合コアヘリックスペプチドの一部であって、IZUMO1のN末端側から数えた場合に76-113番目に相当するアミノ酸残基が表すアミノ酸配列である。

[0029] 配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち、特に、部分ペプチドが高いエンドソーム離脱性を有し、優れた細胞膜透過性を奏することから、IZUMO1のN末端側から数えた場合に76-94番目に相当するアミノ酸残基が表すアミノ酸配列（配列番号4）、IZUMO1のN末端側から数えた場合に81-113番目に相当するアミノ酸残基が表すアミノ酸配列（配列番号5）、又は、IZUMO1のN末端側から数えた場合に95-113番目に相当するアミノ酸残基が表すアミノ酸配列（配列番号6）が特に好ましい。

[0030] 配列番号2に記載のアミノ酸配列は、ヒト由来の膜融合関連タンパク質CD9のC末端付近の第2細胞外ループペプチドの一部であって、CD9のN末端側から数えた場合に113-194番目に相当するアミノ酸残基が表すアミノ酸配列である。

[0031] 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち、特に、部分ペプチドが高いエン

ドソーム離脱性を有し、優れた細胞膜透過性を奏することから、CD9のN末端側から数えた場合に115-133番目に相当するアミノ酸残基が表すアミノ酸配列（配列番号7）、CD9のN末端側から数えた場合に138-151番目に相当するアミノ酸残基が表すアミノ酸配列（配列番号8）、又は、CD9のN末端側から数えた場合に182-190番目に相当するアミノ酸残基が表すアミノ酸配列（配列番号9）が特に好ましい。

[0032] 配列番号3に記載のアミノ酸配列は、ヒト由来の膜融合関連タンパク質Syncytin1を構成するC末端側のTMDメインのうち、膜融合に関わるFPペプチドのアミノ酸配列であって、Syncytin1のN末端側から数えた場合に320-340番目に相当するアミノ酸残基が表すアミノ酸配列である。

[0033] 配列番号3に記載のアミノ酸配列のうち、特に、部分ペプチドが高いエンドソーム離脱性を有し、優れた細胞膜透過性を奏することから、Syncytin1のN末端側から数えた場合に322-340番目に相当するアミノ酸残基が表すアミノ酸配列（配列番号44）が好ましく、Syncytin1のN末端側から数えた場合に321-334番目に相当するアミノ酸残基が表すアミノ酸配列（配列番号10）が特に好ましい。

[0034] 本発明の部分ペプチドを構成するアミノ酸残基の数は、上記（a）から（d）のいずれかに記載のDNAがコードするアミノ酸配列のうち少なくとも7個の連続するアミノ酸残基であれば、特に限定されず、上記配列番号1～3がコードするアミノ酸残基の数等に応じて適宜選択することができる。例えば、本発明の部分ペプチドを構成するアミノ酸残基を、上記（a）から（d）のいずれかに記載のDNAがコードするアミノ酸配列のうち、少なくとも10個、12個、15個、18個、20個、30個、40個、50個、60個、70個等の連続するアミノ酸残基によって構成してもよい。また、その上限も特に限定されず、例えば、本発明の部分ペプチドを構成するアミノ酸残基を、上記（a）から（d）のいずれかに記載のDNAがコードするアミノ酸配列のうち、75個以下、65個以下、55個以下、45個以下、3

5個以下、25個以下、22個以下、17個以下、16個以下、14個以下、13個以下等の連続するアミノ酸残基によって構成してもよい。

[0035] 配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAの変異体やホモログには、配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有するDNAや、配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列と90%以上（好ましくは、92%以上、より好ましくは、95%以上、更に好ましくは、99%以上）の相同性を有する塩基配列からなるDNAも含まれる。配列番号1～10のいずれかに記載の塩基配列に相補的な塩基配列とハイブリダイズできる「ストリンジェントな条件」としては、例えば、通常のハイブリダイゼーション緩衝液中、40～70℃（好ましくは、50～67℃、より好ましくは、60～65℃）で反応を行い、塩濃度15～300mM（好ましくは、15～150mM、より好ましくは15～60mM、更に好ましくは、30～50mM）の洗浄液中で洗浄を行う条件が挙げられる。

[0036] 本発明の部分ペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAには、配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAも含まれる。ここで、「1もしくは複数」とは、通常、3アミノ酸以内を指し、好ましくは2アミノ酸以内である。部分ペプチドが細胞膜透過性作用を維持する場合、変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。特に、部分ペプチドのアミノ酸残基の数が少なく（例えば、部分ペプチドのアミノ酸残基の数が7～10である場合）、かつ、変異されるアミノ酸の数の多い場合（例えば、3アミノ酸以内である場合）、変異するアミノ酸側鎖の性質が保存されるように、別のアミノ酸に変異されることで、部分ペプチドが細胞膜透過性作用を維持しやすくなる。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ

酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C、M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ酸（R、K、H）、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、W）を挙げることができる（なお、上記括弧内のアルファベットは、いずれもアミノ酸の一文字標記を表す）。

[0037] 本発明の部分ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列と相同性が高い方が好ましい。例えば、本発明の部分ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列との相同性は、90%以上が好ましく、92%以上がより好ましく、95%以上（96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）が更に好ましい。他方、あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている（Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadié-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413）。配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列も、配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列と相同性が高い方が好ましい。例えば、配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列と、配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列との相同性は、85%以上が好ましく、90%以上がより好

ましく、95%以上（96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）が更に好ましい。

[0038] アミノ酸配列や塩基配列の相同性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメータは例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータは例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメータを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

[0039] 本発明における「DNA」は、センス鎖又はアンチセンス鎖（例えば、プローブとして使用できる）のいずれでもよく、その形状は一本鎖と二本鎖のいずれでもよい。また、ゲノムDNAであっても、cDNAであっても、合成されたDNAであってもよい。

[0040] 本発明において、DNAを取得する方法としては、特に限定されないが、mRNAから逆転写することでcDNAを得る方法（例えば、RT-PCR法）、ゲノムDNAから調製する方法、化学合成により合成する方法、ゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーから単離する方法等の公知の方法（例えば、特開平11-29599号公報参照）が挙げられる。

[0041] 本発明の部分ペプチドは、例えば、Fmoc合成法など公知の固相ペプチド合成法により化学合成することで作製できる。また、部分ペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを含む発現ベクターが導入された形質転換体を

使用することでも作製できる。すなわち、まず、この形質転換体を適宜の条件で培養し、このDNAがコードするタンパク質（部分ペプチド）を合成させる。

[0042] 形質転換体を得るための宿主としては、ベクターに適合し形質転換されうるものであればよく、例えば、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等の、公知の天然細胞又は人工的に樹立された細胞（特開平11-29599号公報参照）が挙げられる。形質転換体を得るための発現ベクターは、適当なベクターに上述のDNAを挿入することにより、作製できる。「適当なベクター」とは、原核生物及び／又は真核生物の各種の宿主内で複製保持又は自己増殖できるものであればよく、使用の目的に応じて適宜選択できる。ベクターの導入方法は、ベクターや宿主の種類等に応じて適宜選択できる。その具体例としては、特に限定されないが、プロトプラスト法、コンピテント法等の公知の方法（例えば、特開平11-29599号公報参照）が挙げられる。また、DNAは、精製等を目的として、必要に応じて、タグ（6×His、FLAG等）や、トロンビン認識配列（TC S）等が合成するタンパク質に含まれるように、構成してもよい。

[0043] 形質転換体の培養は、部分ペプチドが大量にかつ容易に取得できるように、形質転換体の種類等に応じて、公知の栄養培地から適宜選択し、温度、栄養培地のpH、培養時間等を適宜調整して行うことができる（例えば、特開平11-29599号公報参照）。このように、形質転換体により合成されたタンパク質を形質転換体又は培養液から回収することにより、本発明の部分ペプチドを得ることができる。なお、部分ペプチドの単離方法及び精製方法としては、特に限定されず、溶解度を利用する方法、分子量の差を利用する方法、荷電を利用する方法等の公知の方法（例えば、特開平11-29599号公報参照）が挙げられる。

[0044] （リガンド）

本発明の融合タンパク質又は複合タンパク質におけるリガンドは、細胞表面に対する結合能を有するものである。

[0045] 細胞表面に対する結合能を有するリガンドとしては、例えば、細胞選択的マーカーとしての糖鎖、タンパク質、抗原等の細胞表面の特定の対象物質（受容体等）に対して特異的相互作用を示す分子認識素子が挙げられ、より具体的には、抗体、レクチン、サイトカイン、ホルモン、神経伝達物質、ペプチド（T A T、ポリアルギニン等）、糖鎖（キチン、キトサン、ヒアルロン酸等）が挙げられる。特に、細胞選択性が高いことから、抗体を用いることが好ましい。抗体としては、例えば、一本鎖抗体（s c F v）、F a b、ドメイン抗体、D i a b o d y等の低分子抗体（例えば、分子量10～100 k D aの抗体）を好適に用いることができる。

[0046] リガンドは、上記部分ペプチドと直接的又は間接的に結合する。結合の方法は、リガンドの種類等に応じて、適宜選択することができる。例えば、リガンドが、抗体である場合、上記部分ペプチドと抗体との融合タンパク質を、上記で述べた部分ペプチドと同様に遺伝子工学的に作製することができる。この際、リンカーとなるアミノ酸配列を部分ペプチドと抗体との間に挿入することで、リンカーを介して間接的に部分ペプチドと抗体とを結合させてもよく、リンカーを介さずに、直接的に部分ペプチドと抗体とを結合させてもよい。リンカーとなるアミノ酸残基の数は、特に限定されず、タンパク質全体のアミノ酸残基の数等を考慮して例えば、1～100アミノ酸残基であってもよい。リンカーとなるアミノ酸配列としては、G G G G Sを3回繰り返すフレキシブルリンカー（配列番号11）等が挙げられる。また、リンカーとなるアミノ酸配列がコードするペプチド自身が、細胞膜透過性が高くなるように設計し、融合タンパク質の細胞膜透過性をより一層高めてもよい。リンカーとなるアミノ酸配列がコードするペプチド自身が、細胞膜透過性を高くなるように設計するには、上記配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列との相同性が高くなるように設計してもよく、例えば、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上等となるように設計してもよい。

[0047] リガンドが、抗体等のタンパク質でない場合（例えば、リガンドが低分子化合物や糖鎖である場合）、リガンドが部分ペプチドに直接的に結合するに

は、部分ペプチド内の末端又は内部に存在する官能基（例えば、カルボキシル基、アミノ基、スルフヒドリル基等）を利用して、化学的に結合することができる。その際の化学的な結合様式としては、例えば、アミド結合、チオエーテル結合、エステル結合等が挙げられる。また、部分ペプチドとリガンドとの間接的な結合は、主に、直接的に結合させることが困難である場合や、間接的に結合をさせた方が好適である場合に行う。間接的な結合は、リンカーを介して行うことができる。この場合のリンカー（つまり、リガンドがタンパク質でない場合のリンカー）としては、両端に反応性基を有し、2分子を連結させうる構造の分子であれば、特に限定されるものでないが、該反応性基としては、例えば、マレイミド基、アルデヒド基、NHSエステル等が挙げられる。また、リガンドがタンパク質でない場合のリンカーの具体例としては、ポリエチレングリコール等が挙げられる。

[0048] 上記で述べたように、本発明の部分ペプチドとリガンドとの組み合わせは、部分ペプチド及びリガンドの性質、構造相関等を考慮し、公知の結合方法の中から、本発明のペプチドとリガンドとのそれぞれの組み合わせに適した結合方法を選択することができる。

[0049] （その他）

本発明の融合タンパク質又は複合タンパク質は、生理活性を有する有効成分（以下、本明細書において、「有効成分」ということがある。）を、その分子中に含んでもよい。あるいは、本発明の融合タンパク質又は複合タンパク質が、有効成分を分子中に含まなくてもよく、この場合、例えば、細胞内送達に用いる場合に、本発明の融合タンパク質又は複合タンパク質と、有効成分（例えば、核酸等）との複合体を形成してもよい。

[0050] 有効成分がタンパク質である場合、上記部分ペプチドと、有効成分と、必要に応じて更にリガンドとして作用するタンパク質（抗体等）との融合タンパク質を、上記で述べた部分ペプチドと同様に遺伝子工学的に作製することができる。この際、リンカーとなるアミノ酸配列を、上記リガンドと同様に、それぞれのペプチドの間に挿入することで、リンカーを介して間接的にそ

それぞれのペプチドを結合させてもよく、リンカーを介さずに、直接的にそれぞれのペプチドを結合させてもよい。リンカーとなるアミノ酸配列がコードするペプチドは、上記のリガンドと部分ペプチドとの間に挿入されるリンカーと同様のものを用いることができる。また、融合タンパク質において、それぞれのペプチドが位置する領域は、特に限定されず、例えば、N末端側から、部分ペプチド、有効成分、リガンドとの順番となるように融合タンパク質を設計してもよく、N末端側から、有効成分、リガンドと、部分ペプチドの順番となるように融合タンパク質を設計してもよく、N末端側から、有効成分、部分ペプチド、リガンドの順番となるように融合タンパク質を設計してもよく、それぞれのタンパク質の性質に応じて、所望の効果を発揮するように適宜設計することができる。なお、有効成分がリガンドとして作用する場合もありえ、その場合は、リガンドと部分ペプチドのみから本発明の融合タンパク質を構成してもよい。

[0051] 有効成分がタンパク質である場合、例えば、抗体（s c F v、F a b、ドメイン抗体、D i a b o d y等）、細胞傷害性の毒素タンパク質（シュードモナス外毒素、リボヌクレアーゼ等）、レポーター酵素（蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ等）、生理活性ペプチド等が挙げられる。有効成分がタンパク質である場合、その有効成分の分子量としては、特に限定されず、他のペプチドの種類、分子量等に応じて、適宜選択することができるが、例えば、1～1000 k D a の範囲内から選択してもよい。

[0052] 有効成分がタンパク質でない場合、有効成分は、部分ペプチド又はリガンドに直接的又は間接的に結合することができる。有効成分が部分ペプチド又はリガンドに直接的に結合するには、部分ペプチド内又はリガンド内の末端又は内部に存在する官能基を利用して、有効成分は化学的に結合することができる。その際の化学的な結合様式は、有効成分と反応する官能基の種類に応じて決定される。また、アビジンとビオチン等の非共有結合を利用して、部分ペプチドとアビジンとの融合タンパク質に、ビオチン標識した有効成分

を結合することもできる。有効成分と、部分ペプチド又はリガンドとの間接的な結合は、主に、直接的に結合させることが困難である場合や、間接的に結合をさせた方が好適である場合に行う。間接的な結合は、リンカーを介して行うことができる。この場合のリンカー（つまり、有効成分がタンパク質でない場合のリンカー）としては、上述の部分ペプチドとリガンドとのリンカーと同様のものを用いることができる。

[0053] タンパク質でない有効成分としては、例えば、低分子化合物（抗体薬物複合体ADCで利用されている抗ガン剤や抗生物質等の薬剤、FITCやTAMRAなどの蛍光色素、MRIやPETのためのレポーターユニット等）、核酸（自殺遺伝子やレポーター遺伝子をコードするDNAやmRNA、siRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー等）、糖鎖、放射性同位元素等が挙げられる。

[0054] 本発明の複合タンパク質は、上述のとおり、部分ペプチドがタンパク質以外の成分と結合した複合体のことを指すものであり、例えば、上記で述べた融合タンパク質と、タンパク質以外の成分を化学的に結合したものや、部分ペプチドと、タンパク質以外のリガンド及び／又は有効成分を結合したものの自体であってもよく、該部分ペプチドと、タンパク質以外の成分でありかつリンカー及び有効成分以外である成分を結合したものであってもよい。

[0055] 本発明の複合タンパク質において、タンパク質以外の成分を結合する場合、該成分としては、例えば、上述した、タンパク質以外のリガンド、有効成分、及びこれらのリンカーの他に、例えば、脂質（リン脂質等）や天然多糖（キチン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸等）が挙げられる。ここで、リポソームや天然多糖複合体等のナノ粒子がキャリアとしてDDSに利用されていることは公知であり、例えば、ナノ粒子形成能を有する脂質や天然多糖を用いることで、本発明の複合タンパク質は、上記のタンパク質以外有効成分を封入したキャリアとして、有効成分の細胞内送達に利用できる。ナノ粒子形成能を有する脂質や天然多糖は、従来の公知の脂質や天然多糖を用いることができ、有効成分、リガンド等の種類に応じて、適宜選

択することができる。また、これらタンパク質以外の成分は、部分ペプチド、リガンド、又は有効成分と直接的に結合してもよく、リンカーを介して間接的に結合してもよい。

[0056] 融合タンパク質のような生体高分子は、特に、細胞膜透過性が低いが、本発明は、融合タンパク質であっても、上記部分ペプチドとの融合タンパク質とすることで、高いエンドソーム離脱性を有し、優れた細胞膜透過性を奏する。このことから、本発明は、融合タンパク質が特に好適である。

[0057] 本発明の融合タンパク質又は複合タンパク質の分子量やサイズは、特に限定されず、例えば、融合タンパク質又は複合タンパク質の分子量が100～1000kDaであってもよく、又は、融合タンパク質又は複合タンパク質のサイズ（粒径）が1～200nmであってもよい。

[0058] 本発明の融合タンパク質又は複合タンパク質は、細胞膜透過性を向上させるために、カチオン性ペプチド（例えば、TATペプチド、ポリアルギニン、ポリリシン、ポリヒスチジン）を分子中に含んでもよい。しかし、カチオン性ペプチドは、アニオン性である細胞膜と静電的に相互作用するため、細胞膜透過性が上昇する一方で、細胞非選択的に相互作用して、細胞内に取り込まれる。そのため、カチオン性ペプチドは、特定の細胞内へ送達を行うという観点では、好ましくない。他方、抗体をリガンドとして用いた場合、抗体は細胞膜透過性が低いため、この細胞膜透過性を上昇させるためには、抗体をTATペプチド等のカチオン性ペプチドと融合せざるを得なかった。しかしながら、本発明の融合タンパク質又は複合タンパク質は、細胞膜透過性に優れるため、カチオン性ペプチドを分子中に含まなくても高い細胞膜透過性を有する。むしろ、カチオン性ペプチドを含むことで、細胞選択性が低くなるため、抗体等の細胞選択性の高いリガンドを利用する場合は、細胞選択性を低くしないため、これらのカチオン性ペプチドは、含まない方が好ましい。

[0059] <細胞内送達用担体>

本発明の細胞内送達用担体は、上記の融合タンパク質又は複合タンパク質

からなる。

[0060] 標的とする細胞は、特に限定されず、例えば、肺細胞、結腸細胞、直腸細胞、肛門細胞、胆管細胞、小腸細胞、胃細胞、食道細胞、胆嚢細胞、肝細胞、膵臓細胞、虫垂細胞、乳細胞、卵巣細胞、子宮頸細胞、前立腺細胞、腎細胞、神経膠芽腫細胞、皮膚細胞、リンパ細胞、絨毛腫瘍細胞、頭頸部細胞、骨原性肉腫細胞、血液細胞等の細胞あるいは、これらの癌細胞（子宮頸癌細胞、肺癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、肛門癌細胞、胆管癌細胞、小腸癌細胞、胃癌細胞、食道癌細胞、胆嚢癌細胞、肝癌細胞、膵臓癌細胞、虫垂癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、腎癌細胞、中枢神経系の癌細胞、神経膠芽腫細胞、神経芽腫細胞、皮膚癌細胞、リンパ腫細胞、絨毛癌腫瘍細胞、頭頸部癌細胞、骨原性肉腫細胞、血液癌細胞、上皮様細胞癌細胞等）に送達することができる。

[0061] 本発明の細胞内送達用担体は、従来の公知の方法によって、細胞内へ送達することができる。例えば、本発明の細胞内送達用担体を単離された細胞に送達する場合、*in vitro*で、細胞内送達用担体と細胞を混合して培養することにより、行うことができる。あるいは、本発明の細胞内送達用担体を動物（ヒトを除く動物を含む）に投与する場合、*in vivo*で、経口投与、注射（静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射等）による投与方法により、送達することができる。

[0062] <細胞膜透過促進剤>

本発明は、上記部分ペプチドからなる細胞膜透過促進剤を含む。本発明における「細胞膜透過促進」は、エンドソーム離脱性の促進を含む。

[0063] <DNA>

本発明は、上記（a）から（d）のいずれかに記載のDNAがコードするアミノ酸配列のうち少なくとも7個の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチドと、該部分ペプチドと直接的又は間接的に結合され、かつ、細胞表面に対する結合能を有するリガンドとを有する融合タンパク質、又は、上記部分ペプチドをコードするDNAを包含する。

[0064] 上記融合タンパク質をコードするDNAは、上記部分ペプチドの合成に用いられるDNAと同様の方法で作製することができる。

[0065] <ベクター>

本発明は、上記（a）から（d）のいずれかに記載のDNAがコードするアミノ酸配列のうち少なくとも7個の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチドと、該部分ペプチドと直接的又は間接的に結合された、細胞表面に対する結合能を有するリガンドとを有する融合タンパク質、又は、上記部分ペプチドをコードするDNAが組み込まれたベクターを包含する。

[0066] 本発明のベクターは、上述の部分ペプチドの合成で用いることができる適当なベクターと同様のベクターを用いることができる。

実施例

[0067] <ヒト由来の細胞膜透過性を有する部分ペプチド候補の選定>

ヒト由来の細胞膜透過性を有する部分ペプチド（以下、本明細書において「ヒト由来細胞膜透過性ペプチド」ということがある。）の候補として、受精時に配偶子の認識及び融合に関係する精子側因子のタンパク質IZUMO1のN末端付近の融合コアヘリックスペプチドである「IZUMO1₅₇₋₁₁₃」（配列番号12）、卵子側因子のタンパク質CD9のC末端付近のテトラスパンインファミリーの特徴である3アミノ酸配列（CCG）が含まれる第2細胞外ループペプチドである「CD9₁₁₃₋₁₉₄」（配列番号2）、及び、胎盤の合胞体性栄養膜細胞の形成に関わるタンパク質Syncytin1のヘプタドリピート構造を含むコイルドコイル構造の部分ペプチドである「Syncytin1₃₄₅₋₄₂₂」（配列番号13）、「Syncytin1₃₂₀₋₃₄₀（FP）」（以下、本明細書において、「Syncytin1（FP）」ということがある。）（配列番号3）、「Syncytin1₃₅₂₋₃₉₂（NHR）」（以下、本明細書において、「Syncytin1（NHR）」ということがある。）（配列番号14）、及び「Syncytin1₄₀₇₋₄₄₀（CHR）」（以下、本明細書において、「Syncytin1（CHR）」ということがある。）（配列番号15）を選択した。更に、ヒト由来細胞

膜透過性ペプチドの候補として、「Syncytin1 (FP-NHR)」(配列番号16)、「Syncytin1 (NHR-CHR)」(配列番号17)、「Syncytin1 (FP-NHR-CHR)」(配列番号18)を選択した。なお、各ペプチド名に付された下付きの数字は、それぞれのペプチドを構成するアミノ酸残基について、それぞれの由来となるタンパク質においてN末端側から数えた場合のアミノ酸残基の番号である。

[0068] また、細胞膜透過性ペプチドのポジティブコントロールとしてウニ由来の部分ペプチドB55 (配列番号19)を選択した。各ペプチドが含まれるタンパク質のドメイン構造を図1に、各ペプチドのアミノ酸配列を表1に示す。図1中、「IZUMO1」中の「SP」は、N末端のシグナル配列(SP)を示し、「IZUMO1」中の「TMD」は、C末端側の膜貫通ドメインを示し、「IZUMO1」中の「Ig-like」は、細胞外ドメインの1つであるIg様ドメインを示す。「CD9」中の「TMD」は、4つのそれぞれの膜貫通ドメインを示す。「Syncytin1」の上に付された「SU」及び「TM」は、「Syncytin1」を構成する2つのドメインを示し、「CS」は、これらの間にある切断サイトを示す。「Syncytin1」中の「SP」は、N末端のシグナル配列を示し、「TMD」は、C末端側の膜貫通ドメインを示す。また、図1に示すとおり、「Syncytin1」中、膜融合に関わる融合ペプチドである「FP (320-340 a. a.)」、N末端側ヘプタドリピート配列である「NHR」(352-392 a. a.)、C末端側ヘプタドリピート配列である「CHR (407-440 a. a.)」は、それぞれTMドメインに含まれる3つのモチーフ配列であることを示す。図1中の各ドメインに記載された数字は、それぞれのペプチドを構成するアミノ酸残基について、それぞれの由来となるタンパク質においてN末端側から数えた場合のアミノ酸残基の番号である。図1中、ヒト由来の細胞膜透過性を有する部分ペプチドの候補として選んだ領域を、「IZUMO1」、「CD9」に関しては斜線で示しており、「Syncytin1 (FP)」、「Syncytin1 (NHR)」、「Syncyt

i n 1 (C H R) 」 に関してはそれぞれの名前の文字標記で示しており、「
S y n c y t i n 1_{3 4 5 - 4 2 2}」 に関しては下側に付した数値で示している。

[0069]

[表1]

ペプチド名	アミノ酸配列 (N→C)
IZUMO1 ₅₇₋₁₁₈	VDEATLQKGSWSLLKDLKRITDSVDKGD LFKELFWML ILQKETFATYVARFQKEAY
IZUMO1 ₅₇₋₇₅	VDEATLQKGSWSLLKDLKR
IZUMO1 ₇₆₋₉₄	ITDSVDKGD LFKELFWML
IZUMO1 ₉₅₋₁₁₈	HLQKETFATYVARFQKEAY
IZUMO1 ₈₁₋₁₁₈	VKGD LFKELFWMLHLQKETFATYVARFQKEAY
CD9 ₁₁₃₋₁₉₄	HKDEVIKEVQEFYKDTYNKLKTKDEPQRETLKAIHYAL NCCGLAGGVEQFISDICPKKDVLETTFTVKSCPDAIKEVF DNKFH
Syncytin 1 ₃₄₅₋₄₂₂	QFYYKLSQELNGDMERVADSLVTLQDQLNSLA AVVLQN RRALDLLTAERGGTCLFLGEECCYYVNQSGIVTEKVKEI R
Syncytin1(FP)	ILPFVIGAGVLGALGTGIGGI
Syncytin1(NHR)	QELNGDMERVADSLVTLQDQLNSLA AVVLQNRALDLL TAE
Syncytin1(CHR)	YVNQSGIVTEKVKEIRDRIQRRAEELRNTGPWGL
Syncytin1(FP-NHR)	ILPFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYYKLSQELNGDM ERVADSLVTLQDQLNSLA AVVLQNRALDLLTAE
Syncytin1(NHR-CHR)	QELNGDMERVADSLVTLQDQLNSLA AVVLQNRALDLL TAERGGTCLFLGEECCYYVNQSGIVTEKVKEIRDRIQR AEELRNTGPWGL
Syncytin1(FP-NHR- CHR)	ILPFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYYKLSQELNGDM ERVADSLVTLQDQLNSLA AVVLQNRALDLLTAERGGTC LFLGEECCYYVNQSGIVTEKVKEIRDRIQRRAEELRNTG PWGL
6xHis	HHHHHH
FLAG	DYKDDDDK
TCS	LVPRGS
eGFP	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGIHKFSVSGEGEGDA TYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPD HMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVK FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYI MADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAG ITLGMDELYKGS
B55	KAVLGATKIDLPVDINDPYDLG LLLRHLRHHSNLLANIG DPAVREQVLSAMQEEE
HA2	GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG
TAT	YGRKKRRQRRR

[0070] <eGFP融合タンパク質の調製>

まず、ヒト由来細胞膜透過性ペプチドの候補が細胞膜に非選択的に結合しないことを確認するために、上記の各部分ペプチドとeGFP（高感度緑色蛍光タンパク質）との融合タンパク質（以下、本明細書において、eGFPを含む融合タンパク質を「eGFP融合タンパク質」ということがある。）を大腸菌で発現・精製し、培養細胞に添加した後のeGFPの局在を蛍光顕微鏡で観察した。作製した各種eGFP融合タンパク質のDNAコンストラクトの模式図を図2に示す。図2中、（a）は、ヒト由来膜作用性ペプチド候補のeGFP融合タンパク質（Syncytin1の部分ペプチドについては、「Syncytin1₃₄₅₋₄₂₂」のeGFP融合タンパク質）のDNAコンストラクトの模式図を示す。（b）は、各Syncytin1ドメインの部分ペプチドのeGFP融合タンパク質のDNAコンストラクトの模式図を示す。「6xHis」、「FLAG」は、eGFP融合タンパク質の精製時に使用するTagをコードする塩基配列を示し、「TCS」は、トロンビン認識配列を示す。「(G₄S)₃」は、eGFPとSyncytin1（FP）との間に挿入したGGGGSをコードする塩基配列を3回繰り返したフレキシブルリンカーを示す。なお、「IZUMO1₅₇₋₁₁₃」をコードする塩基配列を配列番号20に示し、「CD9₁₁₃₋₁₉₄」をコードする塩基配列を配列番号21に示し、「Syncytin1₃₄₅₋₄₂₂」をコードする塩基配列を配列番号22に示し、「Syncytin1（FP）」をコードする塩基配列を配列番号23に示し、「Syncytin1（NHR）」をコードする塩基配列を配列番号24に示し、「Syncytin1（CHR）」をコードする塩基配列を配列番号25に示し、「Syncytin1（FP-NHR）」をコードする塩基配列を配列番号26に示し、「Syncytin1（NHR-CHR）」をコードする塩基配列を配列番号27に示し、「Syncytin1（FP-NHR-CHR）」をコードする塩基配列を配列番号28に示した。

[0071] これらの各DNAがpET20b（Novagen社製）に組み込まれた

各プラスミドを大腸菌BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL (Agilent Technologies社製)に導入し、2xYT培地中で20℃で3日間培養後、集菌した。集菌後の菌をTBS (トリス緩衝生理食塩水) (1mM PMSF) 500μLに懸濁して、Sonifier 250 (Branson社製)を用いて超音波破碎を行い、可溶性画分を回収した。残ったペレットをUrea-TBS (6M Urea, in TBS) (1mM PMSF) 500μLに懸濁後、4℃で1時間ボルテックスをすることで不溶性画分を回収した。eGFP、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄融合タンパク質、eGFP-Syncytin1₃₄₅₋₄₂₂融合タンパク質、eGFP-Syncytin1 (FP) 融合タンパク質、eGFP-Syncytin1 (NHR) 融合タンパク質、eGFP-Syncytin1 (CHR) 融合タンパク質、eGFP-Syncytin1 (FP-NHR) 融合タンパク質、eGFP-Syncytin1 (NHR-CHR) 融合タンパク質、及びeGFP-Syncytin1 (FP-NHR-CHR) 融合タンパク質については、更に、可溶性画分をCOSMOGEL His-Accept (Nacalai Tesque社製)を用いて精製した。eGFP-B55及びeGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄については不溶性画分を精製後、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Thermo Scientific社製)を用いた透析によりリフォーリングを行った。

[0072] <eGFP融合タンパク質の細胞膜に対する結合性の観察試験>

上記「eGFP融合タンパク質の調製」において、得られた各eGFP融合タンパク質をHeLa細胞に添加し、24時間後に4%パラホルムアルデヒドで固定し、共焦点顕微鏡 FV-1000 (Olympus社製)を用いてeGFPの局在の観察を行った。その結果、eGFP-B55融合タンパク質とeGFP-Syncytin1₃₄₅₋₄₂₂融合タンパク質においては、細胞膜への強い結合が観察された。また、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄融合タンパク質、eGFP-Syncytin1 (FP) 融合タンパク質、eG

FP-Syncytin1 (CHR) 融合タンパク質、及びeGFP-Syncytin1 (NHR-CHR) 融合タンパク質では細胞膜への弱い結合が観察された。それ以外の融合タンパク質 (eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃ 融合タンパク質、eGFP-Syncytin1 (NHR) 融合タンパク質、eGFP-Syncytin1 (FP-NHR) 融合タンパク質、及びeGFP-Syncytin1 (FP-NHR-CHR) 融合タンパク質) については、細胞膜への結合は全く見られなかった。

[0073] <eGFP-TAT含有融合タンパク質の調製>

上記結合性の観察試験において、eGFP-Syncytin1₃₄₅₋₄₂₂ 以外のヒト由来細胞膜透過性ペプチドの融合タンパク質については、細胞膜への強い結合が見られなかった。これを踏まえて、細胞膜と相互作用するカチオン性のTATペプチド (配列番号29、YGRKKRRQRRR) をC末端に付加したeGFP融合タンパク質 (以下、本明細書において、eGFPを含み、かつ、C末端にTATが付加された融合タンパク質を「eGFP-TAT含有融合タンパク質」ということがある。) を調製し、TATを介して非選択的に細胞に取り込まれたeGFPのエンドソーム離脱をヒト由来ペプチドが促進するかどうかの検証を行った。なお、細胞膜透過性ペプチドのポジティブコントロールとしてインフルエンザウイルス由来のHA2ペプチド (配列番号30、GLFEAIEGFIEGWEGMIDGWYG) を、調製した。作製したeGFP-TAT含有融合タンパク質のDNAコンストラクトの模式図を図3に示す。図3中、(a) は、eGFP-TAT融合タンパク質、及び、HA2、又は、ヒト由来細胞膜透過性ペプチド候補 (Syncytin1以外) を含むeGFP-TAT含有融合タンパク質のDNAコンストラクトの模式図を示す。(b) は、各Syncytin1ドメインの部分ペプチドのeGFP-TAT含有融合タンパク質のDNAコンストラクトの模式図を示す。図3中、「6xHis」、「FLAG」は、eGFP融合タンパク質の精製時に使用するTagをコードする塩基配列を示し、「TCS」は、トロンピン認識配列を示す。「(G₄S)₃」は、eGFP

と Syncytin 1 (FP) との間に挿入した GGGGS をコードする塩基配列を 3 回繰り返したフレキシブルリンカーを示す。これらの eGFP-TAT 含有融合タンパク質は、上記「eGFP 融合タンパク質の調製」と同じ条件で発現を行った。その後、eGFP-TAT 融合タンパク質、eGFP-HA2-TAT 融合タンパク質、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT 融合タンパク質、eGFP-Syncytin 1 (NHR)-TAT 融合タンパク質、及び eGFP-Syncytin 1 (CHR)-TAT 融合タンパク質については、可溶性画分を、上記「eGFP 融合タンパク質の調製」における「eGFP」と同じ条件で精製した。また、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT 融合タンパク質及び eGFP-Syncytin 1 (FP)-TAT 融合タンパク質については、不溶性画分を、上記「eGFP 融合タンパク質の調製」における「eGFP-B55」と同じ条件で精製した。なお、本明細書及び図面において、eGFP-TAT 融合タンパク質を対照例、eGFP-HA2-TAT 融合タンパク質を参考例、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT 融合タンパク質を実施例 1、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT 融合タンパク質を実施例 2、eGFP-Syncytin 1 (FP)-TAT 融合タンパク質を実施例 3、eGFP-Syncytin 1 (NHR)-TAT 融合タンパク質を比較例 1、eGFP-Syncytin 1 (CHR)-TAT 融合タンパク質を比較例 2 ということがある。また、eGFP-TAT 融合タンパク質（対照例）のアミノ酸配列を配列番号 31 に、eGFP-HA2-TAT 融合タンパク質（参考例）のアミノ酸配列を配列番号 32 に、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT 融合タンパク質（実施例 1）のアミノ酸配列を配列番号 33 に、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT 融合タンパク質（実施例 2）のアミノ酸配列を配列番号 34 に、eGFP-Syncytin 1 (FP)-TAT 融合タンパク質（実施例 3）のアミノ酸配列を配列番号 35 に、eGFP-Syncytin 1 (NHR)-TAT 融合タンパク質（比較例 1）のアミノ酸配列を配列番号 36 に、eGFP-Syncytin 1 (CHR)-TAT 融合タンパク質（比較例 2）の

アミノ酸配列を配列番号37にそれぞれ示す。

[0074] <eGFP-TAT含有融合タンパク質の細胞内への送達後の共焦点顕微鏡による観察及び蛍光強度の測定>

上記「eGFP-TAT含有融合タンパク質の調製」において、得られた各eGFP-TAT含有融合タンパク質をHeLa細胞へ添加し、1時間後に固定し、トリパンブルーを用いて細胞膜表面の蛍光を消光後、共焦点顕微鏡で観察した。この際、eGFP-TAT融合タンパク質は終濃度が10 μ Mとなるように、eGFP-HA2-TAT融合タンパク質は終濃度が10 μ Mとなるように、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質は終濃度が0.2 μ Mとなるように、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT融合タンパク質は終濃度が5 μ Mとなるように、eGFP-Syncytin1(FP)-TAT融合タンパク質は終濃度が10 μ Mとなるように、eGFP-Syncytin1(NHR)-TAT融合タンパク質は終濃度が10 μ Mとなるように、eGFP-Syncytin1(CHR)-TAT融合タンパク質は終濃度が10 μ MとなるようにHeLa細胞へ添加した。

[0075] 核をHoechstで標識して、共焦点顕微鏡で観察した結果、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質（実施例1）、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT融合タンパク質（実施例2）、及びeGFP-Syncytin1(FP)-TAT融合タンパク質（実施例3）に関して、ポジティブコントロールであるeGFP-HA2-TAT融合タンパク質（参考例）と同様に、細胞質全体でeGFPの蛍光が見られた。他方、共焦点顕微鏡による画像を観察した結果、eGFP-Syncytin1(NHR)-TAT融合タンパク質（比較例1）、eGFP-Syncytin1(CHR)-TAT融合タンパク質（比較例2）については、eGFP-TAT融合タンパク質（対照例）と同程度の蛍光しか観察されなかった。これにより、IZUMO1₅₇₋₁₁₃、CD9₁₁₃₋₁₉₄、Syncytin1(FP)の部分ペプチドが、エンドソーム離脱を促進していることが示唆された。また、eGFP-Syncytin1(FP-NHR)-TAT融合タンパク質及

びeGFP-Syncytin1 (FP-NHR-CHR) -TAT融合タンパク質に関しても、eGFP-Syncytin1 (FP) と同様な局在を示したが、これはSyncytin1 (FP) の細胞膜透過促進効果であると考えられる。なお、eGFP-Syncytin1 (NHR-CHR) -TAT融合タンパク質については、エンドソームへの取り込みは促進されているものの、eGFPの局在が細胞質全体でないことからエンドソーム離脱は起きていないことが判断された。

[0076] それぞれの融合タンパク質をHeLa細胞内に送達後に、1細胞ごとに心領域(ROI)を取り、eGFPの蛍光強度を定量化した。その結果を、図4、5に示す。図4は、eGFP-TAT融合タンパク質、eGFP-HA2-TAT融合タンパク質、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT融合タンパク質についての蛍光強度のグラフを示す。図5は、eGFP-TAT融合タンパク質、eGFP-HA2-TAT融合タンパク質、eGFP-Syncytin1 (FP) -TAT融合タンパク質についての蛍光強度のグラフを示す。なお、図4、図5の蛍光強度は、「eGFP-TAT」についての蛍光強度に対する、それぞれの融合タンパク質についての相対蛍光強度である。その結果、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT融合タンパク質及びeGFP-Syncytin1 (FP) -TAT融合タンパク質は、eGFP-TAT融合タンパク質と比べて有意に細胞内局在量が増加していた。更に、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT融合タンパク質及びeGFP-Syncytin1 (FP) -TAT融合タンパク質は、いずれも、eGFP-HA2-TAT融合タンパク質と比べて細胞内局在量が増加していた。したがって、IZUMO1₅₇₋₁₁₃、CD9₁₁₃₋₁₉₄、Syncytin1 (FP) の細胞膜透過性の効果はウイルス由来の細胞膜透過性ペプチドであるHA2ペプチドよりも高いことが確認された。特に、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質は0.2 μMという低濃度でも

10 μ MのeGFP-HA2-TAT融合タンパク質よりも細胞内の蛍光量が高いことから、ヒト由来の細胞膜透過促進ペプチドとしてIZUMO1₅₇₋₁₁₃を用いればより効率的なドラッグデリバリーシステムの実現が期待できることがわかった。

[0077] <エンドソーム離脱能検証>

上記「eGFP-TAT含有融合タンパク質の細胞内への送達後の共焦点顕微鏡による観察及び蛍光強度の測定」により、IZUMO1₅₇₋₁₁₃、CD9₁₁₃₋₁₉₄及びSyncytin1 (FP) について細胞膜透過促進ペプチドとしての機能が示唆された。これらのeGFP-TAT含有融合タンパク質が、エンドソームを離脱していることを確認するために、エンドソームをLysoTracker Red DND-99 (Life Technologies) により染色し、各eGFP-TAT含有融合タンパク質との共局在解析を行った。なお、トリパンブルーによる消光を行うと細胞全体が赤色の蛍光を発し、LysoTrackerによるエンドソームの標識はできないため、heparin/PBSで洗浄することで細胞膜表面のeGFP-TAT含有融合タンパク質の除去を行った。具体的な操作を以下に説明する。

[0078] まず、上記「eGFP-TAT含有融合タンパク質の調製」の精製後のeGFP-TAT融合タンパク質、eGFP-HA2-TAT融合タンパク質、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT融合タンパク質及びeGFP-Syncytin1 (FP)-TAT融合タンパク質をHeLa細胞へ添加し、1時間後にheparin/PBSで洗浄し、固定後、共焦点顕微鏡で観察した。この際、eGFP-TAT融合タンパク質は終濃度が10 μ Mとなるように、eGFP-HA2-TAT融合タンパク質は終濃度が10 μ Mとなるように、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質は終濃度が1 μ Mとなるように、eGFP-CD9₁₁₃₋₁₉₄-TAT融合タンパク質は終濃度が5 μ Mとなるように、eGFP-Syncytin1 (FP)-TAT融合タンパク

質は終濃度が5 μ Mとなるように、それぞれをH e L a細胞へ添加した。なお、核はH o e c h s tにより標識し、エンドソームはL y s o T r a c k e rで標識した。その結果、G F P-T A T融合タンパク質ではe G F Pの蛍光がL y s o T r a c k e rの蛍光とほぼ一致しているのに対し、他のタンパク質ではL y s o T r a c k e rの蛍光と一致していないe G F P蛍光が多く観察された。

[0079] また、それぞれの融合タンパク質のH e l a細胞内に送達後に、1細胞ごとに関心領域（R O I）を取り、細胞内のe G F Pの蛍光がL y s o T r a c k e rの蛍光と共局在している面積のe G F Pの蛍光に対する面積比（すなわち、それぞれの融合タンパク質が局在している面積のうちエンドソームと共局在している面積の割合）と、L y s o T r a c k e rの蛍光強度の定量を行った。その結果を図6に示す。図6に示すように、細胞内のe G F Pの蛍光がL y s o T r a c k e rの蛍光と共局在している面積比及びL y s o T r a c k e rの蛍光強度を定量した結果、e G F P-T A T含有融合タンパク質は、e G F P-T A Tと比べ有意にエンドソームと共局在している割合が低いこと（図6の右軸（A r e a））、すなわち、エンドソームから離脱していることが確認された。一方、細胞ごとのL y s o T r a c k e rの蛍光強度はいずれにおいても有意差は見られなかったことから（図6の左軸（L y s o T r a c k e r））、エンドサイトーシスには影響を与えていないことがわかった。

[0080] < I Z U M O 1 についてのペプチド配列の最適化 >

ヒト由来細胞膜透過促進ペプチドとして使用するペプチドは、操作性の観点ではより短い方が好ましいため、最も細胞膜透過効率が高かった I Z U M O 1₅₇₋₁₁₃ について、更に短く断片化したペプチド I Z U M O 1₅₇₋₇₅（配列番号38）、I Z U M O 1₇₆₋₉₄（配列番号4）、I Z U M O 1₉₅₋₁₁₃（配列番号6）及び I Z U M O 1₈₁₋₁₁₃（配列番号5）について各 e G F P-T A T 含有融合タンパク質を上記「e G F P-T A T 含有融合タンパク質の調製」における「e G F P-I Z U M O 1₅₇₋₁₁₃-T A T 融合タンパク質」

と同様の方法で調製し、HeLa細胞内に、それぞれの融合タンパク質を送達し、細胞内に取り込まれたeGFPの蛍光強度を定量した。より具体的には、eGFP-TAT融合タンパク質は終濃度が10 μ Mとなるように、eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質は終濃度が1 μ Mとなるように、eGFP-IZUMO1₉₅₋₁₁₃-TAT融合タンパク質は終濃度が1 μ Mとなるように、eGFP-IZUMO1₅₇₋₇₅-TAT融合タンパク質は終濃度が1 μ M、又は10 μ Mとなるように、eGFP-IZUMO1₇₆₋₉₄-TAT融合タンパク質は終濃度が1 μ M、又は10 μ Mとなるように、eGFP-IZUMO1₈₁₋₁₁₃-TAT融合タンパク質は終濃度が1 μ M又は10 μ Mとなるように、HeLa細胞に添加した。HeLa細胞へ添加してから1時間後に固定し、細胞膜表面の蛍光をトリパンブルーにより消光した後、共焦点顕微鏡で観察を行った。それぞれの融合タンパク質のHeLa細胞内に送達後に、1細胞ごとに関心領域(ROI)を取り、eGFPの蛍光強度を定量化した。その結果を図7、8に示す。なお、本明細書及び図面において、eGFP-IZUMO1₈₁₋₁₁₃-TAT融合タンパク質を実施例4、eGFP-IZUMO1₇₆₋₉₄-TAT融合タンパク質を実施例5、eGFP-IZUMO1₉₅₋₁₁₃-TAT融合タンパク質を実施例6、eGFP-IZUMO1₅₇₋₇₅-TAT融合タンパク質を比較例3ということがある。また、eGFP-IZUMO1₈₁₋₁₁₃-TAT融合タンパク質(実施例4)を配列番号39に、eGFP-IZUMO1₇₆₋₉₄-TAT融合タンパク質(実施例5)を配列番号40に、eGFP-IZUMO1₉₅₋₁₁₃-TAT融合タンパク質(実施例6)を配列番号41に、eGFP-IZUMO1₅₇₋₇₅-TAT融合タンパク質(比較例3)を配列番号42に、それぞれ示す。

[0081] 図7、8に示すように、eGFP-IZUMO1₅₇₋₇₅-TAT融合タンパク質(比較例3)は、eGFP-TAT融合タンパク質(対照例)より低い蛍光強度を示したのに対し、eGFP-IZUMO1₈₁₋₁₁₃-TAT融合タンパク質(実施例4)、eGFP-IZUMO1₇₆₋₉₄-TAT融合タンパク質(実施例5)、eGFP-IZUMO1₉₅₋₁₁₃-TAT融合タンパク質(

実施例6)は、eGFP-TAT融合タンパク質(対照例)より高い蛍光強度を示した。特に、eGFP-IZUMO1₈₁₋₁₁₃-TAT融合タンパク質(実施例4)は、IZUMO1のペプチドを何も付加していないeGFP-TAT融合タンパク質(対照例)の約20倍という最も高い値を示した。これらのことから、IZUMO1は、76-113の番号のアミノ酸残基(配列番号1)からなる部分ペプチドが、高いエンドソーム離脱性を有し、優れた細胞膜透過促進効果を奏するものであることが示された。

[0082] <ペプチド配列の二次構造予測>

3種類のヒトタンパク質由来の細胞膜透過促進ペプチドを含む領域IZUMO1₅₇₋₁₁₃、CD9₁₁₃₋₁₉₄、及びSyncytin1₃₂₀₋₄₄₀について、二次構造予測サーバJPred4(<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/>)を用いて、ヘリックスやβシート、コイル等の二次構造の予測を行った。その結果を、図9に示す。図9中、Hはそれぞれのペプチドにおいてヘリックスを構成する部分である。図9に示すように、IZUMO1は2本のヘリックス、CD9とSyncytin1は3本のヘリックスに分かれたことが確認された。上記のIZUMO1のペプチド配列の断片化の実験では、IZUMO1については後半のアミノ酸残基である81-110残基のヘリックス部分と、Syncytin1については前半のアミノ酸残基である321-334残基(配列番号10)のヘリックス部分を含む断片が高い細胞膜透過効率を示したことから、これらのヘリックス構造が細胞膜との相互作用に重要であることが示唆された。更に、IZUMO1とSyncytin1と同様に、CD9についても115-133(配列番号7)、138-151(配列番号8)又は182-190残基(配列番号9)のヘリックスを含む断片が重要であることが示唆された。

[0083] <eGFP-TAT含有融合タンパク質のエンドソーム離脱効率の定量>

上記「エンドソーム離脱能検証」のとおり、eGFP-TAT含有融合タンパク質は、エンドソームから離脱していることが確認された。更に、eG

F P - T A T 含有融合タンパク質のエンドソーム離脱効率を定量するために、下記試験を行った。

[0084] まず、核局在シグナル配列 (N L S) をC末端に付加した e G F P - T A T 含有融合タンパク質 (以下、本明細書において、e G F P を含み、かつ、C末端に T A T 及び N L S が付加された融合タンパク質を「e G F P - T A T - N L S 含有融合タンパク質」ということがある。) を作製した。作製した e G F P - T A T - N L S 含有融合タンパク質のDNAコンストラクトの模式図を図10に示す。図10中の「6 x H i s」、「F L A G」、「T C S」、「(G₄S)₃」の意味は、図2におけるものと同様である。図10の「F P'」は、「S y n c y t i n 1₃₂₀₋₃₄₀ (F P)」(配列番号3) よりも2アミノ酸短くしたペプチドである「S y n c y t i n 1₃₂₂₋₃₄₀ (F P')」(配列番号44、表3) を示す。核在シグナル配列 (N L S) を配列番号43 (表3) に示す。上記の e G F P - T A T - N L S 含有融合タンパク質は、上記「e G F P 融合タンパク質の調製」と同じ条件で発現を行った。

[0085] その後、e G F P - N L S 融合タンパク質、e G F P - T A T - N L S 融合タンパク質、e G F P - H A 2 - T A T - N L S 融合タンパク質、及び e G F P - S y n c y t i n 1₃₂₂₋₃₄₀ (F P') - T A T - N L S 融合タンパク質については、可溶性画分を、上記「e G F P 融合タンパク質の調製」における「e G F P」と同じ条件で精製した。また、e G F P - I Z U M O 1₅₇₋₁₁₃ - T A T - N L S 融合タンパク質及び e G F P - S y n c y t i n 1₃₂₀₋₃₄₀ (F P) - T A T - N L S 融合タンパク質については、不溶性画分を、上記「e G F P 融合タンパク質の調製」における「e G F P - B 5 5」と同じ条件で精製した。

[0086] 得られた e G F P - T A T - N L S 含有融合タンパク質について、エンドソームを離脱して細胞質に局在できる融合タンパク質のみがインポーチンによって核に輸送されることを利用して、下記の方法にしたがい、各融合タンパク質の核移行した分子数に基づきエンドソーム離脱効率を見積もった。ま

ず、精製した各融合タンパク質をH e L a細胞へ添加してから1時間後に、P B Sを用いて3回洗浄後、スクレイパーを用いて細胞を剥離し遠心により回収した。この一部を採取し、細胞数を血球計算盤を用いてカウントした。回収した細胞を、NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo Fisher Scientific) を用いて可溶化し、核画分と非核画分に分画した。エンドソーム内部に残ったままの融合タンパク質は非核画分に含まれるので、核画分に含まれる融合タンパク質はエンドソームを離脱したタンパク質であると考えられる。そこで、核画分に含まれる融合タンパク質を、抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロッティングにより定量し、細胞数で割ることで、1細胞あたり核画分に含まれるタンパク質の平均分子数を算出した。その結果を表2に示す。なお、本明細書及び図面において、eGFP-I Z U M O 1₅₇₋₁₁₃-T A T-N L S融合タンパク質を実施例7、eGFP-S y n c y t i n 1₃₂₀₋₃₄₀(F P)-T A T-N L S融合タンパク質を実施例8、eGFP-S y n c y t i n 1₃₂₂₋₃₄₀(F P')-T A T-N L S融合タンパク質を実施例9ということがある。

[0087] [表2]

ペプチド名	1細胞あたり核画分に 含まれる平均分子数
	Mean±SD (10 ⁷ molecules/cell)
eGFP-NLS	0.013±0.005
eGFP-TAT-NLS	0.072±0.026
eGFP-HA2-TAT-NLS	0.33±0.09
eGFP-I Z U M O 1 ₅₇₋₁₁₃ -TAT-NLS (実施例7)	0.26±0.10
eGFP-Syncytin1 ₃₂₀₋₃₄₀ (FP)-TAT-NLS (実施例8)	2.5±0.4
eGFP-Syncytin1 ₃₂₂₋₃₄₀ (FP')-TAT-NLS (実施例9)	6.4±0.25

[0088] 表2から理解されたとおり、本発明の部分ペプチド(I Z U M O 1₅₇₋₁₁₃、F P、F P')を含む融合タンパク質はいずれも1細胞あたり核画分に含まれる分子数が高く、エンドソーム離脱効率が高かった。特に、F P'を含

む融合タンパク質が顕著に高い分子数を示し、従来の細胞膜透過性ペプチドであるHA2を含む「eGFP-HA2-TAT-NLS」に対して約20倍の分子を細胞質に送達でき、「eGFP-TAT-NLS」に対して約100倍の分子を細胞質に送達できることがわかった。

[0089] <様々なヒト培養細胞内へのeGFP-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TATの送達>

eGFP-TAT含有融合タンパク質がHeLa細胞以外のヒト培養細胞にも取り込まれることを確認した。まず、eGFP-TAT含有融合タンパク質として、eGFP-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT（配列番号45、表3）を、上記「eGFP-TAT含有融合タンパク質の調製」における「eGFP-IZUMO1₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質」と同様の方法で調製した。得られた融合タンパク質を、終濃度が5 μMとなるように、HeLa（ヒト子宮頸癌細胞）、HA431（ヒト上皮様細胞癌細胞）、HepG2（ヒト肝癌細胞）、及び、SK-N-SH（ヒト神経芽腫細胞）に添加した。添加の1時間後に細胞を固定してから、細胞膜表面の蛍光をトリパンプルーにより消光した後、共焦点顕微鏡で観察を行った。それぞれの細胞内に送達後に、1細胞ごとに関心領域（ROI）を取り、eGFPの蛍光強度を定量化した。その結果を図11に示す。なお、本明細書及び図面において、eGFP-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT融合タンパク質を実施例10ということがある。

[0090] 図11に示すように、いずれの細胞においても、eGFP-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT融合タンパク質（実施例10）は、eGFP-TAT融合タンパク質（対照例）より高い蛍光強度を示した。このことから、Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀（配列番号44）は、様々な種類のヒト細胞に対して、高いエンドソーム離脱性を有し、優れた細胞膜透過促進効果を奏することが示された。

[0091] <eGFP以外のタンパク質の細胞内送達>

Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀（配列番号44）がeGFP以外のタンパク

質のエンドソーム離脱を促進できるかどうか検証した。具体的には、eGFPの代わりに、SNAPタグ（分子量19.4 kDa）[Nat. Biotechnol. 21 (2003) 86-89] 又は β -ガラクトシダーゼ（分子量116 kDa）を使用し、TAT融合タンパク質を上記「eGFP-TAT含有融合タンパク質の調製」における「eGFP-IZUMO₁₅₇₋₁₁₃-TAT融合タンパク質」と同様の方法で調製した。得られた各融合タンパク質を、終濃度が5 μ Mとなるように、HeLa細胞に添加し、細胞内に取り込まれたSNAPタグ及び β -ガラクトシダーゼ（ β -Gal）を下記の方法にしたがい、定量した。

[0092] まず、eGFPの代わりに、SNAPタグを使用した融合タンパク質（SNAP-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT融合タンパク質、配列番号46、表3）については、あらかじめ蛍光標識したベンジルグアニン（BG-DY505）と共有結合させ、HeLa細胞内に送達後に、1細胞ごとに心領域（ROI）を取り、蛍光強度を定量化した。eGFPの代わりに、 β -ガラクトシダーゼを使用した融合タンパク質（ β -Gal-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT融合タンパク質、配列番号47、表3）については、HeLa細胞に添加後に、酵素活性によって分解されると蛍光を発する基質（C12-FDG）を添加し、その蛍光強度を定量化した。その結果を図12に示す。なお、本明細書及び図面において、SNAP-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT融合タンパク質を実施例11、 β -Gal-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT融合タンパク質を実施例12ということがある。

[0093] 図12に示すように、SNAP-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT融合タンパク質（実施例11）及び β -Gal-Syncytin1₃₂₂₋₃₄₀-TAT融合タンパク質（実施例12）は、それぞれSyncytin1₃₂₂₋₃₄₀ペプチドを付加していない対照例であるSNAP-TAT融合タンパク質（配列番号48、表4）及び β -Gal-TAT融合タンパク質（配列番号49、表4）よりも高い蛍光強度を示した。これらのことから、Sync

y t i n 1₃₂₂₋₃₄₀は、e G F P以外のタンパク質についても高いエンドソーム離脱性を有し、優れた細胞膜透過促進効果を奏するものであることが示された。

[0094]

[表3]

ペプチド名	アミノ酸配列 (N→C)
NLS	RREKYGIPEPPEPKRRK
Syncytin1 ₃₂₂₋₃₄₀	PFVIGAGVLGALGTGIGGI
eGFP-Syncytin1 ₃₂₂₋₃₄₀ -TAT	MHHHHHHHDYKDDDDKLVPGRGSMVSKGEELFTGVVPIL VELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPE GYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNF KIRHNIEDGSQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLST QSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKGSF FVIGAGVLGALGTGIGGIYGRKKRRQRRR
SNAP-Syncytin1 ₃₂₂₋₃₄₀ -TAT	MHHHHHHHDYKDDDDKLVPGRGSMKDCCKMRTTLDSP LGKLELSGCEQGLHEIIFLGKGTSAADAVEVPAPAAVLG GPEPLMQATAWLNAYFHQPEAIEEFVVPALHHPVFQES FTRQVLWKLLKVVKFGEVISYSLAALAGNPAATAAVK TALSGNPVPILPCHRVVNINGDVGGYEGGLAVKEWLL AHIEGIIRLGKPLGGSPFVIGAGVLGALGTGIGGIYGRK KRRQRRR
β-Gal-Syncytin1 ₃₂₂₋₃₄₀ -TAT	MHHHHHHHDYKDDDDKLVPGRSGMTMITDSLAVVLQR RDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDRPSQQ LRSLNGEWRFAWFPAPPAVPESWLECDLPEADTVVVP NWQMHGYDAPIYTNVTYPITVNPFFVPTENPTGCYSLT FNVDSEWLQEGQTRIIFDGVNSAFHLWCNGRWVGYGQ DSRLPSEFDLSAFLRAGENRLAVMVLRWSDGSYLEDDQ MWRMSGIFRDVSLHKPTTQISDFHVATRFNDDFSRAV LEAEVQMCGELRDYLRVTVSLWQGETQVASGTAPFGG EIIDERGGYADRVTLRLNVENPKLWSAEIPNLYRAVVEL HTADGTLIEAEACDVGFREVRINGI.I.I.I.NGKPI.I.IRGV NRHEHHPLHGQVMDEQTMVQDILLMKQNNFNNAVRC HYPNHPLWYTLCDRYGLYVVDANIETHGMVPMNRLT DDPRWLPAMSERVTRMVQRDRNHPSVIIWSLGNESGH GANHDALYRWIKSVDPSPRVQYEGGGADTTATDIIICPM YARVDEDQPFPAVPKWSIKKWLSPGETRPLICEYAHA MGNSLGGFAKYWQAFRQYPRQLQGGFVWDWVDQSLIK YDENGNPWSAYGGDFGDTPNDRQFCMNGLVFADRTPH PALTEAKHQQFFQFRLSGQTIEVTSEYLFHSDNELLH WMVALDGGKPLASGEVPLDVAPQGGKQLIELPELPQESA GQLWLTVRVVQPNATAWSEAGHISAWQQWRLAENLSV TLPAASHAIPHLLTSEMDFCIELGNKRWQFNRSQGFSLQ MWIGDKKQLLTPLRDQFTRAPLDNDIGVSEATRDPNA WVERWKAAGHYQAEAAALLQCTADTLADAVLIITAH WQHQQKTLFISRKTYRIDGSGQMAITVDVEVASDTPHP ARIGLNCQLAQVAERNWLGLGPQENYPDLTAACFDR WDLPLSDMYTPYVFPSENGLRCTRELNYGPHQWRGD FQFNISRYSQQLMETSHRHLHAEEGTWLNIDGFHMG IGGDDSWSPSVSAEFQLSAGRYHYQLVWCQKGSFVIG AGVLGALGTGIGGIYGRKKRRQRRR

[0095]

[表4]

ペプチド名	アミノ酸配列 (N→C)
SNAP-TAT	MHHHHHHDYKDDDDKLVPRGSMKDCEMKRTTLDSP LGKLELSGCEQGLHEIIFLGKGTSAADAVEVPAPAAVLG GPEPLMQATAWLNAYFHQPEAIEEFVVPALHHPVFQQES FTRQVLWKLLKVVKFGEVISYSHLAALAGNPAATAAVK TALSGNPVPIIPCHRNVNNGDVGGEGLAVKEWLL AHEGHRGKPGGLGGSYGRKKRRQRRR
β-Gal-TAT	MHHHHHHDYKDDDDKLVPRGSMGTMITDSLAVVLQR RDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDRPSQQ LRSLNGEWRFAWFPAPAEVPESWLECDLPEADTVVVP NWQMHGYDAPIYTNVTYPITVNPFPVTENPTGCYSLT FNVDESWLQEGQTRIIFDGVNSAFHLWCNGRWVGYGQ DSRLPSEFDLSAFLRAGENRLAVMVLWSDGSYLEQD MWRMSGIFRDVSLHKPTTQISDFHVATRFNDDFSRAV LEAEVQMCGLRDYLRVTVSLWQGETQVASGTAPFGG EIIDERGGYADRVTLRNLNENPKLWSAEIPNLYRAVEL HTADGTIEAEACDVGFREVRIENGLLLNGKPLLIRGV NRHEHHPLHGQVMDEQTMVQDILLMKQNNFNAVRC HYPNHPLWYTLCDRYGLYVDEANIETHGMVPMNRLT DDPRWLPAMSERVTRMVQRDRNHPSVIIWSLGNESGH GANHDALYRWIKSVDPSPVQYEGGGADTTATDIICPM YARVDEDQPFPAVPKWSIKKWLSPGETRPLILCEYAIHA MGNSLGGFAKYWQAFRQYPRLQGGFVWDVWVQSLIK YDENGNPWSAYGGDFGDTPNDRQFCMNGLVFADRTPH PALTEAKHQQQFFQFRLSGQTIEVTSEYLFRRHSDNELLH WMVALDGGKPLASGEVPLDVAPQGGKQLIELPELPQPESA GQLWLTVRVVQPNATAWSEAGHISAWQQWRLAENLSV TLPAASHAIPHLLTSEMDFCIELGNKRWQFNRQSGFLSQ MWIGDKKQLLTPLRDQFTRAPLDNDIGVSEATRDPNA WVERWKAAGHYQAEAALLQCTADTLADAVLITTAHA WQHQQKTLFISRKTYRIDGSGQMAITVDVEVASDTPHP ARIGLNCQLAQVAERNVWLGLGPQENYPDRLTAACFDR WDLPLSDMYTPYVFPSENGLRGCTRELNYGPHQWRGD FQFNISRYSQQLMETSHRHLLHAEETWLNIDGFHMG IGGDDSWSPSVSAEFQLSAGRYHYQLVWCQKGSYGRK KRRQRRR

請求の範囲

[請求項1] 以下の（a）から（d）のいずれかに記載のDNAがコードするアミノ酸配列のうち少なくとも7個の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチドと、

該部分ペプチドと直接的又は間接的に結合され、かつ、細胞表面に対する結合能を有するリガンドと、

を有する、融合タンパク質又は複合タンパク質。

（a）配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA

（b）配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有するDNA

（c）配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA

（d）配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA

[請求項2] 前記リガンドが、抗体である、請求項1に記載の融合タンパク質又は複合タンパク質。

[請求項3] 請求項1又は2に記載の融合タンパク質。

[請求項4] 請求項1又は2に記載の融合タンパク質又は複合タンパク質からなる、細胞内送達用担体。

[請求項5] 以下の（a）から（d）のいずれかに記載のDNAがコードするアミノ酸配列のうち少なくとも7個の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチド。

（a）配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA

（b）配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列をコードする

塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有するDNA

(c) 配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA

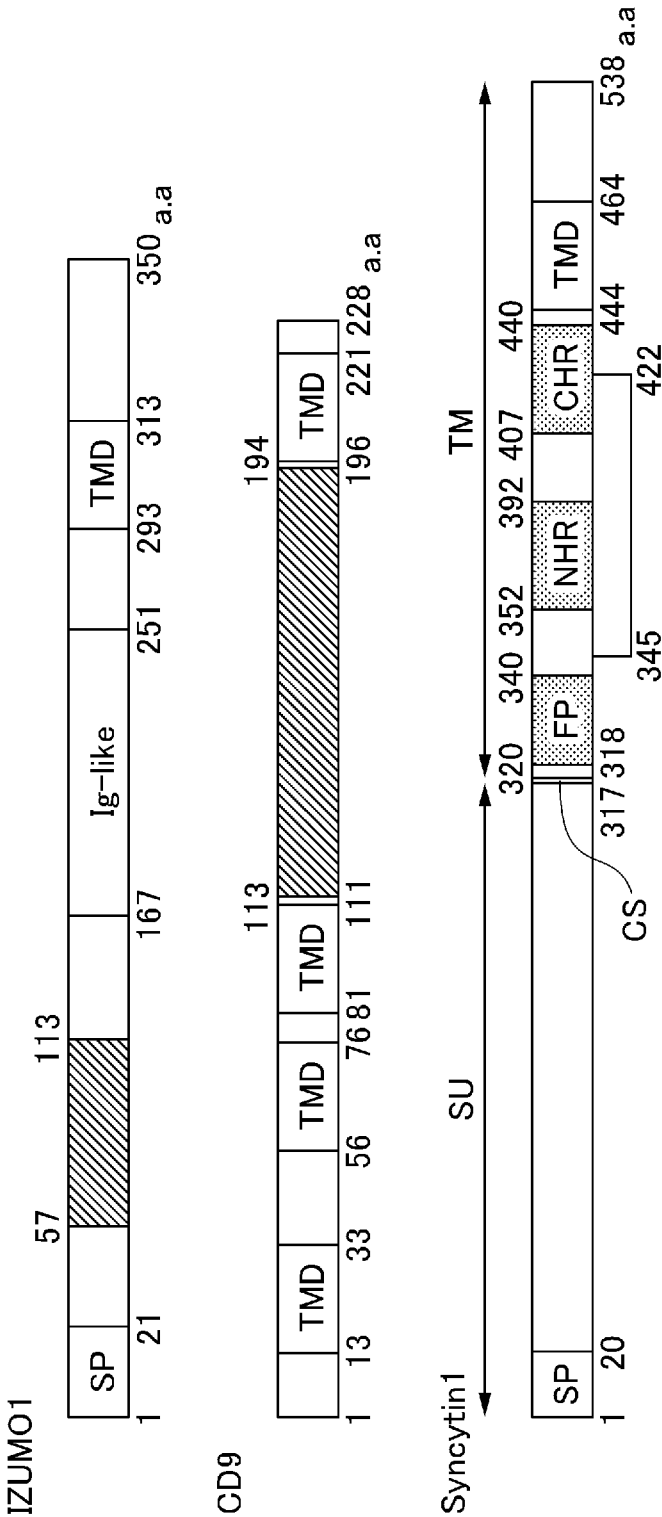
(d) 配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA

[請求項6] 請求項5に記載の部分ペプチドからなる細胞膜透過促進剤。

[請求項7] 請求項1又は2に記載の融合タンパク質又は請求項5に記載の部分ペプチドをコードするDNA。

[請求項8] 請求項7に記載のDNAが組み込まれたベクター。

[図1]



[図2]

(a)

eGFP	6xHis	FLAG	TCS	eGFP
eGFP-B55	6xHis	FLAG	TCS	B55
eGFP-IZUMO1 ₅₇₋₁₁₃	6xHis	FLAG	TCS	IZUMO1 ₅₇₋₁₁₃
eGFP-CD9 ₁₁₃₋₁₉₄	6xHis	FLAG	TCS	CD9 ₁₁₃₋₁₉₄
eGFP-Syncytin1 ₃₄₅₋₄₂₂	6xHis	FLAG	TCS	Syncytin1 ₃₄₅₋₄₂₂

(b)

eGFP-Syncytin1(FP)	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	(G4S) ₃	FP
eGFP-Syncytin1(NHR)	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	NHR	
eGFP-Syncytin1(CHR)	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	CHR	
eGFP-Syncytin1(FP-NHR)	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	(G4S) ₃	FP
eGFP-Syncytin1(NHR-CHR)	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	NHR	CHR
eGFP-Syncytin1(FP-NHR-CHR)	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	(G4S) ₃	FP
					NHR	CHR

[図3]

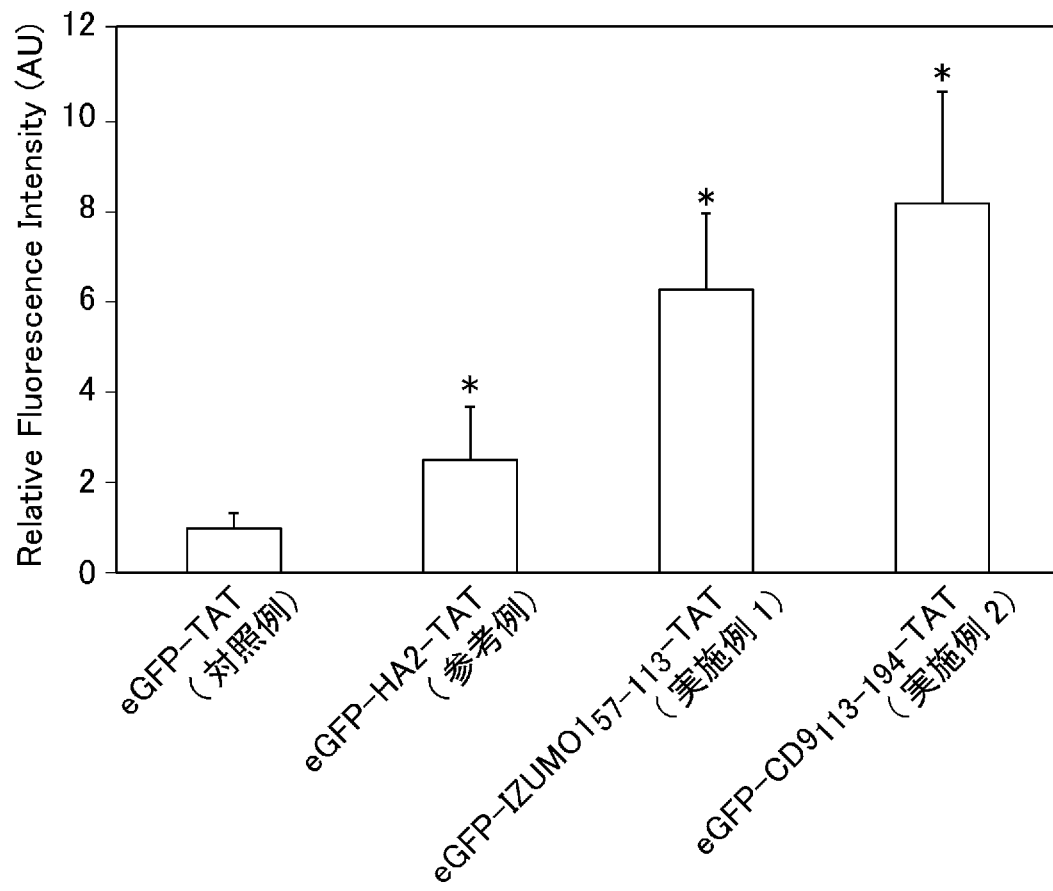
(a)

eGFP-TAT	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	TAT
eGFP-HA2-TAT	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	HA2TAT
eGFP-IZUMO1 ₅₇₋₁₁₃ -TAT	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	IZUMO1 ₅₇₋₁₁₃ TAT
eGFP-CD9 ₁₁₃₋₁₉₄ -TAT	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	CD9 ₁₁₃₋₁₉₄ TAT

(b)

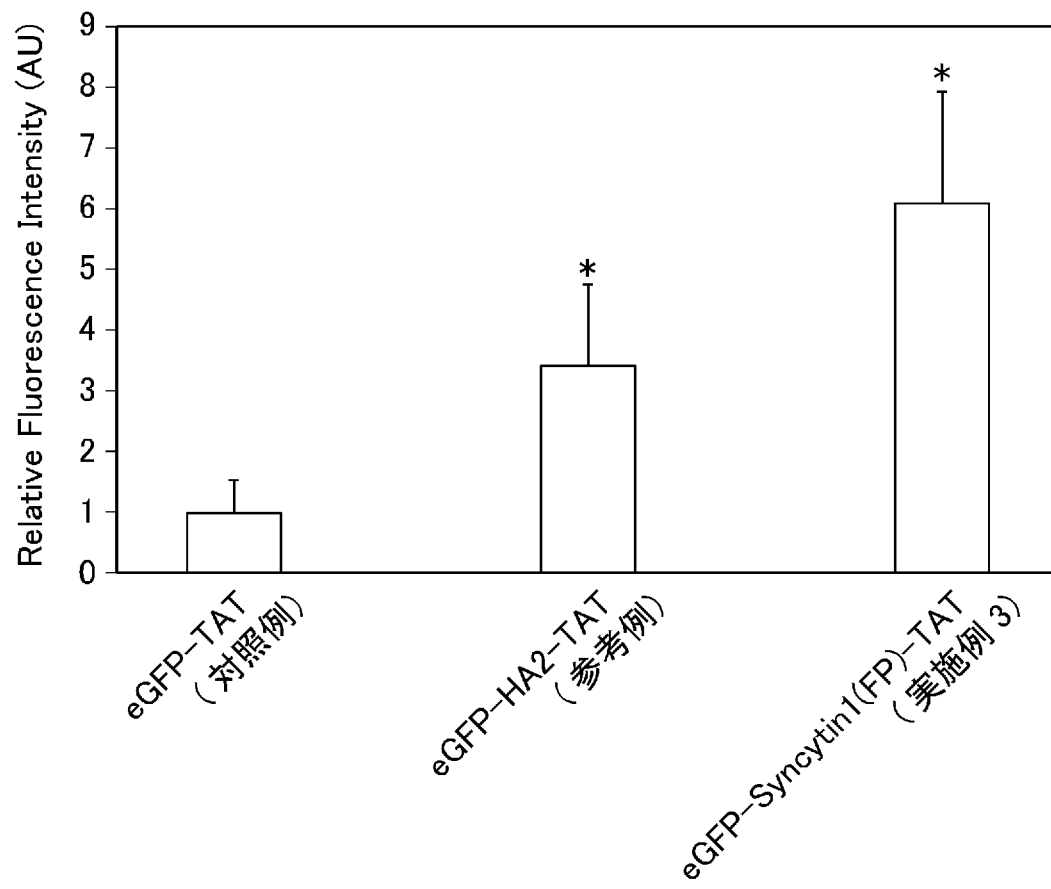
eGFP-Syncytin1(FP)-TAT	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	(G4S) ₃	FP	TAT
eGFP-Syncytin1(NHR)-TAT	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	NHR	TAT	
eGFP-Syncytin1(CHR)-TAT	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	CHR	TAT	
eGFP-Syncytin1(FP-NHR)-TAT	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	(G4S) ₃	FP	NHRTAT
eGFP-Syncytin1(NHR-CHR)-TAT	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	NHR	CHR	TAT
eGFP-Syncytin1(FP-NHR-CHR)-TAT	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	(G4S) ₃	FP	NHRCHRTAT

[図4]

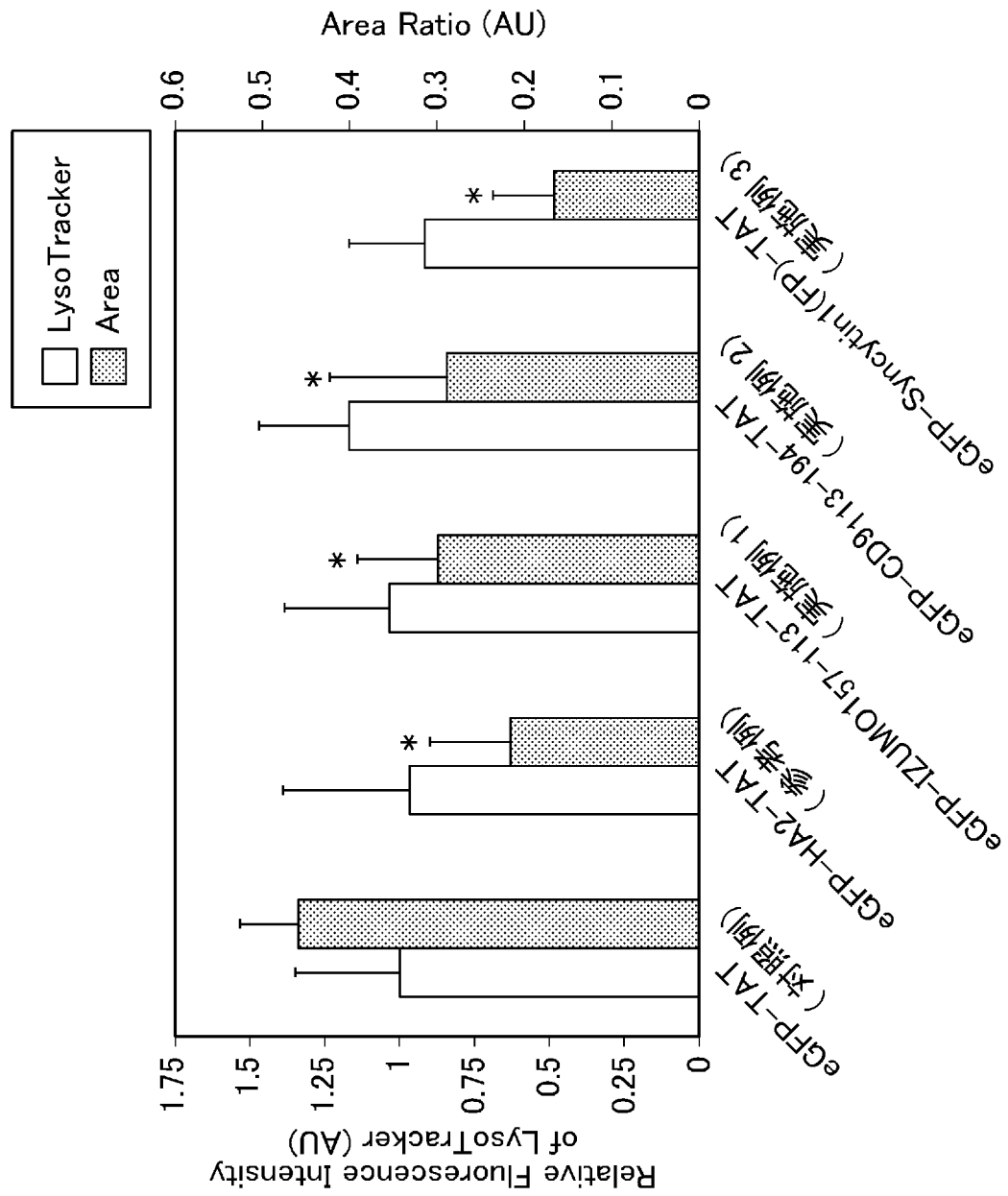


* $p < 0.01$, Mean $\pm$ SD, 左から順に N=36, 44, 36, 29.

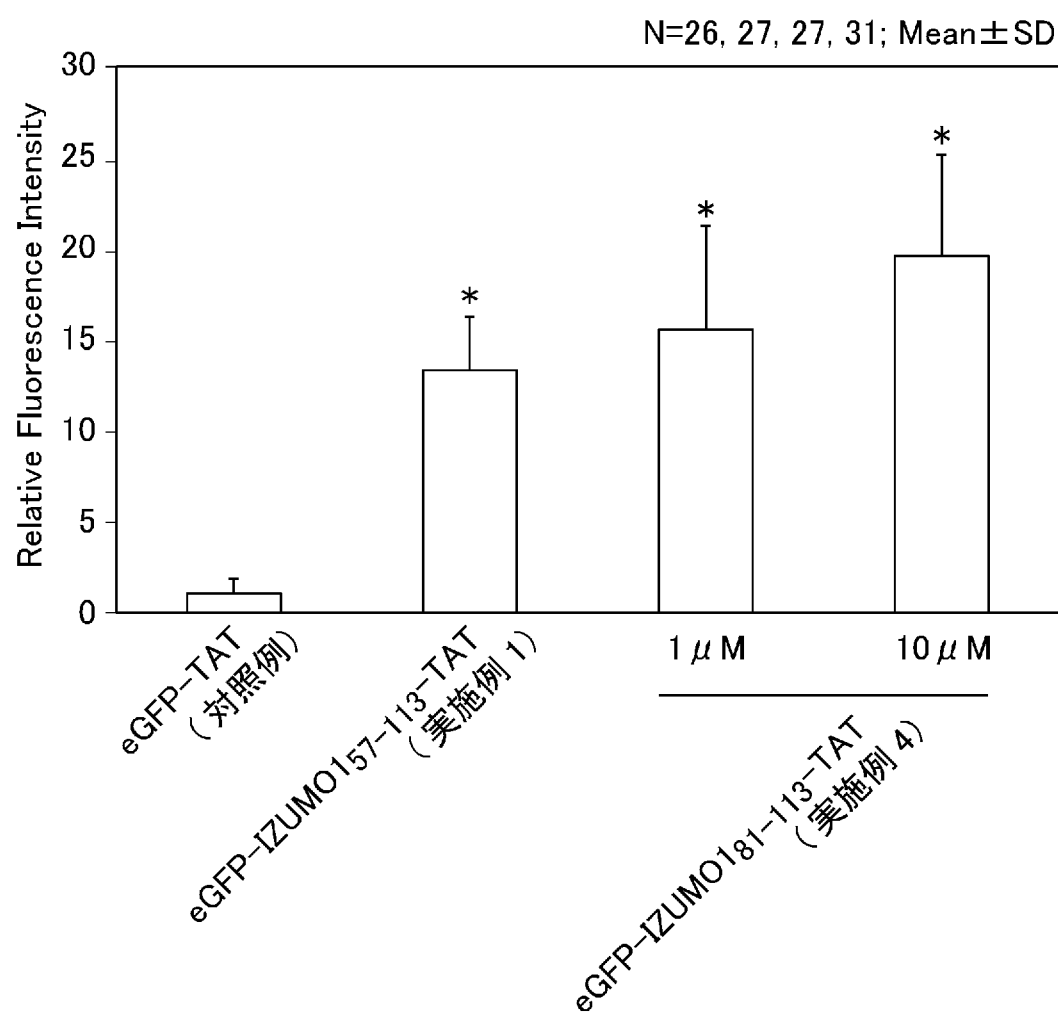
[図5]



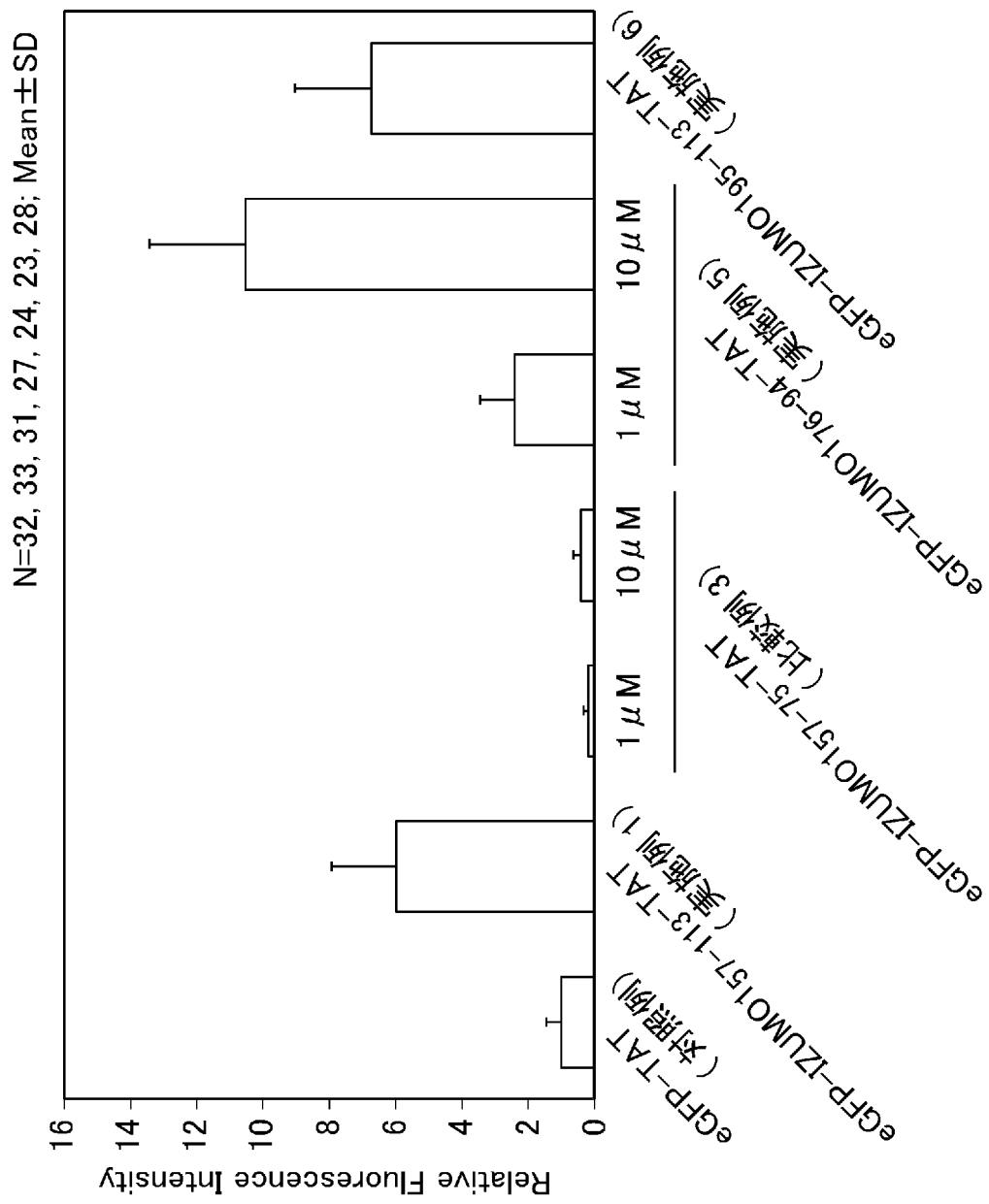
[図6]



[図7]



[図8]



[図9]

IZUMO1

57-----67-----77-----87-----97-----107-----	:	OrigSeq
VDEATLQKGSWSLLKDLKRI TDSVKGDLFVKELFWMLHLQKETFATYVARFQKEAY	:	Jnet
---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---	:	jhmm
---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---	:	jpssm
-----	:	Lupas 14
-----	:	Lupas 21
-----	:	Lupas 28
---BB-BBB-BB-B-B---B---BB-BBBB-BB-B-BB-B---	:	Jnet_25
-----B-B-B-B---B-B-B---B-B---	:	Jnet_5
-----B-----B-----	:	Jnet_0

CD9

113-----123-----133-----143-----153-----163-----173-----183-----193	:	OrigSeq
HKDEVIKEVQEFYKDTYNKL KTKDEPQRET LKAIHYALNCCGLAGGVEQF ISDICPKKDVLET FTVKSCPDAL KEVFDNKFH	:	Jnet
---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---	:	jhmm
---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---	:	jpssm
-----	:	Lupas 14
-----	:	Lupas 21
-----	:	Lupas 28
---BB-B-B-BB-BB-B---B-BBB-BBB-BB-BB---BB-BBB-BB-B-B---B-B-BB-B---	:	Jnet_25
---B---B---B---BB-B-B-BB-B---B-BB---	:	Jnet_5
-----B-----B-----	:	Jnet_0

Syncytin1

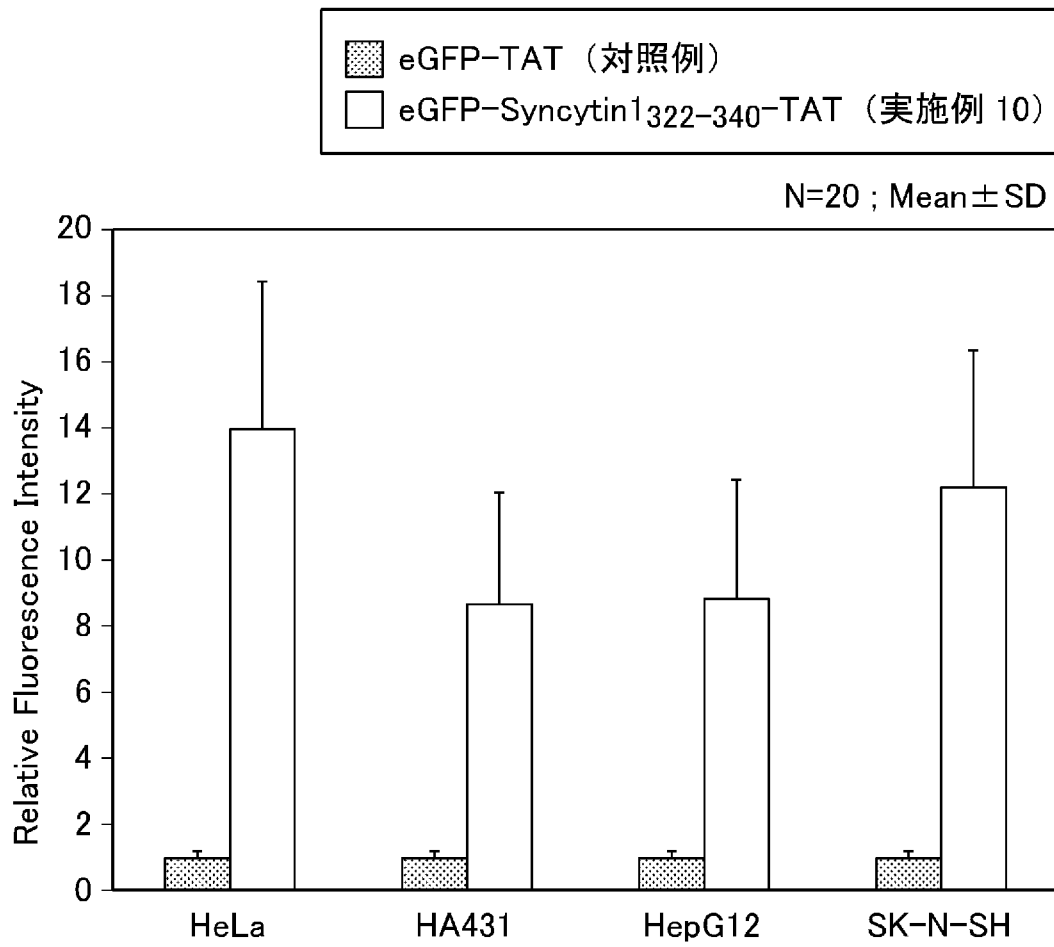
320-----330-----340-----350-----360-----370-----	:	OrigSeq
ILPFVIGAGVLGALGTGGG ITTSTQFYK LSQELNGDMERVADSLVTLQDQLNSLAHV	:	Jnet
---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---	:	jhmm
---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---	:	jpssm
-----	:	Lupas 14
-----	:	Lupas 21
-----	:	Lupas 28
---B---B-BBBB-BB-BBBB BB-BB---BB-BB---BB-BB---B---B-BB-BB---	:	Jnet_25
-----B-----B---B-B---B---B---B---B---B---B---	:	Jnet_5
-----	:	Jnet_0

380-----390-----400-----410-----420-----430-----	:	OrigSeq
LQNRALDLL TAERGGTCLFLGE ECCYYVNSGIVTEKVK EIRDRIQRRAEELRNTGPWGL	:	Jnet
HHHHHH---HH---EEEE---EEEE---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---	:	jhmm
HHHHHH---HHHH---EEEE---EEEE---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---	:	jpssm
-----EE-----EEEE---EEEE---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---	:	Lupas 14
-----	:	Lupas 21
-----	:	Lupas 28
CCCCCCCCCCCC---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---	:	Jnet_25
B-B-BBBBBBBB---BBBBBB---BBBBB---B-BB-B-BB-B---B---B---	:	Jnet_5
B---B-B---BB-B---BBB-B---B-B-B---B---B---	:	Jnet_0

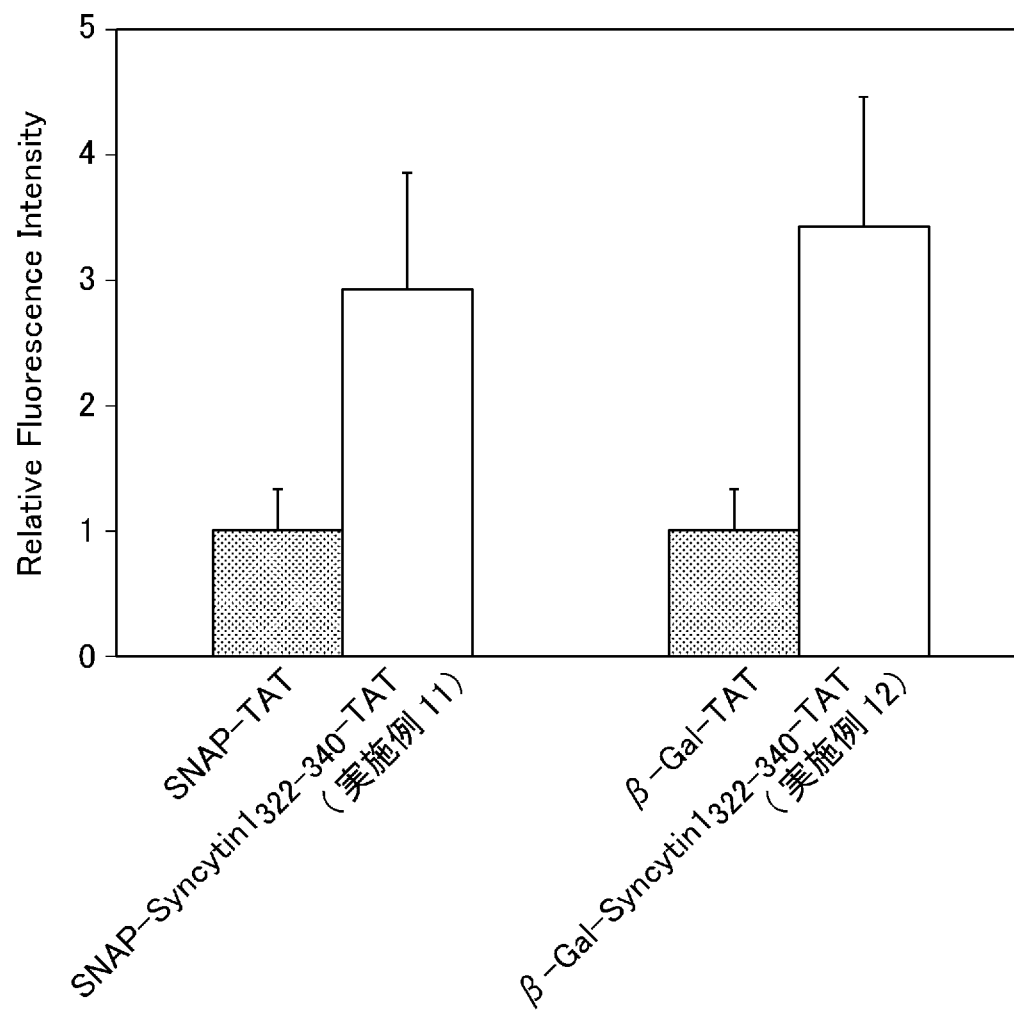
[図10]

eGFP-NLS	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	NLS
eGFP-TAT-NLS	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	TAT NLS
eGFP-HA2-TAT-NLS	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	HA2 TAT NLS
eGFP-IZUMO1 ₅₇₋₁₁₃ -TAT-NLS	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	IZUMO1 ₅₇₋₁₁₃ TAT NLS
eGFP-Syncytin1(FP)-TAT-NLS	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	(G4S) ₃ FP TAT NLS
eGFP-Syncytin1(FP')-TAT-NLS	6xHis	FLAG	TCS	eGFP	(G4S) ₃ FP' TAT NLS

[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/066455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K19/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)n, C07K16/00(2006.01)n

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)

C07K19/00, A61K39/395, A61K47/42, A61K47/48, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00, C12N15/09, C07K7/06, C07K16/00

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), 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	INOUE, N., et al., The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs, Nature (2005) Vol.434, pp.234-238, ISSN: 0028-0836, page 235, fig. 1, page 237, paragraph of 'materials and methods, cloning of Izumo'	5, 7, 8/1-4, 6
X/A	JP 2009-539410 A (Centocor, Inc.), 19 November 2009 (19.11.2009), paragraphs [0017], [0033]; sequence no.2 & US 2009/0325188 A1 paragraph [0019]; SEQ ID NO: 2 & WO 2007/146702 A2 & EP 2038652 B1	5, 7, 8/1-4, 6



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

09 August 2016 (09.08.16)

Date of mailing of the international search report

30 August 2016 (30.08.16)

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/JP2016/066455

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 02/04678 A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.), 17 January 2002 (17.01.2002), pages 26 to 29, paragraph of IV; SEQ ID NO: 1, 2 & US 2002/0102530 A1	5, 7, 8/1-4, 6

Object to be covered by this search:

For the reason described below, no meaningful search can be made on the inventions according to claims 1-8 other than "a peptide comprising an amino acid sequence encoded by DNA represented by any of (a) to (d)". Thus, the search was not made thereon.

The invention according to claim 1 relates to a fused protein or a complex protein that has a partial peptide comprising "at least 7" consecutive amino acid residues in an amino acid sequence encoded by DNA represented by any of (a) to (d) and a ligand having a specific binding ability.

However, the description merely describes that peptides comprising amino acid residues of SEQ ID NOS: 1-10 have high cell membrane permeability and excellent endosome escape performance (Examples). That is, the description never states the acquisition of a partial peptide comprising "7" consecutive amino acid residues in an amino acid sequence encoded by DNA represented by any of (a) to (d) and having high cell membrane permeability and endosome escape performance.

It is common general knowledge in the art at the time of filing the present application that a specific function of a peptide depends on the kinds and number of amino acid residues. Thus, no reason can be found for expanding or generalizing the content disclosed in the description to the scope of the invention according to claim 1 that relates to a partial peptide comprising "7" arbitrary consecutive amino acid residues in an amino acid sequence encoded by DNA represented by any of (a) to (d).

Consequently, the invention of claim 1 exceeds the range set forth in the description, and therefore does not comply with the requirement of the support prescribed under PCT Article 6.

Considering the contents of the description and common general knowledge in the art at the time of filing the present application as discussed above, it is deemed that many trials and errors are needed to find a way to carry out the invention according to claim 1 beyond the reasonable extent that can be expected from a person skilled in the art to acquire a partial peptide having high cell membrane permeability and endosome escape performance by preparing an extremely large number of partial peptides comprising "7" arbitrary consecutive amino acid residues in an amino acid sequence encoded by DNA represented by any of (a) to (d) followed by screening and confirming the same.

Consequently, the description is not clearly and fully set forth to such a degree that a person skilled in the art can work the invention of claim 1, and therefore does not comply with the requirement prescribed under PCT Article 5.

This opinion may be also applied to claim 5 and claims 2-4, 6-8 referring to claim 5.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07K19/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)n, C07K16/00(2006.01)n

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 (I P C))

Int.Cl. C07K19/00, A61K39/395, A61K47/42, A61K47/48, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00, C12N15/09, C07K7/06, C07K16/00

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 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)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/ BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), 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	INOUE, N., et al., The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs, Nature (2005) Vol.434, pp.234-238, ISSN: 0028-0836, 第 235 頁 図 1, 第 237 頁「材料及び方法 Izumo のクローニング」の項	5, 7, 8/ 1-4, 6

☒ 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

0 9 . 0 8 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

3 0 . 0 8 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

藤澤 雅樹

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

5 8 0 2

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
X/ A	JP 2009-539410 A (セントカー・インコーポレーテッド), 2009.11.19, 【0017】 , 【0033】 , 配列番号 : 2 , & US 2009/0325188 A1, [0019], SEQ ID NO: 2 & WO 2007/146702 A2 & EP 2038652 B1	5, 7, 8/ 1-4, 6
X/ A	WO 02/04678 A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.), 2002.01.17, 第26頁-29頁「第IV項」, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, & US 2002/0102530 A1	5, 7, 8/ 1-4, 6

<調査の対象について>

請求項 1－8に係る発明における、「(a) から (d) のいずれかに記載の DNA がコードするアミノ酸配列からなるペプチド」以外については、以下に述べる理由により、有意義な調査を行うことができないため、調査を行わなかった。

請求項 1に係る発明は、(a) から (d) のいずれかに記載の DNA がコードするアミノ酸配列のうち「少なくとも 7 個」の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチドと、特定の結合能を有するリガンドとを有する、融合タンパク質又は複合タンパク質である。

しかしながら、明細書には、配列番号 1－10 のアミノ酸残基からなるペプチドが細胞膜透過性に優れ、優れたエンドソーム離脱性を有していた旨記載されている(実施例)のみであり、(a) から (d) のいずれかに記載の DNA がコードするアミノ酸配列のうち「7 個」の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチドであって、優れた細胞膜透過性及びエンドソーム離脱性を有する部分ペプチドを取得したことについて何ら記載されていない。

そして、ペプチドにおける特定の機能は、アミノ酸残基の種類や数により奏されることが本願出願時の技術常識であるところ、(a) から (d) のいずれかに記載の DNA がコードするアミノ酸配列のうち任意の「7 個」の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチドについての請求項 1に係る発明の範囲まで、明細書に開示された内容を拡張ないし一般化するための根拠も見いだせない。

したがって、請求項 1に係る発明は、明細書に記載した範囲を超えるものであり、PCT 第 6 条に規定される裏付けに関する要件を満たしていない。

また、上記のような明細書の記載、及び出願時の技術常識を考慮すると、請求項 1に係る発明の実施に当たり、優れた細胞膜透過性及びエンドソーム離脱性を有する部分ペプチドを取得するために、(a) から (d) のいずれかに記載の DNA がコードするアミノ酸配列のうち任意の「7 個」の連続するアミノ酸残基からなる極めて多数の部分ペプチドを製造、スクリーニングして確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を行う必要があると認められる。

したがって、明細書は、請求項 1に係る発明を当業者が実施できる程度に明確かつ十分に記載されておらず、PCT 第 5 条に規定される要件を満たしていない。

請求項 5、及びこれらを引用する請求項 2－4、6－8についても同様である。