

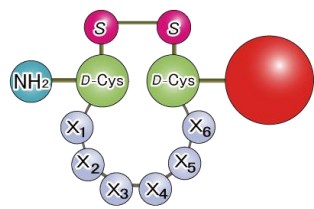
標的探索への新提案 環状ペプチドビーズ・ペプチドビークル

ゲル状ビーズに固定化した環状ペプチドでターゲットに結合するペプチド素子を見つける

ペプチド固定化ビーズを用いるバイオアフィニティ精製に関する特許第2513412は1996年に成立した。総説も含め、これまでにペプチド固定化ビーズの応用にはいくつか論文がある。直鎖ではアフィニティが弱い事が判明し、試行錯誤の結果、非天然アミノ酸を5種追加、合計24アミノ酸を用い、ジスルフィドで環状化、しかも、分子内での環状化にD-Cysを用いることによりアッセイ中の酵素分解を防ぎ、デコンボリューションを含めて最適化されたライブラリーが環状ペプチドを固定化したビーズである。ペプチドビーズの認識能を出発点にプロテオームにおけるマーカーを探索（相互作用に関し何の情報も無い場合に有用）

ゲル様レジン上に固定化された環状ヘキサペプチドライブラリー (D-システイン間でジスルフィド結合形成) ※水系アッセイが可能

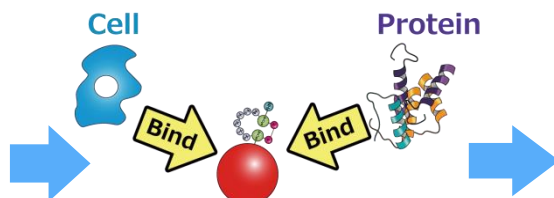
One cyclic peptide on One Bead(OPOB)



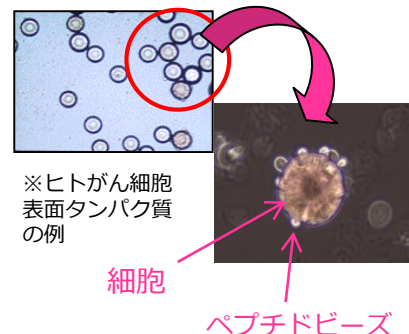
環状ペプチドをビーズに固定化

X: 天然19アミノ酸と非天然5アミノ酸
合計24種類のダイバーシティ
24⁶ = 約2億種類

ターゲットとビーズを
混合－スクリーニング



特定の標的タンパク質、
特定細胞表面タンパク質を
認識する素子の探索例



採取ビーズはペプチドシーケンサー
により配列を同定

近年、分子標的療法ががん疾患の化学療法に用いられておりますが、副作用の問題が避けられません。ハイペップ研究所のバイオ検出の概念であるタンパク質相互作用はペプチドによってタンパク質を模倣(ミメティック)することができるという考えに基づいて「**ペプチドビークル**」という新規な細胞標的薬剤のコンセプトを提案します。ペプチドビークルはがん細胞の表面認識、細胞透過、核移行を行うペプチドと抗がん剤を結合させたドラッグデリバリーのための複合薬剤導入化合物です。D-システインを使いジスルフィドで環状化したペプチドによってがん細胞と正常細胞の区別、捕捉を行います。調製した細胞透過性ペプチドを結合し、臨床現場で使用されている抗がん剤を誘導体化してペプチド鎖に組み込みました(**コンジュゲート**)。セルラインA549細胞株の認識ペプチドを用い、ビークルの構成モジュールの組み合わせが優れたDDSシステムとなりうることを実証しました。ドラッグデリバリーのために「ペプチドビークル」を作製し、特定細胞やタンパク質の認識素子の探索、細胞透過、核移行のためのバイオコンジュゲートを作製しました。Nokihara, K., et.al, Peptide Science 2011: 73, 2012.

DDSのためのペプチド・ビークルの構築



探索した素子

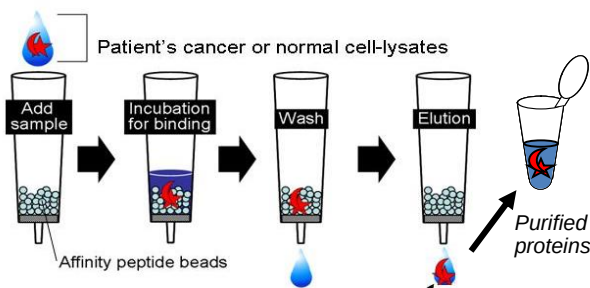
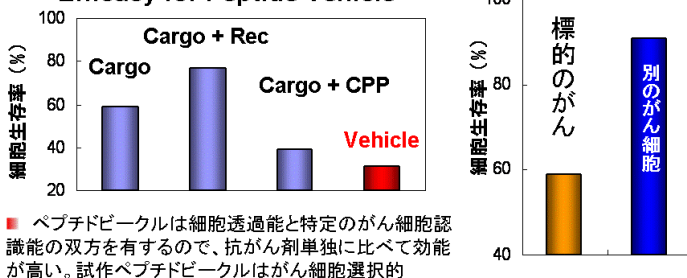


細胞標的治療DDSの研究で認識素子と細胞透過因子をコンジュゲートした → 細胞膜透過、核移行(ペプチド核酸の細胞内導入も可能) Hirata, A., Nokihara, K., *Tetrahedron Lett.* **55**, 4091-4094, 2014.

利点

1. 薬物デリバリー性の向上：標的のがん細胞だけに導入
 2. 細胞特異性、副作用の軽減：分子標的ではなく細胞を標的とする
 3. 新規特許：特許切れの薬剤も新規に知的財産権を確保
 4. 細胞株に対する選択性の向上
 5. 薬剤耐性のがん細胞でも活性を示す
- Protein Separation ① HPLC
- ② SDS-PAGE + in-gel digestion
 - ③ 2D Electrophoresis + in-gel digestion
 - ④ Nano-LC MS/MS + OrbiTrap /MALDI-TOF/MS/MS

Efficacy for Peptide Vehicle



Peptides immobilized on to gel-type beads used for affinity columns [Nokihara, *Peptide Chemistry* 1993, 25, 1994] Elucidation for diseases specific proteins. → discovery of marker proteins