

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-527498
(P2009-527498A)

(43) 公表日 平成21年7月30日(2009.7.30)

(51) Int.Cl.

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

F 1

A 61 K 37/02 Z N A
A 61 K 45/00
A 61 K 9/127
A 61 P 35/00
A 61 P 43/00 1 O 5

テーマコード(参考)

4 C 076
4 C 084
4 H 045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-555524 (P2008-555524)
(86) (22) 出願日 平成19年2月16日 (2007.2.16)
(85) 翻訳文提出日 平成20年10月15日 (2008.10.15)
(86) 國際出願番号 PCT/US2007/062335
(87) 國際公開番号 WO2007/098415
(87) 國際公開日 平成19年8月30日 (2007.8.30)
(31) 優先権主張番号 60/743,313
(32) 優先日 平成18年2月17日 (2006.2.17)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 507277642
インディアナ ユニバーシティ リサーチ アンド テクノロジー コーポレーション
INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION
アメリカ合衆国・インディアナ州 46202・インディアナポリス・10ストリート 351 ウエスト
(74) 代理人 110000176
一色国際特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌におけるcaPCNA相互作用のペプチドによる抑制

(57) 【要約】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型 (caPCNA、csPCNAとも呼ばれる) に由来するペプチド、またはnmPCNAに由来するペプチドは、細胞内のタンパク-タンパク相互作用に干渉し、癌の増殖能の低下を招く。これらのペプチドは、癌細胞の増殖を抑え、さらに、既存の化学療法を強化するための治療用組成物として有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型(caPCNA)を発現する悪性細胞の細胞増殖を抑えるための治療用組成物であって、アミノ酸配列LGIPEQEYを含むペプチドを含み、前記ペプチドが、PCNAと一つ以上のタンパクとの相互作用を特異的に抑制することを特徴とする、組成物。

【請求項 2】

前記ペプチド分子が合成分子であることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記ペプチド分子が細胞透過性であることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。 10

【請求項 4】

前記ペプチドが、転位配列を含むことを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項 5】

前記ペプチドが、プロテアーゼ耐性を有することを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項 6】

化学療法用薬剤を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 7】

前記化学療法用薬剤が、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチ
ン、ダトレキセート、ゲムシタビン、またはビノレルビン、またはそれらの組み合わせから成る群から選ばれることを特徴とする、請求項6に記載の組成物。 20

【請求項 8】

リポソームを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 9】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型 (caPCNA) と悪性細胞における細胞内タンパクとの相互作用を選択的に抑制するための、請求項1に記載の組成物の使用方法であって：

(a) caPCNAと前記細胞内タンパクとの相互作用を選択的に阻害する、請求項1に記載の組成物を準備する工程；

(b) 前記薬剤が、癌細胞集団と接触するように、前記組成物を投与する工程；および、

(c) caPCNAと前記細胞内タンパクとの相互作用を抑制する工程、 30

を含む、使用方法。

【請求項 10】

前記組成物が、静脈内に投与されることを特徴とする、請求項9に記載の使用方法。

【請求項 11】

caPCNAと前記細胞内タンパクとの相互作用が、DNA合成、DNA修復、組み換え、転写、細胞周期チェックポイント調節、およびアポトーシスから成る群から選ばれる細胞過程に関与することを特徴とする、請求項9に記載の使用方法。

【請求項 12】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型(caPCNA)を発現する悪性細胞の細胞増殖を抑えるための、請求項1に記載の組成物の使用方法であって：

(a) caPCNAと細胞内タンパクとの相互作用を選択的に阻害する、請求項1に記載の組成物を準備する工程；

(b) 前記薬剤が、癌細胞の集団と接触するように、前記組成物を投与する工程；および、 40

(c) 悪性細胞の細胞増殖を抑える工程、

を含む、使用方法。

【請求項 13】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型(caPCNA)を発現する癌に対する癌治療を強化するための、請求項1に記載の組成物の使用方法であって：

(a) 癌に対する化学療法剤を含む、請求項1に記載の組成物を準備する工程； 50

(b) 化学療法用薬剤を含む前記組成物を、前記薬剤の少なくとも一部が癌細胞集団と接触するように、投与する工程；および、

(c) 化学療法単独によって死滅する癌細胞数に比べ、癌細胞の死滅を増大させるか、または、癌細胞の増殖能を低減させることによって、癌治療を強化する工程、

を含む、使用方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、癌の増殖に関する細胞成分および過程を選択的に標的とする、ペプチドを用いた治療用組成物および方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

増殖性細胞核抗原 (PCNA) は、DNA複製、修復、染色体組み換え、細胞周期チェックポイント調節の過程、およびその他の細胞増殖の活動において重要な役割を果たす。PCNAは、アダプタータンパクである複製因子C (RFC) と共同して、DNAポリメラーゼデルタおよびイプシロンのドッキングポイントとなる移動クランプを形成する。増殖性細胞核抗原(PCNA)については、酸性および塩基性の等電点(pI)の両方を示す、異なるイソ型が明らかにされている。悪性の、および非悪性の乳房細胞および組織由来のPCNA (非悪性PCNA、またはnmPCNAと呼ばれる)に関する、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析から、酸性形のPCNAは、悪性細胞にしか存在しないことが明らかにされた (癌特異的PCNA、またはcsPCNA、またはcaPCNAと呼ばれる)。これら二型のPCNA間に見られる、この等電点の差は、悪性細胞における、PCNAポリペプチドに対する翻訳後修飾能力の変化によるものと見られ、PCNA遺伝子内の遺伝学的变化によるものではなさそうである。

20

【0003】

caPCNAと、PCNAの非悪性細胞イソ型との間の構造的な違いを定めるため、PCNAポリペプチドの構造を調べる構造研究が行われ、癌細胞中でだけ露出されるcaPCNAタンパクの領域が明らかになった。PCNAの癌特異的イソ型の領域に対して抗体が開発されたが、これは、癌細胞のみに発現されるPCNAイソ型に対し高度に選択的である。

【0004】

増殖性細胞核抗原 (PCNA) は、29 kDaの核タンパクであり、その発現は細胞周期がS期およびG2期にある細胞において起こるために、このタンパクは、細胞増殖の優れたマーカーとなる。さらに、このタンパクは、細胞の生死に関わる分子経路の多くに関与することが明らかにされている。PCNAは、S期の核に周期的に出現することから、DNA複製への関与が示唆された。その後、PCNAは、哺乳類細胞ではDNAポリメラーゼの補助因子として、またインビトロにおいてはSV40のDNA複製の必須因子として特定された。PCNAは、哺乳類細胞において、DNA滑走クランプタンパクおよびDNAポリメラーゼ補助因子として機能する外に、転写、細胞周期チェックポイント、クロマチン再構成、組み換え、アポトーシス、および他の形態のDNA修復に関与する、いくつかの他のタンパクと相互作用する。活動が多様である外に、PCNAの多数の結合パートナーは、各新世代細胞による、細胞機能の正確な継承に寄与することによって互いに結ばれる。PCNAは、染色体処理を調整するマスター分子として活動すると考えられる。

30

【0005】

PCNAはさらに、FEN-1、DNAリガーゼ、およびDNAメチルトランスフェラーゼのような他の因子とも相互作用することが知られる。さらに、PCNAは、多数のDNA修復経路において必須の関与因子であることが示された。ミスマッチ認識タンパクMsh2、およびヌクレオチド除去修復エンドヌクレアーゼXPGのようなタンパクと相互作用することから、PCNAは、DNA合成とは別の過程にも関与することが示唆された。多数のパートナーとの相互作用は、一般に、定序性でエネルギー的に有利なやりかたでPCNAが選択的に相互作用できるようにする機序に依存する。

40

【0006】

50

ポリクロナールおよびモノクロナール抗体の生成のために短い合成ペプチドを用いる方法が使用され、かなりの成功を収めている。ペプチドは、化学誘引物質、強力な神経系および呼吸系毒素、およびホルモンとして活動することが知られる。ペプチドはさらに、生化学研究においてアフィニティー標的およびプローブとして使用され、個々独立のタンパク-タンパク相互作用の特徴および特性理解の基盤を提供してきた。さらに、ペプチドホルモンは、強力な生理的作用を及ぼし、活性型のホルモンは、より大きなタンパクの中に含まれるペプチドであるか、または、プロセシングされて、前駆体タンパクから放出されて始めてその生理作用を発揮する場合もある。

【0007】

ペプチドは、タンパク-タンパク相互作用を阻害するために、高度に特異的な競合因子として機能させて使われてきた。ペプチド試薬を用いる生化学研究によって、タンパク-タンパク相互作用を必要とする細胞機能を阻害することが可能で、治療薬としてのペプチドの利用が促進された。したがって、個々独立のタンパク-タンパク相互作用に依存する、アポトーシスおよび細胞周期進行などの特異的細胞過程は、そのタンパク-タンパク相互作用を選択的に阻害すれば、抑制することが可能である。タンパク-タンパク相互作用に依存するゲノムDNAの複製もまた、これらのタンパク相互作用に対するペプチド誘発性抑制に対し感受性がある。

10

【0008】

インビオでのDNA合成は、複雑な系列のタンパク-タンパク相互作用によって仲介される、無数の生化学反応に依存する、高度に統制的な過程である。細胞分裂は、DNA合成過程に依存するが、癌細胞の増殖は、癌細胞のゲノムDNAの複製に与るDNA合成機序の調節および/または活性を阻害する介在因子に対しては、それがいずれのものであれ、相当な感受性がある。さらに、形質転換した細胞がきわめて侵襲性の高い転移性表現形を呈することから、乳癌の一つの表徴は、ゲノム不安定性の誘発であることが明らかにされた。ゲノム不安定性は、DNA合成の忠実性を変える、細胞内DNA合成機構における一連の変化を通じて発生する。

20

【0009】

p21cipタンパク (PCNAタンパクと相互作用することが知られる) の、カルボキシル末端の26個のアミノ酸を用いた実験から、このペプチドは、細胞増殖過程を阻害する能力を持つことが証明された。p21のこのペプチド断片は、PCNAを利用する、一つ以上の細胞過程を阻害する能力を持ち、恐らく、DNA合成過程に関与する、もっとも重要なタンパク-タンパク相互作用のみならず、他の細胞サイクルチェックポイント調節の調整およびアポトーシスの誘発にも干渉するものと考えられる。

30

【0010】

p21のこのペプチド断片を利用した実験から、このp21ペプチドが、カスパーゼの関与しないアポトーシス経路を活性化する能力を持つことが明らかにされた。同様に、p21タンパクの、39アミノ酸のペプチド断片を含む実験で、DNA複製がインビオにおいて部分的に抑制されたが、このことは、p21のこのペプチド断片が、PCNA-p21タンパク相互作用を安定化し、それが、細胞内におけるDNA合成活性の低下を招く可能性のあることを示唆する。

40

【0011】

HLAクラスII配列の残基65-79に対応する合成ペプチドは、ラバマイシンによって誘発されるものと同じやり方で、細胞周期の進行を抑制することが可能である。この実験は、細胞周期調節タンパクから得られたもの以外のペプチドでも、細胞周期の進行を修飾する能力を持つことを示す。

【0012】

さらに、細胞周期チェックポイント調節およびDNA合成に与る、他の細胞内タンパクと相互作用すると考えられる、PCNA分子の特異的領域をモデル化するために、コンピュータによる化学的方法が使用されている。サイクリン-CDK複合体の領域は、細胞増殖に必須の、細胞周期チェックポイントの鍵となる調節ポイントを阻害するための標的部位を特定す

50

るための、鋳型となると考えられる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

癌を治療するためには、細胞増殖を抑制する合成ペプチドの使用と、細胞増殖の抑制を仲介する癌特異的PCNAタンパクを選択的に標的とする過程が要求される。癌細胞に特有の特異的タンパク-caPCNA相互作用を阻害するための、paPCNA上の抗原部位、すなわち標的部位と相互作用するような、ペプチド様薬剤が求められている。本明細書に開示される、caPCNA特異的エピトープに由来するペプチドは、従来の、特異的化学療法的処方の細胞傷害作用を著明に増強し、したがって、癌細胞を高度に選択的なやり方で殺傷する。

10

【課題を解決するための手段】

【0014】

非悪性PCNA(nmPCNA)タンパクまたは癌特異的(caPCNAまたはcsPCNA)相互作用タンパクの、特異的な領域またはドメインに由来するペプチドは、インビボにおいて、細胞内タンパクとPCNAタンパクとの相互作用を干渉する。caPCNAタンパクのペプチド断片を表す特異的アミノ酸配列は、PCNAの調節活性を阻害し、次いで、PCNAを必要とする細胞過程の機能、例えば、DNA複製、修復、染色体組み換え、および細胞周期チェックポイント調節を含む機能、の阻害を通じて、癌細胞の増殖を抑制する。

【0015】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型 (caPCNA) と、悪性細胞における細胞内タンパクとの、インビボでの相互作用を選択的に抑制するための方法であって：

- (a) caPCNAと該細胞内タンパクとの相互作用を選択的に阻害する薬剤を準備する工程；
- (b) 該薬剤がインビボにおいて癌細胞集団と接触するように、該薬剤を投与する工程；
- および、
- (c) caPCNAと該細胞内タンパクとの相互作用を抑制すること、
を含む方法。

【0016】

該薬剤は、ペプチド、ペプチド様小型分子、またはそれらの組み合わせのいずれかであってもよい。ある実施態様では、薬剤は、アミノ酸配列LGIPEQEYを含むペプチドである。別の実施態様では、薬剤は、アミノ酸配列LGIPEQEYを含むペプチド様分子であって、標的部位においてcaPCNA分子と相互作用する分子である。

30

【0017】

ある実施態様では、薬剤は、標識配列をさらに含むペプチドである。標識配列は、アミノ酸配列RYIRSを含んでもよい。どのような転位配列であっても、本実施態様において使用するのに好適である。

【0018】

ある実施態様では、薬剤は静脈内に投与される。ある実施態様では、薬剤は、リポソーム、微粒子、およびナノ粒子を含む群から選ばれる、治療剤送達システムにおいて処方される。

【0019】

ある実施態様では、薬剤は、caPCNAと、DNA合成、DNA修復、組み換え、転写、細胞周期チェックポイント調節、およびアポトーシスを含む群から選ばれる細胞過程に関与する細胞内タンパクとの相互作用を阻害する。

40

【0020】

ある実施態様では、薬剤は、そのアミノ酸配列が、caPCNA上の抗原部位に由来する、ペプチド分子である。別の実施態様では、薬剤は、その分子構造が、caPCNA上の抗原部位に対応する、ペプチド様分子である。別の実施態様では、薬剤は、そのアミノ酸配列が、caPCNA上のタンパク結合部位に由来する、ペプチド分子である。

【0021】

ある実施態様では、薬剤は、その分子構造が、caPCNA上のタンパク結合部位に対応する

50

、ペプチド様分子である。

【0022】

ある実施態様では、薬剤は、caPCNA上の結合部位に対して競合する小型分子であり、結合部位は、細胞内タンパクと相互作用することが可能である。

【0023】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型 (caPCNA) と、悪性細胞における細胞内タンパクとの、インビボにおける相互作用を選択的に抑制するための方法であって：

(a) caPCNAと細胞内タンパクとの相互作用を選択的に阻害する薬剤を準備する工程であって、薬剤は、そのアミノ酸配列または分子構造が、caPCNAと相互作用する細胞内タンパクにおけるcaPCNA結合部位に由来する、ペプチドまたはペプチド様分子であり；

(b) 該薬剤がインビボにおいて癌細胞集団と接触するように、該薬剤を投与する工程；および、

(c) caPCNAと細胞内タンパクとの相互作用を抑制する工程、
を含む、方法。

【0024】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型 (caPCNA) を発現する悪性細胞の、インビボにおける細胞増殖を抑えるための方法であって：

(a) caPCNAと細胞内タンパクとの相互作用を選択的に阻害する薬剤を準備する工程；

(b) 該薬剤がインビボにおいて癌細胞集団と接触するように、該薬剤を投与する工程；および、

(c) 悪性細胞の細胞増殖を抑える工程、
を含む、方法。

【0025】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型 (caPCNA) を発現する癌に対する、癌治療を強化するための方法であって：

(a) caPCNAと細胞内タンパクとの相互作用を選択的に阻害する薬剤を準備する工程；

(b) 癌に対する化学療法剤を準備する工程；

(c) 該薬剤および化学療法用薬剤を、これらの薬剤の少なくとも一部がインビボにおいて癌細胞集団と接触するように、投与する工程；および、

(d) 癌治療を強化する工程であって、化学療法単独によって死滅する癌細胞数に比べ、より多数の癌細胞が死滅することを特徴とする工程、
を含む、方法。

【0026】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型 (caPCNA) と悪性細胞における細胞内タンパクとの相互作用を選択的に抑制する、候補薬剤を特定するための方法であって：

(a) 薬剤を準備する工程；

(b) caPCNA由来ペプチドを準備する工程；

(c) 該caPCNA由来ペプチドに結合する薬剤を特定する工程；および、

(d) 該薬剤が、caPCNAと細胞内タンパクとの相互作用を抑制する場合、該薬剤を候補薬剤と決定する工程、
を含む、方法。

【0027】

caPCNA細胞相互作用の特異的抑制因子を獲得するには、caPCNA由来ペプチド、例えば、アミノ酸配列LGIPEQEYを持つペプチドの構造または配列情報に基づく合理的薬剤設計方法論の導入も可能である。ある実施態様では、薬剤は、細胞内タンパクに由来するペプチド断片である。ある実施態様では、この細胞内タンパクは、caPCNAと相互作用することが知られる。

【0028】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型 (caPCNA) を発現する悪性細胞の、インビボ細胞増殖を抑えるための治療用組成物であって、該組成物は、アミノ酸配列LGIPEQEY、またはそれ

10

20

30

40

50

と機能的に等価な構造またはペプチド様分子を含み、該ペプチド分子は、caPCNAのアミノ酸配列に由来することを特徴とする。ある実施態様では、このペプチド分子はさらに、細胞を横切るペプチド取り込みを促進するペプチドドメインを含む。

【0029】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型(caPCNA)を発現する悪性細胞の、インビボにおける細胞増殖を抑えるためのリポソーム組成物であって、該組成物は、アミノ酸配列LGIPEQEYを有するペプチド分子、またはそれと機能的に等価な構造またはペプチド様分子を含み、該ペプチド分子は、caPCNAのアミノ酸配列に由来することを特徴とする。

【0030】

癌細胞におけるタンパク-タンパク相互作用を選択的に阻害する、caPCNA由来ペプチドを発現する組み換え細胞。ある実施態様では、該caPCNA由来ペプチドは、アミノ酸配列LG1PEQEYを含む。

10

【0031】

アミノ酸配列LGIPEQEYおよびペプチド転位配列を含む、合成ペプチド。

【0032】

増殖性細胞核抗原の癌特異的イソ型(caPCNA)を発現する悪性細胞の、細胞増殖を抑えるための治療用組成物であって、アミノ酸配列LGIPEQEYを有するペプチド分子を含む。このペプチド分子は、細胞透過性であって、ペプチド転位配列を含む。このペプチドは、プロテアーゼ耐性を持つ。

20

【0033】

ペプチド阻害剤と共に使用するのに好適な化学療法剤としては、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、ダトレキセート、ゲムシタビン、またはビノレルビン、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【0034】

他の、好適なPCNA由来ペプチド阻害剤としては、VEQLG1PEQEY、LGIPEQEYSCVVK、LGIPEQEYSCVVKMPSG、EQLG1PEQEY、QLG1PEQEY、LGIPEQEYSCVVKMPS、LGIPEQEYSCVVKMP、LGIPEQEYSCVVKM、LGIPEQEYSCVV、LGIPEQEYSCV、LGIPEQEYSC、LGIPEQEYS、および、LGIPEQEYに隣接するさらに別のNH₂およびCOOH末端アミノ酸の組み合わせ、が上げられる。

[関連出願に対する相互参照]

本出願は、2006年2月17日出願の、米国特許出願No. 60/743,313に対する優先権を主張する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0035】

本明細書に開示される方法および組成物は、癌細胞における生存に必須の細胞機能を選択的に阻害するような、caPCNA、およびcaPCNAと相互作用するタンパク(例えば、p21、XPG、Cdk2)に由来する、ペプチド、ペプチド様分子、それらの機能的類縁体、および小型分子に関する。これらのペプチドには少なくとも二つの活動様式がある。例えば、caPCNA由来ペプチドは、caPCNAと競合し、caPCNA相互作用タンパクに対して結合するか、または、caPCNA相互作用タンパク上の、該相互作用を阻害する部位に結合する。caPCNA相互作用タンパク由来ペプチドは、caPCNA上の、対応する結合部位を求めて競合し、そうすることによって、caPCNA相互作用タンパクの、caPCNAに対する結合を阻止する。

40

【0036】

caPCNAタンパク配列に由来する特異的ペプチドは、癌細胞におけるDNA複製、修復、細胞周期調節、アポトーシス、転写、または染色体組み換えのいずれかに関与する、いくつかの細胞タンパクの結合を遮断する能力を有する。このペプチドが、PCNA上の天然の結合部位についてこれらの細胞タンパクと競合させられると、caPCNAとこれらのタンパクとの結合が阻害される。PCNAと、PCNAに結合して相互作用するタンパクとの間の、天然に起こる相互作用が阻害されることによって、PCNAを招集する正常な細胞機能が阻害される。この、生命にとって基本的に重要な細胞機序を阻害することによって、このcaPCNA由来ペプチドは、それ自体で、または、他の分子、例えば、癌の化学療法剤と組み合わされて、細

50

胞傷害性を持つ。これらのペプチドは、単独で、または他の癌治療剤と組み合わされて、有用な癌化学療法剤、または特異的抗癌化学療法の薬力学作用の増強因子となる。これらのPCNA-由来ペプチド分子はさらに、特異的細胞過程の阻害因子として有用であり、新規機序に関する洞察を可能とし、正常細胞および癌細胞における、PCNAの関与する特異的細胞機能を調節する治療方法を可能とする。

【0037】

一般に、ペプチド阻害因子は、タンパク-タンパク相互作用の阻害は、そのタンパク相互作用によって仲介される細胞過程の阻害を招く、という概念に基づく。しかしながら、これらのペプチド阻害因子では、癌細胞だけにおいて利用可能となっているが、非癌細胞では、種々の手段、例えば、翻訳後修飾、タンパクの立体配座シフト、癌細胞に過剰発現されるタンパクへの結合、癌細胞における結合パートナーの欠如などのために、該アミノ酸配列が「隠される」ために利用できなくされているような、「癌特異的」アミノ酸配列を特定する必要がある、ということを考慮していない。したがって、本明細書で特定される標的配列の癌特異性は、癌細胞におけるタンパク-タンパク相互作用を阻害する点で特異的である。

10

【0038】

DNA傷害剤（例えば、ドキソルビシン）と組み合わされると、各種癌細胞を治療するそれら薬剤の治療作用を強化するように活動する能力を持つ、増殖性細胞核抗原（PCNA）タンパク由来のペプチド断片が、本発明において特定される。このペプチドは、PCNA中の、例えば、アミノ酸126-133の範囲内のアミノ酸に由来する。この配列は、癌細胞においてのみ発現され、非癌細胞では発現されないようである。XPGを含むPCNA結合タンパクが、癌細胞においてcaPCNAに直接結合することを妨げることによって、DNA傷害剤を含む化学療法剤の作用は強化される。このペプチド配列の内在的な細胞傷害性は、適切な細胞を、単独薬剤としての該ペプチドとインキュベートするか、または、ドキソルビシンなどの細胞傷害剤と組み合わせてインキュベートすることによって決定された。組織培養培地において指數関数的に増殖するU937白血病細胞培養体を用いた。リポソーム介在タンパク導入法を用いて、caPCNAペプチド(126-133)およびドキソルビシンをリポソームに封入し、10 μMで細胞培養体に加えた。白血球細胞系統U937を用いた結果から、このペプチドは内在的に細胞毒性を持つが、一方、このペプチドと、ある濃度範囲のドキソルビシンと共にU937細胞をインキュベートすると、ドキソルビシンの細胞傷害性は約3倍増加することが示された。この方法は、24時間以内に培養細胞の50%を超える殺作用をもたらした。その作用は、ペプチド／薬剤特異的であって、リポソーム介在性細胞毒性によるものではなかった。

20

【0039】

これらの白血球細胞をさらに、陽性コントロールとしてp21wafタンパクから得られたペプチドと共に、また、陰性コントロールとして酵母ミオシンタンパクから得られたペプチドと共に、数時間（4または24時間）インキュベートした。結果から、p21ペプチドは、ドキソルビシン無添加の場合でもきわめて細胞傷害性が高いが（60%を越える死滅）、PCNA由来ペプチド（アミノ酸126-133）は、白血球細胞の約20%を死滅させることが示された。細胞死滅・対・細胞傷害について、ヨウ化プロピジウムおよびアネキシンV染色を用いフローサイトメトリーによって評価した。

30

【0040】

これらの実験から、PCNA配列内のアミノ酸126-133に対応するペプチドは、抗癌性の化学療法活性を有することが示された。さらにこのデータから、PCNAタンパク、または、その任意の結合パートナー内の別のペプチド配列も、同様に、細胞増殖を調節し、細胞の生存に影響を及ぼす特異的細胞過程に干渉することが可能であることが示される。PCNAと、PCNAと相互作用するタンパクとの間の接触領域に由来するペプチドは、決定的に重要な細胞過程を阻害することが可能である。例えば、PCNAに結合することが知られる、他の、三つのタンパク（すなわち、Fen 1、p21、HDAC1）に由来する別のペプチドも、DNA複製および細胞周期チェックポイント調節などの重要な細胞過程において、抑制的役割を果たすよ

40

50

うに設計することが可能である。これらのペプチドは、正常な細胞分裂にはほとんど作用を及ぼさないが、癌細胞の増殖に対しては差別的に抑制するという、癌特異的作用を有する。作用におけるこの違いは、少なくともその一部は、caPCNAと、構造的に変化した、その結合パートナーとの間の相互作用部位における違い、すなわち、悪性細胞と非悪性細胞の間の、翻訳後修飾の違いによって誘発される立体配座変化による。治療戦略として、ペプチドの物理的形態の変化、例えば、天然のL-アミノ酸を別形態に変化させること（例えば、D-アミノ酸に切り換えるか、または、タンパク分解による非特異的分解を抑えるために、個々のアミノ酸同士の間のペプチド結合を変えること）は、これら修飾されたペプチドが治療的に使用される際、該ペプチドの半減期を延長するための有用な手段となる。

【0041】

10

caPCNA由来のペプチドおよびペプチド様分子は、癌細胞においてPCNAを利用する成分の競合因子として選択的に活動するという点で、新規な第三世代の抗癌治療剤を代表する。これらのペプチドのアミノ酸配列によって表される分子標的は、主に癌細胞において発現される。したがって、本明細書に開示されるペプチドは、当時の第二世代治療剤に対し、当時の第二世代治療剤が、癌細胞において上方もしくは下方調節、または発現される特異的経路を標的とするという点で、著明な進歩を示す。第二世代剤の場合、これらの細胞経路は非癌細胞においても活動しており、この第二世代の薬剤またはペプチドまたは剤による、これらの経路内の特定の段階の修飾は、癌細胞と非癌細胞とをはっきりと区別することはできない。

【0042】

20

本明細書において開示されるペプチド配列は、癌細胞においてのみ解けると考えられるcaPCNAのある領域を標的とし、その結果、これらのペプチドは、caPCNA選択的抗体と反応する。したがって、本明細書に開示されるペプチドは、DNA複製、修復、組み換え、転写、細胞周期チェックポイント調節、およびアポトーシス、といった細胞過程の内の少なくとも一つに関与する、PCNA内のアミノ酸配列と相互作用するタンパクの活性の調節に関して、caPCNAと競合する能力を通じて、悪性細胞を選択的に標的とするように設計される。

【0043】

本明細書に開示されるペプチドは、標準的ペプチド合成手順および装置を用いて合成するか、または市販のものを購入することが可能である（例えば、United Biochemical Research Co., Seattle WA）。ヒトのPCNA分子のアミノ酸126-133(LGIPEQEY)を含み、次いで該ペプチドの細胞への取り込みを促進するための、インスリン受容体配列(RYIRS)を含む、caPCNA由来ペプチドは、インビトロにおいて癌細胞を選択的に抑制する。このペプチドの取り込みは、リン酸バッファー生食液(PBS)、または0.2-2% DMSOを含む無血清培地内で、ジメチルスルフォキシ(DMSO)の存在下に、このペプチドを、癌細胞と共に約4-24時間インキュベートすることによって開始した。このペプチドの取り込みはさらに、該ペプチドを、リボソーム処方の中に封入し、次いで、37℃で約4-24時間、癌細胞と共にインキュベートすることによっても効率的に仲介された。このペプチドはさらに、ドキソルビシンなどの化学療法用薬剤の細胞傷害作用を増強する。

【0044】

30

本明細書で用いる「薬剤」という用語は、核酸、タンパク、タンパク断片、ペプチド、合成ペプチド、ペプチド様分子や、それらのその類縁体、小型分子、抑制因子、および、タンパク-タンパク相互作用、または細胞過程に影響を及ぼすことが可能な、任意の、化学的な、有機的な、または生物有機的な、分子を含む。

【0045】

40

「caPCNA由来ペプチド」および「PCNA由来ペプチド」という用語は、ペプチド、PCNAの対応する領域と比べ、アミノ酸置換、アミノ酸類縁体、またはアミノ酸欠失を有する、修飾されたペプチド配列、および、PCNAの特定領域に対応するペプチド様分子、を意味する。PCNA由来ペプチドは、約5-50アミノ酸長、約5-20アミノ酸長、または約5-10アミノ酸長の範囲を持つことが可能である。PCNA由来ペプチドはさらに、精製タグ、例えば、his-タグ、FLAG-エピトープ、RYIRSタグ、および、細胞膜を横断するペプチド転位を促進する配

50

列、を含むことが可能である。PCNA-由来ペプチドはさらに、癌細胞へのペプチド輸送を強化するために、その親油性に影響を及ぼすように修飾することも可能である。ペプチドは合成することが可能であり（「合成ペプチド」）、あるいはまた、組み換え技術によって生産することも可能である（「組み換えペプチド」）。これらのペプチドはさらに、ca PCNA-タンパク相互作用の抑制効力にあまり影響を与えないに、そのインビオでの安定性を増すように加工することも可能である。本明細書に開示されるペプチドの抑制活性に事実上影響を及ぼさない突然変異、例えば、挿入、欠失、置換、アミノ酸修飾を含む突然変異、も含まれる。実質的に126-133番目の配列LGIPEQEYから成るペプチドは、他の特異的、または非特異的配列を含んでもよい。

【0046】

10

「ペプチド誘導体」とは、PCNA、またはPCNA相同体のアミノ酸配列を有し、さらに、そのアミノ酸側基、-炭素原子、末端アミノ基、または末端カルボキシル基の内の少なくとも一つの化学的修飾を有する分子を意味する。化学的修飾は、化学的成分の添加、新規結合の創出、および化学的成分の除去、を含む。アミノ酸側基の修飾としては、リジンのアシル化、-アミノ基、アルギニン、ヒスチジン、またはリジンのN-アルキル化、グルタミン酸またはアスパラギン酸のカルボキシル基のアルキル化、および、グルタミンまたはアスパラギンの脱アミノ化、が挙げられる。末端アミノの修飾としては、デス-アミノ、N-低級アルキル、N-ジ-低級アルキル、およびN-アシル修飾、が挙げられる。末端カルボキシル基の修飾としては、アミド、低級アルキルアミド、ジアルキルアミド、および低級アルキルによるエステル修飾、が挙げられる。低級アルキルは、C1-C4アルキルである。さらに、一つ以上の側基、または末端基は、通常の熟練度のタンパク化学者には既知の保護基によって保護されてもよい。アミノ酸の炭素は、モノ、またはジ-メチル化されてもよい。

20

【0047】

このPCNA-由来ペプチドはさらに、癌細胞に存在する細胞表面受容体に対するリガンドに対して、融合されるか、または、他のやり方で連結させることが可能である。例えば、細胞増殖のマーカーである、ヒトのトランスフェリン受容体(hTfR)は、治療剤の標的として使用されるが、口内、肝臓、腎臓、前立腺、および他の癌において少なくとも100倍高く発現される(Lee et al., (2001)「ヒトのトランスフェリン受容体に結合するペプチドの、受容体介在性の取り込み("Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor,")」、Eur. J. Biochem., 268:2004-2012)。ペプチドHAIYPRHおよびTHRPPMWSPVWPは、hTfRに特異的に結合するが、これらのペプチドは、hTfRに結合した巨大分子を標的とすることが可能であった(Lee、上記)。これらのペプチドは、生得リガンドであるTfとは重複しない部位に結合し、インビオでhTfR陽性細胞における細胞内経路にむけて巨大分子を標的とさせるのに有用である(Lee、上記)。このペプチドはさらに、ペプチド輸送を強化し、さらに、特異的輸送を強化するよう、PCNA-由来ペプチドを標的とするために使用することも可能である。

30

【0048】

caPCNA由来ペプチドと連結または融合するのに好適な、細胞透過性ペプチドまたはペプチドドメインの例としては、例えば、ある種のタンパクの形質導入ドメインに由来する小型のポリ塩基ペプチド、例えば、Antennapedia (Antp) ホメオドメインの第3ヘリックス、RYIRSタグ配列、ペネトラチン(RQIKIWFQNRRMKWKK)、Tat (GRKKRRQRRRPQ)、Transportan (GWTLNSAGYLLGK1NLKALAALAKKIL)、VP22(DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRPVD)、両親媒性ペプチド(二級および一級)、MAP (KLALKLALKALKALKLA)、KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA)、ppTG20 (GLFRALLRLRS LWRLLLRA)、トリマー(VRLPPP)、P1 (MGLGLHLLVLAAALQGAWSQPKKKRKV)、MPG (GALFLGFLGAAG STMGAWSQPKKKRKV)、Pep-1 (KETWWETWWTEWSQPKKKRKV)、hGT (LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP)、などが挙げられる。

40

【0049】

癌に対する特異的抗癌治療剤としては、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン

50

、メトトレキセート、シクロフォスファミド、5-フルオロウリジン、ロイコボリン、イリノテカン、パクリタキセル、カルボプラチニン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、カルボプラチニン、エダトレキセート、ゲムシタビン、またはビノレルビン、またはそれらの組み合わせ、が挙げられる。

【0050】

本明細書において開示されるペプチドはさらに、放射線治療、および他の任意の形態の癌治療を受ける癌患者に好適である。本明細書に開示されるペプチド阻害剤は、ある特定の癌治療、例えば、化学療法または放射線療法を投与する前、最中、およびその後のいずれかにおいて投与することが可能である。

【0051】

本明細書において開示されるペプチドを用いて治療するのに好適な癌は、例えば、悪性腫瘍、例えば、種々の形態のグリア芽細胞腫、グリオーマ、星状細胞腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、メラノーマ、結腸癌、肺癌、腺癌、子宮頸癌、卵巣癌、膀胱癌、リンパ芽細胞腫、白血病、骨肉腫、乳癌、ヘパトーム、腎腫、副腎癌、または前立腺癌、食道癌、が挙げられるが、これらに限定されない。悪性細胞がcsPCNAイソ型を発現する場合、本明細書に開示される組成物は、caPCNAイソ型と、一つ以上のタンパクとの相互作用を阻害することが可能である。

【0052】

「ペプチド様」または「ペプチド模倣性」とは、非天然アミノ酸などの非ペプチド要素を含む、小型の、タンパク様鎖（ペプチド）を有する化学的化合物を指す。ペプチド様分子は、ある特定の変化を誘発または実行するために、標的タンパクに結合させる目的で設計され、合成される。一般に、ペプチド様分子は、それが模倣または拮抗するように設計される、親ペプチド構造の重要な相互作用を、模倣または拮抗することによって機能する。ペプチド様分子は、通常、酵素的に切断可能なペプチド結合といった、古典的ペプチドの特徴を持たない。ペプチド様分子を設計および合成するための各種技術の一般的総覧については、al-Obeidi et al., (1998), 「ペプチドおよびペプチド様分子ライブラリー、分子多様性および薬剤設計 (“Peptide and peptidomimetic libraries. Molecular diversity and drug design”)」、Mol Biotechnol.; 9(3):205-23; および、Houben-Weyl: 「ペプチドおよびペプチド様分子の合成 (“Synthesis of Peptides and Peptidomimetics”)」、Thieme Medical Publishers, 4th edition (2003)を参照されたい。

【0053】

別の実施態様では、ca(cs)PCNA相互作用を阻害することが可能なペプチドとして、LGIP EQEYのNH₂末端において、約+3個の連続的または非連続的な追加のアミノ酸を含むアミノ酸配列、および、LGIP EQEYのCOOH末端において、約+9個の連続的または非連続的なアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられる。例えば、これらのペプチドの内にいくつかとして、VEQLG IPEQ EY(+3-NH₂末端)、LGI PEQ EY SCSV K (+5-COOH末端)、LGI PEQ EY SCSV K M P S G (+9-COOH末端)、EQLG IPEQ EY (+2-NH₂末端)、QLG IPEQ EY(+1-NH₂末端)、LGI PEQ EY SCSV V K M P S G (+8-COOH末端)、LGI PEQ EY SCSV K M P (+7-COOH末端)、LGI PEQ EY SCSV V K M P S G (+6-COOH末端)、LGI PEQ EY SCSV (+4-COOH末端)、LGI PEQ EY SCSV (+3-COOH末端)、LGI PEQ EY SCSV (+2-COOH末端)、LGI PEQ EY SCSV (+1-COOH末端)、およびLGI PEQ EYに隣接する、追加のNH₂およびCOOH末端アミノ酸の組み合わせから成るアミノ酸配列、が挙げられる。これらのペプチドの特異性に影響を及ぼさない置換を含むアミノ酸突然変異で、csPCNA特異的抗体を生成するものは、本開示の範囲内にある。このペプチドのアミノ酸残基の内の一つ以上は、アミノ酸類縁体、または非天然アミノ酸によって置換されてもよい。さらに、本明細書に開示されるペプチドの配列に基づいて開発されるペプチド様分子も、csPCNAイソ型に対する抗体を生成するために使用することが可能である。

【0054】

PCNA由来ペプチド、およびその他のPCNA相互作用タンパク由来ペプチドの投与用量は、該ペプチドの効力、インビボにおける該ペプチドの安定性、投与方式、治療される癌の性質、患者の体重、年齢、および、当業者によって一般に考慮されるその他の要因、に依存

10

20

30

40

50

する。例えば、PCNA由来ペプチド剤の用量は、体重kg当たり約0.1~10.0マイクログラム(mcg)、体重kg当たり約0.2~1.0 mcg、体重kg当たり0.5~5.0 mcg、または、体重kg当たり10.0~50.0 mcgの範囲に亘ることが可能である。毒性作用および腫瘍死滅能に応じて、用量はさらに、体重kg当たり約1.0~10.0 mg、および、体重kg当たり0.1~1.0 mgの範囲に亘ることが可能である。

【0055】

本明細書に開示される組成物の投与は、通常の医師によって有効であることが知られるものであるならば、いずれのルートにおいて実行されてもよい。末梢への非経口的投与が適切である。非経口的投与は、一般に、医学文献においては、剤形を、滅菌シリンジによって体内へ注入することとして理解される。末梢への非経口的ルートとしては、静脈内、筋肉内、皮下、および、腹腔内への投与ルートが挙げられる。本明細書に開示される組成物については、静脈内、筋肉内、および皮下への投与ルートが適切である。非経口的投与では、本明細書に開示されるペプチドは、リン酸バッファー生食液(PBS)と組み合わせるか、または、ヒト被検体投与用FDA基準を満たすものであれば、任意の、適切な発熱物質非含有の、製薬等級バッファーと組み合わせることが可能である。本明細書で用いる「製薬学的に受容可能な担体」は、所望の特定の剤形に適合するものであれば、いずれの溶媒、希釈剤、またはその他の液体ベヒクル、分散促進剤または懸濁促進剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、保存剤、などであってもよい。Remingtonの「製薬科学("Pharmaceutical Sciences")」、20th Edition, A.R. Gennaro (Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 2000)は、製薬組成物を処方する際に使用される各種担体、およびその調製のための既知の技術を開示する。本明細書に記載される組成物の溶液または懸濁液はさらに、滅菌希釈剤、例えば、注射用水、生理的食塩水、固定油、ポリエチレン glycol、グリセリン、プロピレングリコール、またはその他の合成溶媒；EDTAなどのキレート剤；バッファー、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩；および、浸透圧調整用剤、例えば、塩化ナトリウム、またはデキストロース、を含むことが可能である。本組成物の非経口調剤は、従来技術分野の標準慣行にしたがって、アンプル、ディスポーザブルシリンジ、または、ガラスもしくはプラスチック製のバイアルの中に封入することが可能である。本明細書に開示される組成物は、再構成用のためのバイアルにおいて、滅菌凍結乾燥粉末として保存してもよいし、再構成前の調製品は、-20°で保存されてもよい。

【0056】

本明細書に開示されるペプチドおよびその他の組成物は、適切なものであれば、任意の手段によって投与することが可能である。例えば、ペプチド組成物は、生食液、または任意の適切なバッファーで希釈してよく、直接静脈内に投与してもよい。例えば、このペプチド組成物は、リポソーム内に封入し、当業者には周知の薬剤徐放送達システムによって送達することも可能である。腫瘍を標的とする他の方式も適切である。例えば、米国特許出願US20050008572号公報(Prokop et al.,)は、ナノ粒子の腫瘍標的および治療に関する方法および組成物を開示する。なお、この開示を、引用により本明細書に含める。米国特許出願US20030212031号公報(Huang et al.,)は、安定な、脂質含有薬剤送達複合体、およびその生産法を開示する。なお、この開示を引用により本明細書に含める。

【実施例】

【0057】

〔実施例1〕

<乳癌細胞に対するcaPCNA由来ペプチドの細胞傷害性作用>

指数関数的に増殖中の乳癌細胞を、50%集密まで培地内で培養した(図1)。次に、培地を交換し、トランスフェクション試薬(PJR)から調製したリポソームを、培地内でさらに24時間該細胞とインキュベートし、次いで、この処理した細胞のフローサイトメトリー分析を行った。

【0058】

リポソームは、p21waf1タンパクのカルボキシル領域、および/または、caPCNA抗原部位ペプチド(LGIPEQHEY)を含んでいた。24時間後、細胞を、ヨウ化プロピジウム、および

10

20

30

40

50

蛍光標識アネキシンV抗体によって染色した。健康な増殖細胞は、図1の下段左パネルに示すように、抗体に対して不透過性であるが、一方、透過処理された健康細胞は、トランスフェクション試薬に対して感受性を持つが、依然として増殖し、ヨウ化プロピジウムによって染色された。アネキシンVによって染色される細胞は、アポトーシス細胞の誘発と関連した、あるレベルの傷害（図1の、下段右4分の1）、および／または、アポトーシスか壊死のどちらかによって死んだ細胞（図1、上段右4分の1）を示す。

【0059】

これらの結果から、生理的食塩水によって処理されるコントロール細胞は、最初の、上段左パネル（図1）と関連するフロープロフィールをもたらすことが明らかにされた。トランスフェクション試薬のみによって処理された細胞は、細胞の状態に僅かに影響し、アポトーシスおよび壊死細胞の数に若干の増加をもたらした。p21細胞傷害性ペプチド断片によって処理した細胞は、誘発性細胞死滅作用を示し（図1、上段右パネル）、caPCNAペプチドによって処理した細胞は、強力な細胞傷害性反応を示し、健康な増殖細胞の大抵のものが損傷を受け、アポトーシスまたは細胞死を経過する途上にあった。caPCNAを100 μMドキソルビシンと組み合わせると、測定期間内においてほぼ90%の細胞の死滅がもたらされた。さらに、残余細胞の約5-7%が、アポトーシスを経過しつつあり、死滅が予定されるようであった。低用量のドキソルビシンによって処理された細胞は、著明なレベルの細胞殺作用を示したが、caPCNAとこの用量のドキソルビシンと組み合わせると、相乗作用が得られ、これは、分析された細胞のほとんど全ての死をもたらした。この薬剤の致死量未満の濃度において、細胞を、一組の低濃度の本ペプチドに暴露したところ、ドキソルビシンの致死性は著明に強化された。

10

20

30

【0060】

〔実施例2〕

<XPG-GST融合タンパクは、nmPCNAに比べ、caPCNAに対し優先的に結合する>

caPCNAを選択的に単離し、精製しようとする以前の試みは不成功であった。この問題は、caPCNA精製用のアフィニティー基質として固定化したXPG-GST融合タンパクのシステムを用いることによって克服された（図2）。PCNAを精製するために、一般的に用いられるフォスフォセルロース、フェニルセファロース、およびQ-セファロース基質に基づくクロマトグラフィー工程を使用したところ、二つのイソ型を共に含むタンパク分画が得られた。この二つのPCNAイソ型を分離するために、固定化したXPG-GST融合タンパク断片を、精製スキーの中に含まれるアフィニティーカラムの中に取り込んだ（図3）。この融合タンパクのXPG部分の、PCNAの二つのイソ型に対する結合アフィニティーに差があることから、この方法原理によって、caPCNAの、nmPCNAからの効果的精製が実現された。その後、アフィニティー（XPG-GST）カラムにおける流出分画および溶出分画の2D-PAGE分析によって、非悪性細胞（nmPCNA）に存在する塩基性PCNAイソ型はアフィニティーカラムの流出分画に認められ、一方、酸性イソ型（caPCNA）は、カラムから溶出される分画において回収されること（図2）が明らかになった。

【0061】

MCF7細胞（ヒトの乳房腺癌細胞系統）抽出物を、シンテソームの抽出のために処理した。次に、MCF7由来シンテソームに対し、(Malkas, L. and Hickey, R. (1996)「パポバウイルスの複製に関するDNAポリメラーゼの発現、精製、および特徴解明（“The expression, purification and characterization of DNA polymerases involved in papovavirus replication.”）」、In: Methods in Enzymol. Vol. 275: Viral Polymerases and Related Proteins, Acad. Press (133-167))に記載される通りに、フォスフォセルロース、フェニルセファロース、およびQ-セファロース基質に基づくクロマトグラフィー工程を実施した。次に、nmPCNA およびcaPCNAの両イソ型を含む、Q-セファロース溶出分画を、XPG-GSTアフィニティーカラムに負荷した。カラムを溶出し、カラムの流出分画および溶出分画に対し、PC10抗体を用いて2D-PAGEウェスタンプロット分析を実施した。このウェスタンプロット分析では、PC10抗体は、1:1000希釈で用いた。

40

50

【0062】

XPG-GST融合タンパクを用い、MCF7細胞抽出物から、caPCNAを特異的に免疫沈澱させた(図3)。MCF7細胞抽出物の、30マイクログラムのサンプルを、XPG-GST融合タンパクと2時間インキュベートし、次いで、グルタチオンアガロースビーズと1時間インキュベートしてXPG-GSTを捕捉した。次に、この混合物を遠心してビーズを収集し、上清、およびXPG-GST PCNA複合体を含むアガロースビーズペレットに対し、2D-PAGEウェスタンプロット分析を実施した。次に、このウェスタンプロットを市販のPC10抗体を用いてプローブ探査した。図3で見て取れるように、XPG-GSTは、MCF7乳癌細胞抽出物の中から簡単にcaPCNAを選択的に認識し、沈殿させることができた。上清分画中には、nmPCNAイソ型が残された。

【0063】

実施例1は、caPCNA由来ペプチドの、癌細胞の細胞傷害性に対する作用を記載する。caPCNA上のcaPCNA由来ペプチド部位は、種々の重要なタンパクのそれぞれ、例えば、XGP(Xeroderma Pigmentosum(色素性乾皮症)Gタンパク)が適合する、分子鍵穴として活動する。これらの相互作用タンパクは、それらがPCNAと相互作用するとき、特異的細胞過程、例えば、DNA修復、細胞周期チェックポイント調節などを活性化する鍵として活動する。これらのタンパクのPCNAに対する結合を阻害することによって実現される治療的利点は、固定XPG-GST融合タンパク断片のcaPCNAに対する優先的結合によって示されるように、PCNAの癌特異的イソ型と、正常細胞イソ型との間に見られる、その結合部位構造の差に関連する。癌細胞は、この阻害に対して敏感である。なぜなら、その結合部位は、caPCNAイソ型では露出しているのに、nmPCNAイソ型では隠されているからである。この結合部位は、競合ペプチドが存在する場合は、利用することも、接触することもできないか、または、この結合部位は、悪性細胞型と、非悪性細胞型の間で、結合タンパクに対して異なるアフィニティーを持つ。

【0064】

さらに、caPCNAの「鍵穴」、すなわち、相互作用タンパク内の領域、またはドメイン、またはエピトープに対して、結合する「鍵」の使用も、有望な治療剤、および有望な治療標的として使用することが可能である。これらのタンパクの内の一つが、caPCNAのこの部位に対して選択的に結合することを示す証拠が、図2-4に示すように、グルタチオンS-トランスフェラーゼ遺伝子産物(すなわち、GST)に融合されたXPG断片の形で明らかにされる。この方法の原理は、ペプチド様分子(caPCNAの抗原部位に基づく)は、ドキソルビシンによる癌細胞殺作用を強化することが可能であるとの所見に基づく。このことは、抗原部位に対応するペプチドが、caPCNAに結合するタンパクを求めて、caPCNAと直接競合するためか、または、該タンパクがcaPCNAと連結する前に、この結合部位(caPCNAのaa126-133)を介してPCNAと相互作用する特異的タンパクの一つ以上と結合するためであるらしい。いずれのシナリオにせよ、このペプチドは、これらのタンパクの一つ以上が、caPCNA上の相補的結合部位に対して結合することを阻止する。この競合または差別的結合は、次いで、このタンパク-タンパク相互作用によって仲介される特異的細胞過程、例えば、ヌクレオチド除去修復経路を阻害する。図2は、PCNAの癌特異的イソ型(caPCNA)が、XPGタンパクの29アミノ酸断片をグルタチオンS-トランスフェラーゼに結合させ、細菌において融合タンパクを発現させて調製されたアフィニティカラムに、選択的に結合することを示す。このアフィニティカラムは、適切な結合条件下でcaPCNAを結合させる。結合したcaPCNAの溶出は、バッファーにおけるNaClの濃度を300 mMからゼロmMに下げることによって実現した。このデータは、caPCNAイソ型を選択的に結合させるために、XPG-PCNA相互作用を用いることが可能であることを示す。図3は、XPG-GST融合産物の一部として発現されるXPG断片に対するcaPCNAの特異的結合を支持する、別の証拠を示す。このデータは、nmPCNAを溶液に滞留させたまま、一方ではcaPCNAイソ型だけに選択的に結合し、沈殿せるように、XPG-GSTタンパクが使用されることを示す。その後の、固定XPG-GST融合タンパクによって選択的に結合されたタンパクの、2D-PAGEによる分析、続くPCNAの選択的抗体によるウェスタンプロットから、PCNAの癌特異的イソ型(酸性)は、固定XPG-GST融合タンパクに特異的に結合されるが、一方、nmPCNAは未結合のまま溶液中に残されることが明らかになった。図4は、XPG-GST融合タンパクが、組織抽出物に存在するcaPCNAの捕捉

10

20

30

40

50

および定量を可能とする一次試薬として使用することが可能であることを示す。ELISAの結果から、XPG-GSTは、細胞抽出物から、場合によっては患者の血清サンプルからcaPCNAを捕捉し、癌を抱える個人、または癌治療を受けている個人によって発現されるcaPCNAの効率的な監視を可能とすることが示される。

【0065】

これらの、caPCNA由来タンパク、caPCNA相互作用タンパク由来の特異的タンパク、およびペプチド断片は、有用な診断ツールであるばかりでなく、貴重な治療剤となる。さらに、これらのペプチド断片は、caPCNA上の抗原部位、すなわち、アミノ酸126-133とのタンパク-タンパク相互作用を阻害することによって、細胞増殖、および癌細胞増殖を阻害する。

10

【0066】

[実施例3]

<caPCNA検出のための、XPG-GST融合タンパクに基づくELISAアッセイの開発>

複雑なタンパク混合物におけるcaPCNAの量を検出するために、XPG-GST融合タンパクを使用するELISAアッセイを開発した(図4)。XPG-GST融合タンパクを、ELISAプレートウェルに結合させ、悪性MCF7細胞、または非悪性MCF10A乳房細胞から得た、漸增量のタンパク抽出物を、個々のウェル組に加えた。各ウェルにおける残留結合部位は、3% BSAとのインキュベーションによってブロックし、次いで、バッファー生食液によって徹底的洗浄を行った。市販のC20抗PCNA抗体を、一次抗体として用い、リン酸バッファー生食液による洗浄後、各ウェルは、西洋ワサビペルオキシダーゼと接合させた抗ヤギIgGとインキュベートした。非特異的に結合した二次抗体は、0.05% Tween 20界面活性剤を含むリン酸バッファー生食液で各ウェルを洗浄することによって除去した。各ウェルは、ABTS[2,2'-エチルベンジアゾリン-6-スルfonyl酸]を含むバッファーと30分インキュベートし、次いで、405 nmにおいて溶液の吸収を読み取った。nmPCNAのみを含むMCF10A細胞抽出物では、低レベルのABTSしか有色産物に変換されず、産物は、1 μg/ml抽出物において飽和した。逆に、caPCNAおよびnmPCNAの両方を含む、MCF7細胞抽出物を含むELISA反応は(Bechtel、上記)、同じ抽出物濃度において3倍量の有色産物を生産し、反応液中の3倍量の細胞抽出物によってもなお飽和に達しなかった。MCF10AおよびMCF7細胞抽出物を含む反応の間に見られる吸収度の差は、MCF7細胞抽出物に存在するcaPCNAの量を表す。

20

【0067】

[実施例4]

<PCNA 126-133ペプチドの相互作用の特異性>

図5は、caPCNA抗体が、プレートに結合されて、単離caPCNAを捕捉するために使用される、ELISAの結果を示す。ウェルを洗浄し、次いで、PCNAのC末端の20個のアミノ酸を認識する、ヤギ抗PCNA抗体(C20)とインキュベートした。結合したC20抗体は、抗ヤギIgG抗体に結合したアルカリリフォスファターゼによって可視化し、結合抗体複合体は、p-ニトロフェノールリン酸塩によって可視化し、分光光度計測によって定量した。この試験に示す競合実験では、ca(cs)PCNAと、漸增量の、caPCNAの抗原ペプチド断片(B1、またはPCNA aa126-133ペプチドと呼ぶ)との、同時インキュベーションが行われた。漸増濃度のペプチドB1の存在下にcaPCNAの全体分子の結合低下が示され、このELISAアッセイが、このペプチド配列によって定義されるcaPCNAエピトープの認識に対して特異的であることを明らかにする。

40

【0068】

図5に記載されるアッセイを用いて、PCNA aa126-133によって定義されるエピトープに対する、抗体結合部位の特異性を試験した(図6)。このELISAアッセイは、目標1に記載するように実行されたが、ただし、B1ペプチド、または、酵母のミオシンタンパク内部から取られたペプチド配列(H-Ser-Ala-Cys-Glu-Gln-Ile-Leu-Lys-Asp-Thr-OH)を、精製caPCNAの存在下に抗体に対する競合に用いた。図5に示すように、B1ペプチドは、抗体結合部位に対し効率的に競合するが、一方、無関係の酵母ミオシンペプチド(MAL4)は、caPCNAと、caPCNAabに対する結合について競合せず、プレートに結合した固定化caPCNAabに結合

50

するPCNAの量を減少させない。これらのデータは、B1ペプチドによって定義される、caPCNA上のエピトープに対する抗体結合部位の特異性を示す。

【0069】

本明細書に記載するELISAを、結合caPCNA抗体に対するcaPCNAの結合を阻害する、二つのペプチドの能力を監視するために用いた。このアッセイで評価された、一つのペプチド(H-Gly-Arg-Lys-Arg-Arg-Gln-Thr-Ser-Met-Thr-Asp-Arg-Tyr-His-Ser-Lys-Arg-Arg-Leu-Ile-Phe-Ser-OH)は、p21cip/waf1タンパクの、PCNAとの相互作用部位に対応するものであるが、このELISAアッセイでは、caPCNAの、結合caPCNA抗体に対する結合に対し全く作用を及ぼさないことが示される(図7)。他方のペプチド(H-Gln-Thr-Gln-Leu-Arg-Ile-Asp-Ser-Phe-Phe-Arg-OH)は、XPGタンパクのXPG-PCNA相互作用部位に対応するものであるが、cPCNA抗体に対する結合について、精製caPCNAと有効に競合し、本競合アッセイに使用したXPGペプチド量に直接比例して、アッセイにおける有色基質の発生を著明に抑えた。XPGペプチド自身は、抗原ペプチドとは無関係なので、caPCNA抗体とは相互作用しない。したがって、XPGペプチドは、PCNAタンパクの、caPCNA抗体に対する結合を阻止するために、その認識PCNA結合部位と相互作用する。このことは、抗体によって認識されるエピトープが、このXPGペプチドに特異的に結合することによってマスクされた場合に起こる。このデータは、caPCNAペプチド(aa126-133)、および、PCNA内の特定部位と相互作用するペプチド、例えば、XPGペプチド、および他の既知のPCNA結合パートナーの両方が、通常の結合パートナーによってPCNAが認識されることを阻害することが可能であり、かつ、そのようなタンパク-タンパク相互作用に依存する細胞機能を阻害する可能性のあることを示す。

10

20

30

【0070】

〔実施例5〕

<PCNAイソ型間の機能差、II部：XPGはcsPCNAに特異的に結合する>

XPG-GSTアガロースカラムを調製し、次いで、このカラムを用いてMCF7乳癌細胞核抽出物を展開した。カラム流出、カラム洗浄、および溶出条件は、XPG-PCNAの結合条件に基づいて使用した。アフィニティー(XPG-GST)カラムから得られた、流出+洗浄分画、および溶出タンパク分画の2D-PAGE分析から、非悪性細胞に存在するPCNAの塩基性イソ型(nmPCNA)は、XPG-GSTアガロースカラムの流出+洗浄分画に認められたが、一方、酸性PCNAイソ型、すなわちcsPCNAは、カラムの溶出タンパク分画において回収された(図8A)。PC10およびcsPCNAabの二つの抗体を用いて、XPG-GSTカラム分画について1D-PAGEウェスタン分析を行った(図8B)。csPCNAabは、カラムを展開するのに使用された条件下において、XPG-GSTアガロースカラム溶出分画に含まれるPCNAイソ型のみを認識し、このことは、XPGはcsPCNAに優先的に結合すること、および、これらのPCNAイソ型は、既知のPCNA結合パートナーに対し異なるアフィニティーを持つことを示唆する。

【0071】

〔表1：PCNA aa126-133領域を含むペプチドドメイン〕

PCNA配列111-125 LVFEAPNQEK VSDYEMKLMD <u>LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGNGNI</u> KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
PCNA配列118-135 LVFEAPNQEK VSDYEMKLMD <u>LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGNGNI</u> KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
PCNA配列121-133 LVFEAPNQEK VSDYEMKLMD <u>LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGNGNI</u> KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
PCNA配列126-133 LVFEAPNQEK VSDYEMKLMD <u>LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGNGNI</u> KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
PCNA配列126-143 LVFEAPNQEK VSDYEMKLMD <u>LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGNGNI</u> KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
PCNA配列126-153 LVFEAPNQEK VSDYEMKLMD <u>LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGNGNI</u> KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
PCNA配列126-163 LVFEAPNQEK VSDYEMKLMD <u>LDVEQLGIPEQEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGNGNI</u> KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN

126-133ドメインを含む領域は、下線を施して示す。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】図1は、乳癌細胞における、caPCNA標的ペプチド配列の、トランスフェクション実験のフローサイトメトリー分析を示す。

20

【図2】図2は、PCNAのためのXPG-GSTアフィニティカラム分画の2D-PAGE分析を示す。

【図3】図3は、caPCNAを特異的に免疫沈澱させるXPG-GST融合タンパクを示す。MCF7細胞抽出物の30 μg分液を、本文中に記載されるように処理した。ウェスタンプロット分析においてPCNAを可視化するために用いられるPC10抗体は、1:1000の希釈度で用いた。

30

【図4】図4は、caPCNA検出のためのELISA法によって得られた結果を示す。

【図5】図5は、caPCNA抗体 (caPCNAab) がプレートに結合されて、単離caPCNAの捕捉に使用される、ELISAの結果を示す。ウェルを洗浄し、次いで、PCNAのC-末端の20アミノ酸を認識する、ヤギ抗PCNA抗体 (C20) とインキュベートした。結合したC20抗体は、抗ヤギIgG抗体に結合したアルカリリフォスファターゼによって可視化し、結合抗体複合体は、p-ニトロフェノールリン酸塩によって可視化し、分光光度計測によって定量する。この試験に示す競合実験では、ca(cs)PCNAと、漸増量の、caPCNAの抗原ペプチド断片 (B1、またはPCNA aa126-133ペプチドと呼ぶ)との、同時インキュベーションが行われる。漸増濃度のペプチドB1の存在下にcaPCNAの全体分子の結合低下が示され、このELISAアッセイが、このペプチド配列によって定義されるcaPCNAエピトープの認識に対して特異的であることを明らかにする。

30

【図6】図6は、caPCNAによって認識されるエピトープとしての、ペプチド配列の特異性を示す。

【図7】図7は、XPG-PCNA相互作用ドメインの相互作用を示す。本明細書で記載のELISAを用い、B1ペプチド (PCNA aa126-133) が、定められたPCNA-XPG相互作用ドメインにおいてXPGと直接相互作用することが可能かどうかを評価した。

40

【図8】図8は、csPCNAが、XPGに特異的に結合することを示す。MCF7細胞核抽出物を調製し、低濃度の塩バッファー中で透析し、低濃度の塩バッファーで予備平衡化したXPG-GSTアガロースカラムに負荷した。カラムは、6カラム容量の予備平衡化用バッファーで洗浄した。カラムの流出および洗浄分画は、1つの分画として収集した。カラムは、バッファーおよび塩条件を用いて溶出した。(A)XPG-GSTアガロースカラム分画のPC10抗体による2D-PAGEウェスタンプロット。このウェスタン分析では、PC10抗体は、1:1000希釈で用いた。(B)XPG-GSTアガロースカラム分画のPC10およびcsPCNAab抗体による1D-PAGEウェスタン分析。このウェスタン分析では、PC10およびcsPCNAab抗体は、1:1000希釈で用いた。Mはマーカーを示す。

50

【図 1】

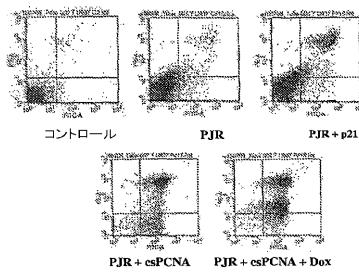


FIG. 1

【図 3】

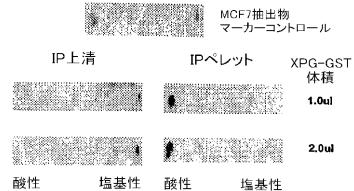


FIG. 3

【図 4】

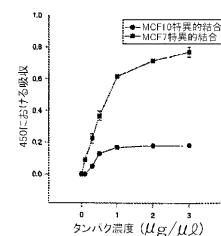


FIG. 4

【図 2】

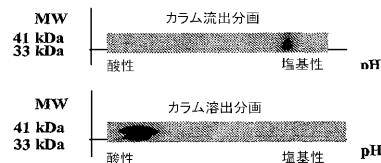


FIG. 2

【図 5】

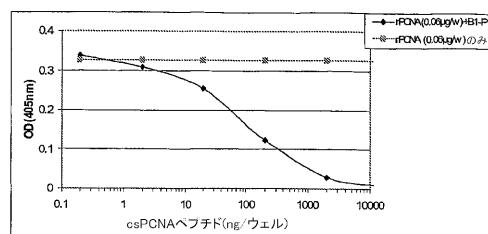


FIG. 5

【図 7】

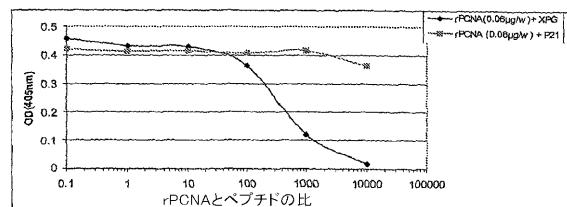


FIG. 7

【図 6】

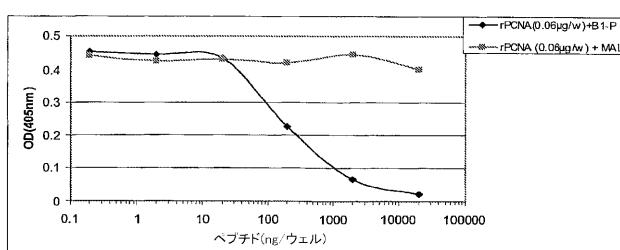


FIG. 6

【図 8】

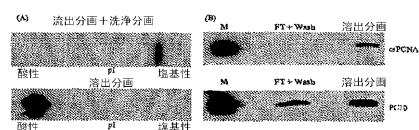


FIG. 8

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/062335

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/47 CI2N15/09

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)
C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/35715 A (UNIV DUNDEE [GB]; COX LYNNE SUZANNE [GB]; LANE DAVID PHILIP [GB]; WARBE) 14 November 1996 (1996-11-14) claim 11	1-13
X	US 5 935 797 A (CLAYBERGER CAROL [US] ET AL) 10 August 1999 (1999-08-10) claims 1,4,6,7	1-13 -/-

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 document 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 : Date of mailing of the International search report

19 September 2007

01/10/2007

Name and mailing address of the ISA /
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sirim, Pinar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/062335

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROOS G ET AL: "Determination of the epitope of an inhibitory antibody to proliferating cell nuclear antigen" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, SAN DIEGO, CA, US, vol. 226, no. 1, 10 July 1996 (1996-07-10), pages 208-213, XP002410788 ISSN: 0014-4827 the whole document -----	1-13
X	HUFF J P ET AL: "INSIGHTS INTO NATIVE EPITOPES OF PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN USING RECOMBINANT DNA PROTEIN PRODUCTS" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 172, 1 August 1990 (1990-08-01), pages 419-429, XP000573549 ISSN: 0022-1007 table 1 -----	1-13
X	ZHANG P ET AL: "The interdomain connector loop of human PCNA is involved in a direct interaction with human polymerase delta" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 273, no. 2, 9 January 1998 (1998-01-09), pages 713-719, XP002410923 ISSN: 0021-9258 the whole document -----	1-13
X	DATABASE UniProt [Online] EBI; 1 March 2001 (2001-03-01), "Proliferating cell nuclear antigen (Fragment)." XP002443529 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q9GK19 Database accession no. Q9GK19 the whole document -----	1-13
P,X	WO 2006/116631 A (INDIANA UNIVERSITY RES AND TEC [US]; HICKEY ROBERT J [US]; MALKAS LIND) 2 November 2006 (2006-11-02) sequence 1 -----	1-13
P,X	WO 2007/002574 A (INDIANA UNIVERSITY RES AND TEC [US]; HOELZ DEREK Z [US]; HICKEY ROBERT) 4 January 2007 (2007-01-04) claims 10,19-22 -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/062335

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 9 to 13 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple Inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/062335

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9635715	A	14-11-1996	AT AU AU CA DE DE EP JP US	190318 T 705096 B2 5508396 A 2218327 A1 69607034 D1 69607034 T2 0871655 A2 11504933 T 6613878 B1		15-03-2000 13-05-1999 29-11-1996 14-11-1996 13-04-2000 03-08-2000 21-10-1998 11-05-1999 02-09-2003
US 5935797	A	10-08-1999	NONE			
WO 2006116631	A	02-11-2006	NONE			
WO 2007002574	A	04-01-2007	NONE			

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/82	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
		A 6 1 P 43/00 1 2 1
		C 0 7 K 14/82

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,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,L,A,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ヒッキー, ロバート, ジェイ.
アメリカ合衆国・インディアナ州 46202・インディアナポリス・レイクランド ブールヴァード 6256

(72) 発明者 マルカス, リンダ, エイチ.
アメリカ合衆国・インディアナ州 46202・インディアナポリス・レイクランド ブールヴァード 6256

F ターム(参考) 4C076 AA19 BB13 CC27 FF31
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA19 BA01 BA08 BA17 BA23 CA59 MA66
 NA14 ZB261 ZB262 ZC751
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA15 CA41 EA28 FA10 GA21