

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6576355号
(P6576355)

(45) 発行日 令和1年9月18日(2019.9.18)

(24) 登録日 令和1年8月30日(2019.8.30)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/09	Z N A Z
C 12 P	21/02	(2006.01)	C 12 P	21/02	C
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	

請求項の数 20 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-549646 (P2016-549646)
(86) (22) 出願日	平成26年10月9日 (2014.10.9)
(65) 公表番号	特表2016-535600 (P2016-535600A)
(43) 公表日	平成28年11月17日 (2016.11.17)
(86) 國際出願番号	PCT/GB2014/053037
(87) 國際公開番号	W02015/063452
(87) 國際公開日	平成27年5月7日 (2015.5.7)
審査請求日	平成29年9月29日 (2017.9.29)
(31) 優先権主張番号	1318954.3
(32) 優先日	平成25年10月28日 (2013.10.28)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)

前置審査

(73) 特許権者	516123789 キューピッド ペプチド カンパニー リ ミテッド イギリス国, カーディフ シーエフ14 4ユージェイ, ヒース パーク, ラボ 2 7, カーディフ メディセンター
(74) 代理人	100149294 弁理士 内田 直人
(72) 発明者	ライヴズ, ウイリアム ジョナサン イギリス国, サレー ケーティー2 7ビ ーエス, キングストン, ギャルスウォーシ ー ロード 48

審査官 坂崎 恵美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞輸送

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

選択された分子又は薬剤を細胞膜を越えて輸送するための細胞浸透性ペプチド(CPP)であって、

アミノ酸配列：R R V Q I W F Q N K R A K V K R からなる、細胞浸透性ペプチド。

【請求項 2】

前記膜が天然に生じるか又は合成されている、請求項1に記載のCPP。

【請求項 3】

前記膜が生体膜である、請求項1又は2に記載のCPP。

【請求項 4】

前記CPPが、前記膜を越えて選択された分子又は薬剤を輸送することを目的として、選択された分子又は薬剤の少なくとも一つと接合ないしコンジュゲートしている、請求項1から3のいずれか一項に記載のCPP。

【請求項 5】

前記CPPが、前記分子又は薬剤と共に結合的に又は非共有結合的に接着ないし結合している、請求項4に記載のCPP。

【請求項 6】

前記選択された分子又は薬剤が、小分子、ペプチドを含むタンパク質および超分子粒子、タンパク質、プラスミドDNA、siRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む核酸配列、化学物質、治療薬、抗体、有機染料、蛍光標識、量子ドット又はナノ粒子を

10

20

含む群から選択される、請求項4又は5に記載のC P P。

【請求項 7】

前記C P Pが、インビボ又はインビトロの組換えによって前記選択された分子又は薬剤に接着している、請求項4又は5に記載のC P P。

【請求項 8】

前記C P Pが、インビトロの組換えによって前記選択された分子又は薬剤に接着している、請求項7に記載のC P P。

【請求項 9】

前記C P Pが、そのアミノ末端又はカルボキシ末端で前記選択された分子又は薬剤にコンジュゲートしている、請求項4から8のいずれか一項に記載のC P P。 10

【請求項 10】

前記C P Pが、少なくとも一つのさらなるスペーサーアミノ酸残基の存在により、前記選択された分子又は薬剤から遠位に位置する、請求項4から8のいずれか一項に記載のC P P。

【請求項 11】

前記C P Pが、前記選択された分子又は薬剤から、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20アミノ酸残基遠位に位置する、請求項10に記載のC P P。

【請求項 12】

選択された治療的薬剤に接合又はコンジュゲートした請求項1から11のいずれか一項に記載のC P Pの少なくとも一つを含んでなる、治療薬。 20

【請求項 13】

前記治療的薬剤が、小分子化学的阻害因子又は活性因子、タンパク質、ペプチドを含む超分子粒子、プラスミドDNA、siRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む核酸配列、化学物質、治療的薬剤又は抗体を含む群から選択される、請求項12に記載の治療薬。

【請求項 14】

請求項12又は13に記載の治療薬の少なくとも一つと、少なくとも一つの他の治療的薬剤とを含む、併用治療薬。

【請求項 15】

請求項12又は13に記載の治療薬又は請求項14に記載の併用治療薬を、薬学的に許容可能な担体とともに含む、薬学的組成物。 30

【請求項 16】

請求項1から11のいずれか一項に記載のC P Pをコードする核酸分子。

【請求項 17】

請求項12又は13に記載の治療薬をコードする核酸分子。

【請求項 18】

請求項16又は17に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 19】

請求項18に記載のベクターを形質移入又は形質導入した宿主細胞。 40

【請求項 20】

請求項1から11のいずれか一項に記載のC P P、又は請求項12又は13に記載の治療薬の製造方法であって、前記C P P又は前記治療薬をコードする核酸分子を形質移入した宿主細胞を、前記C P Pおよび/又は前記治療薬の転写および翻訳が起こる条件下で培養することと、それらを回収することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞膜、特に、限定するものではないが、生体膜を越えて分子を輸送するための新規のポリペプチド、前記ポリペプチドの少なくとも一つと前記ポリペプチドに接合

ないしコンジュゲートした選択された分子ないし薬剤の少なくとも一つとを含む、細胞膜を越えて前記分子ないし薬剤を輸送するためのコンジュゲート、前記ポリペプチドの少なくとも一つの使用を伴う、細胞膜を越えて少なくとも一つの選択された分子ないし薬剤を輸送する方法、前記コンジュゲートの少なくとも一つを含む治療薬、前記コンジュゲートの少なくとも一つとその他の治療薬の少なくとも一つとを含む併用治療薬、前記コンジュゲート又は前記治療薬の少なくとも一つの使用を伴う治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞膜ないしは原形質膜は生細胞の細胞質を取り囲み、特に細胞内成分を細胞外環境から分離している。細胞膜はイオンおよび有機分子を選択的に通し、細胞の内外への物質の移動を制御している。この膜は、細胞を周囲環境から分離する働きがあり、これによって化学的および物理的環境の変化から保護し、かつ細胞内外への分子の移入／移出の制御を可能としている。主に、リン脂質分子の二層（二重層）からなり、脂質二層を直接通り抜けて、膜の片側から他方側に行くことができる分子のみである。この膜には、必要な分子を細胞の内外へ輸送するためのチャネルおよびポンプとして働くさまざまなタンパク質分子が埋没している。したがって、細胞は選択的透過性があり、細胞に入り細胞から出て行くものを調節することが可能であるので、生存に必要な物質の輸送を促すといわれている。

【0003】

生物学的に生きている間、これらの膜は多くの治療薬の輸送を困難にすることがある。この治療薬の有効性はその分子が体内の水性環境をめぐりその後細胞膜の疎水性のバリアを通り抜けることができる能力に依存している。

【0004】

細胞透過ないしは細胞浸透性のペプチド（CPP）（タンパク質導入ドメイン又は膜転位配列としても知られている）は、原形質膜の不透過性を克服するために用いられている。典型的には、30アミノ酸残基以下の長さであるCPPは、細胞の膜を超えて、細胞内部へ通過することができるので、分子（一般的には「カーゴ」と称される）を内在化する生システムでは採用されている。現在のところ何百もの異なるCPP配列が明らかにされており、単独であろうとカーゴと会合していようともすべてが生物学的な膜を破り、細胞に入る共通の能力を有する。CPPの機能は典型的には細胞内へカーゴを運ぶことであり、生きている哺乳動物細胞のエンドソームを介して運ばれるカーゴのエンドサイトーシスにより共通して生じるプロセスである。よって、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸および他の薬学的に活性な化合物へのCPPのカップリングは、他の膜不透過性分子の細胞輸送にとって期待できる戦略となる。

【0005】

CPPの共通の用途には、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、DNAおよびプラスミドなどの核酸ベースの高分子の輸送が含まれる。これらすべては、遺伝子発現の調節において期待できる生物学的および薬理学的治療薬として認識されている。近年、さまざまな方法を用いて、CPPをビヒクルとして用いて生物学的に活性な全長タンパク質、例えば西洋わさびペルオキシダーゼ、RNアーゼAおよびCPP架橋結合Fab断片さえも生細胞へ輸送できることが報告された。

【0006】

大まかに言えば、CPPは一般に3つのグループに分類されるが、すべて原形質膜の位置を変え、細胞質への又は細胞小器官へのさまざまな分子カーゴの輸送を促すという能力を共通して持つ。

1. 高密度の塩基性（+）荷電のアミノ酸の短い配列、一般に一連のリジン又はアルギニン残基。例として、オクタアルギニン。

2. ウイルスペプチド、そのうち最も研究されているHIV由来のトランス作動性転写活性化因子（TAT）配列。又は、

3. アンテナペディアペプチドおよびその誘導体。1990年代に発見された、ショウジ

10

20

30

40

50

ヨウバエの発生に伴うアンテナペディアタンパク質内の重要な転写因子。

【0007】

さらに又はあるいは、CPPは、そのペプチド配列および脂質への結合性質に基づいて、一次両親媒性CPP、二次両親媒性CPPおよび非両親媒性CPPに分類されうる。

【0008】

機構的に、CPPの膜の位置を変える能力は現在研究されている。作用のメカニズムはCPPごとに異なり得、いくつかのCPPは1より多くのメカニズムを用いていると考えられている。一般に、CPPは、1)膜の直接的な浸透、2)エンドサイトーシスを介した移入、又は3)一時的な構造の形成による転座により移入すると考えられている。

【0009】

直接的な浸透は、近年、脂質二層の両側上の細胞浸透性ペプチドとリン酸塩基との間の強い相互作用、一時的な間隙の形成を核とする荷電した側鎖の挿入、その後の間隙表面上に拡散することによる細胞浸透性ペプチドの転座を伴うことが提唱されている。

【0010】

エンドサイトーシスは、原形質膜が内側に向かって折りたたまれ、細胞内に物質を運ぶことによる細胞摄取のプロセスであるが、大部分はエネルギー依存性であると考えられている。

【0011】

これとは対照的に、CPPの第三クラスは、古典的なエンドサイトーシスとは無関係のメカニズムを介して細胞によって内在化される性質を持っている。このメカニズムの物理的性質はあまり理解されていないが、他のクラスとは異なり、クラス3のペプチドは、膜を横断することができるが、生体表面の受容体や細胞由来のATPのエネルギーを必要としない。

【0012】

アンテナペディアペプチド配列(pAnt)に加え、このクラス3の例には、最も一般的に用いられているCPPの一つであり、アンテナペディアホメオプロテインのDNA結合ドメイン由来の16アミノ酸ペプチドである、合成由來のペネトラチンTMがある。

【0013】

クラス3のアンテナペディアペプチド配列(pAnt)は、生き物のゲノムの中でヒト、マウス、ハエおよび単純なミミズと同じくらい多様であることがわかっているが、真核生物のタマホコリカビ属のアメーバのゲノム内にはアンテナペディア配列はない。

【0014】

発明者らは、本明細書において、社会性アメーバであるキイロタマホコリカビ(Dictyostelium discoideum)のゲノムから、その起源に関連してCUPID-AおよびCUPID-B(Cellular Permeating peptides In Dictyostelium)と称する2つの新規なクラス3 CPPの同定を開示する。組換え法を用いて、より大きなポリペプチドまたはタンパク質配列にこれらの配列を組み込むことにより、そのポリペプチドまたはタンパク質の機能を保持しながら、細胞を透過することができる製品を提供する。有利なことに、これらのCUPIDペプチドは、一般的に用いられるペネトラチンTMなどの他の試験CPPと比較して、細胞内へのカーゴの輸送に優れていることが示された。したがって、CUPIDペプチドは他の細胞不浸透性分子の細胞内送達のための改良された輸送性能を提供する。

【発明の概要】

【0015】

本発明の第一の態様によると、

i) RRVQIWFQNKRKVKR,

ii) RSVQIWFQNRRAKAR、又は

iii) i) 又は ii) のペプチドに少なくとも75%相同的な配列

を含む群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを含む、選択された分子ないしは薬剤を細胞膜を越えて輸送するための細胞浸透性ペプチド(CPP)が提供される。

10

20

30

40

50

【0016】

本明細書において CPPへの言及は、短いペプチド、典型的には30未満のアミノ酸であり、少なくとも一つの選択された分子と結合した場合に原形質膜の位置を変え、それによって前記分子の細胞ないしは細胞小器官内への輸送を促す能力を有するペプチドを指す。

【0017】

本明細書において細胞性の膜ないしは細胞膜の言及には、生体膜又は、真核性起源又は原核性起源の生体膜（原形質膜およびすべての細胞内の膜）と同じないしは類似する性質に基づくか、その性質を有する人工ないしは合成の膜への言及が含まれる。

【0018】

本発明の好適な実施形態では、前記細胞性の膜は生体膜である。 10

【0019】

本明細書において生体膜への言及は、人工ないしは合成の膜とは対照的に、天然に生じるないしは生きている膜に関する。

【0020】

当業者には明らかであろうが、本明細書において選択された分子ないしは薬剤への言及は、細胞又は細胞小器官へ輸送することを目的として CPPに結合ないしはコンジュゲートされうる任意のカーゴを指し、例として、限定するものではないが、小分子、ペプチドを含むタンパク質および超分子粒子、タンパク質、プラスミドDNA、siRNAおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む核酸配列、化学物質、治療薬、抗体、有機染料、蛍光標識、または量子ドットやナノ粒子などの造影剤を指す。 20

【0021】

当業者には明らかであろうが、前記生体膜は細胞を囲む膜であってよい。これには、限定するものではないが、単純な原形質膜などの膜や、より特殊化した膜構造、例えば、心尖部、基底外側、シナップス前およびシナップス後の膜、鞭毛、纖毛、微纖毛、糸状仮足および葉状仮足の膜、筋肉細胞の筋細胞膜、ならびにニューロンの特化ミエリンおよび樹状突起棘の膜が含まれる。これには、細胞小器官、限定するものではないが例として、エンドソーム；滑面小胞体および粗面小胞体；筋小胞体；ゴルジ体；リソソーム；ミトコンドリア（内側と外側の膜）；核（内側と外側の膜）；ペルオキシソーム；液胞；細胞質顆粒；細胞小胞（ファゴソーム、オートファゴソーム、クラスリン被覆小胞、COPⅠ被覆小胞およびCOPⅡ被覆小胞）および分泌小胞が含まれる。 30

【0022】

さらに、前記生体膜には真核性起源又は原核性起源の任意の膜への言及が含まれる。

【0023】

本発明の CPPの相同物又は誘導体も本発明の文脈で用いられることは当業者に明らかであろう。ゆえに、例えば、一又は複数の付加、欠損、置換などを含む CPPは本発明に含まれる。さらに、一つのアミノ酸を他の類似の「タイプ」のものに置き換えることも可能である。例えば、一つの疎水性のアミノ酸を他のものに置き換えることは、アミノ酸配列を比較するための C L U S T A L プログラムなどのプログラムを用いてよい。このプログラムは、アミノ酸配列を比較し、適切に配列内にスペースを挿入することにより適切なアライメントを見つける。ある適切なアライメントについてアミノ酸の同一性又は類似性（アミノ酸型の同一性と保存）を算出することができる。BLASTxのようなプログラムは、最も長い範囲の類似配列を整列し、その一致度に値を割り当てる。ゆえに、いくつかの領域に類似が見られる場合の比較を行い、それぞれに異なるスコアを得ることができる。両方のタイプの分析が本発明で検討される。 40

【0024】

本明細書で用いられる「相同」なる用語は、RRVQIWFQNKRKVKR又はRSVQIWFQNRRRAKARのアミノ酸配列に少なくとも75%相同的ないしは同一な配列を有し、RRVQIWFQNKRKVKR又はRSVQIWFQNRRRAKARの生物学的活性又は膜輸送機能を保持するアミノ酸配列を指す。相同性は、i) 又はii) のペプチド配列に少なくとも75%相同であることが好ましく、順に、R 50

RVQIWFQNKRKVKR又はRSVQIWFQNRRAKARに少なくとも76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%相同であることが好ましい。

【0025】

本発明の第一の態様のさらに好適な実施形態では、前記CPPは、配列RRVQIWFQNKRKVKR又はRSVQIWFQNRRAKARを含むか、又はそれからなる。

【0026】

本発明の第二の態様によると、膜、典型的には限定するものではないが、生体膜を越えて選択される分子又は薬剤を輸送することを目的として、前記CPPと、前記CPPに共有結合ないしは非共有結合するか又は会合している少なくとも一つの選択された分子又は薬剤とを含むコンジュゲートが提供される。 10

【0027】

本発明の第二の態様の好適な実施形態では、前記選択された薬剤は、当業者に知られる多くの方法によって前記CPPに接着されてよく、例えば限定するものではないが、共有又は非共有の連結がある。あるいは、より好ましくは、前記カーゴはインビボ又はインビトロの組換えによって前記CPPに付加されうる。

【0028】

理想的には、前記選択された薬剤はそのアミノ末端又はカルボキシ末端で前記CPP分子にコンジュゲートされうる。 20

【0029】

本発明の第二の態様のさらに好適な実施形態では、前記選択された分子又は薬剤は、前記CPPのアミノ酸残基のすぐ隣に又は前記CPPのアミノ酸残基にコンジュゲートされる。あるいは、前記選択された分子又は薬剤は、少なくとも一つのさらなるアミノ酸残基又は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19および20のアミノ酸残基を含む群から選択される数のアミノ酸残基で好ましくは表されるスペーサーの存在により、前記CPPのアミノ酸残基から遠位に位置する。当業者には明らかであろうが、これにより選択された薬剤の透過性が改善されうるが、同様に機能しうる他のスペーサーが本発明の実施に用いられてよい。

【0030】

本発明の第三の態様では、細胞性の膜を越えて少なくとも一つの選択された分子又は薬剤を輸送する方法であって、前記膜を越えて輸送する少なくとも一つの分子又は薬剤と共に結合又は非共有結合的に結合した少なくとも一つの前記CPPの使用を含む方法が提供される。 30

【0031】

本発明のさらなる態様では、選択された分子又は薬剤と共有結合又は非共有結合的に結合した、本発明に係る少なくとも一つのCPPを含み、前記分子又は薬剤が治療薬である、治療薬が提供される。

【0032】

当業者には明らかであろうが、前記治療薬は、小分子化学的阻害因子又は活性因子、タンパク質、ペプチドを含む超分子粒子、プラスミドDNA、siRNAおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む核酸配列、化学物質、治療的薬剤又は抗体であってよい。ゆえに、これには、発現が欠損しているか又は発現が正しくない遺伝子産物の発現を達成する遺伝子治療のための、細胞質又はこの細胞小器官、例えば核内で治療的作用を発揮するために細胞内への薬剤の輸送、疾患治療のためのリソソーム内の欠損するリソソーム酵素の輸送、および癌治療のためのミトコンドリアでのアポトーシス促進性の抗癌薬の輸送が含まれる。 40

【0033】

他の態様では、治療薬に共有結合又は非共有結合的に結合した少なくとも一つのCPPと、一つのさらなる治療薬とを含む併用治療薬が提供される。ゆえに、治療ないしは予防

10

20

30

40

50

する疾患や症状に適する又は効果的と思われるような、他の活性な物質があつてもよい。例えば、併用治療は抗生物質又は抗菌薬を含んでもよい。

【0034】

理想的には、前記併用治療薬は、本発明に係る複数のCPPを含み、それぞれが治療薬と共有結合的に又は非共有結合的に結合している。理想的には、前記薬剤は、同じ症状、理想的にはその異なる態様や症状を治療するために選択されるが、場合によっては、患者が患っている異なる症状を治療するように選択されてよい。ゆえに、本発明のCPPは、治療薬の選択と組み合わせて、オーダーメイドの治療を可能としうる。

【0035】

他の態様では、本発明は、本発明に係る治療薬又は本発明に係る併用治療薬の有効量を治療する個体に投与することを含む、治療方法を提供する。 10

【0036】

本発明の他の態様では、本発明に係る治療薬又は本発明に係る併用治療薬を、薬学的に許容可能な担体とともに含む、薬学的組成物が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0037】

担体、2以上存在する場合にはそれぞれの担体は、製剤の他の成分と混合可能であり、受容者に有害でないという意味では許容されるものでなければならない。

【0038】

製剤には、経口、直腸、経鼻、気管支（吸入器）、局所（点眼剤、類および舌下を含む）、経膣または非経口投与（皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮内を含む）に適したもののが含まれ、製薬業界でよく知られる任意の方法によって調製されてよい。 20

【0039】

投与経路は治療する症状に応じるが、好ましい組成物は、静脈内、非経口、経口、経鼻、気管支または局所の投与のために製剤化される。

【0040】

組成物は、本発明の治療薬又は本発明の併用治療薬と担体とを結合させることによって調製してよい。一般に、製剤は、活性剤を、液体担体又は細かくした固形担体あるいはこの両方と均一かつ密接に関連させて、必要があれば生成物を成形することによって調製される。本発明は、本発明のペプチドを薬学的または獣医学的に許容可能な担体またはビヒクルと併せる、または関連させることを含む、薬学的組成物の調整方法に関する。 30

【0041】

本発明における経口投与用の製剤は、カプセル、小袋又は錠剤といったそれぞれが所定量の活性剤を含む個別の単位として、粉末または顆粒として、水溶液または非水溶液中の活性剤の溶液または懸濁液として、あるいは水中油型液体エマルジョンまたは油中水型液体エマルジョンとして、又はボーラス等として提示されてよい。

【0042】

経口投与用の組成物（例えば錠剤およびカプセル剤）のために、「許容可能な担体」なる用語には、一般的な賦形剤などのビヒクル、例えば結合剤、例えばシロップ、アカシア、ゼラチン、ソルビトール、トラガカント、ポリビニルピロリドン（ポビドン）、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロースおよび澱粉；充填剤および担体、例えばトウモロコシデンプン、ゼラチン、乳糖、ショ糖、微結晶性セルロース、カオリン、マンニトール、リン酸二カルシウム、塩化ナトリウムおよびアルギン酸；およびステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウムおよび他の金属ステアリン酸塩、ステアリン酸グリセロール、ステアリン酸、シリコーン油、タルクワックス、油およびコロイド状シリカなどの潤滑剤が含まれる。ペパーミント、ウィンターグリーン油、チェリーフレーバーなどの香味剤を使用することもできる。剤形を容易に識別可能にするために着色剤を添加することが望ましい場合がある。錠剤はまた、当分野でよく知られる方法によってコーティングしてよい。 40

【0043】

錠剤は、場合により1又は複数の補助成分とともに、圧縮または成型することにより製造されてよい。圧縮錠剤は、場合により結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、保存剤、界面活性剤または分散剤と混合して、粉末または顆粒のような流動形態に活性成分を好適な機械で圧縮することにより調製されてよい。成型錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末状化合物の混合物を好適な機械で成型することにより製造されてよい。これらの錠剤は場合により被覆または刻み目をつけてよく、活性成分の遅延放出性または徐放性を与えるように製剤化してもよい。

【0044】

経口投与に好適な他の製剤には、通常スクロースおよびアカシアゴムまたはトラガカントゴムなどの矯味基剤中に活性剤を含んでなるトローチ剤；ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアゴムなどの不活性基剤に活性剤を含んでなる香錠；および好適な液体担体に活性剤を含んでなる口中洗浄剤が包含される。

10

【0045】

皮膚への局所適用のための、組成物は、クリーム、軟膏、ゼリー、溶液又は懸濁液等に作製されてよい。薬剤に用いられるクリームまたは軟膏製剤は、当分野においてよく知られる従来の製剤であり、例えば、英國薬局方などの薬剤学の標準的教科書に記載されている。

【0046】

非経口製剤は通常滅菌される。

20

【0047】

本発明の他の態様によると、本発明に係るCPPをコードする核酸分子が提供される。

【0048】

本発明の他の態様によると、本発明に係るコンジュゲート又は治療薬をコードする核酸分子が提供される。

【0049】

本発明の他の態様によると、前記核酸分子を含むベクターが提供される。

【0050】

本発明の他の態様によると、前記ベクターを形質移入又は形質導入した宿主細胞が提供される。

30

【0051】

本発明の他の態様によると、前記CPP、又は前記コンジュゲート、又は前記治療薬の製造方法であって、本発明に係る前記CPP又は前記コンジュゲート又は前記治療薬をコードする核酸分子を形質移入した宿主細胞を、前記CPPおよび/又は前記コンジュゲートおよび/又は前記治療薬の転写および翻訳が起こる条件下で培養することと、それらを回収することを含む方法が提供される。

【0052】

本明細書の記載および請求項を通して、「含む」および「含有する」なる用語、ならびにこれらが変化した用語、例えば「含んでいる」および「(3人称単数が主語の)含む」は、「これらだけに限定されないが含んでいる」ことを意味し、他の部分、添加物、成分、整数値またはステップを排除するものではない。本明細書の記載および請求項を通して、文脈が別に求める場合を除いて、単数は複数を包含する。特に、不明確な物品が使用される場合、本明細書は、文脈が別に求める場合を除いて、単独と同様に複数も考慮するものとして理解されたい。

40

【0053】

あらゆる特許または特許出願を含む、本明細書において引用される全ての参考文献は、出典明記により本明細書に組み込まれる。いかなる参考文献も先行技術を構成するものと認められない。さらに、先行技術のいずれも、当該技術分野における共通の一般的知識の一部を構成するものと認められない。

【0054】

50

本発明の各態様の好ましい特徴は、他の態様のいずれかと関連して記載される場合がある。

【0055】

本発明の他の特徴は、以下の実施例から明らかになるであろう。一般的に言えば、本発明は、(添付の特許請求の範囲および図面を含む)本明細書に開示された特徴の任意の新規な1つ、または任意の新規な組合せにまで及ぶ。ゆえに、本発明の特定の態様、実施形態、または実施例に関連して記載された特徴、整数、特性、化合物または化学的部分は、本明細書に記載された任意の他の態様、実施形態、または実施例に、それらと適合しないことがない限り、適用できることは理解されているはずである。

【0056】

さらに、他の記述がない限り、本明細書で開示された任意の特徴は、同じまたは類似した目的を果たす代替の特徴に置き換えられてもよい。

【0057】

本発明を、以下の実施例および図面を参照としてのみ用いて実施例により記載する。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】培養1時間後に細胞に移入する蛍光標識したペプチド(10μM)。(A)タマホコリカビ細胞中のFITC-Cupid A。(B)タマホコリカビ細胞中のFITC-Cupid B、(C)ヒト線維芽細胞中のFITC-Cupid B、(D)ヒト腎細胞中のFITC-Cupid B。

【図2】培養したタマホコリカビ細胞内の蛍光標識したペプチド(10マイクロモルのCupid A、Cupid B又はpANT)蓄積の時間経過。

【図3】蛍光標識したCupid Bペプチド(10マイクロモル)の蓄積を培養したタマホコリカビ細胞においてモニターした。(A~C)4分後(A)、16分後(B)、32分後(C)。32分後に培養液を洗い流し、細胞蛍光をモニターした。(D~F)洗浄後4分(D)、16分(E)、32分(F)。

【図4】調製し乾燥させたペプチドのSDS-PAGEゲル。ゲルはクーマシープルータンパク質染料により染色し、Cupid-PKI(A)、Cupid B(B)および分子量の基準(C)のバンドを可視化した。

【図5】蛍光標識したCupid B-PKIペプチド、10マイクロモルを培養したタマホコリカビ細胞に添加し1時間置いた。次いで細胞を洗浄し、光学(A)および蛍光(B)顕微鏡にて分析した。

【図6】Cupidは細胞内に小分子カーゴを輸送することができる。欠乏させたタマホコリカビ細胞の培養物を、ペプチドなし(A)、Cupid Bペプチド(B)、PKIペプチド(C)およびCupid B-PKIペプチド(D)にて処理し、凝集について分析した。未処理の培養物(A)又は10マイクロモルのCupid Bペプチド(B)又はPKIペプチド(C)にて処理した培養物では、細胞が密接な塊に凝集した。対照的に、10マイクロモルのCupid-PKIペプチドにて処理した培養物(D)は凝集しなかった。

【図7】蛍光標識したCupid B-Ptenペプチド、10マイクロモルを培養したタマホコリカビ細胞に添加し、1時間置いた。次いで細胞を洗浄し、蛍光顕微鏡用に調整した。

【図8】Cupidは細胞内に大分子カーゴを輸送することができる。欠乏させたタマホコリカビ培養物を、ペトリ皿の欠乏バッファ中に置き、10時間後に可視化した。未処理の野生型(WT)培養物(A)では、細胞は凝集中心へ一體となって移動し、細胞から細胞へのシグナル伝達により運動した。Ptenヌル変異体培養物(B)、又は10マイクロモルのCupid-Ptenペプチドにて処理したWT培養物(C)では、細胞は運動や凝集を生じなかった。

【図9】欠乏させた野生型タマホコリカビ細胞における4つのイノシトール・リン脂質(P1、PIP、PIP2およびPIP3)のレベルを、細胞培養物の溶媒抽出法にて測定

10

20

30

40

50

し、薄層クロマトグラフィを用いて分析した。Cupid B - PTENペプチド処理(10マイクロモル、1時間)の影響を基準(未処理)レベルに対するパーセント変化として算出した。

【図10】欠乏させたタマホコリカビ培養物において、いくつかのタンパク質は、投与したサイクリックAMPに反応して急速なリン酸化/脱リン酸化を起こす。この反応の強さはPTEN酵素活性によって制限される。この応答は、cAMPの投与後に示される時点で抽出した培養物から調製したリンタンパク質の抗体検出を用いてSDSゲル上で可視化した。野生型(WT)培養物と比較して、10マイクロモルのCupid-PTENペプチドにて1時間前処理した培養物では、細胞が非常に大きなリン酸化反応を示し、これによりPTEN活性の減少が示唆される。

【図11】Cupidは生物活性が可能である細胞内へ大きなカーゴを輸送することができる。蛍光のない精製Cupid-GFP(表1に示される配列)を、終濃度40マイクロモルで細胞培地に添加し、1時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、Flow or save(メルク)を用いてスライド上にマウントし、顕微鏡により観察した。細胞は、位相差顕微鏡(A)および蛍光顕微鏡(B)下で観察した。GFPを観察し、Cupid-緑色蛍光タンパク質ペプチド(Cupid-GFP)が細胞に浸透し、リフォールディングし、細胞が蛍光を発するという結論を導いた。

【実施例】

【0059】

材料および方法

Cupid結合ペプチドの生成

Cupid Bベクターの作製

ベクターの基本骨格

pBR322(ニュー・イングランド・バイオラボ社)DNAベクターをEcoRIおよびClaI DNA制限酵素(ニュー・イングランド・バイオラボ社)で切断した。試料は、製造業者提供の制限酵素緩衝液中でインキュベートし、EcoRI(1μl)およびClaI(1μl)制限酵素とともに37℃でインキュベートし、直鎖状DNA分子(a)とした。この分子は、両端に「ステイッキー」EcoRIおよびClaI部位を持つという特徴を有する。試料は、氷上で保存するか又は-20℃に凍結した。

【0060】

Cupid B挿入物配列

はじめのCupid B挿入物配列である[GAATCCATGCACCATCACCATCACATAGAAGAGTTCAAA TTTGGTTCCAAAATAACGTGCTAAAGTAAAGAGAACGAT]は、2本の相補的なDNA鎖として合成した(シグマ社、英国)。これは、EcoRI制限酵素部位(GAATCC)、開始コドン(ATG)、6×ヒスチジン(CACCATCACCATCACCAT)、Cupid B配列(AGAAGAGTTCAAATTG GTTCCAAAATAACGTGCTAAAGTAAAGAGAACGAT)、およびClaI制限酵素部位(ATCGAT)に特徴を有する。

【0061】

これら相補的な鎖を、混合、加熱および冷却によりアニーリングし、EcoRIおよびClaI DNA制限酵素(ニュー・イングランド・バイオラボ社)で切断した。試料は、製造業者提供の制限酵素緩衝液中でインキュベートし、EcoRI(1μl)およびClaI(1μl)制限酵素とともに37℃でインキュベートし、EcoRIおよびClaIの「ステイッキー末端」を有する二本鎖Cupid B挿入DNA(b)とした。試料は、氷上で保存するか又は-20℃に凍結した。

【0062】

Cupid Bベクター

直鎖状のDNAベクター(a)をCupid挿入物(b)と混合し、DNAリガーゼキット(ニュー・イングランド・バイオラボ社)にて、「ステイッキー末端」を介して円形にライゲートした。このDNAを大腸菌にクローニングし、アンピシリン(100マイクログラム/mL)を補充したLBアガープレートに播いた。プラスミドDNAをアンピシ

10

20

30

40

50

リン耐性バクテリアコロニーから抽出し、プラスミド配列を決定した（ダンディーシーケンス、英国）。正しい配列を含むクローニングを増殖させ、プラスミドを抽出し（プラスミド抽出キット、キアゲン社）、完成した Cupid B プラスミドベクター（c）の供給源を得た。簡単に言うと、クローニングを、アンピシリン（100マイクログラム/mL）を補充した LB アガーブレート上で増殖させた。単一コロニーを採取し、37℃で8時間アンピシリンを含む LB 培地で増殖させた。培養物を、アンピシリンを補充した LB 中で 1 / 500 に希釈し、37℃で一晩増殖させた。製造業者の説明書に従って、培養物を遠心分離によってペレット化し、その後溶解および精製した（プラスミド抽出キット、キアゲン社）。

【0063】

10

Cupid B - カーゴDNAプラスミドの作製

カーゴDNA挿入物

カーゴDNA挿入物は、PCR増幅技術を用いてゲノムDNAから作製した。この反応のためのプライマーは、シグマ社（英国）から合成・注文した。

フォワードプライマー：[Cla I 部位] - カーゴ開始DNA

リバースプライマー：カーゴ終末DNA - 停止コドン - [Hind III 部位]

【0064】

PCR反応から増幅されたDNAは、Cla I および Hind III 制限酵素にて処理して精製し（PCR精製キット、キアゲン社）、ゲル精製（ゲル精製キット、キアゲン社）を行った。この最終的なカーゴDNA挿入物（e）分子は両端の「ステイッキー」Cla I および Hind III 部位に特徴を有する。

20

【0065】

Cupid B ベクター（c）を Cla I および Hind III DNA 制限酵素（ニュー・イングランド・バイオラボ社）で切断した。試料は、製造業者提供の制限酵素緩衝液中でインキュベートし、Hind III（1 μl）および Cla I（1 μl）制限酵素とともに 37℃でインキュベートし、直鎖状DNA分子（d）とした。この分子は、両端に「ステイッキー」Cla I および Hind III 部位を持つという特徴を有する。試料は、氷上で保存するか又は -20℃に凍結した。

【0066】

30

直鎖状の Cupid B ベクターDNA（d）をカーゴ挿入物DNA（e）と混合し、DNAリガーゼキット（ニュー・イングランド・バイオラボ社）にて、「ステイッキー末端」を介して円形にライゲートした。このDNAを大腸菌にクローニングし、アンピシリン（100マイクログラム/mL）を補充した LB アガーブレートに播いた。プラスミドDNAをアンピシリン耐性バクテリアコロニーから抽出し、プラスミド配列を決定した（ダンディーシーケンス、英国）。正しい配列を含むクローニングを増殖させ、上記のようにプラスミドを抽出し（プラスミド抽出キット、キアゲン社）、完成した Cupid B - カーゴDNAプラスミド（f）を提供した。

【0067】

40

大腸菌株 BL21 (DE3) を 10ng の適当なプラスミドにて形質転換し、アンピシリン（100μg/mL）を補充した 1L の LB 培地に移し、対数期中期（A600 = 0.5 ~ 0.6）になるまで 37℃で一晩増殖させた。ペプチドは、1mM の IPTG により 3 時間かけて誘導し、細菌を遠心分離により回収した。細菌ペレットを、4 体積の緩衝液 A (50 mM リン酸塩緩衝液、15 の pH 7.5、400 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM PMSF) 中で超音波処理により溶解した。遠心分離（16000 g で 15 分間）の後、上清を Ni-NTA His 結合樹脂に通過させた。必要があれば、従来技術を用いてポリヒスチジンアミノテールをコンストラクトに添加し、生成物が Ni-NTA His 結合樹脂に接着し、混入物質から分離するようにした。結合したペプチドは、緩衝液 A で洗浄し、イミダゾール勾配（緩衝液 A 中 0 ~ 0.5 M）を適用することにより溶出した。溶出したペプチド（培養物の 3 mg/L）を 50 mM リン酸緩衝液（pH 7.5）、150 mM NaCl により一晩透析した。長期保存のために、ペプチドを最

50

終的に乾燥させ、使用するまで - 20 °C で保存した。

【0068】

ペプチドの蛍光標識および顕微鏡

ペプチドは、指示書（ピアース社、英国）にあるように、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識キットを用いてFITCで標識した。細胞培養物に添加した場合、標識したペプチドは、488 nmのスペクトル線、アルゴンイオンレーザー（494 nmの励起波長および518 nmの発光波長）にてFITCを励起することによって蛍光顕微鏡を用いて可視化した。

【0069】

タマホコリカビの細胞培養

10

A X 2 野生型タマホコリカビ細胞は、エロバクター・エロゲネス菌（クレブシェラ・エロゲネスともいう）を食料源として播種したSMアガーブレート上で増殖させた。

【0070】

結果

Cupid A および Cupid B が CPP であることの確認

Cupid A (RSVQIWFQNRRAKAR) と Cupid B (RRVQIWFQNKRKVKR) は、化学的に合成し、アミノ末端で FITC にて標識した。ペプチドをキイロタマホコリカビアメーバの培養した真核細胞に加え、最大 2 時間の時間量を変えた。次いで、細胞を洗浄し、蛍光顕微鏡下で検査のために調製した（図 1）。浸透の時間経過はクラス 3 の CPP、アンテナペディアペプチド、化学合成で FITC 標識した pANT と比較した（図 2）。

20

【0071】

他の実験においても、発明者らは、ヒト線維芽細胞、ヒト胎児腎臓細胞（図 1）およびニワトリニューロン（図示せず）を含む、試験したすべての細胞へ広がることができる Cupid ペプチドの透過能力を見出した。

【0072】

発明者らは、20マイクロモルの FITC 標識 Cupid A および Cupid B ペプチドがいずれも可視化された細胞へ 30 分以内に急速に浸透することができたことを観察した。取り込みはいずれのペプチドに関しても 100 分以内に最大に達し、最大半量の透過にかかる時間は FITC - Cupid B では 17 分、FITC - Cupid A では 28 分であった。同じ条件下で FITC - pANT は 23 分で最大半量の透過を達成した。FITC - Cupid B の透過は可逆性であり、FITC ペプチドを含む培地をペプチドを含まない培地と交換した場合には、ペプチドは同様の期間内に細胞の外へ透過した（図 3）。

30

【0073】

(i) 様々な生きている細胞に進入する能力、(ii) 進入するだけでなく生きている細胞から出て行く機能、および(iii) アンテナペディアペプチドとのサイズおよび主構造の類似性により、Cupid A および B は、CPP の第三クラスの新規なメンバーに分類されることが証明された。

【0074】

Cupid が生きている細胞内へ生物活性ペプチドカーゴを輸送することができるることの確認

40

内在化され生物活性カーゴを輸送する Cupid B の能力を調べるために、キイロタマホコリカビモデルシステムを用いた。

【0075】

飢餓（starvation）によりタマホコリカビに発生プログラムを開始させ、自由生活性（free-living）アメーバの凝集を促した。遺伝的研究により、環状アデノシン一リン酸（cAMP）がタマホコリカビの cAMP 依存性プロテインキナーゼ（DdPKA）による初期凝集過程において細胞外化学誘引物質として統合するように機能するという重要な役割を明らかにした。DdPKA は、PKA の阻害因子由来の 20 アミノ酸ペプチド配列である PKI が PKA の触媒ユニットに直接結合することによって阻害されうる。Cupi

50

d B - P K I 融合タンパク質を作製することによって、発明者らは、飢餓タマホコリカビ細胞のインビボでの凝集が妨げられることを確認することを目的とした。

【0076】

生きている細胞に添加した Cupid B - P K I ペプチドを用いた実験

記載のように Cupid 結合ペプチドを生成し、SDS 存在下でのゲル電気泳動法により分析し、Cupid B 又は Cupid B - P K I ペプチドに相当する分子量の主バンドが存在することを確認した(図4)。

【0077】

Cupid B - P K I 融合タンパク質が生きている細胞に透過することができることを示すために、発明者らは、フルオレセインペプチド標識キット(ピアース社、英国)を用いてペプチドを蛍光標識した。10マイクロモルの FITC - Cupid B - P K I をタマホコリカビ細胞に添加し、1時間後に蛍光顕微鏡にて観察したところ、Cupid B - P K I は細胞透過性であることが示された(図5)。

【0078】

発明者らは、Cupid B - P K I が細胞への進入に有効であり、10マイクロモルの濃度ではタマホコリカビの凝集の P K A 依存性プロセスが完全に減弱されることを報告する(図6D)。同様な用量では、Cupid B ペプチドも P K I ペプチドも単独では凝集に何の影響も示さなかった。(図6B および図C)

【0079】

Cupid は大きなペプチドカーゴを細胞内へ輸送することができる

大きなペプチドカーゴを生きている細胞へ輸送するために Cupid B を用いて、カーゴが生物学的および生化学的な性質の生物活性を保持していることを示した。これを行うために、PTEN タンパク質の 167 アミノ酸領域を選択し、上記の方法を用いて Cupid B ペプチドに融合した。この長さのアミノ酸(ヒト PTEN の 186 ~ 352 番目)は C2 領域であり、PTEN 酶素活性の自己抑制に関与することが知られている。この大きな融合ペプチドが生きている細胞に透過することができることを示すために、フルオレセインペプチド標識キット(ピアース社、英国)を用いてペプチドを蛍光標識した。20マイクロモルの FITC - Cupid B - PTEN をタマホコリカビ細胞に添加し、1時間後に蛍光顕微鏡にて観察したところ、Cupid B - PTEN は細胞透過性であることが示された(図7)。

【0080】

タマホコリカビにおいて、PTEN 遺伝子を欠損している遺伝子変異体は表現型の顕著な変化を示す。例えば、低速度撮影画像解析により、飢餓条件の間の PTEN ヌル変異株は、細胞は凝集しようとするが繰り返しそれに失敗するという特徴的な凝集行動を示す(図8B)。野生型のタマホコリカビ細胞は同じ条件下で10マイクロモル用量の Cupid B - PTEN ペプチドが与えられると、PTEN ヌル細胞株と同じ特徴的な行動を示す(図8C)。

【0081】

PTEN タンパク質は、イノシトールベースの脂質からリン酸基を除去するように機能するホスホリパーゼ酵素活性を有し、それ自体、細胞表面に存在する様々な種類のイノシトールリン脂質の間のバランスを維持することに関与している。飢餓を受けた野生型細胞では、3と4のリン酸基(PIP2 および PIP3)を有するイノシトールリン脂質は、主として PTEN の作用により、低く保たれている。

【0082】

発明者らは、タマホコリカビ培養物におけるイノシトールリン脂質レベルに対する Cupid B - PTEN ペプチドの効果を決定した。Cupid B - PTEN ペプチド処理した細胞(10マイクロモル、1時間)はタマホコリカビ細胞におけるイノシトールリン脂質の基礎レベルを変化させる。PIP2 および PIP3 のレベルは、それぞれ未処理の基礎レベルの +75% および +150% に上昇し、これは PTEN のホスホリパーゼ活性の阻害と一致する(図9)。

10

20

30

40

50

【0083】

飢餓タマホコリカビ培養物では、サイクリックAMPの投与に応答していくつかのタンパク質が迅速なリン酸化／脱リン酸化事象を受けている。この最初のリン酸化反応の強さはPTEN酵素活性によって制限され、PIP2およびPIP3イノシトールリン脂質レベルの変化と関連している。10マイクロモルのCupid B-PTENペプチドで予め1時間処理した培養物中のリン酸化パターンは未処理の培養物と比較すると、サイクリックAMPに対して非常に強い初期リン酸化反応を示し、これによりPTEN活性の減少が裏付けられた（図10）。

【0084】

これらのデータをまとめると、Cupid B-PTENペプチドは、生きている細胞の培養物に添加された場合には、透過し、PTEN活性を阻害するという考え方と一致している。これは、発明者らの方法によって生成された大きなCupid B連結ペプチドの細胞透過生物活性は小さなカーゴに限定されないことを示す。

10

【0085】

Cupidペプチドは大きなカーゴを輸送することが可能であり、カーゴ機能を妨げないCupidが細胞透過ペプチド担体として働くのに有効であることを示すために、発明者らは、オワンクラゲ（Aequorea victoria、クラゲ；UniProt寄託番号P42212）由来の野生型緑色蛍光タンパク質（GFP）に連結したCupidペプチド配列を合成した。GFPは、青～紫外線領域の光に曝されると明るい緑色蛍光を示す238アミノ酸タンパク質である。

20

【0086】

表1に示すCupidペプチドにGFPを添加した。Cupid-GFPを粉末に精製し、滅菌水に溶解した場合、Cupid-GFP粉末もCupid-GFP溶液（1ミリモル）も蛍光発色しなかった。しかしながら、Cupid-GFPを細胞培養物に添加した場合（40マイクロモル、1時間）、蛍光顕微鏡下で観察するとCupid-GFPは細胞へ透過し、蛍光発色し始めることがわかった（図11）。

【0087】

GFPに連結したCPPを用いた以前の研究はTATとArg×8 CPPSによるものであった（Lundber, Wikstrom S, Johansson M. Mol Ther. 2003 Jul;8(1):143-50. PMID: 12842437）。これらGFPペプチドは既に蛍光発色していた。著者らは、CPPペプチド（および融合タンパク質）両方の主な特性は細胞表面接着を媒介することであり、これらCPPの内在化はエンドサイトーシスによって生じたと結論付けた。しかしながら、本明細書では、精製したCupid-GFPは（誤って折りたたまれていているために）蛍光発色しないので、緑色蛍光として検出されることは、Cupid-GFPが、細胞のタンパク質機構により正しく折りたたまれていている細胞に透過したことを示唆する。これにより、Cupidの真の細胞透過性ペプチドとしての役割が裏付けられ、生物活性が可能である生きている細胞内へ大きなカーゴペプチドを運ぶことが可能である。

30

【0088】

まとめ

本発明者らは、本明細書において、生物学的な膜などの細胞性の膜を横断し、それによつて細胞透過性ペプチド（CPP）として作用することができる新規のペプチド配列（一般的にCupidと称する）の同定を開示する。したがって、これら新規のCPPは、生物学的な障壁を越えて分子又は薬剤を輸送および運送するために使用することが可能であり、幅広い治療学的又は生物学的な分子の細胞内輸送への使用にも繋がる。

40

【0089】

表1：開示した分子のアミノ酸配列。

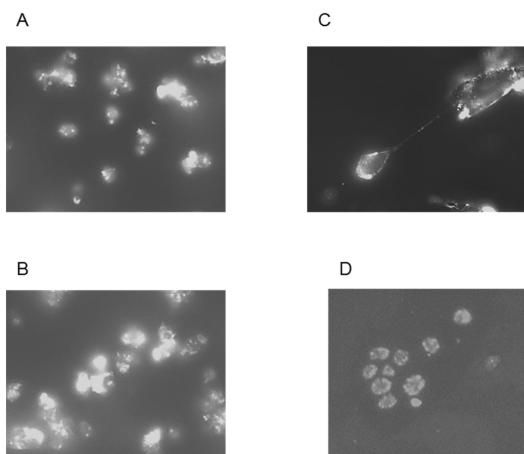
【表1】

アミノ酸	配列
Cupid A	RSVQIWFQNRRAKAR
Cupid B	RRVQIWFQNKRKAVKR
アンテナペディア	RQIKIWFQNRRMKWKK
PKI	TTYADFIASGRTGRRNAIH
PTEN	LDYRPVALLFHKMMFETIPMFSGGTCNPQFVVCQLKVKIYSSNS GPTTRREDKFMYFEFPQPLPVCGDIKVEFFHKQNKMLKKDKMFH FWVNNTFFIPGPEETSEKVENGSLCDQEIDSICSIERADNDKEYLV LTLTKNLDDKANKDKANRYFSPNFVKLYFTKTVE
Cupid B-PKI	HHHHHHRRVQIWFQNKRKAVKRIDTTYADFIASGRTGRRNAIH D
Cupid B-PTEN	HHHHHHRRVQIWFQNKRKAVKRIDLDYRPVALLFHKMMFETIP MFSGGTCNPQFVVCQLKVKIYSSNSGPTTRREDKFMYFEFPQPL PVCGDIKVEFFHKQNKMLKKDKMFHFVWNNTFFIPGPEETSEK ENGSLCDQEIDSICSIERADNDKEYLVLTLTKNLDDKANKDKAN RYFSPNFVKLYFTKTVE
Cupid-GFP	MRRVQIWFQNKRKAVKRSKGEELFTGVVPILVELGDGVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQ CFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMAD QKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH LSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYK

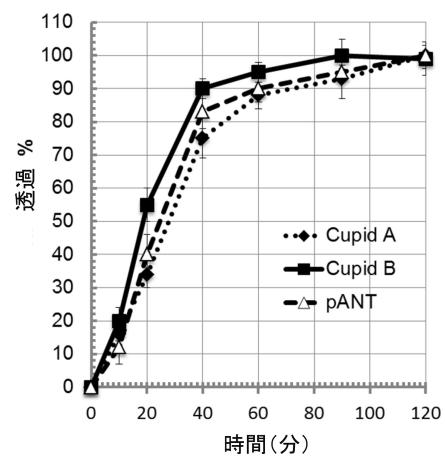
10

20

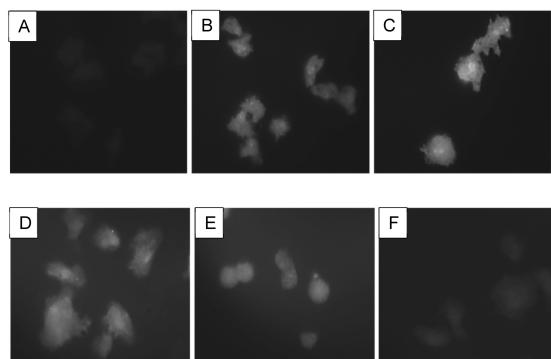
【図1】



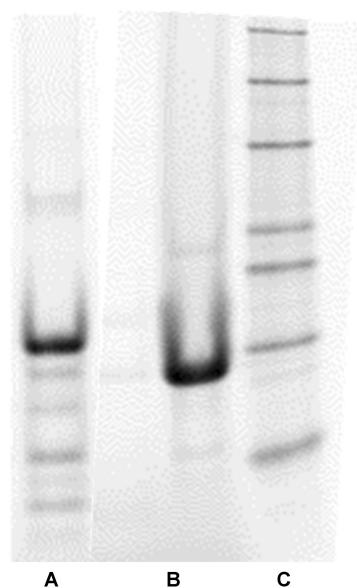
【図2】



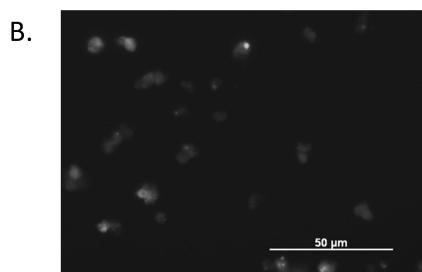
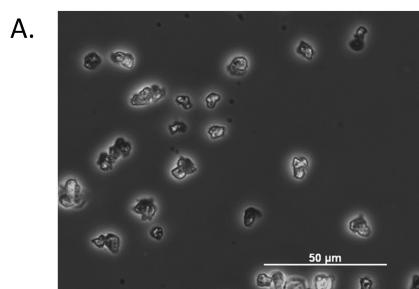
【図3】



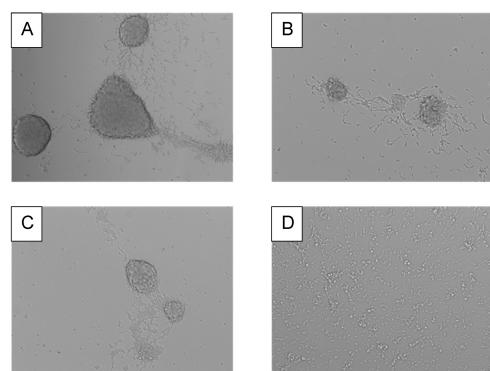
【図4】



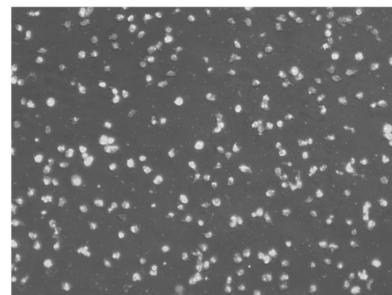
【図5】



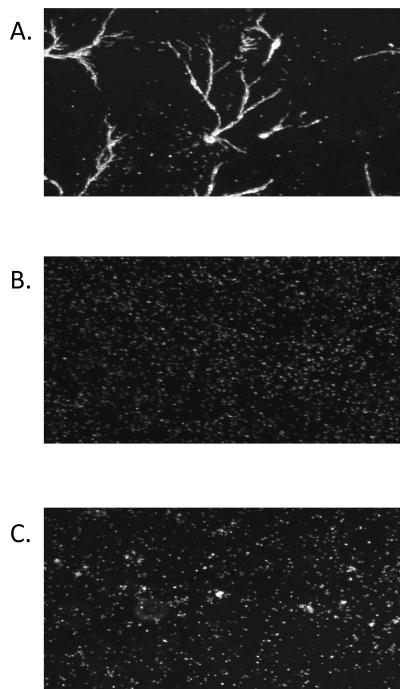
【図6】



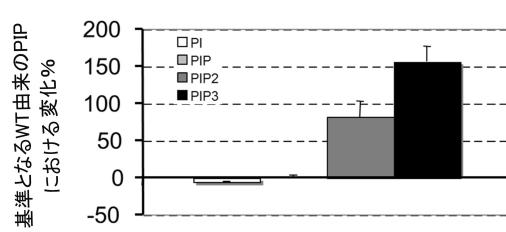
【図7】



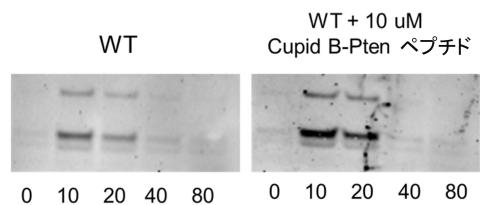
【図 8】



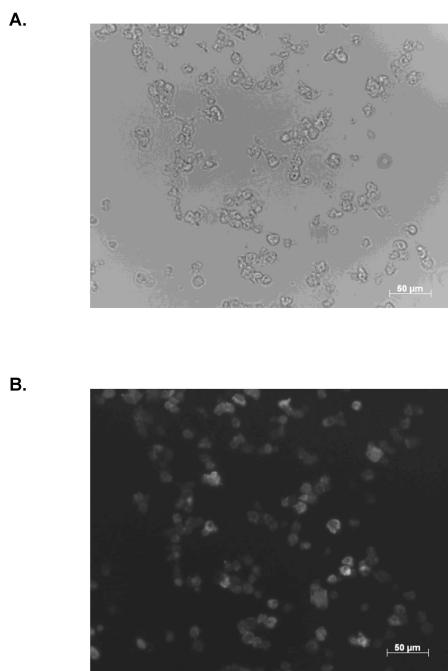
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【配列表】

0006576355000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	5/10	(2006.01) C 1 2 N 5/10
C 0 7 K	14/37	(2006.01) C 0 7 K 14/37
C 0 7 K	7/08	(2006.01) C 0 7 K 7/08
C 0 7 K	14/435	(2006.01) C 0 7 K 14/435
C 0 7 K	19/00	(2006.01) C 0 7 K 19/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K	31/7088	(2006.01) A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K	31/713	(2006.01) A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K	38/04	(2006.01) A 6 1 K 31/713
A 6 1 K	39/395	(2006.01) A 6 1 K 38/04
A 6 1 K	45/00	(2006.01) A 6 1 K 39/395 A
A 6 1 K	47/42	(2017.01) A 6 1 K 39/395 H
		A 6 1 K 45/00
		A 6 1 K 47/42

(56)参考文献 国際公開第2005/016387 (WO, A1)
 国際公開第2002/072807 (WO, A1)
 特表平10-510577 (JP, A)
 特表2006-520745 (JP, A)
 特表2002-519392 (JP, A)
 特表2009-527251 (JP, A)
Genome Biology, 2011年, Vol.12, R20
Molecular Biotechnology, 2006年, Vol.33, p.123-131
Nature, 2005年, Vol.435, p.43-57
Genome Research, 2011年, Vol.21, p.1882-1891

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 7 / 0 8
 C 0 7 K 1 4 / 4 3 5
 A 6 1 K 4 7 / 4 2
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)