

(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2005-508875

(P2005-508875A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int.Cl.⁷**C07K 14/47****A61K 38/00****A61K 39/395****A61K 48/00****A61P 9/04**

F 1

C07K 14/47

A61K 39/395

A61K 48/00

A61P 9/04

A61P 19/02

テーマコード(参考)

4B024

4B065

4C084

4C085

4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-508978 (P2003-508978)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月1日 (2002.7.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年12月26日 (2003.12.26)
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2002/003027
 (87) 國際公開番号 WO2003/002598
 (87) 國際公開日 平成15年1月9日 (2003.1.9)
 (31) 優先権主張番号 0116047.2
 (32) 優先日 平成13年6月29日 (2001.6.29)
 (33) 優先権主張國 英国(GB)

(71) 出願人 502217469
 インプリクス リミテッド
 イギリス ロンドン イーシー1エム 7
 エーディー ゴスウェル ロード 60
 デボンシャー ハウス
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100127638
 弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 転座因子として使用するためのペプチド

(57) 【要約】

本発明は、 X^1 が R または K であり、 X^2 および X^3 がいずれかのアミノ酸である、アミノ酸配列モチーフ $X^1 X^1 X^2 X^3 X^1$ を含む蛋白質が、転座し、したがって治療に用いるための組成物の製造に用いることができるを見出した。また、この蛋白質は、蛋白質または核酸を細胞内にデリバリーするための転座因子として用いることもできる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

内因性蛋白質の產生または機能の欠損、または生物化学経路の調節不全により特徴付けられる疾患の治療用の組成物の製造における、 X^1 が R または K であり、 X^2 および X^3 がいずれかのアミノ酸であるアミノ酸配列 $X^1 X^1 X^2 X^3 X^1$ を含む蛋白質またはその蛋白質の生物学的活性を保持しているそのフラグメントの使用。

【請求項 2】

X^2 が A または V である請求項 1 記載の使用。

【請求項 3】

X^3 が R または K である請求項 1 または請求項 2 記載の使用。 10

【請求項 4】

アミノ酸配列が K K A K K または K K V K K である前記請求項いずれか 1 項記載の使用。

【請求項 5】

ヒト由来の蛋白質である前記請求項いずれか 1 項記載の蛋白質。

【請求項 6】

蛋白質が表 2 に記載されているもののいずれかである請求項 1 記載の使用。

【請求項 7】

蛋白質が I R A K 1、M Y D 8 8、転写因子 E 2 A、F a n c o n i A 遺伝子産物および細胞質チロシンキナーゼから成る群から選択される請求項 1 記載の使用。 20

【請求項 8】

請求項 1 ないし 4 いずれか 1 項に記載のアミノ酸配列を含む内因性蛋白質の產生または機能の欠損により特徴付けられる疾患の治疗方法であって、機能的蛋白質またはその特定のアミノ酸配列を含む機能的フラグメントを含んでなる組成物を患者に投与することを含む方法。

【請求項 9】

請求項 1 ないし 4 いずれか 1 項記載のアミノ酸配列を含む蛋白質に対してアフィニティーを有する抗体。

【請求項 10】

蛋白質が表 2 に記載されているもののいずれかであるか、またはその変異体である請求項 9 記載の抗体。 30

【請求項 11】

蛋白質が癌遺伝子の産物である請求項 9 または請求項 10 記載の抗体。

【請求項 12】

ヒト A P C 遺伝子の蛋白質産物に対してアフィニティーを有する請求項 8 ないし 10 いずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 13】

X^1 が R または K であり、 X^2 および X^3 がいずれかのアミノ酸であるアミノ酸配列 $X^1 X^1 X^2 X^3 X^1$ を含む、細胞膜を横断する転座能を有するペプチドおよび治療剤または診断剤のコンジュゲート。 40

【請求項 14】

X^2 が A または V である請求項 13 記載のコンジュゲート。

【請求項 15】

X^3 が R または K である請求項 13 または請求項 14 記載のコンジュゲート。

【請求項 16】

ペプチドが配列 K K A K K または K K A R K を含まない請求項 13 ないし 15 いずれか 1 項記載のコンジュゲート。

【請求項 17】

ペプチドがアミノ酸配列 K K V K K を含む請求項 12 ないし 16 いずれか 1 項記載のコンジュゲート。 50

【請求項 18】

薬剤が治療用蛋白質である請求項13ないし17いずれか1項記載のコンジュゲート。

【請求項 19】

薬剤が抗体である請求項12ないし18いずれか1項記載のコンジュゲート。

【請求項 20】

抗体が請求項1ないし4いずれか1項記載の配列を含む蛋白質に対してアフィニティーを有する請求項19に記載のコンジュゲート。

【請求項 21】

薬剤が細胞内においてその活性部位を有する請求項13ないし20いずれか1項記載のコンジュゲート。10

【請求項 22】

薬剤がポリヌクレオチド分子である請求項13ないし17いずれか1項記載のコンジュゲート。

【請求項 23】

薬剤が造影剤である請求項13ないし17いずれか1項記載のコンジュゲート。

【請求項 24】

融合蛋白質である請求項13ないし20いずれか1項記載のコンジュゲート。

【請求項 25】

薬剤が化学リンカー分子を介してペプチドにコンジュゲートされる請求項13ないし23いずれか1項記載のコンジュゲート。20

【請求項 26】

ペプチドが少なくとも20個のアミノ酸を含む前記請求項いずれか1項記載のコンジュゲート。

【請求項 27】

治療または診断に用いるための前記請求項いずれか1項記載のコンジュゲート。

【請求項 28】

請求項24に記載の融合蛋白質をコードする発現ベクター。

【請求項 29】

請求項28に記載の発現ベクターを含む組換え細胞系。

【請求項 30】

細胞膜を横断してデリバリーされうる治療剤または診断剤の製造方法であって、薬剤を請求項1ないし4いずれか1項記載のアミノ酸配列を含むペプチドに共有結合させることを含む方法。30

【請求項 31】

疾患を治療するための組成物の製造における、請求項1ないし4いずれか1項記載のアミノ酸配列を含むペプチドにコンジュゲートされる、細胞内で治療効果を与える治療剤の使用。

【請求項 32】

疾患を治療または診断するための組成物の製造における、請求項1ないし4いずれか1項記載のアミノ酸配列を含む、細胞膜を横断する転座能を有するペプチドおよび治療剤または診断剤のコンジュゲートの使用。40

【請求項 33】

腫瘍の治療用の医薬の製造における、コンジュゲートの蛋白質産物に対してアフィニティーを有し、請求項1ないし4いずれか1項記載のアミノ酸配列を含む抗体の使用。

【請求項 34】

コンジュゲートが請求項13ないし26いずれか1項に記載されているものである請求項31ないし33いずれか1項記載の使用。

【請求項 35】

請求項1ないし6いずれか1項記載の蛋白質および医薬上許容される担体を含んで成る、治療的に用いるための組成物。50

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、蛋白質の転座を促進するアミノ酸モチーフの同定法、転座剤としての蛋白質および治療剤のコンジュゲートの製造に関する。

【0002】

(従来技術)

遺伝子治療は、特定の遺伝子疾患を治療する可能性を提供する。しかしながら、目的の遺伝子または蛋白質を標的部位に効果的にデリバリーすることが大きな障害である。種々のウイルスおよび非ウイルスペクターが、*e x v i v o* または *i n v i v o* の計画により遺伝子または遺伝子産物を種々の細胞、組織および器官にデリバリーするために、開発されてきた。ウイルス性ベクターの中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびヘルペスウイルスが最も広く研究されてきた。非ウイルス性ベクターの中で、リポソームおよび陽イオン脂質媒介系が、プラスミドDNAを直接動物の中に導入するために使用してきた。しかしながら、遺伝子治療の重要な課題の一つとして、効果的なデリバリー系の設計が残っている。

【0003】

ヒストンもまた、トランスフェクションを介する遺伝子デリバリーのためのビヒクルとして使用することが提案してきた。ヒストンは、真核細胞での染色体のヌクレオソーム構造の原因である蛋白質である。コアヒストンH2A、H2B、H3およびH4は、ヌクレオソームのコア構造を形成し、リンクヒストンH1はヌクレオソームコアで2周のDNAをシールする。

Zaitsevら, Gene Therapy, 1997; 4: 586-592は、トランスフェクションを介してDNAキャリアとして作用するように調製されうる、ヒストンを含むある種の核蛋白質を開示している。

【0004】

転座は、細胞膜を横切る蛋白質のデリバリーを意味し、したがって、DNAのみに関連するトランスフェクションとは異なる。

細胞膜を横切る治療用蛋白質のデリバリーする種々の方法が提案してきた。例えば、Prochiantz, Current Opinion in Neurobiology, 1996; 6: 629-634は、細胞膜を横切って蛋白質を輸送するためのアンテナペディアの使用に関する。VP22およびtatを含むその他の輸送蛋白質もまた同定してきた。

これらの系は一般に有用であるが、抗原性がより低いであろう、他の適当な輸送蛋白質、特にヒト由来であるものを同定することが望ましい。

【0005】

(発明の開示)

本発明は、特定のアミノ酸モチーフを含む蛋白質およびペプチドが、細胞膜を横切って転座可能であるという驚くべき知見に基づく。

【0006】

本発明の第1の態様により、 X^1 が R または K であり、 X^2 および X^3 がいずれかのアミノ酸であるアミノ酸配列 $X^1 X^1 X^2 X^3 X^1$ を含む蛋白質または蛋白質の生物学的活性を保持するそのフラグメントは、内因性蛋白質の產生または機能の欠損、または生物化学経路の調節不全によって特徴付けられる疾患の治療のための組成物の製造において使用される。

本発明のこの態様において、このモチーフを含む蛋白質は、治療的に、例えば、細胞内で非効率的に產生されうる患者の内因性蛋白質を置換または補足するために用いることができる。蛋白質がこのモチーフを含んでいる場合、転座により細胞内に入り、それによってその活性部位にデリバリーされることが可能となるであろう。別法として、例えばシグナル経路のような、特定の生物学的経路を制御するために蛋白質を投与する。

【0007】

10

20

30

40

50

本発明の第2の態様により、細胞内にその活性部位を有する治療剤は、疾患を治療または診断するための組成物の製造において用いられ、薬剤は上記したアミノ酸配列を含むペプチドにコンジュゲートされる。したがって、この薬剤はペプチドの転座特性を用いて細胞内に入ることが可能である。

本発明のさらなる態様により、上記したアミノ酸配列モチーフを含む、細胞膜を横切る転座可能であるペプチドおよび治療、診断または美容用の薬剤のコンジュゲートを提供する。

【0008】

意外にも、所定のアミノ酸配列を含むペプチドおよび蛋白質が、転座を介して、共有結合した治療、診断または美容用薬剤を細胞内にデリバリーするように作用しうることが見出された。
10

たとえば、VP22またはアンテナペディアなどの慣用的な転座剤とは対照的に、本発明によりヒト由来のペプチドが転座因子として使用されることが可能となり、それにより非ヒトペプチドを用いた結果生じうる有害な免疫反応の危険性が減少する。

本発明の第4の態様により、抗体は上記したアミノ酸配列を含む蛋白質に対するアフィニティーを有する。

本発明の第5の態様により、融合蛋白質の形態で本発明のコンジュゲートを発現する発現ベクターが調製される。

【0009】

(発明の詳細な記載)

本発明は、特定のアミノ酸モチーフを含むペプチドが、細胞膜を横切る転座を受けることが可能であるという驚くべき知見に基づく。重要な配列は：

$X^1 X^1 X^2 X^3 X^1$

(ここに、 X^1 はアルギニンまたはリシンであり、 X^2 および X^3 はいずれかのアミノ酸である)

である。好ましい具体例において、 X^2 はアラニンまたはバリンであり、 X^3 はアルギニンまたはリシンである。

この配列を同定することにより、多くの異なる転座ペプチドを生産することが可能となる。

本発明に関して、「転座」なる語は、薬剤、蛋白質またはコンジュゲートが細胞膜を横切る、すなわち細胞内に入る能力を意味する。
30

【0010】

本発明で用いることができる異なるモチーフ配列は、表1に示されるものを含む。

表1

KKAKK	KRARK	KRVRK	RRAKK
KKAKR	KRAKK	RKAKR	RRAKR
KKARK	KRAKR	RKARK	RRARK
KKARR	KRARR	RKARR	RRARR
KKVKK	KRVKK	RKVKK	RRVKK
KKVKR	KRVKR	RKVKR	RRVKR
KKVRK	KRVRR	RKVRR	RRVRK
KKVRR	KRVRK	RKVRK	RRVRR

【0011】

転座ペプチドは、時間の消費および高価な精製工程を経る必要が無い、容易に產生される切斷型または合成型であってもよい。切斷型はしばしば、組換え発現系、すなわち、組換え哺乳類または細菌発現系で、さらに容易に產生される。加えて、切斷型は免疫原性がより低く、したがって治療剤の投与により適しうる。

【0012】

好ましい具体例において、転座ペプチドフラグメントは、50個未満、好ましくは40個未満、最も好ましくは30個未満のアミノ酸残基を含む。所定の配列モチーフは、ペプ
50

チド内に一つ以上存在する。ペプチドは、好ましくは、哺乳類蛋白質、好ましくはヒト蛋白質に由来するか、または基づく。これにより免疫反応を促進するリスクは減少する。

本発明に従って、所定のアミノ酸モチーフを同定することにより、天然蛋白質を治療に用いることが可能になる。特定の内因性蛋白質が転座能を有することが実現すると、新規治療法が開発されることが可能となる。この態様において、產生されていない（または十分な量が產生されていない）、あるいは異常型が產生されている内因性蛋白質を置換または補足するために、天然蛋白質をいずれかの医薬上許容される形態で患者に投与することができる。蛋白質が細胞膜を横切って転座し、欠陥細胞に局限することができることを識別して、天然蛋白質を投与する。したがって、蛋白質のデリバリーを促進するために他の転座因子を必要としない。

10

【0013】

したがって、この治療は、遺伝子治療に対する実行可能な代替案である。産物をコードする遺伝子を導入しようとするのではなく、産物自体を投与することが可能であり、それは細胞膜を横切って転座するだろう。

したがって、モチーフを含む蛋白質は、内因性蛋白質の產生の欠損によって特徴付けられる疾患の治療のための組成物の製造において用いることができる。適当な蛋白質を表2ないし5に示し、表2に示される蛋白質が特に興味深い。

蛋白質はたんに置換治療として投与されるだけではなく、いずれの治療状況においても用いることができる。例えば、蛋白質は特定の調節経路に影響を与えるため、または細胞内の系魚系をアップレギュレーションもしくはダウングリュレーションするために必要とされうる。適当な治療は当業者に明らかであるだろう

20

【0014】

投与される蛋白質は、当業者に公知の技術を用いて生産することができる。例えば、組換えDNA法により、細胞培養液中の蛋白質の大規模な生産が可能となり、これは本発明に適応することができる。

また、転座ペプチド／蛋白質の機能的変異体を用いてもよい。例えば、内因性蛋白質に対して高レベルの配列類似性（70%より高く、好ましくは90%より高く、さらに好ましくは95%より高い）を有する蛋白質は、本発明の範囲内に含まれる。「類似性」なる語は当該分野で公知のものである。この語はアミノ酸配列間での類似を意味し、対応する位置のアミノ酸が同一であるだけでなく、対応する位置のアミノ酸が機能的に類似するということもその意味に含む。かくして、ポリペプチド配列間での類似性は、配列の類似性に加えて機能的類似性も示す。

30

【0015】

アミノ酸配列間での類似性のレベルは、公知の方法を用いて計算することができる。本発明に関して、一般に利用可能な類似性を測定するためのコンピューターを用いる方法は、BLASTP、BLASTNおよびFASTAプログラム（Atschulら、J. Molec. Biol., 1990; 215:403-410）、NCBIから入手できるBLASTXプログラムおよびGenetics Computer Group, Madison WIからのGapプログラムを含む。本明細書において言及される類似性のレベルは、12のGapペナルティーおよび4のGap全長ペナルティーでGapプログラムを用いて測定する。

40

【0016】

変異体は、特定部位の突然変異誘発などの標準的な組換えDNA法を用いて生成することができる。変異体はまた、例えば疎水残基から異なる疎水残基への置換のように、保存されたアミノ酸置換（しかし、重要なアミノ酸配列中ではない）を有していてもよい。これら全ては当業者に明らかであり、慣用的な蛋白質技術に基づく。変異体は、細胞膜を横切る機能的な転座能を保持していなければならない。

また、内因性蛋白質欠損を直すための置換治療として使用される場合、変異体は内因性蛋白質の生物学的活性、すなわち患者において欠損している活性を保持していなければならない。

【0017】

50

投与される蛋白質を含有する組成物は、いずれかの適当な賦形剤、希釈剤または緩衝剤を含んでいてもよい。他の転座因子は必要でない。

本発明の好ましい具体例において、投与される蛋白質は I R K 1 および / または M Y D 8 8 である。これらの蛋白質は両方、 I L - 1 および T N F の產生を抑制するシグナル経路に關係し、これらの蛋白質は細胞内に転座され、 I L - 1 の產生の減少を介して炎症性シグナル経路を抑制することができる。

【 0 0 1 8 】

さらに好ましい具体例において、治療に転写因子 E 2 A が使用される。E 2 A は幹細胞の増殖の制御に關係することで知られる分子であり、変異型が小児白血病患者において同定されている。非変異型を投与することにより患者に正常な蛋白質の供給源を与えて、症状の改善を支援する。
10

さらに好ましい具体例において、 Fanconi 貧血は Fanconi 貧血遺伝子産物の投与により治療することができる。

さらなる具体例において、 Bruton 型グロブリン血症は、この疾患において病因として関与している突然変異体である、細胞質チロシンキナーゼ (N C B I 寄託番号 Q 0 6 1 8 7) を投与することにより治療される。

【 0 0 1 9 】

また、特定の蛋白質のモチーフの同定により、適当な治療標的の同定も可能となる。例えば、特別な蛋白質が細胞膜を横切る転座能を有し、その際にある疾患が惹起または広がることを理解することにより、これを防止するように設計された適当な治療剤を製造することが可能になる。これは、蛋白質が癌遺伝子または腫瘍形成細胞の産物である場合に特に適している。蛋白質がモチーフを有し、そのため疾患が近隣細胞に拡張することに関与しうることが認識することにより、例えば、腫瘍細胞から蛋白質が放出される場合に蛋白質を標的とするように抗体を設計することが可能となり、それによって蛋白質が他の細胞に入ることを防止する。
20

【 0 0 2 0 】

この一例として、ヒト APC 遺伝子 (N C B I 寄託番号 M 7 4 0 8 8) の蛋白質産物がこのモチーフを有し、癌遺伝子型が転座により広がり、それによって疾患を広げることが見出されている。したがって、癌遺伝子産物は抗体療法を実行できる標的である。したがって、本発明は所定のアミノ酸モチーフを有する蛋白質に高アフィニティーで結合する抗体、および蛋白質により惹起されるか、または促進される疾患を治療するための療法における抗体の使用を含む。特に、本発明は表 2 または 3 に示されるいづれかの蛋白質に結合する抗体を含む。
30

【 0 0 2 1 】

また、本発明は所定のモチーフを有する癌遺伝子であるいづれかの蛋白質、特に、表 2 または 3 に示されるいづれかの癌遺伝子蛋白質の阻害も含む。

対象に投与される蛋白質はまた、美容用に使用されてもよい。例えば、UV 光の損傷効果または X 線損傷に対する保護を補助する DNA 修復蛋白質が知られている。色素性乾皮症蛋白は、転座の原因であるアミノ酸モチーフを含み、美容用に用いるための局所組成物に含まれるのに適している。このように使用すると、蛋白質は細胞膜を横切って転座し、標的細胞内でその効果を発揮するだろう。したがって、当業者には明らかであるように、蛋白質は、局所投与用、例えばクリームまたは軟膏に調製することができる。
40

【 0 0 2 2 】

また、本発明により、モチーフを含むペプチドを、別の治療剤、診断剤または美容用の薬剤が、細胞内に入るために細胞膜を横切るか、または細胞内区画を横切ってデリバリーされるように転座ビヒクルとして用いることが可能になる。

したがって、モチーフを有するペプチドは、転座領域および異種治療剤を有するコンジュゲートを調製するために用いることができる。

【 0 0 2 3 】

「コンジュゲート」なる語は、転座ペプチドおよび治療、診断または美容用の薬剤より
50

形成されるキメラ分子を意味する。

したがって、コンジュゲートは、天然型では同時に見られないハイブリッド分子である。ペプチドおよび薬剤は共有結合で結合している。共有結合は化学リンカー分子の形態であるか、または産物は融合蛋白質の形態でありうる。

【0024】

本明細書において用いられる「ペプチド」なる語は、オリゴおよびポリペプチド、および蛋白質を意味することを意図する。

転座ペプチドは、所定の配列モチーフを1つ以上含んでいてもよく、例えば2つまたは3つのモチーフが存在してもよい。

転座ペプチドはまた、高比率の、典型的には5%を超える、好ましくは10%を超える比率のLysおよびArg残基を含んでいてもよい。蛋白質/ペプチドの折りたたみおよびイオン電荷もまた転座に影響を与える因子でありえる。10

【0025】

本明細書で同定される転座ペプチドに加えて、コンジュゲートは別個の、すなわち異種の治療、診断または美容用の薬剤を含む。本発明に関して、「治療」または「治療剤」はまた、予防的治療、例えばワクチンを意味する。適当な治療および診断剤の例としては、ポリヌクレオチド、蛋白質、ペプチド、抗体、酵素、抗原、成長因子、ホルモン、非蛋白質治療剤または診断剤、酵素阻害剤、細胞障害性物質および造影剤が挙げられる。

【0026】

蛋白質治療剤は、好ましくは、大きさが少なくとも100個のアミノ酸である。本発明はより長い配列、例えば大きさが少なくとも150、200、300、400または1000個のアミノ酸に特に有用である。誤解を避けるために記載するが、「ポリペプチド」なる語は、一般的には、長さが2から100個、普通は2から60個までのアミノ酸の配列を意味するが、本明細書において用いられる「蛋白質」なる語はまた、必要とされる長さのポリペプチドを含む。20

治療剤は核酸、例えばレポーター遺伝子を含んでもいてもよい。核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態であるDNAまたはRNAであってもよい。

【0027】

核酸は治療剤、例えば酵素、毒素、免疫抗原などをコードするか、またはそれ自体が治療剤であってもよい。例えば、アンチセンスRNAまたはDNAは、遺伝子の発現を標的にし、妨害することができる。これら全ては当業者には明らかだろう。30

治療剤はまた、化合物、すなわち有機または無機分子であってもよい。適当な薬剤はいずれも本発明の範囲内に含まれる。好ましい化学分子は細胞障害性物質または成長因子を含む。

【0028】

デリバリーされる薬剤が細胞内でその活性部位を有することが好ましい。例えば、薬剤が治療蛋白質である場合、この蛋白質の天然の活性部位は細胞内にあるべきである。

どの治療剤/蛋白質が細胞内にその活性部位を有するかは、当業者には明らかだろう。薬剤は、細胞内の分子に対するリガンドであってもよく、または細胞内のリガンドの標的であってもよい。細胞外で作用する薬剤は、本発明の範囲内には含まれない。例えば、細胞外レセプターに作用する薬剤、例えばインスリンは、治療効果を発揮するために転座される必要がなく、したがってコンジュゲートの一部であることは意図されていない。40

【0029】

一の具体例において、コンジュゲートは配列KKAKKまたはKKARK以外を含有するだろう。

本発明のコンジュゲートは、当業者に公知である技術により生産することができる。ペプチドおよび薬剤は共有結合を介して結合される。一の具体例において、薬剤はペプチド(または蛋白質)であり、コンジュゲートは融合蛋白質である。融合蛋白質の生産は当業者に知られており、フレームにおけるペプチドおよび薬剤両方をコードする組換えポリヌクレオチドの生産を含む。50

【0030】

例えば、適当なコンジュゲートをコードする核酸は、さらなる操作のために適当な発現ベクターまたはプラスミドに組み込まれてもよい。本明細書で用いられる場合、ベクター（またはプラスミド）は、異種DNAをその発現または複製のために細胞内に導入するために使用される別個の要素を意味する。かかるビヒクルの選択および使用は、当業者によく知られている。多くのベクターは入手可能であり、適当なベクターの選択は、ベクター意図される使用、例えばDNA増幅またはDNA発現のいずれに使用するか、ベクターに挿入されるDNAの大きさおよびベクターで形質転換される宿主細胞に依存するだろう。各ベクターは、その機能（DNAの増幅またはDNAの発現）および適合する宿主細胞に応じて様々な成分を含有する。ベクター成分は、限定するものではないが、一般的に、一つまたはそれ以上の複製起点、一つまたはそれ以上の標識遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、転写終結配列およびシグナル配列を含む。

【0031】

コンジュゲートはまた、ペプチドおよび薬剤と反応可能な二官能性の試薬を用いることにより生産されてもよい。例えば、ペプチドおよび薬剤のコンジュゲーションは、ジスルフィド架橋を形成するN-スクシニミジル3-(2-ピリジル-ジチオ)プロピオン酸(SPD P)などの試薬により成されてもよい。代わりのコンジュゲーション試薬は、グルタルアルデヒド、シスタミンおよびEDACを含む。

【0032】

好ましくは、薬剤は開裂可能なリンカー領域によりペプチド領域に結合される。例えば小分子により開裂可能な他のリンカーを用いてもよいが、好ましくは、開裂可能なリンカーリングは、プロテアーゼにより開裂可能なリンカーである。これらは臭化シアンで開裂可能なMet-X部位、ヒドロキシリルアミンで開裂可能なAsn-Gly、弱酸で開裂可能なAsp-Pro、およびとりわけNBS-スカトールで開裂可能なTrp-Xを含む。プロテアーゼにより開裂可能な部位が、緩和な分割条件が必要であるため好ましく、例えば因子Xa、トロンビンおよびコラゲナーゼにより標的とされる。これらのいずれも使用することができる。当該分野において正確な配列は入手可能であり、当業者は適当な開裂部位を選択するのに困難を要さないだろう。一例として、因子Xaにより標的とされるプロテアーゼ開裂可能領域はIEGRである。エンテロキナーゼにより標的とされるプロテアーゼ開裂可能領域はDDDKである。トロンビンにより標的とされるプロテアーゼ開裂可能領域はLVPRGである。好ましくは、開裂可能リンカーリングは細胞外プロテアーゼにより標的とされるものである。

【0033】

付加的な細胞輸送シグナルが存在してもよい。例えば、核局在化シグナルが構成の付加的な成分であってもよい。これにより、治療成分の正確な細胞内部位への輸送が補助されるだろう。適当なシグナルは先行技術において知られており、同定されている。

【0034】

置換治療として投与するか、または転座ペプチドとして用いられかを問わず、蛋白質はまた、特定の細胞に蛋白質/ペプチドを標的とすることを補助する付加的な置換を含むように修飾を受けてもよい。例えば、蛋白質はグリコシリ化されてもよい。別法として、公知のターゲッティング法、例えば蛋白質/コンジュゲートを運搬するためにリポソームを使用する抗体ターゲッティングに基づく方法によって蛋白質/コンジュゲートは特定の標的組織/器官にデリバリーされてもよい。

診断での使用についても想定されているが、本発明の組成物および構成が治療的使用を意図しているのは明らかである。治療という場面においては、獣医学的使用も含まれることは明らかだろう。

【0035】

本発明のコンジュゲートの適用は以下のものを含む：

1. 抗原デリバリー系

抗原は、免疫応答性動物に導入された場合、抗原に結合することができる抗体（複数で

10

20

30

40

50

も可)の産生を刺激するいずれの薬剤である。しかしながら、抗原は抗体と結合する必要性があり得、抗体の生産または特定のT細胞(ヘルパーT細胞または細胞障害性T細胞)を刺激することができる。本発明において、このことは、抗原を細胞膜の一方の側から他方の側に輸送し、そうして抗体生産を刺激することができる抗体として有用でありうる。一例として、細胞質中のコンジュゲートにより転座される細菌性およびウイルス性抗原を処理し、MHCクラス1分子と結合させることができる。この抗原処理および提示経路は特定のCD8細胞障害性リンパ球を活性化することが知られている。

【0036】

2. 遺伝子治療

遺伝子治療は、例えば1つまたはそれ以上の、標的細胞のような標的部位の、1つまたはそれ以上のヌクレオチド配列の、挿入、置換、欠失、補足、操作などのいずれか一つまたはそれ以上を含んでいてもよい。標的部位が標的細胞である場合、細胞は組織または器官の一部であってもよい。遺伝子治療の一般的な方法は、Molecular Biology, Ed Robert Meyers, Pub VCHの556-558ページで見ることができる。

【0037】

さらなる例として、遺伝子治療はまた、いずれか一つまたはそれ以上の、ヌクレオチド配列、例えば遺伝子を、欠損遺伝子を置換するか、または補足するために適用する方法; 病原性ヌクレオチド配列、例えば遺伝子またはその発現産物を除去する方法; ヌクレオチド配列、例えば遺伝子またはその発現産物を、例えばより有利な表現型を得るために付加するか、または導入する方法; ヌクレオチド配列、例えば遺伝子またはその発現産物を、例えば選択目的(すなわち、非形質転換細胞に優先して形質転換細胞等を選択するため)のために付加するか、または導入する方法; 癌などの病状(Schmidt-Wolf and Schmidt-Wolf, 1994, Annals of Hematology 69; 273-279)または免疫性、心血管性、神経性、炎症性または感染性疾患などの他の病状などを治療、治癒または防止するために分子レベルで細胞を操作する方法; 遺伝子ワクチンのような免疫反応を誘発するために抗原を操作およびまたは導入する方法を提供する。特に好ましい具体例において、組成物は、遺伝的欠損細胞型の細胞質に機能的な蛋白質を導入するために用いることができる。

【0038】

3. 癌治療

コンジュゲートは、転写因子であり、細胞周期調節を修復するか、または分化を誘発することができる分子を癌細胞内に輸送するために用いることができる。例えば、機能的p-53分子がその細胞質内に導入されている場合、多くの癌細胞がアポトーシスを起こすだろうことは理解されている。本発明はかかる遺伝子産物をデリバリーするために用いることができる。さらに、細胞障害性物質を、細胞を破壊するために癌細胞にデリバリーすることができる。

【0039】

4. 抗菌および抗ウイルス治療

例えば、組成物は、感染細胞の細胞質において、細菌またはウイルスの複製の重要な段階を妨害する組換え抗体または付加的なDNA結合分子を輸送するために用いることができる。

【0040】

5. 蛋白質産生のための発現系における使用

例えば、培養質中の真核細胞の内因性蛋白質を、それが正確に処理されるように発現することができる。しかしながら、多くの外因性蛋白質は真核細胞に対して有毒である。したがって、外因性蛋白質の製造において、外因性蛋白質の時間的発現を行なうことが望ましい。したがって、系はこれの誘導プロモーターまたはかかる系に関連するいずれかの他の適用と共に用いることができる。

【0041】

6. 造影

適当な造影剤は、造影を行うことが可能なコンジュゲートの一部であってもよい。

10

20

30

40

50

【0042】

7. 美容的方法

コンジュゲートはまた、美容剤を細胞内で投与するために用いることができる。例えば、美容剤はU.V損傷効果に対する保護を補助する蛋白質（または蛋白質をコードする核酸）であってもよい。

【0043】

本発明の組成物は、所望により、医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤またはアジュバントを含んでいてもよい。医薬担体、賦形剤または希釈剤は、対象とする投与経路および標準的な薬物関して選択することができる。医薬組成物は、さらに、いずれの適当な結合剤（複数でも可）、滑沢剤（複数でも可）、懸濁化剤（複数でも可）、コーティング剤（複数でも可）、可溶化剤（複数でも可）および標的部位への侵入を補助するか、または增加させることのできる他の担体を含んでいてもよい。

組成物は、筋肉内、静脈内、局所、皮内または皮下を含むいずれの投与経路に用いることができる。

【0044】

本発明による1つまたはそれ以上の治療遺伝子または蛋白質のデリバリーは、単独で、または他の治療剤または治療剤の成分と組み合わせて行うことができる。治療されうる疾患は、限定するものではないが、癌、細胞内に薬剤を必要とする神経疾患、遺伝性疾患、心疾患、発作、関節炎、ウイルス感染症および免疫系の疾患を含む。適当な治療遺伝子は、腫瘍サプレッサ蛋白質、酵素、酵素を活性化するプロドラッグ、免疫調整分子、抗体、人口免疫グロブリン様分子、コンジュゲート、ホルモン、膜蛋白質、血管作用性蛋白質またはペプチド、サイトカイン、ケモカイン、抗ウイルス蛋白質、アンチセンスRNAまたはDNAおよびリボザイムをコードするものを含む。

【0045】

患者に投与される量は一般因子：患者の年齢、体重、症状の重症度、投与経路、治療的活性などに依存するだろう。これら全ては当業者に公知の慣用的な方法により決定される。

モチーフを含む蛋白質は以下のものを含む：

- 1) 転写因子；
- 2) DNA修復酵素；
- 3) 組織および骨の成長および形成に関係する蛋白質；
- 4) 肺腫瘍および大腸癌の発生に関係する癌遺伝子；および
- 5) 多くの遺伝性疾患において変異した遺伝子を有する一連の蛋白質。

表2は、モチーフを含み、したがって、転座能を有する蛋白質（または蛋白質の遺伝子）を示す。したがって、蛋白質は、例えば抗体治療、置換治療での標的として、または細胞膜を横切ってデリバリーするための治療剤として、本発明の様々な態様において有用でありうる。

【0046】

10

20

30

【表1】

<u>表2</u>	
蛋白質／遺伝子	N C B I 寄託番号
ウイルス感染性因子 v i f	S 4 3 0 0 1
色素性乾皮症群 c	A A A 8 2 7 2 0
メラスタチン 1	N P 0 0 2 4 1 1
ヒストンデアセチラーゼ 1	N P 0 0 4 9 5 5
S p i - 1 癌原遺伝子	X 5 2 0 5 6
ヒト A P C 遺伝子	M 7 4 0 8 8
ホモサピエンスコイリン (coilin) (P 8 0)	N M 0 0 4 6 4 5
骨形態形成蛋白質-4	P 1 2 6 4 4
甲状腺刺激胚性因子	H S U 0 6 9 3 5
骨形態形成蛋白質-3	M 2 2 4 9 1
d e k 遺伝子	X 6 4 2 2 9
インターロイキン-1 レセプター関連キナーゼ (I R A K 1)	P 5 1 6 1 7
M Y D - 8 8	A A B 4 9 9 6 7 . 1
F a n c o n i 貧血遺伝子産物	0 1 5 3 6 0
転写因子 E 2 A	A A H 0 1 7 2 8 . 1

10

20

30

40

【0047】

さらに適当な蛋白質を、確認した N C B I 寄託番号を付して表3ないし5に示す。

表3

X がいずれかのアミノ酸である、モチーフ [R / K] - [R / K] - x - [R / K] - [R / K] で、E x P A S y ソフトウェアを用いて調査を行った。

1. 神経内分泌蛋白質 7 B 2 前駆体 (分泌顆粒内分泌蛋白質 I ; セクレトグラニン (Secretogranin) V) 寄託番号 P 0 5 4 0 8

2. アルツハイマー病アミロイド A 4 蛋白質前駆体 (プロテアーゼネキシン - I I) (P N - I I) 寄託番号 P 0 5 0 6 7

3. A T P 結合力セット、サブファミリー A 、メンバー 1 (A T P 結合力セットトランスポーター 1) (A T P 結合力セット 1) (コレステロール流出調節蛋白質) 寄託番号 O 9 5 4 7 7

4. 癌原遺伝子チロシン蛋白質キナーゼ A B L 1 (p 1 5 0) (c - A B L) 寄託番号 P 0 0 5 1 9

5. A F - 6 蛋白質。寄託番号 P 5 5 1 9 6

6. 自己免疫レギュレーター (A P E C E D 蛋白質) 寄託番号 O 4 3 9 1 8

7. アンフィレグリン (Amphiregulin) 前駆体 (結腸直腸 (Colorectum) 細胞由来成長因子) (C R D G F) 寄託番号 P 1 5 5 1 4

【0048】

8. アポトーシスプロテアーゼ活性化因子 1 (A p a f - 1) 寄託番号 O 1 4 7 2 7

9. 大腸腺腫様ポリポーシス蛋白質 (A P C 蛋白質) 寄託番号 P 2 5 0 5 4

10. セリン蛋白質キナーゼ A T M (毛細血管拡張性運動失調変異) (A - T 、変異) 寄託番号 Q 1 3 3 1 5

11. A D A M - T S 9 前駆体 (トロンボスpondin) モチーフ 9 を有するディスインテグリン (disintegrin) および金属プロテアーゼ (A D A M T S - 9) (A D A M - T S 9) 寄託番号 Q 9 P 2 N 4

12. 脳特異的血管新生阻害因子 2 前駆体 (アイソフォーム) 寄託番号 O 6 0 2 4 1

50

13. Myc ボックス依存性相互作用蛋白質 1 (架橋インテグレータ 1) (アンフィフィジン (Amphiphysin) 様蛋白質) (アンフィフィジン II) (ボックス依存性 myc 相互作用蛋白質 1) 寄託番号 O 0 0 4 9 9

14. バキュロウイルス IAP 繰り返し含有蛋白質 5 (アポトーシス阻害因子サービビン (survivin)) (アポトーシス阻害因子 4) 寄託番号 O 1 5 3 9 2

15. ブルーム症候群蛋白質。寄託番号 P 5 4 1 3 2

16. 骨形態形成蛋白質 3 b 前駆体 (成長 / 分化因子 10) (GDF - 10) (骨誘導蛋白質) 寄託番号 P 5 5 1 0 7

【0049】

17. 骨形態形成蛋白質 2 前駆体。寄託番号 P 1 2 6 4 3

18. 骨形態形成蛋白質 3 前駆体 (オステオジェニン (Osteogenin)) 寄託番号 P 1 2 6 4 5

19. 骨形態形成蛋白質 4 前駆体。寄託番号 P 1 2 6 4 4

20. BN51 蛋白質。寄託番号 P 0 5 4 2 3

21. 乳癌 1 型感受性蛋白質。寄託番号 P 3 8 3 9 8

22. チロシン蛋白質キナーゼ BTK (ブルトン (Bruton) チロシンキナーゼ) (無ガソマグロブリン血症チロシンキナーゼ) (B 細胞前駆キナーゼ) 寄託番号 Q 0 6 1 8 7

23. 脳カドヘリン (cadherin) 前駆体 (BR - カドヘリン) (カドヘリン - 12) (N - カドヘリン 2) (カドヘリン、天然型、2) 寄託番号 P 5 5 2 8 9

24. カドヘリン - 18 前駆体 (カドヘリン - 14) 寄託番号 Q 1 3 6 3 4

25. カテプシン L 前駆体 (大規模排出蛋白質) 寄託番号 P 0 7 7 1 1

26. プロトカドヘリン (protocadherin) アルファ 3 前駆体 (PCDH - アルファ 3) 寄託番号 Q 9 Y 5 H 8

27. 細胞分裂周期 7 - 関連蛋白質キナーゼ (CDC7 - 関連キナーゼ) 寄託番号 O 0 0 3 1 1

【0050】

28. 蛋白質キナーゼ CLK2。寄託番号 P 4 9 7 6 0

29. 結腸直腸変異癌蛋白質 (MCC 蛋白質) 寄託番号 P 2 3 5 0 8

30. 結合組織成長因子前駆体 (肥厚性軟骨細胞特異的蛋白質 24) 寄託番号 P 2 9 2 7 9

31. シリシン (Cylicin) I (多重帯ポリペプチド I) 寄託番号 P 3 5 6 6 3

32. シリシン II (多重帯ポリペプチド II) 寄託番号 Q 1 4 0 9 3

33. ジストログリカン前駆体 (ジストロフィン結合糖蛋白質 1) [含有物 : アルファ - ジストログリカン ; ベータ - ジストログリカン] 寄託番号 Q 1 4 1 1 8

34. セリン / スレオニン蛋白質キナーゼ DCAMKL1 (二重コルチチン様および CAM キナーゼ様 1) 寄託番号 O 1 5 0 7 5

35. 二重コルチチン (リッセンセファリン (Lissencephalin) - X) (ダブリン (Doublin)) 寄託番号 O 4 3 6 0 2

36. DEK 蛋白質。寄託番号 P 3 5 6 5 9

37. ジスケリン (Dyskerin) (核小体たんぱく質 NAP57) (CBF5 ホモログ) 寄託番号 O 6 0 8 3 2

38. ジストロフィン。寄託番号 P 1 1 5 3 2

39. エクトジスプラジン (Ectodysplasin) A (外胚葉形成異常蛋白質) (EDA 蛋白質) 寄託番号 Q 9 2 8 3 8

40. ステロイドホルモンレセプター ERR1 (エストロゲン関連レセプター、アルファ) (ERR - アルファ) (エストロゲンレセプター様 1) 寄託番号 P 1 1 4 7 4

【0051】

41. ステロイドホルモンレセプター ERR2 (エストロゲン関連レセプター、ベータ) (ERR - ベータ) (エストロゲンレセプター様 2) (ERR ベータ - 2) 寄託番号 O 9 5 7 1 8

10

20

30

40

50

- 4 2 . エストロゲン関連レセプターガンマ (E R R ガンマ - 2) 寄託番号 O 7 5 4 5 4
 4 3 . エストロゲンレセプター (エストラジオールレセプター) (E R - アルファ) 寄
 託番号 P 0 3 3 7 2
 4 4 . エンドセリン 1 前駆体。寄託番号 P 0 5 3 0 5
 4 5 . エンドセリン 2 前駆体。寄託番号 P 2 0 8 0 0
 4 6 . エリス ファン・クレフェルト症候群蛋白質 (D W F - 1) 寄託番号 P 5 7 6 7
 9
 4 7 . 5 1 k D a F K 5 0 6 結合蛋白質 (F K B P 5 1) (ペプチジル - プロリルシ
 ス - トランスイソメラーゼ) (PPiase) (ロタマーゼ (Rotamase)) (5 4 k D a プロゲ
 ステロンレセプター連結イムノフィリン (immunophilin)) (F K B P 5 4) (P 5 4) 10
 (F F 1 抗原) (H S P 9 0 結合イムノフィリン) 寄託番号 Q 1 3 4 5 1
 4 8 . F O S B 蛋白質 (G 0 / G 1 スイッチ調節蛋白質 3) 寄託番号 P 5 3 5 3 9
 4 9 . P 5 5 - C - F O S 癌原遺伝子蛋白質 (細胞癌遺伝子 C - F O S) (G 0 S 7 蛋
 白質) 寄託番号 P 0 1 1 0 0
 5 0 . F O S 関連抗原 1 。寄託番号 P 1 5 4 0 7
 【 0 0 5 2 】
 5 1 . F O S 関連抗原 2 。寄託番号 P 1 5 4 0 8
 5 2 . 脆弱 X 精神遅延症候群関連蛋白質 2 。寄託番号 P 5 1 1 1 6
 5 3 . 成長阻害特異蛋白質 7 。寄託番号 O 6 0 8 6 1
 5 4 . 糖質コルチコイドレセプター。寄託番号 P 0 4 1 5 0 20
 5 5 . 成長 / 分化因子 5 前駆体 (軟骨由来形態発生蛋白質 1) 寄託番号 P 4 3 0 2 6
 5 6 . 成長 / 分化因子 8 前駆体 (ミオスタチン) 寄託番号 O 1 4 7 9 3
 5 7 . 運動ニューロン生存蛋白質相互作用蛋白質 1 (S M N 相互作用蛋白質 1) (G e
 m i n 2) 寄託番号 O 1 4 8 9 3
 5 8 . グランザイム B 前駆体 (T 細胞セリンプロテアーゼ 1 - 3 E) (細胞障害性 T リ
 ンパ球プロテアーゼ 2) (リンパ球プロテアーゼ) (S E C T) (グランザイム 2) (カ
 テブシン G 様 1) (フラグメンティン (Fragmentin) 2) (ヒトリンパ球蛋白質) (H L
 P) (C 1 1) 寄託番号 P 1 0 1 4 4
 5 9 . ヒストン H 1 ' (H 1 . 0) (H 1 (0)) 寄託番号 P 0 7 3 0 5
 6 0 . ヒストン H 1 A (H 1 . 1) 寄託番号 P 1 6 4 0 1 30
 6 1 . ヒストン H 1 B (H 1 . 4) 寄託番号 P 1 0 4 1 2
 【 0 0 5 3 】
 6 2 . ヒストン H 1 C (H 1 . 3) 寄託番号 P 1 6 4 0 2
 6 3 . ヒストン H 1 D (H 1 . 2) 寄託番号 P 1 6 4 0 3
 6 4 . ヒストン H 1 T 。寄託番号 P 2 2 4 9 2
 6 5 . ヒストン H 1 X 。寄託番号 Q 9 2 5 2 2
 6 6 . 仮定 1 2 . 7 k D a のヒストン H 2 A 関連蛋白質。寄託番号 P 9 8 1 7 6
 6 7 . コアヒストンマクロ H 2 A . 2 (ヒストンマクロ H 2 A 2) (m H 2 A 2) 。寄
 託番号 Q 9 P 0 M 6
 6 8 . コアヒストンマクロ H 2 A . 1 (ヒストンマクロ H 2 A 1) (m H 2 A 1) (H
 2 A . y) (H 2 A / y) 寄託番号 O 7 5 3 6 7 40
 6 9 . ヒストン H 2 B . a / g / k (H 2 B . 1 A) (H 2 B / a) (H 2 B / g) (H
 2 B / k) 寄託番号 P 0 2 2 7 8
 7 0 . ヒストン H 2 B . c (H 2 B / c) 寄託番号 Q 9 9 8 8 0
 7 1 . ヒストン H 2 B . d (H 2 B / d) 寄託番号 Q 9 9 8 7 7
 7 2 . ヒストン H 2 B . e (H 2 B / e) 寄託番号 Q 9 9 8 7 9
 7 3 . ヒストン H 2 B . f (H 2 B / f) (H 2 B . 1) 寄託番号 P 3 3 7 7 8
 7 4 . ヒストン H 2 B . h (H 2 B / h) 寄託番号 Q 9 3 0 7 8
 【 0 0 5 4 】
 7 5 . ヒストン H 2 B . j (H 2 B / j) 寄託番号 Q 9 3 0 7 9 50

- 7 6 . ヒストンH 2 B . 1 (H 2 B / 1) 寄託番号 Q 9 3 0 8 0
 7 7 . ヒストンH 2 B . n (H 2 B / n) (H 2 B . 2) 寄託番号 P 2 3 5 2 7
 7 8 . ヒストンH 2 B . q (H 2 B / q) (H 2 B - G L 1 0 5) 寄託番号 Q 1 6 7 7
 8 7 9 . ヒストンH 2 B . r (H 2 B / r) (H 2 B . 1) 寄託番号 P 0 6 8 9 9
 8 0 . ヒストンH 2 B . s (H 2 B / s) 寄託番号 P 5 7 0 5 3
 8 1 . ヒストンH 4。寄託番号 P 0 2 3 0 4
 8 2 . 心臓および神経堤誘導体発現蛋白質1(胚外組織、心臓、自律神経系および神経堤誘導体発現蛋白質1)寄託番号 O 9 6 0 0 4
 8 3 . 心臓および神経堤誘導体発現蛋白質2。寄託番号 O 9 5 3 0 0
 8 4 . ヒストンデアセチラーゼ1。寄託番号 Q 1 3 5 4 7 10
 8 5 . 抗菌ペプチドヘプシディン(hepcidin)前駆体(肝臓発現抗菌ペプチド)(L E A P - 1)[含有物:ヒプシディン25;ヘプシディン20]寄託番号 P 8 1 1 7 2
 8 6 . 肝細胞癌蛋白質H H C M。寄託番号 Q 0 5 8 7 7
 8 7 . 肝性白血病因子。寄託番号 Q 1 6 5 3 4
 8 8 . 熱ショック関連70kDa蛋白質2。寄託番号 P 5 4 6 5 2
 【0 0 5 5】
 8 9 . 热ショック同系71kDa蛋白質。寄託番号 P 1 1 1 4 2
 9 0 . 热ショック70kDa蛋白質1-HOM。寄託番号 P 3 4 9 3 1
 9 1 . ヒトT細胞白血病ウイルスエンハンサー因子。寄託番号 P 3 2 3 1 4
 9 2 . カルパイン阻害因子(カルパスタチン)(静止B S - 1 7成分)寄託番号 P 2 0 20
 8 1 0
 9 3 . カスパー(Caspase) - 1 阻害因子アイスバーグ(Iceberg)寄託番号 P 5 7 7
 3 0
 9 4 . インポーティン(Importin)アルファ - 1 サブユニット(カリオフェリン(Karyopherin)アルファ - 1 サブユニット)(S R P 1 - ベータ)(R A Gコホート蛋白質2)(核蛋白質相互作用因子1)(N P I - 1)寄託番号 P 5 2 2 9 4
 9 5 . インターロイキン1レセプター連結キナーゼ1(I R A K - 1)寄託番号 P 5 1
 6 1 7
 9 6 . インターフェロン調節因子2(I R F - 2)寄託番号 P 1 4 3 1 6
 9 7 . カルマン症候群蛋白質前駆体(接着分子様X結合)寄託番号 P 2 3 3 5 2 30
 9 8 . 核因子N F - カッパ - B p 1 0 0 サブユニット(H 2 T F 1)(癌遺伝子L Y T - 1 0)(L Y T 1 0)寄託番号 Q 0 0 6 5 3
 9 9 . 核因子N F - カッパ - B p 4 9 サブユニット。寄託番号 Q 0 4 8 6 0
 【0 0 5 6】
 1 0 0 . セリン/スレオニン蛋白質キナーゼP C T A I R E - 2。寄託番号 Q 0 0 5 3
 7
 1 0 1 . 白血病関連蛋白質2。寄託番号 O 4 3 2 6 2
 1 0 2 . リソソーム関係調節因子(ベイグ(Beige)ホモログ)寄託番号 Q 9 9 6 9 8
 1 0 3 . マイトジエン活性化蛋白質キナーゼキナーゼキナーゼ14(N F - カッパベータ誘導キナーゼ)(セリン/スレオニン蛋白質キナーゼN I K)寄託番号 Q 9 9 5 5 8 40
 1 0 4 . メチル-C p G - 結合蛋白質2(M e C P - 2蛋白質)寄託番号 P 5 1 6 0 8
 1 0 5 . ティメット(Thimet)オリゴペプチダーゼ(エンドペプチダーゼ24.15)寄託番号 P 5 2 8 8 8
 1 0 6 . メラノーマ関連抗原D 1 (M A G E - D 1 抗原)寄託番号 Q 9 Y 5 V 3
 1 0 7 . メラノーマ関連抗原H 1 (M A G E - H 1 抗原)寄託番号 Q 9 H 2 1 3
 1 0 8 . マトリックス金属プロテアーゼ15前駆体(M M P - 1 5)(膜型マトリックス金属プロテアーゼ2)(M T - M M P 2)(M T M M P 2)(膜型2型マトリックス金属プロテアーゼ)(M T 2 - M M P)(M T 2 M M P)(S M C P - 2)寄託番号 P 5 1
 5 1 1
 1 0 9 . 单球白血病シンクフィンガー蛋白質(ジンクフィンガー蛋白質220)寄託番 50

号 Q 9 2 7 9 4

1 1 0 . 転移関連蛋白質 M T A 1。寄託番号 Q 1 3 3 3 0

1 1 1 . M Y B 関連蛋白質 A (A - M Y B) 寄託番号 P 1 0 2 4 3

1 1 2 . M y b 関連蛋白質 B (B - M y b) 寄託番号 P 1 0 2 4 4

【 0 0 5 7 】

1 1 3 . 筋原性因子 M Y F - 5。寄託番号 P 1 3 3 4 9

1 1 4 . 筋原性因子 M Y F - 6。寄託番号 P 2 3 4 0 9

1 1 5 . ミオジエニン (Myogenin) (筋原性因子 M Y F - 4) 寄託番号 P 1 5 1 7 3

1 1 6 . B C L 2 / アデノウイルス E 1 B 1 9 - k D a 蛋白質相互作用蛋白質 2。寄託番号 Q 1 2 9 8 2

10

1 1 7 . N K - 腫瘍認識蛋白質 (ナチュラルキラー細胞サイクロフィリン (cyclophilin) 関連蛋白質) (N K - T R 蛋白質) 寄託番号 P 3 0 4 1 4

1 1 8 . 腫瘍抑制 P 5 3 結合蛋白質 1 (P 5 3 結合蛋白質 1) 寄託番号 Q 1 2 8 8 8

1 1 9 . プロ蛋白質コンバターゼサブチリシン / ケキシン 7 型前駆体 (E C 3 . 4 . 2 1 . -) (プロ蛋白質コンバターゼ P C 7) (サブチリシン / ケキシン様プロテアーゼ P C 7) (プロホルモンコンバターゼ P C 7) (リンパ腫プロ蛋白質コンバターゼ) 寄託番号 Q 1 6 5 4 9

1 2 0 . ポリシスチン (Polycystin) 前駆体 (常染色体優性多発性囊胞腎疾患蛋白質 1) 寄託番号 P 9 8 1 6 1

1 2 1 . ポリシスチン 2 (常染色体優性多発性囊胞腎疾患蛋白質 I I 型蛋白質) (ポリシストワイン (Polycystwin)) (R 4 8 3 2 1) 寄託番号 Q 1 3 5 6 3

20

【 0 0 5 8 】

1 2 2 . 多発性筋炎 / 強皮症自己抗原 1 (自己抗原 P M / S c 1 1) (多発性筋炎 / 強皮症自己抗原 7 5 k D a) (P M / S c 1 - 7 5) (P 7 5 多発性筋炎 - 強皮症オーバーラップ症候群関連自己抗原) 寄託番号 Q 0 6 2 6 5

1 2 3 . 前立腺酸ホスファターゼ前駆体。寄託番号 P 1 5 3 0 9

1 2 4 . プレイオトロフィン (Pleiotrophin) 前駆体 (P T N) (ヘパリン結合成長関連分子) (H B - G A M) (ヘパリン結合成長因子 8) (H B G F - 8) (骨芽細胞特異的因子 1) (O S F - 1) (ヘパリン結合軸索過成長促進因子 1) (H B N F - 1) 寄託番号 P 2 1 2 4 6

30

1 2 5 . 下垂体腫瘍形質転換遺伝子 1 蛋白質相互作用蛋白質 (下垂体腫瘍形質転換遺伝子蛋白質結合因子) (P T T G 結合因子) 寄託番号 P 5 3 8 0 1

1 2 6 . 3 1 k D a 形質転換蛋白質 (転写因子 P U . 1) 寄託番号 P 1 7 9 4 7

1 2 7 . V (D) J 組換え活性化蛋白質 1 (R A G - 1) 寄託番号 P 1 5 9 1 8

1 2 8 . 網膜芽腫結合蛋白質 1 (R B B P - 1) 寄託番号 P 2 9 3 7 4

1 2 9 . 網膜芽腫結合蛋白質 2 (R B B P - 2) 寄託番号 P 2 9 3 7 5

1 3 0 . 網膜芽腫様蛋白質 1 (1 0 7 k D a 網膜芽腫関連蛋白質) (P R B 1) (P 1 0 7) 寄託番号 P 2 8 7 4 9

【 0 0 5 9 】

1 3 1 . 網膜芽腫様蛋白質 2 (1 3 0 k D a 網膜芽腫関連蛋白質) (P R B 2) (P 1 3 0) (R B R - 2) 寄託番号 Q 0 8 9 9 9

1 3 2 . 形質転換蛋白質 R h o C (H 9) 寄託番号 P 0 8 1 3 4

1 3 3 . X 連鎖網膜色素変性 G T P a s e 調節因子。寄託番号 Q 9 2 8 3 4

1 3 4 . セマフォリン (セマフォリン (Semaphorin)) 3 A 前駆体 (セマフォリン (セマフォリン) I I I) (S e m a I I I) 寄託番号 Q 1 4 5 6 3

1 3 5 . セマフォリン 3 B 前駆体 (セマフォリン V) (S e m a V) 寄託番号 Q 1 3 2 1 4

1 3 6 . セマフォリン 3 C 前駆体 (セマフォリン E) (S e m a E) 寄託番号 Q 9 9 9 8 5

1 3 7 . セマフォリン 3 D 前駆体。寄託番号 O 9 5 0 2 5

50

138. デカペントブレジックホモログ母細胞 (Mothers against decapentaplegic homolog) 1 (SMAD1) (Mad関連蛋白質1) (形質転換成長因子ベータシグナル蛋白質-1) (BSP-1) (hSMAD1) (JV4-1) 寄託番号Q15797

139. 細胞外スуперオキシドジスムターゼ [Cu-Zn]前駆体 (EC-SOD) 寄託番号P08294

140. ストリアチン (Striatin) 寄託番号O43815

【0060】

141. 糖蜜蛋白質 (トレチャーニ・コリンズ症候群蛋白質) 寄託番号Q13428

142. 向甲状腺胚性因子。寄託番号Q10587

143. T-リンパ腫浸潤および転移誘導蛋白質1 (TIA M1蛋白質) 寄託番号Q1 10
3009

144. TNG1蛋白質。寄託番号P56846

145. 腫瘍壞死因子、アルファ誘導蛋白質2 (B94蛋白質) 寄託番号Q03169

146. チュベリン (Tuberin) (結節硬化症2蛋白質) 寄託番号P49815

147. テトラトリ相互ペプチド繰り返し蛋白質3 (TPR繰り返し蛋白質D) 寄託番号P53804

148. ユトロフィン (Utrophin) (ジストロフィン関連蛋白質1) (DRP1) (DRP) 寄託番号P46939

149. ヴィスコット オールドリッチ症候群蛋白質相互作用蛋白質 (WASP相互作用蛋白質) (PRPL-2蛋白質) 寄託番号O43516

150. ヴィスコット オールドリッチ症候群蛋白質ファミリーメンバー1 (WASPファミリー蛋白質メンバー1) (フェルプロリン (Verprolin) 相同性ドメイン含有蛋白質1) 寄託番号Q92558

151. ヴィスコット オールドリッチ症候群蛋白質ファミリーメンバー2 (WASPファミリー蛋白質メンバー2) (フェルプロリン相同性ドメイン含有蛋白質2) 寄託番号Q9Y6W5

【0061】

152. ヴィスコット オールドリッチ症候群蛋白質ファミリーメンバー3 (WASPファミリー蛋白質メンバー3) (フェルプロリン相同性ドメイン含有蛋白質3) 寄託番号Q9UPY6

153. 天然ヴィスコット オールドリッチ症候群蛋白質 (N-WASP) 寄託番号O0401

154. DNA修復蛋白質補足XP-B細胞 (色素性乾皮症グループB補足蛋白質) (DNA除去修復蛋白質ERC C-3) (基本転写因子289kDaサブユニット) (BTF2-P89) (TFI IH89kDaサブユニット) 寄託番号P19447

155. DNA修復蛋白質補足XP-C細胞 (色素性乾皮症グループC補足蛋白質) (P125) 寄託番号Q01831

156. DNA修復蛋白質補足XP-F細胞 (色素性乾皮症グループF補足蛋白質) (DNA除去修復蛋白質ERC C-4) 寄託番号Q92889

157. DNA修復蛋白質補足XP-G細胞 (色素性乾皮症グループG補足蛋白質) (DNA除去修復蛋白質ERC C-5) 寄託番号P28715

【0062】

表4

Xがいずれかのアミノ酸である、モチーフ[R/K]-x-[R/K]-[R/K]-[R/K]で、ExPASyソフトウェアを用いて調査を行った。

1. アミロイドベータA4前駆体蛋白質結合ファミリーAメンバー1 (ニューロン特異的X11蛋白質) (ニューロン性Munc18-1-相互作用蛋白質1) (Mint-1) (アダプタ蛋白質X11アルファ) 寄託番号Q02410

2. アミロイドベータA4前駆体蛋白質結合ファミリーAメンバー2 (ニューロン特異的X11L蛋白質) (ニューロン性Munc18-1-相互作用蛋白質2) (Mint-

20

30

40

50

- 2) (アダプタ蛋白質X 1 1 ベータ) 寄託番号 Q 9 9 7 6 7
 3 . アポトーシス関連蛋白質 A P R - 2 。寄託番号 Q 9 Y 5 M 1
 4 . ベータセクレターゼ前駆体 (ベータ部位 A P P 分割酵素) (ベータ部位アミロイド前駆体蛋白質分割酵素) (アスパルチルプロテアーゼ 2) (A s p 2) (A S P 2) (膜連結アスパラギン酸プロテアーゼ 2) (メマプシン (Memapsin) - 2) 寄託番号 P 5 6 8
 1 7
 5 . 胸部癌 2 型感受性蛋白質。寄託番号 P 5 1 5 8 7
 6 . 胎児性アルツハイマー抗原 (胎児性 A l z - 5 0 - 反応性クローン 1) 寄託番号 Q
 1 2 8 3 0
 【0 0 6 3 】
 7 . カスパーーゼ - 1 0 前駆体 (I C E 様アポトーシスプロテアーゼ 4) (アポトーシスプロテアーゼ M c h - 4) (F A S 連結死亡ドメイン蛋白質インターロイキン - 1 B - 変換酵素 2) (F L I C E 2) 寄託番号 Q 9 2 8 5 1
 8 . インスリン用成長因子 I B 前駆体 (I G F - I B) (ソマトメジン C) 寄託番号 P
 0 5 0 1 9
 9 . 核因子カッパ - B キナーゼ阻害因子アルファサブユニット (I カッパ - B キナーゼアルファ) (I k B K A) (I K K - アルファ) (I K K - A) (I カッパ B キナーゼ) (I - カッパ - B キナーゼ 1) (I K K 1) (保存ヘリックス - ループ - ヘリックスユビキタス (ubiquitous) キナーゼ) (核因子N F カッパ B 阻害因子キナーゼアルファ) (N F K B I K A) 寄託番号 O 1 5 1 1 1
 10 . インターフェロンアルファ - 1 / 1 3 前駆体 (インターロイキンアルファ - D) (L e I F D) 寄託番号 P 0 1 5 6 2
 11 . チロシン - 蛋白質キナーゼ J A K 1 (ヤーヌス (Janus) キナーゼ 1) (J A K - 1) 寄託番号 P 2 3 4 5 8
 12 . メラノーマ抗原優先発現 I N 腫瘍 (メラノーマの優先発現抗原) (O P A - 相互作用蛋白質 4) (O I P 4) 寄託番号 P 7 8 3 9 5
 【0 0 6 4 】
 13 . メラノーマ関連抗原 B 1 (M A G E - B 1 抗原) (M A G E - X P 抗原) (D S S - A H C 臨界間隔 (critical interval) M A G E スーパーファミリー 1 0) (D A M 1 0) 寄託番号 P 4 3 3 6 6
 14 . 筋原細胞決定蛋白質 1 (筋原性因子 M Y F - 3) 寄託番号 P 1 5 1 7 2
 15 . 神経形成分化因子 1 (N e u r o D) 寄託番号 Q 1 3 5 6 2
 16 . 神経形成分化因子 2 。寄託番号 Q 1 5 7 8 4
 17 . 神経形成分化因子 3 (神経形成基本ヘリックス - ループ - ヘリックス蛋白質) (ニューロジエニン (Neurogenin) 1) 寄託番号 Q 9 2 8 8 6
 18 . 上皮小体ホルモン前駆体 (上皮小体ホルモン) (P T H) (パラトルモン) 寄託番号 P 0 1 2 7 0
 19 . R N A - 結合蛋白質 5 (R N A 結合モチーフ蛋白質 5) (推定される腫瘍サプレッサ L U C A 1 5) 寄託番号 P 5 2 7 5 6
 20 . S k i 癌遺伝子 (C - s k i) 寄託番号 P 1 2 7 5 5
 21 . スパスチン (Spastin) 寄託番号 Q 9 U B P 0
 22 . 性決定領域 Y 蛋白質 (精巣決定因子) 寄託番号 Q 0 5 0 6 6
 23 . T 細胞急性リンパ性白血病 - 1 蛋白質 (T A L - 1 蛋白質) (S T E M c e l 1 蛋白質) (T 細胞白血病 / リンパ腫 - 5 蛋白質) 寄託番号 P 1 7 5 4 2
 【0 0 6 5 】
 24 . 腫瘍壞死因子リガンドスуперファミリー 1 3 (増殖誘導リガンド) (A P R I L) (T N F および A P O L 関連白血球発現リガンド 2) (T A L L - 2) (T N F 関連死亡リガンド - 1) (T R D L - 1) 寄託番号 O 7 5 8 8 8
 25 . 腫瘍壞死因子レセプタースーパーファミリー 1 8 前駆体 (糖質コルチコイド誘導 T N F R 関連蛋白質) (活性誘導可能 T N F R
 10
 20
 30
 40
 50

ファミリーレセプター) 寄託番号 Q 9 Y 5 U 5

26. トリコヒアリン。寄託番号 Q 0 7 2 8 3

27. 血管内皮成長因子B前駆体(VEGF-B)(VEGF関連因子)寄託番号 P 4
9 7 6 5

28. 血管内皮成長因子前駆体(VEGF)(血管透過性因子)(VPF)寄託番号 P
1 5 6 9 2

【0066】

表5

Xがいずれかのアミノ酸である、モチーフ[R/K]-[R/K]-[R/K]-x-[R/K]で、ExPASyソフトウェアを用いて調査を行った。

10

1. 転写因子AP-1(癌原遺伝子C-JUN)(P39)(G0S7)寄託番号 P 0
5 4 1 2

2. T細胞表面糖蛋白質CD3ゼータ鎖前駆体(T細胞レセプターT3ゼータ鎖)寄託番号 P 2 0 9 6 3

3. Tリンパ球活性化抗原CD86前駆体(活性化B7-2抗原)

(CTLA-4カウンターレセプターB7.2)(FUN-1)寄託番号 P 4 2 0 8 1

4. T細胞表面糖蛋白質CD8ベータ鎖前駆体(抗原CD8B)寄託番号 P 1 0 9 6 6

5. 細胞分裂周期2様蛋白質キナーゼ5(コリンエステラーゼ関連細胞分裂調節因子(controller))(CDC2関連蛋白質キナーゼ5)寄託番号 Q 1 4 0 0 4

6. メラノーマ関連抗原B2(MAGE-B2抗原)(DSS-AHC臨界間隔MAG
Eスーパーファミリー6)(DAM6)寄託番号 O 1 5 4 7 9

7. 上皮小体ホルモン関連蛋白質前駆体(PTH-rP)(PTHrP)寄託番号 P 1
2 2 7 2

8. 主要プリオントン蛋白質前駆体(PrP)(PrP27-30)(PrP33-35C)
(ASCR)寄託番号 P 0 4 1 5 6

9. 形質転換成長因子ベータ2前駆体(TGF-ベータ2)(神経膠芽細胞腫由来T細胞サブレッサ因子)(G-TSF)(BSC-1細胞成長阻害因子)(ポリエルジン(Polyargin))セテルミン(Cetermin)寄託番号 P 0 8 1 1 2

【0067】

10. 形質転換-2蛋白質相同体(TRA-2アルファ)寄託番号 Q 1 3 5 9 5

30

11. DNA修復蛋白質補足XP-B細胞(色素性乾皮症グループB補足蛋白質)(DNA除去修蛋白質ERCC-3)(基本転写因子289kDaサブユニット)(BT
F2-P89)(TFI IH89kDaサブユニット)寄託番号 P 1 9 4 4 7

12. DNA修復蛋白質補足XP-C細胞(色素性乾皮症グループC補足蛋白質)(P
1 2 5)寄託番号 Q 0 1 8 3 1

13. 仮定28.3kDa蛋白質(小児白血病のTCF3(E2A)縮合パートナー)
寄託番号 Q 9 U P A 6

【0068】

以下の実施例は本発明を説明する。

実施例1

この実験は、異なる蛋白質のデリバリー系：リポフェクチン試薬、アンテナペディアおよびヒストンH1.4Bの転座効率を比較するために行った。ヒストンH1.4B蛋白質は所定のモチーフを含有していた。

40

転座の定量的測定は、融合蛋白質の一部として転座物質と共に含まれる-ガラクトシダーゼ酵素の活性を読み取ることにより行った。適当なガラクトシド基質を提供した場合、酵素はジオキセタンを蓄積させる基質を脱グリコシル化する。続く異なる緩衝液中でのインキュベーションの間、ジオキセタンは、光度計を使用して読み取ることができる発光(425nm)で、脱プロトン化し、分解する。したがって、この系は、サンプル中に存在する-ガラクトシダーゼの量、および、最終的には細胞内にデリバリーされる融合蛋白質の量の高感度の測定法を提供した。

50

【0069】

実験を8-ウェルチャンバースライドを用いて行った。 3×10^4 のヒーラ細胞を各ウェルの中に接種し、 $400\mu l$ のRPMI+10%のFCS培地で補足し、37および5%のCO₂下で一晩インキュベートした。翌日、蛋白質の適当な希釈溶液をRPMI培地中に作成し、ウェル中に加えた。リポフェクチンデリバリーおよび転座実験を両方とも4時間行った。

実験を異なる2日間に行った：初日は、ネガティブコントロール - ガラクトシダーゼおよびH1.4B-Bgalを試験し、二日目はアンテナペディア融合 (Antp-gal) を試験した。Rockeにより提供される、 - ガラクトシダーゼのリポフェクチンデリバリーを細胞内へのデリバリーのポジティブコントロールとして両日行った。

10

【0070】

各蛋白質構成物の量を、光度計を使用して、リニアリーディングを得るために最良の数値が存在することを示した先の試験の後に測定した。装置の能力の限界であることから、 6×10^7 rluに近い数値を与える各量で開始することを決定した。その数値から、3つの連続した1/5倍の希釈溶液が各容器の中に作られた。

これらの試験はまた、 - ガラクトシダーゼを含む異なる構成物が、異なる活性を有することを示した。したがって、また、全ての蛋白質が本来の最大限の活性が 6×10^7 rlu周辺となるように規格化されることを確実にするため、異なる蛋白質の本来の活性を、転座の後に回復された活性と平行して測定した。

【0071】

20

実験プロトコルを以下に示す：

1. 不完全RPMIで2回細胞を洗浄する（前の晩に、チャンバースライドの中に分離する：0.4mlの完全RPMI / ウェル中 $2 \sim 3 \times 10^4$ 個の細胞）。
2. 0.5mlの完全RPMI / ウェルを加える。
3. ペプチドを加える（プランクに対して1:2ずつ希釈した200ng / ウェルから）。
4. インキュベーターに4時間放置する。

【0072】

アビシン - フルオレセインでチャンバースライドを固定し、進行させる。

1. チャンバースライドから培地を除去する。
2. スライドを1XPBSで3回洗浄する。
3. 殆どの液体を取り除き、チャンバーを取り、スライドを乾かす。
4. -20で少なくとも20分間冷凍する。
5. 1XPBS内の3%ホルムアルデヒドで15ないし20分間固定する。
6. PBS内の0.5%BSAですすぐ。
7. 1XPBS内の5%BSAで20分間遮断する。
8. PBS内の0.5MのNaClで3回すすぐ。
9. アビシン - フルオレセイン溶液 (0.1MのNaHCO₃、0.5MのNaCl、pH 8.5中の1:4000希釈溶液) 50μl / ウェルを加え、暗く湿度のあるチャンバーで30分間インキュベートする。
10. PBS内の0.5MのNaClで10回洗浄する。
11. ウェル周囲のプラスチック部を除去する。
12. 4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) または蛍光染色液を2ないし3滴加え、ネイルワニスでスライドを密封する。
13. 顕微鏡で調べ、暗く湿度のあるチャンバー中に保存する。

30

40

【0073】

転座後の結果を、細胞抽出物より取り出された - ガラクトシダーゼを読み取ることにより得、表6および7に示す。全ての場合で、得られた数値は、系が効果的であることを指す直線的パターンに従う。 - ガラクトシダーゼネガティブコントロールの結果は、蛋白質の量が増加した場合に、この分子は転座せず、活性の違いが観察されないことから、

50

当初の予想と相互関係がない増加傾向を示す。しかしながら、この不自然な結果は、洗浄または、ウェルに加えられた際に細胞内に侵入しないが細胞膜に付着した蛋白質分子が原因でありうる。いずれの場合でも、 β -ガラクトシダーゼ蛋白質の最大量を与える数値は、デリバリー系より得られるものより明らかに低い。

リポフェクチンデリバリー、A n t p - β -Gal および H 1 . 4 B - β -Gal の間での比較に関しては、転座後に回復した β -ガラクトシダーゼ活性が 5 倍高いので、ヒストン H 1 . 4 B は、リポフェクチンおよびアンテナペディアのより 5 倍高い割合で転座する。

【0074】

【表2】

表 6

β -Gal ポジティブコントロール (R o c h e) トランスフェクション		
蛋白質量	蛋白質活性 (rlu)	トランスフェクション後活性 (rlu)
	8.578	27.347
	10.204	26.662
1.6 ng	22.026.968	50.353
1.6 ng	22.101.678	47.212
8 ng	43.535.464	140.342
8 ng	43.392.116	162.319
40 ng	62.436.592	635.228
40 ng	61.919.408	675.640
β -ガラクトシダーゼ転座		
蛋白質量	蛋白質活性 (rlu)	トランスフェクション後活性 (rlu)
640 pg	6.948.195	25.076
640 pg	5.911.789	28.710
3.2 ng	51.004.204	29.527
3.2 ng	50.660.716	35.227
15 ng	24.657.924	56.941
16 ng	24.504.798	55.164
80 ng	オーバーロード	242.200
80 ng	オーバーロード	298.589
H 1 . 4 B - β -Gal 転座		
蛋白質量	蛋白質活性 (rlu)	トランスフェクション後活性 (rlu)
1.6 ng	3.929.454	49.243
1.6 ng	3.694.802	35.667
8 ng	11.583.624	70.352
8 ng	12.377.050	60.663
40 ng	33.230.640	355.641
40 ng	33.458.668	333.496
200 ng	58.670.112	2.687.583
200 ng	56.713.392	2.989.107

【0075】

10

20

30

40

【表3】

表7

β -Gα1ポジティブコントロール (Roché) トランスフェクション		
蛋白質量	蛋白質活性 (rlu)	トランスフェクション後活性 (rlu)
	564	2,417
	503	1,835
1.6 ng	10,302,814	40,121
1.6 ng	10,740,756	33,578
8 ng	33,610,784	164,745
8 ng	34,080,292	157,913
40 ng	57,920,416	715,773
40 ng	57,083,376	744,405
Antip- β -Gα1転座		
蛋白質量	蛋白質活性 (rlu)	トランスフェクション後活性 (rlu)
2 ng	618,178	2,275
2 ng	628,733	3,020
10 ng	2,638,336	2,028
10 ng	2,660,380	2,027
50 ng	10,787,237	39,725
50 ng	11,323,412	25,066
250 ng	36,136,704	549,104
250 ng	37,321,488	682,181
Tat- β -Gα1転座		
蛋白質量	蛋白質活性 (rlu)	トランスフェクション後活性 (rlu)
0.8 ng	1,638,342	4,317
0.8 ng	1,620,746	5,587
4 ng	6,443,625	6,318
4 ng	5,424,017	5,454
20 ng	20,843,930	30,984
20 ng	22,358,902	25,516
100 ng	53,224,476	220,384
100 ng	49,537,884	128,548

【0076】

実施例2

種々のペプチドを合成的に調製し、ビオチン分子にコンジュゲートした。ついで、コンジュゲートを、実施例1に記載の実験プロトコルを使用して転座に関して試験した。

コンジュゲートを、それらが由来する蛋白質の識別番号と共に表8に示す。

【0077】

【0078】

10

20

30

40

【表4】

表8

蛋白質名	Genbank 番号	ペプチドアミノ酸配列	配列 番号
TEF	gi:4507431	ビオチン-MIKKAKKVFPDEQKDEK-アミド	1
BMP-3	gi:115072	ビオチン-TLKKARRKQWIEPRNCARR-アミド	2
Spi-1	gi:4507175	ビオチン-GEVKKVKKKLYQFSGEVL-アミド	3
APC	gi:182397	ビオチン-SSRKAKKPAQTASKLPPPVAR-アミド	4
P80-コリン	gi:4758024	ビオチン-NLSLRKAKKRAFQLEEG-アミド	5
BMP-4	gi:115073	ビオチン-HALTRRRRAKRSPKHHSQ-アミド	6
IRAK	gi:8928535	ビオチン-CLHRRRAKRRPPMTQVYER-アミド	7
メラスタチ ン1(p2)	gi:3243075	ビオチン-TKGGRGKGKGKKKGKV-アミド	8
HDAC1	gi:13128860	ビオチン-SNFKKAKRVKTEDEKEKDP-アミド	9
カスパーゼ- 1阻害因子ア イスバーグ	gi:10954343	ビオチン-QLLRKRRIFIHSVGAGT-アミド	10
ジスケリンp 1	gi:4503337	ビオチン-IKKEKKSKKDKKAKAGLES-アミド	11
ジスケリンp 2	gi:4503337	ビオチン-LPKHHKKKERKSLPEED-アミド	12

10

20

【0079】

【表5】

E2A白血病p1	gi:12804613	ビオチン-AARGRRRQRELNRRKYQA-アミド	13
E2A白血病p2	gi:12804613	ビオチン-GPSGRKRRRVPRDGRAGNA-アミド	14
主要プリオ ン蛋白質前 駆体	gi:2944217	ビオチン-GLCKKRPKPGWNTGGSR-アミド	15
ブルトンチ ロシンキナ ーゼ	gi:2117817	ビオチン-HRKTKKPLPPTPEEDQILKKP-アミド	16
性決定領域Y 蛋白質	gi:226981	ビオチン-PNYKYRPRRKAKMLPKNCS-アミド	17
パキュロウ イルスIAP繰 り返し-含有 蛋白質5	gi:4502145	ビオチン-AKETNNKKFEETAKKVRRA-アミド	18
アポトーシ ス阻害因子 サービリン	gi:2315863	ビオチン-NKIAKETNNKKFEETAKKVRRA-アミ ド	19
グランザイ ムB前駆体	gi:4758494	ビオチン-QLERKAKRTRAVQPLRLPS-アミド	20
上皮小体ホ ルモン	gi:4506267	ビオチン-SQRPRKKEDNVLVESHEKSLGE-アミド	21
Toll-イン ターロイキ ン1レセプタ ードメイン 含有アダプ タ蛋白質	gi:20140483	ビオチン-GKMADWFRQTLLKKPKKRPNNSPEST-ア ミド	22

10

20

30

全ての場合で転座が観察された。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Implyx Ltd.

<120> PEPTIDES FOR USE AS TRANSLOCATION FACTORS

<130> REP06785WO

<140> (not yet known)

<141> 2002-07-01

<150> 0116047.2

10

<151> 2001-06-29

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide conjugated with biotin

20

<400> 1

Met Ile Lys Lys Ala Lys Lys Val Phe Val Pro Asp Glu Gln Lys Asp
1 5 10 15

Glu Lys

30

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide conjugated with biotin

<400> 2

Thr Leu Lys Lys Ala Arg Arg Lys Gln Trp Ile Glu Pro Arg Asn Cys
1 5 10 15

40

Ala Arg Arg

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide conjugated with biotin

<400> 3
Gly Glu Val Lys Lys Val Lys Lys Lys Leu Thr Tyr Gln Phe Ser Gly
1 5 10 15

Glu Val Leu

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide conjugated with biotin

<400> 4
Ser Ser Arg Lys Ala Lys Lys Pro Ala Gln Thr Ala Ser Lys Leu Pro
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Arg
20

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

10

20

30

40

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide conjugated with biotin

<400> 5

Asn Leu Ser Leu Arg Lys Ala Lys Lys Arg Ala Phe Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Gly

10

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide conjugated with biotin

<400> 6

His Ala Leu Thr Arg Arg Arg Ala Lys Arg Ser Pro Lys His His
1 5 10 15

20

Ser Gln

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide conjugated with biotin

<400> 7

Cys Leu His Arg Arg Ala Lys Arg Arg Pro Pro Met Thr Gln Val Tyr
1 5 10 15

Glu Arg

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide conjugated with biotin

<400> 8
Thr Lys Gly Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys Gly Lys Val
1 5 10 15

Lys

10

<210> 9
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide conjugated with biotin

<400> 9
Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu Lys Glu
1 5 10 15

Lys Asp Pro

20

30

<210> 10
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide conjugated with biotin

<400> 10
Gln Leu Leu Arg Lys Lys Arg Arg Ile Phe Ile His Ser Val Gly Ala
1 5 10 15

40

Gly Thr

> <210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide conjugated with biotin

10

<400> 11

Ile Lys Lys Glu Lys Lys Ser Lys Lys Asp Lys Lys Ala Lys Ala
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ser

20

20

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide conjugated with biotin

<400> 12

Leu Pro Lys Lys His Lys Lys Lys Glu Arg Lys Ser Leu Pro Glu
1 5 10 15

30

Glu Asp

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide conjugated with biotin

<400> 13
Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Gln Arg Glu Leu Asn Arg Arg Lys
1 5 10 15

Tyr Gln Ala

10

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide conjugated with biotin

<400> 14
Gly Pro Ser Gly Arg Lys Arg Arg Val Pro Arg Asp Gly Arg Arg
1 5 10 15

20

Ala Gly Asn Ala

20

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide conjugated with biotin

<400> 15
Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly
1 5 10 15

Ser Arg

40

<210> 16
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide conjugated with biotin

<400> 16
His Arg Lys Thr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Thr Pro Glu Glu Asp Gln
1 5 10 15

Ile Leu Lys Lys Pro
20

10

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide conjugated with biotin

20

<400> 17
Pro Asn Tyr Lys Tyr Arg Pro Arg Arg Lys Ala Lys Met Leu Pro Lys
1 5 10 15

Asn Cys Ser

30

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide conjugated with biotin

<400> 18
Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala Lys
1 5 10 15

40

Lys Val Arg Arg Ala
20

<210> 19
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide conjugated with biotin

<400> 19
Asn Lys Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu
1 5 10 15

Thr Ala Lys Lys Val Arg Arg Ala
20

<210> 20
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide conjugated with biotin

<400> 20
Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln Pro Leu Arg
1 5 10 15

Leu Pro Ser

10

20

30

<210> 21
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide conjugated with biotin

<400> 21
Ser Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Ser His
1 5 10 15

Glu Lys Ser Leu Gly Glu
20

10

<210> 22

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide conjugated with biotin

<400> 22
Gly Lys Met Ala Asp Trp Phe Arg Gln Thr Leu Leu Lys Lys Pro Lys
1 5 10 15

20

Lys Arg Pro Asn Ser Pro Glu Ser Thr
20 25

【手続補正書】

【提出日】平成16年3月10日(2004.3.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2005508875000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					Internat ional Application No PCT/GB 02/03027						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/62 C12N15/87 C07K2/00 C07K14/435 C07K14/82 C07K16/18 C07K19/00 A61K38/02 A61K38/17 A61K38/43											
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) IPC 7 C12N C07K A61K											
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) BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> VOCERO-AKBANI ADITA M ET AL: "Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein." NATURE MEDICINE, vol. 5, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 29-33, XP002228967 ISSN: 1078-8956 abstract page 29, right-hand column page 32, left-hand column --- -/-/ </td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;">1-8, 13-35</td> </tr> </table>						Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	VOCERO-AKBANI ADITA M ET AL: "Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein." NATURE MEDICINE, vol. 5, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 29-33, XP002228967 ISSN: 1078-8956 abstract page 29, right-hand column page 32, left-hand column --- -/-/	1-8, 13-35
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	VOCERO-AKBANI ADITA M ET AL: "Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein." NATURE MEDICINE, vol. 5, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 29-33, XP002228967 ISSN: 1078-8956 abstract page 29, right-hand column page 32, left-hand column --- -/-/	1-8, 13-35									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.			<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 *S* document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report								
7 February 2003			24/02/2003								
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 Meacock, S								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 02/03027
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>NAGAHARA HIKARU ET AL: "Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration." <i>NATURE MEDICINE</i>, vol. 4, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 1449-1452, XP002927987 ISSN: 1078-8956 abstract page 1449, left-hand column page 1452</p> <p>---</p> <p>SMITH KELLY J ET AL: "Wild-type but not mutant APC associates with the microtubule cytoskeleton." <i>CANCER RESEARCH</i>, vol. 54, no. 14, 1994, pages 3672-3675, XP001121106 ISSN: 0008-5472 abstract</p> <p>---</p> <p>ANDERSON D C ET AL: "TUMOR CELL RETENTION OF ANTIBODY FAB FRAGMENTS IS ENHANCED BY AN ATTACHED HIV TAT PROTEIN-DERIVED PEPTIDE" <i>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS</i>, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 194, no. 2, 30 July 1993 (1993-07-30), pages 876-884, XP000382181 ISSN: 0006-291X abstract page 877 page 877</p> <p>---</p> <p>SCHWARZE S ET AL: "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse" <i>SCIENCE</i>, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 285, no. 5433, 3 September 1999 (1999-09-03), pages 1569-1572, XP002140133 ISSN: 0036-8075 abstract page 1572</p> <p>---</p> <p>WO 99 05302 A (PERKIN ELMER CORP) 4 February 1999 (1999-02-04)</p> <p>abstract page 8, line 19 -page 9, line 12</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-8, 13-35
Y		9-12
X		19,25
Y		1-8, 13-35
Y		13,16, 21,22, 27, 30-32,34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Ref.	Location No.
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y	HO ALAN ET AL: "Synthetic protein transduction domains: Enhanced transduction potential in vitro and in vivo." CANCER RESEARCH, vol. 61, no. 2, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 474-477, XP002228969 ISSN: 0008-5472 abstract; figure 2 page 477, left-hand column -----	1-8, 13-35	
P,X	WO 01 76637 A (CRISANTI ANDREA ;ESSEGHIR SELMA (GB); IMPLYX LTD (GB)) 18 October 2001 (2001-10-18) page 3, line 28 -page 4, line 19 page 11, line 21 -page 12, line 7 -----	1-8, 13-35	
E	WO 02 062823 A (UNIV YALE ;WARD DAVID C (US); BRAY-WARD PATRICIA (US); RABINOVICH) 15 August 2002 (2002-08-15) abstract; table 1 page 11, line 21 -page 12, line 7 -----	1-8, 13-35	
A	SCHWARZE S R S R ET AL: "In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER TRENDS JOURNAL, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 45-48, XP004189118 ISSN: 0165-6147 the whole document -----	1-35	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte	al application No.
PCT/GB 02/03027	

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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 claim 8 is 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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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				International Application No PCT/GB 02/03027
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9905302	A 04-02-1999	AU 741546 B2 AU 8408098 A EP 0998577 A1 JP 2002511885 T WO 9905302 A1 US 6025140 A		06-12-2001 16-02-1999 10-05-2000 16-04-2002 04-02-1999 15-02-2000
WO 0176637	A 18-10-2001	AU 4673901 A AU 4674101 A EP 1272221 A2 EP 1272222 A2 WO 0176637 A2 WO 0176638 A2		23-10-2001 23-10-2001 08-01-2003 08-01-2003 18-10-2001 18-10-2001
WO 02062823	A 15-08-2002	WO 02062823 A2		15-08-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 N 15/09	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アンドレア・クリサンティ

イギリス、エスダブリュー7・2エイゼット、ロンドン、インペリアル・カレッジ・ロード、インペリアル・カレッジ・オブ・サイエンス・テクノロジー・アンド・メディシン

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA12 BA80 CA02 CA07 DA01 DA02 DA05

DA11 GA11 HA01 HA17 HA20

4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA31

CA43 CA44 CA46

4C084 AA02 AA07 AA13 BA02 CA18 DC50 NA14 ZA012 ZA362 ZA962

ZB072 ZB262 ZB332 ZB352 ZC022

4C085 AA13 BB11 CC21 DD23

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA17 BA40 BA41 BA50 CA40

DA75 EA20 EA50 FA20 FA74