【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成25年6月13日(2013.6.13)

【公表番号】特表2013-514060(P2013-514060A)
【公表日】平成25年4月25日(2013.4.25)
【年通号数】公開・登録公報2013-020
【出願番号】特願2012-543448(P2012-543448)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/245　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　16/08　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　19/00　(2006.01)
Ｃ１２Ｐ　21/02　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　47/42　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　47/48　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　Ａ
Ｃ０７Ｋ　14/245
Ｃ０７Ｋ　16/08
Ｃ０７Ｋ　19/00
Ｃ１２Ｐ　21/02　Ｃ
Ａ６１Ｋ　37/02
Ａ６１Ｋ　47/42
Ａ６１Ｋ　47/48
Ａ６１Ｐ　35/00

【手続補正書】
【提出日】平成25年4月22日(2013.4.22)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２７】
【図１】抗体模倣物V_HＣＤＲ１－V_HＦＲ$_2$－V_LＣＤＲ３のポリペプチドの遺伝子と、コリシンＩａの変異ポリペプチドの遺伝子とを含む、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ１１の構造の略図である。
【図２】抗体模倣物V_HＣＤＲ１－V_HＦＲ$_2$－（Ｒｅｖ）V_LＣＤＲ３のポリペプチドの遺伝子と、コリシンＩａの変異ポリペプチドの遺伝子とを含む、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ２２の構造の略図である。
【図３】コリシンＩａの変異ポリペプチドの感作効果の実験１を示す図である。　（Ａ）致死量のＭＲＳＡ（ＡＴＣＣ　ＢＡＡ４２）を腹腔内注射した昆明（Ｋｕｎｍｉｎｇ）マウスを、（１）コントロールグループ、（２）アンピシリングループ、（３）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド（ＺＬ０１１２８８３６．１）のグループ、（４）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ、へとランダムにグループ分けする。　（Ｂ）１４日後、昆明マウスの新たな一群を、コントロールグループおよびアンピシリングループへとグループ分けする。黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループおよび黄色ブド

ウ球菌に対するポリペプチド１のグループ由来の生き残ったマウスを、黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループおよび黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループへとグループ分けし、当該実験を繰り返す。　（Ｃ）４１日後、昆明マウスの新たな一群を、（１）コントロールグループ、（２）レボフロキサシンのグループ、（３）セフトリアキソンナトリウムのグループ、へとグループ分けし、また、（４）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループおよび（５）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ由来の生き残ったマウスは、緑膿菌に対するポリペプチド２のグループおよび緑膿菌に対するポリペプチド１のグループへとグループ分けする。

【図４】コリシンＩａの変異ポリペプチドの低感作効果の実験３を示す図である。　（Ａ）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド／緑膿菌に対するポリペプチド２のグループの血清、１：５０，０００の力価；　（Ｂ）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１／緑膿菌に対するポリペプチド１のグループの血清、１：５０，０００の力価。　（１）第１週、（２）第２週、（３）第７週の血清、（４）ネガティブコントロール。

【図５】ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫に対する、新規抗腫瘍ポリペプチドのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける殺傷効果の比較を示す図である。　（Ａ）コントロールグループ、（Ｂ）新規抗腫瘍ポリペプチド１処理グループ、（Ｃ）新規抗腫瘍ポリペプチド２処理グループ。

【図６】ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫の細胞および他の腫瘍細胞に対する、新規抗腫瘍ポリペプチドのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける殺傷効果を示す図である。　（Ａ）バーキットリンパ腫のＥＢＶ陽性細胞、　（Ｂ）バーキットリンパ腫のＥＢＶ陰性細胞、　（Ｃ）ＡＩＤＳ患者由来の悪性リンパ肉腫のＥＢＶ陽性細胞。　（１）コントロールグループ、（２）新規抗腫瘍ポリペプチド１処理グループ。

【図７】ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫の細胞を移植したヌードマウス由来の成長した固形腫瘍に対する新規抗腫瘍ポリペプチドの殺傷効果を示す図である。　（Ａ）コントロールグループ、　（Ｂ）新規抗腫瘍ポリペプチド１治療グループ、に由来するすべてのＳＣＩＤ免疫不全マウスの、両方の脇の下の側面部中に、バーキットリンパ腫の細胞を接種する。左矢印はＥＢＶ陰性リンパ肉腫、右矢印はＥＢＶ陽性リンパ肉腫である。

【図８】ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫の細胞を移植したヌードマウス由来の成長した固形腫瘍に対する新規抗腫瘍ポリペプチドの殺傷効果を示す図である。　（Ａ）コントロールマウスのＥＢＶ陰性リンパ肉腫の切片、（Ｂ）コントロールマウスのＥＢＶ陽性リンパ肉腫の切片、（Ｃ）新規抗腫瘍ポリペプチド１治療マウスのＥＢＶ陰性リンパ肉腫の切片、（Ｄ）新規抗腫瘍ポリペプチド１治療マウスのＥＢＶ陽性リンパ肉腫の切片。

【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４０】
実験３：実験１の４１日後に、昆明マウスの新たな一群を、コントロールグループ、レボフロキサシンのグループ、およびセフトリアキソンナトリウムのグループへとグループ分けする。黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループおよび黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ由来の生き残ったマウスは、緑膿菌に対するポリペプチド２のグループおよび緑膿菌に対するポリペプチド１のグループへとグループ分けする。

マウスに、致死量の多剤耐性緑膿菌（四川大学華西医院実験医学科からの臨床分離株１３５７８）を腹腔内注射する。１時間の後、

コントロールグループに、０．５ｍｌの０．３Ｍ　ＮａＣｌ＋５０ｍＭホウ酸緩衝液を、尾静脈を介して１回注射する；

レボフロキサシンのグループに、５ｍｇ／ｋｇのレボフロキサシンを、尾静脈を介して

１回注射する；
セフトリアキソンナトリウムのグループに、３０ｍｇ／ｋｇのセフトリアキソンナトリウムを、尾静脈を介して１回注射する；
緑膿菌に対するポリペプチド２のグループに、８ｍｇ／ｋｇの、緑膿菌に対するポリペプチド２を、尾静脈を介して１回注射する；
緑膿菌に対するポリペプチド１のグループに、８ｍｇ／ｋｇの、緑膿菌に対するポリペプチド１を、尾静脈を介して１回注射する。
コントロールグループおよびレボフロキサシンのグループのマウスは、すべて、１日以内に死亡。セフトリアキソンナトリウムのグループの２５％のマウスは生き残る。緑膿菌に対するポリペプチド２のグループの６０％のマウスは生き残る。緑膿菌に対するポリペプチド１のグループのマウスは、すべて、生き残る。宿主の抗体が、変異ポリペプチドの殺傷効果を、野生型ポリペプチドの殺傷効果よりも低く妨害をすることが示されている。
図３を参照のこと。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４２】
【表１】

	Ａ（黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループ／緑膿菌に対するポリペプチド２のグループ）	Ｂ（黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ／緑膿菌に対するポリペプチド１のグループ）
１（第１週）	０．９１４	０．２５４
２（第２週）	１．６２３	０．５９８
３（第７週）	２．９１１	１．４１
４（コントロール）	０．０６５	０．０６９

【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４５】
（実施例５）
ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫の細胞および他の腫瘍細胞に対する新規抗腫瘍ポリペプチドのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける殺傷効果についての多重蛍光染色の観察。
細胞培養の条件は実施例２と同じである。本実験では、次の３種類の細胞株を使用する：ＥＢウィルス陽性細胞株：ＡＴＣＣ　ＣＣＬ‐８６（Ｒａｊｉ細胞。バーキットリンパ腫細胞）；ＥＢウィルスおよびカポジ肉腫ウィルスが陽性の、４６歳のＡＩＤＳ男性患者由来の悪性リンパ肉腫細胞の株である、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ‐２２３０；ＥＢウィルス陰性細胞株：ＡＴＣＣ　ＣＲＬ‐１６４８（ＣＡ‐４６。アメリカのバーキットリンパ腫患者の腹水から単離された細胞）。
各株は、２つの試験グループにグループ分けする。グループ１は、新規抗腫瘍ポリペプチドを含有しない保存液（１０ｍＭＰＢ＋０．２Ｍ　ＮａＣｌリン酸緩衝液（ｐＨ７．４））が加えられたものである。グループ２は、２００μｇ／ｍｌの新規抗腫瘍ポリペプチ

ド１（プラスミドｐＣＨＣＥＢ１１）が加えられたものであり、保存液は１０ｍＭＰＢ＋０．２Ｍ　ＮａＣｌリン酸緩衝液、ｐＨ７．４である。

２４時間の培養後、培養ディッシュに、上述のグループの処理剤を加える。これらの処理剤の添加の７２時間後、この培養ディッシュに、２種類の蛍光色素、すなわち、２０μｌの５０μＭｏｌ　ＦＩＴＣと、２０μｌの５０ｕＭｏｌ　ローダミン１２３とを加え、１０分後、この培養ディッシュを顕微鏡オリンパスＩＸ‐７１下で観察する。

その結果、ＥＢＶ陰性腫瘍細胞の株は、新規抗腫瘍ポリペプチド１の処理後、よく成長すること、及び、ＥＢＶ陽性腫瘍細胞の株は、いずれの株も、大部分の細胞がミトコンドリアおよび核を消失し、膨張し、ネクローシスを起こし、それらのうちのほとんどが死んでいることを示す。実施例４のＰＩ染色実験と比較すると、明らかに、多重蛍光染色実験からの結果は、ＥＢウィルス陽性腫瘍細胞に対する新規抗腫瘍ポリペプチド１の強力な殺傷効果を、より明確に示しているようである。図６を参照のこと。

ＥＢＶ陰性腫瘍細胞はよく成長し、当該新規抗腫瘍ポリペプチドは、細胞膜中にＥＢウィルスの表面抗原を有しない細胞を攻撃しないことを意味する。本発明の新規抗腫瘍ポリペプチドは理想的なターゲティング特異性と安全性とを有している、とのことが示唆される。