

(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2010-526090

(P2010-526090A)

(43) 公表日 平成22年7月29日 (2010.7.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	
<b>C 0 7 K 14/47 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/47 Z N A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)		

(21) 出願番号 特願2010-506618 (P2010-506618)  
 (86) (22) 出願日 平成20年4月30日 (2008.4.30)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年12月28日 (2009.12.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/062092  
 (87) 国際公開番号 W02008/134752  
 (87) 国際公開日 平成20年11月6日 (2008.11.6)  
 (31) 優先権主張番号 60/914, 902  
 (32) 優先日 平成19年4月30日 (2007.4.30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 597025806  
 ワシントン・ユニバーシティ  
 Washington University School of Medicine  
 アメリカ合衆国63130ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100116311  
 弁理士 元山 忠行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療のための方法および組成物

## (57) 【要約】

癌を治療するために使用することができるオリゴペプチドを開示する。乳癌、皮膚癌、前立腺癌および多発性骨髄腫 (MM) を含む癌を治療する方法をさらに開示する。これらの方法は、M e s d 遺伝子によってコードされるポリペプチド、またはM e s d ポリペプチドの連続サブ配列を含んでなるオリゴペプチドの投与を含む。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

治療を必要とする対象において癌を治療する方法であって、全長 M e s d ポリペプチド、M e s d ポリペプチドと少なくとも 70 % の配列同一性を共有するポリペプチド、または 10 連続アミノ酸 ~ 約 70 連続アミノ酸を含んでなるオリゴペプチドからなる群から選択される治療有効量の M e s d ポリペプチドを対象に投与することを含んでなり、ここで、前記オリゴペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22 および配列番号 23、および配列番号 1 ~ 配列番号 32 に記載の少なくとも 1 つの配列と少なくとも 70 % の配列同一性を共有する配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなり、ここで、前記ポリペプチドまたは前記オリゴペプチドは、W n t リガンドの L R P 5 および / または L R P 6 受容体への結合をアンタゴナイズする、方法。

10

## 【請求項 2】

前記オリゴペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22 および配列番号 23 からなる群から選択される配列を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 3】

前記オリゴペプチドは、配列番号 15 および配列番号 21 からなる群から選択される配列を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 M e s d ポリペプチドは、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、および配列番号 32 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記癌は、乳癌、多発性骨髄腫 ( M M )、前立腺癌および皮膚癌からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 6】

治療を必要とする対象において癌を治療する方法であって、全長 M e s d ポリペプチド、M e s d ポリペプチドと少なくとも 70 % の配列同一性を共有するポリペプチド、または 10 連続アミノ酸 ~ 約 70 連続アミノ酸を含んでなるオリゴペプチドからなる群から選択される M e s d ポリペプチドをコードする配列に作動可能に連結されたプロモーターを含んでなる治療有効量の核酸ベクターを、対象に投与することを含んでなり、ここで、前記オリゴペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22 および配列番号 23、および配列番号 1 ~ 配列番号 38 に記載の少なくとも 1 つの配列と少なくとも 70 % の配列同一性を共有する配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなり、ここで、前記ポリペプチドまたは前記オリゴペプチドは、W n t リガンドの L R P 5 および / または L R P 6 受容体への結合をアンタゴナイズする、方法。

40

## 【請求項 7】

前記オリゴペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22 および配列番号 23 からなる群から選択される配列を含んでなる、請求項 6 に記載の方法。

50

**【請求項 8】**

前記オリゴペプチドは、配列番号 15 および配列番号 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記核酸ベクターは細胞に含まれる、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記癌は、乳癌、多発性骨髄腫（MM）、前立腺癌および皮膚癌からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 11】**

癌の治療のための医薬品の製造のために約 10 連続アミノ酸～約 70 連続アミノ酸までを含んでなるオリゴペプチドの使用であって、ここで、前記オリゴペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22 および配列番号 23、および配列番号 1～配列番号 38 に記載の少なくとも 1 つの配列と少なくとも 70 % の配列同一性を共有する配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなり、ここで、前記オリゴペプチドは、Wnt リガンドの LRP5 受容体および / または LRP6 受容体への結合をアンタゴナイズする、使用。

10

**【請求項 12】**

前記オリゴペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22 および配列番号 23 からなる群から選択される配列を含んでなる、請求項 11 に記載のオリゴペプチドの使用。

20

**【請求項 13】**

前記オリゴペプチドは、配列番号 15 および配列番号 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 11 に記載のオリゴペプチドの使用。

**【請求項 14】**

前記癌は、乳癌、および多発性骨髄腫（MM）、前立腺癌および皮膚癌からなる群から選択される、請求項 11 に記載のオリゴペプチドの使用。

30

**【請求項 15】**

癌の治療のための医薬品の製造のためのポリペプチドまたはオリゴペプチドの使用であって、ここで、前記ポリペプチドまたは前記オリゴペプチドは、表 I に記載の全長 MesD ポリペプチド、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31 および配列番号 32、および配列番号 1～配列番号 32 に記載の少なくとも 1 つの配列と少なくとも 70 % の配列同一性を共有する配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなり、ここで、前記ポリペプチドまたは前記オリゴペプチドは、Wnt リガンドの LRP5 受容体および / または LRP6 受容体への結合をアンタゴナイズする、使用。

40

**【請求項 16】**

前記癌は、乳癌、多発性骨髄腫（MM）、前立腺癌および皮膚癌からなる群から選択される、請求項 15 に記載のポリペプチドの使用。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は、2007 年 4 月 30 日に出版された特許文献 1（出典明示によってその全体が本明細書に引用される）に対し優先権を主張する。

50

## 【 0 0 0 2 】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、国立衛生研究所によって付与された R 0 1 - C A 1 0 0 5 2 0 に基づく政府の助成によって行われた。政府は、本発明において所定の権利を有する。

## 【 0 0 0 3 】

コンピュータ読み取り可能な形態で提出された資料の出典明示による援用

本開示物の一部である配列表は、本発明のヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列を含んでなるコンピュータ読み取り可能な形態および書面による配列表を含む。コンピュータ読み取り可能な形態で記録された配列表の情報は、書面による配列表と同一である。配列表の内容は、本明細書においてその全体が出典明示によって援用される。

10

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 4 】

W n t シグナル伝達経路の調節不全は、癌を生じ得る。W n t シグナル伝達経路のいくつかの成分は、ヒトの癌における癌遺伝子または腫瘍抑制因子(それぞれ、機能獲得または機能欠失変異を示す)として同定されている。W n t シグナル伝達の調節不全は、乳腺前駆細胞の過度の増殖を引き起こし得、そしてこれらの細胞を癌にし易くする。例えば、乳腺におけるW n t シグナル伝達経路の活性化は、乳癌発生を誘導するのに十分であり、そしてW n t - 1 の過剰発現は乳癌発生を生じ得る(非特許文献 1 ; 非特許文献 2 ; 非特許文献 3 )。

20

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 5 】

【 特許文献 1 】 米国仮出願第 6 0 / 9 1 4 , 9 0 2 号

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 6 】

【 非特許文献 1 】 Woodward, W.A., et al., J. Cell Sci. 118: 3585-2598, 2005

【 非特許文献 2 】 Liu, S., et al., Breast Cancer Res. 86-95, 2005

【 非特許文献 3 】 Howe, L.R. and Brown, A.M., Cancer Biol. Ther. 3: 36-41, 2004

## 【 発明の概要 】

## 【 課題を解決するための手段 】

30

## 【 0 0 0 7 】

癌の新たな治療に対する要求が満たされていないことを考慮して、本発明者らは、癌の進行を防止、減速または反転することができるオリゴペプチドを開発した。これらのオリゴペプチドは、m e s d 遺伝子(中胚葉発生に寄与することが同定されている遺伝子)、ならびにそのフラグメントによってコードされる全長ポリペプチドを含む。

## 【 0 0 0 8 】

本発明のいくつかの実施形態において、本発明者らは、オリゴペプチド(これらのそれぞれは、m e s d 遺伝子によってコードされるポリペプチドの連続配列を含んでなるか、本質的にそれらからなるか、またはそれらからなる)を開発した。これらの実施形態のオリゴペプチドは、全長m e s d ポリペプチドまたはそのフラグメントを含んでなり得る。これらの実施形態のオリゴペプチドは、約 1 0 連続アミノ酸長~約 7 0 連続アミノ酸長までか、または約 3 0 連続アミノ酸長~約 6 7 連続アミノ酸長までのアミノ酸配列を含んでなるか、本質的にそれらからなるか、またはそれらからなり得る。様々な態様において、オリゴペプチドは、以下から選択されるアミノ酸配列を含んでなるか、本質的にそれらからなるか、またはそれらからなり得る

40

C A D V T L E G Q V Y P G K G G G S K E K N Q T K Q E K G K K K K E R D L K P R  
A S K E D N R A G S K K E E L ( 配列番号 1 )、

C A D V T L E G Q V Y P G K G G G S Q E K N K T K Q E K G K K K K E G V P K S R  
A K V V Q E D N R A G N K R E E L ( 配列番号 2 )、

C A D V T L E G Q V Y P G K G G G S K E K N K T K Q D K G K K K K E G D L K S R

50

S S K E E N R A G N K R E D L ( 配列番号 3 ) 、  
 C A E V T L E G Q M Y P G K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A  
 S K E D N R A G S R R E D L ( 配列番号 4 ) 、  
 C A E V T L E G Q M Y P G K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D R K P R A  
 S K E D N R A G S R R E D L ( 配列番号 5 ) 、  
 C A D V T L E G Q V Y P G K G G G S K E K N K T K Q D K G K K K K E G D L K S R  
 S S K E D N R A R N K R E D L ( 配列番号 6 ) 、  
 C A E V T L E G Q M Y P G K G G G S K E K N K T K P E K G K K K E G D P K P R A  
 S K E D N R A G S R R E D L ( 配列番号 7 ) 、  
 C A D V T L E G Q V Y P G K G A D G S E K G R N K T K P E K A K K K K D A E K S 10  
 K S S H E D N R A N Q T E R G ( 配列番号 8 ) 、  
 K G G G S K E K N K ( 配列番号 9 ) 、  
 K G G G S Q E K N K ( 配列番号 10 ) 、  
 K G G G S K E K N Q ( 配列番号 11 ) 、  
 K G G G S K E R Q L ( 配列番号 12 ) 、  
 K G G G S K E K N K T K Q D K G K K K K E G D L K S R S S K E E N R ( 配列番号 1  
 3 ) 、  
 K G G G S K E K N K T K Q D K G K K K K E G D L K S R S S K E E N R A G N K ( 配  
 列番号 14 ) 、  
 Q V Y P G K G G G S K E K N K T K Q D K G K K K K E G D L K S R S S K E E N R A 20  
 G N K R E D L ( 配列番号 15 ) 、  
 K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A S K E D N R ( 配列番号 16  
 ) 、  
 K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D R K P R A S K E D N R ( 配列番号 17  
 ) 、  
 S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A S K E D N R A G S R R E D L ( 配列  
 番号 18 ) 、  
 S K E K N K T K P E K A K K K E G D R K P R A S K E D N R A G S R R E D L ( 配列  
 番号 19 ) 、  
 K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A S K E D N R A G S R ( 配列 30  
 番号 20 ) 、  
 K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D R K P R A S K E D N R A G S R ( 配列  
 番号 21 ) 、  
 Q M Y P G K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A S K E D N R A G  
 S R R E D L ( 配列番号 22 ) 、  
 E G D P K P R A S K E D N R A G S R ( 配列番号 23 ) 、  
 E G D R K P R A S K E D N R A G S R ( 配列番号 24 ) 、  
 T K P E K A K K K E G D P K P R A S ( 配列番号 25 ) 、  
 K G G G S K E K N K T K P E K A K K K ( 配列番号 26 ) 、  
 T K P E K A K K K E G D R K P R A S ( 配列番号 27 ) 、 40  
 K E D N R A G S R ( 配列番号 28 ) および  
 K E K N K T K P E K ( 配列番号 29 ) 。

# 【 0 0 0 9 】

いくつかの態様では、オリゴペプチドは、  
 K G G G S K E K N K T K Q D K G K K K K E G D L K S R S S K E E N R A G N K ( 配  
 列番号 14 ) 、  
 K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A S K E D N R A G S R ( 配列  
 番号 20 ) 、  
 K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D R K P R A S K E D N R A G S R ( 配列  
 番号 21 ) および

Q M Y P G K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A S K E D N R A G  
S R R E D L ( 配列番号 2 2 )

からなる群から選択される配列を含んでなり得る。

【 0 0 1 0 】

いくつかの態様では、オリゴペプチドは、

K G G G S K E K N K T K Q D K G K K K K E G D L K S R S S K E E N R A G N K ( 配  
列番号 1 4 )

K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A S K E D N R A G S R ( 配列  
番号 2 0 )、

K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D R K P R A S K E D N R A G S R ( 配列  
番号 2 1 ) および

Q M Y P G K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A S K E D N R A G  
S R R E D L ( 配列番号 2 2 )

からなる群から選択される配列から本質的になり得る。

【 0 0 1 1 】

いくつかの態様では、オリゴペプチドは、

K G G G S K E K N K T K Q D K G K K K K E G D L K S R S S K E E N R A G N K ( 配  
列番号 1 4 )

K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A S K E D N R A G S R ( 配列  
番号 2 0 )、

K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D R K P R A S K E D N R A G S R ( 配列  
番号 2 1 ) および

Q M Y P G K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A S K E D N R A G  
S R R E D L ( 配列番号 2 2 )

からなる群から選択される配列からなり得る。

【 0 0 1 2 】

いくつかの態様では、少なくとも約 1 0 連続アミノ酸長～約 7 0 連続アミノ酸長までで  
ある本発明のオリゴペプチドは、配列番号 1 ～配列番号 3 8 に記載の配列のオリゴペプ  
チドと比較して、1 つもしくは複数の位置で保存的アミノ酸置換を含むことができる。様々  
な態様において、本発明のオリゴペプチドは、W n t リガンドの L R P 5 受容体および /  
または L R P 6 受容体への結合をアンタゴナイズする生化学的特性を示すことができる。

【 0 0 1 3 】

本発明のさらなる態様は、ポリペプチドが、W n t リガンドの L R P 5 受容体および /  
または L R P 6 受容体への結合をアンタゴナイズする 1 つもしくは複数の保存的アミノ  
置換によって示されるポリペプチドのアミノ酸と 1 つもしくは複数のアミノ酸が異なる全  
長 m e s d ポリペプチドを含む。

【 0 0 1 4 】

関連する態様では、本発明はまた、配列番号 1 ～配列番号 3 2 に記載のポリペプチドと  
、少なくとも約 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7  
8 %、7 9 %の配列同一性、少なくとも約 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8  
5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %の配列同一性、または少なくとも 9 0 %、9 1 %  
、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %の配列同一性を有  
し、そしてまた W n t が L R P 5 受容体および / または L R P 6 受容体に結合するのを阻  
害するオリゴペプチドを含む。様々な実施形態において、オリゴペプチドは、実質的に純  
粋なオリゴペプチドまたは単離されたオリゴペプチドであり得、実質的に純粋なもしくは  
単離された全長 M e s d ポリペプチドまたはその一部、例えば、配列番号 1 ～配列番号 3  
2 に記載の配列を有するオリゴペプチド、または表 I に記載の全長 M e s d ポリペプチド  
もしくは配列番号 1 ～配列番号 3 2 に記載のオリゴペプチドの配列に関して、保存的置換  
を有するオリゴペプチドを含む。

【 0 0 1 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 I - 1

種 一般名	配列	配列 番号	受入 番号
<b>Bos taurus</b> (ウシ)	MAASGWARAAVIFLCACDLLLLLLLPPRAFATE GPAETPGEATPPPRKKKKDIRDYNDADMARLLE QWEKDDDIIEEGDLPEHKRPSAPIDFSQIDPGKP ESILKMTKKGKTLMMFVTVSGNPTEKETEEITS LWQGSLFNANYDVQRFIVGSDRAIFMLRDGGY AWEIKDFLVSQDRCADVTLEGQVYPGKGGGSK EKNQTKQEKGKKKKKERDLKPRASKEDNRAGSK KEEL	30	NM_0 01034 469.1
<b>Canis familiaris</b> (イヌ)	MGSHVLVTRVIGAESCWRLGLHLKKDDDIIEG DLPEHKRPSAPIDFSQIDPGRPESILKMTKKGKT LMMFVTVSGSPTEKETEEITSLWQGSLFNANYD VQRFIVGSDRAIFMLRDGSYAWEIKDFLVSQDR CADVTLEGQVYPGKGGGSQEKNKTKQEKGKK KKEGVPKSRAAKVVQEDNRAGNKREEL	31	XM_5 45883 .2
<b>Homo sapiens</b> (ヒト)	MAASRWARKAVVLLCASDLLLLLLLPPPGSCA AEGSPGTPDESTPPPRKKKKDIRDYNDADMARL LEQWEKDDDIIEEGDLPEHKRPSAPVDFSKIDPS KPESILKMTKKGKTLMMFVTVSGSPTEKETEEI TSLWQGSLFNANYDVQRFIVGSDRAIFMLRDGS YAWEIKDFLVGQDRCADVTLEGQVYPGKGGG SKEKNKTKQDKGKKKKEGDLKSRSSKEENRAG NKREDL	32	NM_0 15154
<b>Gallus gallus</b> (ニワトリ)	MAAAARWAALGLALWLCAAAHAEPEEGKRRA GPAKKKDIRDYNDADMARLLEQWEKDDDIIEG DLPEHKRPPAPIDFSKIDPGKPESILKLTKKGKT LMMFVTVSGNPTEKETEEITSLWQGSLFNANY DVQRFIVGSNRAIFMLRDGGYAWEIKDFLISQE RCADVTLEGQVYPGKGADGSEKGRNKTPEKA KKKKDAEKSSSHEDNRANQTERGSMTDT	33	NM_0 01030 551

10

20

30

【表 1 - 2】

表 1 - 2

種 一般名	配列	配列 番号	受入 番号
<i>Mus musculus</i> (ハツカネズミ)	MAASRWLRAVLLFLCASDLLLLPPPNAYAADT PGEATPPPRKKKDIRDYNDADMARLLEQWEKD DDIEEGDLPEHKRPSAPIDFSKLDPGKPESILKM TKKGKTLMMFVTVSGNPTEKETEEITSLWQGS LFNANYDVQRFIVGSDRAIFMLRDGSYAWEIKD FLVSQDRCAEVTLEGQMYPGKGGGSKEKNKT KPEKAKKKEGDRKPRASKEDNRAGSRREDL	34	NM_0 23403
<i>Pan troglodytes</i> (チンパンジー)	MAASRWARKAVVLLCASDLLLLLLLLPPPGSC AAEGSPGTPDESTPPPRKKKDIRDYNDADMAR LLEQWEKDDDDIEEGDLPEHKRPSAPVDFSKIDP SKPESILKMTKKKGKTLMMFVTVSGSPTEKETEE ITSLWQGS LFNANYDVQRFIVGSDRAIFMLRDG SYAWEIKDFLVGQDRCADVTLEGQVYPGKGG GSKEKNKTKQDKGKKKKEGDLKSRSSKEENRA GNKREDL	35	XM_5 10542 .1
<i>Pongo pygmaeus</i> (オランウータ ン)	MAASSWARKAVVLLCASDLLLLLLLLPPPGSCA AEASGTPDESTPPPRKKKDIRDYNDADMARL LEQWEKDDDDIEEGDLPEHKRPSAPVDFSKIDPS KPESILKMTKKKGKTLMMFVTVSGSPTEKETEEI TSLWQGS LFNANYDVQRFIVGSDRAIFMLRDG NYAWEIKDFLVGQDRCADVTLEGQVYPGKGG GSKEKNKTKQDKGKKKKEGDLKSRSSKEDNRA RNKREDL	36	CR86 0539
<i>Rattus norvegicus</i> (ドブネズミ)	MAASSWLRAVLLFLCASDLLLLSPPEAYATDTP GEAITPPRKKKDIRDYNDADMARLLEQWEKDD DIEEGDLPEHKRPSAPIDFSKLDPGKPESILKMT KKGKTLMMFVTISGNPTEKETEEITSLWQGS LFN NANYDVQRFIVGSDRAIFMLRDGSYAWEIKDFL VNQDRCAEVTLEGQMYPGKGGGSKEKNKTKP EKGKKKEGDPKPRASKEDNRAGSRREDL	37	NM_0 01008 345
<i>Xenopus laevis</i> (アフリカツメ ガエル)	MGRSRSRSPERRRERRRSRSASRERERRRRRSR SRERRRSRSRSPHRRRSRSPRRHRSSISPSRLKD RRDDDKKEPKESKGGGSKERQLAAEDLEGKTE EEIEMMKLMGFASFDSSKGGKTDGSVNAYAINV SQKRKYRQYMNRRKG GFNRPLDFVA	38	BC07 4295

10

20

30

40

## 【 0 0 1 7 】

様々な態様において、Me s dポリペプチドまたはその一部の配列は、少なくとも約10連続アミノ酸を含んでなり、そして非限定的な例として、脊椎動物、例えば、魚、爬虫類、両生類、例えば、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)、トリ、例えば、ニワトリ (*Gallus gallus*) または哺乳動物、例えば、ヒトもしくはげっ歯類、例えば、ハツカネズミ (*Mus musculus*) を含む任意の動物由来のme s d遺伝子によってコードされるポリペプチドまたはその一部の配列であり得、但し、配列は、Me s dポリペプチドまたは配列番号1～配列番号38に記載の少なくとも1

50

つの配列と、少なくとも約 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %の配列同一性、少なくとも約 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %の配列同一性、もしくは少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %の配列同一性を共有し、そしてまた、W n t が L R P 5 受容体および / または L R P 6 受容体、例えば、癌細胞上で発現される L R P 5 受容体および / または L R P 6 受容体に結合するのを阻害する。様々な態様において、M e s d ポリペプチドまたはオリゴペプチドは、少なくとも約 20 連続アミノ酸、少なくとも約 30 連続アミノ酸、または少なくとも 37 連続アミノ酸長であって、全長遺伝子までであり得る。様々な態様において、ポリペプチドまたはオリゴペプチドは、W n t リガンドの L R P 5 受容体および / または L R P 6 受容体への結合をアンタゴナイズする。

10

#### 【0018】

他の態様では、本発明は、W n t シグナル伝達が改変される癌の治療の方法を含む。一実施態様では、本方法は、癌と診断されたヒト患者のような治療を必要とする対象に、M e s d ポリペプチド、表 I に記載の治療有効量の M e s d ポリペプチド、または少なくとも約 10 連続アミノ酸長 ~ 約 70 連続アミノ酸長までであるオリゴペプチドを投与することを含んでなり、そして配列番号 1 ~ 配列番号 32 に記載の配列、あるいは少なくとも 10 連続アミノ酸長 ~ 約 70 連続アミノ酸長までを含んでなり、そして表 I に記載の M e s d ポリペプチドまたは配列番号 1 ~ 配列番号 38 に記載の少なくとも 1 つの配列と少なくとも約 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %の配列同一性、少なくとも約 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %の配列同一性、もしくは少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %の配列同一性を共有する配列を含んでなる。関連する態様では、癌は、ヒトまたはネズミ M e s d ポリペプチドのような哺乳動物の M e s d ポリペプチドを含む表 I に記載のポリペプチドのような全長 M e s d ポリペプチドを対象に投与することによって、治療することができる。

20

#### 【0019】

いくつかの実施形態において、癌は、ヒトまたはネズミ M e s d ポリペプチドのような哺乳動物 M e s d ポリペプチドを含む表 I に記載のポリペプチドのような全長 M e s d ポリペプチドと少なくとも約 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %の配列同一性、少なくとも約 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %の配列同一性、または少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %の配列同一性を共有するポリペプチドを対象に投与することによって、治療することができる。

30

#### 【0020】

他の様々な態様では、本発明者らは、M e s d ポリペプチド、または本明細書に記載の m e s d 遺伝子によってコードされるポリペプチド由来の配列を含んでなるオリゴペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結されるプロモーターを含んでなるベクターを開発した。様々な態様において、ベクターは、プラスミドまたはウイルスであり得、そしてプロモーターは、真核生物プロモーターまたは原核生物プロモーターであり得る。これらのベクターは、例えば、宿主細胞もしくは宿主微生物におけるインビトロでの発現によって、オリゴペプチドをエキスピボで発現させるために使用することができ、あるいは本発明に記載のベクターを投与することによって、または治療を必要とする対象に、ベクターを含んでなり、そして全長 M e s d ポリペプチドもしくは M e s d オリゴペプチドを産生する細胞を投与することなどによって、治療に使用することができる。そのような実施形態では、ベクターは、M e s d ポリペプチドまたはオリゴペプチドをコードするプロモーターおよび核酸に加えて、ポリペプチドまたはオリゴペプチドをコードするものに連結される配列を含んでなり得、そして当業者に公知のリーダーペプチド配列のような細胞からのポリペプチドまたはオリゴペプチド輸送もしくは分泌を促進するアミノ酸配列をコードする。

40

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【0021】

【図1】図1は、Mesdが、細胞表面において高い親和性で成熟LRP6に結合することを示す。

【図2】図2は、Mesdが、成熟LRP5およびLRP6に結合するが、LDLRファミリーの他のメンバーには有意には結合しないことを示す。

【図3】図3は、MesdのC-末端領域が、LRP6との相互作用に必要であることを示す。

【図4】図4は、MesdのC-末端領域が、LRP6結合性に必要かつ十分であることを示す。

【図5】図5は、Mesdのカルボキシ末端領域が、LRP6フォールディングに必要であることを示す。

【図6】図6は、LRP6が、構成的に活性なエンドサイトーシス受容体ではないことを示す。

【図7】図7は、LRP6が、制限されたレベルのMesd分解を示すことを示す。

【図8】図8は、39kDaの分化した分子シャペロン受容体関連タンパク質RAPがLRP6に結合し、そして部分的にMesd結合性と競合することを示す。

【図9】図9は、Mesdが、DKK1がLRP6に結合するのを阻害することを示す。

【図10】図10は、MesdポリペプチドまたはMesdオリゴペプチドが、両方ともLRP5に結合し、そしてDKK1のLRP5またはLRP6のいずれかへの結合を阻害することができることを示す。

【図11】図11は、TCF/LEF-lucレポーター構築物で安定にトランスフェクトされたHEK293細胞を、Wnt-3Aを伴わずに、またはWnt-3A+示されたインヒビター(Mesdおよび/またはDkk1)を伴って16時間、37℃で処理した結果を示す。Wntシグナル伝達は、生細胞イメージングシステムを使用して、ルシフェラーゼ活性を定量することによって測定した。

【図12】図12は、乳腺過形成を示すMMTV-LRP6トランスジェニックマウスを示す。MMTV-LRP6トランスジェニックマウスは、MMTVプロモーターによって駆動される乳腺上皮細胞におけるLRP6cDNAの過剰発現によって、作製した。14週齢のWT(パネルA、C)またはMMTV-LRP6処女マウス(パネルB、D)のいずれかの同腹仔由来の乳腺を、ホルマウント染色によって分析した。MMTV-LRP6マウスの乳腺過形成(低倍率視野のパネルBおよび高倍率視野のパネルD)に留意すること。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0022】

Wnt受容体は、腫瘍性タンパク質の候補であり、哺乳動物低密度リボタンパク質受容体(LDLR)関連タンパク質(LRP)ファミリーの2つのメンバー、LRP5およびLRP6の変異型は、最近、細胞培養においてWnt/-カテニンシグナル伝達を構成的に活性化することが可能であることが示されている。本知見は、MesdのようなLRP5およびLRP6特異的インヒビターを利用して、細胞表面においてWntシグナル伝達を阻害する。

## 【0023】

本明細書に記載の方法および組成物は、当業者に周知の実験技術を利用し、そしてSambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Spector, D. L. et al., Cells: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998; Harlow, E., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999、およびAusubel, F. M., et al., ed., Current Protocols in Molecular Biologyのような実験マニュアルにおいて見出すことができる。本明細書において開示する治療の薬学的組成物および方法について、剤形お

10

20

30

40

50

よび投与レジメンを、例えば、Remington: the Science and Practice of Pharmacy (Alfonso R. Gennaro ed. 19th ed. 1995); Hardman, J.G., et al., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, McGraw-Hill, 1996; および Rowe, R.C., et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, Fourth Edition, Pharmaceutical Press, 2003のような標準的な参考文献に記載の当業者に既知の標準的方法を使用して、決定することができる。

#### 【0024】

本発明者は、癌細胞が、改変されたWntシグナル伝達を示す、限定されないが、乳癌、多発性骨髄腫(MM)、前立腺癌および皮膚癌のような癌を含む癌を治療するために使用することができる実質的に純粋なオリゴペプチドを開示する。理論によって制限されることなく、本発明者は、Mesdポリペプチドが、Wntリガンドが(LDLR)関連タンパク質-5(LRP5)および(LDLR)関連タンパク質-6(LRP6)に結合するのを阻害することができることを見出した。従って、Mesdポリペプチドまたはその機能的フラグメントは、癌を治療するため、および2006年11月7日に出願されたUS Patent application 11/557,292に記載のように、骨の健康を増加するために使用することができる。理論によって制限されることなく、本発明者は、低密度リポタンパク質受容体(LDLR)関連タンパク質-5(LRP5)および(LDLR)関連タンパク質-6(LRP6)(両方ともLDLRファミリーのメンバーである)によるシグナル伝達は、細胞外Wntリガンドによる阻害に供されると考えられる。最近、LDLRファミリーのメンバーに対する分化したシャペロン(マウスではMesd(中胚葉発生)、そしてショウジョウバエ(Drosophila)ではBocaと呼ばれる)が同定された(Culi, J., Cell 112: 343-354, 2003; Hsieh, J.C., Cell 112: 355-367, 2003)この新たなシャペロンは、Wnt/Wgシグナル伝達経路のLRP5/LRP6共受容体のフォールディングに必要であるため、発見された。しかし、本発明者は、Mesdが、LRP5およびLRP6のフォールディングを仲介するだけではなく、それがまた、細胞表面において成熟LRP5またはLRP6に結合することが可能であり、そしてWntリガンドのようなりガンドの結合をアンタゴナイズすることを見出した。加えて、本発明者は、リガンド-結合アンタゴナイズ活性が、Mesdポリペプチドのカルボキシ末端領域由来のMesdのサブ配列を含んでなるオリゴペプチドにおいて見出されることを決定した。

#### 【0025】

本発明のオリゴペプチドは、約10連続アミノ酸~約70連続アミノ酸までを含んでなり、ここで、ペプチドは、配列番号9、配列番号10、配列番号11および配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる。配列は、限定されないが、ヒト、マウス、イヌ、ウシ、チンパンジー、オランウータンおよびラットのような多様な種のゲノムに含まれるmesd遺伝子によってコードされるMesdポリペプチド由来の配列を表す。本明細書において使用する用語「オリゴペプチド」は、ペプチド結合によって接続された少なくとも2つのアミノ酸を含んでなる分子を指し、そして用語「ポリペプチド」は、遺伝子、mRNAまたはcDNAによってコードされるような全長アミノ酸配列を含んでなる分子を指す。様々な実施形態では、本発明の実質的に純粋なオリゴペプチドは、少なくとも20または少なくとも30連続アミノ酸~約67アミノ酸までを含んでなり得る。本発明の配列を、表IIに示すが、これは、54~67連続アミノ酸のオリゴペプチド配列を示し、そして表IIIは、10~46アミノ酸のオリゴペプチド配列を示す。本発明のオリゴペプチドは、非限定的な例として、Merrifield固相合成、あるいは非限定的な例として、オリゴペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを合成し、そしてオリゴヌクレオチドをベクターに挿入するか、または制限酵素消化、リガーゼによるライゲーション、および/もしくはポリメラーゼ連鎖反応技術を使用してcDNAの一部をベクターにサブクローニングすることを含む分子クローニング法のような当業者に周知の標準的な技術を使用して、合成することができる。オリゴペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを含んでなるベクターを、トランスフェクションまたは形質転換によって細胞に挿入し、そして当業者に周知の方法を使用して、細胞において発現させることができる

。オリゴペプチドは、当業者に周知の標準的な技術によって、単離および／または精製することができる。

【 0 0 2 6 】

【表 2】

表 1 1

種 一般名	配列	配列 番号
Bos taurus (ウシ)	CADVTLEGQVYPGKGGGSKEKNQTKQEKGKKKKERD LKPRASKEDNRAGSKKEEL	1
Canis familiaris (イヌ)	CADVTLEGQVYPGKGGGSQEKNTKQEKGKKKKKEGV PKSRAKVQEDNRAGNKREEL	2
Homo sapiens (ヒト)	CADVTLEGQVYPGKGGGSKEKNKTKQDKGKKKKKEGD LKSRSSKEENRAGNKREDL	3
Mus musculus (ハツカネズミ)	CAEVTLEGQMYPGKGGGSKEKNKTKPEKAKKKKEGDPK PRASKEDNRAGSRREDL	4
Mus musculus (ハツカネズミ)	CAEVTLEGQMYPGKGGGSKEKNKTKPEKAKKKKEGDRK PRASKEDNRAGSRREDL	5
Pan troglodytes (チンパンジー)	CADVTLEGQVYPGKGGGSKEKNKTKQDKGKKKKKEGD LKSRSSKEENRAGNKREDL	3
Pongo pygmaeus (オランウータン)	CADVTLEGQVYPGKGGGSKEKNKTKQDKGKKKKKEGD LKSRSSKEDNRARNKREDL	6
Rattus norvegicus (ドブネズミ)	CAEVTLEGQMYPGKGGGSKEKNKTKPEKGKKKEGDPK PRASKEDNRAGSRREDL	7
Gallus gallus (ニワトリ)	CADVTLEGQVYPGKGADGSEKGRNKTPEKAKKKKDA EKSKSSHEDNRANQTERG	8

10

20

【 0 0 2 7 】

30

【表 3】

表 I I I

供給源	配列	配列 番号
Homo sapiens (ヒト)	KGGGSKEKNKTKQDKGKKKKEGDLKSRSSKEENR	13
Canis familiaris (イヌ)	KGGGSKEKNKTKQDKGKKKKEGDLKSRSSKEENR	13
Bos taurus (ウシ)	KGGGSKEKNKTKQDKGKKKKEGDLKSRSSKEENR	13
Xenopus laevis (アフリカツメガ エル)	KGGGSKEKNKTKQDKGKKKKEGDLKSRSSKEENR	13
Homo sapiens (ヒト)	KGGGSKEKNKTKQDKGKKKKEGDLKSRSSKEENRAGN K	14
Homo sapiens (ヒト)	QVYPGKG GGSKEKNKTKQDKGKKKKEGDLKSRSSKEE NRAGNKREDL	15
Mus musculus (ハツカネズミ)	KGGGSKEKNKTKQDKGKKKKEGDLKSRSSKEENR	13
Mus muscu (ハツカネズミ)	SKEKNKTKPEKAKKKEGDPKPRASKEDNRAGSRREDL	18
Mus musculus (ハツカネズミ)	SKEKNKTKPEKAKKKEGDRKPRASKEDNRAGSRREDL	19
Mus musculus (ハツカネズミ)	KGGGSKEKNKTKPEKAKKKEGDPKPRASKEDNRAGSR	20
Mus musculus (ハツカネズミ)	KGGGSKEKNKTKPEKAKKKEGDRKPRASKEDNRAGSR	21
Mus musculus (ハツカネズミ)	QMYPGKG GGSKEKNKTKPEKAKKKEGDPKPRASKEDN RAGSRREDL	22
Mus musculus (ハツカネズミ)	EGDPKPRASKEDNRAGSR	23
Mus musculus (ハツカネズミ)	EGDRKPRASKEDNRAGSR	24
Mus musculus (ハツカネズミ)	TKPEKAKKKEGDPKPRAS	25
Mus musculus (ハツカネズミ)	KGGGSKEKNKTKPEKAKKK	26
Mus musculus (ハツカネズミ)	TKPEKAKKKEGDRKPRAS	27
Mus musculus (ハツカネズミ)	KGGGSKEKNK	9
Mus musculus (ハツカネズミ)	KEDNRAGSR	28
Mus musculus (ハツカネズミ)	KEKNKTKPEK	29

10

20

30

40

保存的置換を含んでなる本発明のオリゴペプチドでは、そのような置換は、当該技術分野において規定されているような類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリー由来であり得る。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 $\beta$ -分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）ならびに芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。生来のアミノ酸配列内のアミノ酸に対する保存された置換基は、天然に存在するアミノ酸が属するファミリーの他のメンバーから選択することができる。

10

#### 【0029】

本発明のさらなる態様は、1つもしくは複数のアミノ酸の欠失もしくは挿入によって、本明細書に記載のポリペプチドまたはオリゴペプチド配列のアミノ酸と1つもしくは複数のアミノ酸が異なるポリペプチドおよびオリゴペプチドを含んでなる。

#### 【0030】

従って、本発明の実施形態では、オリゴペプチドは、約10アミノ酸長～67アミノ酸長までであり得る。配列は、表IIまたは表IIIに記載の任意の配列を含んでなり得、および/または配列番号1～配列番号38から選択される任意の配列を含み得る。さらに加えて、オリゴペプチドの配列は、配列番号1～配列番号38の少なくとも1つの配列と少なくとも70%の配列同一性、少なくとも80%の配列同一性、もしくは少なくとも90%の配列同一性を共有する配列であり得、そしてオリゴペプチドを、細胞膜に含まれるLRP5および/またはLRP6のようなLRP5および/またはLRP6と接触させる場合、成熟細胞表面タンパク質LRP5および/またはLRP6と、Wntリガンドのような細胞外リガンドとの結合をアンタゴナイズ、阻害または阻止する生化学的特性を有する。さらに加えて、オリゴペプチドの配列は、配列番号1～配列番号38の少なくとも1つの配列と少なくとも70%の配列同一性、少なくとも80%の配列同一性、または少なくとも90%の配列同一性を共有する配列であり得、そしてWntシグナル伝達をアンタゴナイズする生化学的特性をさらに有し得る。様々な実施形態において、保存的置換を、オリゴペプチド配列において行うことができる（例えば、イソロイシンのような異なる疎水性アミノ酸によるバリンのような疎水性アミノ酸の置換）。アミノ酸の保存的置換を同定および選択するための方法は、当業者に周知である（例えば、Pearson, W.R., Methods Enzymol. 266: 227-258, 1996を参照のこと）。

20

30

#### 【0031】

本発明の別の実施形態において、本発明者は、配列番号1～配列番号38から選択される配列を含んでなるオリゴペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターを含んでなる核酸ベクターを開示する。いくつかの態様では、オリゴペプチドまたはポリペプチド配列は、配列番号1～配列番号38の少なくとも1つと少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%の配列同一性、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%の配列同一性、または少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を共有する配列であり得る。これらの実施形態のプロモーターは、真核生物のプロモーター（即ち、哺乳動物細胞の真核細胞もしくは酵母細胞のような微生物真核細胞の環境において転写を支持することができるプロモーター）または原核生物プロモーター（即ち、細菌のような原核細胞の環境において転写を支持することができるプロモーター）であり得る。本発明のベクターに使用することができるプロモーターの非限定的な例として、アクチンプロモーター、酵母メタロチオネイン遺伝子由来のCUP1プロモーター、およびシミアンウイルス40（SV40）初期またはマウス2（I）-コラーゲン遺伝子由来のプロモーター・エンハンサーエレメント、ならびに大腸菌（E. coli）lacオペロンオペレーター/プロモ

40

50

クターが挙げられる。ベクターは、例えば、バキュロウイルスもしくはバクテリオファージのような例えば、プラスミドまたはウイルスであり得る。加えて、いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載のベクターを含んでなる細胞を包含する。ベクターを含んでなるすべての細胞は、ベクターのプロモーターが作動可能である細胞、例えば、*lac* オペロン/プロモーターを含んでなるプラスミドを有する大腸菌 (*E. coli*) 細胞、またはバキュロウイルスベクターを有する昆虫細胞であり得る。

#### 【0032】

様々な実施形態において、本発明は、治療に必要な対象において癌を治療する方法を含む。これらの実施形態の方法は、治療有効量の *Mesd* ポリペプチド、*Mesd* ポリペプチドと少なくとも70%の配列同一性、少なくとも80%の配列同一性、または少なくとも90%の配列同一性を共有するポリペプチド、または10連続アミノ酸～約70連続アミノ酸を含んでなるオリゴペプチドを対象に投与することを含み、ここで、オリゴペプチドは、配列番号1～配列番号38、および配列番号1～配列番号38に記載の少なくとも1つの配列と少なくとも70%の配列同一性、少なくとも80%の配列同一性、または少なくとも90%の配列同一性を共有する配列から選択されるアミノ酸配列を含んでなり、ここで、ポリペプチドまたはオリゴペプチドは、LRP5と接触する場合、WntリガンドのLRP5受容体および/またはLRP6受容体への結合をアンタゴナイズする。いくつかの態様では、癌は、乳癌および多発性骨髄腫 (MM)、前立腺癌および皮膚癌、またはこれらの特徴を有する任意の癌であり得る。これらの方法はまた、インビトロまたはエクスピボで細胞もしくは組織に適用することができる。加えて、いくつかの態様では、本方法はまた、上記のようなベクター、または本明細書に記載のオリゴペプチドをコードする核酸に作動可能に連結された真核生物のプロモーターを含んでなるベクターを含んでなるヒト細胞のようなベクターを含んでなる細胞を、治療を必要とする対象に投与することを含む。非限定的な例では、ヒト細胞は、ベクターで形質転換され、標準的な細胞培養技術を使用してインビトロで増殖させ、そしてドナーに戻される対象由来の細胞であり得る。

#### 【0033】

本発明の治療有効量のポリペプチド、オリゴペプチドまたはベクターは、Herfindal, G ourley and Hart, Williams and Wilkins, ed. Clinical Pharmacy and Therapeutics, Williams & Wilkins, 1988; Goodman, L.S. and Gilman, A., ed. The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw Hall; 2005; Kalant, H., and Roschlau, W.H.E., ed., Principles of Medical Pharmacology, Mosby, Incorporated. 1989; J.T. DiPiro, R.L. et al., ed. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, McGraw Hill Medical Publishing, 2005; Ascione, Principles of Scientific Literature Evaluation Critiquing Clinical Drug Trials, American Pharmacists Association, 2001; および Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 2005のような標準的な薬学テキストに見出されるような当該技術分野において周知の方法を使用して、決定することができる。

#### 【実施例】

#### 【0034】

以下の実施例は、本発明の非限定的な例示を提供する。実施例のいくつかは、本発明が機能し得る方法についての結論を含み得る一方、本発明者は、これらの結論に拘束されることを意図しないが、可能性のあるもののみ説明を記載した。過去形の使用によって示さない限り、実施例の提示は、実験もしくは手順が、行われた、または行われなかったこと、あるいは結果が実際に得られた、または得られなかったことを意味しない。

#### 【0035】

##### 実施例 1

本実施例は、*Mesd* が、細胞表面において成熟 LRP6 に結合することを示す。

#### 【0036】

*Mesd* が、細胞表面において、LDLRファミリーのほとんどのメンバーに高い親和

性で結合するかどうかを調べるために、本発明者らは、LRP6 cDNAを安定にトランスフェクトした細胞で細胞表面リガンド結合実験を実施した。検出不可能なレベルのLRP6を発現するヒトHT1080細胞を、ウイルスベクター単独(pLNCX2)またはLRP6 cDNA (Li, Y., Oncogene 23: 9129-9135, 2004)を含有するベクターで形質導入し、そして<sup>125</sup>I-Mesd結合に使用した(図1A)。<sup>125</sup>I-Mesd (5 nM)は、LRP6を発現するHT1080細胞と共に4で2時間のインキュベーション後、最大結合に到達した(図1A)。過剰の非標識Mesd (500 nM)の含有により、この結合は完全に消失した。コントロール細胞(pLNCX2)では、有意な<sup>125</sup>I-Mesd結合は認められなかった。>6.4 nMの濃度で、Mesd特異的結合の飽和が認められた(図1B)。結合データのScatchard分析は、Mesdが、約3.3 nMのKdでLRP6に結合することを示した(図1C)。LRP6に対するMesdのこの親和性は、LRPに対するRAPの親和性に匹敵する(Iadonato, S.P., Biochem. J. 296: 867-875, 1993)。

10

20

30

40

50

#### 【0037】

図1において例示されるように、Mesdは、細胞表面において高い親和性で成熟LRP6に結合する。(A)LRP6形質導入HT1080細胞およびコントロール細胞への<sup>125</sup>I-Mesd (5 nM)結合の時間経過。アッセイは、500 nMのMesd (非特異的)の非存在(全体)または存在において、示した期間、4で行った。(B)LRP6形質導入HT1080細胞およびコントロール細胞への<sup>125</sup>I-Mesdの飽和結合。アッセイは、500 nMのMesdの非存在(全体)または存在(非特異的)において、示した濃度で3時間、4で行った。(C)BにおけるデータのScatchardプロット。すべての値は、エラーバーで示される標準偏差を有する3回反復決定の平均である。

#### 【0038】

本実施例およびすべての以後の実施例では、以下の材料および方法を使用した：

#### 【0039】

##### 材料

ヒト組み換えDKK1タンパク質およびマウス組み換えWnt3aタンパク質は、R&D Systems由来であった。ヒト組み換えRAPタンパク質を、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)発現ベクターにおいて発現させ、そして先に記載のように単離した(Bu et al., 1993)。モノクローナル抗Myc抗体9E10は、Roche由来であった。ヒトLRPに対するモノクローナル抗体8G1は、Research Diagnostics由来であった。モノクローナル抗HA抗体については、先に記載されている(Li, Y., J. Biol. Chem. 275: 17187-17194, 2000)。ポリクローナルウサギ抗LDLRを、組み換えヒトLDLR1-294フラグメントをウサギに免疫することによって産生させた。ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体およびECLシステムは、Amersham Life Science由来であった。全長ヒトLRP5 cDNAを含有するプラスミドpCDNA3.1C-Myc-hLRP5および全長ヒトLRP6 cDNAを含有するプラスミドpCS-Myc-hLRP6は、それぞれ、Cindy BartelsおよびChristof Niehrs由来であった。キャリアを含まないNal25Iは、NEN Life Science Productsから購入した。IODOGENはPierce由来であった。先に記載のIODOGENによる方法を使用することによって、タンパク質をヨウ素化した(Li, Y., J. Biol. Chem. 275: 17187-17194, 2000)。

#### 【0040】

##### 細胞株および細胞培養

LRP6形質導入HT1080細胞およびコントロール細胞については、先に記載されており(Li et al., 2004)、これを、10%ウシ胎児血清および350 g/mlのG418を含有するDMEM培地において培養した。ヒトLDLR関連タンパク質(LRP)ミニレセプターmLRP4によって安定にトランスフェクトされたLRP-null C

HO細胞、mLRP4末端変異mLRP4末端欠失(細胞質側末端を有さないmLRP4)、ヒトLDLR関連タンパク質1B(LRP1B)ミニレセプターmLRP1B4、ヒトVLDLR、またはヒトアポER2については、先に記載されており(Li, Y., J. Biol. Chem. 275: 17187-17194, 2000; Li et al., 2001; Liu et al., 2001)そして、10%ウシ胎児血清および350 µg/mlのG418を含有するHamのF-12培地において培養した。LRPおよび/またはLDLR欠損マウス胚から遺伝的に誘導されたマウス胚性繊維芽細胞(MEF)の組は、Joachim Herz, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallasから得た(Willnow, J. Cell Sci. 107: 719-726., 1994; Narita, M., J. Biochem. 132: 743-749, 2002)。これらは、MEF-1(WT)、MEF-2(LRP欠損)、MEF-3(LDLR欠損)、およびMEF-4(LRPおよびLDLR - 二重欠損)であり、そして10%ウシ胎児血清を含有するDMEMにおいて培養する。U87、MCF-7、およびヒト大動脈平滑筋細胞の培養条件については、先に記載されている(Li, Y., FEBS Lett. 555: 346-350, 2003)。HEK293細胞は、ATCC由来であり、そして10%ウシ胎児血清を含有するDMEMにおいて培養した。

#### 【0041】

組み換えMesdタンパク質の調製

全長マウスMesd cDNAを使用した。マウスMesdの野生型および変異型を、ポリメラーゼ連鎖反応によって作製し、そしてEcoRIおよびHindIII制限部位において発現ベクターpET-30a(+)(Novagen)にサブクロニングした。サブクロニングしたDNA配列の完全性を、DNA配列決定によって確認した。N末端においてポリヒスチジン金属結合末端を有する組み換え融合タンパク質を産生する大腸菌(E. coli)BL21(DE3)において、pET-30(+)-Mesdから組み換えタンパク質を過剰発現させ、そして製造者のプロトコルに従い、Novagen由来のHis-Bind Kitsにより精製した。すべての組み換えMesdタンパク質は、Mesdシグナルペプチドを欠如する。

#### 【0042】

ウエスタンブロッティング

LDLRファミリーメンバーの発現について調べるために、6ウェルプレートにおいて培養した細胞を、0.5 ml溶解緩衝液(1% Triton X 100および1 mMのPMSFを含有するリン酸緩衝食塩水)により、4℃で30分間、溶解した。等量のタンパク質を、非還元条件下でSDS-PAGEに供した。Immobilon-P膜へ移した後、第一抗体およびセイヨウワサビエルオキシダーゼコンジュゲート第二抗体との連続インキュベーションを、60分間、室温で行った。次いで、ECLシステムを使用して、免疫反応性タンパク質を検出した。

#### 【0043】

細胞質 - カテニンレベルを調べるために、6ウェルプレート中の細胞を、Mesdで、様々な濃度において、90分間、37℃で処理した。氷冷PBSで洗浄後、細胞を回収し、そしてガラス製Dounceホモジナイザーにおいて、100 mMのTris-HCl、pH 7.4、140 mMのNaCl、2 mMのDTT、2 mMのPMSF、および1×Complete(商標)プロテアーゼ阻害剤(500 µl/ウェル)からなる緩衝液中で均質化した。ホモジネートを10分間、500 gで遠心分離し、そして上清を、さらに、100,000 g、4℃で90分間、遠心分離した。得られる上清を細胞質画分と命名した。次いで、- カテニンレベルを、Cell Signaling Technology製の- カテニン特異的抗体を使用するウエスタンブロッティングによって調べた。ECLシステムを使用して、免疫反応性タンパク質を検出した。免疫応答性のバンドを示すフィルムを、Kodak Digital Science DC120 Zoom Digital Cameraで走査し、そしてバンドの強度を、Kodak Digital Science 1D Image Analysis Softwareで分析した。

10

20

30

40

50

## 【0044】

## ルシフェラーゼレポーターアッセイ

HEK293細胞を6ウェルプレートにプレート化した。各ウェルについて、0.1  $\mu$ gのTOP-FLASHTCFルシフェラーゼ構築物 (Upstate Biotechnology) を、0.8  $\mu$ gのMesd発現ベクター、0.8  $\mu$ gのMesd変異体発現ベクター、または空のベクターでトランスフェクトした。-ガラクトシダーゼ発現ベクター (Promega, Madison, WI) を、トランスフェクション効率の内部コントロールとして含めた。48時間後、細胞を溶解し、そしてルシフェラーゼおよび-ガラクトシダーゼ活性の両方を、酵素アッセイキット (Promega) によって決定した。Dual Luciferase Assayシステム (Promega) を使用するルミノメーターによって、ルシフェラーゼ活性を決定した。ルシフェラーゼ活性を、-ガラクトシダーゼの活性に対して規準化した。

10

## 【0045】

## リガンド結合および分解

細胞 ( $2 \times 10^5$ ) を、アッセイの1日前に、12ウェルディッシュに播種した。リガンド結合緩衝液 (異なる濃度の放射性リガンドを含む0.6% BSAを含有する最小Eagle培地、0.6 ml / ウェル) を、500 nM非標識RAPまたは500 nM非標識Mesdの非存在下または存在下で細胞単層に添加し、続いて、0~4時間、4でインキュベーションした。その後、非結合リガンドを含有するオーバーレイ緩衝液を取り出し、そして細胞単層を洗浄し、そして低SDS溶解緩衝液 (62.5 mMのTris-HCl、pH 6.8、0.2% SDS、10% v / グリセロール) で溶解し、そして計数した。各細胞溶解物のタンパク質濃度を、リガンドを含有しないパラレルディッシュにおいて測定した。

20

## 【0046】

記載の方法 (Li, Y., J. Biol. Chem. 275: 17187-17194, 2000) を使用して、リガンド分解を実施した。簡単に説明すると、 $2 \times 10^5$  個の細胞を、アッセイの1日前に、12ウェルディッシュに播種した。予め加温したアッセイ緩衝液 (放射性リガンドを含む0.6% BSAを含有する最小Eagle培地、0.6 ml / ウェル) を、500 nM非標識RAPまたは500 nM Mesdの非存在下または存在下で細胞単層に添加し、続いて、4時間、37でインキュベーションした。その後、培地重層細胞単層を取り出し、そしてBSAを10 mg / mlまで、そしてトリクロロ酢酸を20%まで添加することによってタンパク質を沈殿させた。放射性リガンドの分解を、20%トリクロロ酢酸に可溶性である重層培地における放射性フラグメントの出現として定義した。エンドサイトーシスLRP6形質導入HT1080細胞の動態解析を、 $2 \times 10^5$  個の細胞 / ウェルの密度で12ウェルプレートにプレート化し、そして1晩培養後、使用した。細胞を、氷冷アッセイ緩衝液 (0.6% BSAを含有する最小Eagle培地) で2回濯ぎ、そして $^{125}$ I-抗HA IgGを、1 nM最終濃度で冷アッセイ緩衝液 (0.5 ml / ウェル) に添加した。 $^{125}$ I-抗HA IgGの結合を、4で90分間、穏やかに振盪させながら行った。非結合 $^{125}$ I-抗HA IgGを、冷アッセイ緩衝液で細胞単層を3回洗浄することによって取り出した。氷冷停止 / ストリッピング溶液 (0.2 M酢酸、pH 2.6、0.1 MのNaCl) を、加温を伴わずに1組のプレートに添加し、そして氷上で保持した。次いで、残りのプレートを37の水浴に置き、そして予め37に加温した0.5 mlアッセイ緩衝液を迅速に細胞単層に添加して、内在化を開始した。各時間ポイント後、プレートを迅速に氷上に置き、そしてアッセイ緩衝液を冷停止 / ストリッピング溶液と置き換えた。細胞表面上に保持される $^{125}$ I-抗HA IgGを、細胞単層と冷停止 / ストリッピング溶液との全体で20分間 (10分間について0.75 ml、2回) のインキュベーションによって剥がし、そして計数した。次いで、細胞単層を低SDS溶解緩衝液で可溶化し、そして計数した。 $^{125}$ I-抗HA IgGの合計内在化させ、そして各アッセイ後の細胞表面上の残りを、最大潜在的内在化として使用した。各時間ポイント後に内在化された $^{125}$ I-抗HA IgGの画分を、計算し、そしてプロットした。

30

40

50

## 【0047】

細胞表面DKK1結合および免疫検出

ヒトDKK1 cDNA (クローンMGC: 868, IMAGE: 3508222) を、Invitrogenから入手し、そしてpcDNA3 (EcoRI/XbaI) にサブクローニングした。免疫検出を容易にするために、c-MycエピトープをC末端に付くめた。サブクローニングされたDNA配列の完全性をDNA配列決定によって確認した。ヒトDKK1 - 馴化培地を、無血清培地におけるpcDNA DKK1 - MycによるHEK293細胞の一過性トランスフェクションによって生成し、そしてLRP6形質導入HT1080細胞およびコントロール細胞に、室温で60分間、1 μMのMesdの非存在または存在下で結合させた。次いで、細胞を、4%パラホルムアルデヒドに固定し、抗Mycモノクローナル抗体で標識し、そしてAlexa - 488ヤギ抗マウスIgGで検出した。免疫蛍光を、レーザ走査共焦点顕微鏡 (Olympus Fluoview 500) で検出した。

10

## 【0048】

実施例2

本実施例は、Mesdが成熟LRP5 AND LRP6に結合するが、しかし、LDLRファミリーの他のメンバーには有意には結合しないことを示す。

## 【0049】

Mesdが、LDLRファミリーの他のメンバーに結合するかどうかを決定するために、LDLRファミリーの異なるメンバーを発現する4つの細胞のグループで、<sup>125</sup>I - Mesd結合分析を実施した (図2)。第1の実験では、HEK293細胞を、LDLR、LRP5、LRP6のcDNAまたは空のpcDNA3ベクターで一過的にトランスフェクトした。第2の実験では、LRP-nullチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を、LRPミニレセプターmLRP4、LRP1BミニレセプターmLRP1B4、アポER2、VLDLR、または空のpcDNA3ベクターで安定的にトランスフェクトした (Li, Y., J. Biol. Chem. 275: 17187-17194, 2000; Li, Y., J. Biol. Chem. 276: 18000-18006, 2001; Liu, C.X., J. Biol. Chem. 276: 28889-28896, 2001)。mLRP4は、リガンド - 結合反復の4つのクラスターおよび受容体のC末端全体を含む全長LRPの残基3274 ~ 4525からなる。mLRP1B4は、リガンド結合反復の4つのクラスターおよび受容体のC末端全体を含む全長LRP1Bの残基3276 ~ 4599からなる。mLRP4およびmLRP1B4は、それぞれ、LRPおよびLRP1Bの機能および輸送を模倣する。第3の実験では、野生型マウス胚性線維芽細胞およびLDLR、LRP、または両方の遺伝子欠損を有するマウス胚性線維芽細胞 (Willnow, T.E., J. Cell Sci. 107: 719-726, 1994; Narita, J. Biochem. 132: 743-749, 2002) を使用した。第4の実験では、ヒト乳癌細胞株MCF-7、ヒト神経膠芽腫細胞株U87、およびヒト大動脈平滑筋細胞 (SMC) を使用した。MCF-7細胞は、検出不可能なレベルでLRPを発現するが、一方、U87細胞およびSMCは、豊富なLRPを発現する (Li, Y., FEBS Lett. 555: 346-350, 2003)。興味深いことに、これらの受容体が匹敵するレベルで発現される場合、試験したLDLRファミリーのメンバーのうち、LRP6と比較してレベルが低いにもかかわらず、LRP5のみが、特異的にMesdに結合する (図2A)。CHOおよびMEF細胞において試験した場合、MesdがLRPに結合することが示唆される (図2B、C) が、U87またはSMC (これらの両方とも豊富なLRPを発現する) への特異的Mesdは最小であった (図2D)。従って、CHOおよびMEF細胞へのMesdの特異的結合は、これらの細胞における内因性LRP5 / LRP6に反映し得る。

20

30

40

## 【0050】

図2に例示されるように、Mesdは、成熟LRP5およびLRP6に結合するが、LDLRファミリーの他のメンバーには有意には結合しない。(A) ヒトHA - 標的化LDLR、Myc - 標的化LRP5、Myc - 標的化LRP6またはコントロールベクターを一過的にトランスフェクトされたHEK293細胞への<sup>125</sup>I - Mesd (5 nM) の

50

結合。下のパネル、LDLR、LRP5およびLRP6の発現についてのウエスタンブロット分析。等量の細胞溶解物を、各レーンに適用した。(B)LRPミニレセプターmLRP4、LRP1BミニレセプターmLRP1B4、VLDLR、アポER2または空のpcDNA3ベクターのみを安定的にトランスフェクトされたLRP-nullCHO細胞への<sup>125</sup>I-Mesd(5nM)の結合。(C)野生型マウス胚性線維芽細胞(MEF-1)またはLRP(MEF-2)、LDLR(MEF-3)または両方(MEF-4)を遺伝的に欠損するMEF細胞株への<sup>125</sup>I-Mesd(5nM)の結合。下のパネル、MEF細胞株におけるLRPおよびLDLR発現のウエスタンブロット分析。(D)ヒト乳癌および多発性骨髄腫(MM)細胞株MCF-7、ヒト神経膠芽腫細胞株U87およびヒト大動脈平滑筋細胞(SMC)への<sup>125</sup>I-Mesd(5nM)の結合。下のパネル、これらの細胞株におけるLRP発現のウエスタンブロット分析。アッセイは、4時間、4℃で、500nMのMesdの非存在(合計)または存在下で行った。値は、エラーバーで示す標準偏差を有する3回反復決定の平均である。

10

#### 【0051】

##### 実施例3

本実施例は、Mesdのカルボキシ末端領域がLRP6フォールディングに必要であることを示す。

#### 【0052】

Mesdが細胞表面において成熟LRP6に高親和性で結合するのに必要なMesd配列を分析するために、配列を、マウスMesdと、異なる種のその相同物との間で比較した。マウスMesdの最初の12アミノ酸が線虫シーノラディティス・エレガンス(Caenorhabditis elegans)およびシーノラディティス・ブリグサ(Caenorhabditis briggsae)において存在しないこと、ならびにマウスMesd、ならびにヒトMesdは、そのC末端における保存された小胞体残留シグナルの前に約30アミノ酸を超えるフラグメントを有することが見出された(Culi, J., Cell 112: 343-354, 2003; Hsieh, J.C., Cell 112: 355-367, 2003)。それ故、本発明者らは、N末端領域、MESD(12-195)、またはN末端およびC末端領域の両方、Mesd(12-155)のいずれか一方を欠如する2つの切断型Mesd変異体を作製した(図3A)。次いで、これらの変異体が細胞表面LRP6に結合する能力を評価した。マウスMesdのN末端の11アミノ酸のトランケーションは、LRP6結合に影響を及ぼさないが、最後の40アミノ酸のさらなるトランケーションは、LRP6結合を完全に廃止したことが見出された(図3B)。

20

30

#### 【0053】

##### 実施例4

本実施例は、Mesdの45アミノ酸が、成熟LRP6への結合に必要なかつ十分であることを示す。

#### 【0054】

本実施例では、C末端領域の最後の45アミノ酸を含有する切断型Mesd変異体を作製し(図3A)そして次いで、LRP6に対するその結合親和性について分析した。図4に示すように、MesdのC-末端領域は、LRP6結合に必要なかつ十分である。(A)LRP6形質導入HT1080細胞およびコントロール細胞への<sup>125</sup>I-Mesdおよびその変異体Mesd(150-195)(5nM)の結合分析。(B)LRP6形質導入されたHT1080細胞への<sup>125</sup>I-Mesdおよびその変異体Mesd(150-195)(5nM)の結合分析。アッセイは、3時間、4℃で、500nMのMesdまたはその変異体の非存在または存在下で行った。値は、エラーバーによって示される標準偏差を有する3回反復決定の平均である。

40

#### 【0055】

##### 実施例5

本実施例は、Mesdのカルボキシ末端領域がLRP6フォールディングに必要であることを示す。

50

## 【0056】

受容体フォールディングに対するこのMesdのC-末端領域の役割を決定するために、本発明者らは、C末端領域(アミノ酸156-191)を欠如するが、小胞体残留シグナル(REDL)を保持するMesd変異体(Mesd\_\_C)を作製した(図3A)。次に、本発明者らは、LRP6フォールディングに対するMesd\_\_Cの潜在的役割を評価した。HEK293細胞を、コントロールベクターの同時トランスフェクションを伴うLRP6のcDNA、またはMesdもしくはMesd\_\_CのcDNAで一過的にトランスフェクトした。定常期レベルのLRP6を、抗MYC抗体を用いるウエスタンブロッティングによって分析した(図5A)。図に示すように、2つの型の受容体、即ち、ER型および変異型(複雑な糖改変を含有する)が、LRP6に認められた。Mesd同時発現(但し、Mesd\_\_C同時発現ではない)の存在下では、成熟型LRP6の量が有意に増加した(図5A)。図5Aでは、HEK293細胞を、示されたcDNAで一過的にトランスフェクトした。細胞溶解物を、還元条件下のSDS-PAGEで分析し、そして示した抗FLAGまたは抗HA抗体でウエスタンブロットした。

10

## 【0057】

基準Wntシグナル伝達の活性化は、-カテニンの安定下、ならびにリンパ球増強因子(LEF)-1およびT細胞因子(TCF)を含む遺伝子転写から転写調節因子への調節をもたらす。TOP-FLASHルシフェラーゼレポーターは、TCF-結合部位を含有し、そして-カテニン/TCF複合体によって直接活性化され得る(Korinek et al., 1997)。LRP6は、細胞表面受容体であり、そして成熟受容体のみが、細胞表面に到達し、そしてWntシグナル伝達をモジュレートすることができる(Cong et al., 2004)。次に、本発明者らは、HEK293細胞においてTOP-FLASHルシフェラーゼレポーターアッセイを使用して、Wntシグナル伝達に対するMesd\_\_Cの効果を調べた。予想どおり、Mesd同時発現(但し、Mesd\_\_C同時発現)は、TCF/LEF転写活性を有意に増強した(図5B)。図5Bでは、HEK293細胞を、LRP6、MESD、Mesd\_\_Cまたは空のpcDNA3ベクターおよびTCF/LEF転写活性レポータープラスミド(TOP-FLASH)で同時トランスフェクトした。ルシフェラーゼ活性を、トランスフェクションの48時間後に測定した。値は、エラーバーで示される標準偏差を有する3回反復決定の平均である。まとめると、これらの結果は、MesdのC-末端領域がLRP6フォールディングおよび細胞表面におけるそのシグナル伝達機能に必要であることを示唆する。

20

30

## 【0058】

## 実施例6

本実施例は、LRP6が構成的に活性なエンドサイトーシス受容体ではなく、そして制限されたレベルのMesd分解を仲介することを示す。

## 【0059】

形質膜とエンドサイトーシス区画との間を輸送する細胞表面受容体は、サイトーシスビヒクルへの十分な補給を可能にするそれらの細胞質側末端内にシグナルを含有する。多くの場合(例えば、LRPおよびLDLR)、これらのシグナルは、構成的に活性であり、そしてリガンド結合とは独立して、連続受容体エンドサイトーシスを仲介する。LRP6が構成的に活性なエンドサイトーシス受容体であるかどうかを調べるために、HA-標的化LRP6でトランスフェクトされたHT1080細胞による受容体エンドサイトーシスの動態解析を実施した。その内在化に対するLRP6リガンドの潜在的効果を排除するために、本発明者らは、LRP6エンドサイトーシスアッセイに<sup>125</sup>I-抗HA-IgGを利用した。HA-標的化LRP6への<sup>125</sup>I-抗HA-IgGの結合は特異的であり、即ち、HT1080コントロール細胞への<sup>125</sup>I-抗HA-IgGの結合は、HT1080-LRP6細胞と比較して最小であった(図6A)。本発明者らは、<sup>125</sup>I-抗HA-IgGエンドサイトーシスのポジティブコントロールとしてHA-標的化LRPミニレセプターmLRP4およびネガティブコントロールとしてmLRP4末端欠失(細胞質側末端を欠くmLRP4)を使用した(Li, Y., J. Biol. Chem. 275: 17187-17194, 2

40

50

000)。

#### 【0060】

図6は、LRP6が構成的に活性なエンドサイトーシス受容体ではないことを示す。(A)細胞表面HA-標的化LRP6に結合する抗HA-IgG。LRP6形質導入HT1080細胞およびコントロール細胞への<sup>125</sup>I-抗HA-IgG(1nM)の結合を、90分間、4で行った。(B)LRP6エンドサイトーシス。LRP6形質導入HT1080細胞、mLRP4形質導入CHO細胞およびmLRP4末端欠失形質導入CHO細胞を、1nM<sup>125</sup>I-抗HA-IgGと共に、4で90分間、インキュベートし、次いで、37で示した期間、インキュベートした。内在化された抗HA-IgGの量を決定した。値は、示された標準偏差を有する3回反復決定の平均である。興味深いことに、本発明者らは、LRP6のエンドサイトーシス速度が極度に遅く、そしてmLRP4末端欠失の速度と識別できなかった(図6B)ことを見出したが、これは、LRP6自体が、エンドサイトーシスを開始することができないことを示す。これらのデータから、LRP6は、構成的に活性なエンドサイトーシス受容体ではなく、そして制限されたレベルのMesd分解を仲介すると結論された。

10

#### 【0061】

##### 実施例7

本実施例は、LRP6がMesd取り込みおよび分解をほとんど仲介しないことを示す。

#### 【0062】

LRP6仲介Mesd取り込みおよび分解を、図7に示す実験において調べた。(A)LRP6形質導入HT1080細胞およびコントロール細胞におけるLRP6仲介<sup>125</sup>I-Mesd(5nM)分解を、4時間、37、500nMのMesdの非存在または存在下で行った。(B)LRP6形質導入HT1080細胞およびコントロール細胞への<sup>125</sup>I-Mesd(5nM)結合を、4時間、4、500nMのMesd非存在または存在下で行った。値は、エラーバーで示す標準偏差を有する3回反復決定の平均である。図7に示すように、LRP6で形質導入したHT1080細胞は、37で4時間のインキュベーション後、320fmol/mg細胞のタンパク質のレベルの<sup>125</sup>I-Mesd分解を示したが、一方、4で4時間のインキュベーション後の<sup>125</sup>I-Mesd結合が、1320fmol/mg細胞のタンパク質という高いレベルで検出された。これらの結果は、細胞表面におけるLRP6へのMesd結合が、有意なエンドサイトーシスを誘発せず、そして結果的に、Mesd取り込みおよび分解をほとんど検出することができないことを示す。

20

30

#### 【0063】

##### 実施例8

本実施例は、細胞表面LRP6へのMesd結合は、細胞質-カテニンレベルを有意には変更しないことを示す。

#### 【0064】

-カテニンは、Wnt/-カテニンシグナル伝達経路において重要な分子である。

-カテニンの細胞質プールは、DNA結合タンパク質と相互作用し、そしてWntシグナル伝達に関与する(Hinck, L., J. Cell Biol. 125, 1327-1340 1994; Gottardi, C. J., J. Cell Biol. 153: 1049-1060, 2001; Klingelhofer, J., Oncogene 22, 1181-1188, 2003)。細胞表面LRP6へのMesd結合が、Wntシグナル伝達を直接調節するかどうかを決定するために、本発明者らは、HT1080-LRP6細胞における細胞質-カテニンレベルに対するMesd結合の効果について研究した。これらの実験では、LRP6形質導入HT1080細胞を、0.5~5nMのMesdで、2時間、37で処理し、そして細胞質-カテニンレベルを、抗-カテニン抗体を使用するウエスタンブロッティングによって調べた。本発明者らは、Mesd処理時の細胞質-カテニンレベルの有意な変化を見出さなかった(データ示さず)。結果は、細胞表面LRP6へのMesd結合が、Wntシグナル伝達を直接改変しないことを示す。

40

50

## 【0065】

## 実施例 9

本実施例は、RAPがLRP6に結合し、そして部分的にMesd結合に競合することを示す。

## 【0066】

受容体関連タンパク質(RAP)は、高い親和性でLRP、メガリン、VLDLRおよびアポER2に結合し、そしてより低い親和性でLDLRに結合する(Bu, G., Int. Rev. Cytol. 209, 79-116. 2001)。RAPおよびMesdが、受容体における同一の、重複するか、または異なる部位に結合するかどうかを決定するために、本発明者らは、これらの2つのシャペロンのLRP6を安定的に発現するHT1080細胞との結合および競合分析を実施した。図8において示されるように、RAPがLRP6にも結合するかどうかを決定するために、本発明者らは、4でLRP6を安定に発現するHT1080細胞とのRAP-結合分析を実施した。ベクターを単独で発現するコントロール細胞は、おそらく、細胞表面へパランスル酸プロテオグリカンおよびLDLRファミリーの内因性受容体によって仲介される中程度のレベルの細胞表面<sup>125</sup>I-RAP結合を示した。過剰の非標識RAP(500nM)(但し、Mesd(500nm)ではない)の存在は、この結合を完全に排除した(図8A)。コントロール細胞と比較して、LRP6発現HT1080細胞は、RAP結合の約20%の増加を示し、そしてこの増加は、過剰の非標識Mesdによって廃止された(図8A)。これらの結果は、RAPは、相対的に低い親和性で細胞表面LRP6に結合することを示唆する。

10

20

## 【0067】

本発明者らは、様々な濃度の過剰な非標識RAPまたは500nM非標識Mesdの存在下での細胞表面LRP6への5nMの<sup>125</sup>I-Mesd(5nM)の結合を実施した(図8B)。RAPは、500nMのRAPで達成される約60%阻害を有する用量依存的様式で、<sup>125</sup>I-Mesd結合を阻害したが、一方、同じ濃度の非標識Mesdは、<sup>125</sup>I-Mesd結合の>90%を阻害した(図8B)。<sup>125</sup>I-Mesd(5nM)取り込みおよび分解が実施された場合、500nM非標識Mesdは完全に、一方、500nM非標識RAPのみは、部分的に、<sup>125</sup>I-Mesd分解を阻害した(図8C)。まとめると、これらの結果は、MesdおよびRAPが、おそらく、異なるが、おそらく、LRP6上の隣接する部位に結合することを示唆する。細胞表面LRP6へのRAPのより低い親和性もまた、Mesd結合の阻害においてそのより低い効率に寄与し得る。

30

## 【0068】

図8Aでは、LRP6形質導入HT1080細胞およびコントロール細胞への<sup>125</sup>I-RAP(5nM)の結合を、4時間、4、500nMのRAP、または500nMのMesdの非存在(全体)もしくは存在下で行った。図8Bでは、LRP6形質導入HT1080細胞への<sup>125</sup>I-Mesd(5nM)の結合を、2時間、4、様々な濃度のRAPまたは500nMのMesd非存在(全体)もしくは存在下で行った。(C)LRP6-仲介<sup>125</sup>I-Mesd(5nM)分解を、4時間、37、500nMのMesdまたは500nMのRAPの非存在もしくは存在下で行った。値は、エラーバーによって示される標準偏差を有する3回反復決定の平均である。

40

## 【0069】

これらの実験は、RAPがLRP6に結合し、そして部分的にMesd結合に競合することを示す。

## 【0070】

## 実施例 10

本実施例は、Mesdが、細胞表面におけるLRP6へのリガンド結合をアンタゴナイズすることを示す。

## 【0071】

RAPは、LDLRファミリーのメンバーの受容体アンタゴニストであり、そしてLDLRファミリーメンバーの最も公知のリガンドの結合を阻害することが可能である。DK

50

K 1 は、L R P 6 特異的リガンドおよびアンタゴニストである。M e s d もまた、L R P 6 リガンド結合を阻止することが可能であるかどうかを決定するために、本発明者らは、免疫染色によって、細胞表面 D K K 1 結合を調べた。図 9 に例示されるように、M y c - 誘導性 D K K 1 は、L R P 6 細胞に結合する (図 9 B) が、コントロール細胞には結合しない (図 9 A)。M e s d の存在は、細胞表面における M y c - D K K 1 の L R P 6 への結合を完全に阻止した (図 9 C)。これらの実験では、無血清馴化培地が、ヒト M y c - D K K 1 の c D N A で一過的にトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞から回収され、そして 1  $\mu$  M の M e s d の非存在 (A、B) もしくは存在 (C) 下で、L R P 6 - 形質導入された H T 1 0 8 0 細胞 (B、C) およびコントロール細胞 (A) へ結合させた。細胞表面結合 M y c - 誘導性 D K K タンパク質を固定化し、そして抗 M y c 抗体による免疫蛍光染色によって検出した。(D) 細胞表面 L R P 6 への D K K 1 結合は、M e s d によって阻害される。L R P 6 形質導入 H T 1 0 8 0 細胞またはコントロール細胞への <sup>1 2 5</sup> I - D K K 1 (5 nM) の結合を、3 時間、4 、5 0 0 nM の R A P または 5 0 0 nM の M e s d の非存在 (全体) もしくは非存在下で行った。(E) L R P 6 仲介 D K K 1 分解は、M e s d によって阻害される。L R P 6 - 仲介 <sup>1 2 5</sup> I - M e s d (5 nM) 分解を、4 時間、3 7 、5 0 0 nM の R A P または 5 0 0 nM の M e s d の非存在もしくは存在下で行った。値は、エラーバーによって示される標準偏差を有する 3 回反復決定の平均である。バー、1 0  $\mu$  m。予想どおり、M y c - 誘導性 D K K 1 は、L R P 6 細胞に結合する (図 9 B) が、コントロール細胞には結合しない (図 9 A)。重要なことに、M e s d の存在は、細胞表面における M y c - D K K 1 の L R P 6 への結合を完全に阻止した (図 9 C)。

10

20

#### 【0072】

上記の結果を確認するために、本発明者らは、<sup>1 2 5</sup> I - D K K 1 の結合および分解について調べた。L R P 6 発現 H T 1 0 8 0 細胞は、コントロール細胞より有意に高いレベルの <sup>1 2 5</sup> I - D K K 1 結合および分解を示した。増加した D K K 1 結合および分解は、過剰の非標識 M e s d によって廃止されたが、過剰の非標識 R A P では廃止されなかった (図 9 D、E)。まとめると、これらの結果は、M e s d が、細胞表面における L R P 6 への D K K 1 結合を特異的に阻止することができることを示す。

#### 【0073】

上記の結果を確認するために、本発明者らは、<sup>1 2 5</sup> I - D K K 1 の結合および分解について調べた。L R P 6 発現 H T 1 0 8 0 細胞は、コントロール細胞より有意に高いレベルの <sup>1 2 5</sup> I - D K K 1 結合および分解を示した。増加した D K K 1 結合および分解は、過剰の非標識 M e s d によって廃止されたが、過剰の非標識 R A P では廃止されなかった (図 9 D、E)。まとめると、これらの結果は、M e s d が、細胞表面における L R P 6 への D K K 1 結合を特異的に阻止することができることを示す。

30

#### 【0074】

##### 実施例 1 1

本実施例は、L R P 5 および L R P 6 への M e s d ポリペプチドまたは M e s d オリゴペプチドの結合を示す。

#### 【0075】

L R P 5 または L R P 6 のいずれかへの M e s d ポリペプチドおよび M e s d オリゴペプチドの結合について調べるため、<sup>1 2 5</sup> I - M e s d または <sup>1 2 5</sup> I - D K K 1 を使用して、結合アッセイを実施した (図 10)。図 10 A は、野生型 M e s d および M e s d オリゴペプチド K G G G S K E K N K T K P E K A K K K E G D P K P R A S K E D N R A G S R (配列番号 20) の両方が、L R P 5 への <sup>1 2 5</sup> I - M e s d の結合を約 10 倍まで減少することができることを示す一方、図 10 C は、M e s d およびオリゴペプチドの両方が、L R P 6 への <sup>1 2 5</sup> I - M e s d の結合のなお大きな減少を示すことを示す。加えて、<sup>1 2 5</sup> I - D K K 1 を使用する結合アッセイでは、L R P 5 を、M e s d またはオリゴペプチドのいずれかと接触させた場合、L R P 5 への <sup>1 2 5</sup> I - D K K 1 の結合において小さいが、有意な減少が観察された (図 10 B) 一方、L R P 6 が標的であった場

40

50

合、2倍を超える<sup>1 2 5</sup> I - D K K 1の結合が観察された(図10D)。

【0076】

これらのデータは、Mesdポリペプチド、および配列番号19のオリゴペプチドの両方が、LRP5に結合し、そしてLRP5またはLRP6のいずれかへのDKK1の結合を阻害することができることを実証する。

【0077】

実施例12

本実施例は、HEK293細胞におけるWNTシグナル伝達の阻害を示す。

【0078】

本実施例では、上記のように調製し、そして図11に示される結果(即ち、ルシフェラーゼ活性)を有する表IVに示されるような処理に供される細胞におけるTCF/LEF-Lucアッセイを含んでなるHEK293細胞において、Wntシグナル伝達を測定した。

10

【0079】

【表4】

表IV

カラム	処理
1	L細胞コントロール培地
2	Wnt3A馴化培地
3	Wnt3A馴化培地 + 500nM Mesdタンパク質
4	Wnt3A馴化培地 + 500nM Mesd(150-195)ペプチド QMYPGKGGGSKEKNKTKPEKAKKKEGDPKPRASKEDNRAGSRREDL (配列番号22)
5	Wnt3A馴化培地 + 500nM Mesd WTペプチド KGGGSKEKNKTKPEKAKKKEGDRKPRASKEDNRAGSR (配列番号21)
6	Wnt3A馴化培地 + 500nM Mesdペプチド KGGGSKEKNKTKPEKAKKK (配列番号26) (マウス Mesd-13)
7	Wnt3A馴化培地 + 500nM Mesdペプチド EGDRKPRASKEDNRAGSR (配列番号24) (マウス Mesd-11)
8	Wnt3A馴化培地 + 500nM Mesdペプチド TKPEKAKKKEGDRKPRAS (配列番号27) (マウス Mesd-14)
9	Wnt3A馴化培地 + 500nM Mesdペプチド KGGGSKEKNK (配列番号9) (Mesd-4)
10	Wnt3A馴化培地 + 500nM Mesdペプチド KEDNRAGSR (配列番号28) (マウス Mesd-15)
11	Wnt3A馴化培地 + 500nM Mesdペプチド KEKNKTKPEK (配列番号29) (マウス Mesd-16)
12	Wnt3A馴化培地 + 10nMのDkk1タンパク質
13	Wnt3A馴化培地 + 10nMの細菌発現Dkk1
14	Wnt3A馴化培地 + 10nMのDkk1タンパク質 + Mesd WT
15	Wnt3A馴化培地 + 10nMのDkk1タンパク質 + Mesd-3

20

30

40

【0080】

データは、Mesdタンパク質、Mesd(150-195)ペプチド、およびMesd WTペプチドが、Wntシグナル伝達を中程度に阻害し、そしてそれらを、Wnt-

50

関連癌の治療に使用することができるが、Dkk1は、より強力なインヒビターであることを示す。Mesdはまた、Dkk1のインヒビターであるため、それは、二重の利益（即ち、癌の減少および骨の健康の増加）を有する。

【0081】

#### 実施例13

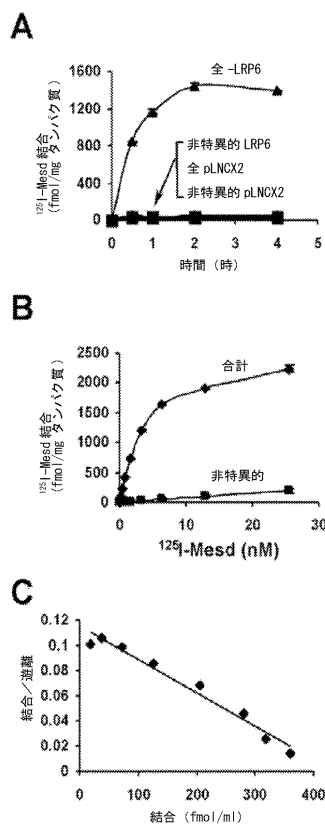
MMTV-LRP6構築物を作製するため、ヒトLRP6cDNAを、マウス乳腺腫瘍ウイルス長末端反復（MMTV-LTR）と、SV40大型T抗原イントロンおよびポリアデニル化シグナルとの間で、MMTV-SV40-Bsskベクターにクローニングした。注入前、構築物を直線化し、そして精製した。トランスジェニックマウスを、FVB/N近交系のバックグランドにおいて作製し、そして初代遺伝子導入動物を、導入遺伝子の存在について、PCR試験によって同定した。4つの初代動物を入手し、そしてそれらの子孫を、LRP6の発現、Wntシグナル伝達の程度、および乳腺形態学について、ホルマウント染色によって、特徴付けた。図12。

【0082】

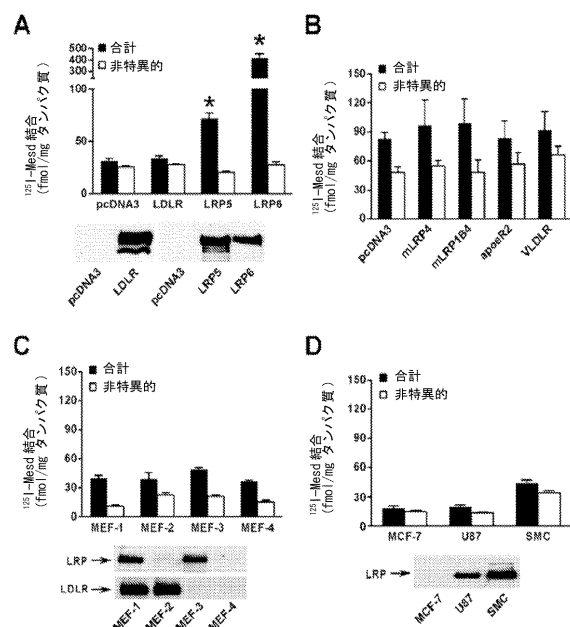
本出願において引用したすべての出版物、特許、特許出願および他の参考文献は、それらの全体が、出典明示によって本明細書に援用される。

10

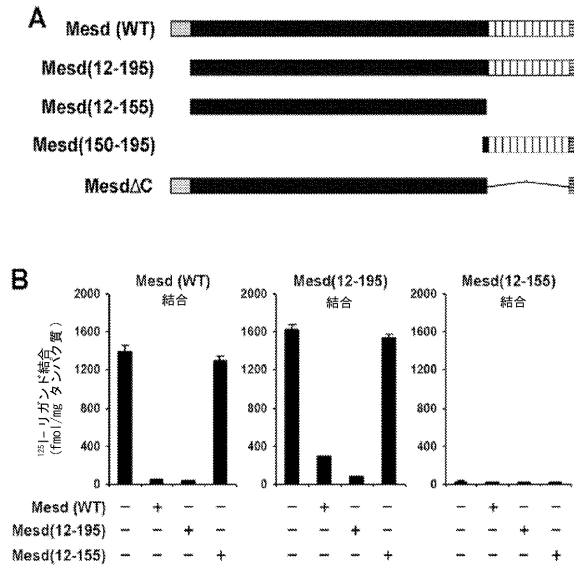
【図1】



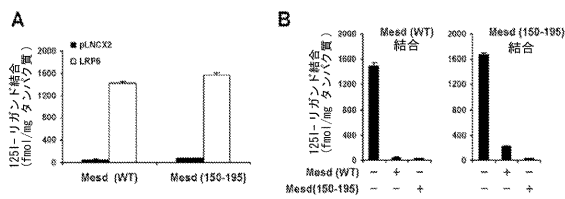
【図2】



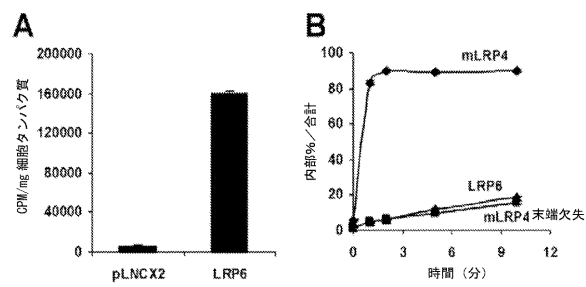
【 図 3 】



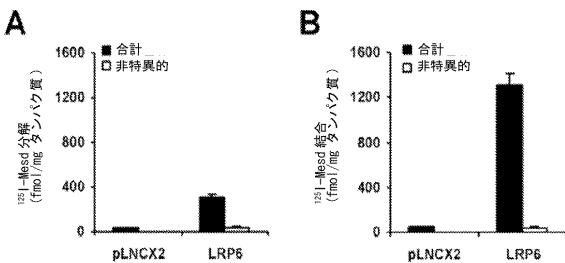
【 図 4 】



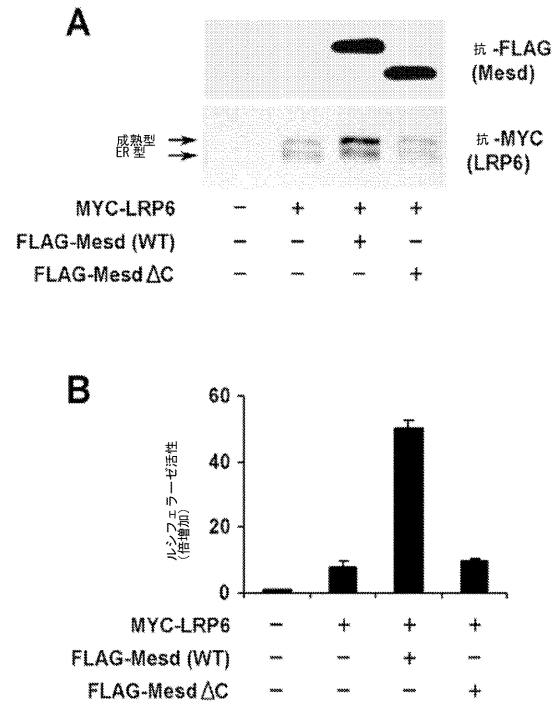
【 図 6 】



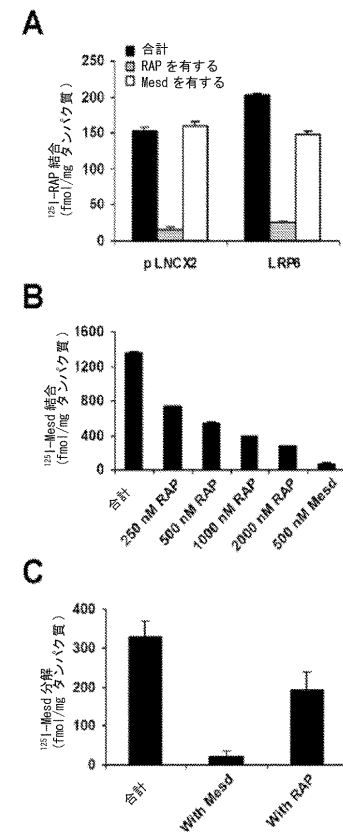
【 図 7 】



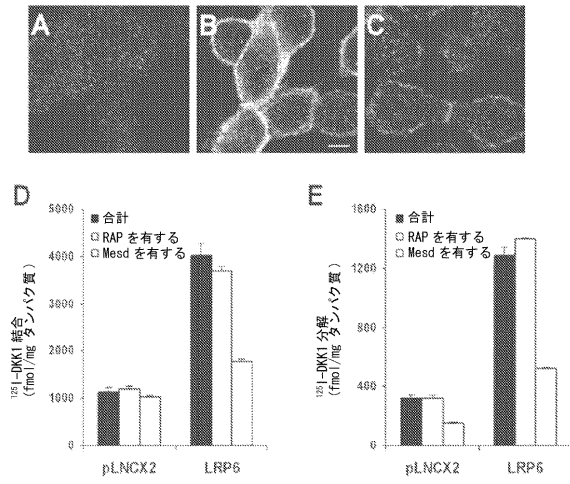
【 図 5 】



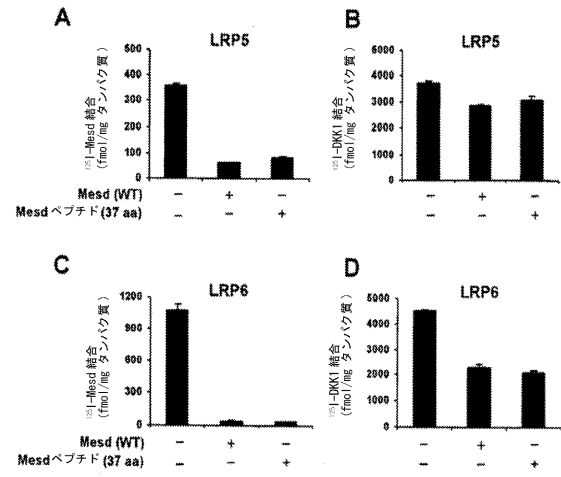
【 図 8 】



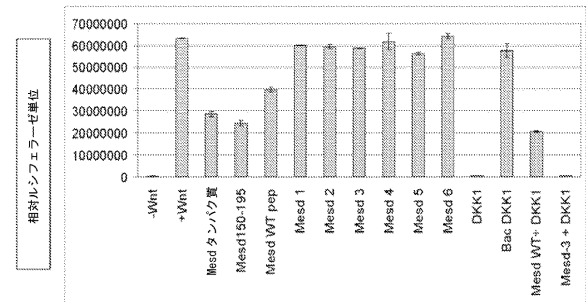
【図 9】



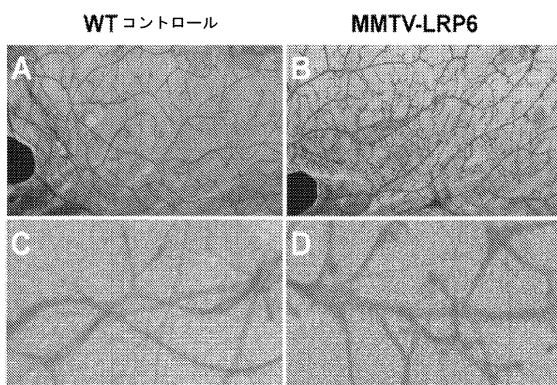
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【配列表】

2010526090000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成21年12月28日(2009.12.28)

【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】

2010526090000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/62092

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 38/00 (2008.04) USPC - 514/12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 514/12  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 530/324; 530/328 (text search)  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB) and Google Patent/Scholar: wnt, mesoderm development candidate, low density lipoprotein receptor related protein, breast cancer, prostate cancer, skin cancer GenCore: SEQ ID NO: 1		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2001/36440 A1 (Ruben et al.) 25 May 2001 (25.05.2001); pg 68, ln 5, 14; pg 104, ln 1-11; pg 138, ln 15-18, SEQ ID NO 146	1, 2, 5-7, 9-12, 14-16
Y	Li et al. Mesd binds to mature LDL-receptor-related protein-6 and antagonizes ligand binding. J Cell Sci 2005, 118: p5305, ; pg 5308, col 2; pg 5309 Fig. 3	1, 2, 5-7, 9-12, 14-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent 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 05 October 2008 (05.10.2008)		Date of mailing of the international search report <b>21 OCT 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSR: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/62092

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



on paper



in electronic form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in electronic form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/62092

**Box No. 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:
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 No. 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:

Group I, claims 1, 2, 5-7, 9-12, 14-16, limited to SEQ ID NO: 1.

Groups II+, claims 1-16. Should additional fees be paid, Applicant is invited to make an election with regard to SEQ ID NO to be searched.

The inventions listed as Groups I-II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I and II+ lack unity because the claimed oligopeptides do not have a common property or activity, and do not share a significant structural element that is an improvement over the prior art. In addition, WO 2001/36440 A1 to Ruben et al, in the context of diagnosing or treating proliferative disorders and cancer, teaches a protein therapy of an oligopeptide which is 86.7% identical to the claimed SEQ ID NO: 1 (Ruben et al, SEQ ID NO: 146, amino acids 144-198). Therefore, Groups I-II+ lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:  
claims 1, 2, 5-7, 9-12, 14-16, limited to SEQ ID NO: 1

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, 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

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100156100

弁理士 西野 満

(74)代理人 100156155

弁理士 水原 正弘

(72)発明者 グオジュン・ブ

アメリカ合衆国 6 3 1 0 7 ミズーリ州チェスターフィールド、キャニオン・ビュー・コート 1 8 2  
1 番

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA13 BA01 BA17 BA18 BA19 BA20 CA62 NA14 ZB262

ZC422

4H045 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19 BA20 CA40 EA20 FA74