

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2024-534231  
(P2024-534231A)

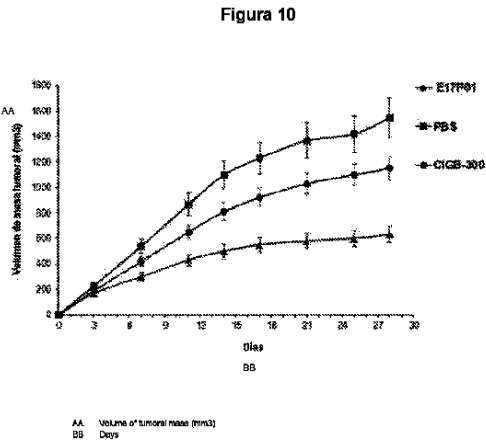
(43)公表日 令和6年9月18日(2024.9.18)

|                                          |                 |                          |       |               |           |
|------------------------------------------|-----------------|--------------------------|-------|---------------|-----------|
| (51)国際特許分類                               |                 | F I                      |       | テーマコード ( 参考 ) |           |
| C 0 7 K                                  | 7/06 (2006.01)  | C 0 7 K                  | 7/06  |               | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 K                                  | 38/08 (2019.01) | A 6 1 K                  | 38/08 | Z N A         | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 P                                  | 35/00 (2006.01) | A 6 1 P                  | 35/00 |               | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 P                                  | 35/02 (2006.01) | A 6 1 P                  | 35/02 |               |           |
| A 6 1 K                                  | 47/42 (2017.01) | A 6 1 K                  | 47/42 |               |           |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 ( 全31頁 ) 最終頁に続く      |                 |                          |       |               |           |
| (21)出願番号 特願2024-514574(P2024-514574)     |                 | (71)出願人 304012895        |       |               |           |
| (86)(22)出願日 令和4年7月7日(2022.7.7)           |                 | セントロ デ インジエニエリア ジエネ      |       |               |           |
| (85)翻訳文提出日 令和6年3月5日(2024.3.5)            |                 | テイカ イ バイオテクノロジー          |       |               |           |
| (86)国際出願番号 PCT/CU2022/050007             |                 | キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ      |       |               |           |
| (87)国際公開番号 WO2023/280330                 |                 | 、プラヤ、キューバナキャン、アベニュー      |       |               |           |
| (87)国際公開日 令和5年1月12日(2023.1.12)           |                 | ー 3 1 エントレ 1 5 8 イ 1 9 0 |       |               |           |
| (31)優先権主張番号 2021-0058                    |                 | (74)代理人 110000855        |       |               |           |
| (32)優先日 令和3年7月9日(2021.7.9)               |                 | 弁理士法人浅村特許事務所             |       |               |           |
| (33)優先権主張国・地域又は機関                        |                 | (72)発明者                  |       |               |           |
| キューバ(CU)                                 |                 | マスフォロール ゴンザレス、ヨルダンカ      |       |               |           |
| (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA |                 | キューバ共和国 1 0 6 0 0 ラ ハバナ  |       |               |           |
| ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(         |                 | 、セロ、エントレ サント トマス イ サ     |       |               |           |
| AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A         |                 | ン サルバドール、セペロ ヌメロ 1 5     |       |               |           |
| T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR       |                 | 9、アバルトメント 7              |       |               |           |
| ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,       |                 | (72)発明者                  |       |               |           |
| 最終頁に続く                                   |                 | ガライ ベレス、ヒルダ、エリサ          |       |               |           |
|                                          |                 | キューバ共和国 1 1 6 0 0 ラ ハバナ  |       |               |           |
|                                          |                 | 最終頁に続く                   |       |               |           |

(54)【発明の名称】 C K 2 媒介リン酸化を阻害する線状ペプチド及びそれを含む組成物

(57)【要約】

配列番号 4 5、配列番号 4 9、配列番号 5 0 及び配列番号 5 7 ~ 配列番号 6 2 として特定される配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、酵素カゼインキナーゼ 2 ( C K 2 ) によって媒介されるリン酸化を阻害する線状ペプチド、ならびに前記ペプチド及び細胞内透過性ペプチドを含むポリペプチド。これらの線状ペプチド又はポリペプチドの少なくとも 1 つと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。本発明はまた、薬物の製造のための前記ペプチド又はポリペプチドの使用、及び前記薬物が投与される固形又は液状腫瘍を治療する方法を開示する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 4 5、配列番号 4 9、配列番号 5 0 及び配列番号 5 7 ~ 配列番号 6 2 として特定される配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を特徴とする、酵素カゼインキナーゼ 2 ( C K 2 ) によって媒介されるリン酸化を阻害する線状ペプチド。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の酵素カゼインキナーゼ 2 ( C K 2 ) によって媒介されるリン酸化を阻害する線状ペプチドと、細胞内透過性ペプチドとを含むポリペプチド。

**【請求項 3】**

細胞内透過性ペプチドが、ヒト免疫不全ウイルスの T a t 1 タンパク質由来のペプチド 10  
である、請求項 2 に記載のポリペプチド。

**【請求項 4】**

細胞内透過性ペプチドが、配列番号 6 5 又は配列番号 6 6 として特定されるアミノ酸配列を有する、請求項 2 に記載のポリペプチド。

**【請求項 5】**

配列番号 3 5、配列番号 4 7、配列番号 4 8 及び配列番号 5 1 ~ 配列番号 5 6 として特定される配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 4 に記載のポリペプチド。

**【請求項 6】**

請求項 1 に記載のカゼインキナーゼ 2 ( C K 2 ) 媒介リン酸化を阻害する少なくとも 1 20  
つの線状ペプチド又は請求項 2 ~ 5 のいずれかに記載のポリペプチドと、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物。

**【請求項 7】**

全身、腫瘍内、経口、又は粘膜経路による投与のために製剤化される、請求項 6 に記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

固形又は液状腫瘍の治療に有用である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

**【請求項 9】**

医薬を製造するための、請求項 1 に記載のカゼインキナーゼ 2 ( C K 2 ) によって媒介されるリン酸化を阻害する線状ペプチド、又は請求項 2 ~ 5 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。 30

**【請求項 10】**

医薬が、固形又は液状腫瘍の治療に使用される、請求項 9 に記載の使用。

**【請求項 11】**

治療有効量の請求項 6 に記載の医薬組成物を投与することを含む、それを必要とする個体における固形又は液状腫瘍の治療方法。

**【請求項 12】**

固形腫瘍が、肺、子宮頸部、喉頭、膵臓又は膀胱のものである、請求項 11 に記載の治療方法。

**【請求項 13】**

液状腫瘍が、慢性リンパ性白血病、T 型急性リンパ芽球性白血病、又は急性骨髄性白血病である、請求項 11 に記載の治療方法。 40

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、分子薬理学及びヒト医学の分野に関する。特に、本発明は、基質上のホスホアクセプター部位との直接相互作用を介して、酵素カゼインキナーゼ 2 ( C K 2 ) によって媒介されるリン酸化事象を阻害する線状ペプチドを得ることに関する。それらの生物学的活性によって、本発明のペプチド及びポリペプチドは、固形腫瘍及び他の起源の異なるタイプの治療に有用である。 50

## 【背景技術】

## 【0002】

CK2は、細胞増殖の増加に関与するセリン/トレオニン酵素であり、その細胞内局在は、基本的に悪性転換の過程の核である(Tawfic S., et al., 2001, Histol. Histopathol. 16: 573-582)。したがって、この酵素は、魅力的な治療標的となる。(Duncan J. S., et al., 2008, Biochim. Biophys. Acta, 1784: 33-47)。

## 【0003】

CK2酵素媒介リン酸化事象は、4, 5, 6, 7-テトラブロモベンゾトリアゾール(TBB)(Pagano M. A., et al., 2004, J. Med. Chem., 47: 6239-6247)、アンチセンスオリゴヌクレオチド(Slaton J. W., et al., 2004, Mol. Cancer Res. 2: 712-720)及び酵素の触媒サブユニットと調節サブユニットとの間の相互作用を遮断するペプチド(Laudet B., et al., 2007, Biochem. J., 408: 363-373)に由来する化学化合物を使用することによって、実験腫瘍学において操作されている。化学化合物CX-4945は、酵素CK2の2つの触媒サブユニットを阻害し(Siddiqui-Jain A., et al., 2010, Cancer Res. 70: 10288-10298)、インビトロでの強力な細胞増殖阻害剤であり、5.5  $\mu$ Mの平均最大阻害濃度(IC<sub>50</sub>)を有する。このCK2酵素阻害剤のみがヒトで十分に評価され、第I相臨床試験で好ましい薬物動態及び安全性パラメータが記録された(Lim J. K. C., et al., 2010, Cancer Res. 70: 2763-2766)。このCK2酵素阻害剤のみがヒトで十分に評価され、第I相臨床試験で好ましい薬物動態及び安全性パラメータが記録された。(特許請求WO03/054002; Perea S. E., et al., 2004, Cancer Res., 64: 7127-7129)。

## 【0004】

CIGB-300ペプチドは、基質上のCK2ホスホアクセプター部位と相互作用する環状ペプチドと、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のTat1タンパク質由来の「細胞内浸透」ペプチドとを含むキメラ分子であり、細胞内でのその内在化を確保する。CIGB-300は、固形腫瘍の様々な系統、例えば肺、子宮頸部、喉頭(Perera Y., et al., 2014, Mol. Clin. Oncol., 2(6): 935-944)、ならびに液状腫瘍、例えば慢性リンパ性白血病(Martins L., et al., 2013, Oncotarget, 5(1): 258-263)及びT型急性リンパ芽球性白血病(Perera Y., et al., 2020, Cancers, 12, 1377)において、インビトロ及びインビボで抗増殖特性及びアポトーシス促進特性を示している。さらに、このペプチドは、第I/I相臨床試験で検証された臨床的利益の徴候を示した(Perea S., et al., 2011, Mol. Cell. Biochem., 356(1-2): 45-50)(Sarduy M., et al., 2015, Br. J. Cancer, 112: 1636-1643)。

## 【0005】

しかしながら、CIGB-300は、25アミノ酸のペプチドであり、その配列中にメチオニン及び分子内ジスルフィド結合を含有する。これらは、分子内の化学的不安定性の原因であり、液体又は凍結乾燥製剤及び安定性研究のいずれにおいても、製品開発のより高い段階での不一致の原因となり得る。(Frokjaer S. et al., 2000, Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins. Taylor & Francis)。このペプチドに存在する主な不純物は、メチオニンの酸化、及び分子間ジスルフィド結合の形成による凝集体(二量体及び三量体)の形成に起因する。(Garay H., et al., 2018, J. Pept. Sci. 24(6): e3081)。一方、システインを含有するペプチドの合成プロセスは、より厄介であり、(Albericio

10

20

30

40

50

F., et al., 2000, Fmoc solid phase peptide synthesis. A Practical Approach. Oxford University Press Inc, New York. Chapter 4, 77 - 114)、分子内ジスルフィド結合の形成は、製造プロセスに追加の工程を導入し、製造コストを増加させる。したがって、線状ペプチドタイプであり、よりサイズ及び構造的複雑性が減少した、合成がより単純かつ安価である、CK2酵素によって媒介されるリン酸化の阻害剤を、種々の腫瘍に対する治療の開発のために得ることは依然として興味深い。

#### 【発明の概要】

##### 【0006】

本発明は、CK2媒介リン酸化を阻害し、配列番号45、配列番号49、配列番号50、及び配列番号57～配列番号62として特定される配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する線状ペプチドを提供することによって、上記の問題を解決する。これらの配列を以下に示す：

##### 【表1】

|    |        |                  |
|----|--------|------------------|
| a) | 配列番号45 | RKRSRYWP         |
| b) | 配列番号49 | RKRWRYPWP        |
| c) | 配列番号50 | RKRSPYPWP        |
| d) | 配列番号57 | R(D-Lys)RWRYPWP  |
| e) | 配列番号58 | RK(D-Arg)WRYPWP  |
| f) | 配列番号59 | RKRWR(NMe-Tyr)WP |
| g) | 配列番号60 | R(D-Lys)RSPYPWP  |
| h) | 配列番号61 | RK(D-Arg)SPYPWP  |
| i) | 配列番号62 | RKRSP(NMe-Tyr)WP |

##### 【0007】

これらのペプチドは、それらが線状であり、サイズがより小さく、化学的により安定であるという点でCIGB-300とは異なる。それらは、それらの配列中にメチオニン又はシステインを有さず、それは利点である。加えて、生産的な観点から、獲得はより実現可能である。

##### 【0008】

配列番号45、配列番号49、配列番号50及び配列番号57～配列番号62として特定される線状ペプチドが、ヒトパピローマウイルス(HPV)-16(LNDSSSEED E I)のE7基質上のCK2酵素のホスホアクセプター部位と相互作用する能力、及びこのがんタンパク質のCK2媒介リン酸化を阻害する能力のために選択された。本発明の例に見られるように、これらの線状ペプチドは、ペプチドCIGB-300と同様の様式でE7タンパク質のCK2媒介リン酸化を阻害することができる。

##### 【0009】

内因性CK2基質に対する細胞内作用を達成するために、本発明のペプチドは、とりわけ、HIVのTat1タンパク質(Schwarze S. R., et al., 2000, Trends Pharmacol, 21:45-48)、la proteina VP22 del Virus Herpes Simples(Lindgreen M., et al., 2000, Trends Pharmacol Sci, 21:99-103)、Penetratin及びTransportan(Gariépy J., et al., 2001, Trends Biotech 19:21-28)などのタンパク質に属する「細胞内透過」のペプチドと化学的にコンジュゲートすることができる。

## 【 0 0 1 0 】

したがって、本発明はまた、配列番号 4 5、配列番号 4 9、配列番号 5 0、及び配列番号 5 7 ~ 配列番号 6 2 として特定される配列から選択されるアミノ酸配列を有する線状ペプチドと、1つの細胞透過性ペプチドとを含むポリペプチドを提供する。

## 【 0 0 1 1 】

本発明の一実施形態では、これらのポリペプチド中の細胞内透過性ペプチドは、H I V の T a t 1 タンパク質由来のペプチドである。その一実施形態では、細胞内透過性ペプチドは、配列番号 6 5、配列番号 6 6 いずれかとして特定されるアミノ酸配列を有する。

## 【 0 0 1 2 】

特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号 3 5、配列番号 4 7、配列番号 4 8 及び配列番号 5 1 ~ 配列番号 5 6 として特定される配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。これらの配列を以下に示す：

## 【 表 2 】

|    |        |                                             |
|----|--------|---------------------------------------------|
| a) | 配列番号35 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRYWP                   |
| b) | 配列番号47 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRWRYPWP                  |
| c) | 配列番号48 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRWSYWP                   |
| d) | 配列番号51 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-R(D-Lys)RWRYPWP   |
| e) | 配列番号52 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RK(D-Arg)WRYPWP   |
| f) | 配列番号53 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RKRW(RNMe-Tyr)WP  |
| g) | 配列番号54 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-R(D-Lys)RSYWP     |
| h) | 配列番号55 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RK(D-Arg)SYWP     |
| i) | 配列番号56 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RKRSW(RNMe-Tyr)WP |

## 【 0 0 1 3 】

これらのポリペプチドのほとんどは、様々ながん細胞株（肺、膀胱、喉頭、脾臓、及び白血病）において I C <sub>50</sub> が低いいため、ペプチド C I G B - 3 0 0 よりも活性である。ポリペプチドは、がん細胞の増殖に対して用量依存的効果をもたらすことができた。さらに、配列番号 3 5 として特定されるポリペプチドは、これらの細胞株において C I G B - 3 0 0 と同様の I C <sub>50</sub> 値を示す。しかしながら、それは、よりサイズが小さく、より化学的に安定した線状アミノ酸配列を有しており、治療用製品の開発を促進する生産的利点を有するので、優れていると考えられる。

## 【 0 0 1 4 】

本発明に記載されるペプチドの特定のために、1 6 0 0 万を超える種々のペプチド配列を含む、タイプ「1 ビーズ 1 化合物 (one-bead-one-compound)」による線状ペプチドのコンビナトリアルライブラリーを合成し、ピオチンで修飾された E 7 がんタンパク質の 2 8 ~ 3 8 領域を含む合成ペプチドを用いてスクリーニングを行った。質量分析を用いて、スクリーニングに陽性であった 9 つのビーズに含まれるペプチドの配列を指定した。配列番号 1 ~ 配列番号 9 と特定されたペプチドを化学合成し、それらが H P V - 1 6 の E 7 がんタンパク質における C K 2 媒介リン酸化を阻害できることを確認した。内在性 C K 2 基質に対する細胞内作用を達成するために、9 つのペプチドを含むポリペプチドを設計及び合成し、H I V T a t 1 タンパク質に対応する細胞内透過ペプチドを N 末端に付加した ( G R K K R R Q R R R P P Q、配列番号 6 5 として特定)。次に、N C I - H 1 2 5 株（非小細胞肺癌）の細胞増殖に対するこれら 9 つのポリペプチドの効果を評価した。評価した濃度の範囲では、いずれのポリペプチドも C I G B - 3 0 0 と同様の阻害値に達しなかった。それらのうち、配列番号 1 8 ~ 配列番号 2 0 として特定される 3 つのみが、試験した最高濃度で 2 0 % ~ 3 0 % の細胞増殖を阻害したので、それらの配列を修飾して、それらの生物学的活性を改善した。

## 【0015】

配列番号18～配列番号20として特定されたポリペプチドの生物学的活性に対するT r p取り込みの影響を評価するために、T r pポジショナルスキニングライブラリーを設計及び入手した。次に、T r pライブラリーで生成された24個のポリペプチド(配列番号21～配列番号44として特定される)のNCI-H125細胞株における抗増殖効果。24個のポリペプチドのうち、配列番号21、配列番号25、配列番号27、配列番号32、配列番号35及び配列番号43として特定された6個は、評価された最高濃度でペプチドCIGB-300と同様の細胞増殖阻害率を示した。NCI-H125及びAsPC-1(膵臓腺がん)細胞株において得られた、配列番号35として特定されるポリペプチド及びCIGB-300のIC<sub>50</sub>値は同等である。特に、配列番号35として特定されるポリペプチドは、より小さいサイズの線状配列であり、化学的により安定であり、生産上の利点を有するので、CIGB-300よりも優れていると考えられる。

10

## 【0016】

本発明において配列番号47及び配列番号48として特定される、CIGB-300ペプチドよりも活性な他の2つの線状ポリペプチドは、配列番号35として特定されるポリペプチドの3つの位置に第2のT r p残基を導入した試験の結果である。配列番号47及び配列番号48として特定されるポリペプチドは、膵臓がん(AsPC-1、PanC-1)及び急性骨髄性白血病(OCI-AML3)細胞株における細胞増殖を阻害する能力において、ペプチドCIGB-300よりも強力であり、使用した肺がん細胞株(NCI-H125)ではCIGB-300と同様であることが示された。

20

## 【0017】

配列番号47及び配列番号48として特定される配列に非天然アミノ酸を酵素分解を受けやすい部位に導入した結果、配列番号51～配列番号56として特定される、CIGB-300よりも活性な6個の新しい線状ポリペプチドが得られた。NCI-H125、Hep2C(喉頭がん)細胞株及び2つの膀胱がん株(MGH-U3及びMGH-U4)で抗増殖アッセイを行った。NCI-H125、Hep2C、MGH-U3及びMGH-U4細胞株で得られた配列番号51～配列番号56として特定されたペプチドのIC<sub>50</sub>値は、CIGB-300で得られたものよりも低く、それらがより強力であることを示している。膀胱がん系統(MGH-U3及びMGH-U4)の場合、CIGB-300と比較してIC<sub>50</sub>値が一桁低いことは非常に魅力的であり、なぜなら、それはわずかに調査されたニッチであり、分解されず、健康に大きな影響を与えるからである。非天然アミノ酸の導入を行って、プロテアーゼに対する安定性を高めた。驚くべきことに、CK2媒介リン酸化を阻害するこれらのポリペプチドの能力を増強することも可能であった。

30

## 【0018】

本発明はまた、配列番号45、配列番号49、配列番号50及び配列番号57～配列番号62として特定される配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つの線状ペプチド、又は配列番号35、配列番号47、配列番号48及び配列番号51～配列番号56として特定される配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドと、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。

40

## 【0019】

本発明の医薬組成物の一部を形成することができる賦形剤は、当業者に公知である。本発明の一実施形態では、医薬組成物は、全身、腫瘍内、経口、又は粘膜経路による投与のために製剤化される。本発明の一実施形態では、医薬組成物は、それを必要とする個体における固形又は液状腫瘍の治療に有用である。

## 【0020】

本発明の目的は、配列番号45、配列番号49、配列番号50及び配列番号57～配列番号62として特定される配列からなる群から選択される配列を有する線状ペプチド、又は配列番号35、配列番号47、配列番号48及び配列番号51～配列番号56として特定される配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの、薬物を製

50

造するための使用である。

【 0 0 2 1 】

本発明の一実施形態では、前記医薬は、固形又は液状腫瘍の治療に使用される。

【 0 0 2 2 】

別の態様において、本発明は、必要とする個体における固形又は液状腫瘍を治療する方法を開示し、方法は、治療有効量の、配列番号 4 5、配列番号 4 9、配列番号 5 0 及び配列番号 5 7 ~ 配列番号 6 2 として特定される配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つの線状ペプチド、又は配列番号 3 5、配列番号 4 7、配列番号 4 8 及び配列番号 5 1 ~ 配列番号 5 6 として特定される配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドを含む医薬組成物を投与することを含む。本発明の一実施形態では、治療される固形腫瘍は、肺、子宮頸部、喉頭、脾臓、又は膀胱の腫瘍である。本発明の別の実施形態では、治療される液状腫瘍は、慢性リンパ性白血病、T 型急性リンパ芽球性白血病、又は急性骨髄性白血病である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 3 】

【図 1】HPV - 1 6 E 7 がんタンパク質の C K 2 媒介リン酸化に対する、配列番号 1 ~ 配列番号 9 の合成ペプチドの効果。C K 2 酵素のホスホアクセプター部位と相互作用しない 2 つのペプチド（配列番号 1 0 及び配列番号 1 1 として特定される）。毎分カウント（c p m）を Y 軸にプロットする。

【図 2】配列番号 1 2 ~ 配列番号 2 0 として特定される 9 つのポリペプチドの、N C I - H 1 2 5 細胞株における細胞増殖の阻害率（% I）。ペプチド C I G B - 3 0 0 及び T a t をアッセイの陽性対照（ポジティブコントロール）及び陰性対照（ネガティブコントロール）としてそれぞれ使用した。2 0 % 以上の細胞増殖の阻害率を示すポリペプチドを選択した。

【図 3】N C I - H 1 2 5 細胞株におけるポリペプチド F 1 1 P 1 9、F 1 1 P 2 0 及び F 1 1 P 2 1（配列番号 1 8 ~ 配列番号 2 0）の用量 - 効果曲線。アッセイの陽性対照として使用した C I G B - 3 0 0 ペプチドの用量 - 効果曲線を含める。% I：細胞増殖の阻害率 C：濃度

【図 4】配列番号 1 8 ~ 配列番号 2 0 として特定される配列から、電荷での T r p 残基の位置掃引（p o s i t i o n a l s w e e p）により（配列番号 2 1 ~ 配列番号 4 4）生成されたポリペプチドについての、N C I - H 1 2 5 細胞株における細胞増殖の阻害率（% I）。A．2 つの濃度での、配列番号 2 1 ~ 配列番号 4 4 として特定されるポリペプチドによって達成される阻害率。配列番号 1 8 ~ 配列番号 2 0 として特定される前駆体ペプチド及び陽性対照としての C I G B - 3 0 0。破線の囲みは、2 0 0  $\mu$  M で 6 0 % 超の細胞増殖阻害を示した 6 つのポリペプチド及び C I G B - 3 0 0 を概説している。B．最も活性な 6 つのポリペプチドの、1 2 . 5  $\mu$  M ~ 2 0 0  $\mu$  M の様々な濃度によって達成される阻害率。

【図 5】N C I - H 1 2 5 細胞株におけるポリペプチド A 1 4 P 2 7（配列番号 2 1）、A 1 4 P 3 1（配列番号 2 5）、A 1 4 P 3 3（配列番号 2 7）、A 1 4 P 4 3（配列番号 3 2）、A 1 4 P 4 6（配列番号 3 5）、A 1 4 P 5 9（配列番号 4 3）の用量 - 効果曲線。対照ペプチドとして使用した C I G B - 3 0 0 ペプチドの用量 - 効果曲線を含める。% I：細胞増殖の阻害率 C：濃度

【図 6】A s P C - 1 細胞株におけるポリペプチド A 1 4 P 4 6（配列番号 3 5）及び C I G B - 3 0 0 ペプチドの用量 - 効果曲線。% I：細胞増殖の阻害率。C：濃度

【図 7】N C I - H 1 2 5 細胞株におけるポリペプチド A 1 5 P 3 5、A 1 5 P 3 6 及び A 1 5 P 3 7（配列番号 4 6 ~ 配列番号 4 8）の用量 - 効果曲線。前駆体ポリペプチド A 1 4 P 4 6（配列番号 3 5）、及び対照として使用した C I G B - 3 0 0 ペプチドが含まれる用量 - 効果曲線。% I：細胞増殖の阻害率。C：濃度

【図 8】N C I - H 1 2 5 細胞株におけるポリペプチド E 1 7 P 0 1、E 1 7 P 0 2 及び E 1 7 P 0 3（配列番号 5 1 ~ 配列番号 5 3）の用量 - 効果曲線。前駆体ポリペプチド A

15P36の用量-効果曲線が含まれる。(配列番号47)及び対照として使用したCIGB-300。% I:細胞増殖の阻害率。C:濃度

【図9】NCI-H125細胞株におけるポリペプチドD17P78、D17P79及びD17P80(配列番号54~配列番号56)の用量-効果曲線。前駆体ポリペプチドA15P37(配列番号48)、及び対照として使用したCIGB-300が含まれる用量-効果曲線。% I:細胞増殖の阻害率。C:濃度

【図10】胸腺欠損マウスに移植したヒト膀胱腫瘍モデルにおける、CK2リン酸化のポリペプチド阻害剤E17P01(配列番号51)の抗腫瘍効果。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

10

【0024】

例1. HPV-16のE7タンパク質中のCK2酵素のホスホアクセプター部位と相互作用する線状ペプチドの選択。

CK2酵素のホスホアクセプター部位と相互作用する生物活性線状ペプチドを特定するために、1600万を超える種々のペプチド配列を含む、「1ビーズ1化合物(one-bead-one-compound)」のタイプによりBCP-1と命名された合成線状ペプチドのコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングした。このライブラリーは、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)配列分析(Masforroll Y., et al., 2012, ACS Combinatorial Science, 14(3): 145-9)に適合するように設計された。スクリーニングは、HPV-16(配列番号63として特定されるLNDSSSEEDDEI)のE7基質中にCK2酵素のホスホアクセプター部位を含有する、BIOTと呼ばれるビオチン化合成ペプチドを用いて行った。ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲートを認識分子として使用し、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸p-トルイジン塩(BCIP)を成長用基質として使用した。青色は、BCP-1ライブラリーにおけるTentaGel樹脂の明るい淡黄色と比較して、BIOTペプチドによって認識される生物活性配列を含有するビーズの視覚的識別を容易にする。BIOTペプチドは、Fmoc/tBu化学を用いて4-メチルベンズヒドリルアミン(MBHA)樹脂上で合成した(Field GB and Noble RL, Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35(3): 161-214)。これを逆相クロマトグラフィー(RP-HPLC)によって精製し、その同一性をESI-MSによって確認した。それは95%を超える純度で得られ、ESI-MS分析により、その分子量(MM)が1574.6 Daであることが確認された。

20

30

【0025】

BCP-1ライブラリーを、真空濾過システム及び機械的攪拌を備えたポリプロピレン反応器に入れた。これを精製水及び生理食塩水リン酸緩衝液(PBS) pH 7.4で洗浄し、PBS pH 7.4中の1%ウシ血清アルブミン(BSA)で1時間ブロックした。溶媒及び試薬を真空濾過によって除去した。ライブラリーを、PBS pH 7.4中1% BSA中150 µg/mLのBIOTペプチド溶液80 mLと共に4で16時間インキュベートした。これをTween-PBS(T-PBS) pH 7.4で洗浄し、PBS pH 7.4中の1% BSAの溶液中でストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート(0.4 µg/mL)とインキュベートした。2時間後、これをT-PBS pH 7.4で洗浄し、基質溶液中のBCIP(0.5 mg/mL)と共に30分間インキュベートした。青色が現れたら、濾過及びPBS pH 7.4での十分な洗浄によって反応を停止させた。

40

【0026】

陽性ビーズを、接眼レンズを用いて目視検査によって残りから分離し、フリットを備えた反応器に移し、再生した。続いて、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート及びBCIPによる非特異的認識を排除する試験を行った。スクリーニングは、より高いストリンジェンシーの条件下で実施して、より高い親和性の配列を選択し、陽

50

性ビーズの数を減少させ、このため、B I O T ペプチドの濃度は  $120\text{ }\mu\text{g/mL}$  まで減少した。上記の手順に従って、陽性ビーズを再生し、n a n o E S I - M S / M S によって配列を特定した ( M a s f o r r o l Y . , e t a l , 2012 , A C S C o m b i n a t o r i a l S c i e n c e , 14 ( 3 ) : 145 - 9 ) 。

#### 【 0 0 2 7 】

$150\text{ }\mu\text{g/mL}$  のペプチド B I O T による初期スクリーニングの結果、56個の陽性ビーズを選択した。より低い濃度の B I O T (  $120\text{ }\mu\text{g/mL}$  ) を用いた2回目のスクリーニングの後、最初のスクリーニングでの陽性ビーズのうち、これらのペプチドの C K 2 ホスホアクセプター部位への親和性がより大きいことを証明する、残りのものよりも強い青色着色を示した9個の陽性ビーズを選択した。9個の陽性ビーズから得られた n a n o E S I - M S / M S スペクトルを、B C P - 1 データベースを検索するために M a s c o t プログラムを使用して、手動デノボシーケンシング及び自動シーケンシングによって並行して分析した。表1は、特定された9つのペプチドの配列を示す ( 配列番号1 ~ 配列番号9 ) 。各ペプチドに割り当てられた配列の分析から、手動での特定と自動シーケンシングとの間に m / z シグナルの割り当ての完全な対応関係が得られ、これにより、各ケースでのペプチド配列の正確な特定が可能になった。

#### 【 表 3 】

表1. B I O T ペプチドを用いた B C P - 1 ライブラリーのスクリーニングで単離された9個の陽性ビーズにおいて特定されたペプチドのアミノ酸配列。

| ビーズ | ビーズ中のペプチド配列 | 配列番号 |
|-----|-------------|------|
| 1   | RLRRKADP    | 1    |
| 2   | LRRRKADP    | 2    |
| 3   | TYRYRRDP    | 3    |
| 4   | VARRRYDP    | 4    |
| 5   | AVRRRYDP    | 5    |
| 6   | TFYRRYDP    | 6    |
| 7   | RKRSRYDP    | 7    |
| 8   | GYRYKRDP    | 8    |
| 9   | VKKRRLDP    | 9    |

#### 【 0 0 2 8 】

表1に示す9つのペプチドのアミノ酸組成に類似性が認められた。これは、塩基性アミノ酸 ( K , R ) の優位性及び疎水性アミノ酸 ( L , A , V , F , Y ) の存在を特徴とする。

#### 【 0 0 2 9 】

n a n o E S I - M S / M S によって特定された9個の配列が E 7 タンパク質中の C K 2 酵素のホスホアクセプター部位と相互作用することを補強するために、F m o c / t B u 化学を用いてペプチドを T e n t a g e l 樹脂上で直接合成した ( F i e l d G . B . e t a l . , 1990 , I n t . J . P e p t i d e P r o t e i n R e s . , 35 ( 3 ) : 161 - 214 ) 。  $120\text{ }\mu\text{g/mL}$  の濃度の B I O T ペプチドを用いて、樹脂に結合したペプチドに対して酵素反応を行った。ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼコンジュゲートを認識分子として使用し、B C I P を成長のための基質として使用した。樹脂に結合した符号化されたペプチド ( P 1 ~ P 9 )  $15\text{ mg}$  を含有する9つの反応器を、機械的に攪拌しながら真空濾過システムに入れた。樹脂に結合された、E 7 タンパク質上の C K 2 ホスホアクセプター部位と相互作用しない2つの対照ペプチド ( 配列番号10として特定される P 10 及び配列番号11として特定される P 11 ) を使用し

た。各反応器について500 $\mu$ Lの作業体積でBCP-1ライブラリスクリーニングアッセイを再現するように手順を調整した。結果は、樹脂(P1~P9)に結合された9個のペプチドが酵素アッセイ後に強い青色を発生させることを示し、9個の特定された線状ペプチドの、基質E7モデル中のCK2酵素のホスホアクセプター部位と相互作用する能力を証明している。対照的に、樹脂結合対照ペプチド(P10及びP11)は青色呈色を発生させなかった。

#### 【0030】

例2．配列番号1~配列番号9として特定されたペプチドの、HPV-16 E7がんタンパク質のCK2媒介リン酸化に対する効果。

ペプチドは、Fmoc/tBu化学を用いてMBHA樹脂上で合成した(Field GB and Noble RL, Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35(3): 161-214)。ペプチドをRP-HPLCによって精製し、それらの同一性をESI-MSによって確認した。合成のために、それらをF11P04~F11P12と命名し、それらのアミノ酸配列は、配列番号1~配列番号9として特定された配列に対応する。表2に見られるように、全てが95%を超える純度で得られ、ESI-MS分析によりその同一性が確認された。

#### 【表4】

表2．BCP-1ライブラリをBIOTでスクリーニングした後に特定された配列を含む合成ペプチドの特徴決定。

| 配列番号 | 合成符号   | 配列       | 純度 (%) | MW (Da) |
|------|--------|----------|--------|---------|
| 1    | F11P04 | RLRRKADP | 99.1   | 1009.6  |
| 2    | F11P05 | LRRRKADP | 99.1   | 1009.6  |
| 3    | F11P06 | TYRYRRDP | 98.1   | 1124.6  |
| 4    | F11P07 | VARRRYDP | 99.3   | 1030.6  |
| 5    | F11P08 | AVRRRYDP | 98.6   | 1030.6  |
| 6    | F11P09 | TFYRRYDP | 98.9   | 1115.5  |
| 7    | F11P10 | RKRSRYDP | 98.8   | 1075.7  |
| 8    | F11P11 | GYRYKRDP | 97.9   | 1052.5  |
| 9    | F11P12 | VKKRRLDP | 99.6   | 1009.7  |
| 10   | D10P94 | EQPAFHDP | 98.5   | 938.6   |
| 11   | D10P95 | VAGFFLDP | 98.7   | 863.4   |

#### 【0031】

HPV-16 E7がんタンパク質のCK2媒介リン酸化に対するこれらのペプチドの効果を測定するためのアッセイは、インビトロリン酸化反応に基づいており、そこでは大腸菌で発現されたHPV-16のE7がんタンパク質が基質として使用された。このがんタンパク質を、グルタチオンS-トランスフェラーゼに対する融合タンパク質として得た。アッセイは、前述の手順に従って実施した。(Perea S. E., et al., 2004, Cancer Res., 64: 7127-7129)。結果は図1に示され、配列番号1~配列番号9として特定されたペプチドが、HPV-16のE7タンパク質のCK2媒介リン酸化を阻害することができることを示す。

#### 【0032】

例3．非小細胞肺癌株NCI-H125における細胞増殖に対する、配列番号12~配列番号20として特定される合成ポリペプチドの効果。

内在性CK2基質に対する細胞内作用を達成するために、HIVのTat1タンパク質に対応する、配列番号1~配列番号9として特定された配列の細胞内透過ペプチドTat

をN末端に付加した (GRKKRRQRRRPPQ)。ベータアラニン ( $\beta$ A) 残基を、目的のペプチドとTatペプチドとの間のスペーサーとして導入した。ポリペプチドは、合成のためにF11P13～F11P21として符号化され、表3に示すように、配列番号12～配列番号20として特定された配列に対応する。ペプチドCIGB-300を配列番号64として特定し、Tatペプチドを配列番号65として特定した。ペプチドの合成、精製及び同一性分析を例2に示すように行った。表3に示されるように、それらの全てが95%を超える純度で得られ、ESI-MS分析によりそれらの同一性が確認された。

#### 【表5】

表3. 配列番号12～配列番号20として特定された合成ポリペプチドの特徴決定

| 配列番号 | 合成符号     | 配列                                                                                | 純度<br>(%) | MW<br>(Da) |
|------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------|
| 12   | F11P13   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-RLRRKADP                                                 | 98.7      | 2780.8     |
| 13   | F11P14   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-LRRRKADP                                                 | 98.7      | 2780.7     |
| 14   | F11P15   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-TYRYRRDP                                                 | 96.6      | 2895.8     |
| 15   | F11P16   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-VARRRYDP                                                 | 97.2      | 2801.7     |
| 16   | F11P17   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-AVRRRYDP                                                 | 98.2      | 2801.7     |
| 17   | F11P18   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-TFYRRYDP                                                 | 96.9      | 2886.8     |
| 18   | F11P19   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-RKRSRYDP                                                 | 96.6      | 2846.7     |
| 19   | F11P20   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-GYRYKRDP                                                 | 97.4      | 2823.7     |
| 20   | F11P21   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-VKKRRLDP                                                 | 97.4      | 2780.7     |
| 64   | CIGB-300 | サイクル (Cys <sub>15</sub> -Cys <sub>25</sub> ) GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-CWMSPRHLGTC | 99.2      | 3057.6     |
| 65   | Tat      | GRKKRRQRRRPPQ                                                                     | 98.3      | 1717.1     |

#### 【0033】

NCI-H125細胞株に対して、ポリペプチドF11P13～F11P21 (配列番号12～配列番号20) の抗増殖活性の評価を行った。細胞株は、低濃度の評価中の薬物に対して高い感受性を示す (HUL-Y., et al., 2018, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 22: 4551-4556)。CIGB-300ペプチドの抗増殖効果は、この株で広く特徴付けられており (Cirigliano S.M., et al., 2017, Cancer Cell International, 17, 42)、したがって、これを陽性対照として選択した。Tatペプチドを陰性対照として使用した。ポリペプチドを25、50、100及び200  $\mu$ Mの濃度で評価した。細胞増殖アッセイを、以前に説明された手順によって行った (Perera Y., et al., 2012, J. Pept. Sci., 18(4): 215-23)。

#### 【0034】

図2は、NCI-H125細胞における抗増殖アッセイからのデータを示す。各バーは、評価したポリペプチドの濃度 (25、50、100及び200  $\mu$ M) で到達した細胞増殖阻害率 (% I) の値に対応する。20%以上の細胞増殖阻害値を示したポリペプチドを、このパーセンテージ値がアッセイの変動係数の範囲内であるので選択した。ポリペプチドF11P19、F11P20及びF11P21のみが、200  $\mu$ Mの濃度で20%～30%の細胞増殖を阻害した。対照として使用したペプチドCIGB-300では、達成

された増殖阻害は50%のみであった。

【0035】

図3は、ペプチドCIGB-300と比較した、ポリペプチドF11P19、F11P20及びF11P21の用量-効果曲線を示す。ポリペプチドF11P19、F11P20、F11P21及びCIGB-300のIC<sub>50</sub>値は、それぞれ336μM、305μM、668μM及び64μMであった。ポリペプチドF11P19、F11P20、F11P21のIC<sub>50</sub>値は、CIGB-300について得られたIC<sub>50</sub>値からまだ遠いので、前記一次構造を最適化して、それらの生物学的活性を改善する必要がある。

【0036】

例4．電荷でのトリプトファンスキャンによる、配列番号18～配列番号20として特定された配列の最適化。 10

Trpアミノ酸を設計によりBCP-1ライブラリー合成から除外した(Masforrol Y., et al, 2012, ACS Combinatorial Science, 14(3): 145-9)。このために、Trpポジショナルスキャンングライブラリーを、配列番号18～配列番号20として特定される配列について設計し、そこで電荷のTrpの各アミノ酸残基への置換を時間通りに行った(表4)。これにより、カーゴ配列の各位置におけるTrpの寄与を調査することができた。

【0037】

Fmoc/tBu化学(Field GB y Noble RL, Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35(3): 161-214)を使用してMBHA樹脂上でTrpポジショナルスキャンングライブラリーポリペプチドを合成し、RP-HPLC精製し、ESI-MSによって同一性を確認した。アミノ酸配列を示す表4に見られるように、それらは全て95%を超える純度で得られ、ESI-MS分析により、設計された分子との同一性が確認された。 20

30

40

50

【表 6】

表 4. 配列番号 21～配列番号 44 として特定された、T r p ポジショナル スキャニングによって生成されたポリペプチドの特徴決定。

| 配列番号 | 供給元                    | 符号     | 配列                         | 純度<br>(%) | MW<br>(D a) |
|------|------------------------|--------|----------------------------|-----------|-------------|
| 21   | 配列番号 19 の<br>ポリペプチド誘導体 | A14P27 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-WYRYKRDP  | 96.5      | 2952.6      |
| 22   |                        | A14P28 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-GWRYKRDP  | 97.8      | 2846.6      |
| 23   |                        | A14P29 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYWYKRDP  | 96.4      | 2853.5      |
| 24   |                        | A14P30 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRWKRDP  | 97.8      | 2846.6      |
| 25   |                        | A14P31 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYWRDP  | 97.8      | 2881.6      |
| 26   |                        | A14P32 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKWDP  | 97.7      | 2853.6      |
| 27   |                        | A14P33 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKRWP  | 95.7      | 2894.6      |
| 28   |                        | A14P34 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKRDW  | 95.1      | 2912.6      |
| 29   | 配列番号 18 の<br>ポリペプチド誘導体 | A14P40 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-WKRSRYDP  | 96.7      | 2876.6      |
| 30   |                        | A14P41 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-RWRSRYDP  | 95.9      | 2904.6      |
| 31   |                        | A14P42 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKWSRYDP  | 97.6      | 2876.6      |
| 32   |                        | A14P43 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRWRYDP  | 98.7      | 2945.6      |
| 33   |                        | A14P44 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSWYDP  | 95.7      | 2876.6      |
| 34   |                        | A14P45 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRWDP  | 99.1      | 2869.6      |
| 35   |                        | A14P46 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRYWP  | 99.7      | 2917.6      |
| 36   |                        | A14P47 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRYDW  | 99.3      | 2935.7      |
| 37   | 配列番号 20 の<br>ポリペプチド誘導体 | A14P53 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-WKKRRLDP  | 98.1      | 2867.8      |
| 38   |                        | A14P54 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-VWKRRLDP  | 98.8      | 2838.7      |
| 39   |                        | A14P55 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKWRRLLDP | 99.7      | 2838.7      |
| 40   |                        | A14P56 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKWRLLDP | 99.0      | 2810.7      |
| 41   |                        | A14P57 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKRWLLDP | 99.3      | 2810.7      |
| 42   |                        | A14P58 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKRRWDP  | 96.3      | 2853.8      |
| 43   |                        | A14P59 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKRRLWP  | 99.6      | 2851.8      |
| 44   |                        | A14P60 | GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKRRLDW  | 99.3      | 2869.8      |

カーゴアミノ酸配列に行われた修飾を太字で強調する。

## 【0038】

T r p による修飾が、E 7 タンパク質中の C K 2 酵素のホスホアクセプター部位と相互作用するポリペプチドの能力に影響を及ぼさないことを実証するために、例 1 に記載の手順に従った。樹脂に結合された 24 個のポリペプチドは、酵素アッセイ後に青色が強く現れ、モデル E 7 基質の C K 2 酵素のホスホアクセプター部位との相互作用が証明された。一方、T r p による修飾が、C K 2 による E 7 タンパク質のリン酸化に対するポリペプチドの効果に影響を及ぼさないことを実証するために、例 2 に記載の手順に従った。60～85%のリン酸化阻害値が得られたので、配列番号 21～配列番号 44 として特定される 24 個のポリペプチドは、C K 2 によって媒介される H P V - 16 の E 7 タンパク質のリン酸化を阻害する能力を維持した。C I G B - 300 は、リン酸化の 87%の阻害を示した。

## 【0039】

Trpのポジショナルスキニングによって生成された合成ポリペプチド（配列番号21～配列番号44）の、NCI-H125細胞株に対する抗増殖活性の評価を行った。試験は、前述の手順によって実施した。（Perera Y., et al., 2012, J. Pept. Sci., 18(4): 215-23）。前駆体ポリペプチド（F11P19、F11P20、F11P21）及びペプチドCIGB-300を陽性対照として含めた。ポリペプチドを12.5、25、50、100及び200  $\mu$ Mの濃度で評価した。図4Aは、100及び200  $\mu$ Mのポリペプチド濃度での細胞増殖の阻害率の結果を示す。結果は、評価した24個のポリペプチドのうち6個（A14P27（配列番号21）、A14P31（配列番号25）、A14P33（配列番号27）、A14P43（配列番号32）、A14P46（配列番号35）、A14P59（配列番号43））が、ペプチドCIGB-300で見られる効果と同様に、200  $\mu$ Mで60%を超える細胞増殖の阻害を示したことを示す。図4Bは、評価された濃度で、6個の選択されたポリペプチドについて得られた細胞増殖の阻害率の値を示す。図から分かるように、A14P46ポリペプチドは、CIGB-300の挙動と同様に、100及び200  $\mu$ Mを超える濃度で細胞増殖の50%超を阻害する。より低い濃度では、A14P46ポリペプチドは、CIGB-300ペプチドの性能と比較して、より良好な用量-効果相関を示した。

10

## 【0040】

図5は、ポリペプチドA14P27、A14P31、A14P33、A14P43、A14P46、A14P59及びCIGB-300の用量-効果曲線を示す。その部分に関して、表5は、これらの6つのポリペプチドのIC<sub>50</sub>値が、それらの前駆体ポリペプチドF11P19（336  $\mu$ M）、F11P20（305  $\mu$ M）及びF11P21（668  $\mu$ M）について得られたものよりも低いことを示す。A14P46ポリペプチド（72  $\mu$ M）のIC<sub>50</sub>は、CIGB-300参照ペプチド（64  $\mu$ M）のIC<sub>50</sub>に匹敵する。

20

## 【0041】

ペプチド配列X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>に対して行った構造研究により、位置X<sub>7</sub>でのDのWへの変更が生物学的活性を増強するために必須であると結論付けることができ（A14P46 > A14P33 > A14P59）、ポリペプチドA14P46での応答が最高であった。さらに、位置X<sub>4</sub> > X<sub>5</sub> > X<sub>1</sub>も生物学的活性に関して顕著な結果を示すと結論付けられ、前記位置の置換における第2のアミノ酸Wの導入を示唆した。

30

## 【表7】

表5. NCI-H125株を用いた細胞増殖アッセイにおける、配列番号21、配列番号25、配列番号27、配列番号32、配列番号35および配列番号43として特定されるポリペプチドのIC<sub>50</sub>値。

| 配列番号 | 符号       | 配列                                                       | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |
|------|----------|----------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 21   | A14P27   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-WYRYKRDP                        | 165                         |
| 25   | A14P31   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-GYRYWRDP                        | 135                         |
| 27   | A14P33   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-GYRYKRWP                        | 124                         |
| 32   | A14P43   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-RKRWRYDP                        | 107                         |
| 35   | A14P46   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-RKRSRYWP                        | 72                          |
| 43   | A14P59   | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-VKKRRLWP                        | 140                         |
| 64   | CIGB-300 | サイクル (Cys15-Cys 25) GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A-CWMSPRHLGTC | 64                          |

40

## 【0042】

ポリペプチドA14P46（配列番号35）の生物学的活性がそれらの電荷位置（R K

50

R S R Y W P ) のみに起因することを実証するために、この例に記載の合成手順を使用して、T a t 及び  $\beta$  A 配列を含まない類似のペプチドを合成した。配列番号 4 5 として特定されたペプチド D 1 4 P 1 6 5 は、9 5 % の純度で得られ、E S I - M S による分析によって、その M W が 1 1 4 6 , 7 D a であることが実証された。リン酸化阻害アッセイを例 2 に記載のように実施し、8 5 % の阻害が得られ、H P V - 1 6 E 7 タンパク質の C K 2 媒介リン酸化を阻害するペプチドの能力を確認した。

#### 【 0 0 4 3 】

ポリペプチド A 1 4 P 4 6 が N C I - H 1 2 5 細胞株において C I G B - 3 0 0 と同様の生物学的活性結果を示したことを考慮して、膵臓腺がん腫瘍系統 ( A s P C - 1 ) におけるそのようなポリペプチドの挙動を、C I G B - 3 0 0 と比較して試験した。細胞増殖アッセイを、以前に説明された手順に従って行った ( P e r e r a Y . , e t a l . , 2 0 1 2 , J . P e p t . S c i , 1 8 ( 4 ) : 2 1 5 - 2 3 ) 。図 6 に示されるように、両方の分子は、A s P C - 1 細胞の増殖に対して用量依存的な効果を生じさせることができる。A 1 4 P 4 6 での 1 2 5  $\mu$  M の I C <sub>50</sub> 値及び C I G B - 3 0 0 での 1 0 2  $\mu$  M の I C <sub>50</sub> 値が得られ、両方のペプチドがこの細胞株において同様の効力を有することを示している。

#### 【 0 0 4 4 】

ポリペプチド A 1 4 P 4 6 ( 配列番号 3 5 ) は、N C I - H 1 2 5 及び A s P C - 1 細胞株における細胞増殖を阻害するその能力において C I G B - 3 0 0 に匹敵することが示されるが ( 図 5 及び図 6 ) 、より小さいサイズの線状ポリペプチドであり、化学的により安定であり、その配列中にメチオニン又はシステインのいずれも含まず、それによって生産的な観点からより魅力的になるので、優れている。

#### 【 0 0 4 5 】

例 5 . 配列中に第 2 の T r p 残基を導入することによる、配列番号 3 5 として特定されるポリペプチドの最適化。

例 4 で得られた結果に基づいて、A 1 4 P 4 6 ポリペプチドの位置 X <sub>1</sub> 、X <sub>4</sub> 及び X <sub>5</sub> に別の T r p 残基を導入し、生物活性に対するその影響を評価した。F m o c / t B u 化学 ( F i e l d G B y N o b l e R L . I n t . J . P e p t i d e P r o t e i n R e s . 1 9 9 0 ; 3 5 ( 3 ) : 1 6 1 - 2 1 4 ) を使用して M B H A 樹脂上でポリペプチドを合成し、R P - H P L C によって精製し、E S I - M S によって同一性を確認した。表 6 に示されるように、3 つのペプチドが 9 5 % を超える純度で得られ、E S I - M S 分析により分子の同一性が確認された。

#### 【 表 8 】

表 6 . 配列番号 3 5 として特定されるペプチドの最適化のために生成されたペプチドの特徴決定。

| 配列番号 | 符号     | 配列                                 | 純度 (%) | MW (D a) |
|------|--------|------------------------------------|--------|----------|
| 46   | A15P35 | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A- WKRSRYWP | 99.7   | 2947.7   |
| 47   | A15P36 | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A- RKRWRYWP | 95.1   | 3016.8   |
| 48   | A15P37 | GRKKRRQRRRPPQ- $\beta$ A- RKRSWYWP | 95.1   | 2947.7   |

太字は、配列番号 3 5 として特定されるペプチド配列における第 2 の T r p 残基の導入を強調している。

#### 【 0 0 4 6 】

合成ポリペプチド A 1 5 P 3 5 、A 1 5 P 3 6 及び A 1 5 P 3 7 ( 配列番号 4 6 ~ 配列番号 4 8 ) の抗増殖活性の評価を、N C I - H 1 2 5 、A s P C - 1 、P a n C - 1 ( 膵臓がん ) 及び O C I - A M L 3 ( 急性骨髄性白血病 - 3 ) 細胞株に対して行った。以前に

記載された手順に従って試験を行った (Perera Y, et al., 2012, J. Pept. Sci., 18(4): 215-23)。図7は、NCI-H125細胞株における3つのポリペプチドの用量-効果曲線を、その前駆体A14P46及び対照ペプチドCIGB-300と比較して示す。ポリペプチドA15P35、A15P36及びA15P37は、NCI-H125細胞の増殖に対して用量依存的効果をもたらすことができた。AsPC-1、PanC-1及びOCI-AML3株では、3つのポリペプチドは用量反応パターンも示した。

【0047】

表7は、NCI-H125、AsPC-1、PanC-1及びOCI-AML3細胞株で得られたA15P35、A15P36及びA15P37ポリペプチドのIC<sub>50</sub>値を、それらの前駆体A14P46及び対照ペプチドCIGB-300と比較してまとめたものである。ポリペプチドA15P35のIC<sub>50</sub>値は、試験した4つの系統において、その前駆体A14P46及びCIGB-300について得られたものと同様であり、配列の位置X1におけるTrpの導入は無関係であることを示している。対照的に、ポリペプチドA15P36及びA15P37について得られたIC<sub>50</sub>値は、特に膵臓がん細胞株(AsPC-1、PanC-1)及び急性骨髄性白血病(OCI-AML3)において、ポリペプチドA14P46及びペプチドCIGB-300について得られたものよりも低かった。

【表9】

表7. NCI-H125、AsPC-1、PanC-1およびOCI-AML3株を用いた細胞増殖アッセイにおける、配列番号46～配列番号48として特定されたポリペプチドのIC<sub>50</sub>値。

| 配列番号 | 符号       | IC <sub>50</sub> (μM) |        |        |          |
|------|----------|-----------------------|--------|--------|----------|
|      |          | NCI-H125              | AsPC-1 | PanC-1 | OCI-AML3 |
| 46   | A15P35   | 106                   | 127    | 145    | 130      |
| 47   | A15P36   | 42                    | 26     | 54     | 9        |
| 48   | A15P37   | 46                    | 23     | 65     | 21       |
| 35   | A14P46   | 72                    | 125    | 166    | 70       |
| 64   | CIGB-300 | 64                    | 102    | 156    | 63       |

対照ペプチドA14P46およびCIGB-300について得られた値が含まれる。

【0048】

A15P36ポリペプチド(配列番号47)及びA15P37(配列番号48)の生物学的活性が電荷RKRWRYWP及びRKRSWYWPのみに起因することを実証するために、この例に記載の合成手順を用いて、両ペプチドをTat又はβA配列なしで合成した。ペプチドD15P105(配列番号49)及びD15P106(配列番号50)が95%を超える純度で得られ、ESI-MS分析により、それぞれ1245.7Da及び1176.6Daの分子量が確認された。リン酸化アッセイを例2に記載のように実施し、87%及び82%のリン酸化阻害値がそれぞれ得られ、HPV-16 E7タンパク質のCK2媒介リン酸化を阻害する両方のペプチドの能力を確認した。

【0049】

この例の結果は、ポリペプチド配列A14P46(配列番号35)の位置X4及びX5における第2のTrpの導入が、ペプチドとホスホアクセプター部位との相互作用、したがってCK2によるリン酸化を阻害するその能力を支持することを示す。A15P36及びA15P37ポリペプチドは、膵臓がん(AsPC-1、PanC-1)及び急性骨髄性白血病(OCI-AML3)細胞株における細胞増殖を阻害するそれらの能力において

、C I G B - 3 0 0 よりも強力であることが示されている。両方のポリペプチドは、メチオニン及びシステインなどの感受性残基を有しないので、より小さいサイズの化学的により安定な線状配列であるという、さらなる利点を有する。加えて、それらは生産的な観点からより魅力的である。

#### 【 0 0 5 0 】

例 6 . 非天然アミノ酸 ( D - 及び L - N - メチルアミノ酸 ) を導入することによる、配列番号 4 7 及び配列番号 4 8 として特定されるポリペプチドの最適化。

ポリペプチド A 1 5 P 3 6 ( 配列番号 4 7 ) 及び A 1 5 P 3 7 ( 配列番号 4 8 ) を体液中のエンドペプチダーゼの作用から保護するために、非天然アミノ酸を、トリプシン及びキモトリプシンによる分解をより受けやすい配列の部位に導入した。タンパク質分解に最も感受性の部位は、Ex p a s y サイト ( <http://www.expasy.org> ) ( G a s t e i g e r E . , e t a l . , 2 0 0 3 , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h . 3 1 ( 1 3 ) : 3 7 8 4 - 3 7 8 8 ) の助けを借りて予測した。D - A r g を T a t の R 8 に組み込み、K 1 6、R 1 7 及び Y 2 0 の保護を、D - L y s、D - A r g 及び N M e - T y r をそれぞれ導入して評価した。各ポリペプチドの N 末端をアセチル化して N - ペプチダーゼから保護した。ポリペプチド E 1 7 P 0 1、E 1 7 P 0 2 及び E 1 7 P 0 3 ( 配列番号 5 1 ~ 配列番号 5 3 ) は A 1 5 P 3 6 の誘導体であり、ポリペプチド D 1 7 P 7 8、D 1 7 P 7 9 及び D 1 7 P 8 0 ( 配列番号 5 4 ~ 配列番号 5 6 ) は A 1 5 P 3 7 の誘導体である。F m o c / t B u 化学を使用して M B H A 樹脂上でポリペプチドを合成し、R P - H P L C によって精製し、E S I - M S によって同一性を確認した。表 8 に示されるように、全てが 9 5 % を超える純度で得られ、E S I - M S 分析により分子の同一性が確認された。

#### 【 表 1 0 】

表 8 . 配列番号 5 1 ~ 配列番号 5 6 として特定されたポリペプチドの特徴決定

| 配列番号 | 符号     | 配列                                             | 純度 (%) | MW (D a) |
|------|--------|------------------------------------------------|--------|----------|
| 51   | E17P01 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-R(D-Lys) RWRYP   | 98.4   | 3058.8   |
| 52   | E17P02 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-RK(D-Arg)WRYWP   | 96.3   | 3058.8   |
| 53   | E17P03 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-RKRWR(NMe-Tyr)WP | 96.6   | 3072.8   |
| 54   | D17P78 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-R(D-Lys)RSWYWP   | 97.3   | 2989.7   |
| 55   | D17P79 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-RK(D-Arg)SWYWP   | 98.2   | 2989.7   |
| 56   | D17P80 | Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-<br>βA-RKRSW(NMe-Tyr)WP | 95.7   | 3003.7   |

#### 【 0 0 5 1 】

非天然アミノ酸の導入が、E 7 タンパク質中の C K 2 酵素のホスホアクセプター部位と相互作用するポリペプチドの能力に影響を及ぼさないことを実証するために、例 1 に記載の手順に従った。樹脂に結合された 6 個のポリペプチドは、酵素アッセイ後に濃い青色が現れ、モデル E 7 基質の C K 2 酵素のホスホアクセプター部位との相互作用が証明された。一方、修飾が酵素 C K 2 による E 7 タンパク質でのリン酸化に対するペプチドの効果に影響を及ぼさないことを実証するために、例 2 に記載の手順に従った。配列番号 5 1 ~ 配列番号 5 6 として特定されるポリペプチド E 1 7 P 0 1 ~ E 1 7 P 0 3 及び D 1 7 P 7 8

～ D 1 7 P 8 0 は、H P V - 1 6 の E 7 タンパク質での C K 2 媒介リン酸化を阻害する能力を維持し、8 3 ～ 9 0 % のリン酸化阻害値が得られた。

【 0 0 5 2 】

N C I - H 1 2 5、H e p 2 C ( 喉頭がん ) 細胞株及び 2 つの膀胱がん株 ( M G H - U 3 及び M G H - U 4 ) で抗増殖アッセイを行った。以前に記載された手順に従って試験を行った ( P e r e r a Y . , e t a l , 2 0 1 2 , P e p t . S c i , 1 8 ( 4 ) : 2 1 5 - 2 3 )。

【 0 0 5 3 】

図 8 及び 9 は、それぞれポリペプチド E 1 7 P 0 1、E 1 7 P 0 2 及び E 1 7 P 0 3 ( 配列番号 5 1 ～ 配列番号 5 3 ) ならびに D 1 7 P 7 8、D 1 7 P 7 9 及び D 1 7 P 8 0 ( 配列番号 5 4 ～ 配列番号 5 6 ) の N C I - H 1 2 5 細胞株における用量 - 効果曲線を示す。対照 C I G B - 3 0 0 ペプチドならびに前駆体ポリペプチド A 1 5 P 3 6 及び A 1 5 P 3 7 をそれぞれ含めた。6 つのポリペプチドは、N C I - H 1 2 5 の細胞株の増殖に対して用量依存的効果をもたらすことができた。H e p 2 C、M G H - U 3 及び M G H - U 4 細胞株では、6 つ全てのポリペプチドは用量 - 応答パターンも示した。

【 0 0 5 4 】

表 9 は、細胞株 N C I - H 1 2 5、H e p 2 C、M G H - U 3 及び M G H - U 4 で得られたポリペプチド E 1 7 P 0 1、E 1 7 P 0 2、E 1 7 P 0 3、D 1 7 P 7 8、D 1 7 P 7 9 及び D 1 7 P 8 0 ( 配列番号 5 1 ～ 配列番号 5 6 ) の I C <sub>50</sub> 値を、それらの前駆体及び対照ペプチド C I G B - 3 0 0 と比較してまとめたものである。

【 0 0 5 5 】

表 9 は、配列番号 5 1 ～ 配列番号 5 6 として特定されたポリペプチドの I C <sub>50</sub> 値が、N C I - H 1 2 5、H e p 2 C、M G H - U 3 及び M G H - U 4 細胞株において、ペプチド C I G B - 3 0 0 で得られたものよりも低く、それらがそれらの抗増殖効果の点でより強力であることを示している。驚くべきことに、膀胱がん系統 ( M G H - U 3 及び M G H - U 4 ) の場合、I C <sub>50</sub> 値は C I G B - 3 0 0 と比較して一桁低く、非常に魅力的であり、なぜなら、それはわずかに調査されたニッチであり、分解されず、健康に大きな影響を与えるからである。プロテアーゼに対する安定性を高めるために、A 1 5 P 3 6 及び A 1 5 P 3 7 ポリペプチドへの修飾を導入した。しかしながら、驚くべきことに、C K 2 リン酸化を阻害する能力も増強された。

10

20

30

40

50

## 【表 1 1】

表 9. NCI-H125、Hep2C、MGH-U3およびMGH-U4細胞株における、配列番号51～配列番号56として特定されたポリペプチドのIC<sub>50</sub>値。

| 配列番号 | 符号       | IC <sub>50</sub> (μM) |       |        |        |
|------|----------|-----------------------|-------|--------|--------|
|      |          | NCI-H125              | Hep2C | MGH-U3 | MGH-U4 |
| 51   | E17P01   | 20                    | 11    | 65     | 53     |
| 52   | E17P02   | 27                    | 26    | 55     | 38     |
| 53   | E17P03   | 47                    | 11    | 29     | 33     |
| 54   | D17P78   | 14                    | 20    | 86     | 89     |
| 55   | D17P79   | 21                    | 18    | 77     | 69     |
| 56   | D17P80   | 13                    | 24    | 65     | 70     |
| 47   | A15P36   | 42                    | 44    | -      | -      |
| 48   | A15P37   | 46                    | 48    | -      | -      |
| 64   | CIGB-300 | 64                    | 61    | 327    | 335    |

対照ポリペプチドA15P36、A15P37およびCIGB-300について得られた値が含まれる。

## 【0056】

配列番号51～配列番号56として特定されたペプチドの生物学的活性がそれらの電荷のみに起因することを実証するために、この同じ例に記載の合成手順を使用して、Tat及びβA配列を含まないペプチドを合成した。ペプチドD17P81～D17P86（配列番号57～配列番号62）が95%を超える純度で得られ、ESI-MS分析により、設計されたもので得られた分子の同一性が確認された（表10）。

## 【表 1 2】

表 10. 配列番号57～配列番号62として特定されたペプチドの特徴決定

| 配列番号 | 符号     | 配列               | 純度 (%) | MW (Da) |
|------|--------|------------------|--------|---------|
| 57   | D17P81 | R(D-Lys) RWRYP   | 98.5   | 1245.7  |
| 58   | D17P82 | RK(D-Arg)WRYP    | 97.6   | 1245.7  |
| 59   | D17P83 | RKRWR(NMe-Tyr)WP | 95.8   | 1259.7  |
| 60   | D17P84 | R(D-Lys)RSWYP    | 96.3   | 1176.7  |
| 61   | D17P85 | RK(D-Arg)SWYP    | 97.8   | 1176.7  |
| 62   | D17P86 | RKRSW(NMe-Tyr)WP | 95.5   | 1190.6  |

## 【0057】

リン酸化アッセイを例2に記載のように実施し、83～90%のリン酸化阻害値が得られ、HPV-16 E7タンパク質のCK2媒介リン酸化を阻害するこれらのペプチドの能力を確認した。

## 【0058】

要約すると、配列番号51～配列番号56として特定されるポリペプチドは、細胞増殖を阻害する能力、特に膀胱がんの系統（MGH-U3及びMGH-U4）における阻害活性に関して、ペプチドCIGB-300よりも強力である。さらに、これらのペプチドは、線状であり、サイズがより小さく、化学的により安定であり、製造の観点から明白な利

点をもたらす。

【 0 0 5 9 】

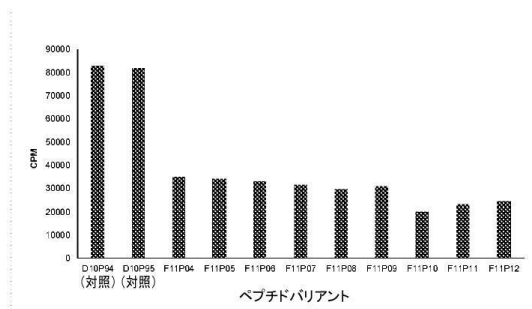
例 7 . 胸腺欠損マウスに移植したヒト膀胱腫瘍モデルにおける、C K 2 リン酸化のポリペプチド阻害剤の抗腫瘍効果。

これらの試験のために、6 ~ 8 週齢の胸腺欠損雌 B a l b C マウスを使用した。膀胱細胞がん由来の M G H - U 3 細胞を使用した。このモデルにおける腫瘍移植のために、細胞を 1 0 0 0 0 0 0 細胞 / ミリリットルの濃度で P B S に懸濁した。細胞懸濁液を動物の腹腔内に皮下接種した。E 1 7 P 0 1 ポリペプチド ( 配列番号 5 1 として特定される ) 又は C I G B - 3 0 0 の投与を、腫瘍細胞を接種した 5 日後に開始し、5 日間連続して腹腔内投与し続けた。ポリペプチド及びペプチドを P B S に溶解した。投与量は 2 0 μ g であり、1 m g / k g 体重に相当する。異なる時点で、ポリペプチドの抗腫瘍効果を評価するためのパラメータとして、腫瘍体積 ( m m <sup>3</sup> ) を測定した。図 1 0 に見られるように、E 1 7 P 0 1 ポリペプチドは、C I G B - 3 0 0 で観察されるものよりも大きい、腫瘍進行を阻害するその能力を示した。これらの結果は、実験動物に移植されたヒト腫瘍のモデルにおいて、配列番号 5 1 として特定されるポリペプチドの抗腫瘍効果を証明した。

【 図 面 】

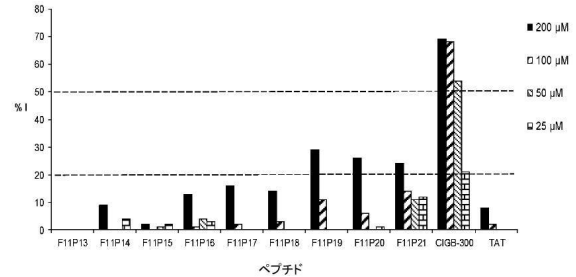
【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

図 2



30

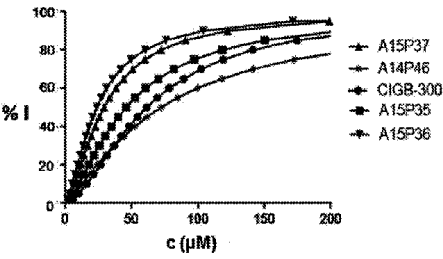
40

50



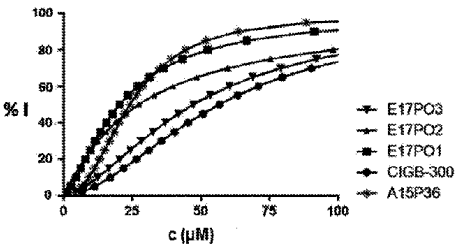
【 図 7 】

Figura 7



【 図 8 】

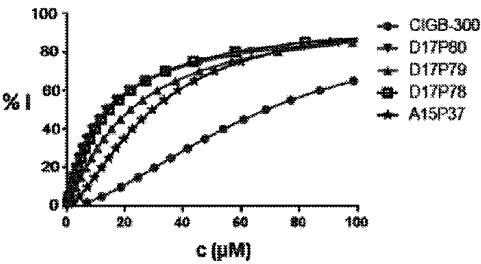
Figura 8



10

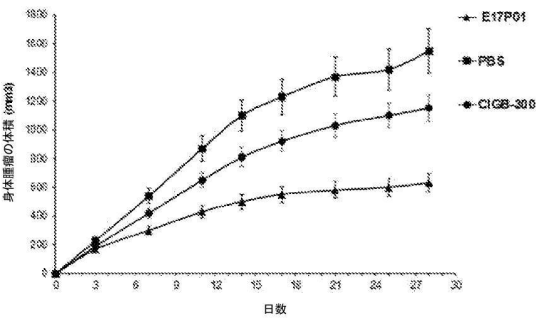
【 図 9 】

Figura 9



【 図 1 0 】

図10



20

【 配 列 表 】

2024534231000001.xml

30

40

50

## 【 国際調査報告 】

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2022/050007

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. C12N9/12 A61K38/00 A61P35/00 C07K7/06

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N A61P A61K C07K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Relevante para las reivindicaciones N° |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| A          | <p>ZANIN SOFIA ET AL: "Chimeric peptides as modulators of CK2-dependent signaling: Mechanism of action and off-target effects",</p> <p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - PROTEINS &amp; PROTEOMICS, ELSEVIER, NETHERLANDS,</p> <p>vol. 1854, no. 10,</p> <p>30 Abril 2015 (2015-04-30), páginas 1694-1707, XP029273198,</p> <p>ISSN: 1570-9639, DOI: 10.1016/J.BBAPAP.2015.04.026</p> <p>Todo el documento</p> <p>-----</p> <p>-/--</p> | 1-13                                   |

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

|                                                                                                                                                                                              |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" | documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" | documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

23 Noviembre 2022

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

08/12/2022

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

N° de fax

N° de teléfono

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Enero 2015)

10

20

30

40

50

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2022/050007

| C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                        |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría*                                           | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Relevante para las reivindicaciones N° |
| A                                                    | <p><b>Yasser Perera ET AL: "Sensitivity of tumor cells towards CIGB-300 anticancer peptide relies on its nucleolar localization",</b><br/> <b>Journal of Peptide Science, vol. 18, n.4,</b><br/> <b>8 Marzo 2012 (2012-03-08), páginas 215-223,</b><br/> <b>XP055710440,</b><br/> <b>DOI: 10.1002/psc.1432</b><br/> <b>Tomado de Internet:</b><br/> <b>URL:https://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1002%2Fpsc.1432</b><br/> <b>[Tomado en 2020-07-01]</b><br/> <b>Todo el documento</b><br/> <b>Resumen, reivindicaciones, Figura 1</b></p> <p>-----</p> | 1-13                                   |
| A                                                    | <p><b>WO 03/054002 A1 (CT INGENIERIA GENETICA BIOTECH [CU] ET AL.)</b><br/> <b>3 Julio 2003 (2003-07-03)</b><br/> <b>Todo el documento</b><br/> <b>[0025], reivindicaciones</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1-13                                   |
| A                                                    | <p><b>WO 2006/020207 A2 (UNIV CINCINNATI [US]; BALASUBRAMANIAM AMBIKAIPAKAN [US])</b><br/> <b>23 Febrero 2006 (2006-02-23)</b><br/> <b>SEQ ID NO: 10, reivindicaciones 15</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1-13                                   |
| A                                                    | <p><b>WO 2006/050611 A1 (UNIV BRITISH COLUMBIA [CA]; HANCOCK ROBERT E W [CA]; HILPERT KAI [CA])</b><br/> <b>18 Mayo 2006 (2006-05-18)</b><br/> <b>SEQ ID NO: 1118, reivindicaciones</b><br/> <b>-4 DATABASE Geneseq [Online]</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1-13                                   |
| L                                                    | <p><b>7 Septiembre 2006 (2006-09-07),</b><br/> <b>"Bactenecin derived antimicrobial peptide, Bac1288.",</b><br/> <b>XP002807909,</b><br/> <b>Tomado de EBI accession no.</b><br/> <b>GSP:AEI80435</b><br/> <b>Database accession no. AEI80435</b><br/> <b>L=Sequence information;</b><br/> <b>sequence</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                             |                                        |
| A                                                    | <p><b>DATABASE ENA [Online]</b><br/> <b>EMBL;</b><br/> <b>28 Febrero 2021 (2021-02-28) ,</b><br/> <b>Lin, Y et al.: "Rhodospirillales bacterium (bioreactor metagenome)</b><br/> <b>carboxylesterase/lipase family protein",</b><br/> <b>XP002807910,</b><br/> <b>Tomado de ENA accession no.</b><br/> <b>MBL8834019</b><br/> <b>Database accession no. MBL8834019</b><br/> <b>sequence</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                            | 1-13                                   |

Formulario PCT/SA/210 (continuación de la segunda hoja) (Enero 2015)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2022/050007

Recuadro I      Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias:

a. ☒ que forma parte de la solicitud internacional tal y como se presentó:

☐ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.

☐ en formato papel o en formato de archivo de imagen.

b. ☐ presentada junto con la solicitud internacional de acuerdo a la Regla 13ter.1.a) del PCT exclusivamente a los fines de la búsqueda, en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.

c. ☐ Presentada con posterioridad a la fecha de presentación exclusivamente a los fines de la búsqueda internacional:

☐ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25 (Regla 13ter.1.a)).

☐ en formato papel o en formato de archivo de imagen (Regla 13ter.1.b) e Instrucciones Administrativas, sección 713).
2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la que formaba parte de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente
3. Comentarios adicionales:

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

**PCT/CU2022/050007**

|               |    |            |    |             |    |            |
|---------------|----|------------|----|-------------|----|------------|
| WO 03054002   | A1 | 03-07-2003 | AR | 037825      | A1 | 09-12-2004 |
|               |    |            | AT | 520704      | T  | 15-09-2011 |
|               |    |            | AU | 2002361922  | A1 | 09-07-2003 |
|               |    |            | BR | 0215213     | A  | 07-12-2004 |
|               |    |            | CA | 2471110     | A1 | 03-07-2003 |
|               |    |            | CN | 1620464     | A  | 25-05-2005 |
|               |    |            | CR | 7361        | A  | 18-02-2005 |
|               |    |            | CU | 23225       | A1 | 30-08-2007 |
|               |    |            | DK | 1491553     | T3 | 05-12-2011 |
|               |    |            | DO | P2002000548 | A  | 30-06-2003 |
|               |    |            | EP | 1491553     | A1 | 29-12-2004 |
|               |    |            | EP | 2383282     | A1 | 02-11-2011 |
|               |    |            | ES | 2371239     | T3 | 28-12-2011 |
|               |    |            | HK | 1068901     | A1 | 06-05-2005 |
|               |    |            | HN | 2002000377  | A  | 10-04-2003 |
|               |    |            | HR | P20040663   | A2 | 31-08-2005 |
|               |    |            | IL | 162633      | A  | 28-02-2011 |
|               |    |            | IS | 7320        | A  | 16-06-2004 |
|               |    |            | JP | 4056476     | B2 | 05-03-2008 |
|               |    |            | JP | 2005525090  | A  | 25-08-2005 |
|               |    |            | KR | 20050002811 | A  | 10-01-2005 |
|               |    |            | MA | 27868       | A1 | 02-05-2006 |
|               |    |            | MX | PA04005832  | A  | 13-09-2004 |
|               |    |            | MY | 133530      | A  | 30-11-2007 |
|               |    |            | NO | 333259      | B1 | 22-04-2013 |
|               |    |            | NZ | 534170      | A  | 31-08-2006 |
|               |    |            | PE | 20030861    | A1 | 02-12-2003 |
|               |    |            | PT | 1491553     | E  | 25-11-2011 |
|               |    |            | RU | 2290410     | C2 | 27-12-2006 |
|               |    |            | SI | 1491553     | T1 | 30-12-2011 |
|               |    |            | TN | SN04114     | A1 | 01-06-2006 |
|               |    |            | UA | 81403       | C2 | 10-01-2008 |
|               |    |            | US | 2006233742  | A1 | 19-10-2006 |
|               |    |            | US | 2009005294  | A1 | 01-01-2009 |
|               |    |            | UY | 27602       | A1 | 30-04-2003 |
|               |    |            | WO | 03054002    | A1 | 03-07-2003 |
|               |    |            | ZA | 200405514   | B  | 30-03-2005 |
|               |    |            |    |             |    |            |
| WO 2006020207 | A2 | 23-02-2006 | US | 2008221038  | A1 | 11-09-2008 |
|               |    |            | WO | 2006020207  | A2 | 23-02-2006 |
|               |    |            |    |             |    |            |
| WO 2006050611 | A1 | 18-05-2006 | CA | 2629751     | A1 | 18-05-2006 |
|               |    |            | EP | 1824976     | A1 | 29-08-2007 |
|               |    |            | EP | 2116603     | A2 | 11-11-2009 |
|               |    |            | US | 2008207522  | A1 | 28-08-2008 |
|               |    |            | WO | 2006050611  | A1 | 18-05-2006 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
**PCT/CU2022/050007**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

INV. **C12N9/12 A61K38/00 A61P35/00 C07K7/06**  
ADD.

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)

**C12N A61P A61K C07K**

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

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

**EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data**

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>A</b>  | <b>ZANIN SOFIA ET AL: "Chimeric peptides as modulators of CK2-dependent signaling: Mechanism of action and off-target effects",<br/>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) -<br/>PROTEINS &amp; PROTEOMICS, ELSEVIER,<br/>NETHERLANDS,<br/>vol. 1854, no. 10,<br/>30 April 2015 (2015-04-30), pages<br/>1694-1707, XP029273198,<br/>ISSN: 1570-9639, DOI:<br/>10.1016/J.BBAPAP.2015.04.026<br/>the whole document<br/>-----<br/>-/--</b> | <b>1-13</b>           |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier 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

**23 November 2022**

Date of mailing of the international search report

**08/12/2022**

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

Authorized officer

**Madruga, Jaime**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/CU2022/050007

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                       |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No. |
| A                                                    | <p><b>Yasser Perera ET AL: "Sensitivity of tumor cells towards CIGB-300 anticancer peptide relies on its nucleolar localization",</b><br/> <b>Journal of Peptide Science, vol. 18, n.4,</b><br/> <b>8 March 2012 (2012-03-08), pages 215-223,</b><br/> <b>XP055710440,</b><br/> <b>DOI: 10.1002/psc.1432</b><br/> <b>Retrieved from the Internet:</b><br/> <b>URL:https://api.wiley.com/onlinelibrary/td</b><br/> <b>m/v1/articles/10.1002%2Fpsc.1432</b><br/> <b>[retrieved on 2020-07-01]</b><br/> <b>the whole document</b><br/> <b>Abstract, claims, Figure 1</b></p> <p>-----</p> | 1-13                  |
| A                                                    | <p><b>WO 03/054002 A1 (CT INGENIERIA GENETICA BIOTECH [CU] ET AL.)</b><br/> <b>3 July 2003 (2003-07-03)</b><br/> <b>the whole document</b><br/> <b>[0025], claims</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1-13                  |
| A                                                    | <p><b>WO 2006/020207 A2 (UNIV CINCINNATI [US]; BALASUBRAMANIAM AMBIKAIPAKAN [US])</b><br/> <b>23 February 2006 (2006-02-23)</b><br/> <b>SEQ ID NO: 10, claim 15</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1-13                  |
| A                                                    | <p><b>WO 2006/050611 A1 (UNIV BRITISH COLUMBIA [CA]; HANCOCK ROBERT E W [CA]; HILPERT KAI [CA])</b><br/> <b>18 May 2006 (2006-05-18)</b><br/> <b>SEQ ID NO: 1118, claims</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1-13                  |
| L                                                    | <p><b>-&amp; DATABASE Geneseq [Online]</b></p> <p><b>7 September 2006 (2006-09-07),</b><br/> <b>"Bactenecin derived antimicrobial peptide, Bac1288.",</b><br/> <b>XP002807909,</b><br/> <b>retrieved from EBI accession no.</b><br/> <b>GSP:AEI80435</b><br/> <b>Database accession no. AEI80435</b><br/> <b>L=Sequence information;</b><br/> <b>sequence</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                         |                       |
| A                                                    | <p><b>DATABASE ENA [Online]</b><br/> <b>EMBL;</b><br/> <b>28 February 2021 (2021-02-28),</b><br/> <b>Lin, Y et al.: "Rhodospirillales bacterium (bioreactor metagenome)</b><br/> <b>carboxylesterase/lipase family protein",</b><br/> <b>XP002807910,</b><br/> <b>retrieved from ENA accession no.</b><br/> <b>MBL8834019</b><br/> <b>Database accession no. MBL8834019</b><br/> <b>sequence</b></p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                      | 1-13                  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                        |                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                        | International application No.<br><br>PCT/CU2022/050007 |
| Box No. I                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet) |                                                        |
| <div>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 sequence listing:<div><div>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.</div><div>b. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).<div><input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.</div></div></div></div> |                                                                                        |                                                        |
| <div>2. <input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                        |                                                        |
| <div>3. Additional comments:</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                        |                                                        |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CU2022/050007

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date         |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------------|
| WO 03054002                               | A1                  | 03-07-2003                 | AR 037825 A1 09-12-2004     |
|                                           |                     |                            | AT 520704 T 15-09-2011      |
|                                           |                     |                            | AU 2002361922 A1 09-07-2003 |
|                                           |                     |                            | BR 0215213 A 07-12-2004     |
|                                           |                     |                            | CA 2471110 A1 03-07-2003    |
|                                           |                     |                            | CN 1620464 A 25-05-2005     |
|                                           |                     |                            | CR 7361 A 18-02-2005        |
|                                           |                     |                            | CU 23225 A1 30-08-2007      |
|                                           |                     |                            | DK 1491553 T3 05-12-2011    |
|                                           |                     |                            | DO P2002000548 A 30-06-2003 |
|                                           |                     |                            | EP 1491553 A1 29-12-2004    |
|                                           |                     |                            | EP 2383282 A1 02-11-2011    |
|                                           |                     |                            | ES 2371239 T3 28-12-2011    |
|                                           |                     |                            | HK 1068901 A1 06-05-2005    |
|                                           |                     |                            | HN 2002000377 A 10-04-2003  |
|                                           |                     |                            | HR P20040663 A2 31-08-2005  |
|                                           |                     |                            | IL 162633 A 28-02-2011      |
|                                           |                     |                            | IS 7320 A 16-06-2004        |
|                                           |                     |                            | JP 4056476 B2 05-03-2008    |
|                                           |                     |                            | JP 2005525090 A 25-08-2005  |
|                                           |                     |                            | KR 20050002811 A 10-01-2005 |
|                                           |                     |                            | MA 27868 A1 02-05-2006      |
|                                           |                     |                            | MX PA04005832 A 13-09-2004  |
|                                           |                     |                            | MY 133530 A 30-11-2007      |
|                                           |                     |                            | NO 333259 B1 22-04-2013     |
|                                           |                     |                            | NZ 534170 A 31-08-2006      |
|                                           |                     |                            | PE 20030861 A1 02-12-2003   |
|                                           |                     |                            | PT 1491553 E 25-11-2011     |
|                                           |                     |                            | RU 2290410 C2 27-12-2006    |
|                                           |                     |                            | SI 1491553 T1 30-12-2011    |
|                                           |                     |                            | TN SN04114 A1 01-06-2006    |
|                                           |                     |                            | UA 81403 C2 10-01-2008      |
|                                           |                     |                            | US 2006233742 A1 19-10-2006 |
|                                           |                     |                            | US 2009005294 A1 01-01-2009 |
|                                           |                     |                            | UY 27602 A1 30-04-2003      |
|                                           |                     |                            | WO 03054002 A1 03-07-2003   |
|                                           |                     |                            | ZA 200405514 B 30-03-2005   |
| WO 2006020207                             | A2                  | 23-02-2006                 | US 2008221038 A1 11-09-2008 |
|                                           |                     |                            | WO 2006020207 A2 23-02-2006 |
| WO 2006050611                             | A1                  | 18-05-2006                 | CA 2629751 A1 18-05-2006    |
|                                           |                     |                            | EP 1824976 A1 29-08-2007    |
|                                           |                     |                            | EP 2116603 A2 11-11-2009    |
|                                           |                     |                            | US 2008207522 A1 28-08-2008 |
|                                           |                     |                            | WO 2006050611 A1 18-05-2006 |

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 K 19/00 (2006.01) C 0 7 K 19/00  
 C 0 7 K 14/00 (2006.01) C 0 7 K 14/00  
 C 0 7 K 7/08 (2006.01) C 0 7 K 7/08  
 C 0 7 K 14/16 (2006.01) C 0 7 K 14/16

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
 CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J  
 M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY  
 ,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T  
 H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許序注：以下のものは登録商標)

## 1 . T W E E N

、ブラヤ、エントレ 1 8 2 イ 1 8 4、アベニダ 3 1 ヌメロ 1 8 2 0 7、アパルトメント 2 0

(72)発明者 レジェス アコスタ、オズワルド

キューバ共和国 1 1 6 0 0 ラ ハバナ、ブラヤ、エントレ 1 8 2 イ 1 8 4、アベニダ 3 1  
 ヌメロ 1 8 2 0 7、アパルトメント 2 0

(72)発明者 ペレラ ネグリン、ヤセル

キューバ共和国 1 1 6 0 0 ラ ハバナ、ブラヤ、クバナカン、カジェ 1 8 6 エ / 3 1 イ 3 3  
 ヌメロ 3 1 1 7、アパルトメント 1 2 ホタ

(72)発明者 カバレロ メネンデス、エヴェリン

キューバ共和国 1 1 6 0 0 ラ ハバナ、ブラヤ、エントレ 1 8 6 イ 1 8 8、アベニダ 3 1 ア  
 、エディフィシオ セ - 1 7、アパルトメント 5

(72)発明者 ゴンザレス レペス、ルイス、ハビエル

キューバ共和国 1 1 6 0 0 ラ ハバナ、ブラヤ、エントレ 3 1 イ 3 3、カジェ 1 8 6 ヌメ  
 ロ 3 1 1 5、アパルトメント セ、ピソ 8

(72)発明者 ベサーダ ペレス、ウラジミール、アルマンド

キューバ共和国 1 1 6 0 0 ラ ハバナ、ブラヤ、クバナカン、カジェ 3 3、エントレ 1 8 6 イ  
 1 8 8、エディフィシオ セ - 1 5、アパルトメント 3、

(72)発明者 ペレア ロドリゲス、シルピオ、エルネスト

キューバ共和国 1 1 6 0 0 ラ ハバナ、ブラヤ、エントレ 1 8 2 イ 1 8 4、アベニダ 3 1  
 ヌメロ 1 8 2 0 7 アパルトメント 3 2

(72)発明者 ギレン ニエト、ジェラルド、エンリケ

キューバ共和国 1 1 6 0 0 ラ ハバナ、ブラヤ、アベニダ 3 1、エントレ 1 8 2 イ 1 8 4、  
 エディフィシオ 1 8 2 0 7、アパルトメント 3 4

(72)発明者 ゴンザレス ブランコ、ソニア

キューバ共和国 1 1 6 0 0 ラ ハバナ、ブラヤ、エントレ アベニダ 3 1 イ アベニダ 3 3、  
 カジェ 1 8 6、エディフィシオ 3 1 1 2、アパルトメント 4 2

F ターム (参考) 4C076 BB01 BB11 BB21 CC27 EE41N FF34

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA09 BA17 BA23 CA59 DC32 MA52  
 MA56 MA65 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272

4H045 AA10 AA30 BA10 BA15 BA17 BA40 CA05 DA55 EA20