

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007年9月7日 (07.09.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/099993 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/00 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/053738
- (22) 国際出願日: 2007年2月28日 (28.02.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2006-053816 2006年2月28日 (28.02.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東亜合成株式会社 (TOAGOSEI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1058419 東京都港区西新橋1丁目14番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉田 徹彦 (YOSHIDA, Tetsuhiko) [JP/JP]; 〒4550027 愛知県名古屋市中区船見町1番地の1 東亜合成株式会社内 Aichi (JP). 小林 菜穂子 (KOBAYASHI, Nahoko) [JP/JP]; 〒4550027 愛知県名古屋市中区船見町1番地の1 東亜合成株式会社内 Aichi (JP). 佐藤 隆則 (SATO, Takanori) [JP/JP]; 〒2109507 神奈川県川崎市川崎区夜光一丁目2番1号 日本ゼオン株式会社総合開発センター内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 安部 誠 (ABE, Makoto); 〒4600003 愛知県名古屋市中区錦2丁目18番5号白川第六ビル7階手島特許事務所名古屋オフィス Aichi (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, 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.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIVIRAL PEPTIDE AND ANTIVIRAL AGENT

(54) 発明の名称: 抗ウイルス性ペプチドおよび抗ウイルス剤

(57) Abstract: Disclosed is an antiviral agent comprising a non-naturally occurring, artificially synthesized peptide as the main ingredient. The antiviral agent comprises an antiviral peptide, wherein the antiviral peptide has at least one unit of an amino acid sequence constituted by at least five contiguous amino acid residues (which is known as a nuclear localization sequence (NLS)) or an amino acid sequence having a partial modification in the NLS and also having at least one unit of an amino acid sequence constituted by at least five contiguous amino acid residues (which is known as a nuclear export sequence (NES)) or an amino acid sequence having a partial modification in the NES.

(57) 要約: 本発明によって提供される抗ウイルス剤は、天然に存在しない人為的に合成されたペプチドを主成分とする抗ウイルス剤であって、核移行性配列 (NLS) として知られる少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NLSに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なくとも1単位有しており、且つ、核外移行性配列 (NES) として知られる少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NESに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なくとも1単位有することを特徴とする抗ウイルス性ペプチドを含む。

明 細 書

抗ウイルス性ペプチドおよび抗ウイルス剤

技術分野

- [0001] 本発明は、天然には存在しない形態の独立したペプチド鎖から成る抗ウイルス性を有するオリゴペプチド又はポリペプチド(以下これらを総称して「抗ウイルス性ペプチド」という。)及びその利用、特にそのような抗ウイルス性ペプチドを主成分とする抗ウイルス剤(抗ウイルス性組成物)とその製造方法に関する。

本願は2006年2月28日に出願された日本国特許出願第2006-053816号に基づく優先権を主張しており、当該日本国出願の全内容は本明細書中に参照として援用されている。

背景技術

- [0002] ウイルス性疾患の予防や治癒に有効な薬剤(抗ウイルス剤)は限られているため、種々のアプローチによって新たな抗ウイルス剤の開発が積極的に進められている。

そのようなアプローチの一つとしてウイルスの増殖を阻止し得るあるいは低減させ得る天然由来或いは人為的に作製された抗ウイルス性ペプチドの探索・開発が進められている。例えば、以下の特許文献1、2及び3には、これまでに発見または開発された抗ウイルス性ペプチド類が記載されている。

- [0003] 特許文献1:国際公開第WO00/32629号パンフレット
特許文献2:国際公開第WO00/52043号パンフレット
特許文献3:国際公開第WO01/57072号パンフレット

発明の開示

- [0004] 本発明は、上記各特許文献に記載されるような従前の抗ウイルス性ペプチドとは異なるペプチドであって、自然界において抗ウイルス性ペプチドとして存在し機能しているペプチドとは異なる新たな抗ウイルス性ペプチドを設計することを目的とする。また、本発明は、ここで開示されるペプチドをウイルス増殖を抑制する目的に使用することを他の目的とする。また、本発明は、ここで開示されるペプチドを使用することを特徴とするウイルス増殖抑制方法の提供を他の目的とする。また、本発明により設計

された抗ウイルス性ペプチドを製造し、該ペプチドを主成分とする抗ウイルス剤（抗ウイルス性組成物）の提供を他の目的とする。さらにまた、ここで開示される抗ウイルス性ペプチドをコードするポリヌクレオチドの提供を他の目的とする。

[0005] 本発明によって提供される、少なくとも1種のウイルスに対して抗ウイルス活性を有する天然に存在しない人為的に合成されたペプチドを主成分とする抗ウイルス剤（典型的には医療分野又は衛生分野において使用し得る薬学的組成物）は、

核移行性配列（NLS）として知られる（把握される）少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NLSに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なくとも1単位有しており、且つ、核外移行性配列（NES）として知られる（把握される）少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NESに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なくとも1単位有する、ことを特徴とする抗ウイルス性ペプチドと、薬学的に許容され得る担体（種々のキャリア、媒体を包含する。以下同じ。）とを含む。

[0006] ここで開示される抗ウイルス剤に含まれる抗ウイルス性ペプチドは、相互に機能の異なる2種類のアミノ酸配列を利用して人為的に設計された抗ウイルス性ペプチドである。即ち、本発明者は、人為的に設計され、合成されたペプチド（国際公開第WO 03/91429号パンフレット参照、かかる文献の全内容は本明細書中に参照として援用されている）が優れた抗ウイルス性を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

ここで開示される抗ウイルス性ペプチドは、少なくとも1種のウイルスに対して抗ウイルス性を有する、天然に存在しない人為的に合成された抗ウイルス性ペプチドである。

ここで開示される抗ウイルス性ペプチドは、抗ウイルス性発現に関与する第1のアミノ酸配列として、核移行性配列（nuclear localization signal sequence: NLS）として知られている少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列（NLS）又は該NLSに部分的な改変が施されたアミノ酸配列（以下「NLS関連配列」と総称する場合がある。）を1単位又は2単位以上有している。NLSは種々の生物種やウイルスから同定された配列であり、本来は細胞内で核に移行する種々のポリペプチド

中に存在する塩基性アミノ酸に富む部分的なアミノ酸配列である。例えばR. Truant 及び B. R. Cullenの文献(MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY、19巻(2)、1999年、pp. 1210-1217)には、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に存在するNLSが記載されている。かかる文献の全内容は本明細書中に参照として援用されている。

[0007] また、ここで開示される抗ウイルス性ペプチドは、抗ウイルス性発現に關与する第2のアミノ酸配列として、核外移行性配列(nuclear export signal sequence: NES)として知られている少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列(NES)又は該NESに部分的な改変が施されたアミノ酸配列(以下「NES関連配列」と総称する場合がある。)を1単位又は2単位以上有している。NESは種々の生物種やウイルスから同定された配列であり、本来は細胞内において核外に移行する種々のポリペプチド(例えばリボ核タンパク質)中に存在する比較的ロイシン残基に富む疎水性の部分的なアミノ酸配列である。例えばC. Elfgang、O. Rosorius、L. Hofer、H. Jaksche、J. Hauber及びD. Bevecの文献(PNAS、96巻、1999年、pp. 6229-6234)には、種々のNESが記載されている。かかる文献の全内容は本明細書中に参照として援用されている。

[0008] 本発明者は、上記NLS関連配列とNES関連配列とを合わせ持つように設計されたペプチド鎖が種々のウイルスに対して高い抗ウイルス活性(増殖阻害活性)を発揮し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

ここで開示される抗ウイルス性ペプチドは、主要構成要素として、少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるNLS関連配列およびNES関連配列を有することによって、ヒト及びその他の哺乳類或いは鳥類に感染可能な種々のウイルスに対して高い抗ウイルス活性を発揮し得る。

[0009] 好ましくは、前記抗ウイルス性ペプチドのペプチド鎖中において、前記少なくとも1単位のNLS又はその改変配列と、前記少なくとも1単位のNES又はその改変配列とは、相互に隣接して配置されている。このような配列によって、より高い抗ウイルス活性を発揮させることができる。

従って、このようなペプチドを含む抗ウイルス剤は、本発明によって提供される抗ウイルス剤の好適な一態様である。

[0010] また、好ましくは、上記抗ウイルス性ペプチドのペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数が30以下である。鎖長が短いペプチドは例えば一般的な化学合成法によって容易に製造及び精製することができるとともに、取扱いが容易である。従って、このようなペプチドを含む抗ウイルス剤は、本発明によって提供される生体内及び／又は生体外での利用に好適な抗ウイルス剤の一態様である。

[0011] また、好ましくは、抗ウイルス性ペプチドに含まれる上記NLS又はその改変配列は、ウイルス由来のNLS又はその改変配列である。ウイルス由来のNLS関連配列を有することにより高い抗ウイルス活性が得られ得る。従って、このようなペプチドを含む抗ウイルス剤は、本発明によって提供される好適な抗ウイルス剤の一態様である。

例えば、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4及び配列番号5から成る群から選択されるいずれかの配列番号に示すアミノ酸配列を有することが好ましい。

[0012] また、本発明は他の側面として、ここで開示される抗ウイルス剤の製造方法を提供する。即ち、本発明によって提供される抗ウイルス剤製造方法は、少なくとも1種のウイルスに対して抗ウイルス活性を有する天然に存在しない人為的に合成されたペプチドを主成分とする抗ウイルス剤の製造方法であって、

(a) 核移行性配列(NLS)として知られる(把握される)少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NLSに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なくとも1単位有しており、且つ、核外移行性配列(NES)として知られる(把握される)少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NESに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なくとも1単位有する、ことを特徴とするペプチド鎖を設計すること、および、

(b) 前記設計したペプチド鎖から成る抗ウイルス性ペプチドを合成すること、を包含する方法である。

このようにNLS関連配列及びNES関連配列を含むように設計したペプチド鎖を合成して得られる抗ウイルス性ペプチドを適当な担体(例えば生理食塩水)と混合することにより本発明の抗ウイルス剤を調製することができる。

[0013] 好ましくは、少なくとも1単位のNLS又はその改変配列と、少なくとも1単位のNES又はその改変配列とが相互に隣接して配置されるようにペプチド鎖を設計する。この

ことによって、より高い抗ウイルス活性を発揮し得る抗ウイルス剤を提供することができる。

また、好ましくは、ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数が30以下となるように該ペプチド鎖を設計する。このことによって、取扱いが容易で使用勝手のよい抗ウイルス剤を提供することができる。

[0014] また、好ましくは、NLS又はその改変配列として、ウイルス由来のNLS又はその改変配列を採用する。このことによって、より高い抗ウイルス活性の抗ウイルス剤を提供することができる。例えば、NLS関連配列として、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4及び配列番号5から成る群から選択されるいずれかの配列番号に示すアミノ酸配列を採用することができる。

また本発明は、ここで開示されるいずれかのペプチドを含む抗ウイルス性組成物を用意し、該組成物を患者又は対象物に付与することを特徴とする、ウイルス(例えばインフルエンザウイルス)の増殖を抑制する方法を提供する。換言すれば、本発明は、ウイルスの増殖を抑制するための、ここで開示されるいずれかのペプチドの使用を提供する。

<配列表フリーテキスト>

配列番号4 設計されたNLSペプチド。

配列番号10～13 設計された抗ウイルス性ペプチド。

発明を実施するための最良の形態

[0015] 以下、本発明の好適な実施形態を説明する。なお、本明細書において特に言及している事項(例えば抗ウイルス性ペプチドの一次構造や鎖長)以外の事柄であって本発明の実施に必要な事柄(例えばペプチド合成、ポリヌクレオチド合成、ペプチドを成分とする抗ウイルス剤(抗ウイルス性組成物)の調製に関する一般的な事項)は、有機化学、生化学、遺伝子工学、タンパク質工学、分子生物学、薬学、医学、衛生学等の分野における従来技術に基づく当業者の設計事項として把握され得る。本発明は、本明細書に開示されている内容と当該分野における技術常識とに基づいて実施することができる。なお、以下の説明では、場合に応じてアミノ酸をIUPAC-IUBガイドラインで示されたアミノ酸に関する命名法に準拠した1文字表記(但し配列表で

は3文字表記)で表す。

また、本明細書中で引用されている全ての文献の全ての内容は本明細書中に参照として組み入れられている。

[0016] 本明細書において「天然に存在しない人為的に合成されたペプチド」とは、そのペプチド鎖がそのみで独立して自然界に安定的に存在するものではなく、人為的な化学合成或いは生合成(即ち遺伝子工学に基づく生産)によって製造され、所定の系(例えば抗ウイルス剤を構成する薬剤組成物)の中で安定して存在し得るペプチド断片をいう。

本明細書において「アミノ酸残基」とは、特に言及する場合を除いて、ペプチド鎖のN末端アミノ酸及びC末端アミノ酸を包含する用語である。

本明細書において所定のアミノ酸配列に対して「部分的な改変が施されたアミノ酸配列(改変アミノ酸配列)」とは、当該所定のアミノ酸配列が有する抗ウイルス活性を損なうことなく、1個または数個(例えば9個以下、好ましくは5個以下、特に好ましくは2, 3個)のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加(挿入)されて形成されたアミノ酸配列をいう。例えば、1個又は数個(典型的には2個又は3個)のアミノ酸残基が保守的に置換したいわゆる同類置換(conservative amino acid replacement)によって生じた配列(例えば塩基性アミノ酸残基が別の塩基性アミノ酸残基に置換した配列、疎水性アミノ酸残基が別の疎水性アミノ酸残基に置換した配列)、或いは、所定のアミノ酸配列について1個又は数個(典型的には2個又は3個)のアミノ酸残基が付加(挿入)した若しくは欠失した配列等は、本明細書でいう「部分的な改変が施された配列(改変アミノ酸配列)」に包含される典型例である。

[0017] 本明細書において「抗ウイルス性ペプチド」とは、少なくとも一種のウイルスに対して抗ウイルス活性(増殖阻害活性)を示す複数のペプチド結合を有するアミノ酸ポリマーを指す用語であり、ペプチド鎖に含まれるアミノ酸残基の数によって限定されない。アミノ酸残基数が10程度までのオリゴペプチド或いはそれ以上のアミノ酸残基から成るポリペプチドも本明細書における抗ウイルス性ペプチドに包含される。

即ち、ここで開示される抗ウイルス性ペプチドは天然に存在しない人為的に設計されたペプチドであり、典型的には、抗ウイルス性発現に関与するアミノ酸配列として上

記NLS関連配列及びNES関連配列を有する比較的短いポリペプチドまたはオリゴペプチドである。

[0018] 本明細書において、「NLS」または「核移行性配列」とは、特に言及している場合を除き、特定のアミノ酸配列に限定されず、核移行性(核局在性)配列として既に知られており、種々のジャーナルその他のメディアにおいてNLSとして公開されているアミノ酸配列全般を指す。NLSは塩基性アミノ酸残基に富むアミノ酸配列部分(ドメイン)として知られている。

本発明の抗ウイルス性ペプチドを設計するためのNLS関連配列としては、従来、各種の生物やウイルスから発見されたネイティブなNLSの何れかを選択し、そのアミノ酸配列を利用することができる。なお、本発明の抗ウイルス性ペプチドを設計するために利用し得るネイティブなNLSの具体例(これらに限定されない)を配列番号14～配列番号94に示す。ネイティブなNLSのうち、ウイルス由来のNLSの採用が好ましい。1単位が4アミノ酸残基以下であるネイティブなNLSを採用する場合には、同種又は異なるNLSと組み合わせ、全体で5アミノ酸残基以上となるアミノ酸配列を設計することが好ましい。すなわち、1単位が4アミノ酸残基以下のNLSを2単位以上(典型的には2単位、3単位又は4単位)含むNLS関連配列を設計するとよい。例えばNLSとしてRKRR(配列番号40)を選択した場合、その配列を二単位タンデムに繋いだ8アミノ酸残基から成る配列(RKRRRKRR)をNLS関連配列とすることができる。

特に限定することを意図したものではないが、抗ウイルス剤を調製するために用いられるウイルス由来のNLSの典型例として、HIVのREVタンパク質由来のRQARRNRRRRWR(配列番号1)、HIVのTATタンパク質由来のRKKRRQRRR(配列番号2)、SV40(Simian virus 40)由来のPKKKRKV(配列番号3)が挙げられる。また、配列番号4に示す配列:RKKKRKVは、配列番号3のNLSのN末端プロリン残基をアルギニン残基に置換したNLS改変配列の好適例である。また、配列番号5に示す配列:YGRKKRRQRRRは、HIVのTATタンパク質であり、配列番号2のNLSを包含する。

[0019] 本明細書において「NES」または「核外移行性配列」とは、特に言及している場合を除き、特定のアミノ酸配列に限定されず、核外移行性配列として既に知られており

、種々のジャーナルその他のメディアにおいてNESとして公開されているアミノ酸配列全般を指す。NESはロイシン残基に富み、疎水性の高いアミノ酸配列部分(ドメイン)として知られている。

本発明の抗ウイルス性ペプチドを設計するためのNES関連配列としては、従来、各種の生物やウイルスから発見されたネイティブなNESの何れかを選択し、その配列のまま利用することができる。

特に限定することを意図したものではないが、抗ウイルス剤を調製するために用いられるNESの典型例として、HIV由来のLPPLERLTLD(配列番号6)、マウスのPKI(protein kinase inhibitor)由来のLALKLAGLDI(配列番号7)、HIV由来のLP PDLRLTLD(配列番号8)、HTLV-1由来のLSAQLYSSLSD(配列番号9)が挙げられる。

[0020] 好ましくは、ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数の50%以上がNLS関連配列及びNES関連配列で構成されるペプチドである。ここでNLS関連配列又はNES関連配列について1単位(unit)とは、当該NLS関連配列又はNES関連配列を構成する一つの配列部分(領域若しくはモチーフ)を指す。従って、あるペプチド鎖にNLS関連配列又はNES関連配列が2単位含まれるというときは、それらが同種であるか異種であるかを問わず相互に独立してNLS関連配列又はNES関連配列と認められる配列が当該ペプチド鎖中に二つ存在することを意味する。例えば、配列番号1～5のいずれかに示されるアミノ酸配列がタンデムに2つ並ぶペプチド鎖の場合、当該ペプチドはNLS関連配列を2単位有することとなる。同様に、例えば、配列番号6～9のいずれかに示されるアミノ酸配列がタンデムに2つ並ぶペプチド鎖の場合、当該ペプチドはNES関連配列を2単位有することとなる。

1単位のNLS関連配列及びNES関連配列から構成される短いペプチド鎖から成るペプチドはここで開示される抗ウイルス性ペプチドの典型例であり、抗ウイルス剤(抗ウイルス性組成物)の主成分たる抗ウイルス性ペプチドとして好適である(後述する実施例参照)。NLS関連配列及びNES関連配列の配列順序は特に限定されないが、ペプチド鎖のN末端側にNLS関連配列が配置され、そのC末端側にNES関連配列が配置されることが好ましい。この場合、隣接する一方の抗ウイルス関連配列(

例えばNLS関連配列)のC末端アミノ酸と、他方の抗ウイルス関連配列(例えばNES関連配列)のN末端アミノ酸とが直接結合した形態(後述する各実施例参照)が好ましい。或いは、隣接するNLS関連配列とNES関連配列の間にリンカーとして1～数個の適当なアミノ酸残基(例えば1～数個のグリシン残基)が介在してもよい。

[0021] 全体のアミノ酸配列に対するNLS関連配列及びNES関連配列の占める割合(即ちペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数に占める抗ウイルス関連配列部分を構成するアミノ酸残基数の個数%)は、50%以上であれば特に限定はないが、70%以上が更に好ましく、80%以上が特に好ましい。ペプチド鎖の実質的に全て(例えば90%以上)がNLS関連配列及びNES関連配列により構成されたペプチドが好適である。

なお、本発明の抗ウイルス性ペプチドとしては、全てのアミノ酸残基がL型アミノ酸であるものが好ましいが、抗ウイルス活性を失わない限りにおいて、アミノ酸残基の一部又は全部がD型アミノ酸に置換されているものであってもよい。

[0022] ここで開示される抗ウイルス性ペプチドの鎖長(即ち総アミノ酸残基数)は、NLS関連配列及び／又はNES関連配列の長さに応じて異なり得るので特に限定されないが、全アミノ酸残基数が100以下(典型的には50以下)であることが適当であり、特に30以下程度であることが好ましい。例えば、20～30個程度のアミノ酸残基で構成されるものは高い抗ウイルス活性を奏し得ると共に合成が容易であり利用し易い。

なお、ペプチドのコンホメーション(立体構造)については、使用する環境下で抗ウイルス活性を発揮する限りにおいて、特に限定されるものではないが、免疫原(抗原)になり難いという観点から直鎖状又はヘリックス状のものが好ましい。このような形状のペプチドはエピトープを構成し難い。かかる観点から、抗ウイルス剤に適用する抗ウイルス性ペプチドとしては、直鎖状であり比較的低分子量(典型的には30以下程度(特に20～30程度)のアミノ酸残基数)のものが好適である。

[0023] なお、NLS関連配列及びNES関連配列は、ネイティブなNLS及びNESをそのまま採用し得るが、いずれかのネイティブなアミノ酸配列を改変して得られる配列、例えば1個若しくは複数(好ましくは2～5個程度)のアミノ酸残基を置換、欠失及び／又は付加して成るNLS関連配列(改変配列)及び／又はNES関連配列(改変配列)を

採用しても、抗ウイルス性ペプチド(ペプチド鎖)を容易に設計することができる。

例えばネイティブないずれかのアミノ酸配列(例えば配列番号3のNLS)を改変配列作成のためのベースとし、そこから適当な抗ウイルス活性試験(例えばin vitroで行われる種々の増殖抑制試験)を指標として該配列を改変していくことができる。具体的な改変の手段としては、アミノ酸残基の置換、欠失又は付加(挿入)が挙げられる。即ち、ネイティブなアミノ酸配列を基にして1～数個のアミノ酸残基の置換、欠失又は付加(挿入)を任意に行い、それら改変配列を含むペプチドを製造し、所定の抗ウイルス活性試験(後述する実施例参照)を行う。このことによって当該改変配列が抗ウイルス性ペプチドを設計するために好ましいものであるか否かを容易に判別することができる。

例えば、製造コストを下げる或いは化学合成を容易にするという観点からはアミノ酸残基の欠失が好ましい。構造安定性を向上させるという観点からはアミノ酸残基の付加が好ましい。また、抗ウイルス活性を向上させるという観点からはアミノ酸残基の置換が好ましい。

[0024] 使用される抗ウイルス性ペプチドは、抗ウイルス性を失わない限りにおいて、抗ウイルス関連配列に含まれ得ない配列を部分的に含み得る。特に限定するものではないが、かかる部分配列としてはペプチド鎖における抗ウイルス関連配列部分の3次元形状(典型的には直鎖形状)を維持し得る配列が好ましい。

また、使用される抗ウイルス性ペプチドは、少なくとも一つのアミノ酸残基がアミド化されているものが好ましい。アミノ酸残基(典型的にはペプチド鎖のC末端アミノ酸残基)のカルボキシル基のアミド化により、抗ウイルス性ペプチドの構造安定性(例えばプロテアーゼ耐性)を向上させ得る。

[0025] ここで開示される抗ウイルス性ペプチドは、一般的な化学合成法に準じて容易に製造することができる。例えば、従来公知の固相合成法又は液相合成法のいずれを採用してもよい。アミノ基の保護基としてBoc (t-butyloxycarbonyl) 或いはFmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl)を適用した固相合成法が好適である。ここで開示される抗ウイルス性ペプチドは、市販のペプチド合成機(例えば、PerSeptive Biosystems社、Applied Biosystems社等から入手可能である。)を用いた固相合成法により、所望するアミ

ノ酸配列、修飾(C末端アミド化等)部分を有するペプチド鎖を合成することができる。

[0026] 或いは、遺伝子工学的手法に基づいて抗ウイルス性ペプチドを生合成してもよい。このアプローチは、ペプチド鎖の比較的長いポリペプチドを製造する場合に好適である。すなわち、所望する抗ウイルス性ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列(ATG開始コドンを含む。)のDNAを合成する。そして、このDNAと該アミノ酸配列を宿主細胞内で発現させるための種々の調節エレメント(プロモーター、リボゾーム結合部位、ターミネーター、エンハンサー、発現レベルを制御する種々のシスエレメントを包含する。)とから成る発現用遺伝子構築物を有する組換えベクターを、宿主細胞に応じて構築する。

一般的な技法によって、この組換えベクターを所定の宿主細胞(例えばイースト、昆虫細胞、植物細胞、動物(哺乳類)細胞)に導入し、所定の条件で当該宿主細胞又は該細胞を含む組織や個体を培養する。このことにより、目的とするポリペプチドを細胞内で発現、生産させることができる。そして、宿主細胞(分泌された場合は培地中)からポリペプチドを単離し、精製することによって、目的の抗ウイルス性ペプチドを得ることができる。一般的な技法によって、この組換えベクターを所定の宿主細胞(例えばイースト、昆虫細胞、植物細胞、哺乳類細胞)に導入し、所定の条件で当該宿主細胞又は該細胞を含む組織や個体を培養する。このことにより、目的とするポリペプチドを細胞内で発現、生産させることができる。そして、宿主細胞(分泌された場合は培地中)からポリペプチドを単離し、精製することによって、目的の抗ウイルス性ペプチドを得ることができる。

なお、組換えベクターの構築方法及び構築した組換えベクターの宿主細胞への導入方法等は、当該分野で従来から行われている方法をそのまま採用すればよく、かかる方法自体は特に本発明を特徴付けるものではないため、詳細な説明は省略する。

[0027] 例えば、宿主細胞内で効率よく大量に生産させるために融合タンパク質発現システムを利用することができる。すなわち、目的の抗ウイルス性ペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子(DNA)を化学合成し、該合成遺伝子を適当な融合タンパク質発現用ベクター(例えばノバジェン社から提供されているpETシリーズおよびアマシャム

バイオサイエンス社から提供されているpGEXシリーズのようなGST(Glutathione S-transferase)融合タンパク質発現用ベクター)の好適なサイトに導入する。そして該ベクターにより宿主細胞(典型的には大腸菌)を形質転換する。得られた形質転換体を培養して目的の融合タンパク質を調製する。次いで、該タンパク質を抽出及び精製する。次いで、得られた精製融合タンパク質を所定の酵素(プロテアーゼ)で切断し、遊離した目的のペプチド断片(設計した抗ウイルス性ペプチド)をアフィニティクロマトグラフィー等の方法によって回収する。このような従来公知の融合タンパク質発現システム(例えばアマシャムバイオサイエンス社により提供されるGST/Hisシステムを利用し得る。)を用いることによって、本発明の抗ウイルス性ペプチドを製造することができる。

或いは、無細胞タンパク質合成システム用の鋳型DNA(即ち抗ウイルス性ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む合成遺伝子断片)を構築し、ペプチド合成に必要な種々の化合物(ATP、RNAポリメラーゼ、アミノ酸類等)を使用し、いわゆる無細胞タンパク質合成システムを採用して目的のポリペプチドをインビトロ合成することができる。無細胞タンパク質合成システムについては、例えばShimizuらの論文(Shimizu et al., Nature Biotechnology, 19, 751-755(2001))、Madinらの論文(Madin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(2), 559-564(2000))が参考になる。これら論文の全内容は本明細書中に参照として援用されている。これら論文に記載された技術に基づいて、本願出願時点において既に多くの企業がポリペプチドの受託生産を行っており、また、無細胞タンパク質合成用キット(例えば、日本の東洋紡績(株)から入手可能なPROTEIOS(商標)Wheat germ cell-free protein synthesis kit)が市販されている。

従って、上述のようにして、利用するアミノ酸配列をひとたび決定し、ペプチド鎖を設計しさえすれば、そのアミノ酸配列に従って無細胞タンパク質合成システムによって目的の抗ウイルス性ペプチドを容易に合成・生産することができる。例えば、日本の(株)ポストゲノム研究所のピュアシステム(登録商標)に基づいて本発明の抗ウイルス性ペプチドを容易に生産することができる。

[0028] また、本発明は、ここで開示されるいずれかの抗ウイルス性ペプチドをコードするヌ

クレオチド配列及び／又は該配列と相補的なヌクレオチド配列を含む、天然に存在しない人為的に設計されたポリヌクレオチド(例えばそれら配列により実質的に構成されるポリヌクレオチド)を提供する。

本明細書において「ポリヌクレオチド」とは、複数のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合で結ばれたポリマー(核酸)を指す用語であり、ヌクレオチドの数によって限定されない。種々の長さのDNAフラグメント及びRNAフラグメントが本明細書におけるポリヌクレオチドに包含される。また、「天然に存在しない人為的に設計されたポリヌクレオチド」とは、そのヌクレオチド鎖(全長)がそれ単独で自然界に存在するものではなく、化学合成或いは生合成(即ち遺伝子工学に基づく生産)によって人為的に合成されたポリヌクレオチドをいう。

例えば、好ましいポリヌクレオチドとして、配列番号10～配列番号13のいずれかに示されるアミノ酸配列(または該配列において部分的な改変が施されて成る改変配列)をコードするヌクレオチド配列及び／又は該配列と相補的なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド(例えばそれら配列により実質的に構成されるポリヌクレオチド)が挙げられる。なお、各アミノ酸を規定するコドンの選択には特に制限はなく、利用可能な宿主細胞における使用頻度を考慮しつつ適宜選択すればよい。

[0029] ここで開示される抗ウイルス性ペプチドをコードするヌクレオチド配列及び／又は該配列と相補的なヌクレオチド配列を含む一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドは、従来公知の方法によって容易に製造(合成)することができる。すなわち、設計したアミノ酸配列を構成する各アミノ酸残基に対応するコドンを選択することによって、抗ウイルス性ペプチドのアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列が容易に決定され、提供される。そして、ひとたびヌクレオチド配列が決定されれば、DNA合成機等を利用して、所望するヌクレオチド配列に対応するポリヌクレオチド(一本鎖)を容易に得ることができる。さらに得られた一本鎖DNAを鋳型として用い、種々の酵素的合成手段(典型的にはPCR)を採用して目的の二本鎖DNAを得ることができる。

本発明によって提供されるポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもよく、RNA(mRNA等)の形態であってもよい。DNAは、二本鎖又は一本鎖で提供され得る。一本鎖で提供される場合は、コード鎖(センス鎖)であってもよく、それと相補的な配列

の非コード鎖(アンチセンス鎖)であってもよい。

本発明によって提供されるポリヌクレオチドは、上述のように、種々の宿主細胞中で又は無細胞タンパク質合成システムにて、抗ウイルス性ペプチド生産のための組換え遺伝子(発現カセット)を構築するための材料として使用することができる。

本発明によると、ネイティブなNLSを改変して創出した配列及び／又はネイティブなNESを改変して創出した改変配列を含む新規なアミノ酸配列の抗ウイルス性ペプチドをコードするヌクレオチド配列及び／又は該配列と相補的なヌクレオチド配列を含む天然に存在しない人為的に設計されたポリヌクレオチドが提供される。

[0030] 本発明の抗ウイルス性ペプチドは少なくとも一種のウイルスに対して高い抗ウイルス活性を有する。例えば、種々のヘルペスウイルスのような2本鎖DNAウイルスに対して高い抗ウイルス活性を発揮し得る。また、オルソミクソウイルス科、フラビウイルス科やレトロウイルス科に属するような1本鎖RNAウイルスに対しても抗ウイルス活性を発揮し得る。本発明の抗ウイルス性ペプチドは、特に、インフルエンザウイルスの増殖抑制のための使用に好ましい。

ここで開示される抗ウイルス性ペプチドは、比較的広い抗ウイルススペクトルを有しており、抗ウイルス剤(抗ウイルス性組成物)の主成分として好適に用いられる。例えば、ウイルス感染症の治療、性病のようなウイルス性疾患の予防、口腔内洗浄(うがい)や目の洗浄、等の目的に用いられ得る。

なお、抗ウイルス剤に含有される抗ウイルス性ペプチドは、抗ウイルス活性を損なわない限りにおいて、塩の形態であってもよい。例えば、常法に従って通常使用されている無機酸又は有機酸を付加反応させることにより得られ得る該ペプチドの酸付加塩を使用することができる。或いは、抗ウイルス活性を有する限り、他の塩(例えば金属塩)であってもよい。

[0031] このような目的に使用される抗ウイルス剤は、主成分たる抗ウイルス性ペプチドの他、薬学(製薬)上許容され得る種々の担体(媒体、キャリア等)を含み得る。希釈剤、賦形剤等としてペプチド医薬において一般的に使用される担体が好ましい。抗ウイルス剤の用途や形態に応じて適宜異なり得るが、典型的には、水、生理食塩水のような生理学的緩衝液、種々の有機溶媒が挙げられる。例えば、適当な濃度のアルコール

(エタノール等)水溶液、グリセロール、オリーブ油のような不乾性油であり得る。或いはリポソームであってもよい。また、抗ウイルス剤に含有させ得る副次的成分としては、種々の充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、表面活性剤、色素、香料等が挙げられる。

抗ウイルス剤の形態に関して特に限定はない。例えば、内用剤若しくは外用剤の典型的な形態として、軟膏、液剤、懸濁剤、乳剤、エアロゾル、泡沫剤、顆粒剤、粉末剤、錠剤、カプセルが挙げられる。また、注射等に用いるため、使用直前に生理食塩水又は適当な緩衝液(例えばPBS)等に溶解して薬液を調製するための凍結乾燥物、造粒物とすることもできる。抗ウイルス剤に含まれる担体は、抗ウイルス剤の形態に応じて異なり得る。

なお、抗ウイルス性ペプチド(主成分)及び種々の担体(副成分)を材料にして種々の形態の薬剤(組成物)を調製するプロセス自体は従来公知の方法に準じればよく、かかる製剤方法自体は本発明を特徴付けるものでもないため詳細な説明は省略する。処方に関する詳細な情報源として、例えばComprehensive Medicinal Chemistry, Corwin Hansch監修, Pergamon Press刊(1990)が挙げられる。かかる文献の全内容は本明細書中に参照として援用されている。

[0032] 本発明によって提供される抗ウイルス剤(抗ウイルス性組成物)は、その形態及び目的に応じた方法や用量で使用することができる。

ここで開示される抗ウイルス関連配列を含む抗ウイルス性ペプチドは、比較的高い濃度のカチオン、塩類(例えば塩化ナトリウム)或いは血清のような有機物が存在する系においても高い抗ウイルス活性を維持し得る。従って、ここで開示される抗ウイルス剤は、カチオン、塩類や血清等が存在する系(場)での使用に好適である。例えば、本発明によって提供される抗ウイルス剤(抗ウイルス性組成物)は、液剤として、静脈内、筋肉内、皮下、皮内若しくは腹腔内への注射或いは灌腸によって患者に投与することができる。

従って、本発明によって提供されるウイルス増殖抑制方法の好ましい一態様は、ここで開示されるいずれかの抗ウイルス性ペプチドを含む液状組成物を静脈内、筋肉内、皮下、皮内若しくは腹腔内への注射或いは灌腸によって患者に投与することを

特徴とする方法である。

或いは、錠剤等の固体形態のものは経口投与することができる。従って、本発明によって提供されるウイルス増殖抑制方法の好ましい一態様は、ここで開示されるいずれかの抗ウイルス性ペプチドを含む固体、液体若しくはゲル状組成物を患者に経口投与することを特徴とする方法である。

或いは、衛生陶器表面の洗浄目的に使用する場合は、比較的多量(例えば1~100mg/ml)の抗ウイルス性ペプチドを含有する液剤を対象物の表面に直接スプレーするか、或いは、当該液剤で濡れた布や紙で対象物の表面を拭くとよい。これらは例示にすぎず、従来のペプチド系抗生物質やペプチドを構成成分とする農薬、医薬部外品等と同じ形態、使用方法を適用することができる。従って、本発明によって提供されるウイルス増殖抑制方法の好ましい一態様は、ここで開示されるいずれかの抗ウイルス性ペプチドを含む組成物(典型的には液剤)を衛生陶器(便器等)その他の対象物に付与することを特徴とする方法である。

[0033] また、本発明の抗ウイルス性ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、いわゆる遺伝子治療に使用する素材として用い得る。例えば、抗ウイルス性ペプチドをコードする遺伝子(典型的にはDNAセグメント、或いはRNAセグメント)を適当なベクターに組み込み、目的とする部位に導入することにより、常時、生体(細胞)内で本発明に係る抗ウイルス性ペプチドを発現させることが可能である。従って、本発明の抗ウイルス性ペプチドをコードするポリヌクレオチド(DNAセグメント、RNAセグメント等)は、ウイルス感染を予防し又は治療する薬剤として有用である。

[0034] 再生医療の分野において、皮膚、骨、各種の臓器の培養時のウイルス感染を防止することは重要である。ここで開示される抗ウイルス性ペプチドは、哺乳動物細胞及び組織に対する毒性が極めて低く、ウイルスに選択的に抗ウイルス作用を示し得る。このため、培養臓器等のウイルス感染を防止する薬剤として極めて有用である。例えば、後述する実施例に示すように、適当な濃度で本発明の抗ウイルス性ペプチド単独又は当該ペプチドを主成分の一つとする抗ウイルス剤(抗ウイルス性組成物)を培養液中に添加することにより、培養中の臓器、組織、細胞等の生体物がウイルスに感染するのを防止することができる。従って、本発明によって提供されるウイルス増殖抑

制方法の好ましい一態様は、ここで開示されるいずれかの抗ウイルス性ペプチドを、対象物としての臓器(器官)、組織または細胞の培養液中に添加することを特徴とする方法である。

また、培養細胞や培養組織に対して、本発明の抗ウイルス性ペプチドをコードするポリヌクレオチドを遺伝子治療に使用する素材として用いることができる。例えば、本発明の抗ウイルス性ペプチドをコードする遺伝子(典型的にはDNAセグメント又はRNAセグメント)を適当なベクターに組み込み、目的とする培養組織に導入することにより、常時或いは所望する時期に培養組織(細胞)内で本発明に係る抗ウイルス性ペプチドを発現させることが可能である。従って、本発明によって提供される本発明の抗ウイルス性ペプチドをコードするポリヌクレオチド(DNAセグメント、RNAセグメント等)は、培養組織のウイルス感染を防止する薬剤として有用である。

[0035] 以下、本発明に関するいくつかの実施例を説明するが、本発明をかかえる実施例に示すものに限定することを意図したものではない。

[0036] <実施例1:ペプチド合成>

計8種類のペプチド(サンプル1~4、比較サンプル1~4)を後述するペプチド合成機を用いて製造した。表1には、これら合成ペプチドのアミノ酸配列を列挙している。

[0037] [表1]

T a b l e 1

試料 No.	アミノ酸配列	総アミノ酸残基数
サンプル1	RQARRNRRRRWR LPPLERLTLD-CONH ₂ (配列番号10)	22
サンプル2	LPPLERLTLD RQARRNRRRRWR-CONH ₂ (配列番号11)	22
サンプル3	YGRKKRRQRRR LPPLERLTLD-CONH ₂ (配列番号12)	21
サンプル4	RKKKRKV LALKAGLDI-CONH ₂ (配列番号13)	16
比較サンプル1	RQARRNRRRRWR-CONH ₂ (配列番号1)	12
比較サンプル2	LPPLERLTLD-CONH ₂ (配列番号6)	10
比較サンプル3	YGRKKRRQRRR-CONH ₂ (配列番号5)	11
比較サンプル4	RKKKRKV-CONH ₂ (配列番号4)	7

[0038] 表1に示すように、サンプル1～4は、いずれも1単位のNLS関連配列と1単位のNES関連配列を相互に隣接して有している。

即ち、サンプル1のペプチド(配列番号10)は、ペプチド鎖のN末端側にNLS関連配列としてHIVのREVタンパク質由来のRQARRNRRRRWR(配列番号1)を有し、そのC末端側にNES関連配列としてHIV由来のLPPLERLTLD(配列番号6)を有している。

サンプル2のペプチド(配列番号11)は、サンプル1とは逆に、ペプチド鎖のN末端側にNES関連配列であるLPPLERLTLD(配列番号6)を有し、そのC末端側にNLS関連配列としてRQARRNRRRRWR(配列番号1)を有している。

サンプル3のペプチド(配列番号12)は、ペプチド鎖のN末端側にNLS関連配列としてHIVのTATタンパク質であるYGRKKRRQRRR(配列番号5)を有し、そのC末端側にNES関連配列としてHIV由来のLPPLERLTLD(配列番号6)を有している。

サンプル4のペプチド(配列番号13)は、ペプチド鎖のN末端側にNLS関連配列としてSV40由来のNLS(配列番号3)の改変配列であるRKKKKRKV(配列番号4)を有し、そのC末端側にNES関連配列としてマウスPKI由来のLALKLAGLDI(配列番号7)から1ロイシン残基欠失させた改変配列を有している。

一方、比較サンプル1のペプチドは、NLS関連配列であるRQARRNRRRRWR(配列番号1)のみから成る。比較サンプル2のペプチドは、NES関連配列であるLPPLERLTLD(配列番号6)のみから成る。比較サンプル3のペプチドは、NLS関連配列であるYGRKKRRQRRR(配列番号5)のみから成る。比較サンプル4のペプチドは、NLS関連配列であるRKKKKRKV(配列番号4)のみから成る。

なお、いずれのサンプルも、C末端アミノ酸のカルボキシル基($-\text{COOH}$)はアミド化($-\text{CONH}_2$)されている。

[0039] 上述した各ペプチドは、市販のペプチド合成機(PEPTIDE SYNTHESIZER 9050、PerSeptive Biosystems社製品)を用いて固相合成法(Fmoc法)により合成した。なお、縮合剤としてHATU(Applied Biosystems社製品)を使用し、固相合成法に用いた樹脂及びアミノ酸はNOVA biochem社から購入した。アミノ酸配列のC末端をアミド化す

る場合には、固相担体として「Rink Amide resin (100～200 mesh)」を使用した。

而して、上記ペプチド合成機の合成プログラムに準じて脱保護基反応及び縮合反応を反復して樹脂に結合するFmoc-アミノ酸からペプチド鎖を伸長していき、目的の鎖長の合成ペプチドを得た。具体的には、20%ピペリジン/ジメチルホルムアミド(DMF)(ペプチド合成用グレード、関東化学(株)製品)によって、アミノ酸のアミノ保護基であるFmocを切断除去し、DMFで洗浄し、Fmoc-アミノ酸(-OH)各4eqを反応させ、DMFで洗浄する操作を反復した。そして、ペプチド鎖の伸長反応が全て終了した後、20%ピペリジン/DMFによりFmoc基を切断し、DMF、メタノールの順で上記反応物を洗浄した。

[0040] 固相合成後、合成したペプチド鎖を樹脂と共に遠沈管に移し、エタノール1.8 mL、*m*-クレゾール0.6 mL、チオアニソール3.6 mL及びトリフルオロ酢酸24 mLを加え、室温で2時間攪拌した。その後、ペプチド鎖に結合していた樹脂を濾過して除去した。

次いで、濾液に冷却エタノールを加え、氷冷水で冷却してペプチド沈澱物を得た。その後、遠心分離(2500rpmで5分間)によって上澄みを廃棄した。沈澱物に冷ジエチルエーテルを新たに加えて十分に攪拌した後、上記と同じ条件で遠心分離を行った。この攪拌と遠心分離の処理を計3回反復して行った。

[0041] 得られたペプチド沈澱物を真空乾燥し、高速液体クロマトグラフ(Waters 600: Waters社製品)を用いて精製を行った。

具体的には、プレカラム(日本ウォーターズ(株)製品、Guard-Pak Delta-pak C18 A 300)及びC18逆相カラム(日本ウォーターズ(株)製品、XTerra(登録商標)カラム、MS C18、5 μ m、4.6 $\times$ 150 mm)を使用し、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液との混合液を溶離液に用いた。即ち、溶離液に含まれる上記トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液の分量を経時的に増大させつつ(容積比で10%から80%への濃度勾配を設ける)、1.5 mL/分の流速で上記カラムを用いて30～40分間の分離精製を行った。なお、逆相カラムから溶離したペプチドは紫外線検出器(490E Detector: Waters社製品)を用いて波長: 220 nmで検出され、記録チャート上にピークとして示される。

また、溶離した各ペプチドの分子量をPerSeptive Biosystems社製のVoyager DE RP (商標)を用いてMALDI-TOF/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry:マトリックス支援レーザーイオン化－飛行時間型－質量分析)に基づいて決定した。その結果、目的のペプチドが合成・精製されていることが確認された。

[0042] <実施例2:合成ペプチドの抗ウイルス活性(1)>

各サンプルの抗ウイルス性ペプチド及び各比較サンプルのペプチドについて、抗ウイルス活性(ウイルス増殖抑制効果)を調べた。本実施例では、対象ウイルスとしてHVT(七面鳥ヘルペスウイルス)を使用し、プラークアッセイ法に基づいて力価を測定した。

即ち、SPF(特定病原体未感染)の発育鶏卵(日生研株式会社より購入)から調製した鶏胚繊維芽(CEF)細胞をライボビッツ/マッコイ5A(1:1)混合培地(LM培地)を使用して37℃で単層培養した。培養物をトリプシン消化して培養皿から剥がし、50 mLの遠心チューブに移した。遠心分離後に上清を捨て、LM培地で懸濁した。

ウイルス力価を予め測定しておいたHVT(ワクチンとして用いられているFC-126株)をこの懸濁細胞で2mLあたり100プラーク形成単位(PFU)又は400PFUになるように希釈した。この希釈液を6ウェルプレートの各ウェルに2mLずつ撒布した。次いで、被検ペプチド(サンプル1～4、比較サンプル1～4)を2.1mM、1050 μ M、210 μ MとなるようにPBSで希釈し、各ウェルに0.1mLずつ添加した。添加後の各ウェルの最終濃度は、それぞれ、100 μ M、50 μ M、10 μ Mとなる。対照区としてペプチドを含まないPBSを0.1mL添加したウェルを用意した。

また、被検ペプチドの細胞毒性を調べるためのコントロール群として、ウイルスを全く含まないCEF細胞のみの懸濁液を2mLずつ撒布したウェルを用意し、各濃度のペプチドを0.1mLずつ添加した。

[0043] その後、上記6ウェルプレートをCO₂インキュベーター(5%CO₂)に入れて37℃で6日間培養し、出現したHVTプラークの数と大きさを観察した。ここで、ペプチド無添加のウェルと比較して、ペプチドを添加してもプラーク数の減少やプラークサイズの縮小が認められない場合、そのペプチドのウイルス増殖抑制効果は無しと判断した。一

方、プラーク数やプラークサイズの小さくなったウェルが存在した被検ペプチドについては、各ウェルの力価を測定し、ペプチド無添加でのウイルス量と比較することによってウイルス増殖抑制効果(抗ウイルス活性)を数値化した。

HVTウイルス力価の測定法は、各ウェル中の細胞をトリプシン消化して回収し、段階希釈して再度CEF細胞と混合して6ウェルプレートに撒いて37℃で培養し、6日後に出現するプラーク数をカウントした。ペプチド無添加のウェルのウイルス力価(PFU/mL)を1として、各ペプチド濃度でのウイルス力価の相対比を求めた。即ち、各被検ペプチドのウイルス増殖抑制効果はこの相対比(Ratio)の数値を用いて比較することができる。

結果を表2に示す。

[0044] [表2]

T a b l e 2

試料 No.	ペプチド濃度							
	0 μ M		1 0 μ M		5 0 μ M		1 0 0 μ M	
	Titer	Ratio	Titer	Ratio	Titer	Ratio	Titer	Ratio
サンプル 1	1.04×10^5	1.0	7.8×10^4	0.75	2.6×10^4	0.25	1.4×10^4	0.13
サンプル 2	8.8×10^4	1.0	8.0×10^4	0.91	5.2×10^4	0.59	5.0×10^4	0.57
サンプル 3	8.8×10^4	1.0	7.3×10^4	0.83	5.2×10^4	0.59	3.3×10^4	0.38
サンプル 4	1.9×10^4	1.0	1.8×10^4	0.95	9.0×10^3	0.47	4.5×10^3	0.24
比較サンプル 1	ウイルス増殖抑制効果無し							
比較サンプル 2	ウイルス増殖抑制効果無し							
比較サンプル 3	ウイルス増殖抑制効果無し							
比較サンプル 4	ウイルス増殖抑制効果無し							

Titer : PFU/mL

[0045] 表2より明らかなように、NLS関連配列とNES関連配列を有する各サンプルペプチドは、いずれも良好な抗ウイルス活性(ウイルス増殖抑制効果)を示した。他方、NLS関連配列のみ或いはNES関連配列のみから成る各比較サンプルペプチドは、抗ウイルス活性(ウイルス増殖抑制効果)は全く認められなかった。

また、いずれのサンプルについても細胞毒性は認められず、本発明によって提供さ

れる抗ウイルス剤の有用性が示された。

[0046] <実施例3:合成ペプチドの抗ウイルス活性(2)>

次に、サンプル1及びサンプル4について、他のウイルスを対象にして抗ウイルス活性(ウイルス増殖抑制効果)を調べた。

本実施例では、対象ウイルスとして鳥に感染するヘルペスウイルスの一種であるMDV(マレック病ウイルス)を使用し、TCID₅₀(50% Tissue Culture Infections Dose)法に基づいて力価(感染価)を測定した。

即ち、SPFの発育鶏卵(日生研株式会社より購入)から調製した鶏胚繊維芽(CEF)細胞をライボビッツ/マッコイ5A(1:1)混合培地(LM培地)を使用して37℃で単層培養した。培養物をトリプシン消化して培養皿から剥がし、50mLの遠心チューブに移した。遠心分離後に上清を捨て、LM培地で懸濁した。

ウイルス力価を予め測定しておいたMDV1型(MDV Serotype 1)Md5株をこの懸濁細胞で2mLあたり 2×10^2 TCID₅₀になるように希釈した。この希釈液を6ウェルプレートの各ウェルに2mLずつ撒布した。次いで、被検ペプチド(サンプル1~4、比較サンプル1~4)を2.1mM、1050 μ MとなるようにPBSで希釈し、各ウェルに0.1mLずつ添加した。添加後の各ウェルの最終濃度は、それぞれ、100 μ M、50 μ Mとなる。対照区としてペプチドを含まないPBSを0.1mL添加したウェルを用意した。

また、被検ペプチドの細胞毒性を調べるためのコントロール群として、ウイルスを全く含まないCEF細胞のみの懸濁液を2mLずつ撒布したウェルを用意し、各濃度のペプチドを0.1mLずつ添加した。

[0047] その後、上記6ウェルプレートをCO₂インキュベーター(5%CO₂)に入れて37℃で4日間培養した。そして、各ウェルの増殖したMDVウイルス力価を以下のように測定した。

即ち、各ウェル中の細胞をトリプシン消化して回収し、再度CEF細胞懸濁液で段階希釈し、各希釈液をそれぞれ24ウェルプレートのうちの5ウェルに撒いて37℃で培養した。4日後、そのウェルにCPE(細胞変性効果)が出現するか否かを調べた。その結果から、常法であるReed-Muench法(Reed and Muench method)によって感染価(TCID₅₀)を算出した。結果を表3に示す。

[0048] [表3]

T a b l e 3

試料 No.	ペプチド濃度					
	0 μ M		50 μ M		100 μ M	
	Titer	Ratio	Titer	Ratio	Titer	Ratio
サンプル1	6.76×10^6	1.0	2.40×10^6	0.36	6.76×10^5	0.1
サンプル4	6.76×10^6	1.0	4.27×10^6	0.63	3.16×10^6	0.47

Titer : TCID₅₀

[0049] 表3より明らかなように、サンプル1及びサンプル4のいずれもMDVに対して良好な抗ウイルス活性(ウイルス増殖抑制効果)を示した。この結果より、ここで開示される抗ウイルス性ペプチドは複数種のウイルスに対して抗ウイルス活性を発揮し得ることが確かめられた。また、いずれのサンプルについても細胞毒性は認められなかった。

[0050] <実施例4:合成ペプチドの抗ウイルス活性(3)>

次に、一部のサンプル(上記サンプル3)について、ヒトに感染するインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス活性(ウイルス増殖抑制効果)を調べた。本実施例では、対象ウイルスとしてAソ連型(H1N1)のインフルエンザウイルス株である「A/ニューカレドニア/20/99(H1N1)」株を使用し、被感染細胞としてイヌ腎臓由来の樹立細胞株であるMDCK(Madrin Darby Canine Kidney)細胞を使用し、以下のような増殖阻害アッセイ(プラークアッセイ)を行った。

即ち、10%FBSを含むイーグルMEM培地(カナマイシン、炭酸水素ナトリウムを含む)にMDCK細胞を添加した細胞懸濁液を、6ウェルプレートの各ウェルに3mLずつ添加した。このプレートをCO₂インキュベーター(5%CO₂)に入れて37℃で3日間培養した。

[0051] 上記培養によりMDCK細胞から成るフルシート(単層)が形成されたウェルから培養上清液を除き、2mLのPBSをウェルに加えて洗浄した。この洗浄は2回繰り返した。次いで、MEM培地(FBS無添加、0.02%デキストラン及び1 μ g/mLのトリ

プシンを含む)で 10^4 PFU/mLとなるように調製したウイルス液をウェル当たり0.1mL接種し、5%CO₂存在下、34°Cで1時間培養し、ウイルスを細胞に吸着させた。培養後、添加後の各ウェルのペプチド最終濃度が50 μM、10 μMとなるように所定濃度の被検ペプチドを含むMEM培地(FBS無添加、0.02%デキストラン及び1 μg/mLのトリプシンを含む)2mLを添加した。なお、対照区(コントロール)としてペプチドを含まない上記MEM培地2mLを添加したウェルを用意した。さらに、被検ペプチドの細胞毒性を調べるためのコントロール群として、上記ウイルス液を添加していない(即ちウイルスを含まない)MDCK細胞を含む(フルシートが形成された)ウェルに所定濃度の被検ペプチドを含むMEM培地(FBS無添加、0.02%デキストラン及び1 μg/mLのトリプシンを含む)2mLを添加したウェルも用意した。そして5%CO₂存在下、34°Cで48時間培養した。

[0052] 48時間の培養後、上記対照区(被検ペプチド無添加区)で細胞の変性が確認されたことを条件に、各試験ウェルから培養上清液を回収し、該上清液に含まれるウイルスの感染価をプラークアッセイにより求めた。

具体的には、10%FBSを含むイーグルMEM培地(カナマイシン、炭酸水素ナトリウムを含む)にMDCK細胞を添加した細胞懸濁液を、6ウェルプレートの各ウェルに3mLずつ添加し、5%CO₂の存在下、37°Cで3日間培養した。培養によりMDCK細胞から成るフルシート(単層)が形成されたウェルから培養上清液を除き、2mLのPBSでウェルを2回洗浄した。洗浄後、上記回収した培養上清液をPBSで段階的に希釈して希釈液群(アッセイ供試用サンプル群)を作製し、各希釈液をウェル当たり1mL接種し、5%CO₂存在下、34°Cで1時間培養した。その後、ウェル内にMEM寒天培地(FBS無添加、0.02%デキストラン及び1 μg/mLのトリプシンを含む)を3mL添加(重層)し、当該培地が固化するまで室温で放置した。固化したらプレートを裏返し、その裏返し状態で5%CO₂存在下、34°Cで3日間培養した。

[0053] 次いで、3.7%ホルマリンを含むPBSをウェル当たり2mL添加し、少なくとも1時間放置することによりウェル内の細胞を固定した。その後、水流で寒天を除き、0.03%メチレンブルー溶液2mLを加えて少なくとも1時間放置することによりウェル内の細胞を染色した。染色後、水洗して裏返して自然乾燥させた。そうして一晩放置後、ウェ

ル中のプラーク数をカウントし、PFUを計算した。以上のプラークアッセイは計2回行った。結果を表4に示す。

[0054] [表4]

T a b l e 4

試料 No.	ペプチド濃度	Infectivity Titer (PFU/mL)	
		1 回目	2 回目
Control	0 μ M	2.1×10^9	2.1×10^9
サンプル 3	50 μ M	6.8×10^8	7.9×10^8
サンプル 3	100 μ M	6.1×10^8	3.2×10^8

[0055] 表4に示すように、サンプル3の添加によってインフルエンザウイルスの増殖を抑制することができた。また、ペプチド濃度が高いものほど感染価(PFU)の値は低くなることが確認された。このことにより、NLS関連配列とNES関連配列を有するペプチドが良好な抗インフルエンザウイルス活性を有することが確認された。また、上述の実施例と同様、サンプルペプチドに細胞毒性は認められなかった。

[0056] <実施例5:顆粒剤の調製>

サンプル1のペプチド50mgと結晶化セルロース50mg及び乳糖400mgとを混合した後、エタノールと水の混合液1mLを加え混練した。この混練物を常法に従って造粒し、抗ウイルス性ペプチドを主成分とする顆粒剤(顆粒状抗ウイルス性組成物)を得た。

[0057] 以上、本発明の具体例を詳細に説明したが、これらは例示にすぎず、特許請求の範囲を限定するものではない。特許請求の範囲に記載の技術には、以上に例示した具体例を様々に変形、変更したものが含まれる。

例えば、本実施例では、NES関連配列として配列番号6及び配列番号7に示すものを採用しているが、他の既知のNES(例えば配列番号8又は配列番号9に示すもの)或いはそれらの改変配列を採用してもよい。

請求の範囲

- [1] 少なくとも1種のウイルスに対して抗ウイルス活性を有する、天然に存在しない人為的に合成されたペプチドを主成分とする抗ウイルス剤であって、
- 核移行性配列 (NLS) として知られる少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NLSに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なくとも1単位有しており、且つ、
- 核外移行性配列 (NES) として知られる少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NESに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なくとも1単位有する、
- ことを特徴とする抗ウイルス性ペプチドと、
- 薬学的に許容され得る担体と、
- を含む、抗ウイルス剤。
- [2] 前記抗ウイルス性ペプチドのペプチド鎖中において、
- 前記少なくとも1単位のNLS又はその改変配列と、前記少なくとも1単位のNES又はその改変配列とは、相互に隣接して配置されている、請求項1に記載の抗ウイルス剤。
- [3] 前記抗ウイルス性ペプチドのペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数が30以下である、請求項2に記載の抗ウイルス剤。
- [4] 前記NLS又はその改変配列は、ウイルス由来のNLS又はその改変配列である、請求項3に記載の抗ウイルス剤。
- [5] 前記抗ウイルス性ペプチドは、前記少なくとも1単位のNLS又はその改変配列として、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4及び配列番号5から成る群から選択されるいずれかの配列番号に示すアミノ酸配列を有する、請求項4に記載の抗ウイルス剤。
- [6] 少なくとも1種のウイルスに対して抗ウイルス活性を有する、天然に存在しない人為的に合成されたペプチドを主成分とする抗ウイルス剤の製造方法であって：
- (a) 核移行性配列 (NLS) として知られる少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NLSに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なく

とも1単位有しており、且つ、

核外移行性配列 (NES) として知られる少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NESに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なくとも1単位有する、

ことを特徴とするペプチド鎖を設計すること；

および

(b) 前記設計したペプチド鎖から成る抗ウイルス性ペプチドを合成すること；
を包含する方法。

- [7] 前記少なくとも1単位のNLS又はその改変配列と、前記少なくとも1単位のNES又はその改変配列とが相互に隣接して配置されるように前記ペプチド鎖を設計する、請求項6に記載の製造方法。
- [8] ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数が30以下となるように該ペプチド鎖を設計する、請求項7に記載の製造方法。
- [9] 前記NLS又はその改変配列として、ウイルス由来のNLS又はその改変配列を採用する、請求項8に記載の製造方法。
- [10] 前記NLS又はその改変配列として、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4及び配列番号5から成る群から選択されるいずれかの配列番号に示すアミノ酸配列を採用する、請求項9に記載の製造方法。
- [11] ウイルスの増殖を抑制する方法であって：
核移行性配列 (NLS) として知られる少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NLSに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なくとも1単位有しており、且つ、核外移行性配列 (NES) として知られる少なくとも5個の連続するアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列又は該NESに部分的な改変が施されたアミノ酸配列を少なくとも1単位有することを特徴とするペプチドを含む抗ウイルス性組成物を用意すること；
および
前記組成物を患者又は対象物に付与すること；
を包含する方法。

- [12] 前記ペプチドのペプチド鎖中において、前記少なくとも1単位のNLS又はその改変配列と、前記少なくとも1単位のNES又はその改変配列とは、相互に隣接して配置されている、請求項11に記載の方法。
- [13] 前記ペプチドのペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数が30以下である、請求項12に記載の方法。
- [14] 前記ウイルスがインフルエンザウイルスである、請求項11に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053738

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C07K14/005(2006.01)i

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)

A61K38/00, A61P31/12, C07K7/06, C07K7/08, C07K14/005

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007

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

CA(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), EMBASE(STN), JMEDPlus(JDream2), JSTPlus(JDream2), JST7580(JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2003/091429 A1 (Toagosei Co., Ltd.), 06 November, 2003 (06.11.03), Full text; particularly, Claim 6 & AU 2003231471 A1 & EP 1502949 A1 & CN 1650005 A & US 2006/0057668 A1	1-10
A	LIXIN LIU, et al., ZAP is a CRM1-dependent nucleocytoplasmic shuttling protein, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, Vol.321, pages 517-523, full text, particularly, abstract	1-10
A	WO 1999/009056 A1 (UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEWJERSEY), 25 February, 1999 (25.02.99), Full text; particularly, page 1, line 25 to page 2, line 9 & AU 9889126 A & US 6468969 B1	1-10

☐ 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

04 April, 2007 (04.04.07)

Date of mailing of the international search report

17 April, 2007 (17.04.07)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053738

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.: 11 - 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 11 to 14 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
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:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C07K14/005(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. A61K38/00, A61P31/12, C07K7/06, C07K7/08, C07K14/005			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 0 7 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 0 7 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 0 7 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2), JST7580 (JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2003/091429 A1（東亜合成株式会社）2003.11.06, 文献全体、特に、請求項6参照 & AU 2003231471 A1 & EP 1502949 A1 & CN 1650005 A & US 2006/0057668 A1		1-10
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 0 4 . 0 4 . 2 0 0 7		国際調査報告の発送日 1 7 . 0 4 . 2 0 0 7	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 山田 靖 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4 C 3755

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LIXIN LIU, <i>et al.</i> , ZAP is a CRM1-dependent nucleocytoplasmic shuttling protein, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, Vol.321, pages 517-523 文献全体、特に、要約参照	1-10
A	WO 1999/009056 A1 (UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY) 1999.02.25, 文献全体、特に、第1頁第25行～第2頁第9行参照 & AU 9889126 A & US 6468969 B1	1-10

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲11-14に記載のものは、治療による人体の処置方法に関するものであって、P C T 17条(2)(a)(i)、及びP C T 規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。