

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7028802号
(P7028802)

(45)発行日 令和4年3月2日(2022.3.2)

(24)登録日 令和4年2月21日(2022.2.21)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/62 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/62
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	14/47 (2006.01)		C 0 7 K	14/47
C 0 7 K	14/76 (2006.01)		C 0 7 K	14/76
C 1 2 N	15/12 (2006.01)		C 1 2 N	15/12

請求項の数 20 (全15頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-563544(P2018-563544)
 (86)(22)出願日 平成29年10月11日(2017.10.11)
 (65)公表番号 特表2019-532616(P2019-532616)
 A)
 (43)公表日 令和1年11月14日(2019.11.14)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/056030
 (87)国際公開番号 WO2018/071465
 (87)国際公開日 平成30年4月19日(2018.4.19)
 審査請求日 令和2年10月7日(2020.10.7)
 (31)優先権主張番号 62/406,552
 (32)優先日 平成28年10月11日(2016.10.11)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 518424420
 ウエルスタッフ オフサルミックス コーポレーション
 W E L L S T A T O P H T H A L M I
 C S C O R P O R A T I O N
 アメリカ国 メリーランド 2 0 8 5 0 口
 ックビル スイート 6 0 0 シェイディグ
 ローブロード 1 4 2 0 0
 (74)代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (74)代理人 100102255
 弁理士 小澤 誠次
 (74)代理人 100096482
 弁理士 東海 裕作
 (74)代理人 100188352

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 短鎖型桿体由来錐体生存因子及び親水性ペプチド間の融合タンパク質

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

(a) 第1のN末端シグナルペプチド配列、前記シグナルペプチド配列のC末端にある第2のペプチド配列、及び前記第2のペプチド配列のC末端にある第3のペプチド配列；又は(b) 第2のペプチド配列及び前記第2のペプチド配列のC末端にある第3のペプチド配列；を含む融合タンパク質であって、

前記第1のペプチド配列が、I g k シグナル配列であり、前記第2のペプチド配列がR d C V F - 短鎖ペプチド配列であり、前記第3のペプチド配列がヒトアルブミンであり；かつ配列（配列番号3）又は（配列番号3）のアミノ酸2 2 ~ 7 3 2 を有する、前記融合タンパク質。

【請求項2】

請求項1に記載の融合タンパク質をコードする核酸。

【請求項3】

D N A である、請求項2に記載の核酸。

【請求項4】

配列（配列番号3）を有する融合タンパク質をコードする、請求項2に記載の核酸。

【請求項5】

配列（配列番号4）を有する、請求項4に記載の核酸。

【請求項6】

制御配列に作動可能に連結された、請求項2~5のいずれかに記載の核酸を含む発現ベク

ター。

【請求項 7】

制御配列がプロモーターである、請求項6に記載の発現ベクター。

【請求項 8】

プロモーターがCMVプロモーターである、請求項7に記載の発現ベクター。

【請求項 9】

ベクターがプラスミドである、請求項6に記載の発現ベクター。

【請求項 10】

ベクターがAAV発現プラスミドである、請求項9に記載の発現ベクター。

【請求項 11】

ベクターがウイルスベクターである、請求項6に記載の発現ベクター。

【請求項 12】

ウイルスベクターが、AAVベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、及び合成ウイルスベクターからなる群から選択される、請求項11に記載の発現ベクター。

【請求項 13】

請求項2～5のいずれかに記載の核酸又は請求項6～12のいずれかに記載の発現ベクターを含む細胞。

【請求項 14】

(i) 請求項1に記載の融合タンパク質、請求項2～5のいずれかに記載の核酸、請求項6～12のいずれかに記載の発現ベクター、及び、請求項13に記載の細胞からなる群から選択される成分；及び(ii) 薬学的に許容される担体；を含む医薬組成物。

【請求項 15】

哺乳動物患者における状態の治療剤であって、請求項1に記載の融合タンパク質、請求項2～5のいずれかに記載の核酸、請求項6～12のいずれかに記載の発現ベクター、請求項13に記載の細胞、又は請求項14に記載の医薬組成物を含み、投与され、それにより前記患者における前記状態が治療され、

前記状態が、網膜ジストロフィー、シュタルガルト病、色素性網膜炎、萎縮型加齢性黄斑変性症（萎縮型AMD）、地図状萎縮（萎縮型AMDの進行期）、滲出型加齢性黄斑変性症（滲出型AMD）、高眼圧を伴う又は伴わない緑内障、糖尿病性網膜症、バルデ・ビードル症候群、バッセン・コーンツヴァイク症候群、ベスト病、コロイデマ、脳回転状萎縮症、先天性黒内障、レフサン症候群、アッシャー症候群、甲状腺関連眼疾患、グレーブ病、網膜色素上皮細胞に関連する疾患、前眼部疾患、水晶体疾患／白内障、眼杯障害、ブドウ膜炎、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、及び嗅覚疾患からなる群から選択される、前記治療剤。

【請求項 16】

状態が眼の状態であり、投与が網膜下注射及び硝子体内注射からなる群から選択される、請求項15に記載の剤。

【請求項 17】

患者における眼の光受容器細胞の保護剤であって、請求項1に記載の融合タンパク質、請求項2～5のいずれかに記載の核酸、請求項6～12のいずれかに記載の発現ベクター、請求項13に記載の細胞、又は請求項14に記載の医薬組成物を含み、投与され、それにより前記患者における前記眼の光受容器細胞を保護する、前記保護剤。

【請求項 18】

投与が、網膜下注射及び硝子体内注射からなる群から選択される、請求項17に記載の剤。

【請求項 19】

患者がヒト患者である、請求項15～18のいずれかに記載の剤。

【請求項 20】

請求項1に記載の融合タンパク質を産生する方法であって、コードされた前記融合タンパク質の発現及び分泌を可能にする条件下で請求項13に記載の細胞を培養するステップで

10

20

30

40

50

あって、前記細胞が発現ベクターを含み、前記発現ベクターが配列（配列番号3）を有する融合タンパク質をコードする核酸を含み、前記核酸が制御配列に作動可能に連結されている、前記ステップ、並びに前記融合タンパク質を前記細胞培養物から単離するステップを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表への参照

Annex C / S T . 2 5 テキストファイルの形態で電子的に提出された配列表と、付属ファイル参照番号 W O C - 0 1 9 P C T は、開示の一部である。

10

【背景技術】

【0002】

R d C V F は、網膜における桿体光受容器細胞によって特異的に発現されるチオレドキシン様タンパク質である (Leveillard et al. (2004) *Nature Genetics* 36:755 ~ 759 及び補足情報)。2つの異なる R d C V F 遺伝子がヒトで見出され、それらは R d C V F 1 及び R d C V F 2 と称される。両方の R d C V F 遺伝子は、選択的スプライシングを介した2つの産物をコードしており、それぞれ R d C V F - long (R d C V F L) 及び R d C V F - short (R d C V F S) として知られる全長のタンパク質及び C 末端転写後短縮タンパク質である。ヌクレオレドキシン (nucleoredoxin) 様 1 遺伝子 (N x n 1 1) は、選択的スプライシング機構により、長鎖型と短鎖型 R d C V F をコードする。N x n 1 1 ノックアウトは、マウスの桿体及び錐体の進行性喪失をもたらし、遺伝子レベルで、この遺伝子は、光受容器細胞が生存するためと、適切な網膜の生理機能を維持するために基本的に不可欠であることを示唆している。

20

【0003】

R d C V F S は、錐体生存を促進する分泌栄養因子として、そして R d C V F L は、細胞内タンパク質と相互作用するレドックス活性酵素として記載されている (Leveillard et al. (2010) *Sci Transl Med.* 2(26):26ps16)。例えば、tau は R d C V F - L に対する結合パートナーとして記載され、tau は専ら細胞内である (Fridlich et al. (2009) *Molecular & Cellular Proteomics* 8(6):1206 ~ 18)。

30

【0004】

いくつかの網膜ジストロフィーに罹患した個体は、網膜ジストロフィーを有さない個体よりも低いレベルの R d C V F タンパク質を眼に有することが見出された (PCT公開国際公開第02/081513号)。

【0005】

異なる形態の R d C V F タンパク質が錐体光受容器細胞の生存をインビトロ及びインビボで促進し得ることが実証されている。例えば、短鎖型ヒト R d C V F 1 (R d C V F 1 S) タンパク質の眼内注射は、錐体細胞を変性から救済するだけでなく、遺伝性網膜変性の動物モデルにおいてこれらの機能を保持させた (Yang et al. (2009) *Mol Therapy* 17: 787 ~ 795)。しかしながら、このタンパク質のインビボ錐体細胞保護効果の実証には、複数の眼内注射が必要であった。

40

【0006】

網膜色素変性症 (Retinitis pigmentosa ; R P) は、進行性の桿体変性、その後の錐体の二次的な喪失を特徴とする網膜変性眼疾患である。R P は、遺伝的失明の主要な原因であり、米国だけで約 1 0 0 0 0 0 人の患者が発症し、年間約 2 0 0 0 人の新たな症例を有する。R P は全ての民族に発症する。世界で 1 5 0 万人以上の人々が R P を発症している。残念なことに、患者にとって、R P のための有効な療法又は承認された療法はない。したがって、R P は依然として緊急の満たされていない医療上の必要性がある。

【0007】

R P は数年から数十年にわたる臨床経過を伴う慢性的な網膜変性疾患であるため、R d C V F を網膜に恒常に発現させることによる遺伝子治療は R P 徴候に対して理想的である

50

。網膜剥離などの急性の緊急な徵候では、タンパク質療法が有益であり得る。それは、組換え R d C V F タンパク質を使用して、網膜が眼の後部、すなわち、網膜色素上皮及び脈絡膜層に再連結される前に、光受容器を死滅から保護することである。残念なことに、この分野の科学者は、R d C V F タンパク質、特に短鎖型 R d C V F を効果的に発現及び分泌するためにかなりの困難に遭遇している。例えば、米国特許公開第 2 0 1 1 0 0 3 4 5 4 6 号の段落 [0 0 0 4] を参照されたい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0 0 0 8】

【文献】 P C T 公開 国際公開第 0 2 / 0 8 1 5 1 3 号

10

米国特許公開第 2 0 1 1 0 0 3 4 5 4 6 号

【非特許文献】

【0 0 0 9】

【文献】 Leveillard et al. (2004) *Nature Genetics* 36:755 ~ 759

10

Leveillard et al. (2010) *Sci Transl Med.* 2(26):26ps16

Fridlich et al. (2009) *Molecular & Cellular Proteomics* 8(6):1206 ~ 18

Yang et al. (2009) *Mol Therapy* 17:787 ~ 795

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 0】

本発明は、第 1 の N 末端シグナルペプチド配列、シグナルペプチド配列の C 末端にある第 2 のペプチド配列、及び第 2 のペプチド配列の C 末端にある第 3 のペプチド配列を含む融合タンパク質であって、第 2 のペプチド配列及び第 3 のペプチド配列の一方が R d C V F - 短鎖ペプチド配列であり、他方が親水性ペプチド配列である、融合タンパク質を提供する。翻訳後、シグナルペプチドは小胞体で切断され、シグナルペプチドを差し引いた第 2 のペプチド配列及び第 3 のペプチド配列を含む融合タンパク質が残る。したがって、本発明はまた、第 2 のペプチド配列及び第 2 のペプチド配列の C 末端にある第 3 のペプチド配列を含む融合タンパク質であって、第 2 のペプチド配列及び第 3 のペプチド配列の一方が R d C V F - 短鎖ペプチド配列であり、他方が親水性ペプチド配列である、融合タンパク質を提供する。本発明はまた、融合タンパク質をコードする核酸及び発現ベクター、核酸又は発現ベクターを含む細胞、並びに治療方法並びに融合タンパク質、核酸、及び発現ベクターの使用を提供する。本発明はまた、コードされた融合タンパク質の発現及び分泌を可能にする条件下で本発明の細胞を培養するステップ、並びに融合タンパク質を細胞培養物から単離するステップを含む、融合タンパク質を產生する方法を提供する。

20

【図面の簡単な説明】

【0 0 1 1】

【図 1】 図 1 A は、ヒト短鎖型桿体由来錐体生存因子のアミノ酸配列を示す図である。ヒト短鎖 R d C V F のアミノ酸組成は高度に疎水性である。短鎖 R d C V F では 3 8 . 5 % のアミノ酸が疎水性である。下線のアミノ酸は疎水性である。図 1 B は、ヒト長鎖型桿体由来錐体生存因子のアミノ酸配列を示す図である。2 5 % のアミノ酸は、長鎖 R d C V F の C 末端で疎水性である（下線のアミノ酸は、長鎖型 R d C V F の C 末端で疎水性である）。

30

【図 2】 短鎖 R d C V F と親水性ドメインとの融合タンパク質を示す図である。図 2 は、2 つのヒト短鎖 R d C V F 融合タンパク質の概略図を示す。ヒト短鎖 R d C V F は、その N 末端又は C 末端で親水性ドメインと融合する。融合タンパク質は、細胞からの分泌を促進するシグナルペプチドを有する。

40

【図 3】 ヒトアルブミンとヒト短鎖 R d C V F との間の新規な融合タンパク質の発現及び分泌を示す図である。図 3 は、ヒト短鎖 R d C V F 及びヒトアルブミン融合タンパク質のウエスタンプロット分析を示す。レーン 1 : A A V - G F P 、対照として G F P をコードする A A V ベクターで形質導入したヒト 2 9 3 細胞からの細胞培養液 3 0 μ L ; レーン 2

50

: A A V - A L B - R d C V F S、短鎖 R d C V F の N 末端にヒトアルブミンと融合した短鎖型ヒト R d C V F をコードする A A V ベクターで形質導入したヒト 293 細胞からの細胞培養液 30 μL ; レーン 3 : A A V - R d C V F S - A L B、短鎖 R d C V F の C 末端にヒトアルブミンと融合した短鎖型ヒト R d C V F をコードする A A V ベクターで形質導入したヒト 293 細胞からの細胞培養液 30 μL。左の数字は KDa での分子量マーカーを示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

配列表の簡単な説明

配列番号 1 : 融合タンパク質の N 末端でヒトアルブミンを有する、ヒトアルブミンと短鎖 R d C V F との融合タンパク質のアミノ酸配列 (A L B - R d C V F S)。 10

【0013】

配列番号 2 : N 末端にヒトアルブミンを融合したヒト短鎖 R d C V F をコードするヌクレオチド配列 (A L B - R d C V F S)。

【0014】

配列番号 3 : 融合タンパク質の C 末端でヒトアルブミンを有する、ヒトアルブミンと短鎖 R d C V F との融合タンパク質のアミノ酸配列 (R d C V F S - A L B)。R d C V F S とヒトアルブミンとの間には 4 つのアミノ酸スペーサーが存在する。N 末端からの最初の 21 アミノ酸は、マウス Igk 由来のシグナル配列である。シグナル配列と R d C V F S との間に 14 アミノ酸スペーサー (リンカー) が存在する。 20

【0015】

配列番号 4 : C 末端でヒトアルブミンと融合したヒト短鎖 R d C V F をコードするヌクレオチド配列 (R d C V F S - A L B)。

【0016】

配列番号 5 : ヒト短鎖型桿体由来錐体生存因子のアミノ酸配列。

【0017】

配列番号 6 : ヒト長鎖型桿体由来錐体生存因子のアミノ酸配列。

【0018】

発明の詳細な説明

理論に縛られることを望むものではないが、短鎖型 R d C V F を発現及び分泌することの困難性は、その高い疎水性アミノ酸組成に起因する可能性がある。短鎖型及び長鎖型ヒト R d C V F タンパク質の両方のアミノ酸組成を慎重に分析することにより、短鎖型 R d C V F タンパク質が極めて疎水性であることが明らかになった (図 1A 及び 1B)。短鎖 R d C V F の 109 のうちの 42 アミノ酸 (38.5%) は、疎水性アミノ酸である。1 ストレッチの 6 つの疎水性アミノ酸、1 ストレッチの 4 つの疎水性アミノ酸、及び 2 ストレッチの 3 つの疎水性アミノ酸がそれぞれ存在する。疎水性アミノ酸組成が高い割合であると、疎水性 - 疎水性相互作用を介して脂質膜に付着する可能性がより高いので、短鎖 R d C V F を哺乳動物細胞からインビトロ及びインビボで効率的に発現及び分泌することを非常に困難にする可能性が高い。興味深いことに、長鎖型 R d C V F の N 末端 109 アミノ酸は短鎖 R d C V F 全体と同一であるが、長鎖 R d C V F の C 末端の 103 アミノ酸は疎水性ではなく、わずか 25% のアミノ酸が疎水性であるのみである (103 のうち 26)。長鎖 R d C V F のこの C 末端における最も長い疎水性アミノ酸のストレッチの長さはわずか 4 アミノ酸である。3 つの疎水性アミノ酸のストレッチはない。長鎖 R d C V F の C 末端における比較的親水性の性質は、長鎖 R d C V F の全体的な疎水性を低下させるのに重要な役割を果たし得る。 30

【0019】

本発明の融合タンパク質の一実施形態では、第 2 のペプチド配列は R d C V F - 短鎖ペプチド配列であり、第 3 のペプチド配列は親水性ペプチド配列である。別の実施形態では、第 2 のペプチド配列は親水性ペプチド配列であり、第 3 のペプチド配列は R d C V F - 短鎖ペプチド配列である。 40

【 0 0 2 0 】

この融合タンパク質を発現する細胞から融合タンパク質の分泌を促進するN末端シグナルペプチド配列が存在するはずである。哺乳動物細胞からのタンパク質の分泌を可能にする任意のシグナルペプチドが利用できる。さらなる実施形態では、シグナルペプチド配列は、Igkシグナルペプチド配列及びアルブミンシグナルペプチド配列からなる群から選択される。より特定の実施形態では、IgKシグナルペプチド配列はマウスIgKシグナルペプチド配列であり、アルブミンシグナルペプチド配列はヒトアルブミンシグナルペプチド配列である。

【 0 0 2 1 】

本発明の好ましい実施形態では、RdCVF - 短鎖ペプチド配列は、ヒトRdCVF - 短鎖ペプチド配列である。適切なRdCVF - 短鎖ペプチド配列の例には、RdCVF1 - 短鎖ペプチド配列、RdCVF2 - 短鎖ペプチド配列、及び例えば1又は2以上の保存的アミノ酸置換によって対応する野生型配列と異なるRdCVF - 短鎖ペプチド配列が含まれる。

10

【 0 0 2 2 】

本発明によれば、親水性ペプチド配列を有さないRdCVF - 短鎖ペプチド配列と比較して、融合タンパク質の疎水性指数を低下させるならば、任意の親水性ペプチド配列を利用することができます。本発明の一実施形態では、任意のシグナルペプチド配列を含む融合タンパク質は、存在する場合、マイナス0.20より低い、より好ましくはマイナス0.30より低い疎水性指数を有する。

20

【 0 0 2 3 】

好ましくは、親水性ペプチド配列は、ヒトにおいて免疫原性ではなく、ヒト網膜生理に又は正常な網膜機能に他の負の効果を示さず、短鎖RdCVFの生物学的機能に影響しない。親水性ペプチド配列は、親水性タンパク質、親水性タンパク質ドメイン、親水性オリゴペプチド、又は親水性ポリペプチドであり得る。1つ以上の親水性ドメインが、短鎖RdCVFを有する親水性融合パートナーとしての候補であり得る。本発明の一実施形態では、親水性ペプチド配列はアルブミン、例えばヒトアルブミンである。

【 0 0 2 4 】

本発明の融合タンパク質によれば、場合により、第1のペプチド配列と第2のペプチド配列との間、第2のペプチド配列と第3のペプチド配列との間、又はその両方に1又は2以上のアミノ酸のスペーサーが存在し得る。本発明の一実施形態では、第1のペプチド配列と第2のペプチド配列との間にスペーサーはなく、言い換えると、第1のペプチド配列は、単一のペプチド結合によって第2のペプチド配列に共有結合する。別の実施形態では、第1のペプチド配列と第2のペプチド配列との間にスペーサーが存在する。本発明の別の実施形態では、第2のペプチド配列と第3のペプチド配列との間にスペーサーはなく、言い換えると、第2のペプチド配列は、単一のペプチド結合によって第3のペプチド配列に共有結合する。別の実施形態では、第2のペプチド配列と第3のペプチド配列との間にスペーサーが存在する。原則的にスペーサーのサイズには制限はない。本発明の一実施形態では、第1及び第2のペプチド配列間のスペーサーは、2~14個のアミノ酸を有する。別の実施形態では、第2及び第3のペプチド配列間のスペーサーは、2~14個のアミノ酸、より具体的には2~4個のアミノ酸を有する。

30

【 0 0 2 5 】

本発明の融合タンパク質コード配列の一実施形態は、第3のペプチド配列コード配列のC末端にポリアデニル化シグナルがさらに含まれる。ポリアデニル化シグナル(ポリA)は、任意のポリAであり得る。

【 0 0 2 6 】

本発明の融合タンパク質の一実施形態では、第1のペプチド配列はヒトアルブミンシグナル配列であり、第2のペプチド配列はヒトアルブミンであり、第3のペプチド配列はRdCVF - 短鎖配列である。より特定の実施形態では、融合タンパク質は、配列(配列番号1)又は(配列番号1)のアミノ酸25~717を有する。本発明の融合タンパク質の別

40

50

の実施形態では、第1のペプチド配列は I g k シグナル配列であり、第2のペプチド配列は R d C V F - 短鎖配列であり、第3のペプチド配列はヒトアルブミンである。より特定の実施形態では、融合タンパク質は、配列（配列番号3）又は（配列番号3）のアミノ酸 22 ~ 732 を有する。

【 0 0 2 7 】

本発明の融合タンパク質の一実施形態では、シグナルペプチド配列、R d C V F - 短鎖ペプチド配列、及び親水性ペプチド配列の1つ、2つ、又は全てが、対応する野生型配列と異なる。より特定の実施形態では、その相違は、1又は2以上の保存的アミノ酸置換を含む。さらにより特定の実施形態では、アミノ酸置換は、1又は2以上の保存的アミノ酸置換に限定される。

10

【 0 0 2 8 】

本発明による融合タンパク質は、グリコシル化されていてもグリコシル化されていなくてもよい。一般に、グリコシル化は、タンパク質の安定性及び溶解性にとって有益である。一実施形態では、本発明による発現ベクターによって形質導入された細胞内で発現される融合タンパク質は、グリコシル化され、細胞から分泌された後にグリコシル化される。

【 0 0 2 9 】

一実施形態では、本発明の核酸はDNAである。別の実施形態では、シグナルペプチド配列、R d C V F - 短鎖ペプチド配列及び親水性ペプチド配列の1、2又は全てのコード配列は、対応する野生型配列と比較して再コードされている。より特定の実施形態では、R d C V F - 短鎖ペプチド配列のコード配列が再コードされている。本発明の核酸は、第1及び第2のペプチド配列の間、第2及び第3のペプチド配列の間、又は他の場所のいずれかに、1又は2以上のイントロンを任意に含むことができる。本発明の一実施形態では、核酸は、配列（配列番号1）を有する融合タンパク質、例えば配列（配列番号2）を有する核酸をコードする。別の実施形態では、核酸は、配列（配列番号3）を有する融合タンパク質、例えば配列（配列番号4）を有する核酸をコードする。他の核酸配列は、遺伝暗号の縮重を考慮して容易に想定することができる。

20

【 0 0 3 0 】

本発明の一実施形態は、制御配列、例えばプロモーターに作動可能に連結された上に記載の核酸を含む発現ベクターである。R d C V F S 融合タンパク質を駆動するプロモーターは、任意のプロモーターであってよく、CMVプロモーターに限定されない。プロモーターと融合タンパク質コード配列との間にイントロンが存在する場合、任意の適切であります従来のイントロンを利用することができる。例えば、-グロビンイントロンが適切である。

30

【 0 0 3 1 】

実験では、ヒトの短鎖R d C V F を親水性ドメインと融合させることによって、2つの融合タンパク質を作製した（概略図については図2を参照）。1つは、融合タンパク質のN末端にアルブミンシグナルペプチド（配列番号1）を有する、N末端でヒトアルブミンと融合したヒト短鎖R d C V F であった。この融合タンパク質を発現及び分泌する発現構築物は、A A V ベクターとの関連で改変され、r A A V - A L B - R d C V F S と命名された。このベクターは、N末端でヒトアルブミンと融合しているコドン最適化された（再コードされた）ヒト短鎖R d C V F をコードした（配列番号2）。この融合タンパク質をA L B - R d C V F S と名付けた。ヒトアルブミンシグナルペプチドのコード配列もまた、融合タンパク質コード配列の上流の融合タンパク質発現構築物に組み込まれた。発現構築物はさらに、CMVプロモーター及び融合タンパク質コード配列に連結されたイントロンを含んでいた。発現構築物は、融合タンパク質コード配列のC末端にポリアデニル化シグナルをさらに含んでいた。発現カセット全体をA A V 発現プラスミドにクローニングし、プラスミドをDNA配列決定に供して発現構築物の整合性を確認した。

40

【 0 0 3 2 】

他の例示された融合タンパク質は、融合タンパク質のN末端にマウスI g k シグナルペプチドを有するC末端でヒトアルブミンと融合したヒト短鎖R d C V F であった（配列番号

50

3）。この融合タンパク質を発現及び分泌する発現構築物は、A A Vベクターとの関連で改変され、r A A V - R d C V F S - A L Bと命名された。このベクターは、C末端でヒトアルブミンと融合しているコドン最適化された（再コードされた）ヒト短鎖R d C V Fをコードした（配列番号4）。この融合タンパク質をR d C V F S - A L Bと名付けた。改変されたマウスIgkシグナルペプチドのコード配列もまた、融合タンパク質コード配列の上流の融合タンパク質発現構築物に組み込まれた。発現構築物はさらに、C M Vプロモーター及び融合タンパク質コード配列に連結されたイントロンを含んでいた。発現構築物は、融合タンパク質コード配列のC末端にポリアデニル化シグナルをさらに含んでいた。発現カセット全体をA A V発現プラスミドにクローニングし、プラスミドをD N A配列決定に供して発現構築物の整合性を確認した。

10

【0033】

合計20個の天然アミノ酸が存在する。それらのいくつかは疎水性であり、そのうちのいくつかは親水性である。アミノ酸の疎水性指数は、その側鎖の疎水性又は親水性を表す数である。数が大きければ大きいほど、アミノ酸はより疎水性である（表1）。最も疎水性のアミノ酸は、イソロイシン（4.5）及びバリン（4.2）である。最も親水性のものは、アルギニン（-4.5）及びリジン（-3.9）である。タンパク質の疎水性又は親水性の性質は、それがどのようなアミノ酸から成り立っているか、並びにどのような二次、三次及び四次構造から成り立っているかに依存しているが、タンパク質の疎水性指数はタンパク質の疎水性の予測値となり得る。

20

【0034】

表1 アミノ酸の疎水性値

Ala: 1.800

Arg: -4.500

Asn: -3.500

Asp: -3.500

Cys: 2.500

Gln: -3.500

Glu: -3.500

Gly: -0.400

His: -3.200

Ile: 4.500

Leu: 3.800

Lys: -3.900

Met: 1.900

Phe: 2.800

Pro: -1.600

Ser: -0.800

Thr: -0.700

Trp: -0.900

Tyr: -1.300

Val: 4.200

【0035】

公的に入手可能なG P M A Wプログラムを用いて、短鎖R d C V F、及び2つの短鎖R d C V F及びアルブミン融合タンパク質の疎水性指数を計算した。天然の短鎖型ヒトR d C V F（R d C V F S）の疎水性指数は-0.12である。ヒトアルブミンをR d C V F SのN末端に融合させた後、得られた融合タンパク質であるA L B - R d C V F Sの疎水性指数は-0.12から-0.32（シグナルペプチドを含む）に減少し、疎水性指数は266.7%低下した。ヒトアルブミンをR d C V F SのC末端に融合させた後、得られた融合タンパク質であるR d C V F S - A L Bは、疎水性指数が-0.12から-0.33（シグナルペプチドを含む）から減少し、疎水性指数が275%低下した。疎水性指数の

30

40

50

劇的な低下は、融合タンパク質の効率的な発現及び分泌に寄与し得る。

【 0 0 3 6 】

さらに、融合タンパク質コード配列を A A V - 2 発現構築物にクローニングしたところ、この新規な融合タンパク質が効率的に発現することが R d C V F 特異的抗体を用いたウエスタンプロットによって明らかに示された（図 3）。短鎖 R d C V F の融合パートナーは、ヒトアルブミンに限定されない。任意の親水性タンパク質又は親水性タンパク質ドメイン又は親水性ペプチドを用いて、短鎖 R d C V F を有する融合タンパク質を作製し、タンパク質の疎水性を低下させることができる。好ましい親水性ドメインはヒトに対して非免疫原性である。

【 0 0 3 7 】

本タンパク質は、A A V (アデノ随伴ウイルス) ベクター、レンチウイルスベクター、合成ベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ネイキッド D N A、ナノ粒子などのような遺伝子治療ベクターによってコードされ、送達され得る。或いは、融合タンパク質は、組換えタンパク質として網膜に送達される。親水性融合ドメインは、ヒト網膜生理学又は正常な網膜機能にいかなる悪影響を与えるべきではなく、短鎖 R d C V F の生物学的機能に影響を及ぼすべきではない。潜在的に、2つ以上の親水性ドメインが、短鎖 R d C V F との親水性融合パートナーとしての候補であり得る。実施例では、ヒトアルブミンを親水性ドメインとして使用して、ヒト短鎖 R d C V F の融合パートナーとして機能させた。

【 0 0 3 8 】

本発明は、(i) 本発明の融合タンパク質、核酸、発現ベクター又は細胞からなる群から選択される成分；(ii) 薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物を提供する。

【 0 0 3 9 】

本発明は、哺乳動物患者におけるそのような治療に適している状態を治療する方法を提供し、その治療は、有効量の本明細書に記載のタンパク質、核酸、ベクター、細胞、又は医薬組成物を患者に投与し、それにより患者の状態を治療するステップを含む。本発明の実施形態では、状態は、網膜ジストロフィー、シュタルガルト病 (Stargardt's disease)、色素性網膜炎、萎縮型加齢性黄斑変性症 (dry age-related macular degeneration ; 萎縮型 A M D (dry AMD))、地図状萎縮 (萎縮型 A M D の進行期)、滲出型加齢性黄斑変性症 (wet age-related macular degeneration ; 滲出型 A M D (wet AMD))、高眼圧を伴う又は伴わない緑内障、糖尿病性網膜症、バルデ・ビードル (Bardet-Biedel) 症候群、バッセン・コーンツヴァイク (Bassen-Kornzweig) 症候群、ベスト病 (Best disease)、コロイデマ (choroidema)、脳回転状萎縮症、先天性黒内障、レフサン (ref sun) 症候群、アッシャー (Usher) 症候群、甲状腺関連眼疾患、グレーブ病 (Grave's disease)、網膜色素上皮細胞に関連する疾患、前眼部疾患、水晶体疾患 / 白内障、眼杯障害、ブドウ膜炎、アルツハイマー病、ハンチントン病、パークリンソン病及び嗅覚疾患からなる群から選択される。任意の従来の投与経路、例えば、眼への注射、静脈内注射、又は他の全身投与を利用ができる。本発明の方法の一実施形態では、状態は眼の状態であり、投与は網膜下注射及び硝子体内注射からなる群から選択される。より特定の実施形態では、患者はヒト患者である。

【 0 0 4 0 】

本発明は、患者における眼の光受容器細胞を保護する方法であって、有効量の本発明の融合タンパク質、核酸、ベクター、細胞、又は医薬組成物を患者の眼に投与し、それによって患者における眼の光受容器細胞を保護するステップを含む、方法を提供する。より特定の実施形態では、投与は、網膜下注射及び硝子体内注射からなる群から選択される。より特定の実施形態では、患者はヒト患者である。

【 0 0 4 1 】

本発明を以下の実施例を参照して説明する。これらの実施例は例示のみを目的として提供されるもので、本発明は決してこれらの実施例に限定されるべきではなく、むしろ本明細書で提供される教示の結果として明らかになる任意の及び全ての変形を包含すると解釈さ

10

20

30

40

50

れるべきである。

【 0 0 4 2 】

本発明の特定の実施形態を説明のために本明細書に記載してきたが、添付の特許請求の範囲に説明される本発明から逸脱することなく、詳細について多数の変形が可能であることが当業者には理解されよう。

【 0 0 4 3 】

個々の刊行物、特許又は特許出願が、具体的かつ個別に参照により本明細書に組み込まれると示されているのと同程度に、本明細書に記載されている全ての刊行物、特許及び特許出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。また、前述の刊行物、特許及び特許出願のいずれかとともに出版された任意の補足的な情報もまた、参照により組み込まれる。例えば、いくつかの雑誌記事は、一般にオンラインで入手可能な補足情報と共に公開されている。

10

[実施例]

【 実施例 1 】

【 0 0 4 4 】

ヒト短鎖型桿体由来錐体生存因子及びアルブミン融合タンパク質をコードする r A A V ベクターの作製

プラスミドクローニング

N末端でヒトアルブミンと融合しているコドン最適化されたヒト短鎖型 R d C V F タンパク質の c D N A を、 GENEART (登録商標) (フィー・フォー・サービスの会社) によって合成し、アデノ随伴ウイルスベクタープラスミド pAAV-MCS (Cell Biolabs 社製、 San Diego、 CA) にクローニングし、プラスミド pAAV-ALB-RdCVFS を作製した。ヒトアルブミン由来のシグナルペプチドもまた、 R d C V F 及びアルブミン融合タンパク質コード配列の上流に組み込まれた。

20

【 0 0 4 5 】

pAAV-ALB-RdCVFS プラスミドは、 A A V - I T R 間に以下の特徴を含む：

【 0 0 4 6 】

CMV プロモーター - - グロビンイントロン - シグナル配列 - アルブミン - 短鎖 R d C V F - ポリ A

【 0 0 4 7 】

この R d C V F 及びアルブミン融合タンパク質について得られたアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。

30

【 0 0 4 8 】

C 末端でヒトアルブミンとしているコドン最適化されたヒト短鎖型 R d C V F タンパク質の c D N A を、 GENEART (登録商標) (フィー・フォー・サービスの会社) によって合成し、アデノ随伴ウイルスベクタープラスミド pAAV-MCS (Cell Biolabs 社製、 San Diego、 CA) にクローニングし、プラスミド pAAV-RdCVFS-ALB を作製した。マウス I g k 由来のこのシグナルペプチドもまた、 R d C V F 及びアルブミン融合タンパク質コード配列の上流に組み込まれた。

【 0 0 4 9 】

pAAV-RdCVFS-ALB プラスミドは、 A A V - I T R 間に以下の特徴を含む：

40

【 0 0 5 0 】

CMV プロモーター - - グロビンイントロン - シグナル配列 - 短鎖 R d C V F - アルブミン - ポリ A

【 0 0 5 1 】

この R d C V F 及びアルブミン融合タンパク質について得られたアミノ酸配列を配列番号 3 に示す。

【 0 0 5 2 】

組換え A A V - A L B - R d C V F S 及び A A V - R d C V F S - A L B ベクターの產生及び精製

プラスミド pAAV-ALB-RdCVFS 又は pAAV-RdCVFS-ALB 、 pHELPER (Cell BioLabs 社製、 カタログ番号 340202) 及び pRC2 (Cell BioLabs 社製、 カタログ番号 340201) を

50

DH10Bコンピテントバクテリア細胞 (Invitrogen社製、カタログ番号18297-010) に形質転換し、Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit又はEndoFree Plasmid Mega Kitを製造者の指示に従って使用してスケールアップした。Beckman DU-600分光光度計を用いてプラスミド濃度を測定した。各々のプラスミドの同一性は、制限酵素切断及びDNA配列決定分析によって確認した。

【0053】

rAAV - ALB - RdcCVFS又はrAAV - RdcCVFS - ALBベクターを產生するため、cDMEM (10% FBS、1%グルタミン、1%非必須アミノ酸、及び1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM) 中で15cmディッシュあたり細胞400万個で293AAV細胞 (Cell BioLabs社製、カタログ番号AAV-100) を播種した。
翌日、培養液を25mLの新鮮なcDMEMと交換した。2時間後、トランスフェクションを行った。水(57.4mL)を1.3mgのpHELPER、650μgのpRC2、650μgのpAAV-ALB-RdcCVFS又はpAAV-RdcCVFS-ALB及び8.1mLの2M CaCl₂(水/プラスミド/CaCl₂混合物)と混合した。12.5mL容量の2xHBS (Lonza社製、Sku:RR07005) を5本の50mLコニカルチューブの各々に移した。ボルテックスしながら、12.5mLの水/プラスミド/CaCl₂混合物を、2xHBSを含むコニカルチューブのそれぞれにゆっくりと加えた。5分間のインキュベーションの後、2.5mLの懸濁液を、293AAV細胞を含む細胞培養皿の各々に加えた。

10

【0054】

翌日、ディッシュあたり25mLの新しいcDMEM培養液で培養液を交換した。2日後、細胞リフター (cell lifter) を用いて細胞を採取し、細胞/培養液混合物を250mLコニカルチューブに移した。試料を3000rpmで4、15分間遠心分離し、上清を捨て、細胞ペレットを110mLのDMEMに再懸濁させた。再懸濁した細胞試料を50mLコニカルチューブに分注し(30mL)、エタノール/ドライアイスバス及び37水浴を用いて凍結/解凍/凍結ステップを行った。材料をさらに処理するまで、チューブを-80で保存した。同様のプロセスを用いてプラスミドpAAV-ALB-RdcCVFSをプラスミドpAAV-GFP (Cell BioLabs社製、カタログ番号AAV-400) で置換したrAAV - GFP参照ベクターを產生した。

20

【0055】

rAAV - ALB - RdcCVFSベクターを精製するために、凍結/解凍/凍結ステップからのベクターを含む4つの50mLコニカルチューブを水浴中、37で解凍した。40μlのBENZONASE (登録商標) (ヌクレアーゼ) (Sigma社製、カタログ番号E8263-25kU) を各チューブに添加し、37で30分間インキュベートした。チューブを3000rpmで10分間遠心分離し、上清を500mLビンに移した。6ミリリットルの10%デオキシコール酸ナトリウム溶液(82mLの水中に8.2g)を添加した。試料を短時間混合し、37で30分間インキュベートした。5μmフィルターを用いて懸濁液を濾過した。その後、0.8μmフィルターを用いた別の濾過ステップを行った。ヘパリニアガロースカラム(8mL) (Sigma社製、カタログ番号H6508-25mL) を準備し、カラムを48mLのリン酸緩衝食塩水(PBS) (Invitrogen社製、カタログ番号10010-049) で平衡化した。フィルターした細胞溶解物をカラムに負荷し、カラムを40mLの洗浄緩衝液(20mLの5M NaCl、980mLのPBS)で洗浄した。15mLの溶出緩衝液(80mLの5M NaCl、920mLのPBS)を用いてベクターを溶出し、新しい50mLコニカルチューブに集めた。

30

【0056】

遠心フィルターによりベクターを濃縮した。AMICON ULTRA-15遠心分離フィルターユニット (Millipore社製、カタログ番号UFC910024) をPBSで1回すすいで、溶出した試料を装置に加えた。Beckman Allegro 6KR遠心分離機で2200rpm、22で、試料が1~2mLの容量に濃縮されるまで遠心分離を行った。15mL容量のPBSを添加し、試料容量が1mLになるまで遠心分離を繰り返した。精製したベクターを回収し、フィルター壁を100μLのPBSですすいだ。試料を混合し、ベクターの30μLのアリ

40

50

コートを、使用するまで 600 μL のコニカルチューブ中に -80°で保存した。

【0057】

このプロセスを繰り返して、rAAV-RdCVFS-ALB 及び rAAV-GFP ベクターを精製した。

【実施例 2】

【0058】

rAAV ベクターによって媒介されるヒト短鎖 RdCVF 及びヒトアルブミン融合タンパク質の発現及び分泌

4 ~ 20% の SDS-PAGE ゲルを用いたウエスタンプロット分析を用いて、標準技術を用いて RdCVF 及びアルブミン融合タンパク質発現を検出した。対照として、5 μL 容量の MAGICMARK (商標) XP ウエスタンタンパク質標準 (Invitrogen社製、カタログ番号 LC5602) を外側のウェルに添加した。タンパク質試料緩衝液と混合した rAAV ベクター形質導入ヒト 293 細胞の各々からの細胞培養液 30 μL を各ウェルに添加した。染料がゲルの底に達するまでゲルを 200V で流した。ウエスタンプロット分析は、Vector Laboratories 社の VECTASTAIN (登録商標) ABC-Amp ウエスタンプロット分析キットを用いて、製造会社の修正版の使用説明書に従って行った。SDS-PAGE を Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell を用いて 20V で 40 分間、ニトロセルロース膜に転写した。転写が完了した後、室温 (RT) で少なくとも 2 時間、又は 4°で終夜、ロッカープラットフォーム上で穏やかに攪拌しながら、200mL の 1 × カゼイン溶液中で膜をプロックした。4°で終夜又は室温で 1 時間穏やかに攪拌しながら、1 : 2000 に希釈したウサギ抗 RdCVF タンパク質特異的抗体 (一次抗体、Covance 社 (Denver, PA) によって生成された) を含む 50mL の 1 × カゼイン溶液とともに、膜をインキュベートした。30mL の 1 × カゼイン溶液で 4 回、穏やかに攪拌しながら室温で各々 5 分間、膜を洗浄した。膜を、1 : 10000 に希釈した 30mL のビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG (二次抗体) とともに、1 × カゼイン溶液中で穏やかに攪拌しながら室温で 1 時間インキュベートした。30mL の 1 × カゼイン溶液中で 3 回、穏やかに攪拌しながら室温で各々 5 分間、膜を洗浄した。100 μL の試薬 A 及び 100 μL の試薬 B を含む 50mL の 1 × カゼイン中の Vectastain ABC-AMP で 45 分間、膜をインキュベートした。30mL の 1 × カゼイン溶液中で 3 回、室温で緩やかに攪拌しながら各々 5 分間、膜を洗浄した。

【0059】

膜を Tris、pH 9.5 中でインキュベートした。6mL の DUOLOX Substrate (Vector Laboratories 社製、カタログ番号 SK 6605) を用いて化学発光シグナルを取得し、フィルムカセット中、10秒から 5 分、KODAK BIOMAX MS X 線フィルム (Kodak Carestream Health 社製、カタログ番号 8572786) に膜を曝露した後、KODAK Developer 液 (Kodak GBX 社製、カタログ番号 1900984) 及び KODAK Fixer 液を用いてフィルムを現像した。

【0060】

図 3 に示すように、rAAV-ALB-RdCVFS 及び rAAV-RdCVFS-ALB の両方の形質導入ヒト 293 細胞からの細胞培養液は、ウサギ抗 RdCVF 抗体と特異的に反応する分子量およそ 80 kDa のバンドを含んでいた。このバンドは、rAAV-GFP 対照ベクター形質導入細胞からの細胞培養液では検出されなかった。このデータは、rAAV-ALB-RdCVFS 及び rAAV-RdCVFS-ALB ベクターの両方が、ヒト短鎖 RdCVF 及びアルブミン融合タンパク質の発現及び分泌をヒト細胞において媒介することを示唆している。

【0061】

rAAV-ALB-RdCVFS 又は rAAV-RdCVFS-ALB ベクターは、上に列挙した疾患を治療するための眼内投与に使用することができる。特には、網膜下注射又は硝子体内注射によってベクターを送達することができる。

【0062】

10

20

30

40

50

要約

N末端でヒトアルブミン融合タンパク質コード配列と融合しているコドン最適化された（再コードされた）ヒト短鎖RdCVFをコードする組換えAAVベクターは、ヒト細胞内での融合タンパク質の発現及びヒト細胞からの分泌を媒介することができた。C末端でヒトアルブミン融合タンパク質と融合しているコドン最適化されたヒト短鎖RdCVFをコードする組換えAAVベクターは、ヒト細胞内での融合タンパク質の発現及びヒト細胞からの分泌を媒介することができた。

【図面】

【図1A】

```
M A S L F S G R I L I T R N N S D Q D E L D T E A E V S R R L E N R L V L L
F F G A G A C P Q C Q A F V P I L K D F F V R L T D E F Y V L R A A Q L A
L V Y V S Q D S T E E Q Q D L F L K D M P K K W L F L P F E D D L R R R (配列番号5)
```

Figure 1A

【図1B】

```
M A S L F S G R I L I T R N N S D Q D E L D T E A E V S R R L E N R L V L L
F F G A G A C P Q C Q A F V P I L K D F F V R L T D E F Y V L R A A Q L A
L V Y V S Q D S T E E Q Q D L F L K D M P K K W L F L P F E D D L R R D L
G R Q F S V E R L P A V V V L K P D G D V L T R D G A D E I Q R L G T A C
E A N W Q E A A E V L D R N E Q L P E D D L E D Q E F R S L T E C L R R H K
Y R V E K A A R G G R D P G G G G E E G G A G G L F (配列番号6)
```

Figure 1B

10

【図2】



Figure 2

【図3】

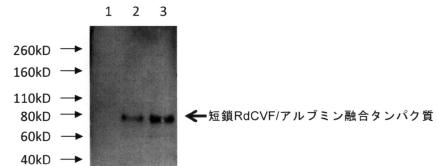


Figure 3

20

【配列表】

0007028802000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I
C 1 2 N 15/14 (2006.01)	C 1 2 N 15/14
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86 Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
A 6 1 K 38/38 (2006.01)	A 6 1 K 38/38
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 C
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/761
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 K 35/12
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 27/12 (2006.01)	A 6 1 P 27/06
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 27/12
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/14
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/16
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/02
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/08 A 6 1 K 9/10

弁理士 松田 一弘

(74)代理人 100113860

弁理士 松橋 泰典

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100096013

富田 博行

(72)発明者 ルオ ティアンチ

アメリカ国 メリーランド 20759 フルトン プレザベーションコート 7229

(72)発明者 ジャン ジュン

アメリカ国 メリーランド 21042 エリコットシティ ナッシュビルコート 11025

審査官 中野 あい

(56)参考文献 特表 2015 - 501156 (JP, A)

国際公開第 2009 / 146183 (WO, A1)

特開平 07 - 241196 (JP, A)

特表 2010 - 529958 (JP, A)

特表 2014 - 516358 (JP, A)

J Clin Invest, 2015 Jan, vol. 125, no. 1, pp. 105-116

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)