

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-542196

(P2013-542196A)

(43) 公表日 平成25年11月21日(2013.11.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/435 (2006.01)	C O 7 K 14/435 Z N A	4 C O 7 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H O 4 5
A 6 1 K 9/72 (2006.01)	A 6 1 K 9/72	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2013-530559 (P2013-530559)	(71) 出願人	513075445
(86) (22) 出願日	平成23年9月27日 (2011. 9. 27)		グルボ エンブレサリアル デ プロドゥ
(85) 翻訳文提出日	平成25年5月27日 (2013. 5. 27)		クシオネス バイオファーマシューティカ
(86) 国際出願番号	PCT/CU2011/000006		ス イ キミカス
(87) 国際公開番号	W02012/041261		キューバ, ラ ハバナ 1 7 2 0 0, ボイ
(87) 国際公開日	平成24年4月5日 (2012. 4. 5)		ェロス サンチアゴ デ ラス ベガス,
(31) 優先権主張番号	2010-0186		アヴェニダ インデペンデンシア カマ
(32) 優先日	平成22年9月27日 (2010. 9. 27)		1 6 1 / 2
(33) 優先権主張国	キューバ (CU)	(74) 代理人	100088904
			弁理士 庄司 隆
		(74) 代理人	100124453
			弁理士 資延 由利子
		(74) 代理人	100135208
			弁理士 大杉 卓也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ロパルルス・ジュンセウスサソリの毒由来のペプチド及び医薬組成物

(57) 【要約】

本発明は、活性成分としてペプチドを含む、高含量のタンパク質、脂質、炭水化物、アミノ酸、無機塩及び他のイオンを特徴とするロパルルス・ジュンセウスサソリの毒から得られる新規のペプチドに関する。本発明は、がん患者の生活の質を改善する該ペプチドの特性、例えばその抗発がん性、鎮痛性及び抗炎症性により薬物として用いられる配合物にも関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サソリ毒から得られ、544.42 Da の分子量及び配列番号 1 のアミノ酸配列を有することを特徴とする、RjLB-01 と呼ばれるペプチド。

【請求項 2】

サソリ毒から得られ、1964.0 Da の分子量及び配列番号 2 のアミノ酸配列を有することを特徴とする、RjLB-03 と呼ばれるペプチド。

【請求項 3】

サソリ毒から得られ、4748.14 Da の分子量及び配列番号 3 のアミノ酸配列を有することを特徴とする、RjLB-04 と呼ばれるペプチド。

10

【請求項 4】

サソリ毒から得られ、908.0 Da の分子量及び配列番号 4 のアミノ酸配列を有することを特徴とする、RjLB-05 と呼ばれるペプチド。

【請求項 5】

サソリ毒から得られ、707.03 Da の分子量及び配列番号 5 のアミノ酸配列を有することを特徴とする、RjLB-07 と呼ばれるペプチド。

【請求項 6】

サソリ毒から得られ、712.42 Da の分子量及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有することを特徴とする、RjLB-08 と呼ばれるペプチド。

【請求項 7】

20

サソリ毒から得られ、1203.44 Da の分子量及び配列番号 7 のアミノ酸配列を有することを特徴とする、RjLB-09 と命名されたペプチド。

【請求項 8】

サソリ毒から得られ、5930.45 Da の分子量及び配列番号 8 のアミノ酸配列を有することを特徴とする、RjLB-014 と呼ばれるペプチド。

【請求項 9】

ロパルス・ジュンセウスのサソリ毒から得られ、賦形剤である蒸留水と混合された、腫瘍細胞に対する高い細胞毒性活性を有する活性成分としてペプチドを有することを特徴とする、医薬組成物。

【請求項 10】

30

ホメオパシー処理している、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 1～8 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのペプチドを含有し、該ペプチドは抗腫瘍活性を有し、該選択されたペプチドが前記アミノ酸配列のいずれかを有する、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

10 mL～20 mL の蒸留水で希釈された、ロパルス・ジュンセウスのサソリ毒に含まれるペプチドの混合物を、以下の濃度：1.5%～2.0% の範囲の RjLB-01、8%～9% の範囲の RjLB-03、0.5%～0.8% の範囲の RjLB-07、0.5%～1.0% の範囲の RjLB-08、0.3%～0.60% の範囲の RjLB-09、0.4%～0.8% の範囲の RjLB-14 で有することを特徴とする、請求項 11 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 13】

ホメオパシー処理している、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

経口経路、局所経路、非経口経路、直腸経路、腔内経路及びエアロゾル経路により投与される配合物に使用される、請求項 9～13 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

50

本発明は基本的に、医薬産業に、特にロパルス・ジュンセウス (*Rhopalurus junceus*) サソリ (キョクトウサソリ科、ロパルス属 (*Rhopalurus* genus)、ロパルス・ジュンセウス (*R. junceus*) 種、一般名「赤」サソリ) (その毒にはペプチド、タンパク質、アミノ酸及び遊離アミンの混合物が含まれる) から得られるペプチドの同定に関連するものである。

【背景技術】

【0002】

サソリは陸上の節足動物であり、また有毒動物として地球上に初めて現れた最古の群である。分類学による分類が節足動物門クモ綱サソリ目であるサソリの種類はおよそ1500種を超える。自然の生育環境において、サソリの毒はpH7.12の乳白色の乳状液体であり、粘液、脂質、炭水化物、アミノ酸、無機塩、低分子量の有機分子、及び主成分である分子量が3kDa~90kDaの範囲の多様なタンパク質を含む。近年、広範な薬理活性を示すペプチドの含量が高く、そのため生物医学研究に非常に有効なツールであることから、サソリ毒に対する研究が加速している (非特許文献1、非特許文献2)。この点において、近年では、抗炎症成分 (非特許文献3)、鎮痛薬 (非特許文献4)、がんの治療 (非特許文献5、非特許文献6) 及び神経変性疾患の治療 (非特許文献3) のようなこれらの毒素及びそれらの誘導体の活性についてかなり多くの特許文献及び非特許文献が見られるようになってきている。構成にサソリ及び/又はサソリの毒が含まれる発明は、がん療法を目的とする広範な配合物を含む。1993年の特許文献1及び特許文献2の著者らは、いずれもサソリと、他の植物及び動物の材料とを混合することにより、がんの治療及び予防を可能にするワインを得たことに言及している。サソリは、原発性肝臓がんを治療する錠剤 (特許文献3 (2000年) 及び特許文献4 (2001年)) 及び患者において腫瘍細胞の成長を阻害し、がんを治癒することができるカプセル (特許文献5 (2003年)) の形態の配合物の成分の1つである。他の特許はがん治療のための様々な配合物を記載している (特許文献6 (2000年)、特許文献7 (2001年)、特許文献8 (2003年))。

【0003】

特定の腫瘍細胞型に作用する、サソリ毒から得られる毒素の限定的な使用に関する特許も存在する。サソリ毒の毒素に関する初期研究は、ペプチドがレイウルス・キンクエストリアツス (*Leiurus quinquestriatus*: オプトサソリ) ヘブライサソリから得られたことに言及していた。クロロトキシンと命名された4kDaのペプチドであるこの毒素は、神経膠腫 (神経膠由来の原発性脳腫瘍) において発現するクロライドチャネルに結合する能力がある (非特許文献7)。この大発見に基づき、1999年に特許文献9においてUlrich et al. は神経膠腫を治療する診断方法を説明している。神経膠腫における或る特定の細胞受容体に対するクロロトキシンの特異的作用に基づく他の研究によって、この毒素は、腫瘍細胞が中枢神経系 (CNS) 細胞と共通の胚起源を有する他の種の腫瘍に対する特異性の高いマーカーであることが示されてきた (非特許文献8)。加えて、近年の研究によって、クロロトキシンが「in vitro」で神経膠腫の成長を阻害するだけでなく、この種の腫瘍の脳領域への浸潤及び拡散を予防する能力もあり、該脳領域は、この種のがんの高い浸潤速度に関与する酵素であるメタロプロテイナーゼとのクロロトキシンの特異的かつ選択的な相互作用のために損傷を受けなかったことが示されている (非特許文献9)。2004年には、動物に移植した腫瘍に対するブータス・マルテンシー・カーシュ: キョクトウサソリ) サソリ由来の単離毒素の抗腫瘍活性に関する別の特許 (特許文献10) が公開された。

【0004】

幾つかの場合において、記載の特許に基づき、がんを治療する又は治癒する能力がある多様な配合物が挙げられている。とはいっても、これらの場合では、この品質がそれらの製造に関わるサソリ及び毒素の一部のタイプに特有のものであることは証明されていない。その一方で、レイウルス・キンクエストリアツスサソリから得られる記載の毒素はクロロトキシン及びブータス・マルテンシー・カーシュの場合と同様に、それ自体は抗腫瘍活

10

20

30

40

50

性を示さず、全毒中の毒素の混合物としてではなく単離毒素として或る特定のタイプの腫瘍を治療することができるにすぎない。

【 0 0 0 5 】

キューバでは、抗腫瘍活性が研究において実験的に証明されているロパルルス・ジュンセウスのサソリ毒希釈溶液が存在する。この研究では、溶液を自然発生腫瘍を有する家畜に投与し、腫瘍の低減及び除去（obliteration）並びに良好な生存を観察した（特許文献 1 1）。本発明は、本発明によって特許請求される治療法及び生活の質の改善のための任意の医薬配合物についての知識がないという意味で顕著な特徴を有する。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

10

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 中国特許公開第 1 0 7 3 4 8 0 号

【 特許文献 2 】 中国特許公開第 1 0 7 6 8 5 8 号

【 特許文献 3 】 中国特許公開第 1 2 6 5 9 0 1 号

【 特許文献 4 】 中国特許公開第 1 2 7 9 0 8 8 号

【 特許文献 5 】 中国特許公開第 1 3 9 1 9 4 1 号

【 特許文献 6 】 中国特許公開第 1 2 5 2 3 2 1 号

【 特許文献 7 】 中国特許公開第 1 3 1 6 2 4 9 号

【 特許文献 8 】 中国特許公開第 1 3 9 9 9 7 9 号

【 特許文献 9 】 米国特許第 5 9 0 5 0 2 7 号

20

【 特許文献 1 0 】 欧州特許出願公開第 2 0 0 2 0 7 7 4 2 5 1 号

【 特許文献 1 1 】 キューバ特許第 2 2 4 1 3 号

【 非特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 Martin-Eaucclair M-F, Segoard M, Ramos C, Cestele S, Bougis PE, andSvenson B, Production of active insect-specific scorpion neurotoxin in yeast. Eur.J. Biochem. 1994; 223; 637-45

【 非特許文献 2 】 Bednarek MA, Bugianesi RM, Leonard RJ, Felix JP. Chemical synthesis and structure-function studies of margatoxin, a potent inhibitor of voltage dependent potassium channel in human T lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun.1994 Jan 28; 198(2):619-25

30

【 非特許文献 3 】 Rajendra W, Armugan A and Jeyaseeian K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. Toxicon 2004 July; 44(1):1-17

【 非特許文献 4 】 Guan RJ, Wang CG, Wang M and Wang DC. A depressant insect toxin with a novel analgesic effect from scorpion Buthus martensii Karsch. Biochem.Biophys. File 2001; 1549(1):9-18

【 非特許文献 5 】 Liu YF, Ma RL, Wang SL, Duan ZY, Zhang JH, Wu LJ and Wu CF. Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion Buthus martensii Karsch in Escherichia coli. Protein Expr. Purif. 2003;27(2):253-8

【 非特許文献 6 】 Wang WX, Ji YH. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. J Neurooncol. 2005 May; 73(1):1-7

40

【 非特許文献 7 】 De Bin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from venom of the scorpion. Am J Physiol 1993;264:361-369

【 非特許文献 8 】 Lyons SA, O'Neal J, Sontheimer H: Chlorotoxin, a scorpion derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. GLIA 2002; 39:162-73

【 非特許文献 9 】 Deshane J, Garner CC and Sontheimer H: Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. J Biol Chem 2003; 278:4135-44

【 発明の概要 】

50

【 0 0 0 8 】

ロパルルス・ジュンセウスのサソリ毒及び／又はその誘導体の組成及び薬理学的特性から、ロパルルス・ジュンセウスのサソリ毒及び／又はその誘導体は非常に価値のある天然薬物とされ、その抗炎症効果、鎮痛効果及び抗発がん効果によって、市販されている他の類似の製品とは実質的に区別される。ロパルルス・ジュンセウスのサソリ毒及び／又はその誘導体は、腫瘍細胞に働く（fight）高有効成分（ペプチド）と鎮痛活性及び抗炎症活性を与える他の成分とが組み合わされた完全に天然の薬物である。加えて、ロパルルス・ジュンセウスのサソリ毒及び／又はその誘導体は、腫瘍細胞のアポトーシスの誘導による、並びにその鎮痛特性及び抗炎症特性による有益な効果を有する。これらの特徴によって、ロパルルス・ジュンセウスのサソリ毒及び／又はその誘導体はがん疾患及びそれに関連する炎症状態を患う患者の生活の質を改善するのに非常に価値のあるものとなる。本発明から得られる天然物の組成物が、*in vitro*での抗発がん活性を有する低分子量タンパク質の群を含み、低分子量のタンパク質の群の作用によって*in vivo*での潜在的な抗腫瘍活性が確認されることが見出されている。

10

【 0 0 0 9 】

本発明の目的の一つは、毒において見られる抗腫瘍活性を有する活性成分であるペプチドの組成を決定し、該ペプチドを説明することである。サソリ毒の定性的組成、化学スクリーニング、物理化学特性及び薬理活性に関する概要をそれぞれ、表Ⅰ、表ⅠⅠ、表ⅠⅠⅠ、表ⅠⅣ、表Ⅴ、表ⅤⅠ及び表ⅤⅠⅠに示す。

20

【 0 0 1 0 】

表Ⅰ．本発明の配合物に用いられるロパルルス・ジュンセウスの全毒の化学スクリーニング

【表 1】

Assay アッセイ	Results 結果
Dragendorff Assay ドラーゲンドルフアッセイ	Negative
Iron Chloride Assay 塩化鉄アッセイ	Negative
Shinoda Assay 篠田アッセイ	Negative
Lieberman-Burchard Assay リーベルマン・バーチャード アッセイ	Negative
Ninhydrin Assay ニンヒドリンアッセイ	Positive
Carbohydrates 炭水化物	Positive
Lipids 脂質	Positive

30

Negative 陰性

Positive 陽性

【 0 0 1 1 】

表ⅠⅠ．ロパルルス・ジュンセウスの全毒における金属イオンの決定

40

【表 2】

Sample サンプル	Na (mg/L)	Mg (mg/L)	K (mg/L)	Cu (mg/L)	Zn (mg/L)	Cd (mg/L)	Pb (mg/L)
Scorpion venom サソリ毒	114±21	4.12±0.28	4.66±0.35	0.069±0.006	11.18±0.7	<0.004*	<0.01*

* 下限未満のレベルの重金属

【 0 0 1 2 】

表ⅠⅠⅠ．本発明の配合物に用いられるロパルルス・ジュンセウスのサソリ毒の物理化学

50

【表 3】

Property 特性	Acceptance許容 index インデックス
pH	5-7
Protein content タンパク質含量	5-15 mg/mL
Appearance 外観	Opalescent 乳白色
Color 色	Whitisth 白みがかった色

【0013】

10

表 I V . 低圧液体クロマトグラフィを用いる分子排除及びポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) により得られた、サソリ毒におけるタンパク質の相対分子量 (R M W) の表

【表 4】

相対分子量

≥ 72 kDa
60 kDa
45 kDa
30 kDa
14 kDa
8 kDa
≤ 4 kDa

20

【0014】

表 V . ロパルス・ジュンセウスの全毒から同定された、腫瘍細胞に対して毒性活性を有する活性成分

【表 5】

Peptide ペプチド	Molecular weight 分子量	Amount of amino acids アミノ酸の量
RjLB-01	544.42 Da	10
RjLB-03	1964.0 Da	17
RjLB-04	4748.14 Da	43
RjLB-05	908.0 Da	8
RjLB-07	707.03 Da	7
RjLB-08	712.42 Da	17
RjLB-09	1203.44 Da	12
RjLB-14	5930.45 Da	50

30

【0015】

40

表 V I . 毒性研究の概要

【表 6】

General toxicology 一般毒性		<i>R. junceus</i> venom ロバルルス・ジュン セウス毒 (mg/kg)	Effect 効果
Acute toxicology 急性毒性			
Oral route 経口経路		2000	N.E.
IP route I P 経路		5-20	DL ₅₀ =16,41mg/kg (M y H)
Irritability 過敏性			
Dermal 皮膚		-	N.E.
Ophthalmic 眼		-	N.E.
Mouth mucose 口腔粘膜		-	N.E.
Repeat dose toxicity 反復投与毒性			
Repeat oral dose toxicity (28 days) 反復経口投与毒性 (28 日)		100	N.E.
Subchronic oral toxicity(90 days) 亜慢性経口毒性 (90 日)		0,1-100	N.E.
Water and food intake 水及び食物の摂取			N.E.
Weight gain 体重増加			N.E.
Hematological and biochemical parameters 血液パラメータ及び生化学パラメータ			N.E.
Relative weight of organs 臓器の相対重量			N.E.
Pathological anatomy 病理解剖			N.E.
Espesial toxicity 特別な毒性		<i>R. junceus</i> venom (mg/kg)	Effect
Mice bone marrow micronuclei マウスの 骨髄小核	Oral (acute) 経口 (急性)	2000	N.E.
	Oral (repeat doses, 28 days) 経口 (反復投与、28 日)	100	N.E.
	ip	4,10-13,13	N.E.

10

20

30

備考：N.E.：効果なし

【0016】

表 V I I . 薬理研究の概要

【表 7】

Pharmacology 薬理	Effect 効果
Antiproliferative 抗増殖	Cytotoxicity in epithelial tumor cells 上皮の腫瘍細胞における細胞毒性
Antitumoral 抗腫瘍	Murine solid tumor growth retardation マウスの固形腫瘍の成長遅延
Antimetastatic 抗転移	Murine lung metastasis reduction マウスの肺転移低減
Analgesic 鎮痛	Reduced CNS and peripheral pain CNS 及び末梢疼痛の低減
Anti-inflammatory 抗炎症	Reduced inflammation after topical, oral and intraperitoneal administration 局所投与、経口投与及び腹腔内投与 後の炎症の低減

40

【0017】

50

以下の手順を本発明における混合物の組成を決定するために実施した。

改良を加えたローリー法による全タンパク質の測定

化学スクリーニング

12 HR 10 & 30 Superoseカラムを用いた低圧液体クロマトグラフィ
分離による分子量の群でのペプチドの分離

ポリアクリルアミドゲルタンパク質電気泳動 (SDS - PAGE)

逆相 C18 カラムを用いた高分解能液体クロマトグラフィによる全毒及びペプチドの分離

220 nm 及び 280 nm 波長の UV スペクトルの測定

正常細胞及び腫瘍細胞における細胞生存

10

質量分析による各対象のペプチドの分析。

【0018】

マウスで行った急性及び亜慢性の毒性アッセイの結果によると、本発明の生成物は非毒性である。

【0019】

本発明の生成物の例として以下に詳しく記載される研究は、何ら本出願の範囲を限定するものではない。

【0020】

実施例として与えられる実験を行うために、数匹のサソリを選択し、それらの毒を電気刺激により抽出し、適切に蒸留水で希釈した。次いでこれを 10000 rpm で 15 分間の遠心分離により清澄化し、粘液及び細胞残渣等の成分を取り除いた。毒タンパク質含量の決定をローリー法によって行い、5 mg / mL ~ 15 mg / mL 濃度であることが示された。

20

【0021】

腹腔内 (IP) 投与経路

アッセイ物質及び陽性対照を初めに投与した。30分後、10 µL ~ 15 µL のクロトン油溶液を動物の右耳の内側表面及び外側表面のそれぞれに投与し、左耳を対照として使用した。3時間後、動物を種の通常の基準に従って (FELASA に準拠して) 屠殺し、両耳を切断し、8 mm 径の円形サンプルを、パンチを用いて採取し、分析規模に秤量した。

30

【0022】

局所投与経路

初めに、25 µL ~ 30 µL のクロトン油溶液を動物の右耳の内側表面及び外側表面のそれぞれに投与し、左耳を対照として使用した。次いで、アッセイ物質を速やかに与えた。3時間後、動物を種の通常の基準に従って (FELASA に準拠して) 屠殺し、両耳を切断し、8 mm 径の円形サンプルを、パンチを用いて採取し、分析規模に秤量した。

【0023】

経口投与経路

25 µL ~ 30 µL のクロトン油溶液を動物の右耳の内側表面及び外側表面のそれぞれに投与し、左耳を対照として使用した。次いで、アッセイ物質を経口投与により速やかに投与した。3時間後、動物を種の通常の基準に従って (FELASA に準拠して) 屠殺し、両耳を切断し、8 mm 径の円形サンプルを、パンチを用いて採取し、分析規模に秤量した。

40

【0024】

クロトン油の局所投与によって、抗炎症剤を評価するのに適切な皮膚炎症モデルが与えられる。クロトン油の活性成分は、皮膚への適用が、血管透過性及び血管破裂の増大、白血球浸潤、プロテイン C の活性化、並びにアラキドン酸及びその代謝産物の放出の増大を含む組織学的変化及び生化学的变化をもたらす強力な炎症促進剤であるホルボール - 12 - ミリステート 13 - アセテート (PMA) である。PMA は強力な好中球活性化因子としても知られており、耳において広範な強い血液灌流 (irrigation) が起こる。

50

【 0 0 2 5 】

I P 投与経路

体重 1 k g 当たり 1 m g ~ 5 m g の用量の I P 投与が、マウスの耳においてクロトン油により誘導される膨脹を阻害し（表 V I I I ）、3 m g / k g 用量が、より高い炎症阻害効果を有していたことから（97 % 対 60 . 86 % ）、実験動物における 15 m g / k g のデキサメタゾンの I P 投与よりも効果的であった。5 m g / k g 用量は陽性対照（デキサメタゾン）とは統計学的に異ならなかった（ $p > 0 . 05$ ）。

【 0 0 2 6 】

表 V I I I . マウスの耳の浮腫モデルにおけるロパルルス・ジュンセウス毒の腹腔内投与の効果

10

【表 8】

Group 群		Extinction of edema (mg) 浮腫の重量	Inflammation inhibition, % 炎症阻害
Control	対照	7,043 ± 0,27	-
R. <i>Junceus</i> venom ロパルルス・ ジュンセウス毒	1 mg/kg	5,050 ± 1,47 b	27,12
	3 mg/kg	1,483 ± 0,93 c	97,46
	5 mg/kg	4,020 ± 1,41 db	44,09
15 mg/kg dexamethasone デキサメタゾン		3,117 ± 1,09 d	60,86

20

値は平均 ± S D である。少なくとも 1 つの共通の文字を有する群は統計的に異なる（ $p > 0 . 05$ ）。

【 0 0 2 7 】

経口投与経路

5 m g 、 10 m g 及び 20 m g のロパルルス・ジュンセウス毒の投与により、陰性対照群と比較して有意な耳の浮腫の重量減少が起こるが（表 I X ）、ロパルルス・ジュンセウス毒により誘導される膨脹阻害は、ホスホリパーゼ A₂（アラキドン酸経路に關与する酵素）を阻害する良好なステロイド系抗炎症薬であるデキサメタゾンにより誘導される膨脹阻害とは統計的に同等ではない。

30

【 0 0 2 8 】

表 I X . マウスの耳の浮腫モデルにおけるロパルルス・ジュンセウス毒の経口投与の効果群

【表 9】

Group		Extinction of edema (m/g) 浮腫の重量	Inflammation inhibition, % 炎症阻害
Control	対照	11,28 ± 1,29 a	-
R. <i>junceus</i> venom ロパルルス・ ジュンセウス毒	5 mg/kg	7,68 ± 0,50 c	35,72
	10 mg/kg	8,05 ± 0,57 c	37,39
	20 mg/kg	7,76 ± 1,01 c	38,02
15 mg/kg dexamethasone デキサメタゾン		4,87 ± 0,95 b	53,70

40

値は平均 ± S D である。少なくとも 1 つの共通の文字を有する群は統計的に異なる（ $p > 0 . 05$ ）。

【 0 0 2 9 】

局所投与経路

ロパルルス・ジュンセウス毒の局所投与により、表 X に示されるように対照群と比較して耳の浮腫の減少が起こった。

50

【 0 0 3 0 】

表 X . マウスの耳の浮腫モデルにおけるロパルルス・ジュンセウス毒の局所投与の効果群

【 表 1 0 】

Group		Extinction of edema (mg) 浮腫の重量	Inflammation inhibition, % 炎症阻害
Control	対照	12,00 ± 0,48 a	-
<i>R. juncus</i> venom ロパルルス・ ジュンセウス毒	10 mg/kg	8,87 ± 0,66 c	28,23
	20 mg/kg	8,25 ± 0,83 c	21,70
Bencydamine	ベンジダミン	4,87 ± 1,40 b	67,60

10

値は平均 ± S D である。少なくとも 1 つの共通の文字を有する群は統計的に異なる ($p > 0 . 0 5$) 。

【 0 0 3 1 】

表 X I は実施した研究の結果を示す。ロパルルス・ジュンセウス毒の経口投与により、陰性対照群と比較して僅かな肉芽腫組織の阻害が起こり、このことは炎症の増殖段階におけるロパルルス・ジュンセウス毒の活性を示唆する。研究した 2 つの生成物の用量は同程度の効果を有していた。

20

【 0 0 3 2 】

表 X I . ラットにおける綿球誘発性の肉芽腫に対するロパルルス・ジュンセウス毒の効果群

【 表 1 1 】

Group		Granuloma weight (mg) 肉芽腫の重量	Inhibition, % 阻害
Control	対照	103,33 ± 5,08 a	-
3 mg/kg dexamethasone	デキサメタゾン	55,40 ± 14,84 b	44,09
10 mg/kg <i>R. Juncus</i> venom	ロパルルス・ ジュンセウス毒	80,60 ± 4,74 c	20,95
20 mg/kg <i>R. Juncus</i> venom	ロパルルス・ ジュンセウス毒	83,10 ± 6,52 c	18,49

30

値は平均 ± S D である。少なくとも 1 つの共通の文字を有する群は統計的に異なる ($p > 0 . 0 5$) 。

【 0 0 3 3 】

表 X I I は、様々な実験群での肉芽腫の重量及びカルミン含量の値を示す。毒素は、対照群と比較して、その 3 m g / k g 及び 5 m g / k g 用量でそれぞれ 1 . 3 2 倍及び 2 . 0 5 倍、肉芽腫の重量を低減した ($p < 0 . 0 5$) 。

40

【 0 0 3 4 】

血管形成は腫瘍の成長及び転移に重要なプロセスであり、そのためこの複雑なプロセスを阻害することができる生成物を有することが腫瘍疾患を治療する代替方法である。

【 0 0 3 5 】

カルミン含量は空気嚢の肉芽腫における新たな血管の形成の指標である。毒素の投与により、肉芽腫組織における新たな血管の形成が 3 m g / k g 及び 5 m g / k g の (I P) 用量でそれぞれ 3 9 . 2 2 % 及び 6 9 . 2 4 % 低減し、全ての実験群間で統計的に有意な差を伴っていた ($p < 0 . 0 0 1$) 。

50

【 0 0 3 6 】

表 X I I . ラット ($n = 10$) のアジュバント誘発性の炎症血管形成における肉芽腫重量及びカルミン含量に対する腹腔内投与されたロパルルス・ジュンセウス毒の効果群

【 表 1 2 】

Group		Granuloma weight (g \pm SD) 肉芽腫重量	Carmin content (A \pm SD) カルミン含量
Control 対照		5,26 \pm 1,11 ^a	0,413 \pm 0,014 ^a
R. <i>junceus</i> venom ロパルルス・ ジュンセウス毒	3 mg/kg	3,59 \pm 0,33 ^b	0,251 \pm 0,015 ^b
	5 mg/kg	2,56 \pm 0,74 ^b	0,127 \pm 0,020 ^c

10

少なくとも 1 つの共通の文字を有する群は統計的に異なる ($p > 0.05$) 。

【 0 0 3 7 】

A : 490 nm での吸光度

表 X I I I は、マウスの 3 % 酢酸誘発性の捻転モデルに腹腔内接種したロパルルス・ジュンセウス毒の鎮痛効果の結果を示す。

【 0 0 3 8 】

【 表 1 3 - 1 】

Experimental groups 実験群	Dose 用量 (mg/kg)	No. of contorsions X \pm DS 捻転の数	Inhibition in the No. of contorsions, % 捻転の数の阻害
NC	-	36,22 \pm 5,11 ^a	-----

20

【 0 0 3 9 】

様々な用量の毒で処理した群は全て、陰性対照群と比較してはるかに低い ($p < 0.05$) 腹部収縮を示した。2.5 mg / kg 及び 7.5 mg / kg 用量の毒は、既知の鎮痛薬であるアスピリンを与えた群と同程度の効果を有していた。その一方で、5.0 mg / kg 用量のロパルルス・ジュンセウス毒は、100 mg / kg のアスピリンの投与により得られた阻害 (49.28 %) より高い阻害を示した (87.74 %) 。

30

【 0 0 4 0 】

表 X I I I . 酢酸誘発性の腹部捻転モデルにおけるロパルルス・ジュンセウス毒の腹腔内投与の効果

【 表 1 3 - 2 】

Experimental groups 実験群	Doses (mg/kg) 用量	No. contorsions X \pm DS 捻転の数	% inhibition of No. of contorsions 捻転の数の阻害率 (%)
CN	-	36,22 \pm 5,11 ^a	-----
ASA	150	18,37 \pm 4,63 ^b	49,28
Venom of R. <i>junceus</i> ロパルルス・ ジュンセウスの 毒	1	22,25 \pm 4,53 ^b	38,57
	2,5	17,87 \pm 5,59 ^b	50,66
	5	4,44 \pm 4,33 ^c	87,74
	7,5	17,86 \pm 5,30 ^b	50,69
ASA	150	18,37 \pm 4,63 ^b	49,28
R. <i>junceus</i> venom ロパルルス・ ジュンセウス毒	1	22,25 \pm 4,53 ^b	38,57
	2,5	17,87 \pm 5,59 ^b	50,66
	5	4,44 \pm 4,33 ^c	87,74
	7,5	17,86 \pm 5,30 ^b	50,69

40

50

N C : 陰性対照 ; N o : 数

A S A : アスピリン

少なくとも 1 つの共通の文字を有する群は統計的に異なる ($p > 0.05$)。

【 0 0 4 1 】

経口経路投与

表 X I V で明らかなように、様々な用量の毒を与えた群は全て、陰性対照群と比較して腹部収縮の数の顕著な低下を示した ($p < 0.05$)。用いた毒用量と陽性対照群 (アスピリン) との比較により、顕著な鎮痛効果が示された。10 mg / kg、15 mg / kg 及び 20 mg / kg 用量のロパルス・ジュンセウス毒はアスピリンと同様の形式で腹部収縮を阻害した。50 mg / kg 用量は陽性対照との統計的に有意な差はもたらさなかったが、実験動物において腹部捻転の 54.78 % の阻害を達成した。

10

【 0 0 4 2 】

表 X I V . ロパルス・ジュンセウス毒の経口投与後の酢酸誘発性の腹部捻転の阻害

【 表 1 4 】

Experimental groups 実験群	Dose (mg/kg) 用量	Inhibition in the No. of contorsions, % 捻転の数の阻害
NC	-	-----
ASA	150	47.01
R. juncus venom ロパルス・ ジュンセウス毒	1	18.84
	5	32.84
	10	36.23
	15	39.85
	20	43.19
	50	54.78

20

N C : 陰性対照

A S A : アスピリン

30

【 0 0 4 3 】

マウスにおける熱的鎮痛モデル

Drug Discover に記載の方法を使用した。

【 0 0 4 4 】

国立実験動物育種センター (C E N P A L A B) から平均体重 20 g ~ 25 g の O F 1 雄性マウスを使用した。 (16 頁)

【 0 0 4 5 】

動物を、アッセイ物質を投与する前とアッセイ物質を投与した後の両方で 55 ° の一定温度のホットプレート (UGO-Basile) 上に置いた。後肢の舐め又は跳躍の形での侵害受容応答の潜時を測定した。20 秒以内に侵害受容応答を示した動物のみをアッセイに選んだ。実験 (Selection) は 40 秒で終了した。

40

【 0 0 4 6 】

生理食塩溶液を陰性対照に投与し、4 % コデインを陽性対照に投与し、様々な用量のロパルス・ジュンセウス毒を試験群に投与した後、それぞれの動物における応答潜時を 2 時間後及び 3 時間後に測定した。

【 0 0 4 7 】

この研究の間、マウスにおける熱刺激に対する侵害受容反応性を、オピオイド鎮痛及び或る種の重大な痛覚過敏性の脊柱反応を検出する急性疼痛感受性試験であるホットプレートアッセイを用いて測定した。物質は、動物の正常な反応時間がその投与によって 2 倍になる場合に重大な鎮痛特性を有するとみなされる。

50

【 0 0 4 8 】

ロパルルス・ジュンセウス毒の鎮痛効果を図 1 及び表 X V に示す。結果により、3 つの用量の生成物の I P 投与がホットプレートの熱刺激を有意に低減したことが示される。図 1 は 3 つの用量のロパルルス・ジュンセウス毒がマウスでのホットプレートアッセイにおいて侵害受容応答の潜時を大幅に延ばすことを示す。

【 0 0 4 9 】

様々な実験群における疼痛阻害を表 X V に示す。熱誘発性の痛覚の強い阻害が観察され、最大の阻害が投与の 2 時間後に起こる。3 時間後でも強力な効果があり、2 . 5 m g / k g 及び 7 . 5 m g / k g 用量は陽性対照と同程度の効果を有するが、7 . 5 m g / k g 用量はコデインよりも大きくより長期的な効果を有する。

【 0 0 5 0 】

表 X V . ホットプレートモデルにおけるロパルルス・ジュンセウス毒の投与の効果

【 表 1 5 】

Group 群	Dose (mg/kg) 用量	Inhibition, % 阻害	
		2 h 時間	3 h 時間
Control 対照	-	26,52 a	16,76 a
<i>R. juncus</i> venom ロパルルス・ ジュンセウス毒	2,5	173,96 b	92,53 b
	5,0	109,19 c	36,31 a
	7,5	145,55 bc	165,54 c
Codeine コデイン	40	120,35 c	94,17 b

少なくとも 1 つの共通の文字を有する群は統計的に異なる ($p > 0 . 0 5$) 。

【 0 0 5 1 】

ホットプレート試験の結果により、より大きくかつより複雑なニューロン統合が舐め及び跳躍応答に必要となることから、ロパルルス・ジュンセウス毒が骨髄よりも中枢神経系に対して高い抗侵害受容効果を有することが示される。

【 0 0 5 2 】

表 X V I . フェナントロリン / Cu^{2+} 誘発性の DNA 損傷のモデルにおけるロパルルス・ジュンセウスサソリ毒の酸化促進能

【 表 1 6 】

Assay substance アッセイ物質	Concentration (**/mL) 濃度	Extent of damage to DNA (****at 532 nm; Median \pm SD) DNA の損傷の程度 (*****532 nm で、中央 値 \pm SD)
Negative control 陰性対照	-	0,069 \pm 0,004
<i>R. juncus</i> scorpion venom ロパルルス・ジュン セウスサソリ毒	7,50	0,023 \pm 0,009*
	18,70	0,36 \pm 0,002*
	37,50	0,047 \pm 0,003*
	56,20	0,069 \pm 0,012
	75,0	0,075 \pm 0,011
Ascorbic acid アスコルビン酸	200 μ M	0,130 \pm 0,006*

異なる文字は対照と比較した統計的な差を意味する ($p < 0 . 0 5$) 。

【 0 0 5 3 】

表 X V I I . フェナントロリン / Cu^{2+} 誘発性の DNA 損傷のモデルにおけるロパルルス・ジュンセウスサソリ毒の酸化促進能。

【表 17】

Assay substance アッセイ物質	Concentration ($\mu\text{g/mL}$) 濃度	Extent of damage to DNA (OD at 532 nm: Median \pm SD) DNAの損傷の程度 (532 nm でのOD、中央値 \pm SD)
Negative control 陰性対照	-	0.40 \pm 0.005
R. juncus scorpion venom ロパルス・ジュンセウスサソリ 毒	4,50	0,024 \pm 0,006
	9,01	0,026 \pm 0,010
	18,02	0,037 \pm 0.008
	36,04	0,024 \pm 0,001
	90,11	0,039 \pm 0,001
Ascorbic acid アスコルビン酸	200 μM	0,647 \pm 0,016*

10

異なる文字は対照と比較した統計的な差を意味する ($p < 0.05$)。

【0054】

表XVII. ロパルス・ジュンセウスサソリ毒の *in vitro*での生物学的活性を評価する研究に使用する細胞

【表 18】

Cell lines 細胞株	Growth form 成長形態	CC ₅₀ (mg/mL)
HeLa (human cervix carcinoma) (ヒト頸癌)	single-layer	1
HEp-2 (human larynx epidermoid carcinoma) (ヒト咽頭類表皮癌)	single-layer	0,78
NCI-H292 (human lung mucoepidermoid carcinoma) (ヒト肺粘膜表皮癌)	single-layer	0,69
A549 (human lung carcinoma) (ヒト肺癌)	single-layer	0,62
U937 (human histiocytic lymphoma) (ヒト組織球性リンパ腫)	suspension	ND
L929 (murine fibrosarcoma) (マウス線維肉腫)	single-layer	1,3
S-180 (murine sarcoma) (マウス肉腫)	suspension	ND
F311 (murine mammary adenocarcinoma) (マウス乳腺癌)	single-layer	1,2
MRC-5 (human lung fibroblasts) (ヒト肺線維芽細胞)	Single-layer	2,2
Vero (African green monkey normal kidney cells) (アフリカミドリザルの正常な腎細胞)	Single-layer	ND
MDCK (normal dog kidney cells) (イヌの正常な腎細胞)	single-layer	ND
N2A (murine neuroblastoma cells) (マウス神経芽腫細胞)	single-layer	1,4
Macrophages (extracted from Balb/c mice peritonea) (Balb/cマウスの腹膜から抽出)	-	ND
Lymphocytes (extracted from Balb/c mice spleens) (Balb/cマウスの脾臓から抽出)	suspension	ND

20

30

40

Single-layer : 単層

Suspension : 懸濁液

ND : 未測定 CC₅₀ : 細胞毒性濃度の中央値

【0055】

50

単層で成長させた細胞培養液（癌）は、正常細胞及び懸濁液中で成長させた腫瘍細胞と比較した有意な細胞成長阻害（ $p < 0.05$ ）と、正常細胞及び懸濁液中で成長させた腫瘍細胞より高い感受性を示した。

【0056】

ヒトの正常なMRC-5細胞株と、ヒト腫瘍細胞との CC_{50} の比較により、ロパルルス・ジュンセウスサソリ毒が、正常細胞と比較して腫瘍細胞において差次的かつ有意な細胞毒性を有することが示された（ $p < 0.05$ ）（表XVII）。

【0057】

毒の曝露により、ヒト及びマウスの腫瘍細胞株において単層成長条件下で有意な成長阻害が引き起こされた（ $p < 0.05$ ）。U937腫瘍細胞株及びS-180腫瘍細胞株（両方とも懸濁液中で成長させた）は毒の投与に対してより低い感受性を示し、その効果は成長を僅かに低下させるだけであった（表XVIII）。

10

【0058】

正常細胞、リンパ球及び腹膜マクロファージは腫瘍細胞よりも低い感受性を示した。用いられる濃度の全範囲にわたって有意な毒性効果は観察されなかった（ $p > 0.05$ ）（表XVIII）。

【0059】

50日後の肺転移の発生率の評価により、サソリ毒の投与が自然肺転移の発現を有意に低減したことが示された（ 0.8 mg/kg 、 3.2 mg/kg ）（表XIX）。

【0060】

表XIX．F311マウス乳腺腫瘍を移植したBalb/cマウスにおける肺転移の発現の発生率。* 対照に対する統計的に有意な差（ $p < 0.05$ ）

20

【表19】

Group 群	Number of mice マウスの数	Metastasis incidence 転移の発生率	No. of metastasis nodules (range) 転移した肺結節の数 (範囲)
Control 対照	6	4/6 66%	0-7
0,2 mg/kg	7	5/7 71%	0-7
0,8 mg/kg	5	2/5 42%	0-2*
3,2 mg/kg	5	2/5 42%	0-3*

30

【0061】

経口投与経路

Balb/cマウスに移植された乳腺腺癌モデルに対するサソリ毒の効果を評価した。治療群に対して4つの用量（ 6 mg/kg 、 12.5 mg/kg 、 25 mg/kg 及び 50 mg/kg ）を使用した。対照には食塩溶液を与え、全ての投与は35日間、経口経路で行った。腫瘍成長は35日間モニタリングした。

【0062】

サソリ毒を投与した実験群は、対照群と比較して有意な腫瘍の成長阻害を示した（ $p < 0.05$ ）（図4）。実験群は、腫瘍の進行遅延に関して35日間の評価の間、用量応答比を示した。

40

【0063】

表XX．10⁶個のS-180マウス細胞を腹腔内移植し、経口で与えるロパルルス・ジュンセウスサソリ毒で処理した実験群の平均生存時間

【表 2 0】

Dose 用量	Control 対照	6 mg/kg	12,5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
Survival time (days) 生存時間 (日数)	20	20,5	24	22,5	20

【 0 0 6 4】

表 X X I . 1 0 ⁶ 個の S - 1 8 0 マウス細胞を腹腔内移植し、経口で与えるロパルルス・ジュンセウスサソリ毒で処理した実験群間の生存時間

10

【表 2 1】

Dose 用量	Control 対照	6 mg/kg	12,5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
Survival, % 生存率 (%)	0	26	37	22	0

【 0 0 6 5】

1 2 . 5 m g / k g 用量ではより長期の平均生存時間が得られ (2 4 日間) 、それに 2 5 m g / k g 用量 (2 2 . 5 日間) 及び 6 m g / k g 用量 (2 0 . 5 日間) が続き、対照の平均生存時間は 2 0 日間であった (表 X X I) 。同様に、1 2 . 5 m g / k g 用量は、対照群の 1 0 0 % のマウスが死滅した時間で最大の生存率 (パーセント) を示し (表 X X I) 、6 m g / k g 用量及び 2 5 m g / k g 用量はそれぞれ、2 6 % 及び 2 2 % を示した。これらの結果にもかかわらず、3 つの実験群 (6 m g / k g 、1 2 . 5 m g / k g 及び 2 5 m g / k g) 間での生存時間及び生存率 (パーセント) の増大は統計的に有意なものではなかった。5 0 m g / k g 用量は全ての場合において対照と同様の値を示した。

20

【 0 0 6 6】

分子排除クロマトグラフィにより得られた画分の抗増殖活性に対するアッセイ

細胞成長に対するタンパク質画分の効果を実施例 6 と同様の方法で決定した。本研究は 2 つの腫瘍細胞株 : H e L a (ヒト頸癌) 及び A 5 4 9 (ヒト肺癌) と、正常な M R C - 5 細胞株 (ヒト肺線維芽細胞) とを使用した。画分はウェル内において 9 μ g / m L ~ 6 0 0 μ g / m L の最終濃度とした。

30

【 0 0 6 7】

細胞株における画分の細胞毒性評価により、L B - 0 3 画分及び L B - 0 4 画分では腫瘍細胞の成長阻害が示され、正常細胞においてはほとんど毒性が示されなかった。表 X X I I は精製画分のそれぞれに対する C C ₅₀ を示す。

【 0 0 6 8】

表 X X I I . 腫瘍細胞株及び正常細胞株における分子排除クロマトグラフィにより得られた画分の相対分子量及び平均細胞毒性濃度

【表 2 2】

R. junceus venoms fractions ロパルルス・ジュンセウス毒の画分	Relative molecular weights* 相対分子量	Mean cytotoxic concentration (CC ₅₀) (μg/mL) 平均毒性濃度		
		Hela	A549	MRC-5
LB-01	30 kDa-72 kDa	835,3	420	245,1
LB-02	14 kDa- 30 kDa	208,7	250	276,9
LB-03	4 kDa - 8 kDa	140,1	116,6	439,2
LB-04	≤4 kDa	423,6	283	613,9

40

* 相対分子量は 1 0 g P M 対 V 。 V 。の検量線から決定した。

M W : パターンタンパク質の分子量

V 。 : カラムの死容積

50

V_e : それぞれのタンパク質ピークに対する溶出容量

【 0 0 6 9 】

F P L C 分子排除クロマトグラフィにより得られた画分を、それらのタンパク質組成を確認するために 4 % から 2 0 % への勾配を用いるポリアクリルアミドゲル電気泳動で泳動させ、それを図 7 に表す。

【 0 0 7 0 】

L B - 0 3 画分及び L B - 0 4 画分は低分子量タンパク質組成を有し、更には腫瘍細胞 (H e l a 及び A 5 4 9) に対するより高い細胞毒性と、正常細胞 (M R C - 5) に対する低い毒性とを示す画分であった。

【 0 0 7 1 】

これらの画分は C 1 8 逆相分析曲線を用いる高分解能液体クロマトグラフィにより再精製した。2つの溶液を移動相として使用した：溶液 A (0 . 1 2 % トリフルオロ酢酸 (T F A) 水溶液) 及び溶液 B (0 . 1 0 % T F A のアセトニトリル溶液) 。画分成分の溶出を、70 分間、溶液 B の 0 % から 7 0 % への段階勾配を用いて 0 . 5 m l / 分の流量で行い、画分の検出波長は 2 2 0 n m とした。腫瘍細胞 (H e l a) 及び正常細胞 (C H O) において得られた純粋なペプチドを実施例 6 に記載されるような方法で評価し、それらの分子量及びタンパク質配列を、高分解能の液体クロマトグラフィ装置に組み込まれた質量分析により決定した。

【 0 0 7 2 】

腫瘍細胞に対する高い細胞毒性活性と、正常細胞に対する低い毒性とを有する 8 つのペプチド (R j L B - 0 1 、 R j L B - 0 3 、 R j L B - 0 4 、 R j L B - 0 5 、 R j L B - 0 7 、 R j L B - 0 8 、 R j L B - 0 9 及び R j L B - 1 4) が得られた。これらの結果により、全毒で観察されたものが裏付けられ、腫瘍細胞に対する毒成分の選択的毒性が確認される。

【 0 0 7 3 】

活性成分の精製に基づき、毒におけるそれらの存在率を決定した (表 X X I I I) 。

【 0 0 7 4 】

表 X X I I I . 毒組成物における活性成分の割合及び腫瘍細胞に対する *i n v i t r o* での生物学的活性の範囲

【 表 2 3 】

Active principle 活性成分	Proportion of venom, % 毒における割合	<i>In vitro</i> biological activity range (%) <i>in vitro</i> での生物学的活性の範囲
RjLB-01	1,5-20	0,945-1,89
RjLB-03	8-9	4,5-9
RjLB-04	0,5-1,0	0,445-0,89
RjLB-05	0,5-0,7	0,33-0,71
RjLB-07	0,5-0,8	0,5-1,0
RjLB-08	0,5-1,0	1,5-3,0
RjLB-09	0,3-0,6	3,65-4,1
RjLB-14	0,4-0,8	3,5-6,0

(2 4 頁)

【 0 0 7 5 】

R j L B - 0 1 ペプチド、R j L B - 0 3 ペプチド及び R j L B - 0 4 ペプチドで得られた分子量はそれぞれ、9 0 8 D a 、1 9 6 4 D a 及び 4 7 4 8 . 1 4 D a であった。得られた配列をサソリ毒ペプチドデータベースと比較したが、これまでに記載されたペプチドとの相同性は見られず、このことは結果の新規性の更なる証拠である。

【 0 0 7 6 】

本発明による別の結果は以下のようにして得られた配合物である：50匹～100匹の口パルス・ジュンセウス種のサソリを採取し、それらの毒を電気刺激により抽出し、10mL～20mLの蒸留水で希釈した。次いで、それを15分間の10000rpmの遠心分離により清澄化して、粘液及び細胞残渣等の成分を取り除いた。同時に、それらのタンパク質を、ローリー法を用いて測定し、結果は5mg/mL～15mg/mLの濃度であった。それからサソリ毒を唯一の賦形剤として蒸留水を用いて適切に希釈し、濃度範囲が0.05mg/mL～0.1mg/mLである配合物を得た。

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】平均寿命が2～3時間内で変動する中枢性鎮痛薬であるコデイン（陽性対照）の挙動を、本発明者らの結果に併せて示す図である。

【図2】A549腫瘍細胞株及びHeLa腫瘍細胞株から抽出されたDNAの1.5%アガロースゲル電気泳動を示す図である。毒は1つのウェル当たり0.5mg/mLの最終濃度で与えられた。それぞれの細胞株のDNAを24時間後及び48時間後に抽出した。

トラックM：ラムダDNA/Hind III分子量マーカー。トラック1～3：A549細胞株、1：毒を含まないDNA対照、2：24時間後に抽出したDNA、3：48時間後に抽出したDNA。トラック4～6：HeLa細胞株、4：毒を含まないDNA対照、5：24時間後に抽出したDNA、6：48時間後に抽出したDNA。

【図3】実験群における腫瘍成長の動態を示す図である。腫瘍成長は35日間モニタリングした。腫瘍成長の阻害は与えられた毒の用量に依拠していた。対照との統計的な有意性は、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ であった。

【図4】実験群における腫瘍成長の動態を示す図である。腫瘍成長は35日間モニタリングした。腫瘍成長の阻害は与えられた毒の用量に依拠していた。対照との統計的な有意性は、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ であった。

【図5】実験による肺転移の発生に対するサソリ毒の経口投与の効果tを示す図である。統計的に有意な差：** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

【図6】12 HR10/30 Superose分子排除カラムを用いた低圧液体クロマトグラフィにおける口パルス・ジュンセウスサソリ毒のクロマトグラフィプロファイルを示す図である。

【図7】還元条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動を示す図である。精製により得られる画分を、低圧液体クロマトグラフィを用いて適用した。トラック1：分子量マーカー、トラック2：全毒、トラック3：LB-01画分、トラック4：LB-02画分、トラック5：LB-03画分、トラック6：LB-04画分。

【図8】評価した画分の再精製により得られた純粋なペプチドに関する濃度応答曲線を示す図である。評価をHeLa（ヒト頸癌）腫瘍細胞で行った。用いる濃度は6.25μg/mL～400μg/mLであった。

【図9】評価した画分の再精製により得られた純粋なペプチドに関する濃度応答曲線を示す図である。評価をCHO（チャイニーズハムスター卵巣）非腫瘍細胞で行った。用いる濃度は6.25μg/mL～800μg/mLであった。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0078】

実施例1 マウスにおけるクロトン油誘発性の耳の浮腫の急性炎症モデル

国立実験動物育種センター（CENPALAB）から平均体重18g～22gのOF-1雄性マウスを使用した。CYTED（Ibero-American Programme for Science and Technology Development、ペルー、1996年11月）により記載された方法を使用した。0.5% アセトンクロトン油溶液を使用した。デキサメタゾン（0.5% CMCに溶解した）。

【0079】

実施例2 ラットにおける綿球移植モデル

10

20

30

40

50

国立実験動物育種センター (CENPALAB) から体重 180 g のスプラーグドーリーラットを使用した。

【0080】

CYTED (Ibero-American Programme for Science and Technology Development、ペルー、1996年11月) による綿球移植方法を行った。

【0081】

炎症は損傷に対する組織応答である。これには、酵素の関与及び活性化、メディエータ放出、流体溢出、細胞移動、並びに組織の破壊及び修復が含まれる (Vane, 1995)。抗炎症効果は化学物質群によりもたらされ、それらの薬理活性と化学構造との間には僅かに相関関係があることが知られている (Sertie, 1990)。これにより、炎症プロセスの複雑性と合わせて考えると、薬理アッセイを実施するのに様々な実験モデルを使用することが要求される。ラットにおける綿球肉芽腫 (正: granuloma) モデルは、慢性炎症状態に対する効果を研究するのに頻繁に用いられるアッセイである (Elieter, 1999)。綿球移植後において3つの炎症段階が明らかになっている。最後の段階は3～6日目に起こる細胞増殖段階である。この段階は、デキサメタゾン等の抗炎症性ステロイド及び非ステロイド性抗炎症薬により阻害することができる (Sw, 1972)。

【0082】

動物は綿栓の移植の7日後に、確立された安楽死方法によって屠殺し、綿球を取り出し研究を行った。綿球の最終重量と初期重量との差を発生した肉芽腫組織とみなした。

【0083】

実施例3 炎症性血管形成モデル

CENPALABから体重180 g～240 gのスプラーグドーリー雄性ラットを使用した。

【0084】

炎症性血管形成は、血管形成カスケードにおいて進行する一連の異なるが基本的には類似する分子機構を伴う複雑なプロセスである。肉芽腫形成が誘導された6日後には、肉芽腫は対照群において明確に規定され、触診可能であった。これは2001年にPrimellesによって報告された結果と一致している。毒を投与した動物の場合、肉芽腫は触診で小さくなっており、それらの巨視的観察により、あまり明確ではない境界が示され、肉芽腫は表皮にそれほど付着していなかった。

【0085】

実施例4 鎮痛活性

マウスにおける酢酸誘発性の捻転のモデル

CYTEDに記載の方法は以下のとおりであった。

【0086】

国立実験動物育種センター (CENPALAB) から平均体重20 g～25 gのOF1雄性マウスを使用した。

【0087】

腹腔内経路投与

1 mg / kg、2.5 mg / kg及び7.5 mg / kg用量のロパルルス・ジュンセウス毒の腹腔内接種を行った。30分後、実験動物に0.1 mLの3パーセント酢酸溶液を腹腔内投与し、捻転の数/動物を初めに捻転が観察されてから10分間、記録した。

【0088】

経口経路投与

1 mg / kg、5 mg / kg、10 mg / kg、15 mg / kg、20 mg / kg及び50 mg / kg用量のロパルルス・ジュンセウス毒を経口投与した。1時間後、実験動物に0.1 mLの3パーセント酢酸溶液を腹腔内投与し、捻転の数/動物を初めに捻転が観察されてから10分間、記録した。

【0089】

10

20

30

40

50

実施例 5 抗酸化活性の評価

ロパルス・ジュンセウス毒による *in vitro*での抗酸化活性を、銅フェナントロリン系及びブレオマイシン鉄系の酸化プロセスにおけるDNA保護効果により評価した。毒はDNAを過酸化プロセスから保護することから、抗酸化活性を示した。

【0090】

銅フェナントロリン系及びブレオマイシン鉄系は、上記の配合物におけるロパルス・ジュンセウス誘導体がDNAに対する酸化促進効果を有しないことを示した。様々なロパルス・ジュンセウス誘導体濃度で得られる吸光度値は陽性対照で得られる吸光度値よりも低い。表XVI及び表XVIIはかかる評価の結果を示す。

【0091】

実施例 6 腫瘍細胞及び正常細胞のパネルにおける *in vitro*での細胞毒性

細胞成長に対する毒の効果を、ミトコンドリア脱水素酵素によるこの(イエロー)テトラゾリウム塩の代謝還元により起こる細胞増殖を測定するMTTアッセイにおいて確認した。生じる化合物(ブルーホルマザン)を溶解し、分光光度法によって定量することができる。

【0092】

9つの腫瘍細胞株を本研究に用いた: HeLa (ヒト頸癌)、HEp-2 (ヒト咽頭類表皮癌)、NCI-H292 (ヒト肺粘膜表皮癌)、A549 (ヒト肺癌)、U937 (ヒト組織球性リンパ腫)、L929 (マウス線維肉腫)、S-180 (マウス肉腫)、及びF311 (マウス乳腺癌)。同様に、3つの正常細胞株を用いた: MRC-5 (ヒト肺線維芽細胞)、Ver o (アフリカミドリザルの正常な腎細胞)、及びMDCK (イヌの正常な腎細胞)。腹膜マクロファージ(Balb/cマウスの腹膜から抽出)及びリンパ球(Balb/cマウスの脾臓から抽出)も評価した。細胞を、細胞培養物の特質に応じて、培養フラスコ内の最小必須培地(MEM)又はRPMI-1640培地中で成長させ、2mM グルタミン、非必須アミノ酸、10% ウシ胎仔血清(BFS)、及び100 IU/mL - 100 µg/mL ペニシリン - ストレプトマイシンを添加した。それぞれの培地を、単層が形成されるまで37 °C及び5パーセントCO₂で高湿度雰囲気下においてインキュベートした。それぞれの細胞株を、0.25%トリプシン - EDTA溶液を用いて剥離し、ノイバウエルチャンバーでカウントした後、2 × 10⁵ 個の細胞/mL濃度で調製した。

【0093】

本アッセイを96ウェルの平底のポリスチレン細胞培養皿(Coming Inc., costar (商標))において行った。50 µLの細胞株をそれぞれ、各ウェルに注ぎ入れ、5パーセントCO₂及び37 °C 雰囲気下で24時間インキュベートした。かかる期間の後、先に溶解させた毒を含む培地を50 µL添加した。最終毒濃度は、ウェルにおいて0.1 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、0.75 mg/mL及び1 mg/mLであった。最終細胞株濃度は全て10⁴ 個の細胞/ウェルであった。ウシ胎仔血清(BFS)は培地中において10%で使用した。

【0094】

培養皿を5パーセントCO₂及び37 °C 雰囲気下で3日間再度インキュベートした。かかる期間の後、10 µLのMTT滅菌溶液(5 mg/mLのテトラゾリウム塩の滅菌PBS溶液)を各ウェルに添加し、同じ条件下で4時間インキュベートした。最後に、培地を捨て、200 µL/ウェルのジメチルスルホキシド(DMSO)溶液を添加し、高湿度雰囲気下において37 °Cで30分間インキュベートした。光学密度(OD)を、リファレンスとして630 nmを用い、Dynex TechnologiesのELISA Micro Readerにおいて560 nmで読み取った。それぞれの画分の濃縮を3回行い、本アッセイを4回実施した。

【0095】

濃度応答曲線分析のために、細胞増殖率(パーセント)を、様々な毒濃度に対して式(1 - OD(サンプル)/OD(対照)) × 100からグラフにより得た。平均細胞毒性濃

10

20

30

40

50

度は、非処理の対照と比較して生存細胞の数（MTT吸光度）の50パーセントの低減をもたらす毒濃度である CC_{50} で表し、評価した細胞のそれぞれについて表XVに表す。

【0096】

実施例7．アポトーシス研究

アポトーシスを求める研究をDNA断片化により行った。HeLa細胞株及びA549細胞株を使用した。結果を図2に示す。アポトーシスの特徴的なDNA断片化は毒で処理したHeLa細胞の対応トラックにおいて観察され、対照ウェル及びA549細胞株では単一の無傷の染色体DNAバンドが観察された。これらの結果により、サソリ毒はアポトーシス及び壊死の両機構により細胞死を誘導することができることが示される。

【0097】

実施例8．固形腫瘍における抗腫瘍活性。F311乳腺腺癌の実験モデル。腹腔内投与経路

Bal/cマウスに移植された乳腺腺癌モデルに対するサソリ毒の効果を評価した。3つの用量（0.2mg/kg、0.8mg/kg及び3.2mg/kg）を処理群に用いた。対照に食塩溶液を腹腔内投与した。腫瘍成長を35日間モニタリングした。腫瘍を移植して50日後、動物を屠殺し、それらの肺を取り出し、肺転移について検査した。

【0098】

サソリ毒で処理した実験群は、対照群と比較して有意な腫瘍成長阻害を示した（ $p < 0.05$ ）（図3）。実験群は、腫瘍の進行遅延に関しての35日間の評価の間、用量応答比を示した。処理群における腫瘍成長の有意な低減により、ロパルス・ジュンセウスサソリ毒が、少なくとも評価期間の間、腫瘍成長に影響を及ぼすことから抗腫瘍効果を有することが示される。

【0099】

実施例9 F311乳腺腺癌の実験モデル。経口投与経路

Balb/cマウスに注入した乳腺腺癌モデルにおけるサソリ毒の効果を評価した。4つの用量（6mg/kg、12.5mg/kg、25mg/kg及び50mg/kg）を処理群に用い、対照群に食塩溶液を経口投与した。腫瘍成長を35日間モニタリングした。

【0100】

サソリ毒（12.5mg/kg、25mg/kg及び50mg/kg）で処理した実験群は、対照群と比較して有意な腫瘍成長阻害を示した（ $p < 0.05$ ）（図4）。処理群で見られた腫瘍進行の有意な低減により、ロパルス・ジュンセウスサソリ毒が少なくとも評価期間の間、腫瘍成長に影響を及ぼすことから、ロパルス・ジュンセウスサソリ毒の抗腫瘍効果が実証される。

【0101】

実施例10 抗転移活性 転移性肺腫瘍の実験モデル。

転移性肺腫瘍に関し、サソリ毒の効果が、Balb/cマウスに移植された乳腺ガンのモデルで評価された。4タイプの投与（6mg/kg、12.5mg/kg、25mg/kg及び50mg/kg）が、処置中に行われた。コントロールには、食塩溶液が投与された。処置は、肺にガンを静脈投与で移植後24時間で始めた。処置は、21日間、朝に、毎日行われた。全ての実験グループで、最後の投与後24時間で、頸椎脱臼で実験動物が屠殺され、肺臓器が転移出現の分析のために抽出された。ガンの発現は、100%であった。6mg/kg投与の実験群が、転移の出現に関し、コントロール群に比べ最も高いレベルを示した。25mg/kg投与の実験群は、コントロール群に比べ、転移の出現の減少を示した。しかし、差異は、有意差ではなかった。12.5mg/kgと50mg/kg投与群は、転移の出現に関し、統計的に有意差をもって減少を示した。

【0102】

実施例11 活性成分としての毒タンパク質の精製及び同定

全タンパク質内容物を分離するために、全毒を0.1M 酢酸アンモニア（ NH_4Ac ）に溶解し、10000rpmで15分間遠心分離した。上清を寸法が10×300mm

10

20

30

40

50

の 12 HR 10/30 Superose 過ゲルカラムを備える AKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) 低圧液体クロマトグラフィ機器に投入した。カラムを、0.1 M NH_4Ac 及び同じ溶媒に混合した材料を用いて 0.5 mL/分の流量で平衡化した。吸光度を 280 nm の光学密度 (OD) で 72 分間、モニタリングした。75 HR 10/20 Superose 分子排除カラムを、リボヌクレアーゼ A (13.7 Kda)、キモトリプシノーゲン (25 Kda)、オボアルブミン (43 Kda)、アルブミン (67 Kda) 及びブルーデキストラン 2000 を含むパターンタンパク質キットを用いて校正した。パターン曲線を作成し、クロマトグラフィの間に得られる様々なタンパク質画分の相対分子量を決定した。クロマトグラフィ操作の結果を図 6 に表す。

【0103】

実施例 12 ヒトがん患者に与えられる配合物に関する臨床研究 (天然物)

本研究の目的はがん患者における生活の質を評価することであった。本研究に含まれる被験体は組織学的に確認された任意の病期のがんを患う男女の患者であった。患者のインフォームド Consent と、カルテの概要とが記載された書類は、治療するがん専門医により作成された。書類には、臨床期間 (evolution) の間に病院において医師によって行われた患者の臨床状態の評価が含まれていた。追跡調査の間隔 (periodicity) は 2 ヶ月以上とした。追跡調査を 1 年間行った。配合物は 40 mL 容のフラスコ内において 0.05 mg/mL ~ 0.1 mg/mL の濃度で調製した。フラスコの内容物を賦形剤として用いられる蒸留水で希釈し、1 リットルにした。生成物を経口経路で毎日投与し、推奨用量は患者の状態及び組織学的診断に依拠するものとした。

【0104】

総計 100 人の患者が本研究に含まれ、評価するがんの主な場所は乳房、前立腺、結腸、肺、脳及び脾臓であった。生成物の投与によっては、治療の何れの時点であっても全く有害反応が引き起こされず、このことは前臨床研究での観察結果に一致していた。全ての症例で、全ての肺がん患者において呼吸困難及び咳嗽がほとんど又は全くないというような主な臨床レベルでの変化の改善により明らかのように、生活の質が改善された。多くの患者は、一部の症例において病変の安定化、及びその他の症例においては病変の消失という形でより良好な X 線検査結果を示した。加えて、血液学的レベルでの変化が安定化し、疼痛及び膨脹が低減した。1 年間、本発明の配合物で処理した患者の 50% 超が研究状態の幾つかで推定された生存時間よりも長期にわたる生存時間を有していた。

【0105】

実施例 13 ヒトがん患者における配合物の臨床研究 (同毒療法産物)

本研究の目的はがん患者における生活の質の評価であった。研究個体として含めるのに、任意の病期のがんであると組織学的に確認された男女の患者を用いた。患者の同意書 (consent act) と、一次医療がん専門医により作成されたカルテの概要とを含む書類を用意した。

【0106】

患者の臨床的挙動の評価を書類に含め、評価は臨床的進行を通して追跡調査し、患者が元いた病院の専門医によって行われた。追跡調査の間隔は少なくとも 2 ヶ月とした。追跡調査は 1 年間行った。配合物は 40 mL の容量のボトル内において 0.05 mg/mL ~ 0.1 mg/mL の濃度で調製した。フラスコの内容物を 1 リットルになるまで賦形剤として用いられる蒸留水で希釈した。生成物を経口経路で毎日投与し、推奨用量は患者の病期及び組織学的診断に依拠するものとした。

【0107】

総計 100 人の患者が本研究に含まれ、がんの主な場所は乳房、前立腺、結腸、肺、脳及び脾臓であった。生成物の投与によっては、何れの症例であっても、治療の間は有害反応が引き起こされず、このことは前臨床研究で観察されたものに一致していた。全ての症例で、肺がん患者の全症例において呼吸困難及び咳嗽の低減又は消失のような主な臨床レベルでの変化の改善を含む生活の質の向上が観察された。多くの患者において、一部の症例において病変が安定化し、その他の症例においては病変が消失したことから、X 線検査

結果の改善が確認された。これに加えて、血液学的レベルでの変化の安定化が達成され、疼痛及び炎症が低減した。１年間、本発明の対象である配合物で処理した患者の５０％超で、研究状態の幾つかで推定された生存期間を上回った。

【０１０８】

実施例１４．Vidatox（商標）３０ＣＨ臨床研究

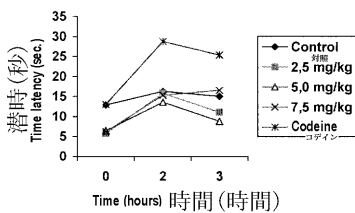
VIDATOX（商標）３０ＣＨは、LABIOFAMのホメオパシー研究所で開発されたホメオパシー生物療法薬である。その活性成分は３０００倍希釈のロパルルス・ジュンセウスサソリ毒である。VIDATOX（商標）３０ＣＨは３３％アルコール媒体中で点滴剤の形態となる。

【０１０９】

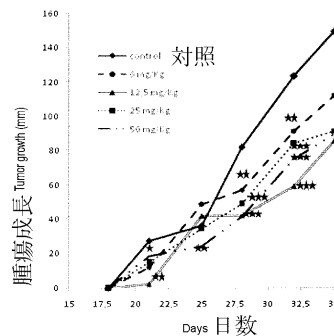
特別ながん治療を受けている男女の患者１７４人で行われた本研究により、様々な身体部位（肺、前立腺、乳房、結腸、膵臓、リンパ球、脳、直腸等）におけるがんの治療に対するVIDATOX（商標）３０ＣＨの補助効果が実証された。その結果により、生成物を投与した患者の９６％が１２ヶ月を越えて生存し、患者の９０％が医師によって確認された臨床症状の改善を報告し、６３人の患者のうち、中期状態まで進行した６２％の患者の疼痛（主症状として）が緩和処置する必要がなく、２７％の患者では疼痛の報告なく、いずれにおいても治療に対する有害反応の報告はなかったことが示される。

10

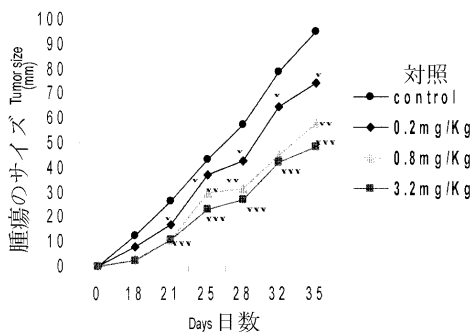
【図１】



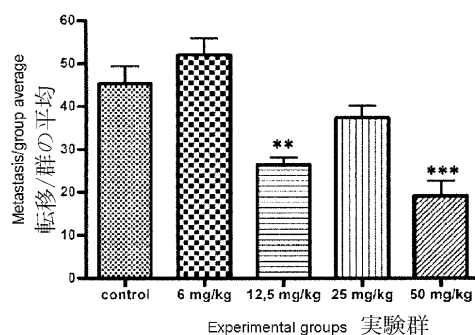
【図４】



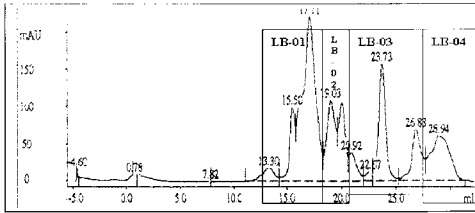
【図３】



【図５】



【 図 6 】



【 図 8 】

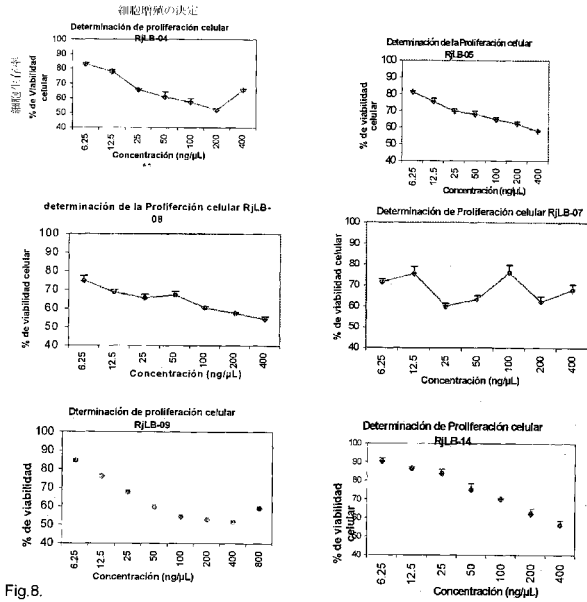
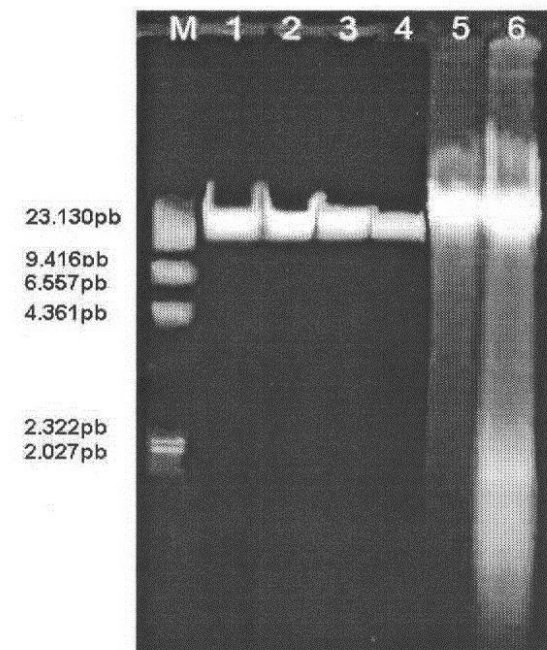


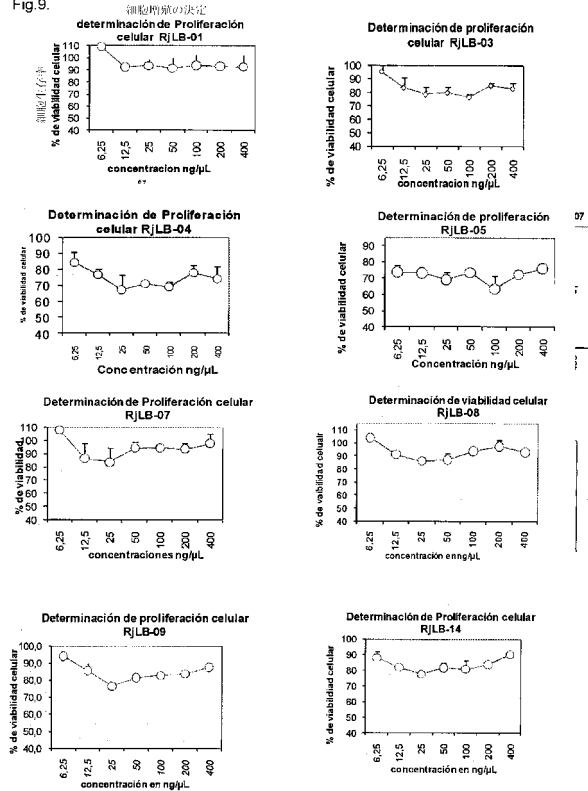
Fig.8.

【 図 2 】

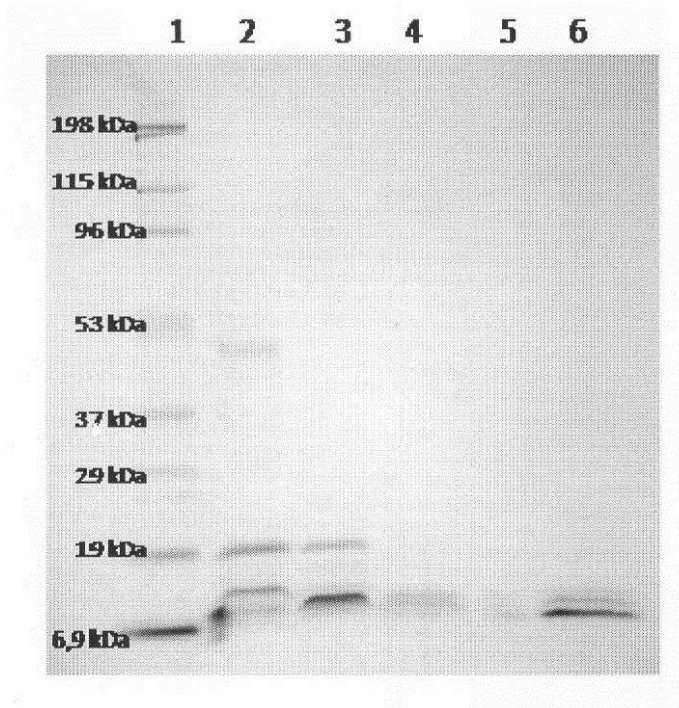


【 図 9 】

Fig.9.



【 図 7 】



【 配 列 表 】

2013542196000001.app

【 国際調査報告 】

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2011/000006

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
INV.	A61K38/08	C07K7/06
ADD.		
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)		
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, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	US 2009/123558 A1 (MIKAELIAN ARTHUR [US]) 14 de mayo de 2009 (2009-05-14) resumen página 1, párrafo 5 - párrafo 7 página 4, párrafos 38,40	1,9-14
A	EP 1 443 053 A1 (UNIV SHENYANG PHARMACEUTICAL [CN]) 4 de agosto de 2004 (2004-08-04) mencionado en la solicitud todo el documento	1,9-14
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo		
* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "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). "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.		
"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. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "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. "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional		Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
5 de junio de 2012		04/10/2012
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional		Funcionario autorizado
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Grötzing, Thilo
N° de fax	N° de teléfono	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2011/000006

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	<p>LYONS S A ET AL: "CHLOROTOXIN, A SCORPION-DERIVED PEPTIDE, SPECIFICALLY BINDS TO GLIOMAS AND TUMORS OF NEUROECTODERMAL ORIGIN", GLIA, WILEY-LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 39, no. 2, 1 de agosto de 2002 (2002-08-01), páginas 162-173, XP009006886, ISSN: 0894-1491, DOI: 10.1002/GLIA.10083 mencionado en la solicitud todo el documento</p> <p>-----</p>	1,9-14
A	<p>WO 03/101475 A1 (TRANSMOLECULAR INC [US]; ALVAREZ VERNON L [US]; GONDA MATTHEW A [US]) 11 de diciembre de 2003 (2003-12-11) todo el documento</p> <p>-----</p>	1,9-14
X,P	<p>GARCA-GMEZ B I ET AL: "Biochemical and molecular characterization of the venom from the Cuban scorpion", TOXICON, ELMSFORD, NY, US, vol. 58, no. 1, 12 de abril de 2011 (2011-04-12), páginas 18-27, XP028230571, ISSN: 0041-0101, DOI: 10.1016/J.TOXICON.2011.04.011 [recuperado el 2011-05-13] resumen página 18, frase ligando las columnas página 26, columna de izquierda, párrafo 1</p> <p>-----</p>	1,9-14

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2011/000006

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)	
<p>Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2)a) por los siguientes motivos:</p>	
1. <input type="checkbox"/>	<p>Las reivindicaciones N°s: se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:</p>
2. <input type="checkbox"/>	<p>Las reivindicaciones N°s: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:</p>
3. <input type="checkbox"/>	<p>Las reivindicaciones N°s: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).</p>
Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)	
<p>La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:</p> <p style="text-align: center;">véase hoja adicional</p>	
1. <input type="checkbox"/>	<p>Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.</p>
2. <input type="checkbox"/>	<p>Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.</p>
3. <input type="checkbox"/>	<p>Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:</p>
4. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:</p> <p style="text-align: center;">1 (completamente); 9-14 (parcialmente)</p>
<p>Indicación en cuanto a la protesta</p>	
<p><input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.</p>	
<p><input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.</p>	
<p><input type="checkbox"/> El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.</p>	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/CU2011/000006

Esta Administración de Búsqueda Internacional encontró múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, como se lista a continuación:

**1. reivindicaciones: 1 (completamente); 9-14 (parcialmente)
Péptido nombrado RjLB-01 y realizaciones asociadas.**

**2. reivindicaciones: 2 (completamente); 9-14 (parcialmente)
Péptido nombrado RjLB-03 y realizaciones asociadas.**

**3. reivindicaciones: 3 (completamente); 9-14 (parcialmente)
Péptido nombrado RjLB-04 y realizaciones asociadas.**

**4. reivindicaciones: 4 (completamente); 9-14 (parcialmente)
Péptido nombrado RjLB-05 y realizaciones asociadas.**

**5. reivindicaciones: 5 (completamente); 9-14 (parcialmente)
Péptido nombrado RjLB-07 y realizaciones asociadas.**

**6. reivindicaciones: 6 (completamente); 9-14 (parcialmente)
Péptido nombrado RjLB-08 y realizaciones asociadas.**

**7. reivindicaciones: 7 (completamente); 9-14 (parcialmente)
Péptido nombrado RjLB-09 y realizaciones asociadas.**

**8. reivindicaciones: 8 (completamente); 9-14 (parcialmente)
Péptido nombrado RjLB-14 y realizaciones asociadas.**

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CU2011/000006

US 2009123558	A1	14-05-2009	US 2009123558	A1	14-05-2009
			US 2012082701	A1	05-04-2012

EP 1443053	A1	04-08-2004	AT 437178	T	15-08-2009
			CN 1341662	A	27-03-2002
			EP 1443053	A1	04-08-2004
			US 2006252676	A1	09-11-2006
			WO 03037922	A1	08-05-2003

WO 03101475	A1	11-12-2003	AT 458751	T	15-03-2010
			AU 2003237347	A1	19-12-2003
			AU 2003240496	A1	19-12-2003
			CA 2487425	A1	11-12-2003
			CA 2494451	A1	11-12-2003
			EP 1539207	A1	15-06-2005
			EP 1553962	A1	20-07-2005
			EP 2182004	A1	05-05-2010
			EP 2431385	A2	21-03-2012
			ES 2341767	T3	28-06-2010
			JP 2005537234	A	08-12-2005
			JP 2011153149	A	11-08-2011
			MX PA04011871	A	26-07-2005
			US 2006166892	A1	27-07-2006
			WO 03101474	A1	11-12-2003
			WO 03101475	A1	11-12-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/CU2011/000006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/08 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)

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, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/123558 A1 (MIKAELIAN ARTHUR [US]) 14 May 2009 (2009-05-14) abstract page 1, paragraph 5 - paragraph 7 page 4, paragraphs 38,40 -----	1,9-14
A	EP 1 443 053 A1 (UNIV SHENYANG PHARMACEUTICAL [CN]) 4 August 2004 (2004-08-04) cited in the application the whole document ----- -/--	1,9-14

☒ 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

5 June 2012

Date of mailing of the international search report

04/10/2012

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

Grötzing, Thilo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/CU2011/000006

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>LYONS S A ET AL: "CHLOROTOXIN, A SCORPION-DERIVED PEPTIDE, SPECIFICALLY BINDS TO GLIOMAS AND TUMORS OF NEUROECTODERMAL ORIGIN", GLIA, WILEY-LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 39, no. 2, 1 August 2002 (2002-08-01), pages 162-173, XP009006886, ISSN: 0894-1491, DOI: 10.1002/GLIA.10083 cited in the application the whole document -----</p>	1,9-14
A	<p>WO 03/101475 A1 (TRANSMOLECULAR INC [US]; ALVAREZ VERNON L [US]; GONDA MATTHEW A [US]) 11 December 2003 (2003-12-11) the whole document -----</p>	1,9-14
X,P	<p>GARCA-GMEZ B I ET AL: "Biochemical and molecular characterization of the venom from the Cuban scorpion", TOXICON, ELMSFORD, NY, US, vol. 58, no. 1, 12 April 2011 (2011-04-12), pages 18-27, XP028230571, ISSN: 0041-0101, DOI: 10.1016/J.TOXICON.2011.04.011 [retrieved on 2011-05-13] abstract page 18, sentence bridging the columns page 26, left-hand column, paragraph 1 -----</p>	1,9-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU2011/000006**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1(completely); 9-14(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ CU2011/ 000006

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1(completely); 9-14(partially)
Peptide "RjLB-01" and related embodiments.

2. claims: 2(completely); 9-14(partially)
Peptide "RjLB-03" and related embodiments.

3. claims: 3(completely); 9-14(partially)
Peptide "RjLB-04" and related embodiments.

4. claims: 4(completely); 9-14(partially)
Peptide "RjLB-05" and related embodiments.

5. claims: 5(completely); 9-14(partially)
Peptide "RjLB-07" and related embodiments.

6. claims: 6(completely); 9-14(partially)
Peptide "RjLB-08" and related embodiments.

7. claims: 7(completely); 9-14(partially)
Peptide "RjLB-09" and related embodiments.

8. claims: 8(completely); 9-14(partially)
Peptide "RjLB-14" and related embodiments.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CU2011/000006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009123558 A1	14-05-2009	US 2009123558 A1	14-05-2009
		US 2012082701 A1	05-04-2012
EP 1443053 A1	04-08-2004	AT 437178 T	15-08-2009
		CN 1341662 A	27-03-2002
		EP 1443053 A1	04-08-2004
		US 2006252676 A1	09-11-2006
		WO 03037922 A1	08-05-2003
WO 03101475 A1	11-12-2003	AT 458751 T	15-03-2010
		AU 2003237347 A1	19-12-2003
		AU 2003240496 A1	19-12-2003
		CA 2487425 A1	11-12-2003
		CA 2494451 A1	11-12-2003
		EP 1539207 A1	15-06-2005
		EP 1553962 A1	20-07-2005
		EP 2182004 A1	05-05-2010
		EP 2431385 A2	21-03-2012
		ES 2341767 T3	28-06-2010
		JP 2005537234 A	08-12-2005
		JP 2011153149 A	11-08-2011
		MX PA04011871 A	26-07-2005
		US 2006166892 A1	27-07-2006
		WO 03101474 A1	11-12-2003
		WO 03101475 A1	11-12-2003

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74)代理人 100152319

弁理士 曾我 亜紀

(72)発明者 フラガ カストロ, ホセ, アントニオ

キューバ, ラ ハバナ 11300, アントレ 86 イ 88. プラヤ, カレ 5タ. ナンバー . 8607 アプト 2

(72)発明者 メディナ ガリ, レグラ マリア

キューバ, ラ ハバナ 11300, プラヤ, アントレ 21 エ イ 21 ベ. レパルト バルボサ, アプト 1, カレ 308 エディフ. 13

(72)発明者 ディアス ガルシア, アレクシス

キューバ, ラ ハバナ 10400, プラヤ, ベダド, アプト 14 アントレ ア イ ベ, サパタ ナンバー. 1465

(72)発明者 ゲバラ オレラーナ, イラニア

キューバ, ラ ハバナ 19290, エディフィシオ 75 アプト 26 アントレ 178 イ 184, ムルゴバ. ボイエロス, カレ 373

(72)発明者 ロドリゲス トーレス, カリダード, クララ

キューバ, ラ ハバナ 10500, 10 デ オクトゥブレ, カレ 16 ナンバー. 230 アントレ ベ イ セ. ロートン

(72)発明者 ロドリゲス コイベル, フディート

キューバ, マヤベケ 33500, ラプト. サンタ モニカ. キビカン, カレ 3ア エディフ. バ アプト 2

(72)発明者 リクエネス ガルロボ, ヤネリス

キューバ, ラ ハバナ 10400, プラヤ, ベダド, リネア ナンバー. 1253 アプト. 11 エサク. 20

(72)発明者 ゴンザレス マレロ, イスベル

キューバ, ラ ハバナ 10500, アントレ ホアン デルガード イ ゴイクリア. サントス スアレス. 10 デ オクトゥブレ, エストラダ パルマ ナンバー. 509 アプト 4

(72)発明者 ペレス カポーティ, マリア, レグラ

キューバ, 19290 ラ ハバナ, ボイエロス, カレ 375 ナンバー. 17836 アプト 18 アントレ 178 イ 184. ムルゴバ

F ターム(参考) 4C076 AA24 AA93 BB01 BB25 BB29 BB30 CC27 CC29 FF68

4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 BA23 CA51 MA13

MA52 MA55 MA56 MA60 NA14 ZB26

4H045 AA10 AA30 BA10 CA50 DA83 EA20 FA71 HA01