(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010 年 8 月 26 日(26.08.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/095422 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 38/46 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
A61K 36/07 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/000962

(22) 国際出願日: 2010 年 2 月 17 日(17.02.2010)

(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 2009-033373 2009 年 2 月 17 日(17.02.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人日本大学(NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目８番２４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): 井口 法男 (INOKUCHI, Norio) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目８番２４号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 鈴木 孝 (SUZUKI, Takashi) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目８番２４号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 小林 弘子 (KOBAYASHI, Hiroko) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目８番２４号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 田畑 恵市 (TABATA, Keiichi) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目８番２４号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町１丁目３番８号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (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, 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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2010/095422 A1

(54) **Title**: THERAPEUTIC AGENT FOR MALIGNANT TUMOR

(54) 発明の名称 : 悪性腫瘍治療剤

(57) **Abstract**: Disclosed is a therapeutic agent for a malignant tumor, which comprises a T1-type ribonuclease derived from an oyster mushroom.

(57) 要約: 本発明は、ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼを含有する悪性腫瘍治療薬に関する。

明　細　書

発明の名称 ： 悪性腫瘍治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、新たなリボヌクレアーゼを含有する悪性腫瘍治療薬に関する。

背景技術

[0002] リボヌクレアーゼ（ＲＮａｓｅ）はＲＮＡを分解する酵素であり、塩基の種類を問わないリボヌクレアーゼＴ２、ピリミジン塩基のある部分だけを切断するリボヌクレアーゼＡ、グアニンの部分のみを分解するリボヌクレアーゼＴ１などが挙げられる。

[0003] リボヌクレアーゼの中で、リボヌクレアーゼＡに属するウシガエル由来のリボヌクレアーゼやウシ膵臓由来のリボヌクレアーゼに抗腫瘍活性があることは知られている（特許文献１、２及び非特許文献１）。また、抗腫瘍活性を有するα－サルシンはＲＮａｓｅ　Ｔ１に近い構造を有しているが、Ｔ１タイプのＲＮａｓｅではない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表２００２－５３２０６７号公報

特許文献2：特表２００７－５３０００２号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００２，Ｊａｎ　１：２０（１）：２７４－２８１

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の課題は、さらに新たなリボヌクレアーゼを含有する抗悪性腫瘍治療薬を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] そこで本発明者は、Ｔ１タイプのリボヌクレアーゼに着目して種々検討してきたところ、ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼは、同じＴ１タイプのリボヌクレアーゼであるヤマブシタケ由来のリボヌクレアーゼ等に比べて特に強い腫瘍細胞増殖抑制作用を有し、Ｔ１タイプのリボヌクレアーゼの中でも特に悪性腫瘍治療薬として有用であることを見出し、本発明を完成した。

[0008] 本発明は、ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼを含有する悪性腫瘍治療薬を提供するものである。

また、本発明は、ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼ、及び薬学的に許容される担体を含有する悪性腫瘍治療用医薬組成物を提供するものである。

また、本発明は、ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼの、悪性腫瘍治療薬製造のための使用を提供するものである。

さらに、本発明は、ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼの有効量を投与することを特徴とする、悪性腫瘍治療方法を提供するものである。

発明の効果

[0009] 本発明の悪性腫瘍治療剤は、優れた腫瘍細胞増殖抑制作用を有し、中性付近で安定で、かつ熱安定性も高いので、医薬品としての応用が容易である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]ｒＲＮａｓｅ　Ｐｏ１の精製工程を示す図である。

[図2]ＩＭＲ－３２細胞に対する各種ＲＮａｓｅの増殖抑制作用を示す図である。

[図3]ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１のＩＭＲ－３２細胞及びＨＬ－６０細胞の生育に対する作用を示す図である。

[図4]ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１のＨＬ－６０細胞の生育に対する作用を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明の悪性腫瘍治療剤の有効成分は、ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌ

クレアーゼ（以下、ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１と略することもある）である。ヒラタケは、ヒラタケ科ヒラタケ属に属する食用キノコであり、このうちＰｌｅｕｒｏｔｕｓ　ｏｓｔｒｅａｔｕｓが特に好ましい。本発明で用いるＴ１タイプリボヌクレアーゼは、ヒラタケ子実体から抽出することもできるが、遺伝子組換え法により大腸菌等の微生物の形質転換体から抽出することもできる。

[0012] ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１には、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、及び配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつリボヌクレアーゼ活性を有するタンパク質が含まれる。ここで、配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列としては、配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するもの、特に９５％以上の同一性を有するものが好ましい。

[0013] ヒラタケ子実体からＲＮａｓｅ　Ｐｏ１を抽出するには、例えばヒラタケ子実体を細切又は粉砕し、酢酸ナトリウム水溶液を加えてホモジナイズし、遠心分離により固形物を除去する。次いでこの上清から硫安分画によりタンパク画分を得、ゲル濾過、イオン交換クロマト等により分画することにより得ることができる（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１１６，２６－３３（１９９４））。

[0014] 一方、遺伝子組換え法によるＲＮａｓｅ　Ｐｏ１の採取法については、例えば第５１回日本薬学会関東支部大会（２００７年１０月１６日）講演要旨集Ｊ１２記載の方法を用いることができる。まず遺伝子のクローニングをし、クローニングしたＤＮＡ断片を用いた発現ベクターの調製、発現ベクターを用いたＲＮａｓｅ　Ｐｏ１の調製を行うが、これらの操作は周知の技術であり、具体的には、例えば「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ」（Ｍａｎｉａｔｉｓら編、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ

（１９８２））に記載の方法に従って行うことができる。

[0015] 例えば、ヒラタケの子実体から精製したＲＮａｓｅ　Ｐｏ１のＮ－末端、Ｃ－末端などのアミノ酸配列の一部を既知の方法で決定し、それに相当するオリゴヌクレオチドを合成する。合成したオリゴヌクレオチドをプローブとしてヒラタケのトータルＲＮＡを抽出後、逆転写酵素反応で得たｃＤＮＡ断片をクローニングすればよい。

クローン化に用いる宿主は特に限定されないが、操作性及び簡便性から大腸菌を宿主とするのが適当である。

[0016] クローン化した遺伝子の高発現系を構築するためには、たとえばマキザム－ギルバートの方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，６５，４９９（１９８０））もしくはダイデオキシチェーンターミネーター法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１０１，２０（１９８３））などを応用してクローン化したＤＮＡ断片の塩基配列を解析して当該遺伝子のコーディング領域を特定し、宿主微生物に応じて当該遺伝子が微生物菌体中で発現可能となるように発現制御シグナル（転写開始及び翻訳開始シグナル）をその上流に連結した組換え発現ベクターを作製する。

[0017] ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１を異種微生物内で大量に産生させるために使用する発現制御シグナルとしては、人為的制御が可能で、ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１の生産量を上昇させるような強力な転写開始並びに翻訳開始シグナルを用いることが望ましい。このような転写開始シグナルとしては、宿主として大腸菌を用いる場合には、ｌａｃプロモーター、ｔｒｐプロモーター、ｔａｃプロモーター（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，８０，２１（１９８３）、Ｇｅｎｅ，２０，２３１（１９８２））、ｔｒｃプロモーター（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６０，３５３９（１９８５））などを例示することができる。

ベクターとしては、種々のプラスミドベクター、ファージベクターなどが使用可能であるが、微生物菌体内で複製可能であり、適当な薬剤耐性マーカーと特定の制限酵素切断部位を有し、菌体内のコピー数の高いプラスミドベ

クターを使用するのが望ましい。具体的に大腸菌を宿主とする場合には、ｐＢＲ３２２（Ｇｅｎｅ，２，９５（１９７５））、ｐＵＣ１８，ｐＵＣ１９（Ｇｅｎｅ、３３，１０３（１９８５））などを例示することができる。作製した組換えベクターを用いて微生物を形質転換する。宿主となる微生物としては安全性が高く取扱いやすいものであれば特に限定されない。例えば、大腸菌、酵母などＤＮＡ組換え操作に常用されている微生物を使用することができる。その中でも、大腸菌が有利であり、例えば組換えＤＮＡ実験に使用されるＢＬ２１株、Ｋ１２株、Ｃ６００菌、ＪＭ１０５菌、ＪＭ１０９菌（Ｇｅｎｅ，３３，１０３－１１９（１９８５））などが使用可能である。

微生物を形質転換する方法はすでに多くの方法が報告されており、宿主として使用する微生物に応じて適宜選択すればよい。例えば大腸菌を宿主として使用する場合、低温下、塩化カルシウム処理して菌体内にプラスミドを導入する方法（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，５３，１５９（１９７０））により大腸菌を形質転換することができる。

[0018] 得られた形質転換体は、当該微生物が増殖可能な培地中で増殖させ、さらにクローン化したＲＮａｓｅ　Ｐｏ１遺伝子の発現を誘導して菌体内又は菌体外に当該酵素が大量に蓄積するまで培養を行う。形質転換体の培養は、炭素源、窒素源などの当該微生物の増殖に必要な栄養源を含有する培地を用いて常法に従って行えばよい。例えば、大腸菌を宿主として使用する場合、培地として２ｘＹＴ培地（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１００，２０（１９８３））、ＬＢ培地、Ｍ９ＣＡ培地（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ、前述）などの大腸菌の培養に常用されている培地を用い、２０～４０℃の培養温度で必要により通気攪拌しながら培養することができる。また、ベクターとしてプラスミドを用いた場合には、培養中におけるプラスミドの脱落を防ぐために適当な抗生物質（プラスミドの薬剤耐性マーカーに応じ、アンピシリン、カナマイシンなど）の薬剤を適当量培養液に加えて培養する。

培養中にＲＮａｓｅ　Ｐｏ１遺伝子の発現を誘導する必要がある場合には

、用いたプロモーターで常用されている方法で当該遺伝子の発現を誘導する。例えば、ｌａｃプロモーターやｔａｃプロモーターを使用した場合には、培養中期に発現誘導剤であるイソプロピルーβーＤーチオガラクトピラノシド（以下、ＩＰＴＧと略称する）を適当量添加する。

[0019] こうして得られた培養上清から硫安塩析処理、透析処理、エタノールなどの溶媒処理、各種クロマトグラフィー処理などの酵素精製に通常使用されている処理を単独で、又は数種組み合わせて得られる精製物をＲＮａｓｅ Ｐｏ１として利用することができる。

[0020] ＲＮａｓｅ Ｐｏ１の等電点は８．７であり細胞内への移行がよい。また、ジスルフィド結合が１組多いことから熱安定性にも優れている。さらに、至適ｐＨが７．５であることから細胞内で酵素活性を最大限に発現できる。

[0021] ＲＮａｓｅ Ｐｏ１は、種々の腫瘍細胞の増殖を低濃度で抑制し、ヒトを含む哺乳類における悪性腫瘍治療薬として有用である。ＲＮａｓｅ Ｐｏ１はＴ１タイプのリボヌクレアーゼであるが、同じＴ１タイプに属するヤマブシタケ由来のリボヌクレアーゼや、典型的な真菌由来ＲＮａｓｅ Ｔ１に比べて特に強い抗腫瘍作用を有する。

[0022] 本発明の悪性腫瘍治療薬の対象となる悪性腫瘍には、白血病、リンパ腫などの血液や造血組織の腫瘍及び固形腫瘍が含まれる。固形腫瘍としては、皮膚癌、肺癌、大腸癌、胃癌、乳癌、前立腺癌、甲状腺癌などの上皮細胞癌；及び平滑筋肉腫、骨肉腫などの肉腫が挙げられる。

[0023] 本発明の医薬又は医薬組成物は、ＲＮａｓｅ Ｐｏ１に、賦形剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、被覆剤、乳化剤、懸濁化剤、溶剤、安定化剤、吸収補助剤、軟膏基剤等の１以上の薬学的に許容される担体を適宜添加し、常法により経口投与用、注射投与用、直腸内投与用、外用などに適する剤形（医薬組成物）に製剤化することによって得られる。

経口投与用の製剤としては、顆粒、錠剤、糖衣錠、カプセル剤、丸剤、液剤、乳剤、懸濁剤等が；注射投与用の製剤としては、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、点滴注射用の製剤などが；直腸内投与用の製剤としては、坐

薬、軟カプセル等が好ましい。

本発明の医薬は上記の如き製剤として、ヒトを含む哺乳動物に投与することができる。

本発明の医薬は、ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１として、１日当り約１～５００ｍｇ／ｋｇを１～４回投与するのが好ましい。

実施例

[0024] 次に実施例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

[0025] 参考例１

ヒラタケ子実体３ｋｇをきざみ、０．０１M酢酸緩衝液（ｐＨ６．０）を加えてホモジナイズする。１万ｒｐｍで３０分間遠心分離し、上清を用いる。９０%飽和硫安を加え、硫安分画後遠心分離し沈殿を緩衝液に溶解し、精製水に対して透析する。Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ５０によるゲル濾過、Ｕｌｔｒｏｇｅｌ　ＡｃＡ５４によるゲル濾過、次いでＳＰ－Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ　６５０Mによるイオン交換クロマトを行う。さらにＤＥＡＥ－Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ　６５０Mによるイオン交換クロマトを行い、ＴＳＫ　Ｇｅｌ　Ｇ２０００ＳＷカラムを用いたＨＰＬＣによるゲル濾過を行う。以上の操作によりＲＮａｓｅ　Ｐｏ１を得た。

[0026] 参考例２

（ｒＲＮａｓｅ　Ｐｏ１の精製）

ｐＥＴ－ｐｅｌＢ－Ｐｏ１を導入した発現用大腸菌（ＢＬ２１（ＤＥ３）ｐＬｙｓ　Ｓ）を、１００μｇ／ｍＬのアンピシリンを添加した液体ＴＢ培地に植菌し、１日後にＩＰＴＧを終濃度０．５mMとなるように添加し、転写誘導をかけたものを２５℃の暗所で７日間、８０ｒｐｍで振とう培養した培養上清約２Ｌを出発原料としてｒＲＮａｓｅ　Ｐｏ１の精製を行った。なお、ｒＲＮａｓｅ　Ｐｏ１のｃＤＮＡ配列より推測した等電点は８．７であった。

ｒＲＮａｓｅ　Ｐｏ１の精製法のフローチャートを図１に示した。

[0027] 実施例１

ＲＮａｓｅ　Ｔ１（真菌由来）及び担子菌由来の２種のＴ１タイプＲＮａｓｅ、ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１、Ｈｅｒｉｃｉｕｍ　ｅｒｉｎａｃｅｕｍ（ヤマブシタケ）のＲＮａｓｅ　Ｈｅ１について、ヒト神経芽腫細胞（ＩＭＲ－３２）を用いて腫瘍細胞の生育に対する影響を検討した。

[0028] （方法）

細胞生育阻害作用：細胞を１０％牛胎仔血清を加えたＲＰＭＩ　１６４０培地で希釈し、５×１０^{3}ｃｅｌｌ／１００μＬ又は３×１０^{5}ｃｅｌｌ／ｍＬとした。この細胞培養液１００μＬ又は２００μＬに終濃度０～１０μＭのＲＮａｓｅをそれぞれ加え、５％CO_2条件下、３７℃、７２時間培養し、ＭＴＴ法により細胞生育阻害率を算出した。

[0029] 細胞内取り込み量：１０％牛胎仔血清を加えたＲＰＭＩ　１６４０培地で希釈した３×１０^{5}ｃｅｌｌ／ｍＬの細胞懸濁液２ｍＬに終濃度６μＭの各ＲＮａｓｅを加え、５％CO_2条件下３７℃、３０分培養後、遠心して細胞を回収し、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を加えて凍結融解し、再度遠心分離し、上清のＲＮａｓｅ活性を指標として求めた。

[0030] （結果）

ヒト神経芽腫細胞の中では、ＩＭＲ－３２細胞において、ＲＮａｓｅ　Ｔ１、ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１とも濃度依存的に細胞生育阻害作用を示し、特にＲＮａｓｅ　Ｐｏ１は、３μＭの添加により、生存細胞数は、約１０％以下にまで低下した（図２）。また、Ｐ３８８細胞に対するＲＮａｓｅ　Ｐｏ１の細胞生育阻害作用は、ＲＮａｓｅ　Ｈｅ１よりも強力であった。すなわち、ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１は、１０μＭの添加により、生存細胞数を約３０％にまで低下させたのに対し、ＲＮａｓｅ　Ｈｅ１は１０μＭ添加でもほとんど細胞生育阻害を示さなかった。

また、腫瘍細胞（Ｐ－３８８）内へのＲＮａｓｅの取り込み量は、ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１は０．５％、ＲＮａｓｅ　Ｔ１は０．０３％、ＲＮａｓｅ　Ｈｅ１は０．０１％であった。

[0031] 実施例２

ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１　のヒト白血病ＨＬ－６０細胞に対する生育阻害作用を検討した。

（方法）

ＨＬ－６０細胞を１０％ウシ胎仔血清を加えたＲＰＭＩ１６４０培地で希釈し、３×１０^{5}ｃｅｌｌ／ｍＬとしたこの細胞培養液２００μＬに終濃度０～１０μＭのＲＮａｓｅ　Ｐｏ１を加え、５％CO_2条件下、３７℃、７２時間培養し、ＭＴＴ法により細胞生育阻害率を算出した。

神経芽腫の１つであるＩＭＲ－３２細胞に対する作用も併せて検討した。

ＨＬ－６０細胞（急性前骨髄性白血病細胞）はヒューマンサイエンス振興財団より分譲された。

（結果）

ヒト白血病ＨＬ－６０細胞にＲＮａｓｅＰｏ１を作用させたところ、最終濃度１×１０$^{-8}$Ｍの添加により、生存細胞が約１０％まで減少した。同濃度の神経芽腫ＩＭＲ－３２細胞での生存細胞数が約３０％であったことから、ＲＮａｓｅ　Ｐｏ１は、ＨＬ－６０細胞に対し、ＩＭＲ－３２細胞に対する場合よりも約３倍高い生育阻害作用を有することが明らかになった（図３、図４）。

請求の範囲

[請求項1] ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼを含有する悪性腫瘍治療薬。

[請求項2] ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼが、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつリボヌクレアーゼ活性を有するタンパク質である請求項１記載の悪性腫瘍治療薬。

[請求項3] ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼ、及び薬学的に許容される担体を含有する悪性腫瘍治療用医薬組成物。

[請求項4] ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼが、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつリボヌクレアーゼ活性を有するタンパク質である請求項３記載の医薬組成物。

[請求項5] ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼの、悪性腫瘍治療薬製造のための使用。

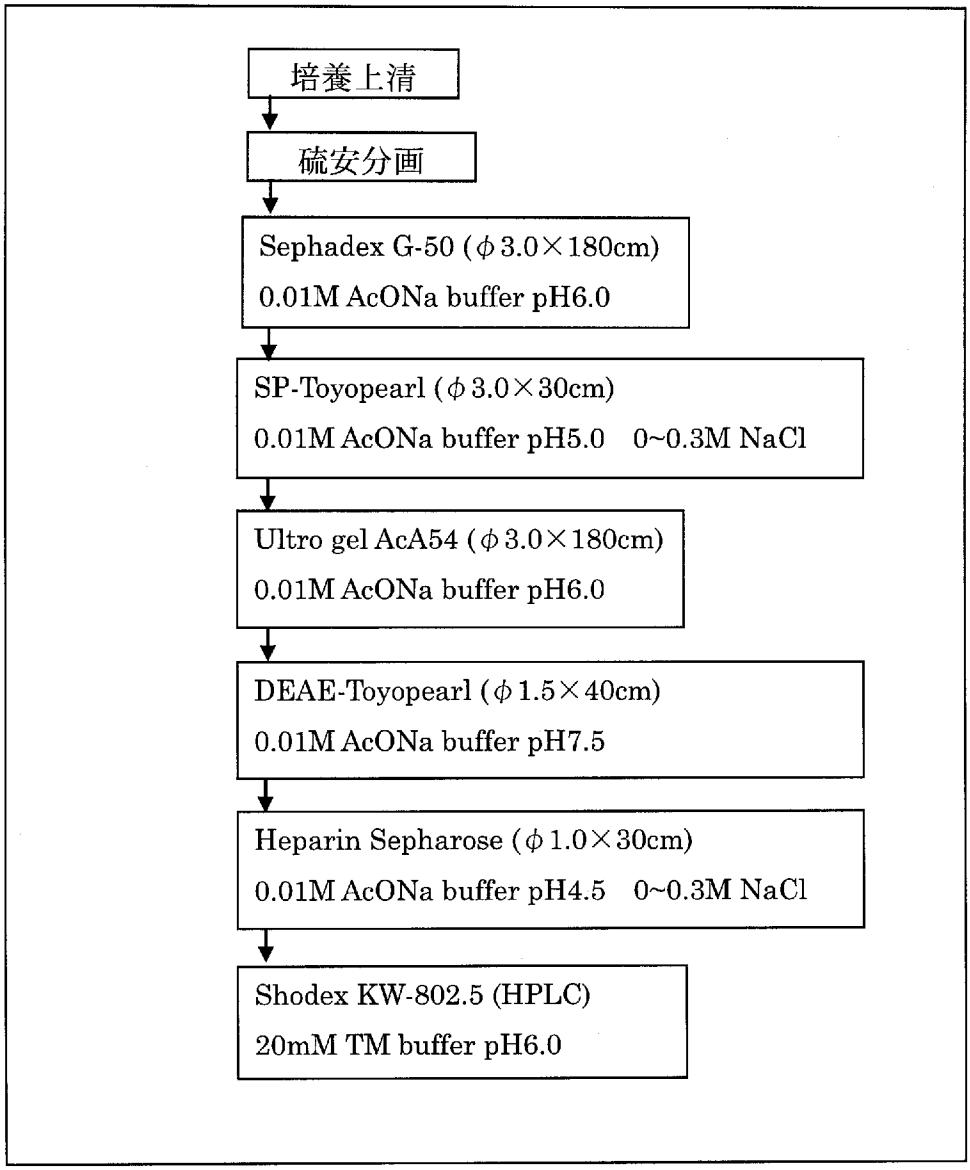
[請求項6] ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼが、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつリボヌクレアーゼ活性を有するタンパク質である請求項５記載の使用。

[請求項7] ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼの有効量を投与することを特徴とする悪性腫瘍治療方法。

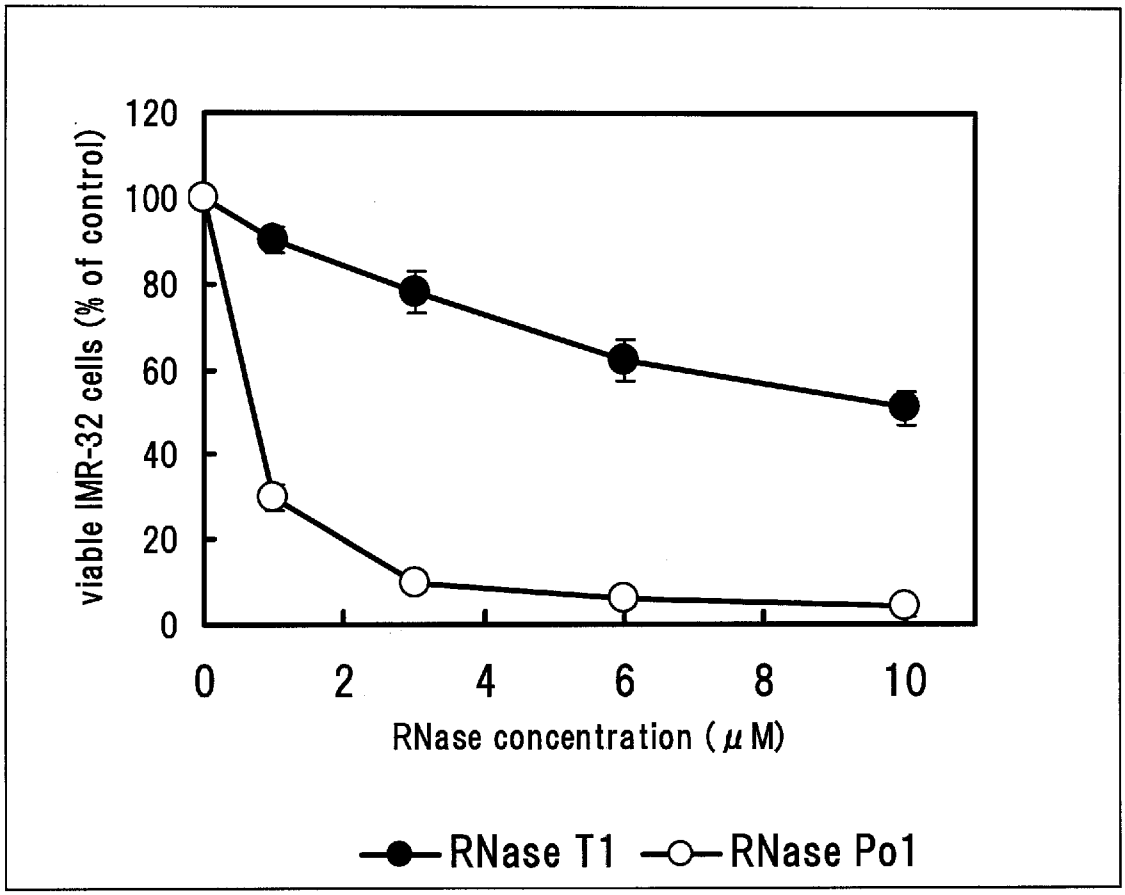
[請求項8] ヒラタケ由来のＴ１タイプリボヌクレアーゼが、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつリボヌクレアーゼ活性を有する

タンパク質である請求項７記載の治療方法。

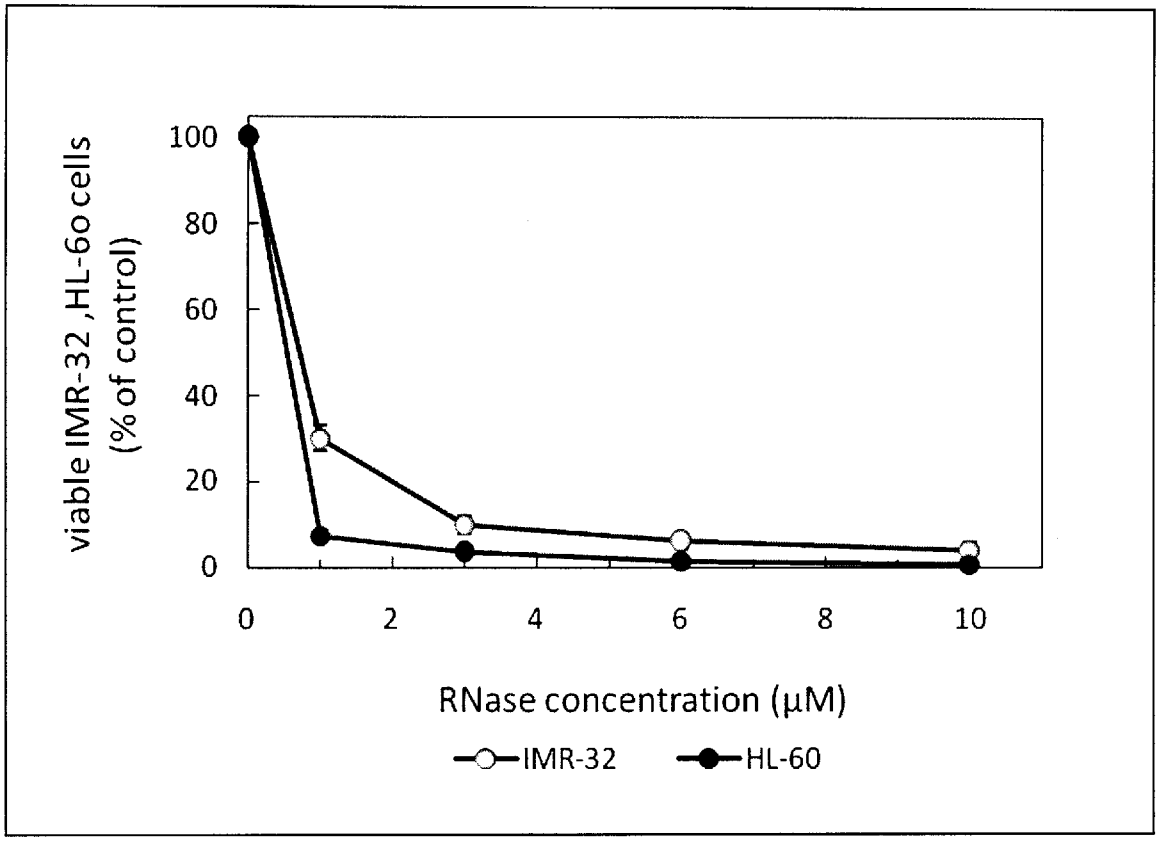
[図1]


培養上清
硫安分画
Sephadex G-50 (φ3.0×180cm)
0.01M AcONa buffer pH6.0
SP-Toyopearl (φ3.0×30cm)
0.01M AcONa buffer pH5.0 0~0.3M NaCl
Ultro gel AcA54 (φ3.0×180cm)
0.01M AcONa buffer pH6.0
DEAE-Toyopearl (φ1.5×40cm)
0.01M AcONa buffer pH7.5
Heparin Sepharose (φ1.0×30cm)
0.01M AcONa buffer pH4.5 0~0.3M NaCl
Shodex KW-802.5 (HPLC)
20mM TM buffer pH6.0

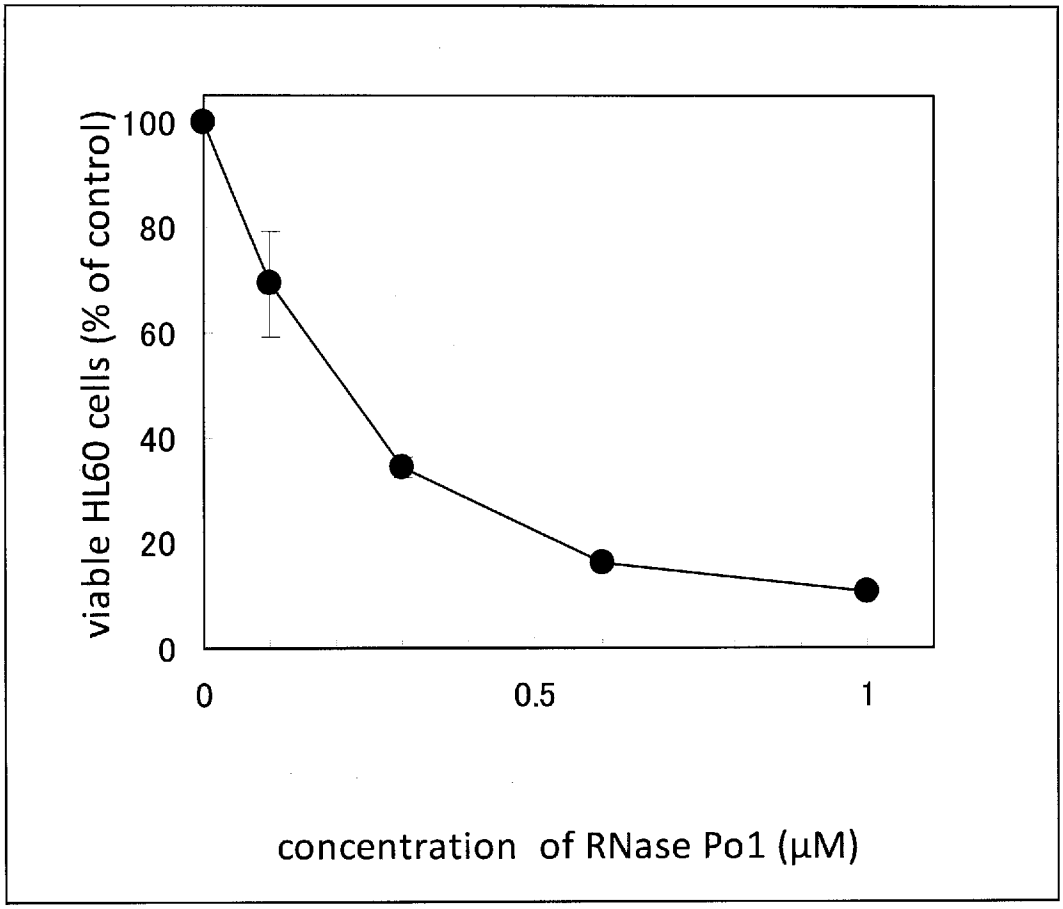
[図2]


viable IMR-32 cells (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
RNase concentration (μM)
RNase T1
RNase Po1

[図3]


viable IMR-32 ,HL-60 cells
(% of control)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
RNase concentration (μM)
IMR-32
HL-60

[図4]


viable HL60 cells (% of control)
100
80
60
40
20
0
0
0.5
1
concentration of RNase Po1 (μM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/000962

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K38/46(2006.01)i, *A61K36/07*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C12N9/22*(2006.01)n, *C12N15/09*(2006.01)n

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)
A61K38/46, A61K36/07, A61P35/00, C12N9/22, C12N15/09

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Yuri KOBAYASHI et al., "Kinoko Yurai T1 Type RNase no Mouse Hakketsubyo Saibo ni Taisuru Seiiku Sogai Sayo", 129th Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan Kyoto 2009 Yoshishu 3, 05 March 2009 (05.03.2009), page 115, 26Q-pm102	1-6
Y	MAKAROV, A.A. et al, Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents, Bioessays, 2008, Vol.30, No.8, p.781-90	1-6
Y	ARNOLD, U. et al, Natural and engineered ribonucleases as potential cancer therapeutics, Biotechnol Lett, 2006, Vol.28, No.20, p.1615-22	1-6

☒ 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	Date of mailing of the international search report
24 March, 2010 (24.03.10)	06 April, 2010 (06.04.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/000962

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Suri, S. et al, RNase: a novel enzyme for treatment of cancers, Internet Journal of Oncology [online], 2008, Vol.5, No.1, [retrieved on 2010.03.04], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijo/vol5n1/rnase.xml>	1-6
Y	Kawasumi, K. et al, Pleurotus ostreatus RNPo1 mRNA for ribonuclease T1, partial cds., GenBank [online], 2008.03.22, GenBank Accession No. AB429298.1, [retrieved on 2010.03.04], Retrieved from the Internet :<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/171362782>	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/000962

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. [X] Claims Nos.: 7, 8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 7 and 8 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Rule 39.1(iv).

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 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.:

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.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０００９６２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K38/46(2006.01)i, A61K36/07(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N9/22(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K38/46, A61K36/07, A61P35/00, C12N9/22, C12N15/09

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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	関連する請求項の番号
P,X	小林由梨ら，キノコ由来Ｔ１タイプＲＮａｓｅのマウス白血病細胞に対する生育阻害作用，第１２９年会日本薬学会ＫＹＯＴＯ２００９要旨集３，2009.03.05，第１１５頁，２６Ｑ－ｐｍ１０２	1-6
Y	MAKAROV,A.A. et al, Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents, Bioessays, 2008, Vol.30, No.8, p.781-90	1-6

☑　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の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 ２４．０３．２０１０	国際調査報告の発送日 ０６．０４．２０１０
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 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）　４Ｃ　３９５４ 菊池　美香 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

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	関連する請求項の番号
Y	ARNOLD,U. et al, Natural and engineered ribonucleases as potential cancer therapeutics, Biotechnol Lett, 2006, Vol.28, No.20, p.1615-22	1-6
Y	Suri, S. et al, RNase: a novel enzyme for treatment of cancers, Internet Journal of Oncology [online], 2008, Vol.5, No.1, [retrieved on 2010.03.04], Retrieved from the Internet:<URL: http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijo/vol5n1/rnase.xml>	1-6
Y	Kawasumi,K. et al, Pleurotus ostreatus RNPol mRNA for ribonuclease T1, partial cds., GenBank [online], 2008.03.22, GenBank Accession No. AB429298.1, [retrieved on 2010.03.04], Retrieved from the Internet :<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/171362782>	1-6

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０００９６２

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（ＰＣＴ17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．☑ 請求項　７、８　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、
請求項７、８は［治療による人体の処置方法に関するもの］であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　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．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ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項について作成した。

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項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項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項について作成した。

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はあったが、異議申立てはなかった。