

(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  
2021年3月25日(25.03.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/054448 A1

(51) 国際特許分類:

A61P 35/00 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)  
C07K 4/00 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)  
C07K 7/06 (2006.01) C12N 15/06 (2006.01)  
C07K 14/00 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)  
C07K 16/44 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01) A61K 38/08 (2019.01)  
C12N 1/15 (2006.01)

NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/035491

(22) 国際出願日: 2020年9月18日(18.09.2020)

(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 2019-171919 2019年9月20日(20.09.2019) JP

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 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))

(72) 発明者; および

(71) 出願人: 甲賀 美智子 (KOGA Michiko) [JP/JP];  
〒4250088 静岡県焼津市大覚寺2丁目30番地の1 社会医療法人駿甲会内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 山口 健次郎, 外(YAMAGUCHI Kenjiro et al.); 〒1730004 東京都板橋区板橋二丁目67番8号 板橋中央ビル5階 森田・山口国際特許事務所内 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,

(54) Title: PEPTIDE, AND CELL FUSION AGENT AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR CANCER THERAPY CONTAINING SAID PEPTIDE

(54) 発明の名称: ペプチド並びにそれを含む細胞融合剤及びがん治療用医薬組成物

(57) Abstract: Purposes of the present invention include: providing an efficient cell fusion method; and providing a method for killing cancer cells through cell fusion. The purposes are achieved by: (1) a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences represented by SEQ ID NO: 1-8; or (2) a polypeptide having cell fusion activity and having an amino acid sequence obtained through deletion, substitution, insertion, and/or addition of 1-4 amino acid residues in the amino acid sequences represented by SEQ ID NO: 1-8.

(57) 要約: 本発明の目的は、効率的な細胞融合の方法を提供することである。また、細胞融合によって、がん細胞を死滅させる方法を提供することである。前記課題は、本発明の(1)配列番号1~8で表されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は(2)配列番号1~8で表されるアミノ酸配列において、1~4のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ細胞融合活性を有するポリペプチドによって解決することができる。

WO 2021/054448 A1

## 明 細 書

発明の名称：

ペプチド並びにそれを含む細胞融合剤及びがん治療用医薬組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、ペプチド並びにそれを含む細胞融合剤及びがん治療用医薬組成物に関する。本発明によれば、細胞を効率的に融合させることができる。

### 背景技術

[0002] 細胞融合は、センダイウイルスに細胞を融合させる作用があることから見出された現象である（非特許文献1及び2）。現在では、品種改良又はモノクローナル抗体の生産などに、細胞融合が利用されている。また、ウイルスを利用する以外に、プロトプラスト－PEG法又は電気刺激によっても細胞融合が起こることが知られている。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0003] 非特許文献1：Cell fusion, 1970, Harvard University Press, Mass.  
非特許文献2：Cell Fusion and some subcellular Properties of heterokaryons and hybrids, Journal of Cell Biology, VOLUME 67, 1975, pages 257-280

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明者らは、効率的に細胞融合できる方法がないかと考えた。また、細胞融合により、がん細胞を死滅させることができるのではないかと考えた。

従って、本発明の目的は、効率的な細胞融合の方法を提供することである。また、細胞融合によって、がん細胞を死滅させる方法を提供することである。

#### 課題を解決するための手段

[0005] 本発明者は、効率的な細胞融合方法について、鋭意研究した結果、驚くべきことに、特定のアミノ酸配列を有する新規のペプチドにより、細胞を効率的に融合できることを見出した。

本発明は、こうした知見に基づくものである。

従って、本発明は、

[1] (1) 配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は(2) 配列番号1～8で表されるアミノ酸配列において、1～4のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ細胞融合活性を有するポリペプチド、

[2] 前記配列番号1～8で表されるアミノ酸配列が、N末端にメチル基を有する、[1]に記載のポリペプチド、

[3] [1] 又は [2] に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド、

[4] [3] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

[5] [4] に記載のポリヌクレオチドを含む形質転換体、

[6] [1] 又は [2] に記載のポリペプチドに結合する抗体又はその抗原結合性断片、

[7] 有効成分として、[1] 又は [2] に記載のポリペプチドを含む細胞融合剤、

[8] 有効成分として、[1] 又は [2] に記載のポリペプチドを含む、医薬組成物、

[9] がん治療用である、[8] に記載の医薬組成物、

[10] [1] 又は [2] に記載のポリペプチドの有効量を、治療が必要な対象に投与する工程を含む、がんの治療方法、

[11] がんの治療用である、[1] 又は [2] に記載のポリペプチド、及び

[12] [1] 又は [2] に記載のポリペプチドの、がん治療用医薬組成物の製造への使用、

に関する。

### 発明の効果

[0006] 本発明のポリペプチドによれば、細胞を効率的に融合させることができる。また、本発明のポリペプチドは、がん治療用医薬組成物の、有効成分として用いることができる。

### 図面の簡単な説明

[0007] [図1-1] RFL細胞及びLCC細胞にペプチド1を作用させた場合の、RFL細胞の弱拡大（A及びB）の顕微鏡写真である。

[図1-2] RFL細胞及びLCC細胞にペプチド1を作用させた場合の、RFL細胞の強拡大（C）の顕微鏡写真、及びLCC細胞（D）の顕微鏡写真である。

[図2] RFL細胞にペプチド2を作用させた場合の、RFL細胞の弱拡大（A）及び強拡大（B）の顕微鏡写真である。

[図3] RFL細胞にペプチド3を作用させた場合の、RFL細胞の弱拡大の顕微鏡写真である。

[図4] RFL細胞にペプチド4を作用させた場合の、RFL細胞の弱拡大の顕微鏡写真である。

[図5] RFL細胞にペプチド5を作用させた場合の、RFL細胞の弱拡大の顕微鏡写真である。

[図6-1] RFL細胞及びRM-4細胞にペプチド6を作用させた場合の、RFL細胞の弱拡大（A）及び強拡大（B）の顕微鏡写真である。

[図6-2] RFL細胞及びRM-4細胞にペプチド6を作用させた場合の、RM-4細胞の弱拡大（C及びD）の顕微鏡写真である。

[図7] RFL細胞にペプチド7を作用させた場合の、RFL細胞の弱拡大（A）及び強拡大（B）の顕微鏡写真である。

[図8-1] RFL細胞及びLCC細胞にペプチド8を作用させた場合の、RFL細胞の弱拡大（A及びB）の顕微鏡写真である。

[図8-2] RFL細胞及びLCC細胞にペプチド8を作用させた場合の、RFL

細胞の強拡大（C）の顕微鏡写真、及びLCC細胞（D）の顕微鏡写真である。

[図9]RFL細胞にペプチド9を作用させた場合の、RFL細胞の弱拡大の顕微鏡写真である。

[図10]RFL細胞にペプチド10を作用させた場合の、RFL細胞の弱拡大の顕微鏡写真である。

[図11]RM-4細胞にペプチド1を作用させ、アポトーシスの誘導を、Caspase-3/7の活性化（A）及びAnnexinVの活性化（B）により測定したグラフである。

[図12]RM-4細胞にペプチド1を作用させ、18時間後のCaspase-3/7の活性化（緑の蛍光）及びAnnexinVの活性化（赤の蛍光）を確認した蛍光顕微鏡写真である。

[図13]RM-4細胞にペプチド1を作用させ、78時間後のCaspase-3/7の活性化（緑の蛍光）及びAnnexinVの活性化（赤の蛍光）を確認した蛍光顕微鏡写真である。

[図14]マウスにがん細胞を移植し、ペプチド6を投与して28日間の腫瘍体積の変化を示したグラフである。

[図15]マウスにがん細胞を移植し、ペプチド6を投与して28日間の体重の変化を示したグラフである。

[図16]マウスにがん細胞を移植し、ペプチド6を投与した群とコントロール群の28日後の腫瘍重量を示したグラフである。

[図17]ペプチド6を投与されたマウスの摘出された腫瘍塊の40倍の写真（A）及び400倍の写真（B）、並びにコントロールのマウスの摘出された腫瘍塊の40倍の写真（C）及び400倍の写真（D）である。

## 発明を実施するための形態

### [0008] [1] ポリペプチド

本発明のポリペプチドは（１）配列番号１～８で表されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。配列番号１～８で表されるアミノ酸配列は、以下のとおりである。

Pro-Leu-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Ile-Ala（配列番号１）

Pro-Leu-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Leu-Ala（配列番号２）

Pro-Leu-Val-Ser-Gln-Thr-Thr-Ala-Ile-Ala（配列番号３）

Pro-Leu-Val-Ser-Gln-Thr-Thr-Ala-Leu-Ala（配列番号４）

Pro-Ile-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Ile-Ala（配列番号５）

Pro-Ile-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Leu-Ala（配列番号６）

Pro-Ile-Val-Ser-Gln-Thr-Thr-Ala-Ile-Ala（配列番号７）

Pro-Ile-Val-Ser-Gln-Thr-Thr-Ala-Leu-Ala（配列番号８）

[0009] また、本発明のポリペプチドは（２）配列番号１～８で表されるアミノ酸配列において、１～４のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ細胞融合活性を有する。

[0010] 前記（１）配列番号１～８で表されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドは、（１）配列番号１～８で表されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む。また、（２）配列番号１～８で表されるアミノ酸配列において、１～４のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ細胞融合活性を有するポリペプチド（以下、「機能的等価改変体」と称することがある）は、（２）配列番号１～８で表されるアミノ酸配列において、１～４のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ細胞融合活性を有するポリペプチドを含む。

本発明のポリペプチドは、配列番号１～８で表されるアミノ酸配列などの前記１０個のアミノ酸配列からなるポリペプチドによって、細胞融合活性を示すことができ、１０個のアミノ酸配列中に、細胞融合活性を示す特定の構

造を有している。従って、10個のアミノ酸配列中の細胞融合活性を示す特定の構造が壊されない限りにおいて、他のアミノ酸、ポリペプチド、又はタンパク質が、本発明のポリペプチドに結合しても、本発明のポリペプチドは細胞融合化活性を示すことができる。

[0011] 《機能的等価改変体》

機能的等価改変体は、配列番号1～8で表されるアミノ酸配列における1又は複数の箇所において、1～4個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、最も好ましくは1個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ細胞融合活性を有するポリペプチドである限りにおいて、特に限定されるものではない。

例えば、配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して、配列番号2又は配列番号5のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、1個のアミノ酸が置換された機能的等価改変体であり、配列番号3又は配列番号6のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、2個のアミノ酸が置換された機能的等価改変体であり、配列番号4又は配列番号7のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、3個のアミノ酸が置換された機能的等価改変体であり、配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、4個のアミノ酸が置換された機能的等価改変体である。

[0012] 機能的等価改変体における、「1～4のアミノ酸の欠失、置換、挿入、及び／又は付加」は、本発明のポリペプチドの機能を維持する保存的置換である。「保存的置換」とは、限定されるものではないが、例えばアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置き換えることによって実施できる。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような置換を行うことでできる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該技術分野において公知である。非極性（疎水性）アミノ酸としては、例えば、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニンなどが挙げられる。極性（

中性) アミノ酸としては、例えば、グリシン、セリン、トレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システインなどが挙げられる。正電荷をもつ(塩基性) アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジンなどが挙げられる。また、負電荷をもつ(酸性) アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。限定されるものではないが、このような保存的置換により、細胞融合活性を有する機能的等価改変体を得ることができる。

[0013] 本発明のポリペプチドは、限定されるものではないが、好ましくはN末端のプロリンがメチル化されている。すなわち、N末端のプロリンは、好ましくはメチル化プロリンである。限定されるものではないが、N末端のプロリンがメチル化されていることによって、更に優れた細胞融合活性を示すことができる。

[0014] 本発明のポリペプチドは、本技術分野で公知の方法によって製造することができる。例えば、後述の発現ベクターを含む形質転換体を培養することによって得ることもできるが、化学合成法によって製造することが好ましい。

[0015] 《細胞融合活性》

本発明のポリペプチドは、細胞融合活性を有する。本発明のポリペプチドによる細胞融合は、いくつかの細胞が融合し、複数の核を有する融合細胞を形成する。

また、融合した細胞は、細胞融合の後にアポトーシスが誘導され、細胞が死滅する。

[0016] 《ポリヌクレオチド》

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである限り、特に限定されるものではない。なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAの両方が含まれる。本発明のポリヌクレオチドは、例えば化学合成法などによって製造することができる。

[0017] 《発現ベクター》

本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターである。すなわち、本発明のベクターは、本発明による前記ポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、本発明による前記ポリヌクレオチドを挿入することにより得られるベクターを挙げることができる。本発現ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しない、例えば、プラスミドを基本に構築することができる。また、本発現ベクターは、宿主細胞に導入されたとき、その宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであってもよい。本発明によるベクター構築の手順及び方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

[0018] 《形質転換体》

本発明によれば、前記発現ベクターによって形質転換された細胞が提供される。この宿主-ベクター系は特に限定されず、例えば、大腸菌、放線菌、酵母、糸状菌、真核生物の細胞などを用いた系、及びそれらを用いた他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。

また、前記発現ベクターによる細胞の形質転換も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。

更に、この形質転換体を適当な培地で培養し、その培養物から上記の本発明によるポリペプチドを単離して得ることができる。従って、本発明の別の態様によれば、前記の本発明による新規ポリペプチドの製造方法が提供される。形質転換体の培養及びその条件は、使用する細胞についてのそれと本質的に同等であってよい。また、形質転換体を培養した後、目的のタンパク質を回収する方法は、この分野で慣用されているものを用いることができる。

[0019] 《抗体》

本発明のタンパク質に反応する抗体（例えば、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体）は、各種動物に本発明のタンパク質、又はその断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明のタンパク質をコードす

るポリヌクレオチドを導入したプラスミドを用いて、DNAワクチン法 (Raz, E.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523, 1994; 又はDonnelly, J. J.ら, J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996) によっても得ることができる。

[0020] ポリクローナル抗体は、例えば、本発明のタンパク質又はその断片を適当なアジュバント (例えば、フロイント完全アジュバントなど) に乳濁した乳濁液を、腹腔、皮下、又は静脈等に免疫して感作した動物 (例えば、ウサギ、ラット、ヤギ、又はニワトリ等) の血清又は卵から製造することができる。このように製造された血清又は卵から、常法のタンパク質単離精製法によりポリクローナル抗体を分離精製することができる。そのような分離精製方法としては、例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、又はDEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、若しくはプロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法を挙げることができる。

[0021] モノクローナル抗体は、例えば、ケーラーとミルスタインの細胞融合法 (Kohler, G.及びMilstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975) により、当業者が容易に製造することが可能である。

すなわち、本発明のタンパク質又はその断片を適当なアジュバント (例えば、フロイント完全アジュバントなど) に乳濁した乳濁液を、数週間おきにマウスの腹腔、皮下、又は静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

[0022] ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、例えば、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損又はチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを有するミエローマ細胞 (例えば、マウスミエローマ細胞株P3X63Ag8.U1) を利用することができる。また、融合剤としては、例えば、ポリエチレングリコールを利用することができる。更には、ハイブリドーマ作製における培地として、例えば、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、又はRPMI-1640などの

通常よく用いられている培地に、10～30%のウシ胎仔血清を適宜加えて用いることができる。融合株は、HAT選択法により選択することができる。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA法又は免疫組織染色法などの周知の方法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択することができる。また、限界希釈法によってサブクローニングを繰り返すことにより、ハイブリドーマの単クローン性を保証することができる。このようにして得られるハイブリドーマは、培地中で2～4日間、あるいは、プリスタンで前処理したBALB/c系マウスの腹腔内で10～20日間培養することで、精製可能な量の抗体を産生することができる。

[0023] このように製造されたモノクローナル抗体は、培養上清又は腹水から常法のポリペプチド単離精製法により分離精製することができる。そのような分離精製方法としては、例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、又はDEAEセルロース、ヒドロキシアパタイト、若しくはプロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法を挙げることができる。

また、モノクローナル抗体又はその一部分を含む抗体断片は、前記モノクローナル抗体をコードする遺伝子の全部又は一部を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞（例えば、大腸菌、酵母、又は動物細胞）に導入して生産させることもできる。

[0024] 以上のように分離精製された抗体（ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含む）について、常法により、ポリペプチド分解酵素（例えば、ペプシン又はパパイン等）によって消化を行い、引き続き、常法のポリペプチド単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗原結合性断片、例えば、 $F(ab)_2$ 、Fab、Fab、又はFvを得ることができる。

[0025] 更には、本発明のタンパク質に反応する抗体を、クラクソンらの方法又はゼベデらの方法（Clackson, T.ら, Nature, 352, 624-628, 1991；又はZebedee, S.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992）により、一

本鎖 (single chain) Fv 又は ab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. ら, Nature, 368, 856-859, 1994) に免疫することで、ヒト抗体を得ることも可能である。

[0026] [2] 細胞融合剤

本発明の細胞融合剤は、有効成分として、本発明の前記ポリペプチドを含む。本発明の細胞融合剤は、1種のポリペプチドを単独で含んでもよいが、2種以上のポリペプチドを組み合わせ含んでもよい。

細胞融合剤における前記ポリペプチドの含有量は、特に限定されるものではないが、例えば0.1~100重量%であり、好ましくは10~100重量%であり、より好ましくは30~90重量%である。本発明の細胞融合剤は、ポリペプチド以外の成分として、担体 (例えば、水又は緩衝液)、賦形剤、希釈剤、保存剤、安定化剤、防腐剤、又は酸化防止剤等を含んでもよい。

[0027] 本発明の細胞融合剤は、植物の品種改良又はモノクローナル抗体の生産などに用いることができる。本発明の細胞融合剤によれば、効率的に細胞を融合させることができる。

本発明の細胞融合剤によって、融合される細胞としては、特に限定されるものではなく、微生物の細胞、植物細胞、又は動物細胞が挙げられる。動物細胞としては、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウシなどの脊椎動物 (例えば哺乳動物) の有核細胞 (例えば血液細胞、リンパ系細胞、内臓を構成する細胞)、哺乳動物由来の癌細胞などが挙げられる。

[0028] 細胞融合の温度は、細胞融合が起こる限りにおいて、特に限定されるものではないが、例えば0~40℃であり、好ましくは10~38℃である。処理時間は特に限定されるものではないが、好ましくは1分から2時間である。

[0029] [3] 医薬組成物

本発明の医薬組成物は、有効成分として、本発明のポリペプチドを含む。本発明の医薬組成物が予防又は治療できる疾患は、特に限定されるものではないが、例えばがん細胞を融合させ、がん細胞を死滅させ、そしてがんを治療することができる。具体的には、本発明のペプチドは、細胞融合によって、細胞にアポトーシスを誘導することができる。融合した細胞は、Caspase-3/7又はAnnexin Vが活性し、アポトーシスが誘導される。融合細胞にアポトーシスが誘導されることによって、がん細胞を死滅させることができる。

本発明の医薬組成物が治療できる癌としては、舌癌、歯肉癌、悪性リンパ腫、悪性黒色腫、上顎癌、鼻癌、鼻腔癌、喉頭癌、咽頭癌、神経膠腫、髄膜腫、神経膠腫、神経芽細胞腫、甲状腺乳頭腺癌、甲状腺濾胞癌、甲状腺髄様癌、原発性肺癌、扁平上皮癌、腺癌、肺胞上皮癌、大細胞性未分化癌、小細胞性未分化癌、カルチノイド、睾丸腫瘍、前立腺癌、乳癌、乳房ページェット病、乳房肉腫、骨腫瘍、甲状腺癌、胃癌、肝癌、急性骨髄性白血病、急性前髄性白血病、急性骨髄性単球白血病、急性単球性白血病、急性リンパ性白血病、急性未分化性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、成人型T細胞白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、原発性マクログロブリン血症、小児性白血病、食道癌、胃癌、胃・大腸平滑筋肉腫、胃・腸悪性リンパ腫、膵・胆嚢癌、十二指腸癌、大腸癌、原発性肝癌、肝芽腫、子宮上皮内癌、子宮頸部扁平上皮癌、子宮腺癌、子宮腺扁平上皮癌、子宮体部腺類癌、子宮肉腫、子宮癌肉腫、子宮破壊性奇胎、子宮悪性絨毛上皮腫、子宮悪性黒色腫、卵巣癌、中胚葉性混合腫瘍、腎癌、腎盂移行上皮癌、尿管移行上皮癌、膀胱乳頭癌、膀胱移行上皮癌、尿道扁平上皮癌、尿道腺癌、ウィルムス腫瘍、横紋筋肉腫、線維肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、滑液膜肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、ユーイング肉腫、皮膚扁平上皮癌、皮膚基底細胞癌、皮膚ボーエン病、皮膚ページェット病、皮膚悪性黒色腫、悪性中皮癌、転移性腺癌、転移性扁平上皮癌、転移性肉腫および中皮腫が挙げられる。

[0030] 本発明の医薬組成物の投与剤型としては、特に限定がなく、例えば、散剤

、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁剤、エマルジョン剤、シロップ剤、エキス剤、若しくは丸剤等の経口剤、又は注射剤、外用液剤、軟膏剤、坐剤、局所投与のクリーム、若しくは点眼剤などの非経口剤を挙げることができる。

経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスターチ、白糖、乳糖、ブドウ糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリデン、結晶セルロース、大豆レシチン、シヨ糖、脂肪酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸、又は合成ケイ酸アルミニウムなどの賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、矯味剤、安定化剤、保湿剤、防腐剤、又は酸化防止剤等を用いて、常法に従って製造することができる。

非経口剤としては、例えば注射剤を挙げることができる。注射剤の調製においては、有効成分の他に、例えば生理食塩水若しくはリンゲル液等の水溶性溶剤、植物油若しくは脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖若しくは塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、又は乳化剤などを任意に用いることができる。

[0031] 医薬組成物を用いる場合の投与量は、例えば、使用する有効成分の種類、病気の種類、患者の年齢、性別、体重、生上の程度、又は投与方法に応じて適宜決定することができ、経口的に又は非経口的に投与することが可能である。例えば、本発明の医薬組成物を経口摂取する場合の摂取量は、例えば成人の場合、ポリペプチドとして1日当たり0.01~100mg/kgが好ましい。なお、上記の投与法は一例であり、他の投与法であってもよい。ヒトへの医薬組成物の投与方法、投与量、投与期間、及び投与間隔等は、管理された臨床治験によって決定されることが望ましい。

[0032] 更に、投与形態も医薬品に限定されるものではなく、種々の形態、例えば、機能性食品や健康食品（飲料も含む）、又は飼料として飲食物の形態で与えることも可能である。

ポリペプチドを含有する医薬組成物の製造方法は、ポリペプチドを有効成分として含むこと以外は、公知の医薬品の製造方法を用いて製造することができる。

[0033] 本発明の医薬組成物は、その他の成分を含有することができる。前記その他の成分としては、例えば、食用油脂、水、グリセリン脂肪酸エステル、蔗糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、グリセリン有機酸脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ステアロイル乳酸カルシウム、ステアロイル乳酸ナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル等の乳化剤、ローカストビーンガム、カラギーナン、アルギン酸類、ペクチン、キサントガム、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、寒天、グルコマンナン、ゼラチン、澱粉、又は化工澱粉等の増粘安定剤、食塩、又は塩化カリウム等の塩味剤、酢酸、乳酸、又はグルコン酸等の酸味料、糖類又は糖アルコール類、ステビア、又はアスパルテーム等の甘味料、ベータカロチン、カラメル、又は紅麴色素等の着色料、トコフェロール、又は茶抽出物等の酸化防止剤、着香料、pH調整剤、食品保存料、又は日持ち向上剤等の食品素材や食品添加物を挙げることができる。また、各種ビタミンやコエンザイムQ、植物ステロール、又は乳脂肪球皮膜等の機能素材を含有させることも可能である。これらのその他の成分の含有量は、本発明の医薬組成物中、合計で好ましくは8質量%以下、より好ましくは40質量%以下、更に好ましくは20質量%以下とする。

[0034] 本発明の医薬組成物は、ヒトに対して投与することができるが、投与対象はヒト以外の動物であってもよく、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット、及びリス等のペット；牛及び豚等の家畜；マウス、ラット等の実験動物；並びに、動物園等で飼育されている動物等が挙げられる。

[0035] 《がんの治療方法》

本発明のがんの治療方法は、前記ポリペプチドの有効量を、治療が必要な対象に投与する工程を含む。すなわち、本発明のポリペプチドは、がんの治

療方法に用いることができる。前記医薬組成物の有効量を、ヒト又は動物に投与することにより、がんを治療することができる。

[0036] 《がんの治療用であるポリペプチド》

本発明のポリペプチドは、がんの治療用である。

前記ポリペプチドは、がんの治療方法に使用することができる。すなわち、本明細書はがんの治療用であるポリペプチドを開示する。

[0037] 《ポリペプチドの医薬組成物の製造への使用》

前記ポリペプチドは、医薬組成物の製造に使用することができる。すなわち、本明細書は、ポリペプチドの医薬組成物の製造への使用を開示する。前記医薬組成物は限定されるものではないが、がん治療用医薬組成物である。

[0038] 《作用》

本発明のポリペプチドが、細胞融合活性を有するメカニズムは完全に解明されているわけではないが、以下のように推定される。しかしながら、本発明は以下の推定によって限定されるものではない。

本発明のポリペプチドは、配列番号1～8のアミノ酸配列に共通して存在している構造により細胞融合活性を示すものと考えられる。限定されるものではないが、第1番目のプロリンは比較的重要であると考えられる。一方、2番目及び9番目のロイシン又はイソロイシンは、相互に置換されても細胞融合活性を示すため、2番目及び9番目のアミノ酸は置換可能であり、他のアミノ酸（例えばバリン）への置換によっても細胞融合活性を示す可能性が高いと考えられる。また、5番目及び6番目のトレオニンとグルタミンも相互に置換されても細胞融合活性を示すため、5番目及び6番目のアミノ酸は置換可能であり、4番目のセリン及び7番目のトレオニンを含めて、性質の似た他のアミノ酸への置換によっても細胞融合活性を示す可能性が高いと考えられる。更に、8番目及び10番目のアラニンも性質の似たアミノ酸、例えばグリシンに置換されても細胞融合活性を示す可能性があると考えられる。また、N末端のプロリンのメチル化は、各ペプチドの細胞融合能、及びがん細胞のアポトーシスの誘導に必須ではない。従って、N末端のプロリンに

1つ以上のアミノ酸が付加されたペプチドも、細胞融合及びアポトーシス誘導能を示すことができる。

また、本発明のポリペプチドが、抗がん作用を有するメカニズムは完全に解明されているわけではないが、以下のように推定される。しかしながら、本発明は以下の推定によって限定されるものではない。

本発明のポリペプチドは、がん細胞を融合させることができ、細胞にアポトーシスを誘導し、それによってがん細胞を死滅させることができると推定される。また、前記細胞融合は、がんの種類によらず誘導される。従って、本発明のポリペプチドは、多くの種類のがんに対して有効だと考えられる。

## 実施例

[0039] 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

[0040] 《実施例1》

本合成例では、下記の配列番号1～8で表されるアミノ酸配列のN末端のプロリンがメチル化されたペプチド、配列番号1で表されるアミノ酸配列のペプチド（プロリンがメチル化されていない）、及び配列番号9で表されるアミノ酸配列のN末端のプロリンがメチル化されたペプチドを合成した。ペプチド合成は、グライナー／ファスマックス社に委託した。なお、配列番号9で表されるアミノ酸配列は、配列番号1で表されるアミノ酸配列のC末側にスレオニン及びアラニンが付加されたアミノ酸配列である。

CH<sub>3</sub>-Pro-Leu-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Ile-Ala（以下、ペプチド1と称する；配列番号1）

CH<sub>3</sub>-Pro-Leu-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Leu-Ala（以下、ペプチド2と称する；配列番号2）

CH<sub>3</sub>-Pro-Leu-Val-Ser-Gln-Thr-Thr-Ala-Ile-Ala（以下、ペプチド3と称する；配列番号3）

CH<sub>3</sub>-Pro-Leu-Val-Ser-Gln-Thr-Thr-Ala-Leu-Ala（以下、ペプチド4と称する；配列番号4）

CH<sub>3</sub>-Pro-Ile-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Ile-Ala (以下、ペプチド5と称する  
; 配列番号5)

CH<sub>3</sub>-Pro-Ile-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Leu-Ala (以下、ペプチド6と称する  
; 配列番号6)

CH<sub>3</sub>-Pro-Ile-Val-Ser-Gln-Thr-Thr-Ala-Ile-Ala (以下、ペプチド7と称する  
; 配列番号7)

CH<sub>3</sub>-Pro-Ile-Val-Ser-Gln-Thr-Thr-Ala-Leu-Ala (以下、ペプチド8と称する  
; 配列番号8)

CH<sub>3</sub>-Pro-Leu-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Ile-Ala-Thr-Ala (以下、ペプチド9  
と称する; 配列番号9)

Pro-Leu-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Ile-Ala (以下、ペプチド10と称する;  
配列番号1)

アミノ酸の合成は、standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc) method  
に従って行った。具体的には、Fmocアミノ酸をHBTU/HOBT溶液 (HBTU:2-(1H-B  
enzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniu Hexafluorophosphate; HOBT:  
1-Hydroxybenzotriazole) で活性化し、DIEA (N,N'-Diisopropylethylamin  
e) を添加してアミノ酸を縮合させた。

合成されたアミノ酸のレジンからの切り出しは、以下のように実施した。T  
FA (trifluoroacetic acid) 溶液 (4.125 mL TFA, 0.25 mL H<sub>2</sub>O, 0.375 g phe  
nol, 0.125 mL ethanedithiol and 0.25 mL thioanisole)) を作成し、レジ  
ンに加え、常温で2時間反応させて冷エーテルで沈殿させてCrudeペプチドを  
得た。

得られた粗精製ペプチドをRP-HPLCを用いて精製し、凍結乾燥させ  
た。精製の純度は、下記の条件のHPLC及びMSで検討した。

・ HPLC条件

A Buffer : 0.1%TFA/H<sub>2</sub>O、 B Buffer : 0.1%TFA/Acetonitrile

Column : SunFire C18 Column, 5 μm, 4.6 x 150 mm

Flow rate : 1 mL/min

Wavelength : 220 nm

・ MALDI-TOF-MS

[0041] 《実施例 2》

本実施例では、RFL細胞（ラット肺胎児由来細胞）又はLLC細胞（ルイス肺癌由来細胞）に、実施例1で得られたペプチド1を作用させ、ペプチドの細胞融合活性を検討した。

RFL細胞又はLLC細胞（ $2 \times 10^6$ 個）を5%FBS（Biosera, Cat No. 015BS493）を添加したRPMI-1640（Wako, 189-02025）培地6mLに懸濁し、24well plate（Iwaki, 2820-024）の各wellに $8 \times 10^4$ 個/0.25mL分注し、培養した。培地を除去し、新たに培地（20 $\mu$ L）及びペプチド1（1 $\mu$ g/mL）を分注し、さらに24~36時間培養した。培養終了後、メタノール（Wako）にて固定し、ギムザ染色液（武藤化学 15003）にて核染色を行って検鏡した。

図1にRFL細胞の弱拡大（A及びB）及び強拡大（C）の顕微鏡写真、及びLLC細胞（D）の顕微鏡写真を示す。RFL細胞及びLLC細胞のいずれでも、細胞が融合し、複数の核を有する融合細胞が見られた。

[0042] 《実施例 3》

本実施例では、ペプチド2の細胞融合活性を検討した。ペプチド1に代えてペプチド2を用いたこと、及びRFL細胞のみを使用したことを除いては、実施例2の操作を繰り返した。

図2にRFL細胞の弱拡大（A）及び強拡大（B）の顕微鏡写真を示す。RFL細胞において、細胞が融合し、複数の核を有する融合細胞が見られた。

[0043] 《実施例 4》

本実施例では、ペプチド3の細胞融合活性を検討した。ペプチド2に代えてペプチド3を用いたことを除いては、実施例3の操作を繰り返した。

図3にRFL細胞の弱拡大の顕微鏡写真を示す。RFL細胞において、細胞が融合し、複数の核を有する融合細胞が見られた。

## [0044] 《実施例 5》

本実施例では、ペプチド 4 の細胞融合活性を検討した。ペプチド 2 に代えてペプチド 4 を用いたことを除いては、実施例 3 の操作を繰り返した。

図 4 に R F L 細胞の弱拡大の顕微鏡写真を示す。R F L 細胞において、細胞が融合し、複数の核を有する融合細胞が見られた。

## [0045] 《実施例 6》

本実施例では、ペプチド 5 の細胞融合活性を検討した。ペプチド 2 に代えてペプチド 5 を用いたことを除いては、実施例 3 の操作を繰り返した。

図 5 に R F L 細胞の弱拡大の顕微鏡写真を示す。R F L 細胞において、細胞が融合し、複数の核を有する融合細胞が見られた。

## [0046] 《実施例 7》

本実施例では、ペプチド 6 の細胞融合活性を検討した。ペプチド 1 に代えてペプチド 6 を用いたこと、及び L L C 細胞に代えて R M - 4 細胞を用いたことを除いては、実施例 2 の操作を繰り返した。なお、R M - 4 細胞は、R F L 細胞にモロニーマウス白血病ウイルスを感染させて、選択されたがん細胞である。

図 6 に R F L 細胞の弱拡大 (A) 及び強拡大 (B) の顕微鏡写真、並びに R M - 4 細胞の弱拡大 (C 及び D) を示す。R F L 細胞及び R M - 4 細胞において、細胞が融合し、複数の核を有する融合細胞が見られた。

## [0047] 《実施例 8》

本実施例では、ペプチド 7 の細胞融合活性を検討した。ペプチド 2 に代えてペプチド 7 を用いたことを除いては、実施例 3 の操作を繰り返した。

図 7 に R F L 細胞の弱拡大 (A) 及び強拡大 (B) の顕微鏡写真を示す。R F L 細胞において、細胞が融合し、複数の核を有する融合細胞が見られた。

## [0048] 《実施例 9》

本実施例では、ペプチド 8 の細胞融合活性を検討した。ペプチド 2 に代えてペプチド 8 を用いたことを除いては、実施例 2 の操作を繰り返した。

図8にRFL細胞の弱拡大（A及びB）及び強拡大（C）の顕微鏡写真、並びにLCC細胞（D）の顕微鏡写真を示す。RFL細胞及びLCC細胞において、細胞が融合し、複数の核を有する融合細胞が見られた。

[0049] 《実施例10》

本実施例では、ペプチド9の細胞融合活性を検討した。ペプチド2に代えてペプチド9を用いたことを除いては、実施例3の操作を繰り返した。図9にRFL細胞の弱拡大の顕微鏡写真を示す。RFL細胞において、細胞が融合し、複数の核を有する融合細胞が見られた。

ペプチド9は、ペプチド1のC末側にスレオニン及びアラニンが付加されたペプチドであるが、細胞融合活性を有しており、その細胞融合活性はペプチド1よりも優れていた。

[0050] 《実施例11》

本実施例では、ペプチド10の細胞融合活性を検討した。ペプチド2に代えてペプチド9を用いたことを除いては、実施例3の操作を繰り返した。図10にRFL細胞の弱拡大の顕微鏡写真を示す。RFL細胞において、細胞が融合し、複数の核を有する融合細胞が見られた。

すなわち、ペプチド1のN末のプロリンが、Nメチル化プロリンでなく、通常のプロリンのペプチドも、細胞融合活性を有していたが、ペプチド1の細胞融合活性の方が強いようであった。

[0051] 《実施例12》

本実施例では、RM-4細胞を用いて、ペプチド1のアポトーシス能を検討した。アポトーシスの指標であるCaspase-3/7及びAnnexinVの活性を、Incucyte S3生細胞解析システム（エッセンバイオサイエンス社）を用いて測定した。

Caspase-3/7の活性は、細胞膜を通過できる不活性非蛍光（DEVD）基質を用いて測定される。活性化Caspase-3/7が基質を切断することによって、DNA結合緑色蛍光ラベルが放出され、緑色蛍光の強度により、Caspase-3/7の活性が測定される。

Annexin Vの活性は、光安定性のCF色素を用いて測定される。CF色素は、ホスファチジルセリン（PS）に結合すると、赤色の蛍光シグナルを発し、赤色の蛍光シグナルにより、Annexin Vの活性が測定される。

[0052] RM-4細胞を96ウェルプレートに播種し、ペプチド1を0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した。Caspase-3/7 Green Reagent (Unit size: 20  $\mu\text{l}$ , 5mM/vial)をHam's F-12Kで500倍希釈し添加し、そしてAnnexin V Red Reagent (Unit size: 100 tests/vial)をHam's F-12Kで100倍希釈し添加した。Incucyte S3生細胞解析システムを用い、対物レンズ倍率10倍、視野数4で、1時間おきに3日間連続スキャンし測定した。コントロールとして、ペプチド1を処理していないRM-4細胞を用いた。

図11 (A)にCaspase-3/7の活性を、図11 (B)にAnnexin Vの活性を示す。Caspase-3/7及びAnnexin Vのいずれも、10時間から20時間の間に急激に上昇し、その後も徐々に活性が上昇した。一方、ペプチド1を処理しないRM-4細胞では、Caspase-3/7及びAnnexin Vの活性は上昇しなかった。

図12及び図13に、それぞれ18時間後及び78時間後の蛍光顕微鏡写真を示す。ペプチド1の処理によって、RM-4細胞にアポトーシスが誘導されることがわかる。

[0053] 《実施例13》

本実施例では、A549細胞（ヒト肺胞上皮腺癌細胞）に対するペプチド6の抗癌作用を*in vivo*で検討した。

6匹ずつ群分けしたCAnN.Cg-Foxn1<sup>nu</sup>/CrlCrljヌードマウスに、PBSに4  $\times 10^6$  cells/mLの濃度で懸濁したA549細胞を、0.1 mL右腹側部皮下に移植した。腫瘍移植後14日、17日、21日、24日、28日、31日、35日、及び38日後に、ペプチド6を25 mg/kgの投与量で、

尾静脈から静脈内投与した（ペプチド6群）。コントロール群は、PBSのみを投与した。

3日又は4日おきに、腫瘍体積及び体重を測定し、腫瘍移植38日後（ペプチド投与開始から28日）に剖検し、腫瘍を摘出した。腫瘍体積は、短径及び長径をノギスで測定し、「推定腫瘍体積＝（短径）<sup>2</sup>×（長径）÷2」の式から計算した。なお、コントロール群の1匹のマウスは腫瘍が過度に大きくなったため、腫瘍移植後35日で、実験を中止し、5匹のマウスで評価した。

図14及び図15に示すように、ペプチド6の投与により、腫瘍体積が減少し、抗癌作用があることが確認された。また、ペプチド6の投与は、マウスの体重に影響がなく、副作用等は見られなかった。


[0054] 摘出した腫瘍のHE染色写真を図17に示す。図17A（×40）及びB（×400）が、ペプチド6が投与されたA549細胞の腫瘍塊の写真であり、図17C（×40）及びD（×400）がコントロールである。コントロールは腫瘍組織塊に細胞が充満しているが、ペプチド6を投与したマウスでは腫瘍内部が壊死を起こしており、ペプチド6が抗腫瘍効果を示したと考えられる。

### 産業上の利用可能性

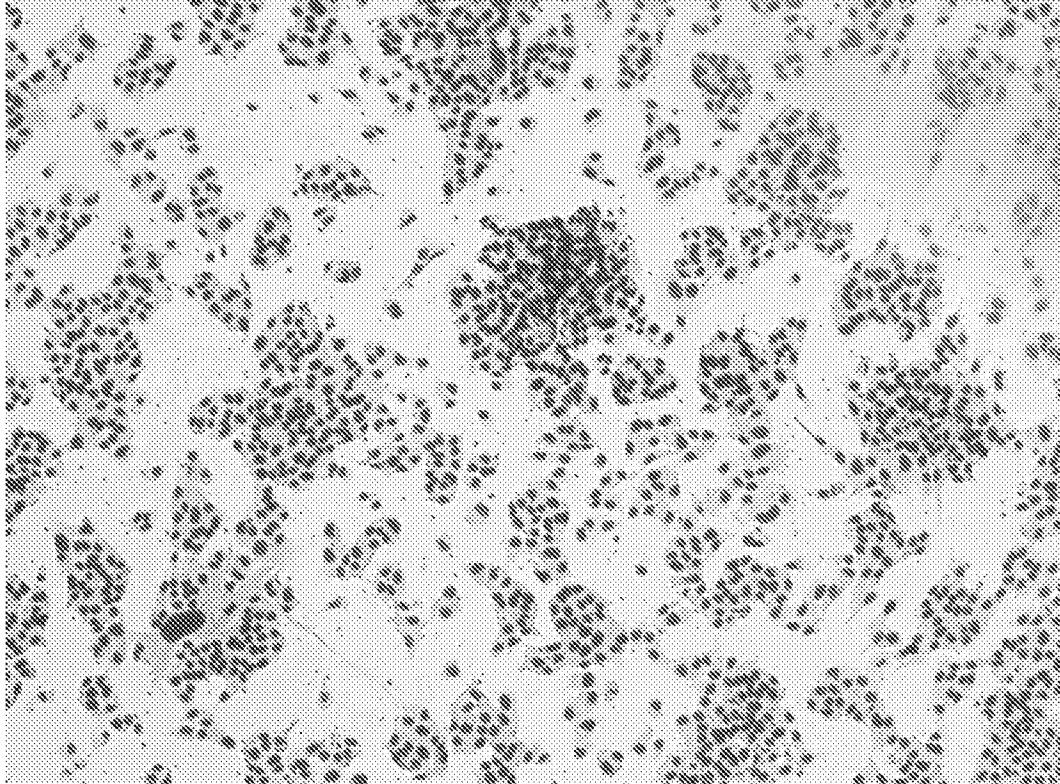
[0055] 本発明のポリペプチドは、植物細胞及び動物細胞の細胞融合に用いることができる。また、本発明の医薬組成物は、がんの治療に用いることができる。

## 請求の範囲

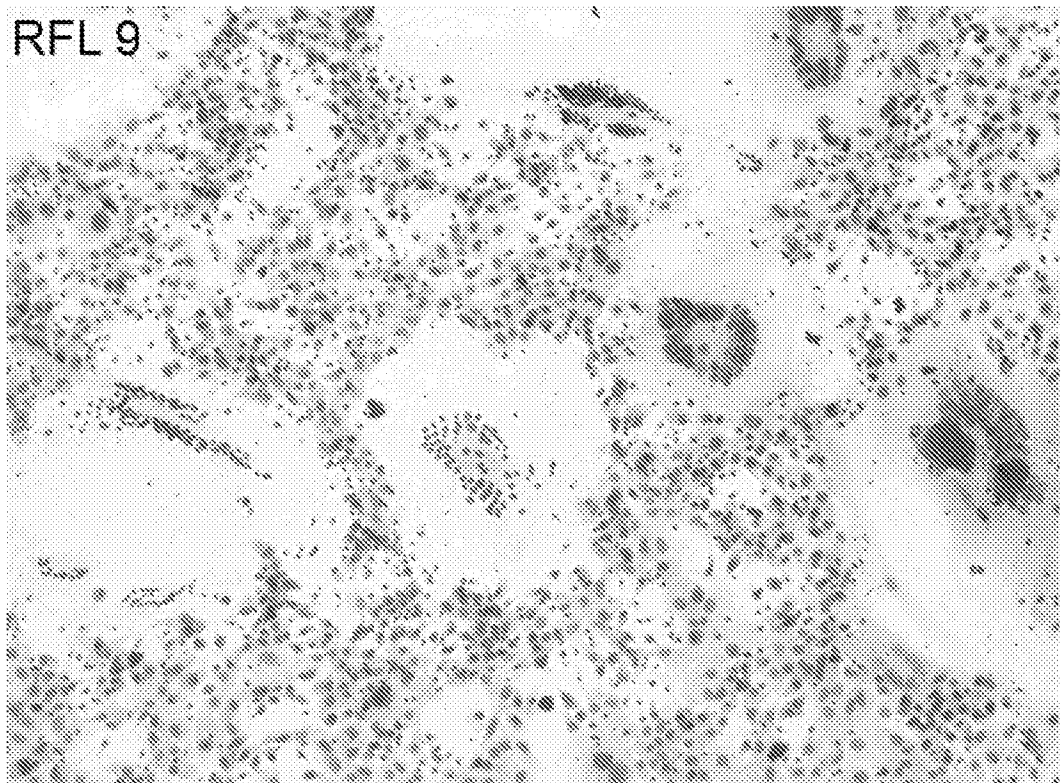
- [請求項1] (1) 配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は  
(2) 配列番号1～8で表されるアミノ酸配列において、1～4のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ細胞融合活性を有するポリペプチド。
- [請求項2] 前記配列番号1～8で表されるアミノ酸配列が、N末端にメチル基を有する、請求項1に記載のポリペプチド。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- [請求項4] 請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
- [請求項5] 請求項4に記載のポリヌクレオチドを含む形質転換体。
- [請求項6] 請求項1又は2に記載のポリペプチドに結合する抗体又はその抗原結合性断片。
- [請求項7] 有効成分として、請求項1又は2に記載のポリペプチドを含む細胞融合剤。
- [請求項8] 有効成分として、請求項1又は2に記載のポリペプチドを含む、医薬組成物。
- [請求項9] がん治療用である、請求項8に記載の医薬組成物。
- [請求項10] 請求項1又は2に記載のポリペプチドの有効量を、治療が必要な対象に投与する工程を含む、がんの治療方法。
- [請求項11] がんの治療用である、請求項1又は2に記載のポリペプチド。
- [請求項12] 請求項1又は2に記載のポリペプチドの、がん治療用医薬組成物の製造への使用。

[1-1]

(A)

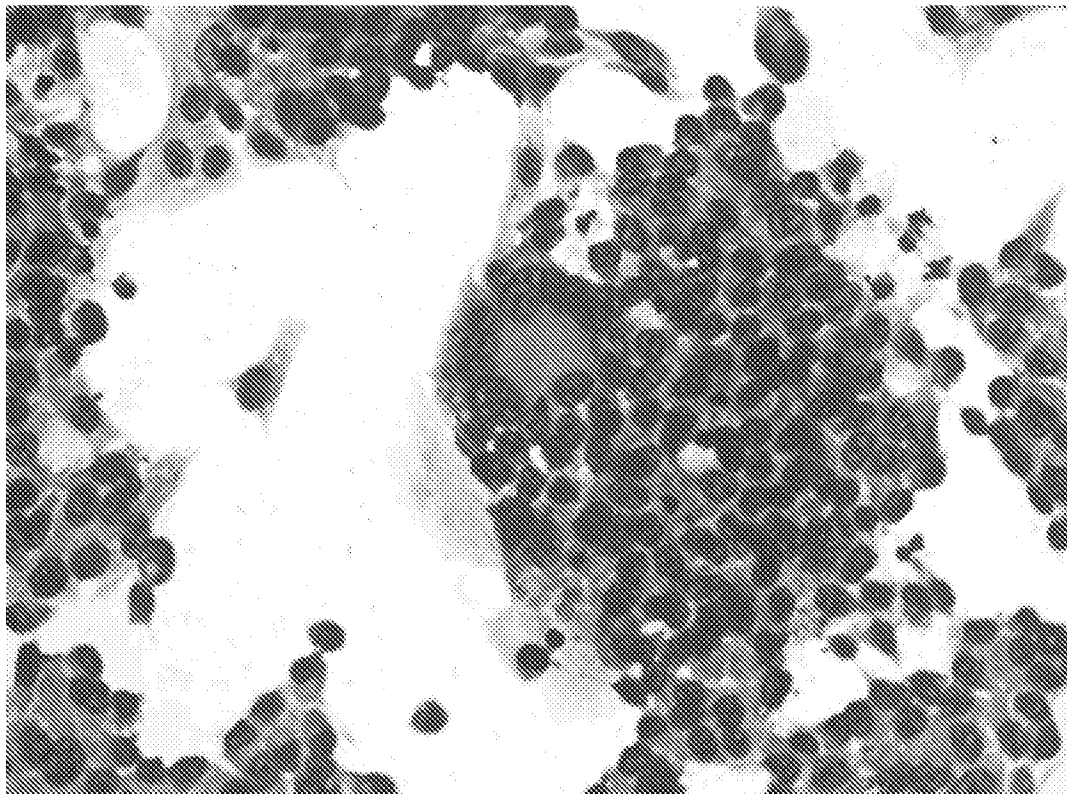


(B)

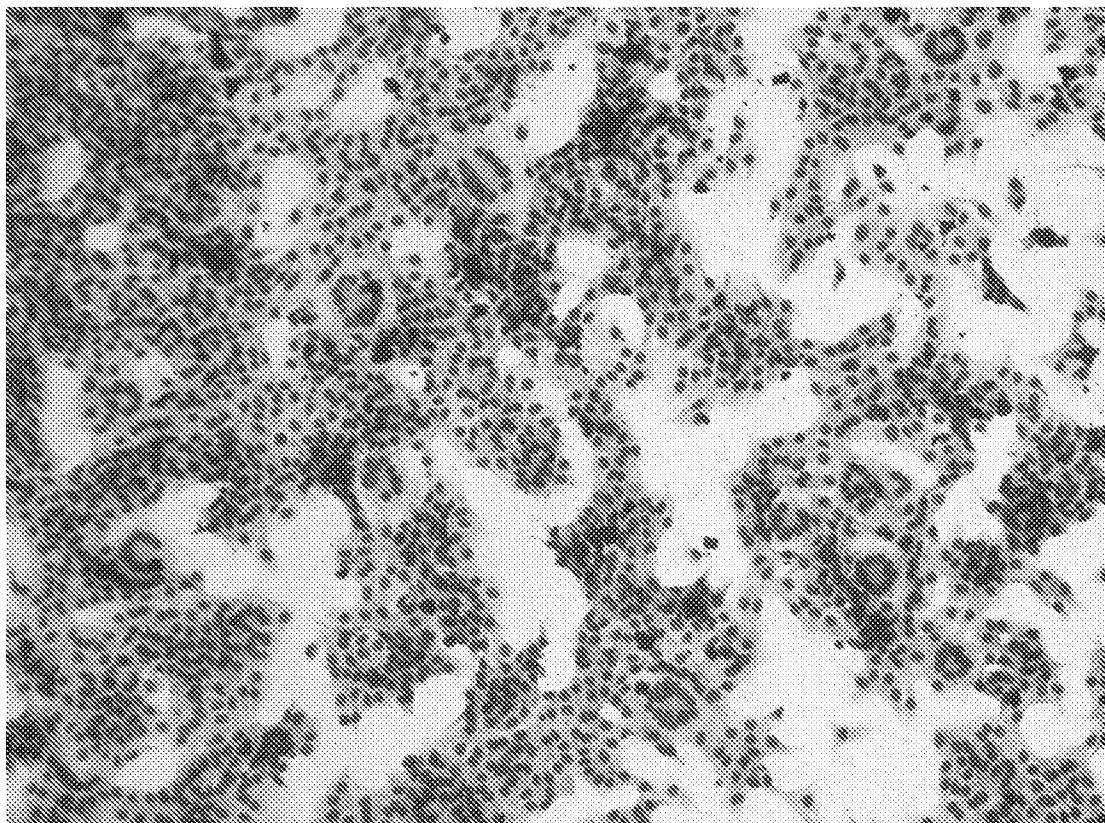


[図1-2]

(C)

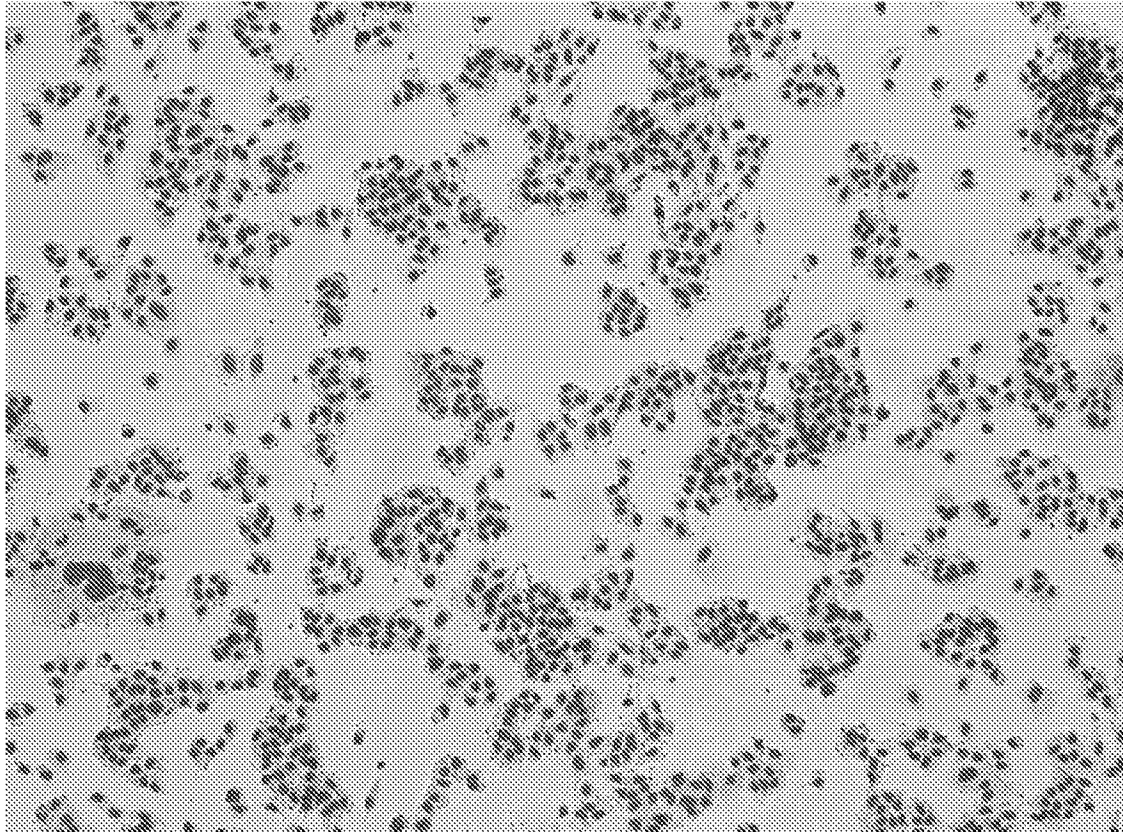


(D)

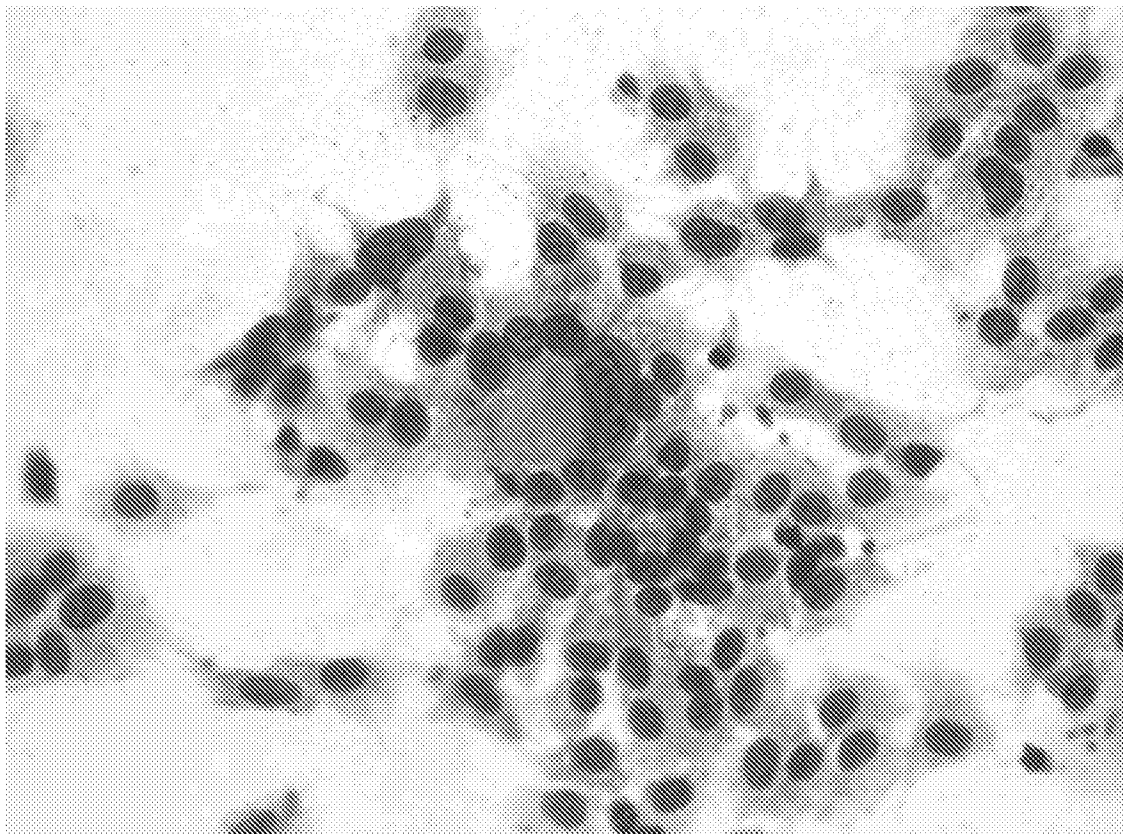


[図2]

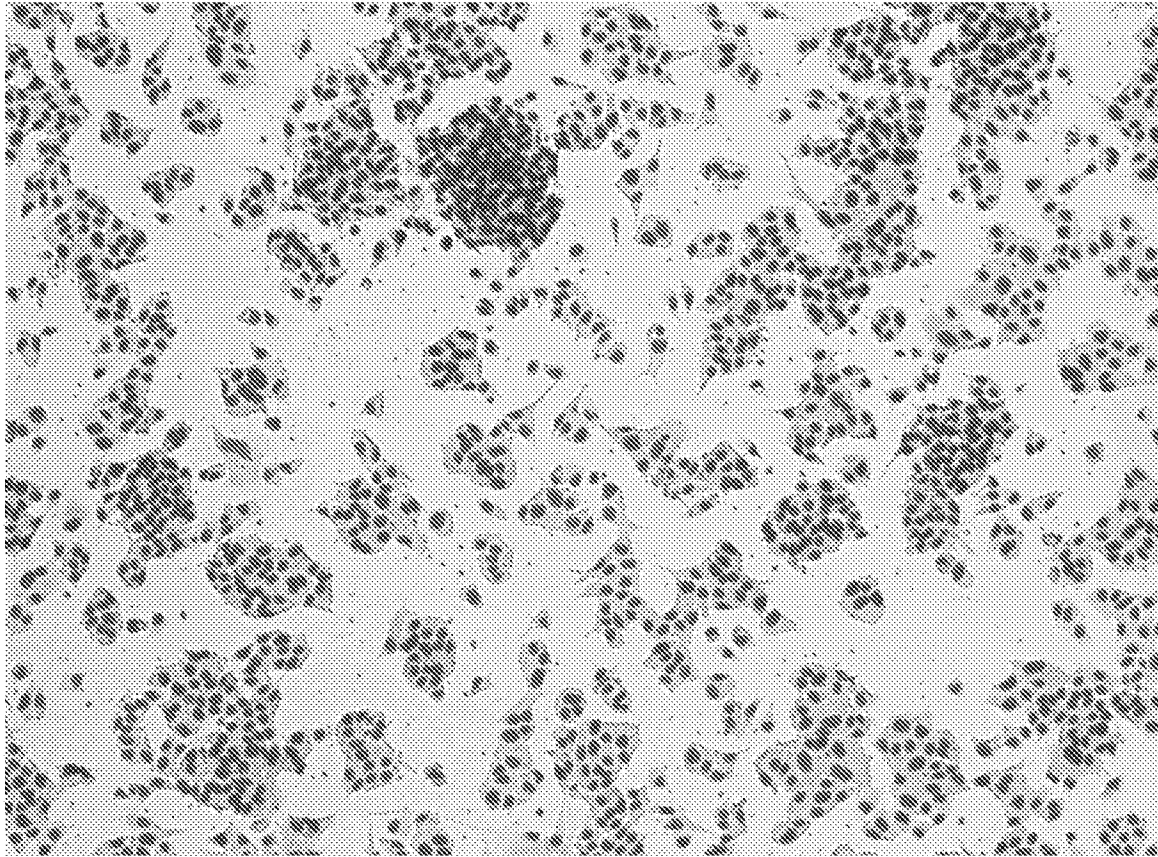
(A)



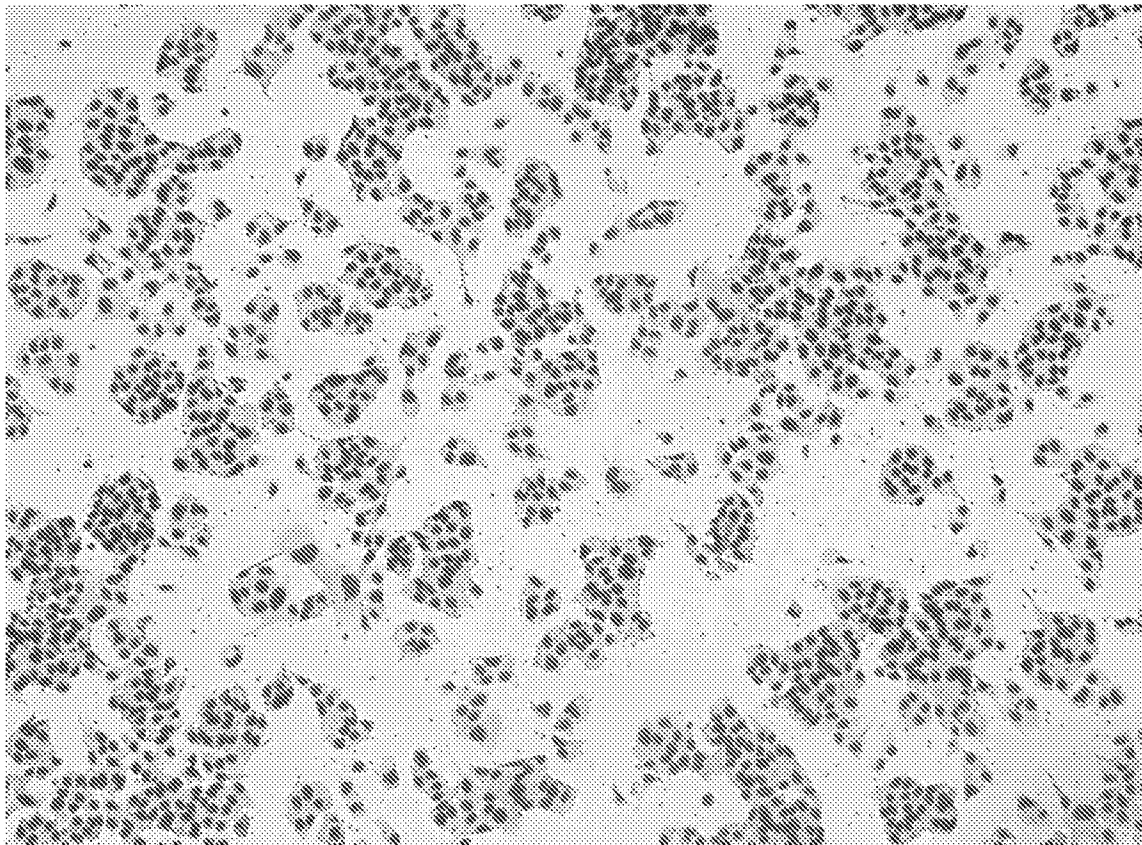
(B)



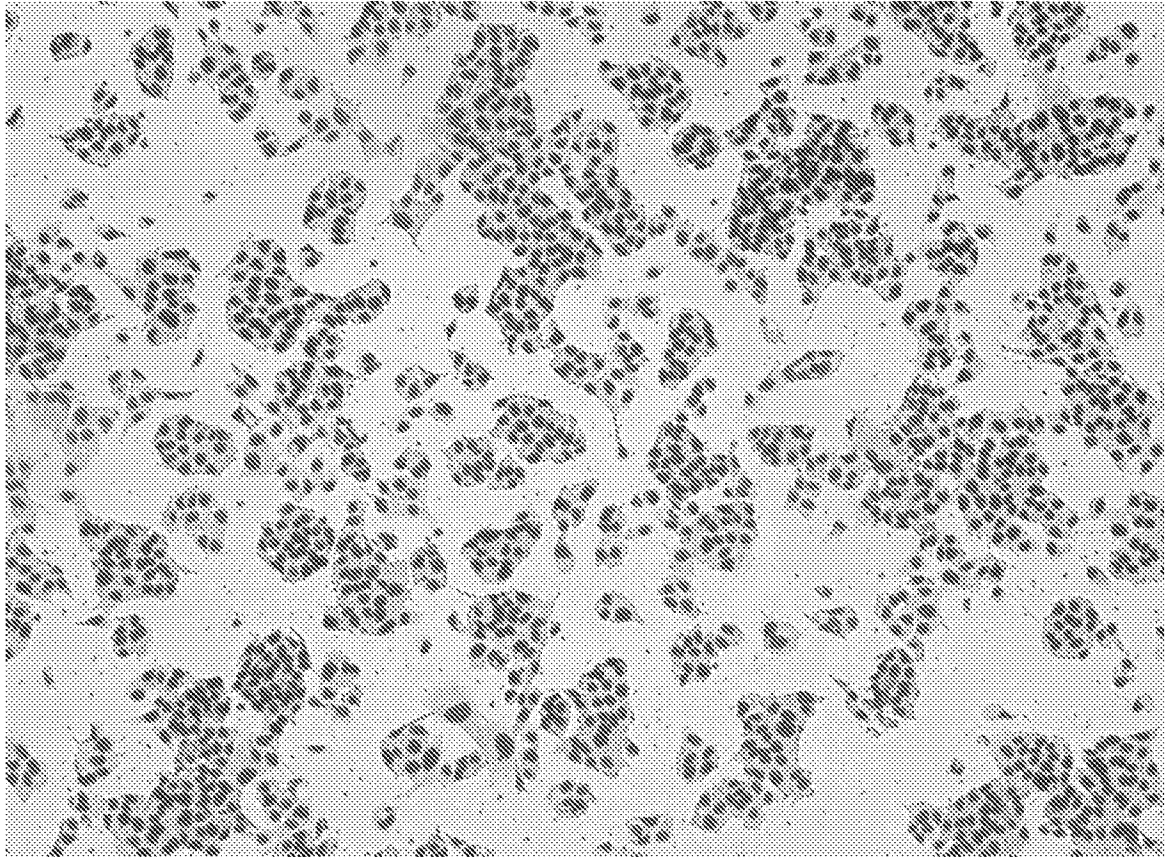
[図3]



[図4]

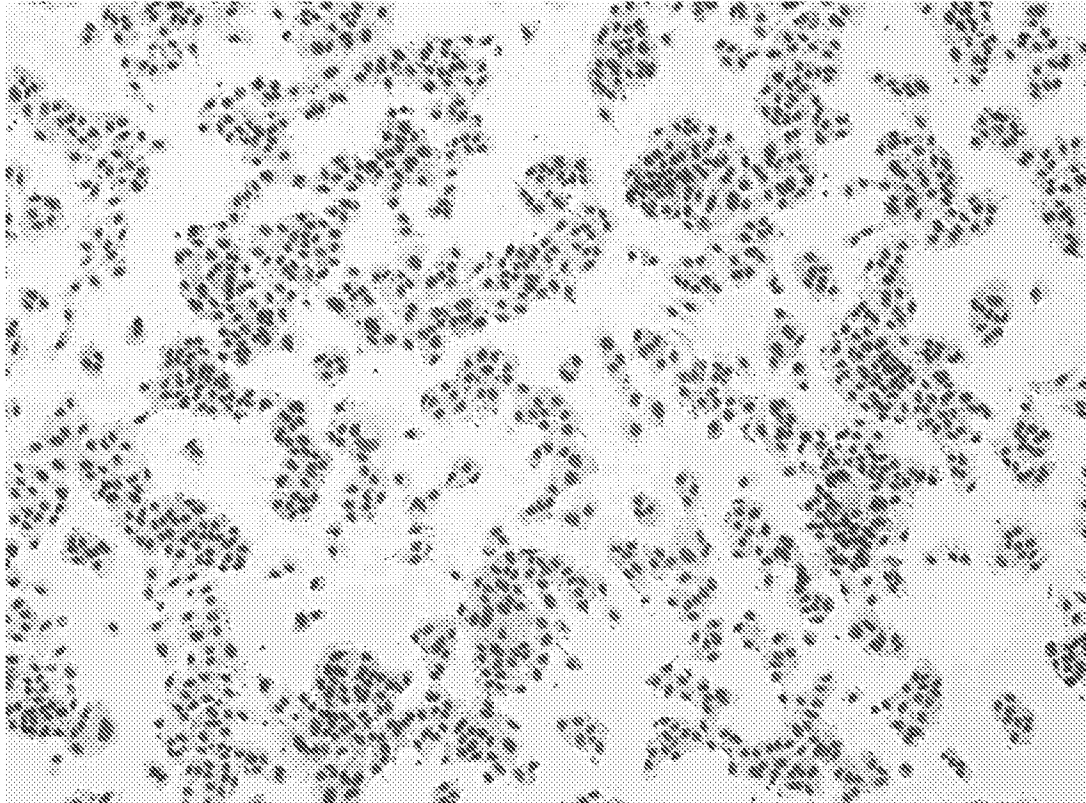


[図5]

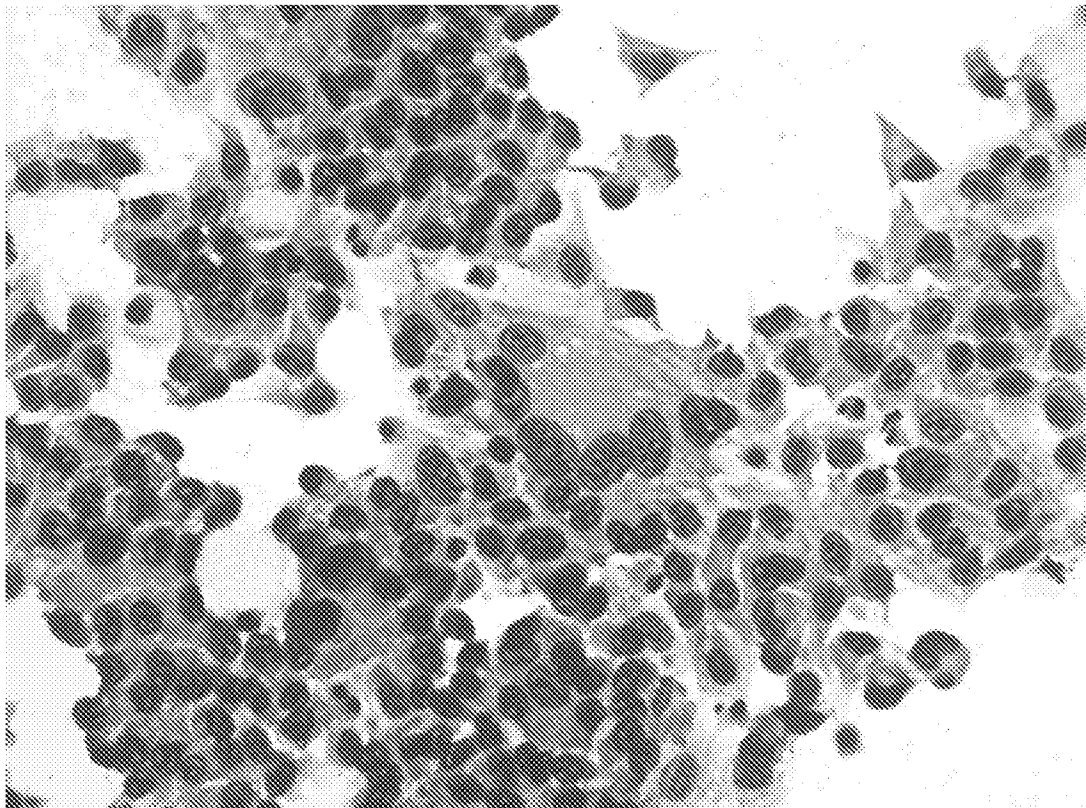


[図6-1]

(A)

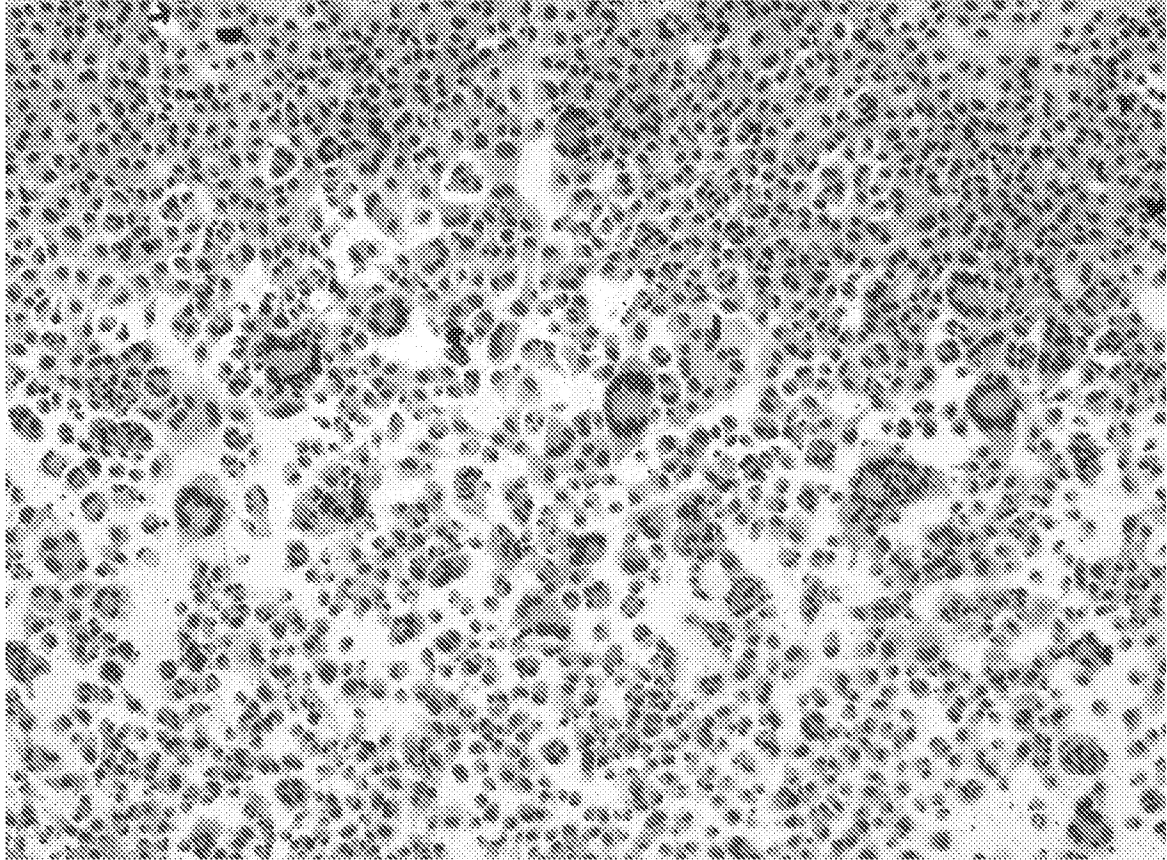


(B)

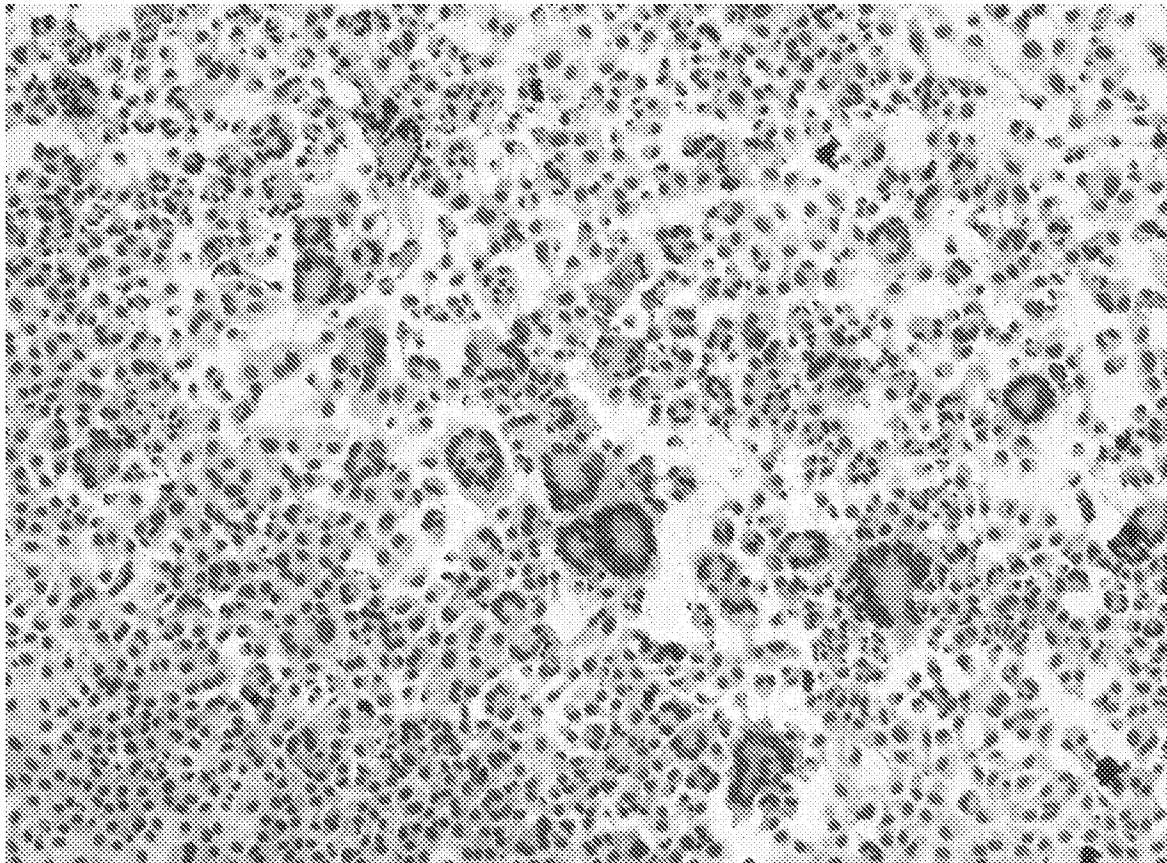


[図6-2]

(C)

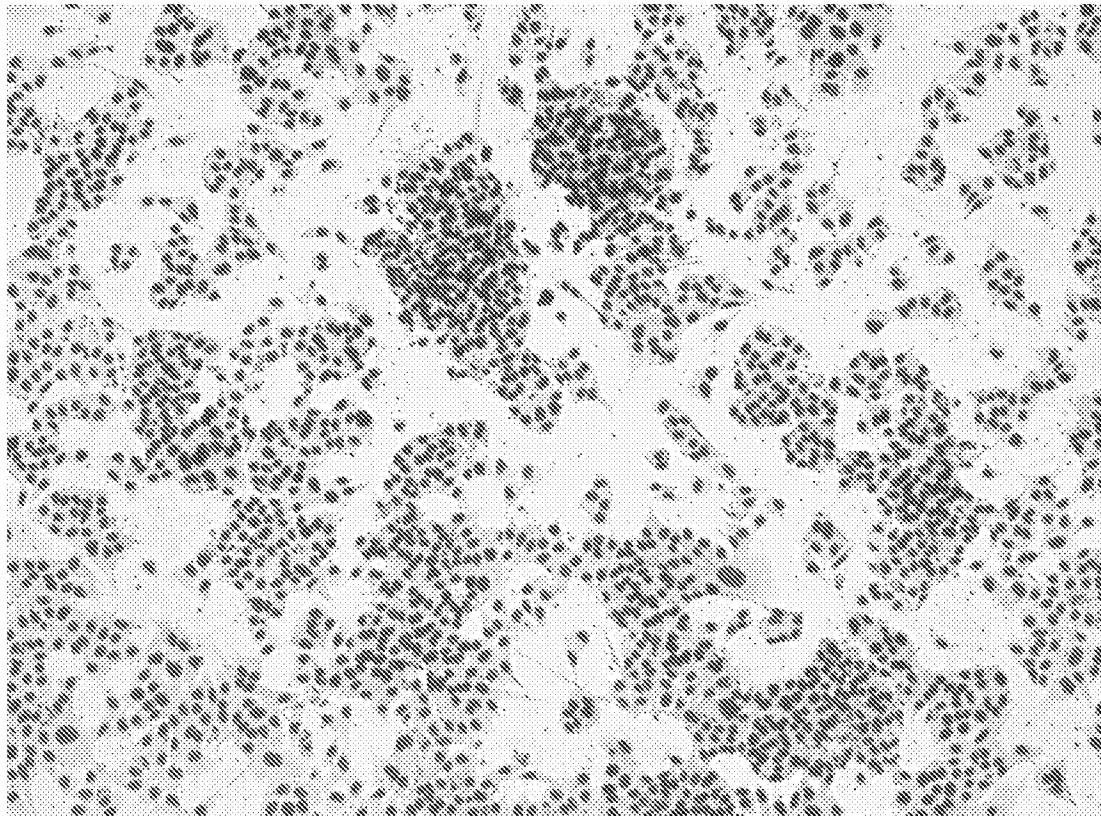


(D)

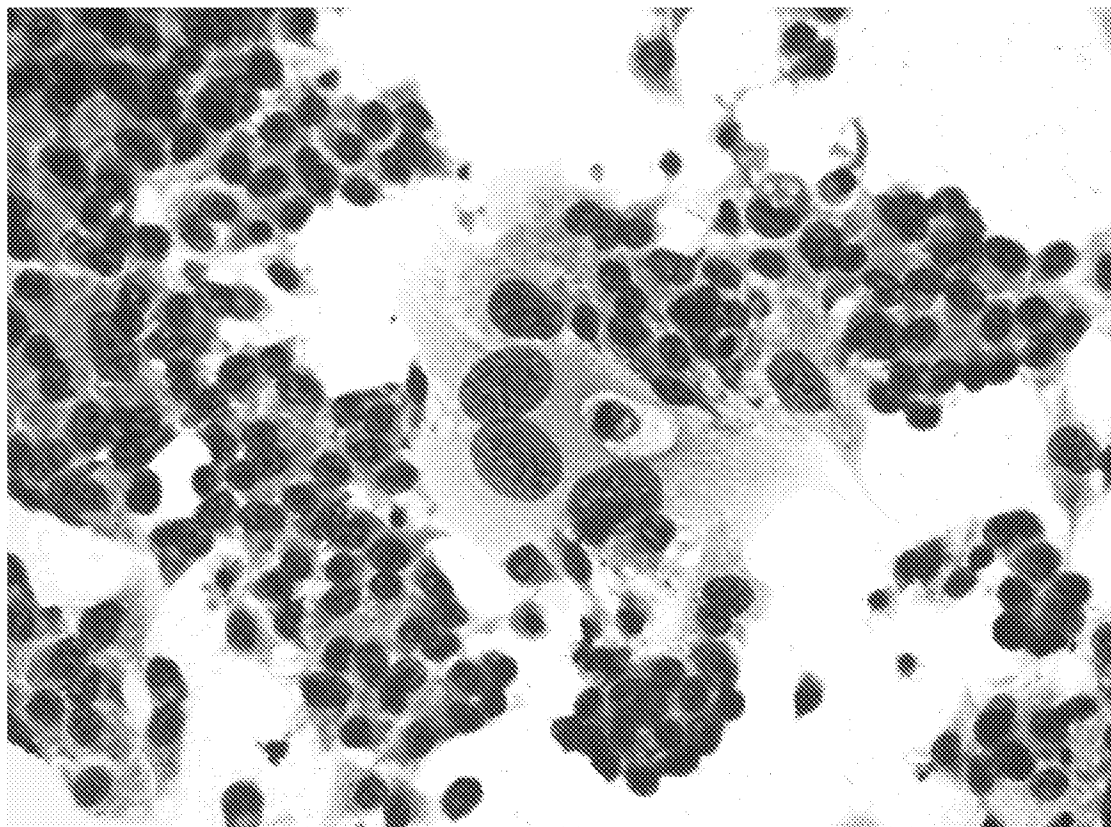


[図7]

(A)

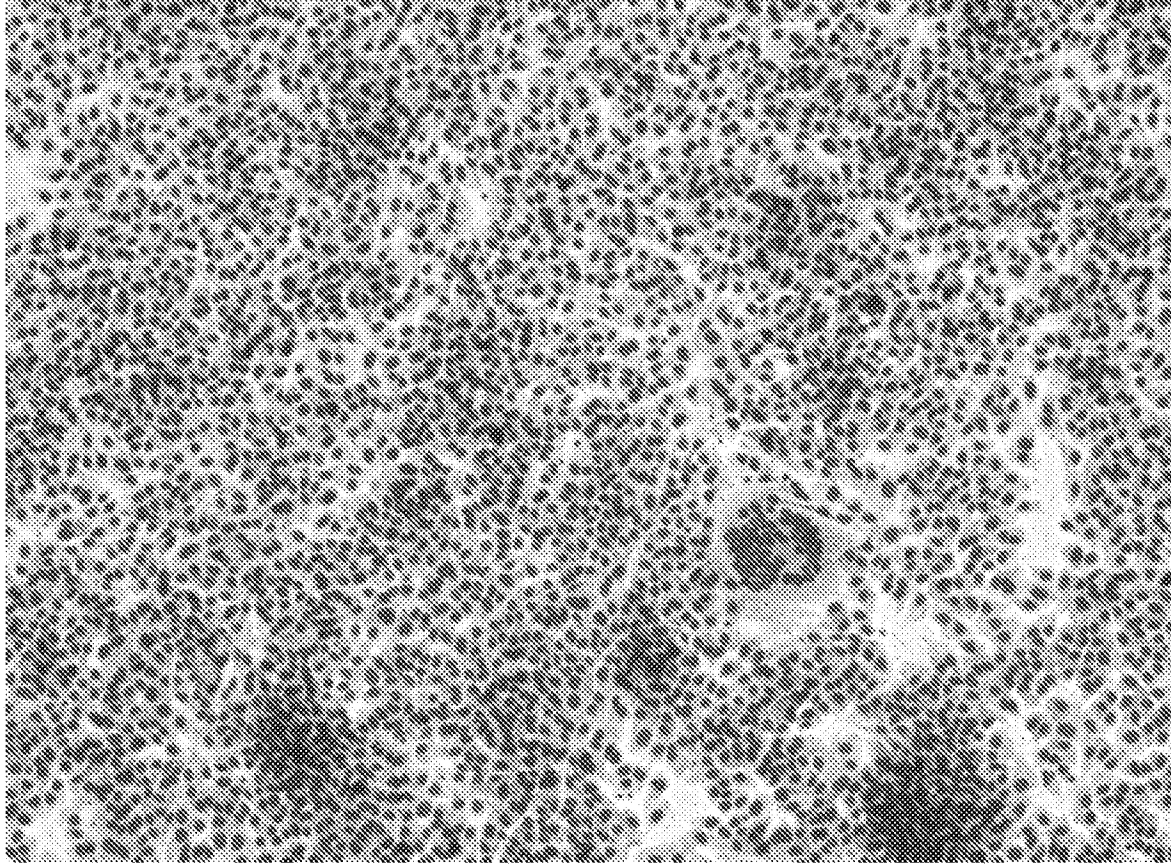


(B)

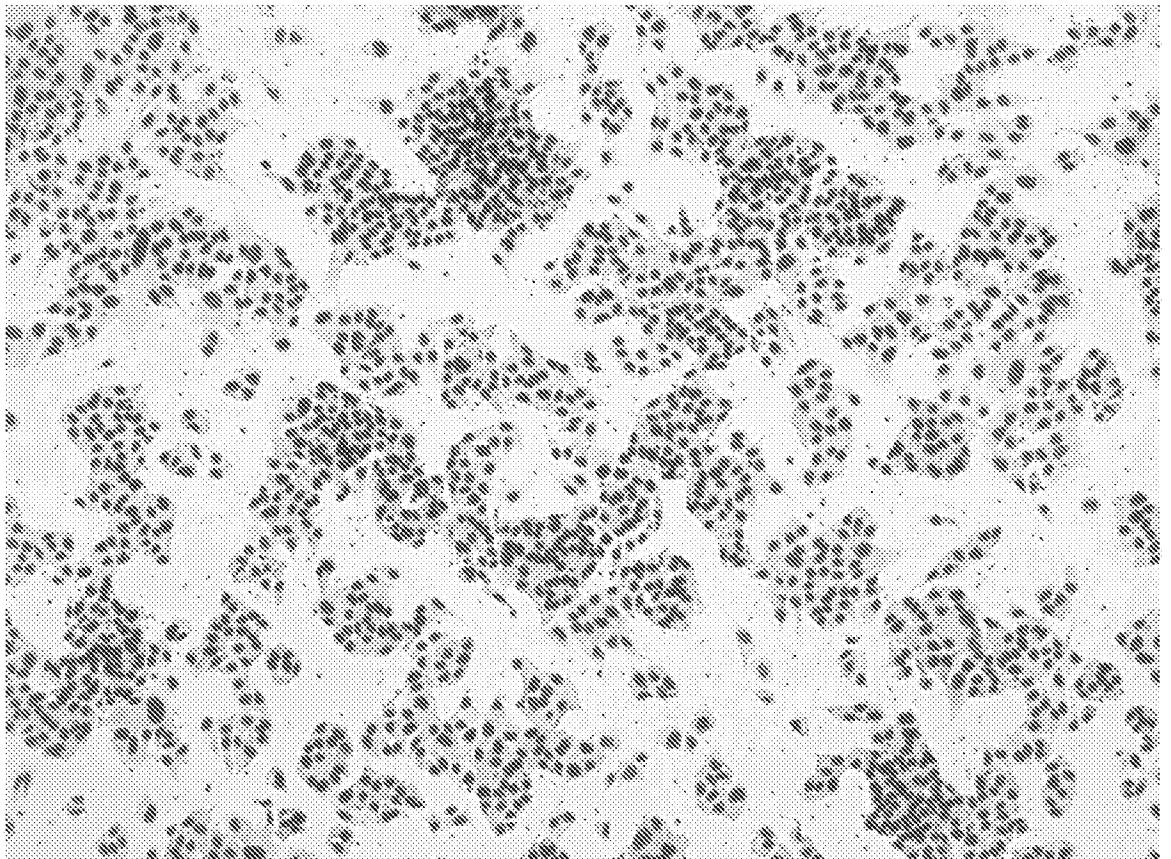



[図8-1]

(A)

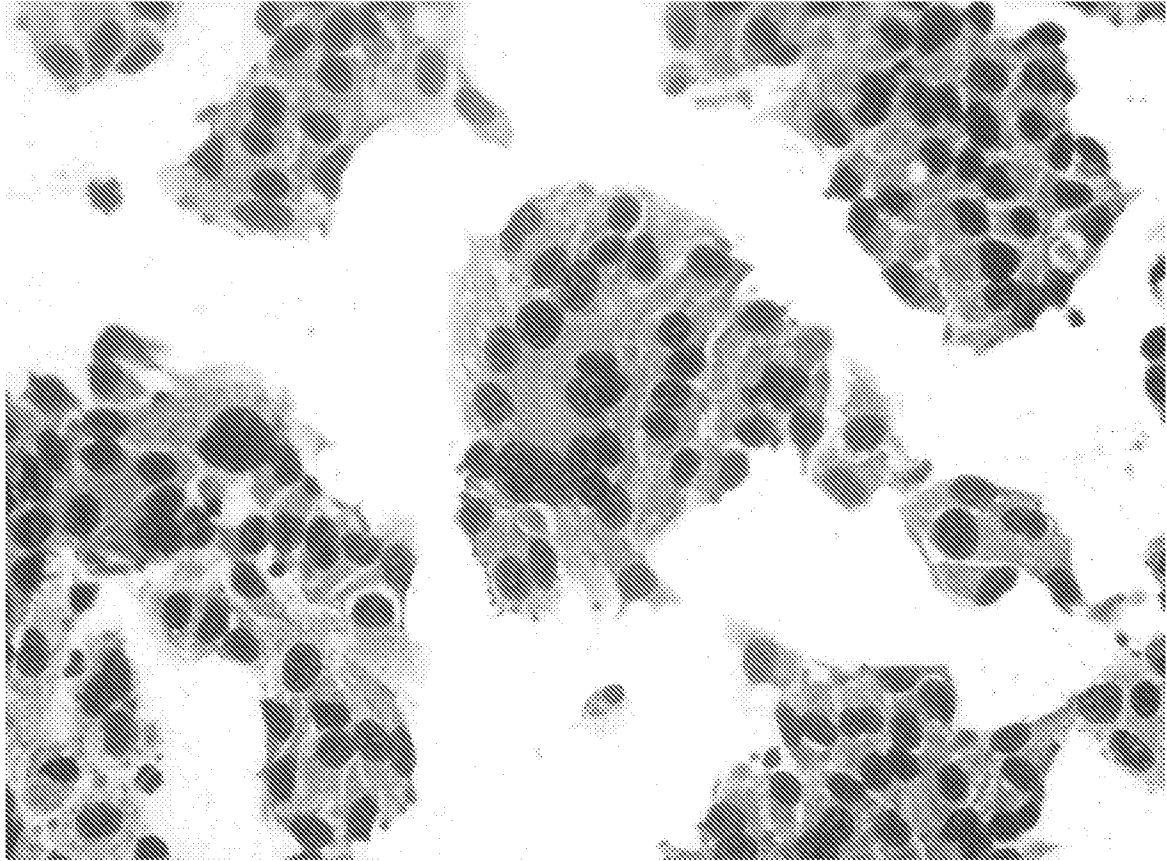


(B)

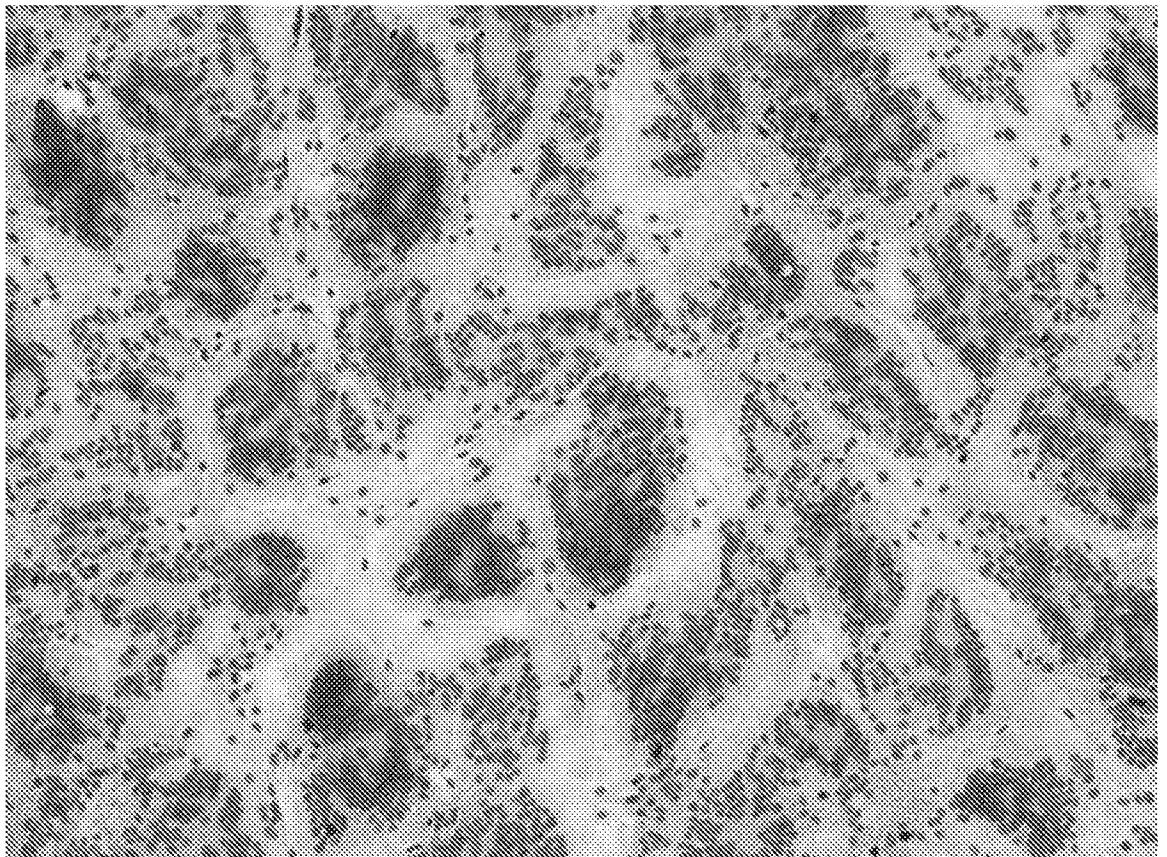


[8-2]

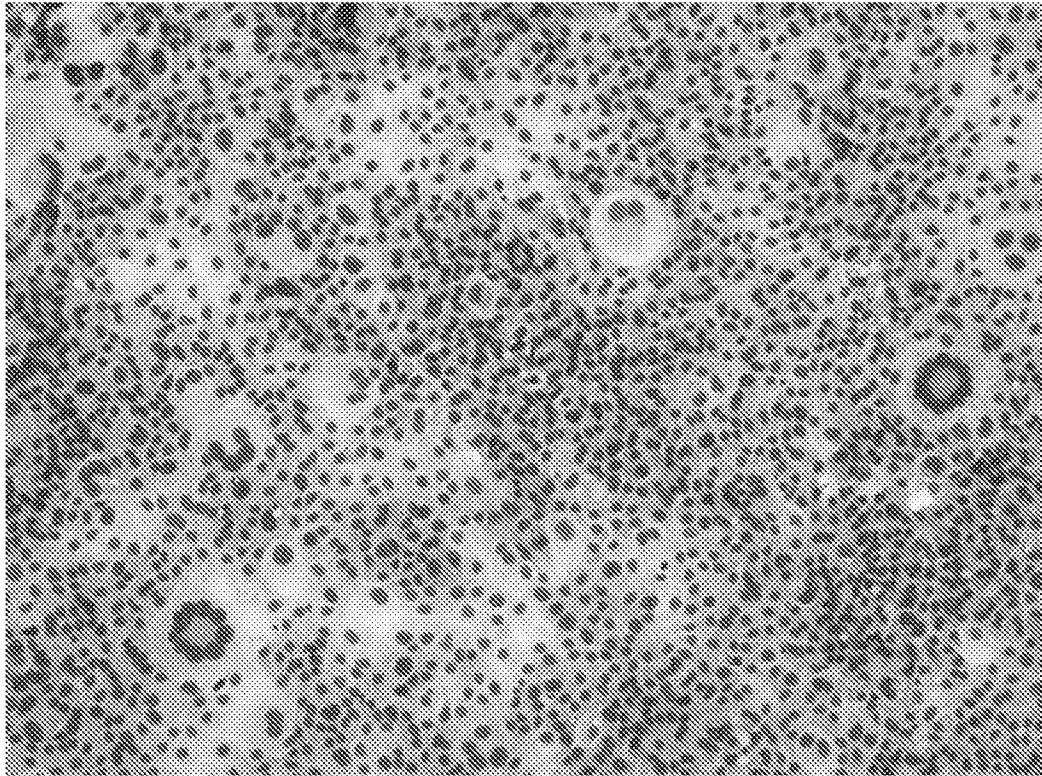
(C)



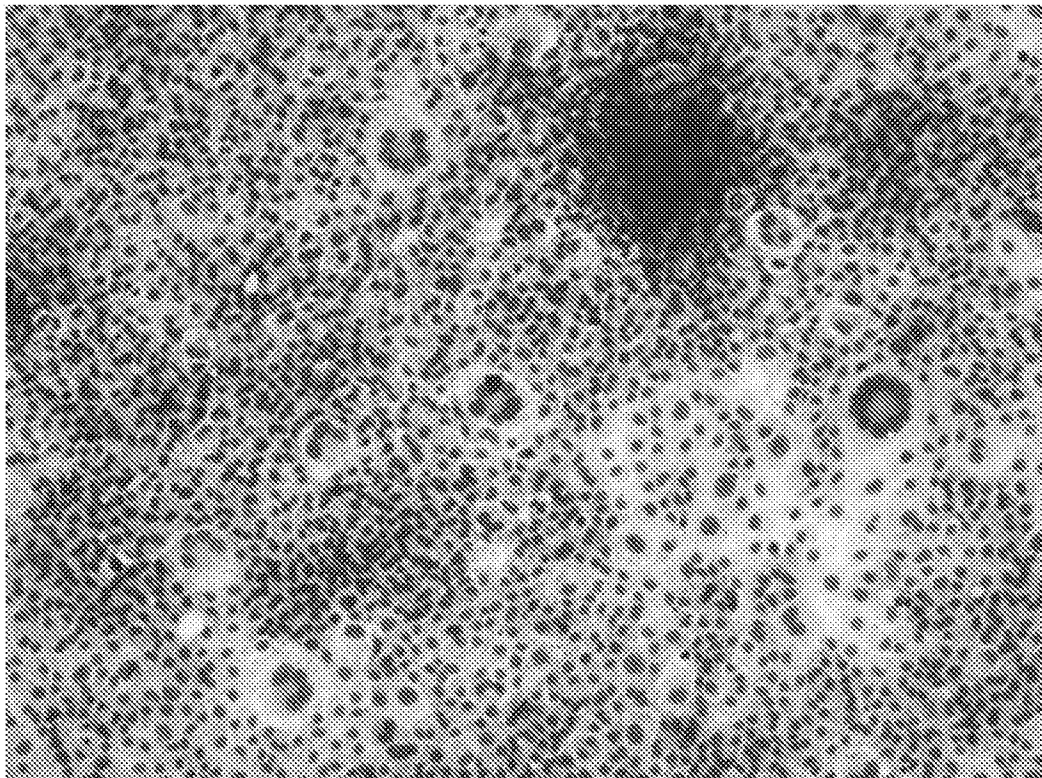
(D)



[図9]

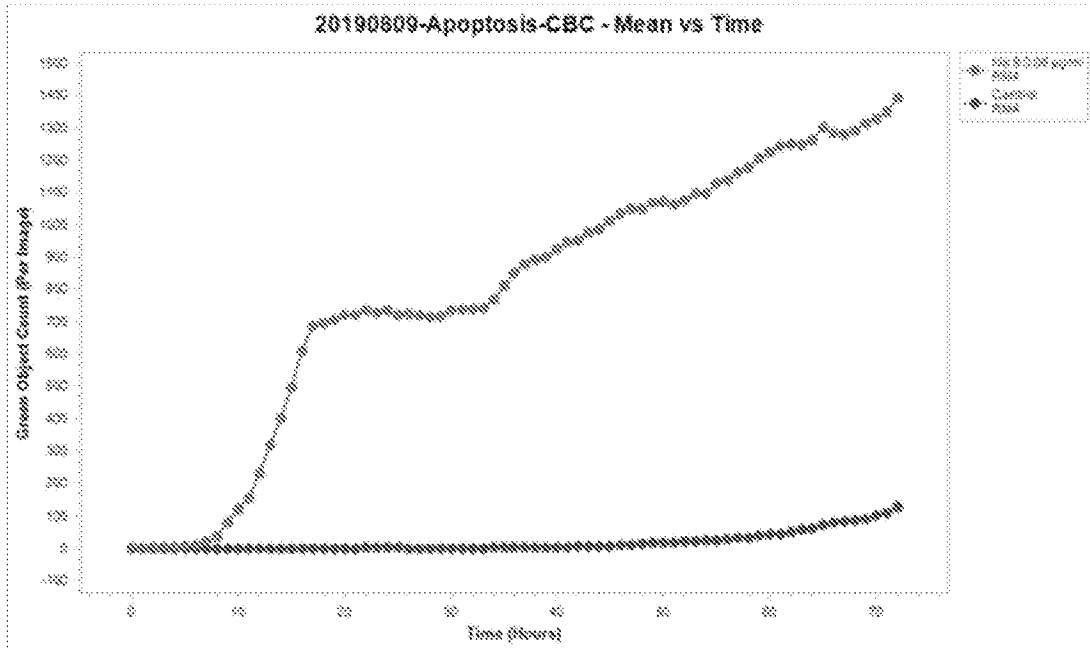


[図10]

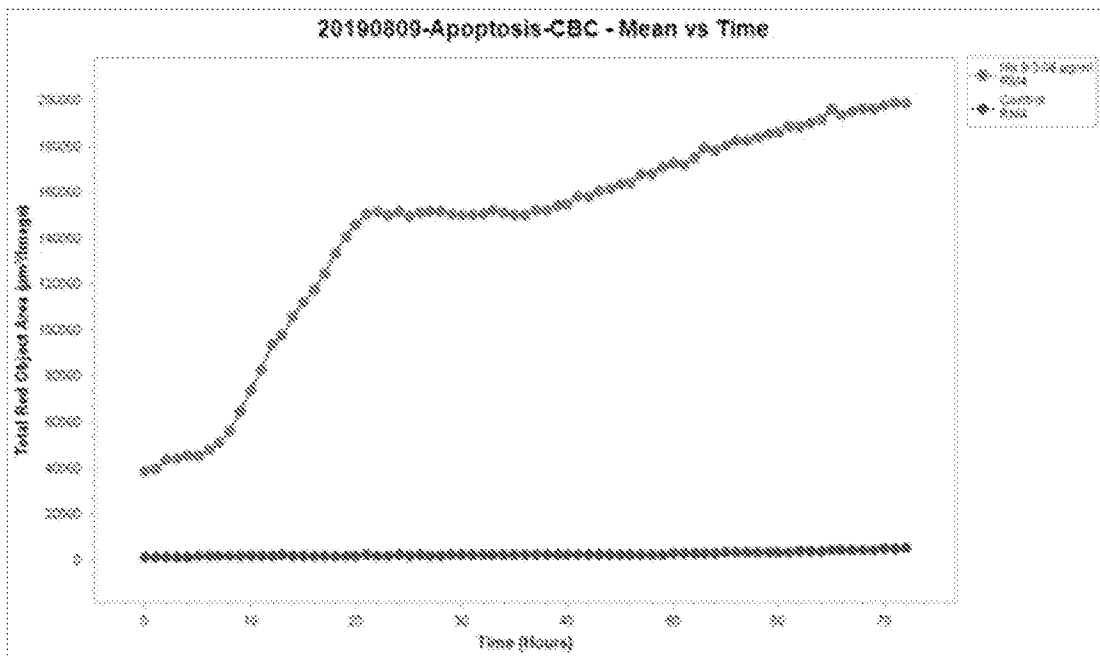


[11]

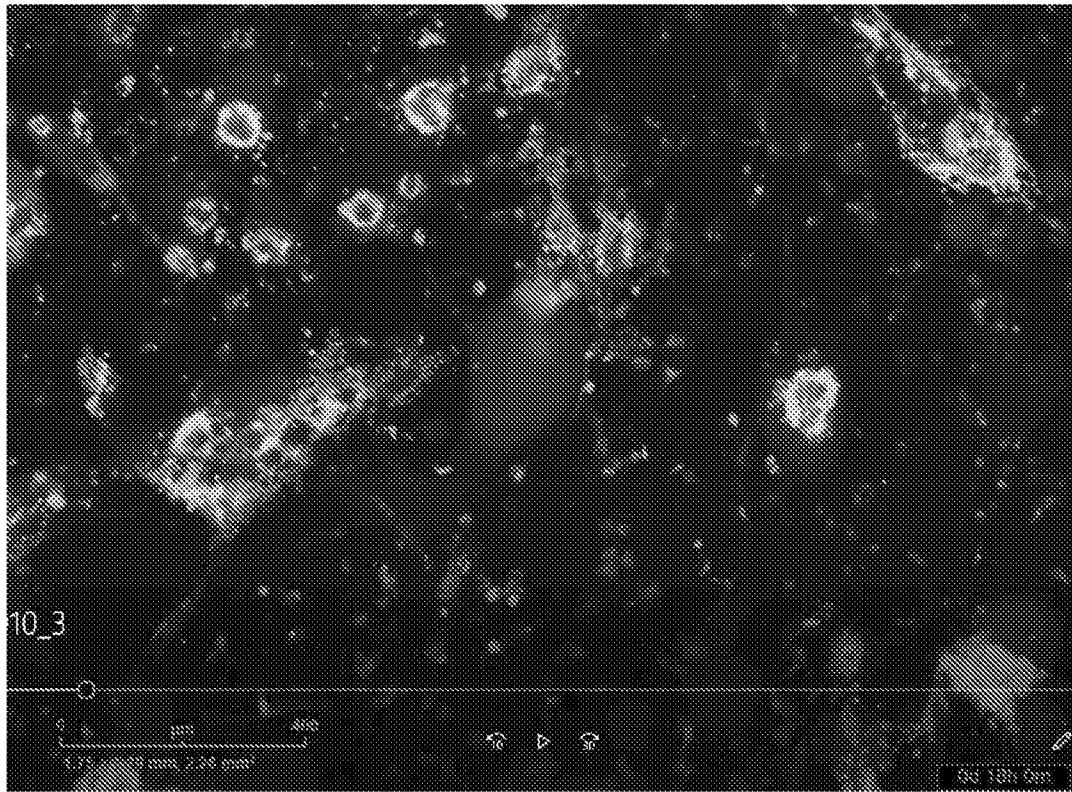
(A) Caspase3/7-Green



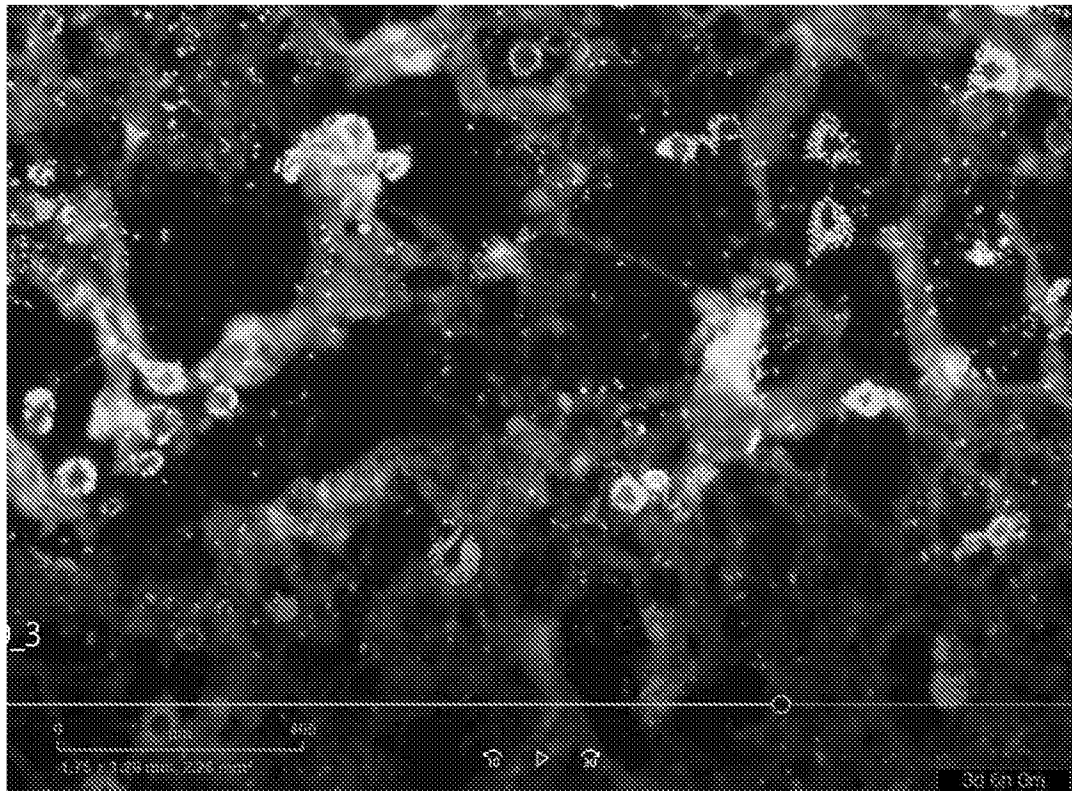
(B) AnnexinV-Red



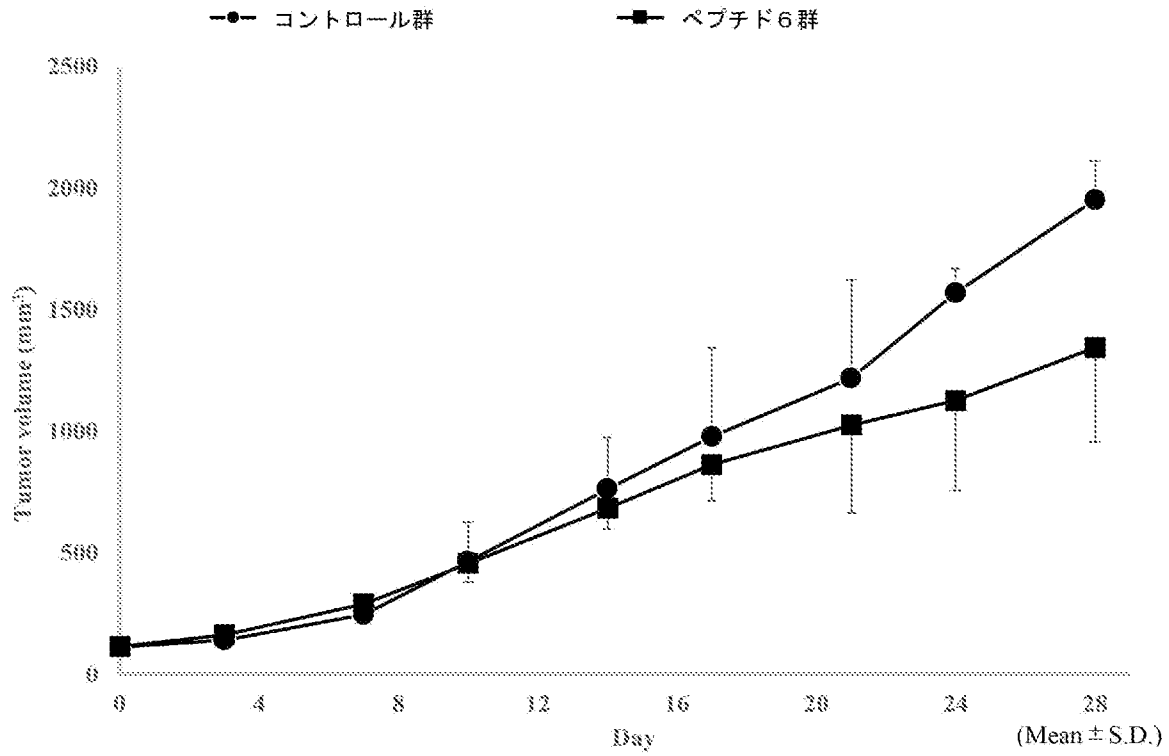
[図12]



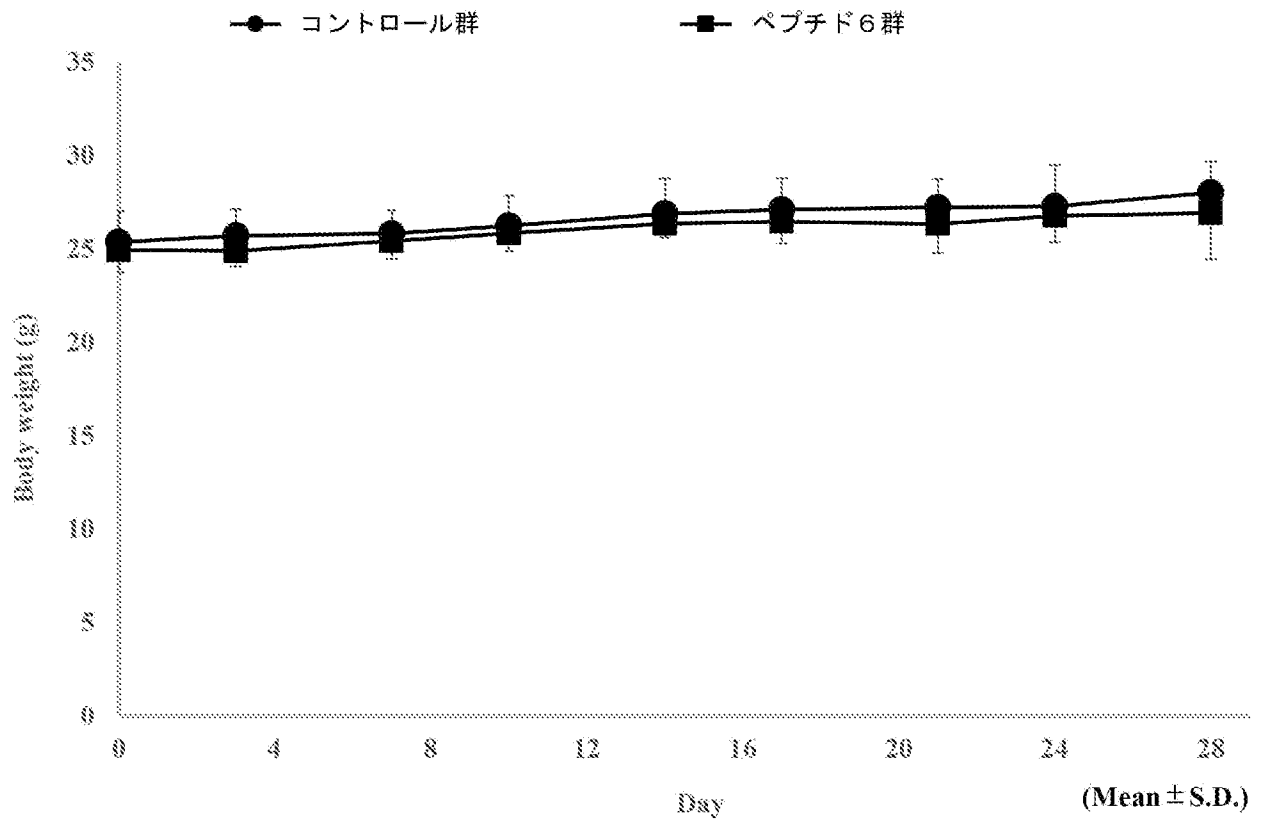
[図13]



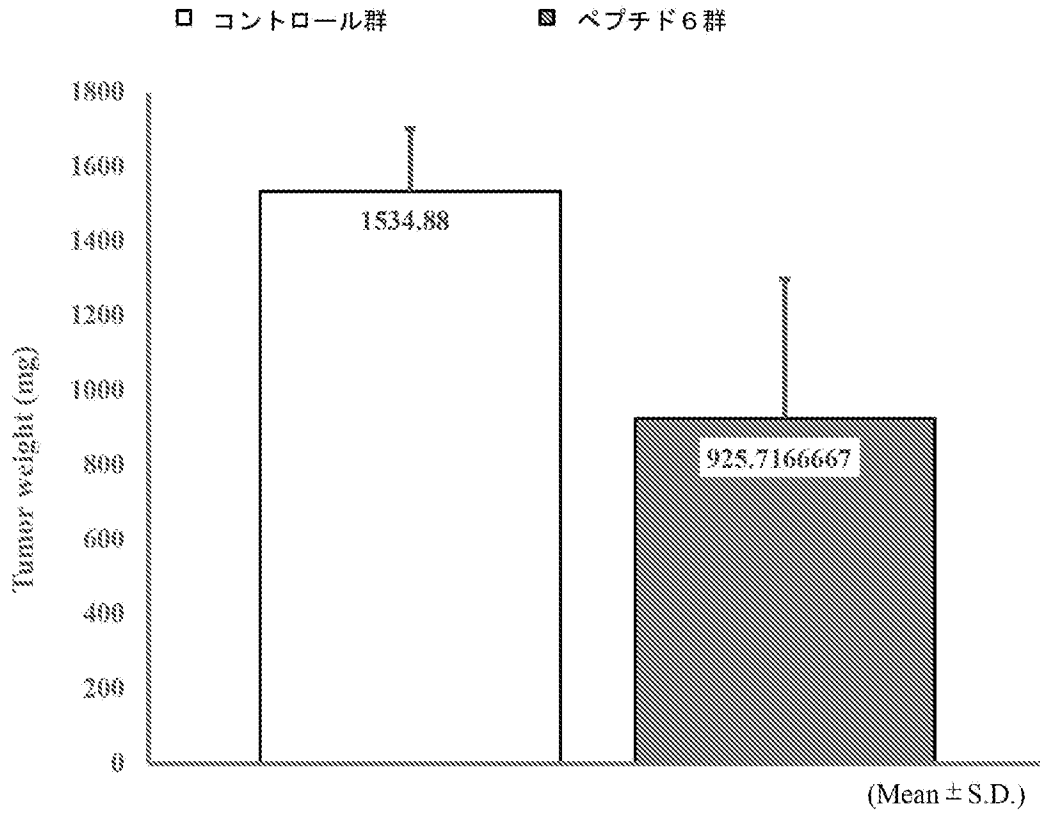
[図14]



[図15]



[図16]

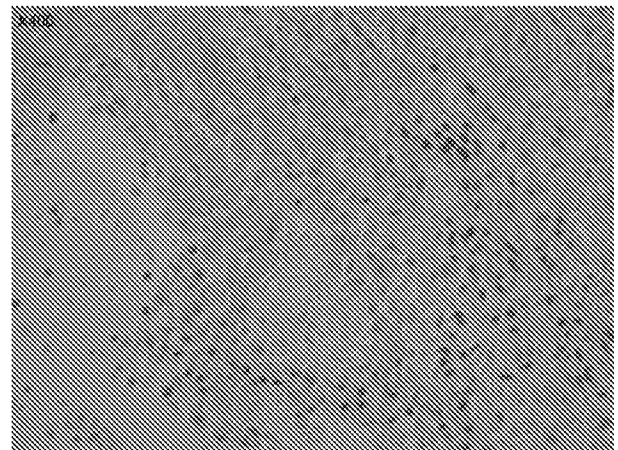


[図17]

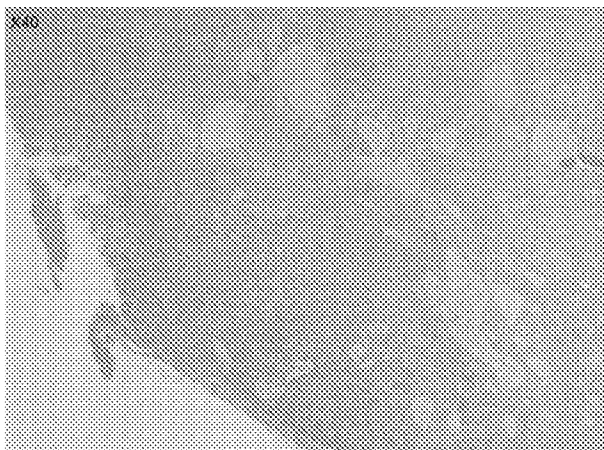
(A)



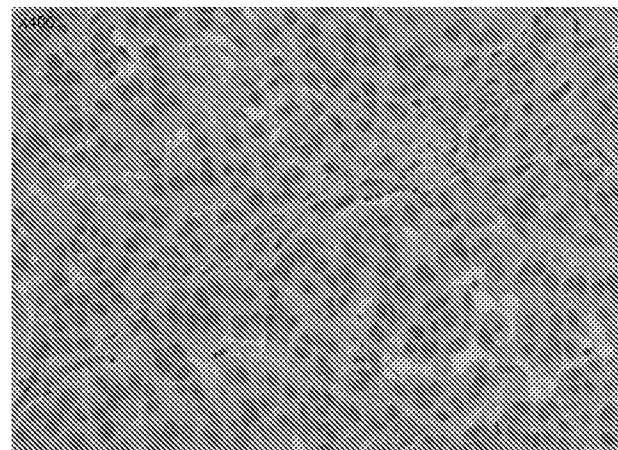
(B)



(C)



(D)



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2020/035491

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61P 35/00(2006.01)i; C07K 4/00(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; C07K 14/00(2006.01)i; C07K 16/44(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/06(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 38/08(2019.01)i  
 FI: C12N15/06 ZNA; C07K7/06; C12N15/63 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C07K16/44; C12N15/11 Z; A61K38/08; A61P35/00; C07K4/00; C07K14/00

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)

A61P35/00; C07K4/00; C07K7/06; C07K14/00; C07K16/44; C12N5/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/06; C12N15/11; C12N15/63; A61K38/08

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), CAplus/REGISTRY (STN), SwissProt/CeneSeci

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 57-68790 A (TSUCHIDA, Hidetoshi) 27 April 1982 (1982-04-27) entire text, in particular, see claims 8, 9, page 4, upper left column, line 19 to upper right column, line 9, lower right column, lines 6-9, page 5, lower right column, bottom paragraph to page 6, upper left column, table 3, page 6, upper right column, bottom paragraph to lower left column, table 5	1, 7, 11
L A	(Documents cited to show BSA has "cell fusion activity" described in other literature )	3-6, 8-10, 12 2

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

"I" 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  
12 October 2020 (12.10.2020)

Date of mailing of the international search report  
02 November 2020 (02.11.2020)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/035491

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2008-523829 A (NOVOZYMES A/S) 10 July 2008 (2008-07-10) entire text, in particular, see claims 2, 3, paragraphs [0023], [0024], [0027], sequence tables, SEQ ID NO: 1, 2	1, 3-5, 11 2, 6-10, 12
X A	MAJOREK, K. A. et al., "Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins", Mol. Immunol., 2012, vol. 52, pp. 174-182, entire text, in particular, page 174, abstract, page 175, left column 2.1, page 175, right column 3.1, page 176, fig. 1, page 179, left column, lines 6-8, page 180, left column, lines 17-20, page 181, right column, column "references"	1, 6, 11 2-5, 7-10, 12
X A	UENO, H. et al., "Epitope Mapping of Bovine Serum Albumin Using Monoclonal Antibodies Coupled with a Photoreactive Crosslinker", J. Biochem., 1994, vol. 115, pp. 1119-1127, entire text, in particular, see page 1119, abstract, page 1119, right column, column "materials and methods", lines 7-8	1, 6, 11 2-5, 7-10, 12
X A	HOOGENBOEZEM, E. N., DUVALL, C. L., "Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies", Adv. Drug Deliv. Rev., 2018, vol. 130, pp. 73-89, entire text, in particular, see page 73, abstract, page 77, right column, lines 5-8, page 79, right column, bottom paragraph to page 81, left column, line 7, page 81, left column, column 2.2.3, lines 1-3, page 81, left column, column 2.2.3, paragraph [0002], lines 1-24, page 88, right column, column "references", paragraph [0104]	1, 3-5, 8-12 2, 6, 7
X A	ZHAO, D. et al., "Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles", Int. J. Nanomedicine, 2010, vol. 5, pp. 669-677, entire text, in particular, see page 670, right column, paragraph [0002], lines 1-3	1, 11 2-10, 12
X A	ALI, S. S. et al., "Phytophthora megakarya and Phytophthora palmivora, Closely Related Causal Agents of Cacao Black Pod Rot, Underwent Increases in Genome Sizes and Gene Numbers by Different Mechanisms", Genome Biol. Evol., 2017, vol. 9, no. 3, pp. 536-557 (pp. 1-22) entire text, in particular, see page 1, abstract, page 2, right column, column "materials and methods", paragraph [0001], page 3, left column, column "genome sequencing and assembly"	1, 3-5 2, 6-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/035491

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
L A	"Phytophthora palmivora var. palmivora strain sbr112.9 scaffold_20380, whole genome shotgun sequence", GenBank accession no. NCKW01020374, 02 February 2018, [retrieved on 12 October 2020], Retrieved from the Internet, URL, <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NCKW01020374.1?report=girevhist">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NCKW01020374.1?report=girevhist</a> , entire text (References cited to indicate the amino acid sequences encoded by the genes described in the literature of ALI, S.S. et al.)	1, 3-5 2, 6-12
P, X P, A	VAN DE SANDE, L. et al., "Albumin-based cancer therapeutics for intraperitoneal drug delivery: a review", Drug Delivery, 20 December 2019, vol. 27, no. 1, pp. 40-53, entire text, in particular, see page 40, abstract, page 43, right column, column 4.2, paragraph [0002], lines 7-12, page 46, right column, column 4.3.3	1, 8-12 2-7
A	JP 2007-523829 A (SALAMA, Zoser, B.) 23 August 2007 (2007-08-23) entire text, in particular, see claims 1, 2, 52, 53, paragraphs [0012], [0025]	1-12
A	高橋忠伸ら, ヒトパラインフルエンザ 1 型ウイルスフュージョン糖タンパク質の 170 番目のアミノ酸変異は多核細胞形成とカスパーゼ 3 依存性アポトーシスを誘導する, 生化学, 2011, vol. 83, no. 8, p. 784, entire text, non-official translation (TAKAHASHI, Tadanobu et al., "The 170th amino acid mutation in fusion glycoproteins of human parainfluenza virus type 1 induces multinucleated cell formation and caspase 3-dependent apoptosis", SEIKAGAKU)	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/JP2020/035491

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 57-68790 A	27 Apr. 1982	(Family: none)	
JP 2008-523829 A	10 Jul. 2008	WO 2006/066595 A2 entire text, in particular, see claims 2, 3, page 6, lines 11-12, 20-21, page 7, lines 1-3, sequence listing, SEQ ID NO. 1, 2	
JP 2007-523829 A	23 Aug. 2007	EP 2169067 A1 US 2009/0280534 A1 WO 2005/058816 A1 entire text EP 1711462 A1 US 2008/0176923 A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61P 35/00(2006.01)i; C07K 4/00(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; C07K 14/00(2006.01)i;                  C07K 16/44(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i;                  C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/06(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i;                  A61K 38/08(2019.01)i                  FI: C12N15/06 ZNA; C07K7/06; C12N15/63 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C07K16/44;                  C12N15/11 Z; A61K38/08; A61P35/00; C07K4/00; C07K14/00</p>																				
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61P35/00; C07K4/00; C07K7/06; C07K14/00; C07K16/44; C12N5/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21;                  C12N15/06; C12N15/11; C12N15/63; A61K38/08</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table> <p>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）</p> <p>CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), CAplus/REGISTRY (STN), SwissProt/GeneSeq</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年										
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年																			
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年																			
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年																			
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 57-68790 A (土田英俊) 27.04.1982 (1982-04-27) 全文、特に、請求項8及び9、並びに第4頁左上欄19行-右上欄9行及び右下欄6-9 行、第5頁右下欄最終段落-第6頁左上欄表3、及び第6頁右上欄最終段落-左下欄表 5参照</td> <td>1,7,11</td> </tr> <tr> <td>L</td> <td>(他の文献に記載されたBSAが「細胞融合活性」を有することを示すために引用さ れた文献)</td> <td>3-6,8-10,12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2008-523829 A (ノボザイムス アクティールズカブ) 10.07.2008 (2008-07- 10) 全文、特に、請求項2及び3、段落[0023]、[0024]及び[0027]、並びに配列表の配 列番号1及び2参照</td> <td>1,3-5,11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>2,6-10,12</td> </tr> </tbody> </table>			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	X	JP 57-68790 A (土田英俊) 27.04.1982 (1982-04-27) 全文、特に、請求項8及び9、並びに第4頁左上欄19行-右上欄9行及び右下欄6-9 行、第5頁右下欄最終段落-第6頁左上欄表3、及び第6頁右上欄最終段落-左下欄表 5参照	1,7,11	L	(他の文献に記載されたBSAが「細胞融合活性」を有することを示すために引用さ れた文献)	3-6,8-10,12	A		2	X	JP 2008-523829 A (ノボザイムス アクティールズカブ) 10.07.2008 (2008-07- 10) 全文、特に、請求項2及び3、段落[0023]、[0024]及び[0027]、並びに配列表の配 列番号1及び2参照	1,3-5,11	A		2,6-10,12
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																		
X	JP 57-68790 A (土田英俊) 27.04.1982 (1982-04-27) 全文、特に、請求項8及び9、並びに第4頁左上欄19行-右上欄9行及び右下欄6-9 行、第5頁右下欄最終段落-第6頁左上欄表3、及び第6頁右上欄最終段落-左下欄表 5参照	1,7,11																		
L	(他の文献に記載されたBSAが「細胞融合活性」を有することを示すために引用さ れた文献)	3-6,8-10,12																		
A		2																		
X	JP 2008-523829 A (ノボザイムス アクティールズカブ) 10.07.2008 (2008-07- 10) 全文、特に、請求項2及び3、段落[0023]、[0024]及び[0027]、並びに配列表の配 列番号1及び2参照	1,3-5,11																		
A		2,6-10,12																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																				
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“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							
* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																			
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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																			
“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	“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																			
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献																			
“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																				
<p>国際調査を完了した日</p> <p>12.10.2020</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>02.11.2020</p>																			
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>佐藤 巖 4B 3334</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>																			

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
X A	MAJOREK, K.A. et al., Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins, Mol. Immunol., 2012, Vol.52, pp.174-182 全文、特に、第174頁ABSTRACT、第175頁左列2.1欄、第175頁右列3.1欄、及び第176頁Fig.1、並びに第179頁左列6-8行、第180頁左列17-20行、及び第181頁右列References欄	1,6,11  2-5,7-10,12
X A	UENO, H. et al., Epitope Mapping of Bovine Serum Albumin Using Monoclonal Antibodies Coupled with a Photoreactive Crosslinker, J. Biochem., 1994, Vol.115, pp.1119-1127 全文、特に、第1119頁要約、及び第1119頁右列MATERIALS AND METHODS欄第7-8行参照	1,6,11  2-5,7-10,12
X A	HOOGENBOEZEM, E.N. and DUVAL, C.L., Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies, Adv. Drug Deliv. Rev., 2018, Vol.130, pp.73-89 全文、特に、第73頁ABSTRACT、第77頁右列5-8行、第79頁右列最終段落-第81頁左列7行、第81頁左列2.2.3欄1-3行、及び第81頁左列2.2.3欄第2段落1-24行、並びに第88頁右列References欄[104]参照	1,3-5,8-12  2,6,7
X A	ZHAO, D. et al., Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles, Int. J. Nanomedicine, 2010, Vol.5, pp.669-677 全文、特に、第670頁右列第2段落1-3行参照	1,11  2-10,12
X A	ALI, S.S. et al., Phytophthora megakarya and Phytophthora palmivora, Closely Related Causal Agents of Cacao Black Pod Rot, Underwent Increases in Genome Sizes and Gene Numbers by Different Mechanisms, Genome Biol. Evol., 2017, Vol.9, No.3, pp.536-557(pp.1-22) 全文、特に、第1頁Abstract、第2頁右列Materials and Methods欄第1段落、及び第3頁左列Genome Sequencing and Assembly欄参照	1,3-5  2,6-12
L A	Phytophthora palmivora var. palmivora strain sbr112.9 scaffold_20380, whole genome shotgun sequence, GenBank accession no. NCKW01020374, 2018.02.02, [retrieved on 2020-10-12], Retrieved from the Internet, URL, <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NCKW01020374.1?report=girevhist">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NCKW01020374.1?report=girevhist</a> 全文(ALI, S.S. et al.の文献に記載された遺伝子にコードされているアミノ酸配列を示すために引用された文献)	1,3-5  2,6-12
P, X  P, A	VAN DE SANDE, L. et al., Albumin-based cancer therapeutics for intraperitoneal drug delivery: a review, Drug Delivery, 2019.12.20, Vol.27, No.1, pp.40-53 全文、特に、第40頁ABSTRACT、第43頁右列4.2欄第2段落7-12行、及び第46頁右列4.3.3欄参照	1,8-12  2-7
A	JP 2007-523829 A (サラマ, ゴーセル, ベー) 23.08.2007 (2007-08-23) 全文、特に、請求項1、2、52及び53、並びに段落[0012]、及び[0025]参照	1-12
A	高橋忠伸ら, ヒトパラインフルエンザ1型ウイルスフュージョン糖タンパク質の170番目のアミノ酸変異は多核細胞形成とカスパーゼ3依存性アポトーシスを誘導する, 生化学, 2011, Vol.83, No.8, p.784 全文	1-12

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号  
 PCT/JP2020/035491

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 57-68790 A	27.04.1982	(ファミリーなし)	
JP 2008-523829 A	10.07.2008	WO 2006/066595 A2 全文、特に、請求項2及び 3、第6頁11-12行及び20-21 行、第7頁1-3行、並びに SEQUENCE LISTING, SEQ ID NO.1 and 2参照 EP 2169067 A1 US 2009/0280534 A1	
JP 2007-523829 A	23.08.2007	WO 2005/058816 A1 全文 EP 1711462 A1 US 2008/0176923 A1	