【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】令和4年11月21日(2022.11.21)

【国際公開番号】WO2020/111167
【出願番号】特願2020-557810(P2020-557810)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ 15/12(2006.01)
Ｃ０７Ｋ 14/47(2006.01)
Ｃ０７Ｋ 7/06(2006.01)
Ｃ０７Ｋ 7/08(2006.01)
Ａ６１Ｐ 35/00(2006.01)
Ａ６１Ｋ 38/16(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ 15/12
Ｃ０７Ｋ 14/47 ＺＮＡ
Ｃ０７Ｋ 7/06
Ｃ０７Ｋ 7/08
Ａ６１Ｐ 35/00
Ａ６１Ｋ 38/16

【手続補正書】
【提出日】令和4年11月10日(2022.11.10)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
PHB2ポリペプチドにおけるBIG3ポリペプチドとの結合部位を含み、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害するペプチド。
【請求項２】
以下の（a）～（f）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む請求項１に記載のペプチド：
（a）配列番号25、123、124、125、1、36～41、106～109および114～118からなる群より選択されるアミノ酸配列；
（b）配列番号25、123、124、125、1、36～41、106～109および114～118からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているアミノ酸配列；
（c）配列番号5、26、47～53、110～113、119～122および126～128からなる群より選択されるアミノ酸配列；
（d）配列番号5、26、47～53、110～113、119～122および126～128からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているアミノ酸配列；
（e）配列番号82～83からなる群より選択されるアミノ酸配列；ならびに
（f）配列番号82～83からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているアミノ酸配列。
【請求項３】
以下の（a'）～（b'）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項2に記載

のペプチド：
（a'）配列番号25、123、124、125、1、36～41、106～109および114～118からなる群より選択されるアミノ酸配列において、配列番号28のアミノ酸配列における15番目のグリシン及び18番目のグリシンに対応する位置以外の1個、2個、または数個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列；ならびに
（b'）配列番号5、26、47～53、110～113、119～122および126～128からなる群より選択されるアミノ酸配列において、配列番号28のアミノ酸配列における82番目のアスパラギン酸に対応する位置以外の1個、2個、または数個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列。
【請求項４】
80残基以下のアミノ酸残基からなる、請求項1～3のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項５】
25残基以下のアミノ酸残基からなる、請求項1～4のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項６】
配列番号 25、123、124、125、1、5、26、36～41、47～53、82、83、106～109、110～122および126～128からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、請求項1～5のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項７】
細胞膜透過性物質により修飾されている、請求項1～6のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項８】
環状型である、請求項1～7のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項９】
架橋型である、請求項1～8のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項１０】
以下の（i）及び（ii）のいずれか一方又は両方の性質を有する、請求項1～9のいずれか一項に記載のペプチド：
（i）BIG3陽性細胞の細胞増殖を抑制する；及び
（ii）BIG3陽性細胞において、PHB2ポリペプチドのセリン残基のリン酸化を促進する。
【請求項１１】
請求項1～10のいずれか一項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１２】
請求項1～10のいずれか一項に記載の1種もしくは複数種のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、および該ペプチドの薬学的に許容される塩からなる群より選択される少なくとも１つの成分、ならびに薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
【請求項１３】
配列番号28のアミノ酸配列における11～21番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチド、配列番号28のアミノ酸配列における44～57番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチド、ならびに配列番号28のアミノ酸配列における76～88番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドのうちのいずれか１つまたは組み合わせを含む、請求項12に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
がん細胞の増殖を抑制するため、又はがんを治療及び／若しくは予防するための、請求項12又は13に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
がんがBIG3陽性のがんである、請求項14に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
がんが乳がんである、請求項14又は15に記載の医薬組成物。
【請求項１７】

がんがエストロゲン受容体陽性のがんである、請求項14～16のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１８】
請求項1～10のいずれか一項に記載の1種もしくは複数種のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、および該ペプチドの薬学的に許容される塩からなる群より選択される成分の、がんの治療及び予防のいずれか又は両方のための医薬組成物の製造における使用。
【請求項１９】
前記ペプチドが、配列番号28のアミノ酸配列における11～21番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチド、配列番号28のアミノ酸配列における44～57番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチド、ならびに配列番号28のアミノ酸配列における76～88番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドのうちのいずれか１つまたは組み合わせである、請求項18に記載の使用。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００８】
本発明者らは、in silico解析を通じて予測されたPHB2アミノ酸配列上のタンパク質相互作用候補領域のデータに基づいて、複数のPHB2由来ペプチド(PHB2ペプチド)を設計し、それらを用いて細胞増殖抑制効果を指標とした相互作用領域の同定のスクリーニングを進めた。その結果、PHB2ペプチドNo.1（11-RLPAGPRGMGTA-22（配列番号1））とPHB2ペプチドNo.5（76-QYPIIYDIRARPRKI-90（配列番号5））において、それぞれ約50％の増殖抑制効果を認め、特にPHB2ペプチドNo.1およびNo.5の併用にて、ERAPと同様の90％を超える増殖抑制効果、BIG3-PHB2相互作用阻害効果を認めることに成功した。さらに、これらの効果は、PHB2ペプチドNo.1およびNo.5の周辺の配列からなるペプチドや、PHB2ペプチドNo.1およびNo.5における種々の位置のアミノ酸残基を置換したペプチドについても認められた。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１４】
【図１－１】エストロゲン依存性細胞増殖を抑制するPHB2配列由来ペプチドのスクリーニングを示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7を10μMの各PHB2配列由来ペプチドで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激し、24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。グラフの下にはヒトPHB2タンパク質の全長配列を示しており、下線を付した部分の配列のC末端にアルギニン残基を8個付加した合成ペプチドをアッセイに用いた。また、太字はin silico解析でBIG3との相互作用に関与することが示唆されたアミノ酸を、四角で囲んだ「S」はPHB2のリン酸化部位を、破線はBIG3との結合が証明されている領域を表している。
【図１－２】（B, C）11-22aa（B）および76-90aa（C）を中心としたPHB2配列由来のペプチド（配列番号1、34～43、5、44～55）の各10μMでMCF-7を処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。グラフの左には、アッセイに用いた合成ペプチドに含まれるPHB2由来配列の位置を示している。
【図１－３】（D）11-22aaのPHB2配列由来ペプチドと76-90aaを中心とした各PHB

2配列由来のペプチドの各10μMを併用し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。（E）76-90aaのPHB2配列由来ペプチドと11-22aaを中心とした各PHB2配列由来のペプチドの各10μMを併用し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【図２】エストロゲン依存性増殖の抑制に対するPHB2ペプチド11-22aaと76-90aaの併用効果を示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7を各10μMのERAP（ポジティブ・コントロール）、PHB2ペプチド11-22aa、76-90aa、86-100aa（ネガティブ・コントロール）、および11-22aaと76-90aaの併用、76-90aaと86-100aaの併用で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。（B）PHB2ペプチド11-22aa、76-90aa、およびその併用がMCF-7のBIG3とPHB2の相互作用に対する阻害効果をウェスタンブロットにより評価した。MCF-7を各PHB2ペプチドの20μMと50μMで24時間処理した後、細胞を溶解し、抗BIG3抗体を用いて免疫沈降し、図に示した抗体を用いたイムノブロット解析を行った。結合阻害率は非処理細胞でのPHB2のバンド面積を100としたときの比率で表した。（C）ヒト乳がん細胞株MCF-7を各10μMのERAP、PHB2ペプチド11-22aa、76-90aa、86-100aa、および11-22aaと76-90aaの併用、76-90aaと86-100aaの併用で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後のPHB2（Ser39）のリン酸化をウェスタンブロットにより評価した。リン酸化強度はエストロゲン存在下でERAP処理したときのリン酸化バンドの面積を1.0としたときの比率で表した。

【図３】PHB2ペプチド11-90aaがエストロゲン依存性増殖とBIG3とPHB2の相互作用に及ぼす影響を示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7をPHB2ペプチド11-90aa（10，20，50μM）、11-22aa（50μM）、76-90aa（50μM）、および11-22aaと76-90aaの併用で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。（B）PHB2ペプチド11-90aa、および10μM ERAP（ポジティブ・コントロール）がMCF-7のBIG3とPHB2の相互作用に対する阻害効果をウェスタンブロットにより評価した。（C）ヒト乳がん細胞株MCF-7をPHB2ペプチド11-90aa（20，50，100μM）および10μM ERAPで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後のPHB2（Ser39）のリン酸化をウェスタンブロットにより評価した。リン酸化強度は未処理のリン酸化バンド面積を1.0としたときの比率で表した。

【図４】分岐型および環状型PHB2ペプチドの模式図を表す。（A）直鎖結合型PHB2ペプチド。（B）分岐型PHB2ペプチド。（C）環状型PHB2ペプチド。

【図５】分岐型および環状型PHB2ペプチドによるエストロゲン依存性増殖の抑制効果を示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7を各10μMの直鎖型ペプチド11-22aa、76-90aa、11-22aaと76-90aaの併用、直鎖結合型、分岐結合型、および環状型11-21aa、環状型76-88aa、環状型ペプチドの併用で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。（B）直鎖型11-22aa、直鎖型76-90aa、直鎖結合型、分岐結合型、および環状型11-21aa、環状型76-88aaペプチドは、正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に影響を及ぼさないことを示したMTTアッセイの結果を示す。（C）ヒト乳がん細胞株MCF-7を各10μMの直鎖型ペプチド11-22aa、76-90aa、11-22aaと76-90aaの併用、直鎖結合型、分岐結合型、および環状型11-21aa、環状型76-88aa、環状型ペプチドの併用で処理したときのBIG3とPHB2の相互作用に対する阻害効果をウェスタンブロットにより評価した。

【図６】エストロゲン依存性増殖の抑制に対する環状型PHB2ペプチドの併用効果を示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7を直鎖型11-22aaおよび環状型11-21aa（左図）、または直鎖型76-90aaおよび環状型76-88aa（右図）で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間ごとに96時間までMTTアッセイで阻害効果を評価した。

（B）環状型11-21aa、環状型76-88aaペプチドは、正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に影響を及ぼさないことを示したMTTアッセイの結果を示す。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【図７】エストロゲン依存性増殖に対する環状型PHB2ペプチドの濃度依存的な抑制効果を示す。（A）ヒト乳がん細胞株MCF-7を環状型11-21aaおよび環状型76-88aaを各0.1，0.5，1，2.5，5，10，20μMで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。（B）ヒト乳がん細胞株MCF-7を環状型11-21aa（４μM）、環状型76-88aa（２μM）、およびその併用で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間ごとに96時間までMTTアッセイで阻害効果を評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。（C）環状型11-21aa（４μM）、環状型76-88aa（２μM）、およびその併用は、正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に影響を及ぼさないことを示したMTTアッセイの結果を示す。

【図８－１】エストロゲン依存性増殖の抑制に重要なPHB2のアミノ酸を示す。（A）No.1（11-22aa）およびNo.5（76-90aa）のアラニン変異PHB2ペプチドを表す。（B、C）ヒト乳がん細胞株MCF-7を10μMの各PHB2配列由来のアラニン変異ペプチドで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激し、24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【図８－２】（D）No.2（42-50aa）とNo.3（38-50aa）のPHB2ペプチドに51-57aaを付加したPHB2ペプチドを表す。（E）（D）のPHB2配列由来ペプチドの各10μMを添加し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【図９】トリプルネガティブ乳がん細胞におけるPHB2ペプチド11-22aa（A）と76-90aa（B）の細胞増殖抑制効果を示す。乳がん細胞株MDA-MB-231に対する細胞を各ペプチドは、20μMから3倍系列希釈を行い計11点濃度で添加した。ペプチド添加から96時間後に生細胞数を測定し、ペプチド未添加の陰性対照細胞を基準に相対値を算出しグラフにした。データは、3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。(C)PHB2ペプチド11-22aaと76-90aaのMDA-MB-231の細胞増殖に対する併用効果を調べた結果を示す。ペプチドをIC50値で単独および混合して細胞に添加し、96時間後に生細胞数を測定し、陰性対照のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）添加細胞を基準に相対値を算出しグラフを作成した。データは、3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【図１０－１】エストロゲン依存性増殖に対する架橋型PHB2ペプチドの抑制効果を示す。（A）架橋形式の模式図を表す。（B）11-21aaおよび76-88aaのPHB2ペプチドの両端にシステインを付加して架橋したPHB2ペプチドを示す（配列番号106～108、110～112、115～117、119～121）。配列番号109、113、114、118、122のPHB2ペプチドは両端にアラニンを付加して非架橋型にした。配列番号106～114のPHB2ペプチドはC末端にポリアルギニンを付加した。また、11-21aaのPHB2ペプチドは合成中の酸化を回避するため、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）に記載のアミノ酸配列における19番目のメチオニンをノルロイシン（Nle）に置換した。

【図１０－２】（C）ヒト乳癌細胞株MCF-7を11-21aaの架橋型PHB2ペプチド（左図）、または76-88aaの架橋型PHB2ペプチド（右図）で処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【図１１】エストロゲン依存性増殖に対する環状型PHB2ペプチドの抑制効果を示す。（A）環状型11-21aa（配列番号25）および環状型76-88aa（配列番号26）のPHB2ペプチドの架橋形式を表す。配列番号125と128の環状型PHB2ペプチドは、11-21aaおよび76-88aaのPHB2ペプチドの両端にアラニンを付加して非架橋型の環状型ペプチドにした。すべての環状型PHB2ペプチドはC末端に非天然アミノ酸及び連続する複数のアルギニン残基を付加した。また、11-21aaの環状型PHB2ペプチドは合成中の酸化を回避するため、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）に記載のアミノ酸配列における19

番目のメチオニンをノルロイシン（Nle）に置換した。（B）ヒト乳癌細胞株MCF-7を環状型PHB2ペプチドで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【図１２】PHB2ペプチド11-22aaの改変がエストロゲン依存性増殖に及ぼす影響を示す。（A）配列番号1（11-22aa）のPHB2ペプチドについて、配列番号28（PHB2ポリペプチド全長）に記載のアミノ酸配列における15番目と18番目のグリシンをD型アラニンおよびD型ロイシンに置換したPHB2ペプチドを表す。（B）ヒト乳癌細胞株MCF-7を11-22aaの改変PHB2ペプチドで処理し、その後直ちに10nMエストロゲンで刺激して24時間後の細胞数をMTTアッセイで評価した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【図１３】架橋型PHB2ペプチドが正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に及ぼす影響を示す。架橋型PHB2ペプチドおよび環状型PHB2ペプチドは、正常乳腺上皮細胞MCF-10Aの増殖に影響を及ぼさないことを示したMTTアッセイの結果を示す。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差を表す。

【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３３】

本発明のペプチドは、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合を阻害する活性に加えて、以下の（i）及び（ii）のいずれか又は両方の性質を有することが望ましい：

（i）BIG3ポリペプチドを発現しているエストロゲン受容体陽性細胞において、PHB2ポリペプチドの核内移行を促進する；及び

（ii）BIG3ポリペプチドを発現しているエストロゲン受容体陽性細胞において、核内及び／又は細胞膜に存在するエストロゲン受容体とPHB2ポリペプチドとの結合を促進する。

上記（i）及び（ii）のいずれか又は両方の性質を有することにより、本発明のペプチドは、BIG3発現細胞において、エストロゲン受容体の活性化を抑制し、その結果としてエストロゲン受容体陽性細胞の細胞増殖の抑制を導く。PHB2ペプチドの前記性質(i)および(ii)は、いずれも、当業者に公知の方法に従って評価することができる。

【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３９】

細胞膜透過性物質の例としては、例えば、膜融合性リポソーム、細胞膜透過性ペプチドなどが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、膜融合性リポソームは細胞膜と融合して、その内容物を細胞内に放出する。膜融合性リポソームは、例えば、膜融合性を有する物質でリポソーム表面を修飾することにより調製することができる。膜融合性リポソームの例としては、例えば、pH感受性リポソーム（Yuba E, et al., J. Control. Release, 149, 72-80 (2011)）、センダイウィルス膜融合性リポソーム（WO97/016171）、細胞膜透過性ペプチドで修飾されたリポソームなどが挙げられる。本発明のペプチドは、細胞内に効率的に導入するために、膜融合性リポソーム内に封入されてもよい。本発明では、膜融合性リポソーム内へのペプチドの封入も、ペプチドの「修飾」に包含される。

【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】００５１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５１】
具体的な方法としては、例えば、試験ペプチドの存在下及び非存在下において、PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとをインキュベートする。その後、反応液を抗PHB2抗体又は抗BIG3抗体で免疫沈降し、免疫沈降物のウェスタンブロット解析を行う。PHB2ポリペプチドとBIG3ポリペプチドとの結合レベルは、抗PHB2抗体で免疫沈降されたBIG3ポリペプチドレベル又は抗BIG3抗体で免疫沈降されたPHB2ポリペプチドレベルの少なくとも一方を検出することにより確認することができる。ここで使用するPHB2ポリペプチド及びBIG3ポリペプチドは、公知の遺伝子工学的手法によって調製することができる。また、これらのポリペプチドの産生細胞の細胞溶解物を用いることもできる。これらのポリペプチドの産生細胞としては、本明細書の実施例に記載されるような細胞株が利用可能である。
【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５８】
また、遺伝子工学的手法（例えば、Morrison J, J Bacteriology, 132(1): 349-51（1977）;Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.), 101: 347-62(1983)）により、本発明のペプチドを得ることもできる。例えば、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを適切な発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞に導入して形質転換細胞を調製する。次いで、該宿主細胞を培養して本発明のペプチドを産生させ、その細胞抽出物を調製する。該細胞抽出物からの本ペプチドの精製には、タンパク質精製のための標準的な手法を用いることができる。例えば、カラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、及び再結晶化を適切に選択し、組み合わせることにより、本ペプチドを精製することができる。また、本発明のペプチドは、タンパク質合成のために必要な要素がインビトロで再構成されたインビトロ翻訳系によっても合成することができる。
【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５９】
遺伝子工学的手法を用いる場合には、本発明のペプチドを、他のペプチドとの融合タンパク質として発現させることもできる。本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドと他のペプチドをコードするポリヌクレオチドとを、インフレームとなるように連結して、適切な発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞に導入して形質転換細胞を調製する。次いで、該宿主細胞を培養して本発明のペプチドと他のペプチドとの融合タンパク質を産生させ、その細胞抽出物を調製する。該細胞抽出物からの該融合タンパク質の精製は、例えば、融合タンパク質と親和性を有する物質を結合させたカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより該融合タンパク質を捕捉することにより、行うことができる。また、本発明のペプチドと他のペプチドとを、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、及びプロテアソームなどの酵素によって切断され得るリンカー配列を介して結合させておけば、カラムに捕捉された該融合タンパク質をこれらの酵素で処理することにより、本発明のペプチドをカラムから分離することができる。融合タンパク質の形成に使用し得る他のペプチドに

は、例えば、以下のようなペプチドが含まれるが、これらに限定されない：
FLAG（Hopp et al., Bio/Technology 6, 1204-10(1988)）；
ヒスチジン（His）残基からなる6xHis又は10xHis；
インフルエンザ血球凝集素（HA）；
ヒトc-myc断片、VSV-GP断片；p18 HIV断片；
T7タグ； HSVタグ；
Eタグ；SV40T抗原断片；
lckタグ；
α-チューブリン断片；
Bタグ；
プロテインC断片；
GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）；
HA（インフルエンザ血球凝集素）；
免疫グロブリン定常領域；
β-ガラクトシダーゼ；及び；
MBP（マルトース-結合タンパク質）。
【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６１】
本発明のポリヌクレオチドは、当業者に知られた方法によって作製することができる。例えば、Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron, 48: 2223-311(1992);Matthes et al., EMBO J, 3(4): 801-5(1984)に記載されるような固相技法を用いて、本発明のポリヌクレオチドを合成することができる。また、遺伝子工学的手法を用いて本発明のポリヌクレオチドを調製することもできる。例えば、本発明のペプチドとして選択したアミノ酸配列をコードするPHB2遺伝子（配列番号27）の部分塩基配列に基づいて、プライマーを作成し、PHB2ポリペプチドを発現する細胞から抽出したmRNAを鋳型として、逆転写PCRを行う。これにより、本発明のポリヌクレオチドを増幅することができる。
【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００９５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００９５】
ペプチドの合成
すべてのペプチドはFmoc型固相合成法により合成した。樹脂はNovaSyn TGR樹脂（0.25mmol アミン/g)もしくはRink Amide AM樹脂（0.62mmol アミン/g）を用い、手動のFmoc固相合成法を利用した。Fmoc基の除去は、20%（v/v）ピペリジン/DMF溶液を室温で10分間作用させ、樹脂をDMFで5～10回洗浄したあと、Fmocアミノ酸3当量をDMF溶媒中、N,N-ジイソプロピルカルボジイミド（DIPCDI、3.0当量）と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（HOBt・H2O、3.3当量）あるいは N,N-ジイソプロピルエチルアミン（DIPEA、3.0当量）とN,N,N,N-テトラメチル-O-（ベンゾトリアゾール-1-イル）ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU、2.9当量）を用いて、室温で90分間カップリングさせた。DMF、メタノール、エタノールで洗浄乾燥後、保護ペプチド樹脂100mgに対して、TFA：チオアニソール：m-クレソール：1,2-エタンジチオール：水（80：5：5：5：5）のカクテル5mLを、室温で90分間作用させた。TFAを窒素気流により濃縮後、残渣にエーテルを加え沈殿化させ、エーテルで沈殿物を洗

浄後、適当な水性溶媒に溶解後、ＨＰＬＣで分取精製した。
【手続補正１１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１０４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０４】
細胞増殖アッセイ
ＭＤＡ-ＭＢ-２３１細胞を４８ウェルプレートに1×10^4細胞/２００ μＬ in wellの細胞密度で播種し、４８時間後に各ウェルの培地をＰＨＢ２ペプチド１１-２２aaまたは７６-９０aaを加えた培地（それぞれ２０ μＭから３倍の希釈系列を作製）と交換し、さらに９６時間培養後、Ｃｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ-８（同仁堂、熊本、日本）を用いて細胞増殖レベルを測定した。データは３つの独立した実験より取得し、グラフ作成・データ解析ソフトウェアＳｉｇｍａ Ｐｌｏｔ（Ｓｙｓｔａｔ Ｓｏｆｔｗａｒｅ, Ｓａｎ Ｊｏｓｅ, ＣＡ, ＵＳＡ）を用いてグラフ作成（平均±標準偏差）および細胞増殖に対するペプチドの５０％阻害濃度（IC_{50}）の算出を行った。
【手続補正１２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１０５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０５】
併用アッセイ
ＭＤＡ-ＭＢ-２３１細胞を４８ウェルプレートに1×10^4細胞/２００ μＬ in wellの細胞密度で播種し、４８時間後に各ウェルの培地をＰＨＢ２ペプチド１１-２２aa（添加濃度IC_{50}値）、ＰＨＢ２ペプチド７６-９０aa（添加濃度IC_{50}値）、両ペプチドの混合液（添加濃度はそれぞれのIC_{50}値）をそれぞれ加えた培地、および陰性対照としてリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を加えた培地と交換し、さらに９６時間培養後、Ｃｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ-８（同仁堂、熊本、日本）を用いて細胞増殖レベルを測定した。得られたデータは、ＰＢＳ添加時の増殖レベルを基準に相対値を算出し、グラフを作成した。