

(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2016-519077

(P2016-519077A)

(43) 公表日 平成28年6月30日(2016.6.30)

| (51) Int.Cl.               | F 1         | テーマコード (参考)     |
|----------------------------|-------------|-----------------|
| <b>A61K 8/64 (2006.01)</b> | A 61 K 8/64 | Z N A 4 C 0 8 3 |
| <b>A61K 8/81 (2006.01)</b> | A 61 K 8/81 | 4 H 0 4 5       |
| <b>A61K 8/25 (2006.01)</b> | A 61 K 8/25 |                 |
| <b>A61K 8/24 (2006.01)</b> | A 61 K 8/24 |                 |
| <b>A61K 8/27 (2006.01)</b> | A 61 K 8/27 |                 |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く

|               |                              |          |   |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号     | 特願2016-502742 (P2016-502742) | (71) 出願人 | 515250738<br>セーフホワイト インコーポレイテッド                 |
| (86) (22) 出願日 | 平成26年3月14日 (2014.3.14)       |          | アメリカ合衆国 オハイオ州 ダブリン<br>フランツ ロード 5500 スイート<br>120 |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成27年10月23日 (2015.10.23)     | (74) 代理人 | 100102978<br>弁理士 清水 初志                          |
| (86) 國際出願番号   | PCT/US2014/028233            | (74) 代理人 | 100102118<br>弁理士 春名 雅夫                          |
| (87) 國際公開番号   | W02014/152918                | (74) 代理人 | 100160923<br>弁理士 山口 裕孝                          |
| (87) 國際公開日    | 平成26年9月25日 (2014.9.25)       | (74) 代理人 | 100119507<br>弁理士 刑部 俊                           |
| (31) 優先権主張番号  | 61/785,966                   | (74) 代理人 | 100142929<br>弁理士 井上 隆一                          |
| (32) 優先日      | 平成25年3月14日 (2013.3.14)       |          |   |
| (33) 優先権主張国   | 米国(US)                       |          |   |
| (31) 優先権主張番号  | 61/903,671                   |          |   |
| (32) 優先日      | 平成25年11月13日 (2013.11.13)     |          |   |
| (33) 優先権主張国   | 米国(US)                       |          |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】歯に白い外観を与えるための方法および材料

## (57) 【要約】

本文書は、化合物を歯に送達するための方法および材料、ならびにより白い外観を歯に与えるための方法および材料を提供する。例えば、より白い外観を歯に与えるために、1種または複数種の蛍光発光ポリペプチド(例えば、青色蛍光タンパク質(BFP))および/またはホワイトニング粒子と組み合わせた1種または複数種の接着分子(例えば、イガイ接着ポリペプチド、または複数の3,4-ジヒドロキシフェニル-L-アラニン残基を含むポリマー)を歯に接触させるための方法および材料が提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

接着分子、およびホワイトニング粒子または再石灰化粒子を含む組成物であって、該接着分子が、複数の3,4-ジヒドロキシフェニル-L-アラニン(DOPA)残基を含みかつ歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する、組成物。

**【請求項 2】**

前記接着分子がイガイ接着ポリペプチドである、請求項1記載の組成物。

**【請求項 3】**

前記接着分子が、複数のリジン残基および前記複数のDOPA残基を含むポリマーである、請求項1～2のいずれか一項記載の組成物。

10

**【請求項 4】**

前記接着分子が、複数のリジン残基、複数のグリシン残基および前記複数のDOPA残基を含むポリマーである、請求項1～3のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 5】**

前記接着分子が、前記複数のDOPA残基を含むポリメタクリレートポリマーである、請求項1～4のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記ホワイトニング粒子が二酸化ケイ素粒子、ヒドロキシアパタイト粒子、または酸化亜鉛粒子である、請求項1～5のいずれか一項記載の組成物。

20

**【請求項 7】**

前記ホワイトニング粒子がヒドロキシアパタイト粒子である、請求項1～6のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 8】**

前記再石灰化粒子がヒドロキシアパタイト粒子または非晶質リン酸カルシウム粒子である、請求項1～5のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 9】**

蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドをさらに含む、請求項1～8のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 10】**

前記蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドが前記接着分子にコンジュゲートされている、請求項9記載の組成物。

30

**【請求項 11】**

前記蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドと前記接着分子とのコンジュゲートが非凝集性である、請求項10記載の組成物。

**【請求項 12】**

前記蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドと前記接着分子とのコンジュゲートが、ヒトの口中に見られる条件下で安定である、請求項10または請求項11記載の組成物。

**【請求項 13】**

前記蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドと前記接着分子とが7.0未満のpHでコンジュゲートされている、請求項10～12のいずれか一項記載の組成物。

40

**【請求項 14】**

練り歯磨き、ジェル、マウスリンス、チューインガム、または摂取物質である、請求項1～13のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 15】**

蛍光発光ポリペプチド、および複数のDOPA残基を含む接着分子を含む組成物であって、該接着分子が歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する、組成物。

**【請求項 16】**

ホワイトニング粒子をさらに含む、請求項15記載の組成物。

50

**【請求項 17】**

前記ホワイトニング粒子が二酸化ケイ素粒子、ヒドロキシアパタイト粒子、または酸化亜鉛粒子である、請求項16記載の組成物。

**【請求項 18】**

前記接着分子が、複数のリジン残基および前記複数のDOPA残基を含むポリマーである、請求項15～17のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 19】**

前記接着分子が、複数のリジン残基、複数のグリシン残基および前記複数のDOPA残基を含むポリマーである、請求項15～17のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 20】**

前記接着分子がイガイ接着ポリペプチドである、請求項15～17のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 21】**

前記接着分子が、前記複数のDOPA残基を含むポリメタクリレートポリマーである、請求項15～17のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 22】**

前記蛍光発光ポリペプチドが前記接着分子にコンジュゲートされている、請求項15～21のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 23】**

前記蛍光発光ポリペプチドがBFPポリペプチドである、請求項9～22のいずれか一項記載の組成物。

**【請求項 24】**

ヒドロキシアパタイト粒子、およびポリペプチドにコンジュゲートされた接着分子を含む組成物であって、該接着分子が、複数のDOPA残基を含みかつ歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する、組成物。

**【請求項 25】**

練り歯磨き、ジェル、マウスリンス、チューインガム、または摂取物質である、請求項24記載の組成物。

**【請求項 26】**

前記ポリペプチドが非蛍光ポリペプチドである、請求項24または請求項25記載の組成物。

**【請求項 27】**

前記非蛍光ポリペプチドがコラーゲンまたはアルブミンである、請求項26記載の組成物。

**【請求項 28】**

前記ポリペプチドが蛍光発光ポリペプチドである、請求項24または請求項25記載の組成物。

**【請求項 29】**

前記蛍光発光ポリペプチドがBFPポリペプチドである、請求項28記載の組成物。

**【請求項 30】**

接着分子、およびホワイトニング粒子または再石灰化粒子を歯に適用する段階を含む、歯の外観を変化させるための方法であって、該接着分子が、複数のDOPA残基を含みかつ歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有し、該ホワイトニング粒子または再石灰化粒子が歯の外観を変化させる、方法。

**【請求項 31】**

前記接着分子、および前記ホワイトニング粒子または再石灰化粒子が順次適用される、請求項30記載の方法。

**【請求項 32】**

前記接着分子、および前記ホワイトニング粒子または再石灰化粒子が一緒に適用される、請求項30記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 3】

前記ホワイトニング粒子がナノ粒子またはマイクロ粒子である、請求項30～32のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 3 4】

前記ホワイトニング粒子が二酸化ケイ素粒子、ヒドロキシアパタイト粒子、または酸化亜鉛粒子である、請求項30～33のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 3 5】

前記ホワイトニング粒子がヒドロキシアパタイト粒子である、請求項30～34のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 3 6】

前記再石灰化粒子がヒドロキシアパタイト粒子または非晶質リン酸カルシウム粒子である、請求項30～32のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 3 7】

前記接着分子が、前記複数のDOPA残基を含むポリメタクリレートポリマー；イガイ接着ポリペプチド；複数のリジン残基および前記複数のDOPA残基を含むポリマー；ならびに複数のリジン残基、複数のグリシン残基および前記複数のDOPA残基を含むポリマーからなる群より選択される、請求項30～36のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 3 8】

前記接着分子が蛍光発光ポリペプチドにコンジュゲートされている、請求項30～37のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 3 9】

前記接着分子が非蛍光ポリペプチドにコンジュゲートされている、請求項30～37のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 4 0】

複数のDOPA残基を含む接着分子および蛍光発光ポリペプチドを歯に適用する段階を含む、歯の外観を変化させるための方法であって、該接着分子が歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有し、該蛍光発光ポリペプチドから発せられた蛍光が歯の外観を変化させる、方法。

## 【請求項 4 1】

前記歯がヒトの歯である、請求項40記載の方法。

## 【請求項 4 2】

前記歯がより白く見えるように前記歯の外観を変化させる段階を含む、請求項40または請求項41記載の方法。

## 【請求項 4 3】

前記接着分子が、前記複数のDOPA残基を含むポリメタクリレートポリマー；イガイ接着ポリペプチド；複数のリジン残基および前記複数のDOPA残基を含むポリマー；ならびに複数のリジン残基、複数のグリシン残基および前記複数のDOPA残基を含むポリマーからなる群より選択される、請求項40～42のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 4 4】

前記イガイ接着ポリペプチドが、mussel foot protein-1(MFP-1)、MFP-3、もしくはMFP-5、またはこれらの組み合わせを含む、請求項43記載の方法。

## 【請求項 4 5】

前記イガイ接着ポリペプチドがキメラポリペプチドであり、該キメラポリペプチドが、(i)MFP-1のアミノ酸配列およびMFP-5のアミノ酸配列、または(ii)MFP-1のアミノ酸配列およびMFP-3のアミノ酸配列を含む、請求項43記載の方法。

## 【請求項 4 6】

前記蛍光発光ポリペプチドが前記ポリマーにコンジュゲートされている、請求項40～45のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 4 7】

前記蛍光発光ポリペプチドがBFPポリペプチドである、請求項46記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 4 8】**

ホワイトニング粒子または再石灰化粒子を前記歯に適用する段階をさらに含む、請求項40～47のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 4 9】**

前記ホワイトニング粒子がナノ粒子またはマイクロ粒子である、請求項48記載の方法。

**【請求項 5 0】**

前記ホワイトニング粒子が二酸化ケイ素粒子、ヒドロキシアパタイト粒子、または酸化亜鉛粒子である、請求項48または請求項49記載の方法。

**【請求項 5 1】**

前記ホワイトニング粒子がヒドロキシアパタイト粒子である、請求項48～50のいずれか一項記載の方法。 10

**【請求項 5 2】**

前記組成物が練り歯磨き、マウスリンス、ジェル、チューインガム、または摂取物質内に存在し、前記適用する段階が該練り歯磨き、マウスリンス、ジェル、チューインガム、または摂取物質を前記歯または歯成分に適用することを含む、請求項30～51のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 5 3】**

前記蛍光発光ポリペプチドが、2種以上の蛍光発光ポリペプチドを含むポリマーの1単位である、請求項38～52のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 5 4】**

前記接着分子および前記蛍光発光ポリペプチドが順次適用される、請求項40～53のいずれか一項記載の方法。 20

**【請求項 5 5】**

前記接着分子および前記蛍光発光ポリペプチドが一緒に適用される、請求項40～53のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 5 6】**

前記接着分子および蛍光発光ポリペプチドが、唾液の存在下で歯、歯成分、または無機歯科材料に適用される、請求項40～55のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 5 7】**

蛍光発光ポリペプチドの20残基以上の長さのアミノ酸配列およびイガイ接着ポリペプチドの20残基以上の長さのアミノ酸配列を含む、キメラポリペプチド。 30

**【請求項 5 8】**

完全長の蛍光発光ポリペプチドまたは該完全長の蛍光発光ポリペプチドと少なくとも約90パーセント同一であるその断片を含み、かつ完全長のイガイ接着ポリペプチドまたは該完全長のイガイ接着ポリペプチドと少なくとも約80パーセント同一であるその断片を含み、かつ、蛍光を発する能力、および歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する、請求項57記載のキメラポリペプチド。

**【請求項 5 9】**

接着分子、非蛍光ポリペプチド、および化合物を含む組成物を歯に適用する段階を含む、化合物を歯に送達する方法であって、該接着分子が、複数のDOPA残基を含みかつ歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する、方法。 40

**【請求項 6 0】**

前記接着分子が前記非蛍光ポリペプチドにコンジュゲートされている、請求項59記載の方法。

**【請求項 6 1】**

前記非蛍光ポリペプチドがコラーゲンまたはアルブミンである、請求項59または請求項60記載の方法。

**【請求項 6 2】**

前記接着分子と前記非蛍光ポリペプチドとのコンジュゲートが非凝集性である、請求項60または請求項61記載の方法。 50

**【請求項 6 3】**

前記化合物がポリペプチド、核酸、蛍光部分、治療剤、ホワイトニング粒子、または再石灰化粒子である、請求項59～62のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 6 4】**

前記歯がヒトの歯である、請求項59～63のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 6 5】**

接着分子、非蛍光ポリペプチド、および化合物を含む組成物であって、該接着分子が、複数のDOPA残基を含みかつ歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する、組成物。

**【請求項 6 6】**

前記化合物がポリペプチド、核酸、蛍光部分、治療剤、ホワイトニング粒子、または再石灰化粒子である、請求項65記載の組成物。

**【請求項 6 7】**

前記接着分子が前記非蛍光ポリペプチドにコンジュゲートされている、請求項65または請求項66記載の組成物。

**【請求項 6 8】**

前記接着分子と前記非蛍光ポリペプチドとのコンジュゲートが非凝集性である、請求項67記載の組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願の相互参照**

本出願は、2013年11月13日に出願された米国特許出願第61/903,671号、および2013年3月14日に出願された米国特許出願第61/785,966号に対する優先権を主張するものであり、これらの開示はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

**【0 0 0 2】****1. 技術分野**

本文書は、1種または複数種の接着分子を用いて歯に化合物を送達するための方法および材料に関する。本文書はまた、歯に白い外観を与えることに関する。例えば、本文書は、1種または複数種のポリペプチド(例えば、青色蛍光タンパク質などの蛍光発光ポリペプチド、またはコラーゲンもしくはアルブミンなどの非蛍光ポリペプチド)および/または1種または複数種のホワイトニング粒子もしくは白い外観を歯に与える他の化合物と組み合わせた1種または複数種の接着分子(例えば、1種または複数種のイガイ(mussel)接着ポリペプチド)を歯に接触させるための方法および材料に関する。

**【背景技術】****【0 0 0 3】****2. 背景情報**

一般的に、白い歯は、外見上好ましいと考えられる。しかし、歯は、介入の不在下では変色してしまうことがある。着色した外観を示すことに一般的に関与している歯の構造は、エナメル層である。いくつかの要因がエナメル質の変色の原因となり得る。例えば、歯の表面での歯垢および歯石マトリックスの形成は、汚れを取り込み、それによってエナメル質の変色をもたらすことがある。

**【0 0 0 4】**

市販の歯ホワイトニング製剤は、表面の捕捉物質により変色した歯のエナメル質に光沢を取り戻すために、多くの人たちの美容上の好みに対処すべく開発してきた。全ての歯磨き剤およびマウスウォッシュは数種の洗浄剤および研磨剤を含有するが、一部のエナメル質沈着物またはエナメル質外観の他の変化は、通常の使用条件下では、これらの作用剤によって完全に除去される、酸化される、または再着色されることに抵抗性になる。喫煙者は、多くの場合、吐き出されたタバコの煙に含まれるタールや微粒子が歯に集まるので、エナメル質の変色をきたす。場合によっては、食品および飲料(例えば、紅茶)が歯の工

10

20

30

40

50

ナメル質を着色または変色することがある。

【発明の概要】

【0005】

概要

本文書は、接着分子を単独でまたは1種または複数種のポリペプチド(例えば、蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチド)との組み合わせで用いて、化合物を歯または口(例えば、ヒトの歯または口)に送達するための方法および材料を提供する。例えば、本明細書に記載の方法および材料は、核酸、ポリペプチド、治療剤、ホワイトニング粒子、または再石灰化粒子を歯に送達するために使用することができる。ある場合には、該化合物の送達は、歯の白い外観を改善し、かつ/または再石灰化粒子を歯に結合させる。

10

【0006】

本文書はまた、より白い外観を歯に与えるための方法および材料を提供する。例えば、本文書は、より白い外観を歯に与えるために、1種または複数種の接着分子(例えば、1種または複数種のイガイ接着ポリペプチド)を、1種または複数種の蛍光発光ポリペプチド(例えば、青色蛍光タンパク質(BFP))および/または1種または複数種のホワイトニング粒子と組み合わせて、歯に接触させるための方法および材料を提供する。本明細書に記載するように、接着分子は、BFPポリペプチドなどの蛍光発光ポリペプチドもしくは非蛍光ポリペプチドおよび/またはヒドロキシアパタイトもしくは二酸化チタン粒子などのホワイトニング粒子と組み合わせて、歯に適用することができる。接着分子は、複数の3,4-ジヒドロキシフェニル-L-アラニン(DOPA)残基を含むことができ、かつ歯、歯成分、例えばエナメル質、ヒドロキシアパタイト、もしくは歯周囲の獲得被膜(ペリクル)、または無機歯科材料、例えばクラウン、キャップ、ブレース(braces)、もしくは充填材、と相互作用または結合する能力を有する。本明細書に記載の方法および材料は、乾いた歯または湿った歯に使用することができる。例えば、本明細書に記載の方法および材料は、歯の上の唾液および食物の存在など、口中に見られる典型的な条件下で、かつブラッシングまたは食事の強要下で、有用であり得る。

20

【0007】

蛍光発光ポリペプチドは、特定の波長で蛍光を発することができる。BFPポリペプチドの場合には、BFPポリペプチドは、約440nm～約500nmの範囲(例えば、約450nmと約490nmの間)で蛍光を発することができ、それが歯から発せられたとき歯に白色の外観を与える。この白い外観は、基礎となる歯がもともとそれほど白くない場合でさえも出現する。例えば、本明細書に記載の方法および材料は、たとえ歯が汚染されていたり、テトラサイクリンなどの化学薬品が原因で変色してしまったとしても、人が白く見える歯を持つことを可能にする。したがって、白く見える歯は、苛酷な漂白(例えば、過酸化水素もしくは過酸化カルバミドを必要とするような歯科漂白処理)または脱染色技術なしに、本明細書に記載の方法および材料を用いて、得ることができる。本明細書に記載の方法および材料は、蛍光ポリペプチドが歯の自然な蛍光を模倣して、完全には不透明でないことによって半透明を維持することに寄与するので、歯に自然な外観を与える。

30

【0008】

一局面では、本文書は、化合物を歯(例えば、ヒトの歯)に送達する方法を特徴とする。この方法は、接着分子、非蛍光ポリペプチド、および該化合物(例えば、ポリペプチド、核酸、蛍光部分、治療剤、ホワイトニング粒子、または再石灰化粒子)を含む、またはから本質的になる、組成物を歯に適用する段階を含み、該接着分子は、複数のDOPA残基を含みかつ歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する。接着分子は、コラーゲンまたはアルブミンなどの非蛍光ポリペプチドにコンジュゲートされ得る。接着分子と非蛍光ポリペプチドとのコンジュゲートは非凝集性であり得る。

40

【0009】

一般に、本文書の一局面は、歯の外観を変化させるための方法を特徴とする。この方法は、複数のDOPA残基を含む接着分子および蛍光発光ポリペプチド(例えば、BFPポリペプチド)を、歯に(例えば、乾いたヒトもしくは動物の歯に、湿ったヒトもしくは動物の歯に、

50

または口中に見られる典型的な条件下のヒトもしくは動物の歯に)適用する段階を含み、またはから本質的になり、ここで、該接着分子は歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有し、該蛍光発光ポリペプチドから発せられた蛍光は、歯の外観を変化させる。接着分子と蛍光発光ポリペプチドは順次適用されてもよいし、一緒に適用されてもよい。例えば、接着分子と蛍光発光ポリペプチドは、接着分子と蛍光発光ポリペプチドが化学架橋試薬により一緒に連結されたコンジュゲートの形で適用されるか、または接着特性と蛍光特性の両方を含むキメラポリペプチドとして適用される。前記方法は、歯がより白く見えるように歯の外観を変化させることをさらに含むことができる。前記方法は、ホワイトニング粒子(例えば、ナノ粒子またはマイクロ粒子)を歯に適用する段階をさらに含むことができる。例えば、ホワイトニング粒子を、接着分子と蛍光発光ポリペプチドを含むコンジュゲートに結合させて、ホワイトニング粒子とコンジュゲートを含む複合体を歯に適用することができる。ホワイトニング粒子は、ヒドロキシアパタイト、二酸化ケイ素、二酸化チタン、または酸化亜鉛を含むことができる。このような粒子は、特定の条件下で、蛍光を発する歯の白い外観を向上させ、かつその外観が歯の表面でより均一であるようにすることができる。

10

## 【0010】

接着分子、蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチド、およびホワイトニング粒子または再石灰化粒子は、練り歯磨き、マウスリンス、マウスウォッシュ、外用塗布ジェル、チューインガム、または摂取される物質中に存在することができ、適用する段階は、その練り歯磨き、マウスリンス、マウスウォッシュ、外用塗布ジェル、チューインガム、または摂取物質を歯に適用する(例えば、直接適用する)ことを含み得る。場合によっては、マウスウォッシュ、マウスリンス、外用塗布ジェル、チューインガム、または摂取物質は、歯または歯成分が飽和されるのに十分な時間にわたって、歯または歯成分に接触させておく。

20

## 【0011】

別の局面では、本文書は、歯の外観を変化させるための方法を特徴とする。この方法は、接着分子、およびホワイトニング粒子(例えば、ナノ粒子)または再石灰化粒子を、歯に(例えば、乾いたヒトもしくは動物の歯に、湿ったヒトもしくは動物の歯に、または口中に見られる典型的な条件下のヒトもしくは動物の歯に)適用する段階を含み、またはから本質的になり、該接着分子は、複数のDOPA残基を含みかつ歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する。歯の外観を変化させる(例えば、歯をより白く見せる)ことが可能であり、かつ/または再石灰化粒子を歯に結合させることができ。接着分子とホワイトニングまたは再石灰化粒子は順次適用されてもよいし、一緒に適用されてもよい。ホワイトニング粒子は、ヒドロキシアパタイト粒子、二酸化チタン粒子、二酸化ケイ素粒子、または酸化亜鉛粒子を含むことができる。再石灰化粒子は、ヒドロキシアパタイト粒子または非晶質リン酸カルシウム粒子を含むことができる。接着分子は、複数のDOPA残基を含むポリメタクリレートポリマーを含み得る。接着分子は、1種または複数種のイガイ接着ポリペプチドを含み得る。接着分子は、複数のリジン残基および複数のDOPA残基を含む、またはから本質的になる、ポリマーを含み得る。接着分子は、複数のリジン残基、複数のグリシン残基および複数のDOPA残基を含む、またはから本質的になる、ポリマーを含み得る。該ポリマーは、SEQ ID NO:21またはSEQ ID NO:22に示されるアミノ酸配列を有するものであり得る。

30

## 【0012】

本文書はまた、蛍光発光ポリペプチド、および複数のDOPA残基を含む接着分子を含む、またはから本質的になる、組成物を特徴とし、該接着分子は、歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する。この組成物はさらに、二酸化チタン粒子、二酸化ケイ素粒子、ヒドロキシアパタイト粒子、または酸化亜鉛粒子などのホワイトニング粒子を含むことができる。接着分子は、複数のリジン残基および複数のDOPA残基を含む、またはから本質的になる、ポリマーであり得る。接着分子は、複数のリジン残基、複数のグリシン残基および複数のDOPA残基を含む、またはから本質的になる、ポリマーを

40

50

含み得る。接着分子は、1種または複数種のイガイ接着ポリペプチドであり得る。蛍光発光ポリペプチドは、イガイ接着ポリペプチドにコンジュゲートされ得る。接着分子は、複数のDOPA残基を含むポリメタクリレートポリマーであり得る。蛍光発光ポリペプチドは、ポリメタクリレートポリマーにコンジュゲートされ得る。

#### 【0013】

別の局面では、本文書は、接着分子、およびホワイトニング粒子または再石灰化粒子を含む、またはから本質的になる、組成物を特徴とし、該接着分子は、複数のDOPA残基を含みかつ歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する。接着分子は、複数のリジン残基および複数のDOPA残基を含む、またはから本質的になる、ポリマーであり得る。接着分子は、複数のリジン残基、複数のグリシン残基および複数のDOPA残基を含む、またはから本質的になる、ポリマーを含み得る。接着分子は、1種または複数種のイガイ接着ポリペプチドであり得る。接着分子は、複数のDOPA残基を含むポリメタクリレートポリマーであり得る。ホワイトニング粒子は、二酸化ケイ素粒子、ヒドロキシアバタイト粒子、または酸化亜鉛粒子であり得る。再石灰化粒子は、ヒドロキシアバタイト粒子または非晶質リン酸カルシウム粒子であり得る。前記組成物は、蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドをさらに含むことができる。蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドは、接着分子(例えば、イガイ接着ポリペプチド、ポリメタクリレートポリマー、複数のリジンおよびDOPA残基を含むポリマー、または複数のリジン、グリシンおよびDOPA残基を含むポリマー)にコンジュゲートされ得る。蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドと接着分子とのコンジュゲートは、非凝集性であり得る。蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドと接着分子とのコンジュゲートは、ヒトの口中に見られる条件下で安定であり得る。蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドと接着分子とは、7.0未満のpHでコンジュゲートされ得る。

10

20

30

#### 【0014】

別の局面では、本文書は、ヒドロキシアバタイト粒子、およびポリペプチド(例えば、蛍光発光ポリペプチド、またはコラーゲンもしくはアルブミンなどの非蛍光ポリペプチド)にコンジュゲートされた接着分子を含む、またはから本質的になる、組成物を特徴とする。該接着分子は、複数のDOPA残基を含むことができかつ歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する。

#### 【0015】

本文書はまた、接着分子、非蛍光ポリペプチド、および化合物(例えば、ポリペプチド、核酸、蛍光部分、治療剤、ホワイトニング粒子、または再石灰化粒子)を含む、またはから本質的になる、組成物を特徴とし、該接着分子は、複数のDOPA残基を含みかつ歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を有する。接着分子は、非蛍光ポリペプチドにコンジュゲートされ得る。接着分子と非蛍光ポリペプチドとのコンジュゲートは非凝集性であり得る。

#### 【0016】

本明細書に記載の組成物のいずれにおいても、蛍光発光ポリペプチドはBFPポリペプチドであり得る。

40

#### 【0017】

本明細書に記載の組成物はどれも、練り歯磨き、マウスリンス、外用塗布ジェル、チューインガム、または摂取物質とすることができます。

#### 【0018】

別の局面では、本文書は、蛍光発光ポリペプチドの20残基以上の長さのアミノ酸配列およびイガイ接着ポリペプチドの20残基以上の長さのアミノ酸配列を含む、またはから本質的になる、キメラポリペプチドを特徴とする。該キメラポリペプチドは、完全長の蛍光発光ポリペプチドまたは該完全長の蛍光発光ポリペプチドと少なくとも約90パーセント同一であるその断片を含むことができる。該キメラポリペプチドは、完全長のイガイ接着ポリペプチドまたは該完全長のイガイ接着ポリペプチドと少なくとも約80パーセント同一であるその断片を含むことができる。このキメラポリペプチドは、蛍光を発する能力、および

50

歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力を含み得る。

【0019】

本明細書に記載の方法または組成物のいずれにおいても、接着分子は1種または複数種のイガイ接着ポリペプチド(例えば、2種以上のイガイ接着ポリペプチド)であり得る。イガイ接着ポリペプチドは、mussel foot protein-1(MFP-1)、MFP-3、MFP-5、またはこれらの組み合わせを含むことができる。例えば、イガイ接着ポリペプチドは、MFP-1およびMFP-5ポリペプチドの組み合わせを含み得る。イガイ接着ポリペプチドは、(i)MFP-1のアミノ酸配列およびMFP-5のアミノ酸配列、または(ii)MFP-1のアミノ酸配列およびMFP-3のアミノ酸配列、を含むキメラポリペプチドであり得る。蛍光発光ポリペプチドは、イガイ接着ポリペプチドにコンジュゲートされ得る。

10

【0020】

本明細書に記載の方法または組成物のいずれにおいても、蛍光発光ポリペプチドおよびイガイ接着ポリペプチドは、蛍光発光ポリペプチドのアミノ酸配列およびイガイ接着ポリペプチドのアミノ酸配列を含むキメラポリペプチドの一部であり得る。

【0021】

本明細書に記載の方法または組成物のいずれにおいても、接着分子は、複数のリジン残基および複数のDOPA残基を含む、またはから本質的になる、ポリマーであり得る。該ポリマーは、複数のリジン残基、複数のグリシン残基および複数のDOPA残基を含み得る、またはから本質的になり得る。接着分子は、SEQ ID NO:21またはSEQ ID NO:22に示されるアミノ酸配列を有するものであり得る。蛍光発光ポリペプチドは、該ポリマーにコンジュゲートされ得る。

20

【0022】

本明細書に記載の方法または組成物のいずれにおいても、接着分子は、複数のDOPA残基を含むポリメタクリレートポリマーであり得る。蛍光発光ポリペプチドは、該ポリメタクリレートポリマーにコンジュゲートされ得る。

【0023】

本明細書に記載の方法または組成物のいずれにおいても、蛍光発光ポリペプチドは、2種以上の蛍光発光ポリペプチドを含むポリマーの1単位であり得る。該ポリマーは、イガイ接着ポリペプチドに結合させてコンジュゲートを形成させることができ、該コンジュゲートは歯に適用される。例えば、該ポリマーは、イガイ接着ポリペプチドにコンジュゲートさせて、単独でまたはホワイトニング粒子と組み合わせて、歯に適用することができる。

30

【0024】

本明細書に記載の方法または組成物のいずれにおいても、接着分子は、2種以上の接着分子を含むポリマーの1単位であり得る。該ポリマーは、蛍光発光ポリペプチドにコンジュゲートさせて、単独でまたはホワイトニング粒子と組み合わせて、歯に適用することができる。

【0025】

本明細書に記載の方法または組成物のいずれにおいても、ポリマー(この場合、ポリマーの1単位は蛍光発光ポリペプチドにコンジュゲートされた接着分子を含む)は、単独でまたはホワイトニング粒子と組み合わせて、歯に適用することができる。

40

【0026】

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または同等の方法および材料を、本発明の実施または試験の際に使用することができるが、適切な方法および材料が以下に記載される。本明細書中で挙げた全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。コンフリクトの場合には、定義を含めて、本明細書が支配するものとする。さらに、材料、方法、および実施例は、単なる例示にすぎず、限定を意図したものではない。

50

## 【0027】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から、および添付の特許請求の範囲から、明らかになるであろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0028】

【図1】例示的なBFPポリペプチドをコードする核酸配列(SEQ ID NO:1)の一覧である(GenBankアクセッション番号U70497.1; GI番号1619752)。

【図2】例示的なBFPポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO:2)の一覧である(GenBankアクセッション番号AAB16959.1; GI番号1619753)。

【図3】例示的なBFPポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO:3)の一覧である。 10

【図4】例示的なイガイ接着ポリペプチドをコードする核酸配列(SEQ ID NO:4)の一覧である(GenBankアクセッション番号AY521220.1; GI番号41350294)。

【図5】例示的なイガイ接着ポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO:5)の一覧である(GenBankアクセッション番号AAS00463; GI番号41350295)。

【図6】例示的なイガイ接着ポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO:6)の一覧である(GenBankアクセッション番号AAL35297.1; GI番号17066511)。

【図7】例示的なイガイ接着ポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO:7)の一覧である(GenBankアクセッション番号ABE01084.1; GI番号90823165)。

【図8】例示的なイガイ接着ポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO:8)の一覧である(GenBankアクセッション番号AAF89290.1; GI番号9587380)。 20

【図9】例示的なイガイ接着ポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO:9)の一覧である(GenBankアクセッション番号AYY29129.1; GI番号63055693)。

【図10】例示的なイガイ接着ポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO:10)の一覧である(GenBankアクセッション番号BAB16314.1; GI番号10641127)。

【図11】例示的なイガイ接着ポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO:11)の一覧である(GenBankアクセッション番号AAX23968.1; GI番号60548042)。

【図12】例示的なイガイ接着ポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO:12)の一覧である(GenBankアクセッション番号AYY29131.1; GI番号63055728)。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0029】

30

## 詳細な説明

本文書は、複数のDOPA残基を含む接着分子を用いて、別の化合物(例えば、蛍光分子、ポリマー、抗生物質もしくは他の治療剤、ポリペプチド、核酸、ホワイトニング粒子、再石灰化粒子、または生物学的部分)を、骨、歯、軟骨もしくは細胞などの生物学的基体、またはプラスチック、金属もしくはガラスなどの非生物学的基体に接着させるための方法および材料を提供する。場合により、ホワイトニング粒子は再石灰化粒子であり得る。例えば、本文書は、より白い外観を与えるために、歯にミネラルを結合させるために、口臭を消すために、抗菌剤を送達するために、または他の治療もしくは審美的用途のために、分子を歯に結合させるための方法および材料を提供する。

## 【0030】

40

ある場合には、本文書は、より白い外観を歯に与え、かつ/または再石灰化粒子を歯に結合させるために、接着分子およびヒドロキシアパタイト粒子などの1種または複数種のホワイトニング粒子を歯に接触させるための方法および材料を提供する。

## 【0031】

ある場合には、本文書は、ブラッシング後も維持され得る白い外観を歯に与え、かつ/または再石灰化粒子を歯に結合させるために、接着分子および1種または複数種の蛍光発光ポリペプチド(例えば、青色蛍光タンパク質(BFP))、ならびに1種または複数種の任意のホワイトニング粒子、を歯に接触させるための方法および材料を提供する。

## 【0032】

ある場合には、本文書は、接着分子、1種または複数種の非蛍光ポリペプチド、および

50

ホワイトニング粒子または他の化合物を歯に接触させるための方法および材料を提供する。例えば、非蛍光ポリペプチドは、多数の接着分子を結合させるための足場として機能することができ、ひいては、別の化合物(例えば、ホワイトニング粒子、再石灰化粒子、抗生物質もしくは他の治療剤、または蛍光発光ポリペプチド)の歯および/または口への送達を高めることができる。ホワイトニング粒子の送達は、ブラッシング後も維持され得る白い外観を歯に与え、かつ/または再石灰化粒子を歯に結合させることができる。

#### 【0033】

接着分子は、複数のDOPA残基を含むことができ、かつ歯、歯成分(例えば、エナメル質、ヒドロキシアパタイト、歯周囲の獲得被膜(ペリクル)、セメント質、歯冠、歯頸、セメント-エナメル境、もしくは歯尖)、または無機歯科材料、例えばクラウン、キャップ、ブレース、もしくは充填材など、と相互作用または結合する能力を有する。

10

#### 【0034】

本明細書に記載のように使用することができる接着分子の例としては、限定するものではないが、イガイ接着ポリペプチド(例えば、mussel foot protein 1、2、3、4、5、6、またはこれらの組み合わせ)が挙げられる。イガイ接着ポリペプチドは、例えばチロシン残基の酵素的酸化を介して、形成された1個または複数個のDOPA残基を含むことができる。例えば、イガイ接着ポリペプチドの総アミノ酸の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25パーセントまたはそれ以上は、DOPA残基であり得る。組換えポリペプチドのチロシン残基は、チロシナーゼ(例えば、マッシュルームチロシナーゼ)を用いてDOPA残基に変換することができる。Choi et al., *Microb Cell Fact.*, 11:139 (2012)を参照されたい。

20

#### 【0035】

例えば、接着分子は、SEQ ID NO:5～29に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%の配列同一性を有するものであり得る。ある場合には、接着分子は、SEQ ID NO:5～29に示されるアミノ酸配列を有する。特定のアミノ酸配列とSEQ ID NO:5～29のいずれか1つに示されるアミノ酸配列間の同一性パーセントは、次のように決定することができる。最初に、BLASTPバージョン2.0.14を含むBLASTZのスタンドアロン・バージョンからのBLAST 2 Sequences(BI2seq)プログラムを用いて、アミノ酸配列をアライメントする。このBLASTZのスタンドアロン・バージョンは、Fish & Richardsonのウェブサイト(例えば、www.fr.com/blast/)または米国政府の国立バイオテクノロジー情報センターのウェブサイト(www.ncbi.nlm.nih.gov)から取得することができる。BI2seqプログラムの使い方を説明する指示書は、BLASTZに添付されるリードミー(readme)ファイルに見出すことができる。BI2seqは、BLASTPアルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列間の比較を実行する。2つのアミノ酸配列を比較するために、BI2seqのオプションは次のように設定される：-iは比較される第1のアミノ酸配列を含むファイルに設定される

30

(例えば、C:\seq1.txt)

; -jは比較される第2のアミノ酸配列を含むファイルに設定される

(例えば、C:\seq2.txt)

40

; -pはblastpに設定される；-oは任意の所望のファイル名に設定される

(例えば、C:\output.txt)

;他の全てのオプションはデフォルト設定のままである。例えば、次のコマンドを用いて、2つのアミノ酸配列間の比較を含む出力ファイルを作成することができる：

C:\BI2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt

。2つの比較された配列が相同性を共有する場合、指定された出力ファイルは、アライメントされた配列として、相同性の領域を提示する。2つの比較された配列が相同性を共有しない場合、指定された出力ファイルは、アライメントされた配列を提示しない。核酸配列の場合は、blastnを使用する以外は同様の手順に従うことができる。

#### 【0036】

ひとたびアライメントされたら、同一のアミノ酸残基が両配列に提示されている位置の

50

数をカウントすることによって、マッチの数を決定する。同一性パーセントは、マッチの数をSEQ ID NO:5～29のいずれか1つのアミノ酸配列の長さで割り、得られた値に100を掛けることによって決定される。

【0037】

同一性パーセント値は、小数第2位で四捨五入されることに留意されたい。例えば、78.11、78.12、78.13、および78.14は78.1に切り捨てられ、一方78.15、78.16、78.17、78.18、および78.19は78.2に切り上げられる。また、長さの値は常に整数であることに留意されたい。

【0038】

多数の核酸がSEQ ID NO:5～29に示されるアミノ酸配列をコードし得ることは理解されるであろう。遺伝子コードの縮重は当技術分野でよく知られている；すなわち、多くのアミノ酸では、そのアミノ酸のコドンとして機能するヌクレオチドトリプレットが2つ以上存在している。

【0039】

本明細書に記載のように使用することができるイガイ接着ポリペプチドは、各種タイプのイガイに天然に存在するアミノ酸配列を有するものであり得る。例えば、本明細書に記載のように使用することができるイガイ接着ポリペプチドは、ヨーロッパイガイ(*Mytilus edulis*(common blue mussel))、*Mytilus byssus*、ムラサキイガイ(*Mytilus galloprovincialis*)、カリフォルニアイガイ(*Mytilus californianus*)、イガイ(*Mytilus coruscus*)、キタノムラサキイガイ(*Mytilus trossulus*)、またはミドリイガイ(*Perna viridis*(green mussel))に天然に存在するアミノ酸配列を有するものであり得る。

【0040】

例えば、本明細書に記載のように使用することができるイガイ接着ポリペプチドとしては、限定するものではないが、以下が挙げられる：ムラサキイガイ(*Mytilus galloprovincialis*)(GenBankアクセッション番号AAS00463、SEQ ID NO:5)、ヨーロッパイガイ(*Mytilus edulis*)(GenBankアクセッション番号AAL35297.1、SEQ ID NO:6)、もしくはカリフォルニアイガイ(*Mytilus californianus*)(GenBankアクセッション番号ABE01084.1、SEQ ID NO:7)由来のmfp-5；ヨーロッパイガイ(GenBankアクセッション番号AAF89290.1、mfp-3前駆物質変異体11)、カリフォルニアイガイ(GenBankアクセッション番号AYY29129.1、SEQ ID NO:9)、もしくはムラサキイガイ(GenBankアクセッション番号BAB16314.1、SEQ ID NO:10)由来のmfp-3；またはヨーロッパイガイ(GenBankアクセッション番号AAX23968.1、SEQ ID NO:11)、カリフォルニアイガイ(GenBankアクセッション番号AYY29131.1、SEQ ID NO:12)、もしくはムラサキイガイ(UniProtKB/Swiss-Prot Q27409.1)由来のmfp-1、または天然に存在するイガイ接着ポリペプチドのいずれかの断片。

【0041】

ある場合には、mfp-1イガイ接着ポリペプチドは、

AKPSYPPTYK (SEQ ID NO:13)またはPKISYPPTYK (SEQ ID NO:14)

などのコンセンサス配列を1コピーまたは複数コピー含むことができる。例えば、イガイ接着ポリペプチドは、SEQ ID NO:13またはSEQ ID NO:14に示されるコンセンサス配列の5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、または75のリピートを含む。ある場合には、6位および/または7位のプロリン残基はヒドロキシプロリン残基である。ある場合には、5位および/または9位のチロシン残基はDOPA残基である。

【0042】

ある場合には、mfp-2イガイ接着ポリペプチドは、

TDKAYKPNPCVSKPCKNRGKCIWNGKAYRCKCAYGYGGRHC (SEQ ID

NO:15)

などのコンセンサス配列を1コピーまたは複数コピー含むことができる。例えば、イガイ接着ポリペプチドは、SEQ ID NO:15に示されるコンセンサス配列の2、4、5、6、7、8、9、10、または11のリピートを含む。ある場合には、SEQ ID NO:15の5、29、35および/また

10

20

30

40

50

は37位のチロシン残基はDOPA残基である。

【 0 0 4 3 】

ある場合には、mfp-3イガイ接着ポリペプチドは、  
ADYYGPNYGPPRRYGGGNYNRYGRRYGGYKGWNNGWNRRGKYW  
(SEQ ID NO:16)

などのコンセンサス配列を1コピーまたは複数コピー含むことができる。ある場合には、SEQ ID NO:16の3、4、8、14、19、22、25、29、32および/または47位のチロシン残基はDOPA残基である。

【 0 0 4 4 】

ある場合には、mfp-4イガイ接着ポリペプチドは、  
HVHTHRVLHK (SEQ ID NO:17)またはDDHVNDIAQTA (SEQ ID NO:18)

などのコンセンサス配列を1コピーまたは複数コピー含むことができる。例えば、イガイ接着ポリペプチドは、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:18に示されるコンセンサス配列の5、10、12、14、16、20、25、30、32、34、35、または36のリピートを含む。

【 0 0 4 5 】

ある場合には、mfp-5イガイ接着ポリペプチドは、  
SSEYKGGYYPGNAYHYSGGSYHGSGYHGGYKGKYYGKAKKYYYYKYKNS  
GKYKYLKKARKYHRKGYKYYGGSS (SEQ ID NO:19)

などのコンセンサス配列を1コピーまたは複数コピー含むことができる。ある場合には、SEQ ID NO:19の5、9、10、15、17、22、27、31、35、36、42、43、44、46、52、54、61、66、68および/または69位のチロシン残基はDOPA残基である。

【 0 0 4 6 】

ある場合には、mfp-6イガイ接着ポリペプチドは、  
GGGNYRGYCSNKGCRSGYIFYDNRGFCKYGSSTSYKYDCGNYACLPRNPYGR  
VKYYCTKKYSCPDDFYYNNKGYYYYNDKDYGCFNCGSYNGCCLRSGY  
(SEQ ID NO:20)

などのコンセンサス配列を1コピーまたは複数コピー含むことができる。ある場合には、SEQ ID NO:20の5、8、18、21、29、34、36、41、49、54、55、60、67、68、69、74、75、76、77、82、90および/または99位のチロシン残基はDOPA残基である。

【 0 0 4 7 】

ある場合には、図5～12のいずれかに示されるアミノ酸配列(SEQ ID NO:5～12)を有するか、または図4に示されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を有するイガイ接着ポリペプチドは、本明細書に記載するように使用することができる。

【 0 0 4 8 】

ある場合には、イガイ接着ポリペプチドは、完全長のイガイ接着ポリペプチドの一部であり得る。例えば、デカペプチド

AKPSYPPTYK (SEQ ID NO:13)

の6リピートを含むイガイ接着ポリペプチドは、本明細書に記載するように使用することができる。Kitamura et al., J. Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 37:729-736 (1991)を参照されたい。

【 0 0 4 9 】

ある場合には、本明細書に記載のよう使用することができるイガイ接着ポリペプチドは、MFP-3(例えば、SEQ ID NO:8)のN末端とC末端の両方に、MFP-1のデカペプチド(AKPSYPPTYK; SEQ ID NO:13)

の6リピートを含むキメラポリペプチドであり得る。Lim, et al., Biomaterials, 31:371

10

20

30

40

50

5-3722 (2010); およびHwang et al., *Biomaterials*, 28:3560-3568 (2007)を参照されたい。ある場合には、SEQ ID NO:13の6位および/または7位のプロリン残基は、ヒドロキシプロリン残基である。ある場合には、SEQ ID NO:13の5位および/または9位のチロシン残基は、DOPA残基である。

【0050】

ある場合には、本明細書に記載のように使用することができるイガイ接着ポリペプチドは、MFP-5(SEQ ID NO:6)のN末端とC末端の両方に、MFP-1のデカペプチド(AKPSYPPTYK; SEQ ID NO:13)

の6リピートを含むキメラポリペプチドであり得る。Lim, et al., *Biomaterials*, 31:371 10 5-3722 (2010); およびHwang et al., *Biomaterials*, 28:3560-3568 (2007)を参照されたい。ある場合には、SEQ ID NO:13の6位および/または7位のプロリン残基は、ヒドロキシプロリン残基である。ある場合には、SEQ ID NO:13の5位および/または9位のチロシン残基は、DOPA残基である。

【0051】

イガイ接着ポリペプチドは、各種タイプのイガイから抽出するか、またはポリペプチド発現技術(例えば、細菌細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞を用いた異種発現技術)を用いて組換え的に生産することができる。イガイから抽出されたイガイ接着ポリペプチドの製剤は、Cell-Tek社(カタログ番号354240)およびACRO Biosystems社(カタログ番号MAP-04 20 012)から市販されている。ある場合には、イガイ接着ポリペプチドは、他の文献に記載されるように作製することができる(例えば、Kitamura et al., *J. Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 37:729-736 (1991); Lim et al., *Biomaterials*, 31:3715-3722 (2010); およびHwang et al., *Biomaterials*, 28:3560-3568 (2007))。場合によっては、標準的なポリペプチド合成技術(例えば、液相ポリペプチド合成法または固相ポリペプチド合成法)を用いて、イガイ接着ポリペプチドを合成的に製造することができる。

【0052】

本明細書に記載のように使用することができる接着分子の他の例には、複数のDOPA残基を含むポリマーが含まれる。例えば、複数のDOPA残基を含む表1の接着分子を参照されたい。ある場合には、このようなポリマーは、コンセンサス配列

XYX<sub>4</sub>YX<sub>3</sub>YX<sub>3</sub>YYX<sub>5</sub>YYYXYX<sub>5</sub>YXYX<sub>6</sub>YX<sub>4</sub>YXY<sub>4</sub>YXYYX

の1または複数のリピートを有し、ここでXはリジン、グリシン、セリン、ヒスチジン、またはアスパラギンであり、Yはチロシンに代わるDOPAを指す。セリンが該ポリマー中に含まれる場合には、セリン残基の1個または複数個に代えてホスホセリン残基を使用することができる。例えば、SEQ ID NO:23～25のいずれかの接着分子では、セリン残基の1個または複数個の代わりにホスホセリン残基が使用される。ある場合には、接着分子は、DOPAおよびリジン残基のランダムな混合物、DOPA、リジン残基およびグリシン残基のランダムな混合物、またはDOPAおよびN5-(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミンのランダムな混合物を含むポリペプチドであり得る。例えば、Wang et al., *Biomaterials*, 28:3456-3468 (2007); およびAnderson et al., *Advanced Functional Materials*, 20:4196-4205 (2010) 30 を参照されたい。接着分子はまた、カテコールを含むポリアミノ酸であってもよい。例えば、米国特許第6,506,577号を参照されたい。このようなポリマーは、大きさが20～1000アミノ酸の長さの範囲であってよく、例えば、20～750、20～500、20～350、20～300、20～250、20～200、20～150、20～125、20～100、30～600、30～550、30～500、30～450、30～400、30～350、30～300、30～250、30～200、30～150、30～125、30～100、50～750、50～700、50～650、50～600、50～550、50～500、50～450、50～400、50～350、50～300、50～250、50～200、50～150、50～125、または50～100アミノ酸の長さである。

【0053】

適切なポリマーは、ペプチドまたは非ペプチド骨格をもつことができ、固相または液相合成によって合成することができる。このような合成技術は、高割合のDOPA(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超のDOPA、または40%超のDOPA)をポリマーに組み込ませることが可能である。

## 【0054】

(表1) 複数のDOPA残基を含む接着分子

| 接着分子、ここでYはL-DOPAを指す  | SEQ<br>.ID |
|--|------------|
| <u>KY</u> <u>KGKGY</u> <u>KGGY</u> <u>KGKYY</u> <u>GK</u> <u>KK</u> <u>YYY</u> <u>KY</u> <u>KG</u> <u>KG</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>G</u> <u>KK</u> <u>KG</u> <u>KY</u> <u>KG</u> <u>KY</u> <u>KY</u><br><u>YG</u>   | 21         |
| <u>KY</u> <u>KKKK</u> <u>KKKY</u> <u>KKK</u> <u>YY</u> <u>KKKK</u> <u>KK</u> <u>YY</u> <u>KY</u> <u>KKKK</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>KKKK</u> <u>KK</u> <u>YY</u><br><u>YK</u>  | 22         |
| <u>SY</u> <u>HGSGY</u> <u>HGGY</u> <u>KG</u> <u>KYY</u> <u>G</u> <u>KAKK</u> <u>YY</u> <u>KY</u> <u>KNSG</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>LKK</u> <u>KARK</u> <u>Y</u> <u>HRK</u> <u>GY</u> <u>KY</u><br><u>G</u>  | 23         |
| <u>SY</u> <u>SSSS</u> <u>SSSY</u> <u>KS</u> <u>SK</u> <u>YY</u> <u>SK</u> <u>KK</u> <u>YY</u> <u>KY</u> <u>K</u> <u>SS</u> <u>SK</u> <u>KY</u> <u>SS</u> <u>KS</u> <u>SY</u> <u>KY</u> <u>YS</u>   | 24         |
| <u>GY</u> <u>SGK</u> <u>NY</u> <u>HGS</u> <u>Y</u> <u>KG</u> <u>KYY</u> <u>H</u> <u>KH</u> <u>KK</u> <u>YY</u> <u>KY</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>G</u> <u>KK</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>KY</u> <u>GG</u> <u>K</u> <u>GY</u> <u>KY</u><br><u>YH</u> | 25         |
| <u>KY</u> <u>KY</u> <u>KYY</u> <u>KK</u> <u>YY</u> <u>KY</u> <u>KYY</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>KY</u><br><u>YY</u>   | 26         |
| <u>KY</u> <u>KG</u> <u>GG</u> <u>KGGY</u> <u>KG</u> <u>KGY</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>GK</u> <u>KG</u> <u>KY</u> <u>L</u> <u>KK</u> <u>KG</u> <u>KG</u> <u>KY</u> <u>KG</u><br><u>YG</u>   | 27         |
| <u>KY</u> <u>KKKK</u> <u>KKKY</u> <u>KKK</u> <u>YY</u> <u>KKKK</u> <u>KK</u> <u>YY</u> <u>KY</u> <u>KKKK</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>KKKK</u> <u>KK</u> <u>YY</u><br><u>YK</u>  | 28         |
| <u>KK</u> <u>GG</u> <u>YY</u> <u>KG</u> <u>KY</u> <u>KY</u> <u>G</u> <u>KK</u> <u>KK</u> <u>GG</u> <u>YY</u> <u>GG</u> <u>KY</u> <u>Y</u> <u>GG</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>YY</u> <u>KG</u> <u>KY</u> <u>Y</u> <u>GY</u> <u>KY</u><br><u>KK</u>                              | 29         |

10

20

30

40

50

## 【0055】

接着分子は、複数のDOPA残基を含むポリ(アクリル酸)骨格をもつことができる。例えば、接着分子は、側鎖として結合された複数のDOPA残基、および任意で複数のリジン残基、を含むポリ[ブタジエン-コ-(マレイン酸)]またはポリ[エチレン-コ-(マレイン酸)]骨格を有する。例えば、Laulicht et al., Macromol. Biosci., 12:1555-1565 (2012)を参照されたい。複数のDOPA残基を含むこのようなポリマーは、塩基性pH値で可溶性である。リジン残基の付加は、酸性および塩基性の両方の値での溶解度を上げることができる。接着分子は、複数のDOPA残基、および任意で複数のリジン残基、が組み込まれたポリメタクリレート骨格をもつことができる。Kim et al., J. Porous Mater., 20:177-182 (2013)を参照されたい。複数のDOPA残基を含むポリメタクリレートポリマーは、酸性および塩基性の両方のpH値で可溶性であり得る。

## 【0056】

ある場合には、接着分子は、DOPA含有ポリペプチドまたはポリ(ドーパミン)ポリマーであり得る。例えば、Fuller et al., Biopolymers, 17:2939-2943 (1998); およびLee et al., Adv. Mater., 21:431-434 (2009)を参照されたい。ポリ(ドーパミン)ポリマーは、例えば現場重合により、調製することができる。

## 【0057】

ある場合には、接着分子は、DOPAを末端に結合させたポリエチレングリコールであり得る。例えば、Dalsin et al., J. Am. Chem. Soc., 125:4253-4258 (2003)を参照されたい。

## 【0058】

ある場合には、接着分子および他の分子(例えば、ポリペプチド、核酸、蛍光部分、抗生素または他の薬剤)は、基体(例えば、生物学的または非生物学的基体)に順次適用す

ことができる。例えば、接着分子および1種または複数種のポリペプチド(例えば、蛍光または非蛍光ポリペプチド)を順次適用することができ、すなわち、接着分子を(乾燥条件下、湿潤条件下、または歯の上の唾液などの口中に通常見られる条件下で)歯に適用し、その後1種または複数種のポリペプチドを適用することができる。

【0059】

ある場合には、接着分子および他の分子(例えば、ポリペプチド、核酸、蛍光部分、抗生物質または他の薬剤)は、一緒に適用することができ、例えば、接着分子と他の分子が互いに結合される(例えば、互いにコンジュゲートされる)。例えば、接着分子と蛍光発光ポリペプチドとが互いにコンジュゲートされるか、または接着分子と非蛍光ポリペプチドとが互いにコンジュゲートされる。蛍光発光ポリペプチドは、蛍光が歯から発せられるように、(乾燥条件下、湿潤条件下、または歯の上の唾液などの口中に通常見られる条件下で)歯に適用される。ある場合には、非蛍光ポリペプチドと接着分子とが互いにコンジュゲートされ、別の化合物(例えば、ホワイトニング粒子または治療剤)が歯に送達され得るように、乾燥条件下、湿潤条件下、または歯の上の唾液などの口中に通常見られる条件下で歯に適用される。非蛍光ポリペプチドは、例えば、コラーゲンまたはアルブミンであり得る。

【0060】

適切な蛍光発光ポリペプチドはどれも使用することができる。例えば、より白く見える歯を持つことが望みであれば、青色蛍光を発するポリペプチドが人の歯に適用され得る。このような青色蛍光は、約440nm～約500nm(例えば、約450nm～約500nm、約460nm～約500nm、約470nm～約500nm、約480nm～約500nm、約440nm～約490nm、約440nm～約480nm、約440nm～約470nm、約440nm～約460nm、約450nm～約490nm、または約460nm～約480nm)の発光波長をもつことができる。ある場合には、約420nm～約450nm、約430nm～約450nm、約440nm～約450nm、約420nm～約440nm、または約485nm～約505nmの発光波長で蛍光を発する蛍光発光ポリペプチドは、本明細書に記載するように歯に適用され得る。

【0061】

異なる色の歯を持つことが望みであれば、赤色、緑色または黄色スペクトルで蛍光を発するポリペプチドが人の歯に適用され得る。赤色蛍光は、約555nm～約655nm(例えば、約565nm～約645nm、約575nm～約635nm、または約585nm～約625nm)の発光波長をもつことができる。緑色蛍光は、約500nm～約525nm(例えば、約505nm～約520nmまたは約510nm～約515nm)の発光波長をもつことができる。黄色蛍光は、約525nm～約555nm(例えば、約530nm～約550nmまたは535nm～約545nm)の発光波長をもつことができる。ある場合には、異なる蛍光発光ポリペプチドの組み合わせが人の歯に適用され得る。例えば、BFPポリペプチドと赤色蛍光タンパク質(RFP)ポリペプチドの組み合わせを人の歯に適用することができる。場合により、RFPポリペプチドと緑色蛍光タンパク質(GFP)ポリペプチドの組み合わせを人の歯に適用してもよい。

【0062】

適切なBFPポリペプチドはどれも、本明細書に記載されるように使用することができる。本明細書に記載のように使用できるBFPポリペプチドの例としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：EBFP(例えば、460nmの発光最大を有するEBFP)、蛍光タンパク質SBFP1(GenBank(登録商標)アクセッション番号ABM97856; GI番号124264536)、蛍光タンパク質SBFP2(GenBank(登録商標)アクセッション番号ABM97857, GI番号124264538)、EBFP2(GenBank(登録商標)アクセッション番号EF517318, GI番号145666498)、アズライト(Azurite)(Mena et al., *Nature Biotechnology*, 24:1569-1571 (2006))、mKalama1(GenBank(登録商標)アクセッション番号EF517317, GI番号145666496)、亜鉛フィンガータンパク質383(GenBank(登録商標)アクセッション番号EDU39924.1, GI番号187972425)、米国特許第7,166,424号に記載されるSEQ ID NO:445(GenBank(登録商標)アクセッション番号ABN30727.1; GI番号125148618)、可溶変性青色蛍光タンパク質(smBFP)(GenBank(登録商標)アクセッション番号U70497.1; GI番号1619752)、GenBank(登録商標)アクセッション番号CAE00365.1(GI番号32260521)に示される配列を有するポリペプチド、GenBank(登録商標)アクセッシ

10

20

30

40

50

ヨン番号CAE00361.1(GI番号32260509)に示される配列を有するポリペプチド、GenBank(登録商標)アクセッショング番号CAE00361.1(GI番号32260509)に示される配列を有するポリペプチド、ECFPポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号AC048275.1; GI番号226331138)、Ceruleanポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ADE48834.1; GI番号293612838)、蛍光タンパク質Cypetポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号3GEX\_A; GI番号290789997)、MiCyポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ADE48830.1; GI番号293612833)、およびmTFP1蛍光タンパク質ポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号AC048263.1; GI番号226320339)。ある場合には、米国特許出願公開第2010/0062460号に記載されるBFPポリペプチドは、本明細書に記載のように使用することができる。

10

## 【0063】

適切なRFPポリペプチドおよびGFPポリペプチドはどれも、本明細書に記載のように使用することができる。本明細書に記載のように使用できるRFPポリペプチドの例としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：可溶変性赤色シフト緑色蛍光タンパク質(s-mRSGFP)ポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号U70496.1; GI番号1619750)、GenBank(登録商標)アクセッショング番号AAG16224.1(GI番号10304307)；AB038175.1(GI番号133753343)；またはAAU06852.1(GI番号51593130)に示される配列を有する赤色蛍光タンパク質ポリペプチド、オレンジ色発光Gfp様タンパク質ポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号2ZMW\_D; GI番号209870302)、mOrange蛍光タンパク質ポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号AC048285.1; GI番号226331152)、NLS-dTomatoポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ADC42843.1; GI番号288188779)、赤色蛍光タンパク質tdTomatoポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ACQ43939.1; GI番号228484713)、DsRedポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号BAE53441.1; GI番号83016748)、DsRed2ポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号AAV73970.1; GI番号56119204)、DsRed-Expressポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ACU30027.1; GI番号255689290)、DsRed-Monomerポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ACF35425.1; GI番号194245628)、単量体オレンジ-赤色蛍光タンパク質ポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号AAV52170.1; GI番号55420625)、単量体オレンジ-赤色蛍光タンパク質ポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号AAV52166.1; GI番号55420617)、mCherryポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ACY24904.1; GI番号262089840)、米国特許第7,393,923号に記載のSEQ ID NO:3のアミノ酸配列を有するポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ACH06540.1; GI番号197013979)、および米国特許第7,393,923号に記載のSEQ ID NO:5のアミノ酸配列を有するポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ACH06541.1; GI番号197013980)。

20

## 【0064】

本明細書に記載のように使用できるGFPポリペプチドの例としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：可溶変性緑色蛍光タンパク質(smGFP)ポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号U70495.1; GI番号1619748)、変性緑色蛍光タンパク質GFP-ER (mfp4-ER)ポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号U87625.1; GI番号1842446)、GFPポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ACJ06700.1, GI番号210076685)、増強GFPポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ACV20892.1; GI番号256708579)、turboGFPポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ADD23343.1; GI番号290131407)、VisGreen GFPポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号ABR26680.1; GI番号149393496)、およびアザミ-グリーン(Azami-Green)ポリペプチド(GenBank(登録商標)アクセッショング番号BAD52001.1; GI番号52839539)。

30

## 【0065】

ある場合には、蛍光発光ポリペプチド、例えばSubachら(Chem. Biol., 15:1116-1124 (2008))により記載されたものは、本明細書に記載のように使用することができる。さらに、GenBank(登録商標)アクセッショング番号3M24\_A(GI番号296863586)、GenBank(登録商標)アクセッショング番号3M24\_B(GI:296863587)、GenBank(登録商標)アクセッショング番号3M24\_

40

50

C(GI:296863588)、およびGenBank(登録商標)アクセッション番号3M24\_D(GI:296863589)を参照されたい。本明細書に記載のように使用できる蛍光発光ポリペプチドのさらなる例としては、限定するものではないが、他の文献に記載されるものが含まれる(Alieva et al., PLoS ONE, 3(7):e2680 (2008)およびChudakov et al., Physiol. Rev., 90:1103-1163 (2010))。例えば、Alievaらの文献の表1、ならびにChudakovらの文献の図5、10、12および14を参照されたい。ある場合には、サンゴ蛍光発光ポリペプチドを本明細書に記載のように使用することができる。ある場合には、図2もしくは3に示されるアミノ酸配列を有するか、または図1に示される配列によりコードされるアミノ酸配列を有する蛍光発光ポリペプチドを、本明細書に記載のように使用することができる。

## 【0066】

10

任意の適切な方法を用いて、ポリペプチド(例えば、蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチド)を作製することが可能である。例えば、ポリペプチド発現技術(例えば、細菌細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞を用いた異種発現技術)を用いて、ポリペプチドを作製することができる。ある場合には、BFPポリペプチドなどの蛍光発光ポリペプチドは、他の文献に記載されるように作製され得る(Yakhnin et al., Protein Expr. Purif., 14:382-386 (1998)およびJain et al., J. Chromatography A, 1035:83-86 (2004))。ある場合には、標準的なペプチド合成技術(例えば、液相ポリペプチド合成法または固相ポリペプチド合成法)を用いて、ポリペプチド(例えば、蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチド)を合成的に製造することができる。

## 【0067】

20

ポリペプチドは、イガイ接着ポリペプチドまたは複数のDOPA残基を含むポリマーなどの接着分子に、共有結合または非共有結合で結合させることができる。任意の適切な方法を用いて、蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドを、歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力がある接着分子(例えば、ポリペプチドまたはポリマー)に共有結合または非共有結合で結合させることができる。例えば、BFPポリペプチドなどの蛍光発光ポリペプチドまたはコラーゲンもしくはアルブミンなどの非蛍光ポリペプチドは、イガイ接着ポリペプチドまたはポリマーなどの接着分子に、1つまたは複数の配位共有結合、共有結合、ジスルフィド結合、高エネルギー結合、水素結合、イオン結合、またはペプチド結合を介して化学的にコンジュゲートされ得る。ある場合には、蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドは、歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力があるポリペプチド(例えば、イガイ接着ポリペプチドまたは複数のDOPA残基を含む他のポリペプチド)上に存在するアミン基に、化学的にコンジュゲートされ得る。このようなアミン基は、該ポリペプチドのN末端、該ポリペプチドのC末端、または該ポリペプチドのN末端とC末端の中間に位置することができる。

## 【0068】

30

ある場合には、コンジュゲートされるポリペプチドは、コンジュゲーションの前に活性化され得る。例えば、ポリペプチド(例えば、接着分子、蛍光発光ポリペプチド、または非蛍光ポリペプチド)は、反応性チオール基を組み込むことにより活性化することができる(例えば、Traut's試薬などの2-イミノチオランとの反応によるか、または一端にN-スクシンイミジル3-(2-ビリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)部分を含みかつ他端にN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを含むポリエチレングリコールポリマーとの反応、およびチオールを活性化するためのジチオスレイトール(DTT)などの還元剤でのSPDP部分の切断による)。例えば、イガイ接着ポリペプチドは、他の文献に記載されるように(McCall et al., Bioconjugate Chem., 1:222-226 (1990))、2-イミノチオラン(例えば、Traut's試薬)と反応させることによってチオール化され得る。この反応条件は、コンジュゲーションが歯への結合を妨げる可能性を低減するために、1または2個のチオールで活性化された分子の収量を最大にするように変えることができる。チオールの組み込みの程度は、他の文献に記載されるように(Lacy et al., Analytical Biochemistry, 382:66-68 (2008))、高感度蛍光アッセイを用いて測定することができる。

## 【0069】

40

50

接着分子またはポリペプチド(例えば、蛍光発光ポリペプチドもしくは非蛍光ポリペプチド)は、該ポリペプチドのアミンを、マレイミド基と反応性N-ヒドロキシスルキニミドエステルを含む2官能性試薬(例えば、一端にマレイミド基を含み、他端に反応性N-ヒドロキシスルキニミドエステルを含むポリエチレングリコールポリマー)と反応させることによって、1個または複数個のマレイミド基で置換することができる。マレイミドで置換された蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチドは、その後、歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力があるポリペプチドのチオール基にコンジュゲートされ得る。ある場合には、マレイミドで置換された接着分子がポリペプチドのチオール基にコンジュゲートされてもよい。ポリペプチド(例えば、蛍光発光ポリペプチドもしくは非蛍光ポリペプチド)または接着分子がマレイミド基で置換される程度は、他の文献に記載されるように(Singh, *Bioconjugate Chem.*, 5:348-351 (1994))変えることができる。

10

#### 【0070】

蛍光発光または非蛍光ポリペプチドを、歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力がある分子(例えば、ポリペプチド)にコンジュゲートするために使用できるコンジュゲーション法のさらなる例には、限定するものではないが、他の文献に記載される方法(例えば、Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques*, 第2版, 2008, Elsevier)が含まれる。例えば、パートI、セクション4およびパートII、セクション5を参照されたい。

20

#### 【0071】

ある場合には、本明細書に記載の方法および材料を用いて得られる蛍光シグナルは、歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力がある単一の分子(例えば、ポリペプチド)に、多数の蛍光発光ポリペプチドを連結することによって、増強することができる。立体効果のため、この増幅は、最初に、多数の蛍光発光ポリペプチドを含むポリマーを調製し、次に、このポリマーを、歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力がある接着分子(例えば、イガイ接着ポリペプチド)に連結することによって、効果的に達成することができる。ある場合には、カゼインポリペプチドなどのポリペプチドに多数の蛍光発光ポリペプチドを連結させたポリマーを形成し、このポリマーを接着分子と共に適用することができる。多数の蛍光発光ポリペプチドを含むポリマーを形成するために使用できる方法(例えば、重合方法)の例には、限定するものではないが、他の文献に記載される方法が含まれる(例えば、Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques*, 第2版, 2008, Elsevier)。例えば、パートII、セクション25を参照されたい。さらに、米国特許出願公開第2010/0203533号；カゼインポリペプチドへのコンジュゲーションを記述するセクションを含む、米国特許出願公開第2013/0022555号；米国特許第4,657,853号；およびHoshino et al., *J. Biochem.* 102:785-791 (1987)を参照されたい。

30

#### 【0072】

複数のマレイミド基で活性化された接着分子を、複数のチオール基を含む蛍光発光もしくは非蛍光ポリペプチドにコンジュゲートすると、単量体の接着分子-ポリペプチドコンジュゲートだけでなく、異なる数の接着分子とポリペプチドを含むオリゴマー類が生成され得る。このような共有結合で連結されたオリゴマー類の分子量分布は、変性条件下でのゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって決定することができる。該生成物の分子量分布は、接着分子とポリペプチドが活性化される程度、コンジュゲーション反応のpH(例えば、約pH5～約pH7、例えばpH5～6)、およびコンジュゲーション反応中の接着分子：ポリペプチドの比率など、いくつかの要因に依存する。ある態様では、約200,000ダルトンを超える分子量を有する接着分子：蛍光分子オリゴマーは、ヒドロキシアパタイトとの複合体の形成後に、歯を白くする能力の低下を示すことがある。

40

#### 【0073】

異なる数の接着分子とポリペプチドを含むオリゴマー類の分子量分布に加えて、このようなオリゴマー類は、凝集と呼ばれるプロセスにおいて、非共有結合性の相互作用を介して会合することがある。オリゴマー類の凝集状態は、未変性条件下でのサイズ排除クロマトグラフィー分析によって測定することができる。ある態様では、凝集はホワイトニングに影響を与える可能性がある。したがって、凝集を最小限にとどめるため、コンジュゲー

50

ション反応のpH、保存pH、およびイオン強度などの要因、ならびに接着分子とポリペプチド(例えば、蛍光発光または非蛍光ポリペプチド)の濃度および活性化の程度が調整され得る。一般的には、コンジュゲーション反応のpHが約pH5～約pH6である場合、およびコンジュゲーション反応が約pH5～約pH6.0のpHで保存される場合に、凝集は減少する。凝集はまた、一般的に、イオン強度が>5mM、例えば50mM、である場合に最小限に抑えられる。接着分子および蛍光発光ポリペプチドもしくは非蛍光ポリペプチドの、例えば、<1mg/mL、<0.5mg/mL、<0.2mg/mL、または<0.1mg/mLといった、低濃度もまた、凝集を最小限にとどめることができる。

#### 【0074】

また、接着分子とポリペプチド(例えば、蛍光発光ポリペプチドもしくは非蛍光ポリペプチド)とのコンジュゲーション反応は、得られるコンジュゲートが口中で通常見られる条件下で(例えば、1～7日間、または1週間または複数週間、例えば2、3、4週間もしくはそれ以上)安定であり、かつ酸化または変色を起こさないように実施される。

#### 【0075】

ある場合には、蛍光発光ポリペプチドは、歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力があるポリペプチドとの融合またはキメラポリペプチドとして作製することができ、その結果、該融合またはキメラポリペプチドは、蛍光を発する能力と、歯、歯成分もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力との両方を持ち合わせる。例えば、異種ポリペプチド発現技術または合成ポリペプチド合成技術を用いて、完全長の蛍光発光ポリペプチドまたはその断片のアミノ酸配列と、歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力がある接着分子(例えば、イガイ接着ポリペプチドもしくは複数のDOPA残基を含むポリマーなどの接着分子)のアミノ酸配列とを有する、单一のポリペプチド鎖を作製することができる。例えば、キメラポリペプチドは、完全長の蛍光発光ポリペプチドもしくは完全長の蛍光発光ポリペプチドと少なくとも約90%同一であるその断片、および接着分子(例えば、完全長のイガイ接着ポリペプチドもしくは完全長のイガイ接着ポリペプチドと少なくとも約80%同一であるその断片、または表1に示されるポリマーなどの、複数のDOPA残基を含むポリマー)を含むことができる。

#### 【0076】

ある場合には、单一のポリペプチド鎖は、(a)蛍光発光ポリペプチドのアミノ酸配列と、これに続く歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力があるポリペプチドのアミノ酸配列、または(b)歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力があるポリペプチドのアミノ酸配列と、これに続く蛍光発光ポリペプチドのアミノ酸配列を有する。ある場合には、单一のポリペプチド鎖は、各配列が蛍光発光ポリペプチドをコードする、1つまたは複数(例えば、1、2、3、4または5つ)のアミノ酸配列、および各配列が歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力のあるポリペプチドをコードする、1つまたは複数(例えば、1、2、3、4または5つ)のアミノ酸配列を有する。

#### 【0077】

ある場合には、本明細書に記載の融合またはキメラポリペプチドは、他のアミノ酸配列(例えば、スペーサーまたは結合残基)を含むことができる。例えば、蛍光発光ポリペプチドのアミノ酸配列、および歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力があるポリペプチドのアミノ酸配列を有する、融合またはキメラポリペプチドは、1個または複数個の追加のアミノ酸残基、例えば、グリシン、リジン、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、プロリン、ヒスチジン、バリン、セリン、チロシン、オルニチン、タウリン、ピロリジン、もしくはセレノシステイン残基、またはアミノ酸誘導体(例えば、5-ヒドロキシトリプトファン、L-ジヒドロキシフェニルアラニン、もしくは-D-ジフルオロメチルオルニチン)を含むことができる。このような追加のアミノ酸残基は、スペーサー(例えば、一連の5個以上のグリシン残基)であるように設計されるか、ポリペプチドまたは他の分子を該融合またはキメラポリペプチドに化学的にコンジュゲートすることができるよう設計され得る。例えば、蛍光発光ポ

10

20

30

40

50

リペプチドのアミノ酸配列、および歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力があるポリペプチドのアミノ酸配列を有する、融合またはキメラポリペプチドは、歯もしくは歯成分と相互作用または結合する能力を有する1種または複数種のポリペプチド(例えば、イガイ接着ポリペプチド)が該融合またはキメラポリペプチドに化学的にコンジュゲートされ得るように、1、2、3、4、5個またはそれ以上の追加のリジン残基を含むことができる。

【0078】

本明細書に記載の方法は、歯により白い外観を与えるおよび/または再石灰化粒子を歯に結合させることを目的として、例えば、ヒドロキシアパタイト、置換ヒドロキシアパタイト、非晶質リン酸カルシウム、またはフッ化物、カルシウム、マグネシウム、リン酸、鉄、もしくは錫イオン、およびその任意の塩形態(例えば、ヘキサメタリン酸ナトリウム、塩化マグネシウム、硫酸第一鉄)で構成される、ホワイトニング粒子および/または再石灰化粒子を歯に適用するために、接着分子と非蛍光ポリペプチドを使用することを含むことができる。

10

【0079】

本明細書に記載の方法は、歯により白い外観を与えるおよび/または再石灰化粒子を歯に結合させるために、蛍光発光ポリペプチドの代わりに、または該ポリペプチドに加えて、ホワイトニング粒子または再石灰化粒子を歯に適用することを含むことができる。

【0080】

ホワイトニング粒子は、ナノ粒子もしくはマイクロ粒子、またはナノ粒子もしくはマイクロ粒子の凝集体とすることができます、大きさは1ナノメートル(nm)から100マイクロメートル(μm)までのサイズ範囲、例えば、1nm～50μm、1nm～20μm、5nm～20μm、10nm～20μm、1nm～10μm、5nm～10μm、10nm～10μm、1nm～1μm、5nm～1μm、10nm～1μm、100nm～1μm、1nm～500nm、1nm～250nm、1nm～125nm、1nm～100nm、1nm～75nm、1nm～50nm、5nm～500nm、5nm～250nm、5nm～125nm、5nm～100nm、5nm～75nm、5nm～50nm、5nm～20nm、10nm～150nm、10nm～125nm、10nm～100nm、10nm～75nm、10nm～50nm、50nm～150nm、または50nm～125nmのサイズとすることができます。ホワイトニング粒子は、ヒドロキシアパタイトまたは二酸化チタンで構成することができます。他の有用なホワイトニング粒子は、二酸化ケイ素、ケイ酸ジルコニウム、リン酸カルシウム、または酸化亜鉛で構成することができます。例えば、Photochem. Photobiol. Sci., 9, 495-509 (2010); および米国特許第6,004,567号を参照されたい。場合により、ヒドロキシアパタイトで構成されたホワイトニング粒子は再石灰化粒子でもある。

20

【0081】

ある場合には、接着分子とホワイトニング粒子(または再石灰化粒子などの他の化合物)は順次適用され、すなわち、接着分子が歯に適用された後で、ホワイトニング粒子(または他の化合物)が適用され得る。ある場合には、接着分子とホワイトニング粒子(または他の化合物)が同時に適用され得る。ある場合には、接着分子と非蛍光ポリペプチドとホワイトニング粒子が順次適用され得る。ある場合には、接着分子と蛍光発光ポリペプチドとホワイトニング粒子が順次適用され得る。ある場合には、接着分子と非蛍光ポリペプチドとホワイトニング粒子が同時に適用され得る。ある場合には、接着分子と蛍光発光ポリペプチドとホワイトニング粒子が同時に適用され得る。例えば、ホワイトニング粒子は、接着分子と蛍光発光ポリペプチドを含むコンジュゲートに結合されて、ホワイトニング粒子とコンジュゲートを含む複合体が歯に適用される。ある場合には、蛍光発光ポリペプチドと組み合わせたホワイトニング粒子の使用は、歯のより白い外観を均一にするのに役立ち得る。

30

【0082】

二酸化チタンまたは他の粒子を使用する場合には、該粒子を、二酸化チタンに非特異的に結合する、アルブミンまたは免疫グロブリンなどの1種または複数種の血清タンパク質で(例えば、該粒子を血清と共にインキュベートすることによって)コーティングし、そのコーティング粒子を接着分子(例えば、複数のDOPA残基を含むポリマー)と組み合わせて適

40

50

用することができる。ある場合には、血清タンパク質を活性化して、接着分子/蛍光発光ポリペプチドコンジュゲートに化学的にコンジュゲートし、その後、血清タンパク質、接着分子および蛍光発光ポリペプチドを含むコンジュゲートを、二酸化チタン粒子などのホワイトニング粒子に結合させることができる。

【0083】

接着分子および1種または複数種の他の分子を含有する本明細書に記載の組成物(例えば、抗生物質または他の治療用分子、例えばインスリンもしくはヒト成長ホルモンなど、に結合された接着分子を含有する組成物)は、このような他の分子(複数可)を体内の特定の位置に送達するために対象者に投与することができる。例えば、接着分子と抗生物質を含有する組成物は、ジェル、マウスリンス、マウスウォッシュ、またはデオドラントとして処方することができる。ある場合には、該組成物は1種または複数種の医薬品添加剤を含んでもよい。

10

【0084】

接着分子および蛍光発光ポリペプチドを含有する本明細書に記載の組成物(例えば、蛍光発光ポリペプチド/イガイ接着ポリペプチドのコンジュゲート、または蛍光発光ポリペプチド/イガイ接着ポリペプチドの融合ポリペプチドを含有する組成物)は、歯の外観を変化させるために、乾燥または湿潤条件下で歯に適用することができる。ある場合には、該組成物は口中に見られる典型的な条件下(例えば、唾液の存在下)で適用され得る。接着分子およびホワイトニング粒子を含有する本明細書に記載の組成物(例えば、接着分子および二酸化チタンまたはヒドロキシアパタイトナノ粒子を含有する組成物)は、歯の外観を変化させるために、乾燥または湿潤条件下で歯に適用され得る。

20

【0085】

接着分子と非蛍光ポリペプチドと他の化合物(例えば、ホワイトニング粒子、再石灰化粒子、ポリペプチド、核酸、治療剤、またはこれらの組み合わせ)を含有する本明細書に記載の組成物は、歯の外観を変化させるために、乾燥または湿潤条件下で歯に適用することができる。例えば、ヒドロキシアパタイト粒子と、非蛍光ポリペプチド/イガイ接着ポリペプチドコンジュゲートまたは非蛍光ポリペプチド/複数のDOPA残基を含む接着分子とを含有する組成物は、歯の外観を変化させるおよび/または再石灰化粒子を結合させるために、乾燥または湿潤条件下で歯に適用され得る。ある場合には、該組成物は口中に見られる典型的な条件下(例えば、唾液の存在下)で適用され得る。

30

【0086】

接着分子と蛍光発光ポリペプチドとホワイトニング粒子を含有する本明細書に記載の組成物は、歯の外観を変化させるために、乾燥または湿潤条件下で歯に適用することができる。例えば、ヒドロキシアパタイト粒子と、蛍光発光ポリペプチド/イガイ接着ポリペプチドコンジュゲート、蛍光発光ポリペプチド/複数のDOPA残基を含む接着分子、または蛍光発光ポリペプチド/イガイ接着ポリペプチド融合ポリペプチドとを含有する組成物は、歯の外観を変化させるために、乾燥または湿潤条件下で歯に適用され得る。例えば、二酸化チタン粒子を血清タンパク質でコーティングするために血清中でインキュベートされた二酸化チタン粒子と、蛍光発光ポリペプチド/接着分子コンジュゲートまたは蛍光発光ポリペプチド/接着分子融合ポリペプチドとを含有する組成物は、歯の外観を変化させるために、乾燥または湿潤条件下で歯に適用され得る。ある場合には、該組成物は口中に見られる典型的な条件下(例えば、唾液の存在下)で適用され得る。

40

【0087】

任意の適切な方法を用いて、本明細書に記載の組成物を歯に送達することができる。例えば、本明細書に記載の組成物は、練り歯磨き、マウスウォッシュ、マウスリンス、飲料もしくは食品などの摂取可能な物質、ガム(例えば、チューインガム)、ジェル(外用塗布ジェル)、粉末、またはクリームの中に組み込むことができる。場合により、該組成物は1種または複数種の医薬品添加剤を含んでもよい。例えば、接着分子、ポリペプチドおよびホワイトニング粒子を含有する練り歯磨き、または本明細書に記載の別の組成物を含有する練り歯磨きは、1種または複数種の増粘剤(例えば、鉱物コロイドまたはポリエチレン

50

リコール(PEG)）、緩衝剤、界面活性剤、フッ化物、香味料(例えば、ペパーミント、スペアミント、ウインターグリーン、またはバブルガム)、糖アルコール(例えば、ソルビトール、グリセロール、またはキシリトール)、感受性軽減剤(例えば、硝酸カリウム)、および/または抗細菌剤(例えば、トリクロサンまたは塩化亜鉛)を含むことができ、これらは歯のホワイトニングおよび/または歯への再石灰化粒子の結合を妨害しないものである。

【0088】

ある場合には、歯の外観を変化させるように、接着分子およびポリペプチド(例えば、蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチド)および/またはホワイトニング粒子の有効量を歯に送達することができる。

【0089】

ある場合には、歯の外観を変化させる(例えば、歯の外観がより白くなる、および/または再石灰化粒子が歯に結合される)ように、本明細書に記載の組成物の有効量を歯に送達することができる。接着分子、ポリペプチド、および/またはホワイトニング粒子もしくは他の化合物、つまり本明細書に記載の組成物の有効量は、有意な毒性を誘発することなく、歯の外観を変化させる(例えば、歯の外観がより白くなる、および/または再石灰化粒子が歯に結合される)任意の量とすることができます。例えば、本明細書に記載の組成物は、練り歯磨き、マウスリンス、またはジェル製品中に、練り歯磨きのグラムあたり約0.0001mg～約100mg(例えば、約0.001mg～約100mg、約0.01mg～約100mg、約0.1mg～約100mg、約0.5mg～約100mg、約0.5mg～約50mg、約0.5mg～約25mg、約1mg～約100mg、約1mg～約50mg、または約1mg～約25mg)のポリペプチド(例えば、蛍光発光ポリペプチドまたは非蛍光ポリペプチド)をもたらす量で組み込むことができる。この量は、特定の処方物、例えばマウスウォッシュでは、より高くなてもよいことが理解されよう。

10

20

30

40

50

【0090】

ある場合には、本明細書に記載の組成物は、歯の外観を変化させる(例えば、歯の外観がより白くなる)ように、洗浄する前、飲み込む前、または吐き出す前のある時間にわたり歯に適用され得る。例えば、接着分子およびポリペプチドおよび/またはホワイトニング粒子もしくは本明細書に記載の他の化合物を含むように構成された練り歯磨きまたは外用剤は、歯に適用して(例えば、直接適用して)、すぐことなく、これらの歯との接触を30秒～10分(30秒～5分、30秒～2.5分、30秒～2分、1分～10分、2分～10分、または1分～5分)にわたり維持される。マウスウォッシュ、マウスリンス、外用塗布ジェルまたは摂取物質を用いるような場合には、該組成物が歯または歯成分を飽和させる時間にわたって、該組成物を歯と接触させておく。本明細書に記載の組成物は、湿潤または乾燥条件下で歯に適用することができる。

【0091】

ある場合には、本明細書に記載の組成物を送達する前に、人の歯を準備しておくことができる。例えば、本明細書に記載の組成物を送達する前に、人の歯を洗浄する、(例えば、超音波歯ブラシで)ブラッシングする、または磨く(例えば、軽石で磨く)ことができる。例えば、超音波歯ブラシでのブラッシングは、歯周囲のペリクルを破壊し、かつホワイトニングを高めるのに役立つことがある。ある場合には、処置される歯の表面を、リン酸カルシウム結合部位を露出させることができ1種または複数種の薬剤で処理することができる。例えば、本明細書に記載の組成物で処置される歯をEDTAまたはリン酸と接触させて、その歯の上に存在するリン酸カルシウム結合部位を露出させることができる。リン酸処理の場合には、軟組織の損傷を予防するか、またはそのリスクを低減するために、歯のエナメル質のみを該酸にさらすことができる。

【0092】

ある場合には、2段階以上のプロセスを用いて、接着分子およびポリペプチド(例えば、非蛍光ポリペプチドまたは蛍光発光ポリペプチド)または他の化合物を歯に適用することができる。例えば、歯、歯成分、もしくは無機歯科材料と相互作用または結合する能力がある接着分子(例えば、イガイ接着ポリペプチド、または複数のDOPA残基を含むポリマー)を含有する組成物を、処置される歯に1段階として送達し、その後に、該接着分子と相互

作用または結合する能力がある、例えば、蛍光発光ポリペプチド、非蛍光ポリペプチド、ホワイトニング粒子、または再石灰化粒子を送達する段階が続く。ある場合には、これらの2段階は、蛍光発光ポリペプチドから分離して該分子を含有する単一の組成物を用いて、または一方の組成物が接着分子を含有し、もう一方の組成物が蛍光発光ポリペプチドを含有する別個の組成物を用いて、同時に行うことができる。

#### 【0093】

ある場合には、本明細書に記載の組成物または本明細書に記載の組成物の成分(例えば、イガイ接着ポリペプチド、または複数のDOPA残基を含むポリマー)が歯、歯成分、もしくは無機歯科材料に対する結合親和性を有することを確認するために、アッセイを実施することができる。例えば、試験される材料をヒドロキシアパタイト(HA)マトリックスとインキュベートし、HA結合後の溶液中の材料の量を初期濃度と比較して、結合した材料の量を、差によって、決定することができる。例えば、Raj et al., J. Biol. Chem., 267:59 68-5976 (1992)を参照されたい。ある場合には、HAに結合した材料は、該HAマトリックスをEDTAで溶解させた後に直接測定することができる(Lamkin et al., J. Dent. Res., 75: 803-808 (1996))。ポリペプチド材料の場合には、溶液中の該ポリペプチドの濃度は、ビシンコニン酸アッセイおよび/またはオルト-フタルアルデヒドアミンアッセイを用いて測定することができる。結合定数は、Langmuirモデルを用いて決定することができる(Bouropoulos and Moradian-Oldak, Calcif. Tissue Int., 72:599-603 (2003))。ある場合には、他の文献に記載されるように(Lamkin et al., J. Dent. Res., 75:803-808 (1996))、HAをタンパク質でコーティングするために、ヒト唾液とブレインキュベートしたHAマトリックスを用いてアッセイを行うことができる。このような場合に、未結合の唾液タンパク質は、その存在がポリペプチド濃度の測定を妨害があるので、洗浄によって取り除くことができる。

#### 【0094】

任意の適切な方法を用いて、本明細書に記載の組成物の歯またはHAマトリックスに対する親和性を評価することができる。例えば、結合および未結合組成物は、該組成物の蛍光発光ポリペプチドの蛍光を測定することによって定量することができる。定量のために蛍光を利用できるため、ヒト唾液の存在下でHAへの該組成物の結合を測定することができる。ある場合には、本明細書に記載の組成物は、ヒト歯にインピトロで結合する能力について評価され得る。歯を、ブラッシングまたは軽石研磨などの、さまざまな程度のクリーニングにかける。次に、その歯をヒト唾液で処理して歯周囲に獲得被膜(ペリクル)を形成させ、唾液の存在下および非存在下で本明細書に記載の組成物と共にインキュベートする。歯への結合は、結合および未結合の両方の蛍光を測定することによって決定することができる。結合した蛍光発光ポリペプチドの歯からの抽出は、穏和な手順を用いて達成することができる。例えば、歯を濾紙回収ストリップでふき取り、他の文献に記載されるように(Siqueira and Oppenheim, Archives of Oral Biology, 54:437-444 (2009))、穏やかな条件下で該濾紙からポリペプチドを抽出する。ある場合には、異なる条件下で結合した蛍光発光ポリペプチドの相対量を評価するために、歯を蛍光顕微鏡で分析することができる。

#### 【0095】

任意の適切な方法を用いて、歯の外観を変化させる能力および/または再石灰化粒子を歯に結合させる能力について、本明細書に記載の組成物を評価することができる。例えば、目視検査技術を用いて、本明細書に記載の組成物が歯の外観を変えられるかどうかを判定する。このような目視検査技術は、他の文献に記載されるような(Paravina et al., J. Esthet. Restor. Dent., 19:276-283 (2007))、比較用のシェードガイド(shade guide)の使用を含むことができる。ある場合には、歯の外観を変化させる(例えば、歯をより白く見せる)本明細書に記載の組成物の能力は、反射分光光度法を用いて測定することができる。このような場合には、歯に白色光源を照射して、異なる波長で吸収された光の量に関する反射分光光度法(比色分析)によって歯を分析する。その後、光源からフィルタリングされたUV光を用いて、これらの測定を繰り返す。UV光の包含と排除により得られた反射

10

20

30

40

50

率の値の差は、歯表面のUV蛍光スペクトルである(例えば、Park et al., M. Dental Materials, 23:731-735 (2007)を参照されたい)。ある場合には、歯または歯成分にミネラルを結合させる本明細書に記載の組成物の能力は、例えば、走査型電子顕微鏡またはプロフィロメトリーを用いて、観察することができる。

【0096】

本明細書に記載の組成物は、該組成物を使用する人への毒性のリスクが低く、ヒト由来の1種または複数種のポリペプチドを含有し、飲食品中に天然に存在する1種または複数種のポリペプチドを含有し、かつ/または潜在的に毒性の色素を欠くことができる。

【0097】

本発明は以下の実施例においてさらに説明されるが、これらの実施例は添付の特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0098】

実施例1 - イガイ接着ポリペプチドのDOPA含有量

UV差アッセイを用いて、組換えイガイ接着ポリペプチド(MAP 22.6kDa、カタログ#260012; MAP 37kDa、カタログ#260022、Amsbio社から購入)ならびに商業的に抽出した天然のイガイ接着ポリペプチド(Cell-Tak社およびACRO Biosystems社から購入)のDOPA含有量を決定した。組換えポリペプチドは、MFP-1とMFP-5の両方からの配列を含む一本鎖ポリペプチドである。

【0099】

UV差アッセイでは、吸収の差を2つの異なる溶液中で測定する; 0.2Mホウ酸塩緩衝液pH8.0および0.2M HCl。L-DOPAはホウ酸との複合体を形成し、この複合体がpH8.0で吸収のシフトを引き起こす。0.2M HClと0.2Mホウ酸塩緩衝液の間の吸収の差は、292nmで最大であり、サンプルはこの波長で測定される。未知量のDOPAを含むサンプルを、同じ希釈率を用いて0.2Mホウ酸塩緩衝液または0.2M HCl中に希釈する。吸収を測定して、吸収の差を計算する。DOPA含有量は、 $1885\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ の吸光係数でランベルト・ベール(Lambert-Beer)の法則を用いて算出される。このアッセイは室温で測定される。DOPA含有量を測定するための良好な範囲は、25~200  $\mu\text{M}$ のL-DOPAであることが分かった。

【0100】

組換え22.6kDaイガイ接着ポリペプチドは、10.8%のDOPA含有量であった。組換え37kDaイガイ接着ポリペプチドは、3.9%のDOPA含有量であった。ACRO社およびCell-Tak社からのイガイ接着ポリペプチドはこのアッセイにおいて沈殿したので、それらのDOPA含有量はこの方法では測定されなかった。

【0101】

実施例2 - DOPA残基の酸化安定性

後続のコンジュゲーション反応がDOPA残基の酸化を引き起こさないことを確実にするため、酸化に対するDOPA残基の感受性を異なるpH値で試験するための実験を行った。比色分析と(実施例1に記載した)UVアッセイの両方を用いて、DOPA残基の安定性をモニタリングした。比色分析では、10mM DOPAの原液を1%酢酸中に調製し、500  $\mu\text{M}$ から0  $\mu\text{M}$ のDOPAの標準曲線を作成した。サンプルを種々の異なる緩衝液中に1:10で希釈し、1M NaOHを使用して、緩衝溶液のpHが所望の値に確実にとどまるようにした。サンプルを室温でインキュベートし、サンプルを2~3時間おきに採取し、1%酢酸中に希釈してDOPA酸化の程度を調べた。

【0102】

L-DOPAがテトラゾリウムブルー(TZB)の存在下で酸化されると、TZBは非水性媒体中で桃色-紫色のジ-ホルマザン形態に還元される。最大吸収は525nmで見られる。TZBを含有するマスターミックス溶液を、標準曲線のサンプルおよび未知のサンプルに添加する。マスターミックスは、0.01w/v%のKOHを含むエタノール中に0.25mg/mlの最終TZB濃度を有する。場合により、12以上のpHを達成するために少量のNaOHを添加した。このアッセイでは37で30分間インキュベートし、サンプルを室温まで冷却して、525nmでのそれらの吸収を測

10

20

30

40

50

定する。

【0103】

サンプルはまた、肉眼でも検査し、場合によっては、酸化されたサンプルの写真を撮った。DOPAの酸化は、DOPAの褐色ないし暗褐色の着色によって示された。

【0104】

DOPAは、pH5の酢酸、pH7のHEPES、およびpH8のホウ酸塩緩衝液中で少なくとも24時間、酸化に対して安定であることが判明した。pH8.5およびpH9.0の重炭酸塩緩衝液中では、DOPAのほとんどが24時間で酸化された。pH8および8.5のホウ酸塩緩衝液は、DOPA残基の酸化を防止した。この場合のDOPA残基は、酸化に対して安定な、ホウ酸イオンとの錯体を形成していると推定される。

10

【0105】

実施例3 - 酸性pH値でのBFPの安定性

酸中のBFPの安定性は、該タンパク質(66 μg/ml)をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、1%酢酸(pH約2.7)、5%酢酸(pH約2.4)、酢酸塩pH4、または酢酸塩pH5中で最大72時間インキュベートし、その後蛍光を測定することによって評価した。BFP原液は、PBS中に4mg/mLの濃度であり、それぞれのpH溶液中に1:60(v/v)の比で希釈した。

【0106】

BFPはpH値4で数日間安定していた。対照的に、1%酢酸(pH約2.7)および5%酢酸(pH約2.4)中では蛍光が失われた。同じ実験を0.05%Tween 20の存在下で行ったところ、BFPはpH4で不安定であったが、pH値pH5では安定していた。

20

【0107】

1%酢酸と共にインキュベートしたBFPサンプルでは、そのpHを8に上げることによって蛍光の50%以上が回復した。これとは対照的に、5%酢酸中で3時間インキュベートしたBFPサンプルでは、pHを上げても活性は回復しなかった。

【0108】

実施例4 - 異なるMAPタンパク質の歯への結合

ウシ歯への異なるイガイ接着ポリペプチドの結合を比較するために、一定の歯表面積あたりに結合したタンパク質の量を測定した。各歯はその大きさおよび形状が一様でないため、歯ごとに表面積は異なっており、その表面積を計算することは厄介である。シリコーンをシーラントとして用いて歯の上に小さなポリプロピレンカップを付着させることにより、各歯の表面積を標準化するための方法が開発された。こうした方法では、一定の歯表面積に結合したタンパク質の量を測定することができ、その量は歯の変化に無関係である。

30

【0109】

ウシ歯への実施例1に記載のイガイ接着ポリペプチドの結合を評価した。ウシ歯を、15 μgから0 μg(陰性対照)までの範囲のMAPの異なる量を用いて、さまざまなMAPと共に37度2時間インキュベートした。異なる緩衝液を用いて、異なるpH値での結合を調べた(炭酸塩緩衝液pH9; 0.2M MOPS pH7; 0.2M酢酸塩緩衝液pH5; 1%酢酸pH2.75)。結合させた後で、未結合のタンパク質を水で洗い流し、結合したタンパク質の量を比色分析(Bradford法)により測定した。結合は、組換え22.6kDaポリペプチド、組換え37kDaポリペプチド、およびCell-Tek社のサンプルで観察されたが、組換え22.6kDaポリペプチドが最良の結合を有していた。ACRO社のサンプルでは有意な結合が観察されなかった。

40

【0110】

歯の異なる前処理がイガイ接着ポリペプチドの結合にどのように影響するかを確立するために、ウシ歯を洗浄して軽石で磨いた。2組の歯を5%EDTA pH7または5%クエン酸でさらに処理し、組換え22.6kDaおよび37kDaポリペプチド、ならびにCell-Tek社の製品の結合を試験した。最良の結合は、ウシ歯をクエン酸で前処理したときに観察された。組換え22.6kDaおよび37kDaポリペプチドは、クエン酸前処理後に同様の結合を有していた。しかし、これは苛酷な処理であり、ヒトの処理には使えない。EDTAまたは水のいずれかで前処理した歯では、組換え22.6kDaポリペプチドが最大量の結合を有していた。

50

## 【0111】

別の実験では、少容量のイガイ接着ポリペプチドを、シリコーンリング法を用いてウシ歯に適用し、37℃で約90分間乾燥させ、その後水で十分に洗浄した。薄膜が歯の中央に輪状に見られた。次に歯ブラシと水を用いてこの歯をブラッシングした。ブラッシング後、イガイ接着ポリペプチドの薄膜は容易には見えなかった。結合を検出するために、歯をクマシーブルー(BioRad社からのクマシーブリリアントブルーR-250染色溶液、カタログ番号161-0436)で1分間染色し、水中で洗浄し、クマシー染色を検査し、練り歯磨きでブラッシングし、再度クマシー染色を検査した。ブラッシング段階では、非特異的に結合したクマシーブルーが取り除かれた。

## 【0112】

10

クマシー染色法を用いて、該ポリペプチドはブラッシング後に歯の上に残っていることが明らかになった。染色されたイガイ接着ポリペプチドは、練り歯磨きでブラッシングした後に歯から除去されなかった。

## 【0113】

他の実験は、1%酢酸中の少量のイガイ接着ポリペプチド(MAP 22kDa)、MAP前駆物質(チロシン残基がDOPA残基に変換されていない組換えMAP)、またはウシ血清アルブミン(BSA)をウシ歯に添加し、その歯を37℃で乾燥させることにより実施した。サンプルを洗浄し、クマシーブルーで染色し、再度洗浄し、写真を撮り、その後練り歯磨きでブラッシングした。MAP、MAP前駆物質、およびBSAはすべて、1%酢酸中で乾燥させた後に歯に結合し、ブラッシング後に歯の上に残存した。対照的に、カゼインおよびBFPはこれらの条件下で歯に有意に結合しない。1、2または4時間のインキュベーションは、結合の量を変化させなかった。同様の結果がヒト歯でも観察された。

20

## 【0114】

別の実験では、1%酢酸中のMAPおよびMAP前駆物質を、乾燥させずに歯の上で3.5時間インキュベートした。クマシー染色で調べたところ、これらの条件下でMAPのみが結合し、かつブラッシング後に残存した。質的には、歯の上に乾燥させたMAPは、湿潤条件下で歯に結合されたMAPよりもブラッシングに耐性であるように見える。

## 【0115】

30

pHの影響を調べるため、MAPをpH2.7(1%酢酸)、pH5.3(酢酸塩緩衝液)、およびpH7.3(HEPES緩衝液)で乾燥させずに歯の上で3.5時間インキュベートした。水で洗浄して乾燥させた後、どの歯の上にも薄膜は目に見えなかった。クマシーによる処理は、1%酢酸処理された歯に強い染色をもたらし、pH5.3処理された歯に弱い染色をもたらし、そしてpH7処理された歯には明白な染色を生じさせなかった。

## 【0116】

40

実施例5 - イガイ接着ポリペプチド-BFPコンジュゲートの調製

22.6kDaイガイ接着ポリペプチド(MAP)は、リジン残基をTraut's試薬(2-イミノチオラン(IT))でチオール化することによって、コンジュゲーションのために活性化した。該ポリペプチド(0.4mg/ml)を、イガイ接着ポリペプチドのDOPA残基を酸化から保護するためにホウ酸ナトリウムの存在下に室温、pH8で40分間、1.8mMまたは5mMのITと共にインキュベートした。結合したチオールの数が異なるMAPの2つのバッチ、MAP-Hi-SH(5mM IT)およびMAP-Lo-SH(1.8mM IT)が得られた。

## 【0117】

BFP(1mg/mL)は、2つの濃度のマレイミドを用いて活性化した(MAL-dPEG<sub>4</sub>-NHSエステル；Quanta BioDesign社、カタログ#10214；0.3mg/ml, 0.6mg/ml)。これは、結合したマレイミドの数が異なるBFPの2つのバッチ、BFP-Hi-MAL(0.6mg/mlのMAL-dPEG<sub>4</sub>-NHSエステル)およびBFP-Low-MAL(0.3mg/mlのMAL-dPEG<sub>4</sub>-NHSエステル)を生じさせた。

## 【0118】

50

一連の小規模(分析量のタンパク質)のコンジュゲーション反応を実施し、この反応は以下を含んでいた：

- MAP-Lo-SH + BFP-Lo-MALを3:1、1:1、および1:3のMAP/BFP比で含む3つの反応；

- MAP-Lo-SH + BFP-Hi-MALを3:1、1:1、および1:3のMAP/BFP比で含む3つの反応；
- MAP-Hi-SH + BFP-Lo-MALを3:1、1:1、および1:3のMAP/BFP比で含む3つの反応；
- MAP-Hi-SH + BFP-Hi-MALを3:1、1:1、および1:3のMAP/BFP比で含む3つの反応；

## 【0119】

これらの反応生成物をSDS-PAGEで分析した。1:3のMAP:BFP比およびMAP-hi-SH + BFP-hi-MALを用いたとき、MAPの全てはコンジュゲートに変換された。3:1および1:1のMAP:BFP比を用いた場合は、より少ない量のコンジュゲートが生成され、その際わずかに異なる分子量パターンがゲル上に観察された。

## 【0120】

中規模のコンジュゲーション(1.4mg ~ 5.6mgの総タンパク質)では、2つのMAP-BFPコンジュゲートを1:1のMAP:BFP比および1:3のMAP:BFP比で調製した。コンジュゲーション反応中に沈殿物が形成され、可溶性コンジュゲートの収量は低かった。上記の小規模反応でも沈殿が生じた可能性があるが、容量が少なかったため沈殿物が見えにくかった。可溶性の反応生成物をSDS-PAGEで分析した。沈殿物をもSDS-PAGE電気泳動で分析したところ、沈殿物はSDSゲルに入らない大きなポリマーを含むようであった。

## 【0121】

実施例6 - MAPコンジュゲートの歯への結合

結合実験のために、最初にウシ歯を歯ブラシと練り歯磨きで洗浄し、次にゴムキャップを備えたハンドヘルドデンタルポリッシャーを使ってそれらを磨くことによって、ウシの歯を準備した。特定の実験では、歯を5%EDTA二ナトリウムまたは7.5%クエン酸のいずれかと室温で2時間インキュベートした。

## 【0122】

1:1 MAP/BFP中規模反応(実施例5)からの沈殿物は、酢酸塩緩衝液pH5中の沈殿物をピペットで何回も上下させることによって混濁した懸濁液に変換した。この懸濁液をクエン酸処理したウシ歯の上に乾燥させると、肉眼で見えるかなり均質な被膜が形成された。この被膜は十分に洗浄しても除去されず、360nmランプで照射したとき強い蛍光を示した。

## 【0123】

この被膜はやや黄色がかっていた。組換え22.6kDaポリペプチドを酢酸中に溶解したとき、この溶液は黄色であることが判明した。対照的に、組換え37kDaポリペプチドを酢酸中に溶解したとき、この溶液は透明であった。これらの生成物は両方とも同じ成分(mfp1 + mfp5)を含有するので、それらの調製に差があった可能性が高い。かくして、この黄色味は、DOPA残基の酸化を最小限に抑える条件下で接着ポリペプチドを調製することによって、回避され得る。

## 【0124】

実施例7 - ヒト歯の上に乾燥させたBFP-MAPコンジュゲート沈着物の分析

活性化MAPと活性化BFPとの中規模反応(実施例5)で形成されて、再懸濁された沈殿物をヒト歯に適用し、水で十分に洗浄し、その後屋外条件を模倣した照明の存在下での写真撮影によってホワイトニングについて分析した。2つの適用法を採用した。「シリコーンリング」(silicone ring)法では、シリコーンリングによって囲まれた歯の領域にコンジュゲートを添加し、乾燥させた。「液中」(submerged)法では、コンジュゲートの懸濁液中で歯を一晩インキュベートした。

## 【0125】

シリコーンリング法を用いると、MAPコンジュゲートは、目に見える黄色味を帯びた被膜を歯の上に形成した。かなりの量のBFP:MAPコンジュゲートが歯に結合したが、黄色味は、歯の上のBFPの固定化のために生じた可能性があるホワイトニングをすべて隠してしまった(たいていの場合、増加ではなく減少したDシェードは、表面が処置前よりも白くなかったことを示す、表3参照)。液中法を用いると、被膜が目に見えなかった(表2参照)。

## 【0126】

(表2)

10

20

30

40

| 歯識別番号 | BFP:<br>MAP<br>比 | 適用法      | Dシェード |
|-------|------------------|----------|-------|
| 131   | 1:1              | シリコーンリング | -2    |
| 132   | 1:1              | シリコーンリング | -3    |
| 133   | 1:3              | シリコーンリング | -1    |
| 134   | 1:3              | シリコーンリング | 2     |
| 135   | 対照               | シリコーンリング | 1     |
| 136   | 1:1              | 液中       | 0     |
| 137   | 1:3              | 液中       | 0     |
| 138   | 対照               | 液中       | 0     |

10

20

30

## 【0127】

歯の上に固定化されたBFPの半定量的な測定を得るために、赤色と緑色のチャネルを排除した後に得られた青色光の値を計算した。この測定結果は、被膜の黄色味によってあまり影響を受けない。結果は以下の表3に示される。

## 【0128】

(表3) BFP-MAPコンジュゲートおよびBFP-P-MAPコンジュゲートの適用：処置前と処置後の青色チャネルの増強の測定

| 歯識別番号 | BFP:<br>MAP<br>比 | 適用法      | 前<br>青色 | 後<br>青色 | D青色   |
|-------|------------------|----------|---------|---------|-------|
| 131   | 1:1              | シリコーンリング | 188.21  | 201.02  | 12.80 |
| 132   | 1:1              | シリコーンリング | 212.14  | 219.42  | 7.27  |
| 133   | 1:3              | シリコーンリング | 201.74  | 203.98  | 2.24  |
| 134   | 1:3              | シリコーンリング | 227.92  | 230.67  | 2.75  |
| 135   | 対照               | シリコーンリング | 207.53  | 206.15  | -1.38 |

## 【0129】

歯の上に乾燥させた1:1コンジュゲートの場合には、青色チャネルがかなり高い値を有していた。この青色チャネルの値はまた、軽石で研磨した歯にカゼイン-BFPコンジュゲートを結合させた場合に以前に見られたものよりも高い値である。

## 【0130】

実施例8 - BFPポリマー-MAPコンジュゲートの調製

40

BFPポリマーを次のように調製して活性化した。BFPを2つのバッチに分けた；一方のバッチはBFPにチオール基を付加するためにTrauts試薬で活性化し、他方のバッチはBFPにマレイミド基を付加するためにMAL-dPEG<sub>4</sub>-NHSエステルで活性化した。Trauts試薬でのBFPの活性化は、2mM EDTAおよび0.05% Tween-20を含有する50mMホウ酸塩緩衝液pH8.0中で行った。イミノチオランの最終濃度を45mMとした。BFPは1mg/mlを保った。この反応を室温で40分間インキュベートした。未反応のITは、50mMリン酸塩緩衝液、2mM EDTA、0.05% Tween-20 pH7.0中でのゲル濾過により反応物から除去した。マレイミド反応では、BFPを1mg/mlの濃度とし、MAL-dPEG<sub>4</sub>-NHSエステルを、50mMリン酸塩、2mM EDTA、0.05% Tween-20の緩衝液中3mg/mlの最終濃度となるように添加した。この反応を室温で40分間インキュベートした。未反応のMAL-dPEG<sub>4</sub>-NHSエステルは、5mM MES、2mM EDTA、0.05% Tween-20 pH6中の

50

Sephadex G25カラム(GE Healthcare社)でのゲル濾過クロマトグラフィーによりBFP-Mから分離した。

【0131】

次に、これら2つの活性化BFP種と一緒に反応させて、ポリBFPを形成させた。活性化BFP種を、BFP-マレイミドとBFP-SHの1:3比で組み合わせて、50mMリン酸塩緩衝液pH7.0、2mM EDTA、0.05%Tween-20中で室温にて1時間インキュベートした。この反応をNMMで停止させた。このサンプルを濃縮し、サイズ排除カラム(Superdex 200, GE Healthcare社)にアプライして、異なるサイズのポリBFPを分離し、かつ未反応のBFPを除去した。

【0132】

ポリBFPをMAP-SHと反応させるために、220kDa超の分子量を有するBFPポリ画分を使用した。ポリマーBFPを、2mM EDTAおよび0.05%Tween 20を含有する50mMリン酸塩緩衝液pH7中で0.33mg/mLのMAL-dPEG<sub>4</sub>-NHSエステルと反応させて活性化し、未反応の試薬をゲル濾過で除去した後、異なるMAP/BFP比(MAP : BFP ; 4:1 ; 2:1 ; 1:1 ; 1:2 ; 1:4)でMAP-SH(5mMイミノチオランで活性化)と反応させた。BFPの約75%は、1:2または1:4の高いMAP/BFP比で沈殿することが見出された。これらの条件下では、ポリマーBFPをコーティングするのに十分なMAPが存在し、さらなる重合または凝集とその後の沈殿は生じなかった。コンジュゲーションにおけるBFPの相対量を増加させると、沈殿物中のBFPの量が減少した。

【0133】

実施例9 - 齒へのMAPおよびBFPの連続結合(両面接着テープ)

ウシ歯への天然MAP(ACRO Biosystems社; MAP1と呼ぶ)または組換えMAP(Amsbio社; 22.6 kDaをMAP2と呼ぶ; 37kDaをMAP3と呼ぶ)、およびBFPの結合は、歯にMAPを適用し、続いてBFPを適用することによって評価した。MAPをホウ酸ナトリウム(SB)緩衝液pH8.0中で37℃にて4時間インキュベートし、その後BFP(1mg/mL)と共に37℃で一晩インキュベートした。MAP1では、その濃度を1mL中20 μgとした; MAP2では、その濃度を1mL中80 μgとした; MAP3では、その濃度を1mL中80 μgとした。歯には前処理を施さなかったが、1組の歯は、歯を軽石で磨くことに何らかの影響があるかどうかを評価するために、軽石で磨いた。結合は、一晩のインキュベーションおよび洗浄後に評価し、分析のために歯の写真を撮った(データ比較のために、実験前に同じ歯の画像を記録した)。結果は表4に示される。ごくわずかなホワイトニングが観察されただけであった。

【0134】

(表4)

10

20

30

| 前処理    | 組成         | 前       | 後       | d RGB  | dシェード |
|--------|------------|---------|---------|--------|-------|
| 軽石研磨   | MAP1+BFP   | 205.962 | 222.34  | 16.378 | 5     |
|        | MAP2+BFP   | 199.762 | 205.963 | 6.201  | 2     |
|        | MAP3+BFP   | 194.64  | 202.938 | 8.298  | 3     |
|        | MAP1<br>対照 | 196.91  | 206.687 | 9.777  | 3     |
|        | BFP 対照     | 185.361 | **      |        |       |
| 軽石研磨なし | MAP1+BFP   | 183.667 | 200.383 | 16.716 | 6     |
|        | MAP2+BFP   | 190.141 | 201.548 | 11.407 | 4     |
|        | MAP3+BFP   | 182.027 | **      |        |       |
|        | MAP3<br>対照 | 195.354 | 200.168 | 4.814  | 2     |
|        | BFP 対照     | 200.231 | 206.186 | 5.955  | 2     |

\*\* データは計算できない。

#### 【 0 1 3 5 】

#### 実施例10 - 二酸化チタン粒子

二酸化チタン粒子(20nm)とMAP 37を10:1のナノ粒子:MAP37比で混合し、酢酸中37で2時間インキュベートした。この懸濁液の異なる量をウシ歯(歯は銀染色された)の象牙質部分にピペットで移し、37で約30分間インキュベートして歯の上にイガイ接着ポリペプチドとナノ粒子を乾燥させた。その後、歯を水で洗浄し、ゲルシェーカー上で水中にて44時間インキュベートした。粒子は、水で洗浄した後に歯の上に残ったが、水中で歯ブラシを用いてブラッシングすることにより除去された。

#### 【 0 1 3 6 】

#### 実施例11 - 30%のDOPA残基を含むペプチドの調製

以下のペプチドは、固相アミノ酸合成(Ohio Peptide社)により製造した：

KYKGKGYKGG YKGKYGKG KYYKYKGKG KYKYGKKKGK

YKGKGYKYYG

ここでYはL-DOPA(L-ジヒドロキシフェニルアラニン)を指す(SEQ ID NO:21)。このペプチドは30%のDOPA、42%のリジン、および28%のグリシンを含み、本明細書ではMAPtideと呼ばれる。この配列は、ヨーロッパイガイ(*Mytilis edulis*)のMfp-5配列(SEQ ID NO:6)のアミノ酸46-95から、Y、KまたはGでない残基をKまたはGで置換して、改作されたものである。

#### 【 0 1 3 7 】

MAPtideを1%酢酸に溶解して5mg/mLの濃度にし、湿潤および乾燥結合条件下でウシ歯に適用した。湿潤結合では、歯を1%酢酸のリザーバーの上で10μLのペプチド溶液と共に37で30分間インキュベートした。一連の濃度を1000μg/mLから1.6μg/mLまでの範囲で試験した。練り歯磨きでブラッシングし、歯をクマシーブルー染料で染色した後、8μg/mLまでの全ての濃度について強い染色が見られた。1.6μg/mLで弱い染色がまだ見えていた。乾燥結合条件下では、2つの濃度(1000μg/mLおよび200μg/mL)を試験した。10μLのペプチド溶液を歯に適用し、37で一晩乾燥させ、練り歯磨きでブラッシングした。この場合にも、強いクマシー染色が見られた。

10

20

30

40

50

## 【0138】

実施例12 - DOPAで置換された有機ポリマーの合成

ポリDOPAは3つの異なるポリマーを用いて合成した：ポリメタクリル酸(PMA)、ポリ[エチレン-コ-(無水マレイン酸)](PEMA)、およびポリ[ブタジエン-コ-(無水マレイン酸)](PBMA)。

## 【0139】

ポリL-DOPA-PMAポリマーは、DOPAの異なる濃度を用いて合成した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC; 0.5g)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS; 0.5g)を、2.5gのPMA(MW 9.5kDa, Sigma社)溶液を含有するPBS溶液中に溶解した。この溶液を室温で4時間混合した後、L-DOPA(PMA1では0g、PMA2では0.25g、およびPMA3では0.75g)をそれぞれのポリマー溶液に添加した(表5)。反応容量をPBSで10mlに調整し、これらの反応物を約2時間攪拌した。次に、沈殿した反応生成物をエタノールで十分に洗浄し、沈殿したポリ(L-DOPA)を乾燥させ、この生成物を減圧デシケーター内に保存した。

## 【0140】

ポリL-DOPA-PEMAおよびポリL-DOPA-PBMAポリマーは、次のように合成した。冷水凝縮器を取り付けた丸底フラスコ内で、0.5gの各ポリマー、ポリ[エチレン-コ-(無水マレイン酸)]1:1(PEMA, MW 400kDa, Polysciences社)およびポリ[ブタジエン-コ-(無水マレイン酸)]1:1(PBMA, MW 10~15kDa, Polysciences社)を、50mlのエタノール中の0.65gのDOPAに添加した。この反応物を、絶えず攪拌しながら、水浴または油浴中のホットプレート上で70~90°Cにて12時間還流した。12時間後、この反応物を室温まで冷却し、沈殿したポリマーを乾燥させて減圧デシケーター内に保存した(表5)。

## 【0141】

(表5) PMA、PEMAおよびPBMAを用いたポリL-DOPAの合成

| ポリマー | 分子量<br>(平均)<br>kDa | 色   | 溶解性           | 収量<br>グラム | Dopaの<br>重量<br>% |
|------|--------------------|-----|---------------|-----------|------------------|
| PMA1 | 9.5                | 白色  | 水             | 2.11      | 0                |
| PMA2 | 11-12              | 白色  | 水             | 2.23      | 9.91%            |
| PMA3 | 12-13              | 白色  | 水             | 2.56      | 22.24%           |
| PBMA | 20-25              | 灰白色 | アルカリ/0.5M HCl | 0.767     | 33.4%            |
| PEMA | 600                | 白色  | アルカリ/0.2M HCl | 0.964     | 39.9%            |

## 【0142】

実施例13 - DOPA置換された有機ポリマーの初期結合実験

実施例2からのポリマーのウシ歯への結合は、次のように評価した。1%酢酸中のPMA 1、2および3(5mg/ml)、または0.2M HCl中のPEMAもしくはPBMA(2mg/ml)の10μlを、乾燥条件下で各歯に適用し、一晩インキュベートした。歯を上記のようにクマシーブルーで染色し、水で洗浄し、練り歯磨きで十分にブラッシングした。DOPAを含む全てのポリマーの強い結合が観察された。DOPAを含まないPMA(PMA 1)を用いた対照反応では、非常に低い結合が観察された。

## 【0143】

関連する実験では、1%酢酸中のPMAポリマーを歯の上に乾燥させ、水で洗浄し、その後重炭酸塩緩衝液pH8.5中で一晩インキュベートした。PMA2およびPMA3の場合、重炭酸塩溶

10

20

30

40

50

液は、溶解したDOPAが原因で褐色を呈したが、歯は白いままであった。これらの歯は、練り歯磨きでのブラッシング後に強いクマシー染色を示した。ここでも、PMA1は有意な染色を示さなかった。

【0144】

実施例14 - MAPtide-BFPコンジュゲートの調製

MAPtide(1mg/mL)(実施例11参照)は、コンジュゲーションのために、50mMリン酸ナトリウム、2mM EDTA、0.05%TWEEN-20、pH7.0中で1mg/mLのマレイミド-dPEG(登録商標)4-NHSエステル(Quanta Biodesign社)と共に室温で40分間インキュベートすることによって活性化した。この反応混合物を、3kDaスピノフィルター(Millipore社)を用いて濃縮し、ゲル滌過カラム(PD-10; GE Healthcare社)を用いて5mM MES(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)、2mM EDTA、および0.05%TWEEN-20、pH6中で精製して、活性化されたタンパク質を未反応の反応成分から取り出した。

10

【0145】

BFP(1mg/mL)は、コンジュゲーションのために、50mMリン酸ナトリウム、2mM EDTA、0.05%TWEEN-20、pH7.0中で3.3mg/mLのSPDP-dPEG(登録商標)12-NHSエステル(Quanta Biodesign社)と共に室温で40分間インキュベートすることによって活性化した。チオール基は、10mMのDTT(ジチオスレイトール)で活性化した。この反応混合物を濃縮した後、PD-10カラムを用いて5mM MES、2mM EDTA、および0.05%TWEEN-20、pH6中で精製した。

20

【0146】

コンジュゲーション反応のために、活性化MAPtideおよび活性化BFPを、50mMリン酸ナトリウム、2mM EDTA、0.05%TWEEN-20、pH7.0中に3:1~5:1のモル比で組み合わせて、室温で60分間インキュベートした。反応生成物をSDS PAGE電気泳動により分析した。コンジュゲートは、未反応のMAPtideを除去しつつDOPA残基を安定化させるために、10kDa透析膜(Spectrum社)を用いて5mM酢酸塩緩衝液pH5中に透析した。

20

【0147】

実施例15 - ポリ(MAPtide-BFP)の調製

実施例14に記載したように調製したBFP-MAPtideコンジュゲートを2つの画分に分離した。一方の画分のBFP-MAPtide(0.6mg/mL MAPtide)は、MAPtideの活性化について実施例14に記載したように、3.3mg/mLのマレイミド-dPEG(登録商標)4-NHSエステルで活性化した。他方の画分のMAPtide-BFP(0.6mg/mL MAPtide)は、BFPの活性化について実施例14に記載したように、3.3mg/mLのSPDP-dPEG(登録商標)12-NHSエステルで活性化した。

30

【0148】

重合反応は、マレイミド活性化BFP-MAPtideコンジュゲートをSPDP活性化MAPtide-BFPコンジュゲートと3:1の比で組み合わせることによって開始させた。この反応物を50mMリン酸ナトリウム、2mM EDTA、0.05%TWEEN-20、pH7.0中で室温にて60分間インキュベートした。反応混合物をSDS PAGE電気泳動により分析した。ポリマーを濃縮し、pH5の5mM酢酸塩緩衝液で平衡化したSuperdex 200 16/60ゲル滌過カラム(GE Healthcare社)にアプライした。カラム画分は、これらの画分のSDS-PAGE分析により測定して、高分子量、中間分子量、および低分子量のポリマーに分離した。

30

【0149】

実施例16 - MAPtide-ポリBFPの調製

MAPtide-ポリBFPコンジュゲートを調製するために、BFPポリマーを調製し、その後MAPtideとBFPポリマーを活性化して、互いとコンジュゲートした。

40

【0150】

ポリBFPの調製

BFPの溶液(1mg/mL)は、コンジュゲーションのために、MAPtideの活性化について実施例14に記載したように、3.3mg/mLのマレイミド-dPEG(登録商標)4-NHSエステルによって活性化した。別のBFP溶液(1mg/mL)は、BFPの活性化について実施例14に記載したように、3.3mg/mLのSPDP-dPEG(登録商標)12-NHSエステルによって活性化した。

50

【0151】

BFPは、50mMリン酸ナトリウム、2mM EDTA、0.05%TWEEN-20、pH7.0中で室温にて60分間、等量のマレイミド活性化BFP溶液とSPDP活性化BFP溶液を組み合わせることによって重合させた。この重合反応をSDS PAGE電気泳動により分析した。重合BFPを精製するために、反応物を濃縮し、5mM酢酸ナトリウム緩衝液pH5で平衡化したSuperdex 200 16/60ゲルfiltrationカラムにアプライした。

【0152】

MAPtide-ポリBFPコンジュゲートの調製

ポリBFP(1mg/mL)は、BFPの活性化について実施例14に記載したように、3.3mg/mLのSPDP-dPEG(登録商標)12-NHSエステル(Quanta Biodesign社)により活性化した。MAPtide(1mg/mL)は、コンジュゲーションのために、MAPtideの活性化について実施例14に記載したように、1.1mg/mLのマレイミド-dPEG(登録商標)4-NHSエステルにより活性化した。

10

【0153】

活性化ポリBFPと活性化MAPtideとのコンジュゲーションは、6倍モル過剰のMAPtideを含有する反応物中で行った。コンジュゲーションは、50mMリン酸ナトリウム、2mM EDTA、0.05%TWEEN-20、pH7.0中で室温にて60分間実施した。コンジュゲーション反応をSDS PAGE電気泳動で分析した。ポリマーコンジュゲートは、該ポリマーコンジュゲートを安定化しつつ未反応のMAPtideを除去するために、pH5の5mM酢酸ナトリウム緩衝液中に透析した。

【0154】

実施例17 - MAPtide-BFP、ポリ(MAPtide-BFP)およびMAPtide-ポリBFPとのヒドロキシアパタイト(HA)複合体の調製

20

実施例14～16の異なるコンジュゲート(MAPtide-BFP、ポリ(MAPtide-BFP)、およびMAPtide-ポリBFP)の各々を、0.2mg/mL(MAPtide含有量)の濃度で、プラットフォームシェーカー上で室温にて1時間、0.1M MES pH6中で1.25mg/mLのHAとインキュベートした。インキュベーション後、反応物を750×g、4℃で2分間遠心分離した。過剰のコンジュゲートを沈殿物から除去し、HA複合体を1mLの0.1M酢酸塩緩衝液pH5中に再懸濁した。この溶液を再度750×g、4℃で1分間遠心分離し、上澄み液を廃棄した。この洗浄段階を2回繰り返した。最後に、HA複合体を0.1M酢酸塩緩衝液pH5中に再懸濁してHAの最終濃度50mg/mLにし、歯を処置するために使用した。

【0155】

実施例18 - ヒト歯へのMAPtide-BFP/HA複合体の適用

30

実施例17の複合体を使用して、ヒト歯のホワイトニングを評価した。抜き取ったヒト歯をオートクレーブ滅菌し、実験室でのブラッシング、軽石研磨、再ブラッシングのクリーニングサイクルにより試験のために準備した。歯は練り歯磨きと手動の歯ブラシを用いてブラッシングし、軽石研磨は専門の研磨装置と歯科用軽石を用いて行った。

【0156】

唾液処理済みの歯を用いる実験では、ペリクルを再形成するために、歯を新鮮なヒト唾液中で少なくとも2時間インキュベートした。次に歯を空気乾燥させ、シェードガイド(下記参照)を用いてシェードを割り当てた。歯は、ホワイトニング試薬の適用のために水平面上のプレイドウ(playdough)の上に上向きに配置した。

【0157】

いくつかの実験では、複合体を適用する前に、漂白済みのヒト歯を紅茶またはコーヒーで着色させた。この着色手順の前に歯をブラッシングで洗浄した。1つのティーバッグ(Lipton(登録商標))と2gのインスタントコーヒー(Nescafe(登録商標))を20mLのDI水の熱湯中に一緒に溶解した。この溶液を室温で冷まし、細菌の増殖を防ぐために0.02%のアジ化ナトリウムとした。最後に、約20本の歯をこの溶液中で37℃にて30日間インキュベートした。30日のインキュベーション後、歯は着色されたように見えた。その後、歯を着色溶液から取り出し、水で十分にすすいだ。これらの歯は、ホワイトニング実験でそれらを使用する前に、ブラッシングし、軽石で磨き、さらにブラッシングした。

40

【0158】

5～10本の歯を各実験条件のために使用した。MAPtide-BFP/HAスラリー(またはポリ(MAP

50

tide-BFP)/HAおよびMAPtide-ポリBFP/HAスラリー)は、HA粒子がチューブの底に沈降するのを防止するために各適用前によく混合した。10 µLのアリコートを各歯の表面にそっと適用し、ピペットチップを用いて試薬を歯の表面全体に広げた。場合によっては、空気の流れを用いて試薬を歯の表面に広げた。試薬は、室温で5~15分間、歯と接触させておき、ある場合には、遅い空気流を用いて、試薬を歯の表面上に乾燥させた。その後、各歯を水で洗浄し、過剰のMAPtide-BFP/HA試薬を歯から落とすためにブラッシングした。歯を空気乾燥させ、シェードガイド(下記参照)を用いてホワイトニングの増強について分析した。

#### 【0159】

シェード改善の分析は、2つの方法を用いて行った。第1の方法では、自然な昼光を模倣したライトボックス内のホルダー上に歯を置いた。処置の前後に、カメラとマニュアル露出設定を用いてライトボックス内の各歯について画像を記録した。その画像は、Java画像処理プログラムImageJを用いてシェード改善について分析した(rsbweb.nih.gov/ij/でワールドワイドウェブを参照されたい)。第2の方法では、VITA 3D-Master(登録商標)シェードシステムを用いてシェードホワイトニングの増強について歯を分析した(vident.com/products/shade-management/vita-3d-master-shade-guideでワールドワイドウェブを参照されたい)。シェードガイドはメーカーの説明書に従って使用した。どちらの方法でも、明るさ(明度)、色の鮮やかさ(彩度)および色相の違いが比較される。各実験について平均シェード変化およびシェード変化の標準偏差を計算した。

#### 【0160】

#### 実施例19 - 自然着色したヒト歯のMAPtide-BFP/HAを用いた歯ホワイトニング

自然に着色されたヒト歯を、実施例18に記載したようにブラッシングし、軽石で磨き、さらにブラッシングした。各歯のシェードを決定し、実施例18に記載したようにその歯をMAPtide-BFP/HA試薬と共にインキュベートした。次に、歯をすすぎ、練り歯磨きでブラッシングし、再度すすぎ、乾燥させてから最終的なシェードを決定した。

#### 【0161】

4つの別々のホワイトニング実験を、合計20本の試験歯および3本の未処置の対照歯を用いて行った。試験歯は $6.5 \pm 3.5$ シェードの白さの増加を示したが、対照歯はホワイトニングを示さなかった。結果の標準偏差により示されるように、歯ごとのばらつきがあった。しかし、20本の処置した歯のうち17は、2シェードの白さの増加を示した。

#### 【0162】

#### 実施例20 - 歯ホワイトニング剤としてのHA、MAPtide/HA、およびMAPtide-BFP/HAの比較

抜き取ったヒト歯のセットを用意し、実施例18に記載したようにHA、MAPtide/HA、またはMAPtide-BFP/HAのいずれかで処置した。結果は表6に示される。それぞれの場合に、8本の歯を試薬により処置し、1または2本の歯を未処置の対照とした。

#### 【0163】

(表6)異なる歯ホワイトニング剤によるホワイトニング結果

A. HAで処置した歯のシェードガイド分析

10

20

30

| 歯番号     | ホワイトニング前の<br>シェード | ホワイトニング後の<br>シェード | シェード数値の改善    |
|---------|-------------------|-------------------|--------------|
| 472     | 5M2               | 4M3               | 4            |
| 473     | 5M3               | 5M3               | 0            |
| 474     | 5M2               | 4M3               | 4            |
| 475     | 5M2               | 5M2               | 0            |
| 476     | 5M3               | 5M2               | 1            |
| 477     | 4M2               | 4M2               | 0            |
| 479     | 4M1               | 4M1               | 0            |
| 480     | 4M1               | 4M1               | 0            |
|         |                   | 平均(8本の歯)          | <b>1 ± 2</b> |
| 471(対照) | 5M1               | 5M1               | 0            |
| 478(対照) | 5M1               | 5M1               | 0            |

10

## B. MAPtide/HAで処置した歯のシェードガイド分析

| 歯番号     | ホワイトニング前の<br>シェード | ホワイトニング後の<br>シェード | シェード数値の改善    |
|---------|-------------------|-------------------|--------------|
| 481     | 4M1               | 4M1               | 0            |
| 482     | 4M1               | 4M2               | -1           |
| 483     | 5M1               | 3M3               | 10           |
| 484     | 5M3               | 5M1               | 2            |
| 485     | 5M1               | 4M3               | 3            |
| 488     | 4M1               | 4M1               | 0            |
| 489     | 5M3               | 4M1               | 7            |
| 490     | 3M2               | 3M1               | 1            |
|         |                   | 平均(8本の歯)          | <b>3 ± 4</b> |
| 486(対照) | 1M2               | 1M2               | 0            |
| 487(対照) | 2M1               | 2M1               | 0            |

20

30

## C. MAPtide-BFP/HAで処置した歯のシェードガイド分析

| 歯番号     | ホワイトニング前の<br>シェード | ホワイトニング後の<br>シェード | シェード数値の改善    |
|---------|-------------------|-------------------|--------------|
| 491     | 4M2               | 3M2               | 5            |
| 492     | 4M1               | 3M1               | 7            |
| 494     | 5M3               | 4M2               | 6            |
| 495     | 4M1               | 3M1               | 7            |
| 496     | 5M1               | 4M2               | 4            |
| 497     | 5M1               | 3M3               | 10           |
| 498     | 5M2               | 4M3               | 4            |
| 499     | 5M1               | 4M3               | 3            |
|         |                   | 平均(8本の歯)          | <b>6 ± 2</b> |
| 493(対照) | 3M1               | 3M1               | 0            |

40

## 【0164】

表6に示すように、平均シェード改善は、HAでは $1 \pm 2$  ; MAPtide/HAでは $3 \pm 4$  ; MAPtide-BFP/HAでは $6 \pm 2$ であった。データは、HA単独では有意な効果がないことを示している。MAPtide-BFP/HAで得られたホワイトニングシェード変化は、MAPtide/HAで得られたものの2倍である。MAPtide-BFP/HAを用いて得られたホワイトニングは、肉眼による観察で、HAなし

50

のMAPtide-BFPにより得られたホワイトニングをかなり超えていた。

【0165】

実施例21 - 唾液被覆した歯を用いて得られたホワイトニング

自然に着色されたヒト歯を、実施例18に記載したようにブラッシングし、軽石で磨き、さらにブラッシングした。次に、その歯を新鮮なヒト唾液中で室温にて2時間インキュベートし、すすいだ後にMAPtide-BFP/HAで処置した。各歯のシェードを先に記載したように決定した。試験した7本の唾液被覆歯のうち、5本はホワイトニングが2シェード増加した。ホワイトニングの平均増加は $3 \pm 2$ シェードであった。2本の未処置対照歯のシェードに変化はなかった。

【0166】

実施例22 - 紅茶 + コーヒーで着色した歯を用いて得られたホワイトニング

漂白した歯を実施例18に記載したように紅茶とコーヒーの濃縮溶液中で37℃にてインキュベートした。その歯をブラッシングし、軽石で磨き、さらにブラッシングした後にMAPtide-BFP/HAで処置した。この実験では、9本の歯のうち7本が2シェード以上のホワイトニングの増加を示した。白さの平均増加は $4 \pm 3$ シェードであった。2本の未処置対照歯はホワイトニングの増加を示さなかった。

【0167】

実施例23 - ポリ(MAPtide-BFP)/HAで得られた歯ホワイトニング

自然に着色された歯をブラッシングし、軽石で磨き、さらにブラッシングして、実施例18に記載したようにポリ(MAPtide-BFP)/HAで処置した。試験した5本の歯は全てが2シェードのホワイトニングの増加を示した。平均ホワイトニング増加は $7 \pm 4$ シェードであった。1本の対照歯はホワイトニングの増加がなく、別の対照歯は1シェードのホワイトニングを有していた。

【0168】

実施例24 - MAPtide-ポリBFP/HAで得られた歯ホワイトニング

自然に着色された歯をブラッシングし、軽石で磨き、さらにブラッシングして、実施例18に記載したようにMAPtide-ポリBFP/HAで処置した。試験した8本の歯のうち5本は、2シェードのホワイトニングの増加を示した。平均ホワイトニング増加は $4 \pm 4$ シェードであった。1本の対照歯はホワイトニングの増加がなく、別の対照歯は1シェードのホワイトニングを有していた。

【0169】

実施例25 - 30%のDOPA残基を含む10~25アミノ酸ペプチドの調製

25アミノ酸のペプチド(  
YKGKG KYKYGKKKGK YKGKG YKYYG

ここでYはL-DOPAを指す)を、この配列由来の複数のより短い断片と共に、固相ペプチド合成により調製した。これらのペプチドは、実施例14に記載した方法を用いてBFPにコンジュゲートし、実施例17および18に記載した方法を用いてHAと複合化して、歯に適用した。この材料を用いて得られたホワイトニングは、より大きなMAPtideを含むMAPtide-BFP/HAを用いて得られたホワイトニングよりもかなり劣っていた。

【0170】

他の態様

本発明は、その詳細な説明に関連して説明してきたが、前述の説明は、例示するためのものであり、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定するものではないことが理解されるべきである。他の局面、利点、および修飾は添付の特許請求の範囲内である。

10

20

30

40



## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |   | International application No.<br>PCT/US2014/020233 |
|--|---|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - A61Q 11/00 (2014.01)<br>USPC - 424/54<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC(8) - A23J 1/20; A61K 8/64, 38/16; A61Q 11/00, 11/02; C07K 1/00, 1/13, 14/00, 16/00, 17/00, 19/00; C08H 1/04 (2014.01)<br>USPC - 424/54; 530/300, 350, 360  |   |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>CPC - A61K 8/64, 2800/57, 2800/434; A61Q 11/00 (2014.02)  |   |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>PatBase, Google Patents, PubMed  |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                  | Relevant to claim No.                              |
| X  | US 2013/0022555 A1 (BRIDGEMAN et al) 24 January 2013 (24.01.2013) entire document                   | 1, 3, 15-19, 24-26, 28, 29, 40-42                  |
| Y  |   | 2, 20, 21, 27, 57, 58                              |
| X  | WO 2011/057180 A2 (CLARKSON et al) 11 May 2011 (11.05.2011) entire document                         | 30-33, 36  |
| X  | US 2012/0201748 A1 (CHA et al) 09 August 2012 (09.08.2012) entire document                          | 59-61  |
| Y  |   | 27   |
| Y  | US 2012/0078296 A1 (LEE) 29 March 2012 (29.03.2012) entire document                                 | 2, 20, 21, 57, 58                                  |
| A  | US 2007/0190107 A1 (TOSATTI et al) 16 August 2007 (16.08.2007) entire document                      | 1-3, 15-21, 24-33, 36, 40-42, 57-61                |
| A  | US 2006/0009550 A1 (MESSERSMITH et al) 12 January 2006 (12.01.2006) entire document                 | 1-3, 15-21, 24-33, 36, 40-42, 57-61                |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>   |   |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>19 June 2014  | Date of mailing of the international search report<br>10 JUL 2014                                   |  |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201  | Authorized officer:<br>Blaine R. Copenheaver<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774 |  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2014/028233

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

## a. (means)

- on paper  
 in electronic form

## b. (time)

- in the international application as filed  
 together with the international application in electronic form  
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2014/028233

## 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.: 4-14, 22, 23, 34, 35, 37-39, 43-58, 62-64 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.

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.            | F I           | テーマコード(参考) |
|-------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 K 8/02 (2006.01)  | A 6 1 K 8/02  |            |
| A 6 1 Q 11/00 (2006.01) | A 6 1 Q 11/00 |            |
| C 0 7 K 19/00 (2006.01) | C 0 7 K 19/00 |            |

(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, 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, R, S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H, R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. J A V A

|   |
|---|
| (74) 代理人 100148699<br>弁理士 佐藤 利光   |
| (74) 代理人 100128048<br>弁理士 新見 浩一   |
| (74) 代理人 100129506<br>弁理士 小林 智彦   |
| (74) 代理人 100114340<br>弁理士 大関 雅人   |
| (74) 代理人 100114889<br>弁理士 五十嵐 義弘  |
| (74) 代理人 100121072<br>弁理士 川本 和弥   |
| (72) 発明者 プロディ リチャード サイモン<br>アメリカ合衆国 オハイオ州 コロンブス オレンタンジー ブールバード 3539   |
| (72) 発明者 ジュバンチッチ トーマス ジョエル<br>アメリカ合衆国 オハイオ州 パウエル アンドーバー ドライブ 350  |
| (72) 発明者 ホーファー ニコル<br>アメリカ合衆国 オハイオ州 ベクスレー リビングストン アベニュー 2466  |
| (72) 発明者 サンドボー ウダイ ビー.<br>アメリカ合衆国 オハイオ州 ヒリアード ベニンガン ドライブ 1852   |
| F ターム(参考) 4C083 AB171 AB211 AB291 AD091 AD092 AD411 AD412 AD431 CC41 DD27<br>DD41 EE35<br>4H045 AA10 AA20 BA10 BA41 EA60 FA74 |