

(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2010-523093

(P2010-523093A)

(43) 公表日 平成22年7月15日(2010.7.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-501447 (P2010-501447)
 (86) (22) 出願日 平成20年4月7日 (2008.4.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年12月1日 (2009.12.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/002746
 (87) 国際公開番号 W02008/122434
 (87) 国際公開日 平成20年10月16日 (2008.10.16)
 (31) 優先権主張番号 07007200.4
 (32) 優先日 平成19年4月5日 (2007.4.5)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 07018956.8
 (32) 優先日 平成19年9月26日 (2007.9.26)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 509273385
 シンバイオテック ゲゼルシャフト ツー
 ア フォルシュング ウント エントヴィ
 ックルング アウフ デム ゲビート デ
 ア ビオテヒノロジー ミット ベシュレ
 ンクテル ハフツング
 ドイツ連邦共和国 6 6 1 2 3 ザールブ
 リュッケン, サイエンス パーク ザール
 1
 (71) 出願人 509274094
 ティリ, ミヒェル
 ベルギー王国 ベー-4 8 7 0 トゥルー
 ズ, カル デュ ビーフ 1 6 6
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B i s - m e t ヒストン

(57) 【要約】

本発明は、ペプチド結合により成熟真核生物ヒストンに連結された第1および第2のN末端アミノ酸残基として2つのメチオニン残基から構成されるポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。本発明はさらに、前記核酸分子を含むベクター、前記ベクターによりトランスフォームされた宿主、核酸分子によりコードされるポリペプチド、および医薬および診断用組成物に関する。本発明はまた、本発明の核酸分子、ベクター、宿主およびポリペプチドの疾病の治療用の組成物の製造における使用に関する。さらに、本発明は、サンプル中の核酸分子またはポリペプチドの存在を試験する方法およびキットに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 第 1 および第 2 の N 末端アミノ酸残基として、ペプチド結合を介して成熟真核生物ヒストン (a b) に連結されている 2 つのメチオニン残基 (a a) から構成されるポリペプチドをコードするか；

b) 第 1 および第 2 の N 末端アミノ酸残基として、ペプチド結合を介して、(a) の成熟真核生物ヒストンと少なくとも 80 % の配列同一性を有し、かつその生物学的活性を本質的に保持している成熟真核生物ポリペプチド (b b) に連結されている 2 つのメチオニン残基 (b a) から構成されるポリペプチドをコードするか；または

c) (a) または (b) のポリペプチドをコードする核酸分子の相補鎖にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、前記核酸分子は、少なくとも 2 つの N 末端メチオニン残基を有し、(a) または (b) のポリペプチドの生物学的活性を本質的に保持するポリペプチドをコードする、核酸分子。

【請求項 2】

ヒストンは、ヒストン H 1 . 0 , H 1 . 1 , H 1 . 2 , H 1 . 3 , H 1 . 4 , H 1 . 5 および H 1 t からなる群より選択される、請求項 1 記載の核酸分子。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載の核酸分子に相補的な核酸分子。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 記載の核酸分子のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、(a a) , (b b) または (c) の 2 つの N 末端メチオニン残基をコードするヌクレオチドトリプレットに相補的なヌクレオチドを含み、かつ最少長さ 10 ヌクレオチドを有する、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 6】

請求項 5 記載のベクターによりトランスフォームされた宿主であって、該宿主はヒトではなく、かつヒト胚ではない、上記宿主。

【請求項 7】

細菌、酵母細胞、昆虫細胞、真菌細胞、哺乳動物細胞または植物細胞である、請求項 6 記載の宿主。

【請求項 8】

ポリペプチドを製造する方法であって、請求項 6 または 7 記載の宿主を適当な条件で培養し、産生されたポリペプチドを単離することを含む方法。

【請求項 9】

請求項 1 または 2 記載の核酸分子によりコードされるか、または請求項 8 記載の方法により製造されるポリペプチド。

【請求項 10】

請求項 1 または 2 記載の核酸分子または請求項 5 記載のベクター、または請求項 6 または 7 記載の宿主または請求項 9 記載のポリペプチドを含む組成物。

【請求項 11】

さらに成熟真核生物ヒストンを含む、請求項 10 記載の組成物。

【請求項 12】

さらに任意に薬学的に許容しうる担体および/または希釈剤を含んでいてもよい医薬組成物である、請求項 10 または 11 記載の組成物。

【請求項 13】

診断用組成物である、請求項 10 または 11 記載の組成物。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

A 癌，血小板減少症，細菌，ウイルスまたは真菌感染等の感染，全身性エリテマトーデス（S L E）または慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患，潰瘍性大腸炎，またはアルツハイマー病（A D）およびパーキンソン病（P D）等のアミロイド様線維を有する疾患，リーシュマニア症，ミオパシー，または血栓事象に関連する心臓血管疾患から選択される疾病を治療および／または予防する方法であって，請求項 1 2 記載の組成物を治療または予防を必要とする被験者に投与することを含む方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 または 2 記載の核酸分子，または請求項 5 記載のベクター，または請求項 6 または 7 記載の宿主，または請求項 9 記載のポリペプチドの，治療および／または診断目的のための組成物の製造における使用。

10

【請求項 1 6】

治療目的は，癌，血小板減少症，細菌，ウイルスまたは真菌感染等の感染，全身性エリテマトーデス（S L E）または慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患，潰瘍性大腸炎，またはアルツハイマー病（A D）およびパーキンソン病（P D）等のアミロイド様線維を有する疾患，リーシュマニア症，ミオパシーまたは血栓事象に関連する心臓血管疾患の治療である，請求項 1 5 記載の使用。

【請求項 1 7】

請求項 1 または 2 記載の核酸分子または請求項 9 記載のポリペプチドを特異的に認識するが，対応する成熟真核生物ヒストンには結合しない抗体またはアプタマーまたはファージ。

20

【請求項 1 8】

請求項 1 7 記載の抗体，アプタマーおよび／またはファージを含む診断用組成物。

【請求項 1 9】

請求項 1 または 2 記載の核酸分子または請求項 9 記載のポリペプチドの存在を試験する方法であって，被験者から取得したサンプルを，前記核酸分子またはポリペプチドの存在についてアッセイすることを含む方法。

【請求項 2 0】

前記サンプルは，血液，血清，血漿，唾液，尿，粘膜組織，粘液である，請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

1 またはそれ以上の容器中に，請求項 1 - 3 のいずれかに記載の核酸分子，または請求項 4 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド，または請求項 5 記載のベクター，または請求項 6 または 7 記載の宿主，または請求項 9 記載のポリペプチド，または請求項 1 7 記載の抗体，アプタマーおよび／またはファージのいずれかを含むキット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は，ペプチド結合により成熟真核生物ヒストンに連結されている第 1 および第 2 の N 末端アミノ酸残基として 2 つのメチオニン残基から構成されるポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。本発明はさらに，前記核酸分子を含むベクター，前記ベクターでトランスフォームされた宿主，核酸分子によりコードされるポリペプチド，および医薬および診断用組成物に関する。本発明はまた，本発明の核酸分子，ベクター，宿主およびポリペプチドの，疾病の治療用の組成物の製造における使用に関する。さらに本発明は，サンプル中の核酸分子またはポリペプチドの存在を試験する方法およびキットに関する。

40

【背景技術】

【0 0 0 2】

本明細書の全体にわたり種々の文献が引用される。前記文献および製造元の指針の開示内容は，その全体が本明細書に参照として取り込まれる。

50

【0003】

現在、組換え蛋白質、例えばヒストンの高レベル生産に多大な経済的興味もたれている。大量の組換え蛋白質の製造は、その特性および機能を研究するために十分な量の蛋白質を提供するという目的のみならず、治療用途に大量の蛋白質を提供する点でも興味もたれている。

【0004】

組換え蛋白質の高レベルの製造および精製を首尾良く行うためには、非常に多くのパラメータを考慮しなければならない。重要なパラメータとしては、発現条件、翻訳制御およびmRNA安定性、蛋白質のターゲティングおよび分解が挙げられる(Makrides, S., *Microbiological Reviews*, 1996: 512)。

10

【0005】

組換え蛋白質の製造、検出および精製を改良するための1つのアプローチは、広範な種類の融合パートナーを使用することである(Makrides, S., *Microbiological Reviews*, 1996: 512)。組換え蛋白質の精製および検出のためにアフィニータグを付ける精巧な手法が開発されている。そのようなアフィニータグは、より効率的な精製を可能とし、一方で、組換え蛋白質のタグに基づく簡便な検出を可能とする、有利な特性を組み合わせ持つ。しかし、多くの場合、比較的大きいアフィニータグの付加は、蛋白質の翻訳、フォールディングおよび活性に望ましくない影響を与えるため、不利である場合もある。特に、治療用途に用いる場合には、後にアフィニータグを除去することがしばしば必要であり、したがって、アフィニータグが蛋白質に与える有利な効果のいくつか(例えば検出の容易さ)が軽減される(Gellissen, G. "Production of Recombinant Proteins", 2005, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim)。

20

【0006】

それぞれの発現期ポリペプチドのN末端におけるメチオニン残基の取り込みは、原核生物ならびに真核生物により用いられる万能の翻訳開始シグナルを構成する。E. coliにおいては、このN末端メチオニン残基の除去は、細胞質酵素であるメチオニンアミノペプチダーゼ(map)により行われる(Hirel et al., *Biochemistry*, 1989, 86: 8247)。

30

【0007】

原核生物、例えばE. coliにおいて産生された組換え真核生物蛋白質のN末端メチオニン残基の効率的なプロセッシングは、メチオニンに隣接するアミノ酸に依存することが示されている。いくつかのアミノ酸については矛盾するデータがあるが、切断の可能性は小さくかつ荷電されていないアミノ酸残基であるAla, Gly, Pro, Ser, Val, CysおよびThrについて最も高いことについては意見が一致しているようである。より大きい側鎖はメチオニンプロセッシングには不利であるようである(Hirel et al., *Biochemistry*, 1989, 86: 8247; Frottin et al., *Mol. & Cell. Proteomics*, 2006, 12: 2336; Gellissen, G. "Production of Recombinant Proteins", 2005, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim)。

40

【0008】

N末端メチオニンのプロセッシングは蛋白質の安定性(Gigliione et al., *EMBO J.*, 2003, 1: 13)のみならず、蛋白質の正しい機能にも重要な役割を果たすと考えられており、これは例えば、MEF-2C、ヒトヘモグロビン、インターロイキン-2、RNase Aホモログまたはカエルリボヌクレアーゼについて示されている(Meierhans and Allemann, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 26052; Adachi, K. et al., *Protein Expr. Purif.*, 2000, 20: 37; Endo, S. et al., *Bioch*

50

emistry, 2001, 40:914; Boix, E. et al., J. Mol. Biol., 1996, 257:992; Liao, Y. D. et al., Nucleic Acids Res., 2003, 31:5247; Varshavsky, A., Proc., Natl. Acad. Sci., 1996, 93:12142)。メチオニン残基を除去するために自然が何故このような特別の酵素系を維持してきたかについての別の理論は、細胞メチオニンプールをリサイクルして、この必須のアミノ酸を節約するためであるというものである(Hirel et al., Biochemistry, 1989, 86:8247)。

【0009】

EP1254166は、E. coliにおけるヒストン蛋白質の組換え製造を記載する。このようなヒト蛋白質の組換え製造は、治療用途に、ならびにヒトまたは仔ウシ胸腺調製物と比較してより効率的かつ費用効果が高い点で、利点があると考えられる。さらに、蛋白質の組換え製造は、製造プロセスの間のより優れた品質管理を可能とする。

10

【0010】

Pyora (Pyo, S. H. et al., Proteins Expr. Purif., 2001, 1:38)は、E. coliにおける組換えヒストンH1.5の製造を記載しており、ヒストンの強い塩基性の特性を用いて、組換え蛋白質の大規模精製の効率的な方法を開発した。

【0011】

組換え蛋白質の高レベルの製造は従来技術でも示されているが、得られた組換え蛋白質を検出するための適当な方法の必要性はなお高い。上述したように、アフィニティータグ、例えばhis-tagの使用は、当該技術分野において広く用いられているが、治療用途のための蛋白質の製造においては問題があるかもしれない。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって、本発明の基礎をなす技術的課題は、例えば、製造および検出を簡単にすることが可能な改良された組換え真核生物ポリペプチドを提供することであった。

【課題を解決するための手段】

【0013】

この技術的課題は、特許請求の範囲において特定される態様により解決される。

30

【0014】

したがって、第1の態様においては、本発明は、

(a) 成熟真核生物ヒストン(ab)にペプチド結合により連結されている第1および第2のN末端アミノ酸残基として2つのメチオニン残基(aa)からなるポリペプチドをコードする；

(b) (a)の成熟真核生物ヒストンと少なくとも80%の配列同一性を有し、その生物学的活性を本質的に保持する成熟真核生物ポリペプチド(bb)にペプチド結合により連結されている第1および第2のN末端アミノ酸残基として2つのメチオニン残基(ba)からなるポリペプチドをコードする；または

40

(c) ストリンジェントな条件下で(a)または(b)のポリペプチドをコードする核酸分子の相補鎖にハイブリダイズし、ここで、前記核酸分子は、2つのN末端メチオニン残基を少なくとも有し、かつ(a)または(b)のポリペプチドの生物学的活性を本質的に保持するポリペプチドをコードする、核酸分子に関する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】 図1は、精製方法の概要を示す。

【図2】 図2は、B1, M-H1A-P02臨床バッチのQTOFマスペクトルを示す。

50

【図3】図3は、B2、M-H1A-Pool 01臨床バッチのQTOFマスペクトルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明においては、核酸分子には、センスおよびアンチセンス鎖の両方について、DNA、例えば、cDNAまたはゲノムDNA、RNA（例えばmRNA）、合成または半合成の形の分子、さらに、DNAまたはRNAの合成または半合成の誘導体（例えば、PNAまたはホスホロチオエート）、および混合ポリマーが含まれる。当業者には容易に理解されるように、これらは、追加の非天然ないし誘導化したヌクレオチド塩基を含むことができる。好ましい態様においては、核酸分子はDNA、例えばゲノムDNAである。

10

【0017】

本発明の目的のためには、ペプチド核酸（PNA）はポリアミドタイプのDNA類似体であり、誘導体用のアデニン、グアニン、チミンおよびシトシンのモノマーユニットは市販されている（Perceptive Biosystems）。DNAのある成分、例えば、リン、酸化リン、またはデオキシリボース誘導体はPNAには存在しない。Nielsenら（Science 254:1497（1991））およびEgholmら（Nature 365:666（1993））に開示されているように、PNAは、相補的DNA鎖に特異的に強く結合し、ヌクレアーゼにより分解されない。実際、PNAは、DNAそれ自体よりも強くDNAに結合する。これはおそらく、2つの鎖の間に静電的反発がないため、およびポリアミド骨格はよりフレキシブルであるためであろう。このため、PNA/DNAデュプレックスは、DNA/DNAデュプレックスより広い範囲のストリンジェンシーの条件下で結合し、マルチプレックスハイブリダイゼーションを行うのが容易である。結合が強いため、DNAの場合よりも小さいプローブを用いることができる。さらに、PNA/DNAハイブリダイゼーションにより1塩基ミスマッチを判定することができると考えられる。これは、PNA/DNA 15-merにおける1つのミスマッチは融点（ T_m ）を8 - 20 低下させ、これに対しDNA/DNA 15-merデュプレックスの場合には4 - 16 であるためである。また、PNA中に荷電基がないということは、ハイブリダイゼーションを低いイオン強度で行うことができ、分析の間に塩による干渉の可能性を低減しうることを意味する。

20

【0018】

本明細書において用いる場合、“ポリペプチド”との用語は、30を越えるアミノ酸から構成される分子群を記述する。本発明においては、このポリペプチドの群は、“蛋白質”を含む。ポリペプチドはさらに、2以上のポリペプチド分子から構成されるダイマー、トリマーおよびより高次のオリゴマーを形成してもよい。そのようなダイマー、トリマー等を形成するポリペプチド分子は、同一であっても、非同一であってもよい。したがって、対応する高次構造は、ホモダイマーまたはヘテロダイマー、ホモトリマーまたはヘテロトリマー等と称される。ホモダイマーまたはヘテロダイマー等も“蛋白質”の定義に包含される。ポリペプチドはまた、本発明のポリペプチドのC末端側に融合パートナーが結合している融合蛋白質であってもよい。前記融合蛋白質の、本明細書において定義されるヒストン配列、またはそのフラグメントもしくはバリエーションではない成分としては、所望の特性、例えば、改変された/増強された安定性、改変された/増強された溶解性、および/または1またはそれ以上の特定の細胞タイプにターゲティングする能力を与えるか、または異なる生物学的活性を与えることができるアミノ酸配列が挙げられる。例えば、細胞表面マーカーに特異的な抗体、または前記抗体の抗原認識フラグメントを有する融合蛋白質が想定される。さらに、そのようなポリペプチドのアミノ酸および/またはペプチド結合の1またはそれ以上が機能的類似体で置き換えられているペプチド模倣体もまた本発明に包含される。そのような機能的類似体としては、遺伝子にコードされる20種のアミノ酸以外のすべての既知のアミノ酸、例えば、セレノシステインなどが挙げられる。“ポリペプチド”および“蛋白質”との用語はまた、グリコシル化、アセチル化、ホスホリル化等により修飾が生ずる、天然に修飾されたポリペプチド/蛋白質も表す。そのような修飾

30

40

50

は当該技術分野においてよく知られている。

【0019】

本発明においては、“メチオニン”との用語は、当業者によく知られている。メチオニンは、必須アミノ酸であり、標準的な遺伝コードではコドンAUGによりコードされる。前記メチオニンは、真核生物において見いだされる場合、本発明の好ましい態様に寄与する。また、メチオニンとの用語の意味には、そして本発明の別の態様に寄与するものには、原核生物のN-ホルミルメチオニンが含まれる。

【0020】

本明細書において用いる場合、“第1および第2のN末端アミノ酸残基”との用語は、本発明のポリペプチドの1位および2位において見いだされるアミノ酸残基を表す。これらの残基はまた、当該技術分野において、N末端の最も末端および末端から2番目の残基とも称される。別の用語では、最初のメチオニン残基はポリペプチドの最初の翻訳産物のN末端に位置しており、これはそれ自体、メチオニンをそのN末端に含む。

10

【0021】

本明細書において用いる場合、“ペプチド結合”との用語は、当業者によく知られており、1つのアミノ酸のカルボキシル基が別のアミノ酸のアミノ基と反応して、2つのアミノ酸分子の間に形成される化学結合を表す。

【0022】

本発明においては、“成熟真核生物ヒストン”との用語は、その開始N末端メチオニンを欠いたヒストンを表す。当業者にはよく知られるように、ポリペプチドは、万能翻訳開始シグナルを用いて翻訳され、このため、翻訳されたポリペプチドのN末端の最初のアミノ酸残基としてメチオニンが取り込まれる。真核生物において、および原核生物の一部においても、このN末端メチオニンが切断されて、ポリペプチドは“成熟”する。

20

【0023】

本発明においては、“ヒストン”との用語は、コアヒストンH2A（ヒトH2AのSwiss-Prot番号はP02261である）、H2B（ヒトH2BのSwiss-Prot番号はP02278である）、H3（ヒトH3.1のSwiss-Prot番号はP16106である）およびH4（ヒトH4のSwiss-Prot番号はP02304である）、およびH1リンカーヒストンファミリー（Swiss-Prot番号については下記を参照）を含む一群の蛋白質を表す。ヒストンは、細胞核の構成成分として伝統的に知られており、その周りにDNAが巻き付く“スプール”として作用し、遺伝子制御において鍵となる役割を果たす。しかし、ヒストンは、広範な多機能を示す（Reichhart, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1985, 82: 4871; Reichhart, R. et al., FEBS 1985, 188: 63）。例えば、ヒストンは、全身でホルモンおよび制御因子として作用することが見いだされており、また、重要な保護機能の担体でもある。

30

【0024】

ヒストンは、その広範な多機能のため、多くの治療用のアプローチにおいて重要になってきた。例えば、ヒストンH1、H2AおよびH2Bは、末梢の健康なリンパ球を刺激することが見いだされている（Cebecauer, L. et al. Rheumatologia 1991, 5: 107）。ヒストンH1は、筋芽細胞の増殖を刺激することにより筋肉再生を改善すること（Henriquez, J. P. et al., J. Cell Sci. 2002, 115: 2041）、アミロイド様線維をもつ疾病の状態を調節すること（Duce, J. A. et al. J. Mol. Biol. 2006, 361: 493）、および幹細胞を刺激すること（Semina et al. Radiation Biology and Oncology, 1994, 34: 544）が見いだされている。ヒストンH1はまた、潰瘍性大腸炎およびその臨床的サブタイプの診断、予防および治療に用いることができる（Braun, J. et al., 米国特許6,074,835）。ヒストンH1ならびにコアヒストン類はさらに、血液脳関門を越えて生物学的に活性な物質を輸送することができるが見いだされている（Pardridge, W

40

50

. M . e t a l . , J . P h a r m a c o l . E x p . T h e r . 1 9 8 9 , 2 5 1 : 8 2 1) 。 さ ら に , 欧 州 特 許 0 3 9 2 3 1 5 は , ヒ ス ト ン H 1 お よ び そ の サ ブ タ イ プ の ホ ル モ ン ま た は ホ ル モ ン 様 活 性 を 示 す 。 自 己 免 疫 疾 患 , 例 え ば , 全 身 性 狼 瘡 (S L E) に お け る ヒ ス ト ン の 役 割 が 示 さ れ て い る (例 え ば , 欧 州 特 許 0 5 3 2 9 7 9 ま た は 国 際 出 願 W O 0 3 / 0 4 4 0 5 4) 。 こ れ ま で に 示 さ れ て い る ヒ ス ト ン の さ ら に 別 の 機 能 に は , 抗 生 剤 機 能 (米 国 特 許 6 5 6 5 8 5 4 お よ び 6 8 8 4 4 2 3) お よ び 抗 ウ イ ル ス 機 能 (W O 2 0 0 5 / 1 1 2 9 7 5) が 含 ま れ る 。 さ ら に , 血 小 板 凝 集 の 予 防 (W O 0 2 / 0 6 7 9 0 7) ま た は 血 小 板 減 少 症 の 治 療 (W O / 2 0 0 6 / 1 1 9 9 1 2) に お け る ヒ ス ト ン の 使 用 が 示 さ れ て い る 。

【 0 0 2 5 】

ま た , ヒ ス ト ン は , 癌 の 治 療 に お い て 重 要 な 役 割 を 果 た す こ と が 見 い だ さ れ て い る 。 V a n i ら (V a n i , G . e t a l . , C h e m o t h e r a p y 2 0 0 3 , 4 9 : 2 5 2) は , 例 え ば , ヒ ス ト ン H 1 が 実 験 的 乳 癌 腫 を も つ 動 物 に お い て 免 疫 状 態 お よ び 免 疫 応 答 を 改 善 す る こ と を 示 す 。 ま た , 癌 に 罹 患 し た 個 人 に お け る 抗 酸 化 状 態 は , ヒ ス ト ン H 1 に よ り 増 強 さ れ る こ と が 示 さ れ て い る (V a n i , G . e t a l . , C h e m o t h e r a p y 2 0 0 5 , 5 1 : 5 7) 。 ヒ ス ト ン H 1 で ヒ ト エ ス ト ロ ゲ ン 感 受 性 乳 癌 細 胞 を 処 理 す る と , エ ス ト ロ ゲ ン レ セ プ タ ー の 数 が 減 少 す る こ と が 示 さ れ て い る (V a n i , G . a n d D e v i , C . S . , M o l . C e l l B i o c h e m . 2 0 0 5 , 2 7 2 : 1 5 1) 。 ヒ ス ト ン H 1 ま た は H 2 A : H 2 B を 用 い る 放 射 線 誘 導 性 白 血 病 ま た は 癌 腫 の 治 療 が 米 国 特 許 5 8 1 2 2 5 7 に 示 さ れ て い る 。 ヒ ス ト ン は ま た , 病 原 性 の 細 胞 外 D N A お よ び 全 身 を 循 環 す る 病 原 性 ヌ ク レ オ ソ ー ム を 除 去 す る こ と に よ り 癌 を 治 療 す る の に 有 用 で あ る 可 能 性 が あ る (L e L a n n - T e r r i s s e e t a l . (1 9 9 7) C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r ; 4 3 : 3 3 7) 。

【 0 0 2 6 】

本 発 明 に お い て は , 核 酸 分 子 は ま た , (a) の 成 熟 真 核 生 物 ヒ ス ト ン に 対 し て 少 な く と も 8 0 % の 配 列 同 一 性 , よ り 好 ま し く は 8 5 % , よ り 好 ま し く は 9 0 % の 配 列 同 一 性 を 有 し , 本 質 的 に そ の 生 物 学 的 活 性 を 保 持 す る 成 熟 真 核 生 物 ポ リ ペ プ チ ド に ペ プ チ ド 結 合 に よ り 結 合 し た 第 1 お よ び 第 2 の N 末 端 ア ミ ノ 酸 残 基 と し て 2 つ の メ チ オ ニ ン 残 基 か ら 構 成 さ れ る ポ リ ペ プ チ ド を コ ー ド す る こ と が で き る 。 さ ら に よ り 好 ま し く は , 核 酸 分 子 は , (a) の 成 熟 真 核 生 物 ヒ ス ト ン に 対 し て 少 な く と も 9 5 % の 配 列 同 一 性 , 最 も 好 ま し く は 9 8 % の 配 列 同 一 性 を 有 し , そ の 生 物 学 的 機 能 を 保 持 し て い る 成 熟 真 核 生 物 ポ リ ペ プ チ ド に ペ プ チ ド 結 合 に よ り 連 結 さ れ た 第 1 お よ び 第 2 の N 末 端 ア ミ ノ 酸 残 基 と し て 2 つ の メ チ オ ニ ン 残 基 か ら 構 成 さ れ る ポ リ ペ プ チ ド を コ ー ド す る こ と が で き る 。

【 0 0 2 7 】

本 発 明 に お い て は , “ パ ー セ ン ト 配 列 同 一 性 ” と の 用 語 は , 2 ま た は そ れ 以 上 の ア ラ イ メ ン ト し た 核 酸 ま た は ア ミ ノ 酸 配 列 の , 核 酸 ま た は ア ミ ノ 酸 配 列 の 全 体 (ま た は そ の 比 較 す る 部 分 の 全 体) の 長 さ を 構 成 す る ヌ ク レ オ チ ド ま た は ア ミ ノ 酸 残 基 の 数 と 比 較 し た , 同 一 の ヌ ク レ オ チ ド / ア ミ ノ 酸 の マ ッ チ (“ ヒ ッ ト ”) の 数 を 記 述 す る 。 別 の 用 語 で は , 2 ま た は そ れ 以 上 の 配 列 ま た は サ ブ 配 列 に つ い て ア ラ イ ン メ ン ト を 用 い て , (サ ブ) 配 列 を 比 較 し , 比 較 ウ イ ン ド ウ に わ た っ て , ま た は 当 該 技 術 分 野 に お い て 知 ら れ る 配 列 比 較 ア ル ゴ リ ズ ム を 用 い て 比 較 し て , 指 定 さ れ た 領 域 に わ た っ て 最 大 対 応 に つ い て ア ラ イ ン メ ン ト し た と き の , ま た は 手 動 で ア ラ イ ン メ ン ト し て 肉 眼 で 調 査 し た と き の , 同 一 で あ る ア ミ ノ 酸 残 基 ま た は ヌ ク レ オ チ ド の パ ー セ ン テ ー ジ (例 え ば , 8 0 % ま た は 8 5 % の 同 一 性) を 決 定 す る こ と が で き る 。 こ の 定 義 は , 試 験 配 列 の 相 補 体 に も 適 用 さ れ る 。 本 発 明 に し た が う 好 ま し い 核 酸 分 子 / ポ リ ペ プ チ ド は , 少 な く と も 約 1 5 - 2 5 ア ミ ノ 酸 ま た は ヌ ク レ オ チ ド の 長 さ の 領 域 に わ た っ て , よ り 好 ま し く は , 約 5 0 - 1 0 0 ア ミ ノ 酸 ま た は ヌ ク レ オ チ ド の 長 さ の 領 域 に わ た っ て , 上 記 の 同 一 性 が 存 在 す る も の で あ る 。 当 業 者 は , 例 え ば , 当 該 技 術 分 野 に お い て 知 ら れ る よ う に , C L U S T A L W コ ン プ ュ ー タ プ ロ グ ラ ム (T h o m p s o n N u c l . A c i d s R e s . 2 (1 9 9 4) , 4 6 7 3 - 4 6 8 0) ま た は F A S T A (P e a r s o n a n d L i p m a n , P r o c . N a t l . A c a d

10

20

30

40

50

. Sci., 1988, 85; 2444)等のアルゴリズムを用いて、配列の間のパーセント配列同一性をどのようにして求めるかを理解している。

【0028】

FASTDBアルゴリズムは、典型的にはその計算において配列中の内部非マッチ欠失または付加、すなわちギャップを考慮しないが、%配列同一性の過大評価を防ぐために手動で修正することができる。しかし、CLUSTALWは、その同一性の計算において配列ギャップを考慮しない。また、当業者に入手可能なものとして、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズム(Altschul, Nucl. Acids Res., 1977, 25:3389)がある。核酸配列用のBLASTNプログラムは、デフォルトとして、言長(W)11, 除外(E)10, M=5, N=4, および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、言長(W)3, および除外(E)10を使用する。BLOSUM62スコアリングマトリクス(Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci., 1989, 89:10915)は、アラインメント(B)50, 除外(E)10, M=5, N=4, および両方の鎖の比較を使用する。これらのプログラムはすべて本発明の目的のために用いることができる。上述のプログラムはすべて本発明にしたがって使用することができる。

10

【0029】

本発明においては、(a)として上に記載される対応する成熟真核生物ヒストンの生物学的活性の少なくとも20%が得られる場合、活性は本質的に保持されている。好ましくは、活性の少なくとも50%, 例えば、少なくとも60%, 少なくとも75%または少なくとも80%が保持される。より好ましくは、生物学的活性の少なくとも90%, 例えば少なくとも95%, さらにより好ましくは少なくとも98%, 例えば少なくとも99%が保持される。最も好ましくは、生物学的活性は完全に、すなわち100%保持される。また、本発明においては、ポリペプチドは(a)に記載される対応する成熟真核生物ヒストンと比較して増加した生物学的活性、すなわち、参照ヒストンの100%を越える酵素活性を有する。(ポリ)ペプチドの生物学的活性を評価する方法は当該技術分野においてよく知られており、例えば、限定されないが、酵素活性、細胞毒性、サイトカイン放出、溶血またはバイオマーカーの発現の測定が挙げられる。特に、細胞毒性試験は、例えば、(ポリ)ペプチド、例えばヒストンにより処理したインビトロまたはインビボ細胞培養物を用いる試験であり、処理後に細胞検出方法で細胞の死亡率の勾配を求める。また、特に抗体の場合には、生物学的活性はELISA試験により判定することができる。

20

30

【0030】

本明細書において用いる場合、“ハイブリダイズ/ハイブリダイズする”との用語は、核酸分子と、この核酸分子の(部分的な)相補鎖とが対を形成し、このことによりハイブリッドを形成することを表す。

【0031】

核酸分子を用いてハイブリダイゼーション実験をどのようにして実施するかは当該技術分野においてよく知られている。したがって、当業者は、ハイブリダイゼーションの成功のためにはどのようなハイブリダイゼーション条件を用いなければならないかを理解している。適当なハイブリダイゼーション条件の確立は、標準的な教科書、例えば、Sambrook and Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), またはHiggins and Hames (Eds.) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC, (1985)を参照することができる。1つの好ましい態様においては、ハイブリダイゼーションはストリンジентな条件下で行う。

40

50

【0032】

"ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件"とは、例えば、4 x SSC (600 mM NaCl, 60 mM クエン酸ナトリウム) で65 で一晩インキュベーションし、次に0.1 x SSCで65 で1時間洗浄することを含む。あるいは、ハイブリダイゼーション条件は、以下を含むことができる：、50%ホルムアミド、5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM クエン酸ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.6)、5 x デンハルト溶液、10%デキストラン硫酸、および20 µg/mlの変性し切断したサケ精子DNAを含む溶液中で42で一晩インキュベーションし、次にフィルターを0.1 x SSCで約65 で洗浄する。ハイブリダイゼーションの前記条件は、当業者には、"高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件"として知られる。また、低いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件("ハイブリダイゼーションの低いストリンジェンシー条件")で本発明の核酸分子にハイブリダイズする核酸分子も包含される。ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出のストリンジェンシーの変更は、主として、ホルムアミド濃度(より低いパーセンテージのホルムアミドはより低いストリンジェンシーを与える)、塩条件、または温度を操作することにより行う。例えば、低いストリンジェンシー条件は、4 x SSC中で50で一晩インキュベーションし、または6 X S S P E (20 X S S P E = 3 M NaCl; 0.2 M NaH₂PO₄; 0.02 M EDTA, pH 7.4)、0.5% SDS、30%ホルムアミド、100 µg/mlブロッキングサケ精子DNAを含む溶液中で37で一晩インキュベーションし、次に、1 X S S P E、0.1% SDSで50で洗浄することを含む。さらに、より低いストリンジェンシーを得るためには、ストリンジेंटなハイブリダイゼーション後の洗浄をより高い塩濃度(例えば5 X S S C)で行うことができる。ハイブリダイゼーション実験におけるバックグラウンドを抑制するために用いられる代替のブロッキング試薬を含めるか、および/または置き換えることにより、上述の条件を改変することができることに注意すべきである。典型的なブロッキング試薬としては、デンハルト試薬、B L O T T O、ヘパリン、変性サケ精子DNA、および市販の独自処方物が挙げられる。特別のブロッキング剤を含める場合には、互換性の問題のため、上述のハイブリダイゼーション条件を改変することが必要である。そのような改変は、一般に、当業者によって、追加の労力なしに行うことができる。ハイブリダイゼーション複合体は、溶液で(例えば、C o tまたはR o t分析)、または溶液中に存在する1つの核酸配列と、固体支持体(例えば、細胞等が固定された膜、フィルター、チップ、ピンまたはガラススライド等)上に固定化された別の核酸配列との間に形成される。上述の態様は、好ましくは高度にストリンジेंटな条件を表すが、あるいはより低いストリンジェンシーの条件を表してもよい。

10

20

30

【0033】

上述に加えて、(c)に記載される"ストリンジेंटな条件下で(a)または(b)のポリペプチドをコードする核酸分子の相補鎖にハイブリダイズする核酸分子"との用語は、(a)または(b)に記載されるヌクレオチド配列と、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも97%の配列同一性を示す配列を表す。

【0034】

上述したように、本発明において好ましいものは、(高度に)ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下で、本発明の核酸分子またはその一部にハイブリダイズしうる、すなわち、ヌクレオチド配列中の無関係の核酸分子にクロスハイブリダイズしない核酸分子である。上述の(c)によれば、(a)および(b)の核酸分子と関連するが配列は同一ではない核酸分子もまた本発明に包含される。さらに、(c)によれば、本発明は、(a)および(b)の核酸分子のフラグメントを含む。(c)に含まれるすべての態様について、この態様においては、この核酸分子によりコードされるポリペプチドが、少なくとも2つのN末端メチオニン残基を有し、(a)または(b)のヒストンの生物学的活性を保持しているかまたは本質的に保持していることが必須である。

40

【0035】

50

より好ましい態様においては、本発明はまた、上述の(a)または(b)の核酸分子の配列と比較してその配列が縮重している核酸分子に関する。本発明において用いる場合、“遺伝コードの結果縮重している”との用語は、遺伝コードの縮重のため、異なるヌクレオチド配列が同じアミノ酸をコードすることを意味する。

【0036】

ポリペプチドに融合させて製造および検出を容易にすることができる多数のアフィニティータグが当該技術分野において知られているが、治療用途において用いるためには、しばしばこれらのタグを除去しなければならない。これらのアフィニティータグとは異なり、本発明者らは、驚くべきことに、*bis-met*ポリペプチドがその天然の対応物と同じ生物学的特性を示し、したがって、本発明のポリペプチドを治療目的に用いることができることを見いだした。本発明のポリペプチドの機能は、少なくとも本発明者らの用いた試験で検出できるほど変化していないため、メチオニン残基の除去は不要である。さらに、メチオニン残基の除去は、製造の間には生じない。上で概要を説明したように、N末端メチオニン残基の切断は、2番目のアミノ酸残基のサイズに大きく依存する。本発明のポリペプチドは、2番目のアミノ酸残基としてもう一つのメチオニンを含むため、観察された1つの効果は、2つのN末端メチオニン残基の低いパーセンテージ、すなわち、約20%の範囲のみが*E. coli*中で切断されることである。この場合、残りの約80%では、2つのN末端メチオニン残基は切断されない。原核生物、例えば*E. coli*における本発明のポリペプチドの製造の間、最もN末端のメチオニンもホルミル化されうる。しかし、本発明者らは、質量分析で調べたところ、ホルミル化された生成物は得られなかった。また、1つのメチオニン残基のみの切断は観察することができなかった。理論に拘束されることを望むものではないが、最初のN末端メチオニン残基の切断は2番目のN末端メチオニンの迅速な除去につながり、したがって、両方のメチオニン残基が切断されると推測される。

10

20

30

40

【0037】

この点において、本発明の*bis-met*ヒストンは、内因性ヒストンの存在下で容易に検出可能であるという利点を提供する。例えば、*bis-met*ヒストンは、種々のモードのHPLC(RPC; SEC; IEX)または電気泳動(SDS-PAGE, CE)によって内因性の対応物から分離することはできないかもしれないが、例えば同じRP-HPLC画分で、*bis-met*ヒストンのエレクトロスプレーイオン化(またはタンデム)質量分析(ESI-MS)により容易に区別することができる(実施例を参照)。このことにより、臨床試験の間の治療用ヒストンの薬物動態を、同位体標識または試験する薬剤に対する特別の抗体を用いる必要なく、モニターすることが可能となる。

【0038】

さらに、驚くべきことに、2つのメチオニン残基をその第1および第2のN末端アミノ酸残基として含むヒストンは、組換え製造において有益な特性を示すことが見いだされた。すなわち、本発明者らは、2つのメチオニン残基を導入すると顕著に高いレベルのヒストンを得ることができることを見いだした。*bis-met*ヒストンの発酵後の細菌細胞の収率は有意に高くはないが、驚くべきことに、*bis-met*ヒストンの挙動は、下流のプロセッシングの最初の鍵となる段階において著しく異なることが見いだされた。*bis-met*ヒストンは予測された塩分濃度で溶出されることができ、追加のメチオニン残基を欠いた組換えヒストンは非常に高い塩分濃度でなければMacroprep High Sカラムから溶出されることができず、効率よくさらに精製することができない。以上のように、*bis-met*ヒストンは、Macroprep High Sカラム上で優れた挙動を示し、効率的かつ高収率の精製プロセスを可能とする。

【0039】

したがって、本発明は、ヒストンのN末端における2つのメチオニン残基の存在は、内因性ヒストンの存在下における簡単な検出の可能性を提供し、効率的な組換え蛋白質製造を可能とする*bis-met*ヒストンを与えるという新たな知見に基づく。

【0040】

50

好ましい態様においては、ヒストンは、ヒストンH1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5およびH1tTestisからなる群より選択される。

【0041】

ヒトヒストンH1サブタイプのSwiss-Prot受託番号は次のとおりである：H1.0 - P07305, H1.1 - Q02539, H1.2 - P16403, H1.3 - P16402, H1.4 - P10412, H1.5 - Q14529およびH1t - P22492。ヒトヒストンH1.2の核酸およびアミノ酸配列は配列番号6および7に示される。ヒトヒストンH1.3の核酸およびアミノ酸配列は配列番号8および9に示される。ヒトヒストンH1.4の核酸およびアミノ酸配列は配列番号10および11に示される。ヒトヒストンH1.5の核酸およびアミノ酸配列は配列番号12および13に示される。

10

【0042】

別の態様においては、本発明は、本発明の核酸分子に相補的な核酸分子を提供する。

【0043】

核酸分子は、許容性の塩および温度条件下で塩基対形成により自然に互いに結合する場合、“相補的”である。例えば、配列“A-G-T”は、相補的配列“T-C-A”に結合する。本発明においては、“相補的”とは、本発明の核酸分子の長さ全体にわたるヌクレオチドの完全な塩基対形成を表す。すなわち、適切なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を選択すれば、検出可能な標識で標識した、本発明の核酸分子に正確に相補的ではない核酸分子は、検出可能なシグナルを生成しない。そのような相補的核酸分子は、例えば、RNAまたはDNA調製物のノザンまたはサザンプロット分析におけるプローブとして用いることができる。

20

【0044】

別の観点においては、本発明は、本発明の核酸分子のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを提供し、ここで、オリゴヌクレオチドは、本発明のヒストンの2つのN末端メチオニン残基をコードするヌクレオチドトリプレットに相補的なヌクレオチドを含み、最少長さ10ヌクレオチドを有する。

【0045】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、シーケンシングアッセイ用のプライマーとして、またはRNAまたはDNA調製物のノザンまたはサザンプロット分析におけるプローブとして用いることができる。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、例えば少なくとも25個の連続するヌクレオチドを含む。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、より好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも200、最も好ましくは少なくとも500ヌクレオチドの長さを有する。

30

【0046】

そのような核酸分子はまた、例えば、RNase保護アッセイにおけるプローブとして、または本発明のヒストンの発現を阻害するためのアンチセンスプローブとして用いることもできる。当業者は、前記プローブの調製および使用に精通している（例えば、Sambrook and Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001)を参照）。

40

【0047】

さらに別の態様においては、本発明は、本発明の核酸分子を含むベクターを提供する。好ましくは、ベクターは、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージまたは遺伝子工学において一般に用いられる別のベクターである。さらに別の態様においては、本発明は、本発明の相補的核酸分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【0048】

本発明の核酸分子は、いくつかの市販のベクターに挿入することができる。非限定的例としては、原核生物プラスミドベクター、例えば、pUC-シリーズ、pBluescr

50

ipt (Stratagene), pET-シリーズの発現ベクター, 例えば, pETduet-ベクター (Novagen) または pCRTOP (Invitrogen), および哺乳動物細胞における発現に適合したベクター, 例えば, pREP (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pDBPVM Tneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pIZD35, pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) および pCINeo (Promega) が挙げられる。Pichia pastoris に適したプラスミドベクターの例としては, 例えば, プラスミド pAO815, pPIC9K および pPIC3.5K (全て Invitrogen) が挙げられる。

10

【0049】

上述した本発明の核酸分子はまた, 別の核酸分子との翻訳融合が生成するように, ベクター中に挿入してもよい。別の核酸分子は, 例えば, 溶解性を増加させるか, および/または融合蛋白質の精製を容易にする蛋白質をコードすることができる。非限定的例としては, pET32, pET41, pET43 が挙げられる。ベクターはまた, 正しい蛋白質フォールディングを容易にするために, 1 またはそれ以上のシャペロンをコードする追加の発現可能な核酸分子を含んでいてもよい。適当な細菌発現宿主としては, 例えば, BL21 に由来する株 (例えば, BL21 (DE3), BL21 (DE3) PlysS, BL21 (DE3) RIL, BL21 (DE3) PRARE) または Rosetta (登録商標) が挙げられる。

20

【0050】

ベクターの改変の手法については, Sambrookら (上掲) を参照。一般に, ベクターは, 1 またはそれ以上の複製起源 (ori) およびクローニングまたは発現用の固有のシステム, 宿主における選択用の 1 またはそれ以上のマーカー, 例えば, 抗生物質耐性, および 1 またはそれ以上の発現カセットを含むことができる。適当な複製起源 (ori) としては, 例えば, ColE1, SV40 ウイルス および M13 の複製起源が挙げられる。

30

【0051】

ベクター中に挿入されるコーディング配列は, 例えば, 標準的な方法により合成してもよく, または天然起源から単離してもよい。コーディング配列の転写制御要素への, および/または他のアミノ酸コーディング配列へのライゲーションは, 確立された方法を用いて行うことができる。原核生物または真核生物細胞における発現を確実にする転写制御要素 (発現カセットの一部) は当業者によく知られている。これらの要素には, 転写の開始を確実にする制御配列 (例えば, 翻訳開始コドン, プロモーター, エンハンサー, および/またはインシュレータ), 内部リボゾーム進入部位 (IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476), および任意に転写の終止および転写産物の安定化を確実にするためのポリAシグナルが含まれる。さらに別の制御要素としては, 転写ならびに翻訳エンハンサー, および/または天然に付随するかまたは異種のプロモーター領域が挙げられる。好ましくは, 本発明の核酸分子はそのような発現制御配列に動作可能なように連結されて, 原核生物または真核生物細胞における発現を可能とする。ベクターはさらに別の制御要素として分泌シグナルをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。そのような配列は当業者にはよく知られている。さらに, 用いる発現系によって, 発現されたポリペプチドを細胞コンパートメントに向かわせるリーダー配列を本発明の核酸分子のコーディング配列に付加してもよい。そのようなリーダー配列は当該技術分野においてよく知られている。

40

【0052】

転写の開始を確実にするための制御要素の例としては, サイトメガロウイルス (CMV

50

）プロモーター，SV40 - プロモーター，RSV - プロモーター（ラウス肉腫ウイルス），lacZプロモーター，gai10プロモーター，ヒト伸張因子1 - プロモーター，CMVエンハンサー，CaM - キナーゼプロモーター，Autographa californica核多角体病ウイルス（AcMNPV）多角体プロモーターまたはSV40エンハンサーが挙げられる。原核生物における発現用には，多数のプロモーター，例えば，tac - lac - プロモーター，lacUV5またはtrpプロモーターが記載されている。原核生物および真核生物細胞におけるさらに別の制御因子の例としては，核酸分子の下流に，転写終止シグナル，例えば，SV40 - ポリ - A部位またはtk - ポリ - A部位またはSV40，lacZおよびAcMNPV多角体のポリアデニル化シグナルが挙げられる。

10

【0053】

さらに，本発明のベクターは選択マーカーを含むことが好ましい。選択マーカーの例としては，ネオマイシン，アンピシリンおよびハイグロマイシン，カナマイシン耐性等が挙げられる。特別に設計されたベクターは，DNAを異なる宿主間で，例えば，細菌 - 真菌細胞間または細菌 - 動物細胞間でシャトルすることを可能とする（例えば，Gateway（登録商標）システム，Invitrogen）。

【0054】

本発明にしたがう発現ベクターは，複製，および本発明の核酸分子およびコードされるポリペプチドの発現を指示することができる。上述の制御因子を含む適当な発現ベクターは当該技術分野において知られており，例えば，オカヤマバーグcDNA発現ベクターpcDV1（Pharmacia），pRc/CMV，pcDNA1，pcDNA3（Invitrogen，とりわけ，下記の実施例において用いられる），pSPORT1（GIBCOBRL）またはpGEMHE（Promega），または原核生物発現ベクター，例えば，ラムダgt11，pJOE，pBBR1 - MCS - シリーズ，pJB861，pBSMuL，pBC2，pUCPKS，pTACT1または，好ましくは，pETベクター（Novagen）が挙げられる。

20

【0055】

本明細書に記載される本発明の核酸分子は，細胞に直接導入するよう，またはリボソーム，ファージベクターまたはウイルスベクター（例えばアデノウイルス，レトロウイルス）を介して導入するよう設計することができる。さらに，バキュロウイルスシステムまたはワクチニアウイルスまたはセムリキ森林熱ウイルス系のシステムも，本発明の核酸分子の真核生物発現システムとして用いることができる。

30

【0056】

典型的な哺乳動物発現ベクターは，mRNAの転写の開始を媒介するプロモーター要素，蛋白質コーディング配列，および転写の終結および転写産物のポリアデニル化に必要なシグナルを含む。さらに，複製起源などの要素，薬剤耐性遺伝子，レギュレータ（誘導性プロモーターの一部として）を含んでいてもよい。lacプロモーターは原核生物細胞について有用な典型的な誘導性プロモーターであり，ラクトース類似体であるイソプロピルチオール - b - D - ガラクトシド（"IPTG"）を用いて誘導することができる。組換え発現および分泌のためには，目的とする核酸分子を，例えば，組換え蛋白質をペリプラズムに向かわせるPelBリーダーシグナルと，pHEN4と称されるファージミド中の遺伝子III（Ghahroudi et al，1997，FEBS Letters 414：521 - 526に記載される）との間にライゲーションすることができる。さらに別の要素としては，エンハンサー，Kozak配列，およびRNAスプライシングのドナー部位とアクセプタ部位に挟まれた介在配列が挙げられる。効率の高い転写は，SV40の初期および後期プロモーター，レトロウイルス，例えば，RSV，HTLV I，HIV Iの長末端反復（LTR），およびサイトメガロウイルス（CMV）の初期プロモーターを用いることにより達成することができる。しかし，細胞要素を用いることもできる（例えば，ヒトアクチンプロモーター）。本発明を実施するのに適した発現ベクターとしては，例えば，pSVLおよびpMSG（Pharmacia，Uppsala，Sweden

40

50

en), pRSVcat (ATCC37152), pSV2dhfr (ATCC37146) および pBC12MI (ATCC67109) 等のベクターが挙げられる。用いることができる哺乳動物宿主細胞としては、ヒトHeLa, 293, H9 および Jurkat 細胞, マウスNIH3T3 およびC127細胞, Cos1, Cos7 およびCV1, quailQC1-3細胞, マウスL細胞およびチャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞が挙げられる。あるいは、組換えポリペプチドは、染色体中にインテグレートされた遺伝子コンストラクトを含む安定な細胞株において発現させることができる。選択マーカー、例えば、dhfr, gpt, ネオマイシン, ハイグロマイシンとともにコトランスフェクションすることにより、トランスフェクションした細胞を同定および単離することができる。また、トランスフェクションした核酸を増幅させて、コードされるポリペプチドを大量に発現させることができる。DHFR (ジヒドロ葉酸レダクターゼ) マーカーは、数百またはさらに数千コピーの目的とする遺伝子を含む細胞株を開発するのに有用である。別の有用な選択マーカーは酵素グルタミンシンターゼ(GS) (Murphy et al. 1991, Biochem J. 227: 277-279; Bebbington et al. 1992, Bio/Technology 10: 169-175) である。これらのマーカーを用いて、哺乳動物細胞を選択培地上で成長させ、最も耐性の高い細胞を選択する。上述したように、発現ベクターは好ましくは少なくとも1つの選択マーカーを含む。そのようなマーカーとしては、真核生物細胞の培養用にはジヒドロ葉酸レダクターゼ, G418またはネオマイシン耐性が、E. coli および他の細菌の培養については、テトラサイクリン, カナマイシンまたはアンピリシン耐性遺伝子が挙げられる。

10

20

【0057】

さらに、本発明は、本発明の核酸分子または本発明のベクターで遺伝子工学処理された宿主に関する。前記宿主は、前記核酸分子またはベクターを、これらの存在により本発明のポリペプチドの発現が媒介されるような宿主に導入することにより製造することができる。

【0058】

宿主は任意の原核生物または真核生物細胞であることができる。適当な原核生物/細菌は、一般にクローニングに用いられているものであり、例えば、E. coli (例えばE. coliのBL21(DE3), HB101, DH5a, XL1Blue, Y1090 およびJM101株), Salmonella typhimurium, Serratia marcescens, Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens, Streptomyces lividans, Lactococcus lactis, Mycobacterium smegmatis またはBacillus subtilisである。適当な真核生物宿主は、動物細胞、例えば、CHO, COS, 293 およびボウズ・メラノーマ細胞、両生類細胞、魚細胞、昆虫細胞、例えばDrosophila S2 およびSpodoptera Sf9細胞、真菌細胞、植物細胞、トランスジェニック非ヒト動物またはトランスジェニック植物であることができる。

30

【0059】

本発明の好ましい態様においては、宿主は、細菌、酵母細胞、昆虫細胞、真菌細胞、哺乳動物細胞または植物細胞である。上述の宿主細胞に適した培地および培養条件は当該技術分野においてよく知られている。好ましい態様においては、本発明の核酸分子またはベクターで遺伝子工学処理すべき宿主はE. coli. であり、例えば、BL21 (例えば、BL21(DE3), BL21(DE3)PlysS, BL21(DE3)RIL, BL21(DE3)PRARE) またはRosetta (登録商標) に由来する株である。

40

【0060】

さらに別の態様においては、本発明はまた、本発明のポリペプチドを発現することができる細菌または真核生物細胞を製造する方法に関し、この方法は、本発明のベクターで細菌または真核生物細胞を遺伝子工学処理することを含む。

【0061】

50

“遺伝子工学処理”との用語は、細胞に遺伝的情報を持ち込むか、または細胞の遺伝的情報を改変するプロセスを表す。これは一般に、宿主細胞を核酸分子でトランスフェクトまたはトランスフォームすることにより行うことができる。コンストラクトの宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストラン媒介性トランスフェクション、カチオン性脂質媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、感染または他の方法により行うことができる。このような方法は、多くの標準的な実験室マニュアルに、例えば、S a m b r o o k ら（上掲）に記載されている。宿主細胞中に導入された前記核酸分子は、本発明のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む。

【0062】

さらに別の態様においては、本発明は、本発明のポリペプチドを製造する方法に関し、この方法は、本発明の宿主を適当な条件下で培養し、産生された本発明のポリペプチドを前記宿主または培地から単離することを含む。

【0063】

当該技術分野には、ポリペプチドを適当な宿主中で製造するための多数の適当な方法が存在する。宿主が原核生物、哺乳動物または昆虫細胞等の単細胞生物である場合、当業者は種々の培養条件を参照することができる。簡便には、産生された蛋白質を培地、培養した生物の溶解物、または単離された（生物学的）膜から、確立された手法により回収する。多細胞生物の場合、宿主は、生物の一部であるか、一部に由来する細胞であってもよく、例えば、前記宿主細胞は、植物の収穫可能な一部であってもよい。好ましい方法は、上述したように、宿主における蛋白質の組換え製造を含む。例えば、本発明の核酸分子を含む核酸配列をPCRにより合成し、発現ベクターに挿入する。次に、適当な宿主を発現ベクターでトランスフォームする。その後、宿主を培養して、所望のポリペプチドを産生させ、これを単離して精製する。このような方法は当該技術分野においてよく知られている（例えば、S a m b r o o k ら（上掲）を参照）。

【0064】

本発明のポリペプチドを製造する別の方法は、mRNAのインビトロ翻訳である。本発明にしたがって用いるのに適した無細胞発現系としては、ウサギ網状赤血球溶血液、小麦胚芽抽出物、イヌ臍臓ミクロソーム膜、E . c o l i S 3 0 抽出物、およびカップリングした転写/翻訳システム、例えば、T N T - システム（P r o m e g a ）が挙げられる。これらの系により、コーディング領域を含むクローニングベクター、DNAフラグメント、またはRNA配列および適当なプロモーター要素を加えると、組換えポリペプチドの発現が可能である。

【0065】

組換え製造に加えて、本発明のポリペプチド（蛋白質）、蛋白質のフラグメントまたは融合蛋白質は、例えば、固相手法を用いる直接ペプチド合成により合成的に製造することができる（S t e w a r t e t a l . (1 9 6 9) S o l i d P h a s e P e p t i d e S y n t h e s i s ; F r e e m a n C o , S a n F r a n c i s c o ; M e r r i f i e l d , J . A m . C h e m . S o c . 8 5 (1 9 6 3) , 2 1 4 9 - 2 1 5 4 を参照）。

【0066】

合成蛋白質は、手動の手法により、または自動化装置により合成することができる。自動化合成は、例えば、the Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer（Perkin Elmer, Foster City CA）を、製造元の指針にしたがって用いることにより行うことができる。種々のフラグメントを別々に化学合成し、化学的方法を用いて組み合わせて、全長分子を製造してもよい。上述したように、化学合成、例えば、H o u g h t o n (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 1 9 8 5 , 8 2 : 5 1 3 1) に記載される固相法を用いることができる。さらに、本発明のポリペプチド（蛋白質）、蛋白質のフラグメントまたは融合蛋白質は、半合成的に、例えば、組換え製造と合成的製造の組み合わせにより製造してもよい

10

20

30

40

50

。ペプチド結合を介して、(a)成熟真核生物ヒストン；(b)成熟真核生物ヒストンに対して少なくとも80%の配列同一性を有し、本質的にその生物学的活性を保持している成熟真核生物ポリペプチド；または(c)上述した本発明の任意の別のポリペプチドならびにポリペプチド(蛋白質)および融合蛋白質のフラグメントに結合している2つのメチオニン残基を第1および第2のN末端アミノ酸残基として有するすべてのポリペプチド(蛋白質)は、これを取得する製造方法にかかわらず、本発明の範囲内である。これは、これらの蛋白質のすべてのアミノ酸配列も本発明の核酸分子によりコードされるためである。

【0067】

蛋白質の単離および精製は、いくつかの既知の手法、例えば、限定されないが、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、逆相HPLC、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよび調製用ディスクゲル電気泳動の任意のものを用いて行うことができる。蛋白質の単離/精製の手法は、本発明のポリペプチドを慣用の方法を用いて修飾することを必要とする場合がある。例えば、さらに蛋白質にヒスチジンタグを付加して、ニッケルカラムによる精製を可能としてもよい。別の修飾は、より高いまたは低い活性を引き起こすか、より高いレベルの蛋白質産生を可能とするか、または蛋白質の精製を簡単に行うことができる。

10

【0068】

別の態様においては、本発明は、本発明の核酸分子によりコードされるか、または本発明の方法により製造されるポリペプチドを提供する。

20

【0069】

本発明はまた、本発明の核酸分子またはベクターまたは宿主またはポリペプチドを含む組成物を提供する。任意に、以下にさらに記載される本発明の抗体、アダプターまたはファージも、前記組成物中に含まれていてもよい。

【0070】

本発明において用いる場合、“組成物”との用語は、記載される化合物の少なくとも1つを含む組成物に関する。これは、任意に、本発明の化合物の特性を変更しうるさらに別の分子を含んでもよく、このことにより、例えば、その機能を抑制、安定化、ブロッキング、調節、および/または活性化することができる。組成物は、固体、液体または気体状の形であってもよく、とりわけ、粉末、錠剤、溶液またはエアロゾルの形であってもよい。

30

【0071】

好ましい態様においては、本発明の組成物はさらに成熟真核生物ヒストンを含む。

【0072】

好ましくは、そのような組成物は、成熟真核生物ヒストンとの混合物中に本発明のポリペプチド(bis-metヒストン)を含む。したがって、組成物は、N末端に2つのメチオニン残基を含むヒストンと、両方のメチオニン残基を欠いたヒストンとの混合物を含んでもよい。好ましくは、混合物は、90%の本発明のポリペプチド対10%の成熟真核生物ヒストンの範囲である。より好ましくは、混合物は80%-20%の範囲、より好ましくは70%-30%の範囲である。さらに好ましくは、混合物の50%-50%、30%-70%または20%-80%の範囲である。最も好ましくは、混合物は、10%の本発明のポリペプチド対90%の成熟真核生物ヒストンの範囲である。そのような混合物は、宿主生物のメチオニンアミノペプチダーゼの不十分な活性による、bis-metヒストンからのメチオニンの部分的切断から生じてもよい。あるいは、成熟真核生物ヒストンを本発明のbis-metヒストンに加えて、前記混合物を得ることができる。好ましくは、混合物中のヒストンは、同じサブタイプ、例えば、H1またはH2Aのものである。

40

【0073】

別の好ましい態様においては、組成物は薬学的に許容しうる担体および/または希釈剤

50

をさらに任意に含む医薬組成物である。

【0074】

本発明においては，“医薬組成物”との用語は，患者，好ましくはヒト患者に投与するための組成物を表す。本発明の医薬組成物は，上述の化合物を含む。本発明の医薬組成物は，任意にかつ追加的に，薬学的に許容しうる担体を含む。“薬学的に許容しうる担体”とは，非毒性の，固体，半固体または液体の増量剤，希釈剤，カプセル化材料または任意のタイプの製剤助剤を意味する。適当な薬学的担体の例は，当該技術分野においてよく知られており，例えば，塩化ナトリウム溶液，リン酸緩衝化塩化ナトリウム溶液，水，油／水エマルジョン等のエマルジョン，種々のタイプの湿潤剤，滅菌溶液，DMSO等の有機溶媒が挙げられる。好ましくは，担体は非経口担体であり，より好ましくはレシピエントの血液と等張の溶液である。担体は適宜，少量の添加剤，例えば，等張性および化学的安定性を高める物質を含む。そのような物質は，用いられる投与量および濃度においてレシピエントに対して無毒性であり，例えば，リン酸，クエン酸，コハク酸，酢酸および他の有機酸またはその塩等のバッファー；アスコルビン酸等の抗酸化剤；ポリアルギニンまたはトリペプチド等の低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン，ゼラチン，またはイムノグロブリン等の蛋白質；ポリビニルピロリドン等の疎水性ポリマー；グリシン，グルタミン酸，アスパラギン酸，またはアルギニン等のアミノ酸；単糖類，二糖類，および他の炭水化物，例えば，セルロースまたはその誘導体，グルコース，マンノース，またはデキストリン；EDTA等のキレート剤；マンニトールまたはソルビトール等の糖アルコール類；ナトリウム等のカウンターイオン；および／またはポリソルベート，ポロキサマーまたはPEG等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。

10

20

【0075】

本明細書において用いる場合，“非経口”との用語は，静脈内，筋肉内，腹腔内，胸骨内，皮下および関節内注射および注入等の投与のモードを表す。

【0076】

そのような担体を含む組成物は，よく知られる慣用の方法により製剤することができる。一般に，製剤は，医薬組成物の成分を，液体担体と，または微粉化した固体担体またはその両方と，均一にかつ密接に接触させることにより製造することができる。次に，必要であれば，生成物を所望の製剤の形態に成形する。

【0077】

これらの医薬組成物は，適当な投与量で被験者に投与することができる。投与計画は，担当医師および臨床因子により決定される。医療の分野ではよく知られるように，任意の患者についての投与量は，多くの因子によって異なり，これには例えば，患者のサイズ，体表面積，年齢，投与すべき特定の化合物，性別，投与の時間および経路，一般的健康状態，および同時に投与される他の薬剤が含まれる。所定の状況における治療上有効量は，日常的な実験により容易に決定することができ，通常的能力を有する臨床医または医師の能力および判断の範囲内である。一般に，医薬組成物の定期的投与としての投与計画は，1日あたり1 μ g - 20gユニットの範囲であるべきである。しかし，より好ましい投与量は，1日あたり，0.01mg - 100mg，さらにより好ましくは0.01mg - 50mg，最も好ましくは0.01mg - 10mgであってもよい。

30

40

【0078】

治療的投与に用いられる医薬組成物の成分は，無菌でなければならぬ。無菌性は，滅菌濾過膜（例えば0.2ミクロンの膜）を通した濾過により容易に達成することができる。

【0079】

医薬組成物の成分は，通常は，単位または多数回用量の容器，例えば，密封したアンブルまたはバイアル中に，水性溶液としてまたは再構成用凍結乾燥製剤として保存する。凍結乾燥した製剤の例として，10mlのバイアルに5mlの滅菌濾過した1%（w/v）水性溶液を入れ，得られた混合物を凍結乾燥する。注入溶液は，凍結乾燥した化合物を静菌性注射用水で再構成することにより調製する。保存剤および他の添加物，例えば，抗微生物剤，抗酸化剤，キレート剤，および不活性ガス等が存在していてもよい。さらに，医

50

薬組成物は、医薬組成物の意図される用途によって、さらに別の薬剤を含んでいてもよい。

【0080】

医薬組成物は、疾病、好ましくは本明細書に記載される疾病から選択される疾病の治療に特に有用である。これには、例えば、癌、血小板減少症、細菌、ウイルスまたは真菌感染等の感染、全身性エリテマトーデス（SLE）または慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患、潰瘍性大腸炎または、アルツハイマー病（AD）およびパーキンソン病（PD）等のアミロイド様線維をともなう疾病、リーシュマニア症、ある種の形のミオパシー、または血栓事象に関連した心臓血管疾患が含まれる。

【0081】

本発明においては、癌とは、細胞の制御されない分裂、および浸潤により隣接する組織に直接成長することにより、または転移（癌細胞が血流またはリンパ系を通過して運搬される）によって遠位の部位に移植されることによりこれらが広がる能力により特徴づけられる、一群の疾病または疾患を表す。

【0082】

本発明においては、血小板減少症とは、血液中の血小板の存在が比較的少ないことを表し、ここで、正常な血小板数は一般に $140,000 - 400,000 \text{ per mm}^3$ の範囲内である。

【0083】

本発明においては、感染とは、外来種による宿主生物の有害なコロニー形成である。感染においては、感染生物は繁殖のために（通常は宿主の犠牲によって）宿主の資源を利用しようとする。感染に対する宿主の応答は炎症である。

【0084】

本発明にしたがう細菌感染としては、限定されないが、細菌性髄膜炎、コレラ、ジフテリア、リステリア症、百日咳（Whooping Cough）、肺炎球菌性肺炎、サルモネラ症、破傷風、チフス、結核または尿路感染が挙げられる。

【0085】

本発明にしたがうウイルス感染としては、限定されないが、単核球症、AIDS、水痘、風邪、サイトメガロウイルス感染、デング熱、エボラ出血熱、手足および口疾患、肝炎、インフルエンザ、ムンプス、ポリオウイルス、狂犬病、天然痘、脳炎ウイルス、胃腸炎ウイルス、脳炎ウイルス、髄膜炎ウイルス、肺炎ウイルスまたは黄熱病が挙げられる。

【0086】

本発明にしたがう真菌感染としては、限定されないが、Aspergilliosis, Blastomycosis, Candidiasis, Coccidioidomycosis, Cryptococcosis, Histoplasmosis, HistoplasmosisまたはTinea pedisが挙げられる。

【0087】

本発明においては、自己免疫疾患とは、通常体内に存在する物質および組織に対する身体の過剰な免疫応答から生ずる疾病を表す。自己免疫疾患は、当業者にはよく知られており、例えば、限定されないが、全身性エリテマトーデス、急性播種性脳脊髄炎、再生不良性貧血、自己免疫性肝炎、糖尿病、多発性硬化症、視神経炎または慢性関節リウマチが挙げられる。

【0088】

本発明においては、エリテマトーデスとは、免疫系が過剰反応性となり、正常な組織を攻撃する、慢性の（長期にわたる）自己免疫疾患を表す。この攻撃により、炎症が生じ、症状が現れる。エリテマトーデスは、"臓器非特異的"なタイプの自己免疫疾患である。

【0089】

本発明においては、慢性関節リウマチとは、身体の免疫系が関節を攻撃する自己免疫疾患である。

【0090】

10

20

30

40

50

本発明においては、潰瘍性大腸炎とは、炎症性腸疾患（IBD）の一形態である。潰瘍性大腸炎は大腸炎、すなわち腸、特に大腸および結腸の疾患の一形態であり、結腸における特徴的な潰瘍または開放性びらんを含む。活動性疾患の主な症状は、通常は徐々に始まる血液の混じった下痢である。しかし、潰瘍性大腸炎は、腸以外の身体の多くの部分に影響を与える全身性疾患である。

【0091】

本発明においては、アミロイド様線維をともなう疾病とは、通常は可溶性のペプチドであるアミロイド または蛋白質 シヌクレインが凝集して規則正しい線維状の構造をとるという共通の特徴を有する疾病であり、典型的には、酸化障害の増加、興奮毒性および細胞サイクルの変化が生ずる。アミロイド様線維をともなう疾病としては、限定されないが、アルツハイマー病（AD）およびパーキンソン病（PD）が挙げられる。

10

【0092】

アルツハイマー病は、日常生活の活動の低下および精神神経的症状または挙動の変化をともなう進行性の認識低下により特徴づけられる神経変性性疾患である。これは痴呆の最も一般的なタイプである。

【0093】

パーキンソン病は、中枢神経系の変性性疾患であり、しばしば罹患者の運動および言語能力を失わせる。

【0094】

リーシュマニア症は、trypanosome protozoa属の寄生性生物であるLeishmania種により引き起こされるトリパノソーマ性疾患である。リーシュマニア症は、ある種のサシチョウバエに刺されることにより伝染し、症状は、皮膚びらん、ならびに発熱、脾臓および肝臓の障害、および貧血である。

20

【0095】

ミオパシーは、筋肉線維が機能せず、筋肉の脆弱化が生ずる神経筋の疾病である。いくつかの種類のみオパシーが知られており、例えば、限定されないが、筋ジストロフィー、先天性ミオパシー、ミトコンドリアミオパシーまたは炎症性ミオパシーが挙げられる。

【0096】

本発明においては、血栓事象に関連する心臓血管疾患とは、例えば、限定されないが、深部静脈血栓症または心筋梗塞等の疾患に関連する。特に好ましいものは、-トロンビンにより媒介される血栓事象に関連する心臓血管疾患である。

30

【0097】

別の好ましい態様においては、本発明の組成物は診断用組成物である。

【0098】

本発明においては、“診断用組成物”との用語は、本発明の医薬組成物に対する潜在的応答または治癒可能性について個々の患者を診断するための組成物に関する。本発明の診断用組成物は、上述の化合物を含む。診断用組成物はさらに、適当なバッファおよび酵素、例えば、リパーストランスクリプターゼ、熱安定性ポリメラーゼ等を含んでいてもよい。診断用組成物は、1つの容器または複数の容器に包装することができる。

【0099】

本発明はまた、癌、血小板減少症、細菌、ウイルスまたは真菌感染等の感染、全身性エリトマトーデス（SLE）または慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患、潰瘍性大腸炎、またはアミロイド様線維をともなう疾病、例えばアルツハイマー病（AD）およびパーキンソン病（PD）、ミオパシー、または血栓事象に関連する心臓血管疾患から選択される疾病を治療および/または予防する方法を提供し、この方法は、本発明の医薬組成物をこれを必要とする被験者に投与することを含む。

40

【0100】

本発明はまた、治療目的および/または診断目的で組成物を製造するための、本発明の核酸分子またはベクター、または非ヒト宿主またはポリペプチドの使用を提供する。

【0101】

50

好ましい態様においては、治療目的は、癌、血小板減少症、感染、例えば細菌、ウイルスまたは真菌感染、自己免疫疾患、例えば全身性エリテマトーデス（SLE）または慢性関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、またはアミロイド様線維をともなう疾病、例えばアルツハイマー病（AD）およびパーキンソン病（PD）、ミオパシーまたは血栓事象に関連する心臓血管疾患の治療である。

【0102】

さらに別の態様においては、本発明は、本発明の核酸分子またはポリペプチドに特異的に結合するが、対応する成熟真核生物ヒストンには結合しない抗体またはアプタマーまたはファージを提供する。

【0103】

前記抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。

【0104】

“抗体”との用語には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、または前記ペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合するそれらのフラグメントが含まれ、また、二重特異性抗体、合成抗体、抗体フラグメント、例えば、Fab、F(ab₂)’、FvまたはscFvフラグメント等、またはこれらのいずれかの化学的に修飾した誘導体も含まれる。モノクローナル抗体は、例えば、Kohler and Milstein, Nature 256 (1975), 495, および Galfre, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3 に元々記載された手法により製造することができる。この方法は、マウスミエローマ細胞を免疫した哺乳動物に由来する脾臓細胞と融合させることを含み、当該技術分野において開発された改変を有する。さらに、上述のペプチドに対する抗体またはそのフラグメントは、Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988 に記載される方法を用いて得ることができる。前記抗体の誘導体をファージディスプレイ手法により得る場合には、BIACore システムにおいて用いられる表面プラスモン共鳴を用いて、本発明のペプチドまたはポリペプチドのエピトープに結合するファージ抗体の効力を高めることができる (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13)。キメラ抗体の製造は、例えば、WO89/09622 に記載されている。本発明にしたがって用いられるべき抗体のさらに別の起源は、いわゆる異種（ゼノジェニック）抗体である。ゼノジェニック抗体、例えばマウスにおけるヒト抗体の製造の一般的原理は、例えば、WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 および WO96/33735 に記載されている。本発明にしたがって用いられるべき抗体およびその対応するイムノグロブリン鎖はさらに、当該技術分野において知られる慣用の手法を用いて、例えば、アミノ酸の欠失、挿入、置換、付加、および/または組換え、および/または当該技術分野において知られる他の任意の修飾を単独でまたは組み合わせで用いて修飾することができる。例えば、イムノグロブリン鎖のアミノ酸配列の基礎となる DNA 配列中にそのような修飾を導入する方法は当業者によく知られている。例えば、Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 を参照。

【0105】

“モノクローナル抗体”または“ポリクローナル抗体” (Harlow and Lane, (1988) (上掲) を参照) との用語はまた、その生物学的特異性を保持しているかまたは本質的に保持している前記抗体の誘導体に関連する。前記誘導体の特に好ましい態様は下記で詳細に説明するが、そのような抗体の他の好ましい誘導体は、例えば、マウスまたはラットの可変領域とヒト定常領域とを含むキメラ抗体である。

【0106】

“scFv フラグメント” (一本鎖 Fv フラグメント) との用語は、当該技術分野におい

10

20

30

40

50

てよく理解されており，サイズが小さく，そのようなフラグメントを組換え的に製造するため好ましい。

【0107】

好ましくは，本発明にしたがう抗体，アプタマー，フラグメントまたは誘導体は，その存在または非存在をモニターすべき標的蛋白質，ポリペプチドまたはフラグメント，またはそれらのエピトープに特異的に結合する。

【0108】

本明細書において用いる場合，“特異的に結合する”との用語は，抗体等が，類似する構造のポリペプチドと，またはN末端の2つのメチオニン残基を有しない成熟真核生物ポリペプチドと交叉反応しないかまたは本質的に交叉反応しないことを意味する。試験する抗体等のパネルの交叉反応性は，例えば，抗体等の前記パネルの，慣用の条件下（例えば，Harlow and Lane，（1988）（上掲）を参照）における，目的とするポリペプチド，ならびに程度の差はあれ多数の（構造的におよび/または機能的に）密接に関連するポリペプチドへの結合を評価することにより，試験することができる。目的とするポリペプチド/蛋白質に結合するが，好ましくは目的とするポリペプチドと同じ組織で発現される他のポリペプチドのいずれにも結合しないかまたは本質的に結合しない抗体のみが，目的とするポリペプチド/蛋白質に特異的であると考えられ，本発明の方法にしたがって選択され，さらなる研究に用いられる。

【0109】

本発明の方法の特に好ましい態様においては，前記抗体または抗体結合部分は，ヒト抗体またはヒト化抗体であるか，またはこれらに由来するものである。本発明においては，“ヒト化抗体”との用語は，ヒト以外の起源の抗体であって，可変領域中の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR），例えばCDR3，好ましくは6個すべてのCDRが所望の特異性をもつヒト起源の抗体のCDRで置き換えられている抗体を意味する。任意に，抗体の非ヒト定常領域は，ヒト抗体の定常領域により置き換えられていてもよい。ヒト化抗体の製造方法は，例えば，EP-A10239400およびWO90/07861に記載されている。

【0110】

アプタマーとは，他の分子に結合するその能力に基づいてランダムプールから選択されたDNAまたはRNA分子である。核酸，蛋白質，低分子有機化合物，さらに生物全体に結合するアプタマーが選択されている。アプタマーのデータベースは，<http://aptamer.icmb.utexas.edu/>で維持されている。

【0111】

より詳細には，アプタマーは，DNAまたはRNAアプタマー，またはペプチドアプタマーに分類することができる。前者は（通常は短い）オリゴヌクレオチドの鎖から構成されるが，後者は両末端で蛋白質スキャフォールドに結合している短い可変ペプチドドメインから構成される。

【0112】

核酸アプタマーは，インビトロ選択の繰り返し，または同等のSELEX（指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化）により工学処理された，種々の分子標的，例えば小分子，蛋白質，核酸，さらには細胞，組織および生物等に結合する核酸種である。ペプチドアプタマーは，細胞内で他の蛋白質相互作用を干渉するように設計された蛋白質である。これは，両末端で蛋白質スキャフォールドに結合した可変ペプチドループから構成される。この二重構造束縛は，ペプチドアプタマーの結合親和性を，抗体に匹敵するレベルまで（ナノモルの範囲）非常に高める。

【0113】

可変ループの長さは，典型的には10 - 20アミノ酸を含み，スキャフォールドは，優れた溶解特性を有する任意の蛋白質であることができる。現在のところ，細菌の蛋白質チオレドキシニンAが最も用いられているスキャフォールド蛋白質であり，可変ループが還元活性部位に挿入されており，これは野生型蛋白質では - C y s - G l y - P r o - C y s

10

20

30

40

50

- ループであり，2つのシステイン側鎖はジスルフィド架橋を形成することができる。ペプチドアダプターの選択は，種々のシステムを用いて行うことができるが，現在最も用いられているものは，酵母ツーハイブリッドシステムである。

【0114】

アダプターは，一般に用いられている生物分子，特に抗体に匹敵する分子認識特性を提供するため，バイオテクノロジーおよび治療用途において有用性を提供する。アダプターは，その弁別認識に加えて，完全に試験管内で工学処理することができ，化学合成により容易に製造することができ，所望の保存特性を有しており，治療用途において免疫源性をほとんどまたは全く示さないため，抗体より利点がある。

【0115】

修飾していないアダプターは，血流から迅速に排出され，数分間から数時間の半減期をもつ。これは主として，アダプター固有の低分子量の結果，ヌクレアーゼ分解および腎臓による体内からの排出のためである。未修飾アダプターの用途は，現在のところ，過渡的状态，例えば，血液凝固の治療，または局所デリバリーが可能な眼などの臓器の治療に焦点が当てられている。この急速な排出は，インビボ診断イメージングなどの用途において利点がある。いくつかの修飾，例えば，2'-フルオロ置換ピリミジン，ポリエチレングリコール(PEG)結合等が研究者に利用可能であり，これを用いて，アダプターの半減期を日または週の時間スケールで容易に増加させることができる。

【0116】

本発明においては，ファージとは，組換えファージを表し，これは当該技術分野においてよく知られており，例えば，Griffiths, A. D. et al.: EMBO J. 1994, 13: 3245に記載されている。ファージは，その表面に融合蛋白質として，本発明のポリペプチドに対して所望の結合特異性を有するイムノグロブリンフラグメントまたは誘導体を含むとしてもよく，ここで，融合パートナーはファージの表面分子である。

【0117】

本発明の方法の好ましい態様においては，前記抗体またはアダプターまたはファージを検出可能なように標識する。アダプターは好ましくは³Hまたは³²Pで放射性標識するか，または上述したような蛍光マーカで標識し，一方ファージまたは抗体は，同様にして標識してもよく(放射性標識としては¹²⁵Iが好ましい)，またはヒスタグ，FLAGタグまたはmycタグ等のタグを用いて標識してもよい。

【0118】

別の態様においては，本発明は，前記抗体，アダプターおよび/またはファージを含む診断用組成物を提供する。前記組成物はさらに，適当なバッファおよび酵素，例えば，リバーストランスクリプターゼ，熱安定性ポリメラーゼ等を含んでいてもよい。

【0119】

前記診断用組成物は，例えば，本発明の抗体を用いるイムノアッセイにおいて，本発明のポリペプチドの存在を試験するために用いることができる。本明細書において用いる場合，"イムノアッセイ"との用語は，例えば，免疫沈殿，免疫プロットイング，ELISA，RIA，間接的免疫蛍光実験等の方法を含む。このような手法は当該技術分野においてよく知られており，例えば，Harlow and Lane(上掲)に記載されている。

【0120】

別の態様においては，本発明は，本発明の核酸分子またはポリペプチドの存在を試験する方法を提供し，この方法は，被験者から取得したサンプルを，前記核酸分子またはポリペプチドの存在についてアッセイすることを含む。

【0121】

本発明の核酸分子の存在についてサンプルを試験する方法としては，限定されないが，核酸増幅，シーケンシングまたはハイブリダイゼーションアッセイが挙げられる。

【0122】

10

20

30

40

50

核酸増幅アッセイの例およびこれを実施する手段としては、限定されないが、PCR（ネステッドPCR，RT-PCR，PCR伸張アッセイ，核酸配列塩基増幅（NASBA），一本鎖確認多型（SSCP）PCR），増幅耐性変異システム（Amplification refractory mutation systems：ARMSTM）および増幅耐性変異システム直線伸張（Amplification refractory mutation system linear extension：ALEXTM）アッセイを含む）が挙げられる。これらの方法の詳細は、当該技術分野において見
 10
 10
 20
 20
 30
 30
 40
 40
 50
 50
 60
 60
 70
 70
 80
 80
 90
 90
 100
 100
 110
 110
 120
 120
 130
 130
 140
 140
 150
 150
 160
 160
 170
 170
 180
 180
 190
 190
 200
 200
 210
 210
 220
 220
 230
 230
 240
 240
 250
 250
 260
 260
 270
 270
 280
 280
 290
 290
 300
 300
 310
 310
 320
 320
 330
 330
 340
 340
 350
 350
 360
 360
 370
 370
 380
 380
 390
 390
 400
 400
 410
 410
 420
 420
 430
 430
 440
 440
 450
 450
 460
 460
 470
 470
 480
 480
 490
 490
 500
 500
 510
 510
 520
 520
 530
 530
 540
 540
 550
 550
 560
 560
 570
 570
 580
 580
 590
 590
 600
 600
 610
 610
 620
 620
 630
 630
 640
 640
 650
 650
 660
 660
 670
 670
 680
 680
 690
 690
 700
 700
 710
 710
 720
 720
 730
 730
 740
 740
 750
 750
 760
 760
 770
 770
 780
 780
 790
 790
 800
 800
 810
 810
 820
 820
 830
 830
 840
 840
 850
 850
 860
 860
 870
 870
 880
 880
 890
 890
 900
 900
 910
 910
 920
 920
 930
 930
 940
 940
 950
 950
 960
 960
 970
 970
 980
 980
 990
 990
 1000
 1000
 1010
 1010
 1020
 1020
 1030
 1030
 1040
 1040
 1050
 1050
 1060
 1060
 1070
 1070
 1080
 1080
 1090
 1090
 1100
 1100
 1110
 1110
 1120
 1120
 1130
 1130
 1140
 1140
 1150
 1150
 1160
 1160
 1170
 1170
 1180
 1180
 1190
 1190
 1200
 1200
 1210
 1210
 1220
 1220
 1230
 1230
 1240
 1240
 1250
 1250
 1260
 1260
 1270
 1270
 1280
 1280
 1290
 1290
 1300
 1300
 1310
 1310
 1320
 1320
 1330
 1330
 1340
 1340
 1350
 1350
 1360
 1360
 1370
 1370
 1380
 1380
 1390
 1390
 1400
 1400
 1410
 1410
 1420
 1420
 1430
 1430
 1440
 1440
 1450
 1450
 1460
 1460
 1470
 1470
 1480
 1480
 1490
 1490
 1500
 1500
 1510
 1510
 1520
 1520
 1530
 1530
 1540
 1540
 1550
 1550
 1560
 1560
 1570
 1570
 1580
 1580
 1590
 1590
 1600
 1600
 1610
 1610
 1620
 1620
 1630
 1630
 1640
 1640
 1650
 1650
 1660
 1660
 1670
 1670
 1680
 1680
 1690
 1690
 1700
 1700
 1710
 1710
 1720
 1720
 1730
 1730
 1740
 1740
 1750
 1750
 1760
 1760
 1770
 1770
 1780
 1780
 1790
 1790
 1800
 1800
 1810
 1810
 1820
 1820
 1830
 1830
 1840
 1840
 1850
 1850
 1860
 1860
 1870
 1870
 1880
 1880
 1890
 1890
 1900
 1900
 1910
 1910
 1920
 1920
 1930
 1930
 1940
 1940
 1950
 1950
 1960
 1960
 1970
 1970
 1980
 1980
 1990
 1990
 2000
 2000
 2010
 2010
 2020
 2020
 2030
 2030
 2040
 2040
 2050
 2050
 2060
 2060
 2070
 2070
 2080
 2080
 2090
 2090
 2100
 2100
 2110
 2110
 2120
 2120
 2130
 2130
 2140
 2140
 2150
 2150
 2160
 2160
 2170
 2170
 2180
 2180
 2190
 2190
 2200
 2200
 2210
 2210
 2220
 2220
 2230
 2230
 2240
 2240
 2250
 2250
 2260
 2260
 2270
 2270
 2280
 2280
 2290
 2290
 2300
 2300
 2310
 2310
 2320
 2320
 2330
 2330
 2340
 2340
 2350
 2350
 2360
 2360
 2370
 2370
 2380
 2380
 2390
 2390
 2400
 2400
 2410
 2410
 2420
 2420
 2430
 2430
 2440
 2440
 2450
 2450
 2460
 2460
 2470
 2470
 2480
 2480
 2490
 2490
 2500
 2500
 2510
 2510
 2520
 2520
 2530
 2530
 2540
 2540
 2550
 2550
 2560
 2560
 2570
 2570
 2580
 2580
 2590
 2590
 2600
 2600
 2610
 2610
 2620
 2620
 2630
 2630
 2640
 2640
 2650
 2650
 2660
 2660
 2670
 2670
 2680
 2680
 2690
 2690
 2700
 2700
 2710
 2710
 2720
 2720
 2730
 2730
 2740
 2740
 2750
 2750
 2760
 2760
 2770
 2770
 2780
 2780
 2790
 2790
 2800
 2800
 2810
 2810
 2820
 2820
 2830
 2830
 2840
 2840
 2850
 2850
 2860
 2860
 2870
 2870
 2880
 2880
 2890
 2890
 2900
 2900
 2910
 2910
 2920
 2920
 2930
 2930
 2940
 2940
 2950
 2950
 2960
 2960
 2970
 2970
 2980
 2980
 2990
 2990
 3000
 3000
 3010
 3010
 3020
 3020
 3030
 3030
 3040
 3040
 3050
 3050
 3060
 3060
 3070
 3070
 3080
 3080
 3090
 3090
 3100
 3100
 3110
 3110
 3120
 3120
 3130
 3130
 3140
 3140
 3150
 3150
 3160
 3160
 3170
 3170
 3180
 3180
 3190
 3190
 3200
 3200
 3210
 3210
 3220
 3220
 3230
 3230
 3240
 3240
 3250
 3250
 3260
 3260
 3270
 3270
 3280
 3280
 3290
 3290
 3300
 3300
 3310
 3310
 3320
 3320
 3330
 3330
 3340
 3340
 3350
 3350
 3360
 3360
 3370
 3370
 3380
 3380
 3390
 3390
 3400
 3400
 3410
 3410
 3420
 3420
 3430
 3430
 3440
 3440
 3450
 3450
 3460
 3460
 3470
 3470
 3480
 3480
 3490
 3490
 3500
 3500
 3510
 3510
 3520
 3520
 3530
 3530
 3540
 3540
 3550
 3550
 3560
 3560
 3570
 3570
 3580
 3580
 3590
 3590
 3600
 3600
 3610
 3610
 3620
 3620
 3630
 3630
 3640
 3640
 3650
 3650
 3660
 3660
 3670
 3670
 3680
 3680
 3690
 3690
 3700
 3700
 3710
 3710
 3720
 3720
 3730
 3730
 3740
 3740
 3750
 3750
 3760
 3760
 3770
 3770
 3780
 3780
 3790
 3790
 3800
 3800
 3810
 3810
 3820
 3820
 3830
 3830
 3840
 3840
 3850
 3850
 3860
 3860
 3870
 3870
 3880
 3880
 3890
 3890
 3900
 3900
 3910
 3910
 3920
 3920
 3930
 3930
 3940
 3940
 3950
 3950
 3960
 3960
 3970
 3970
 3980
 3980
 3990
 3990
 4000
 4000
 4010
 4010
 4020
 4020
 4030
 4030
 4040
 4040
 4050
 4050
 4060
 4060
 4070
 4070
 4080
 4080
 4090
 4090
 4100
 4100
 4110
 4110
 4120
 4120
 4130
 4130
 4140
 4140
 4150
 4150
 4160
 4160
 4170
 4170
 4180
 4180
 4190
 4190
 4200
 4200
 4210
 4210
 4220
 4220
 4230
 4230
 4240
 4240
 4250
 4250
 4260
 4260
 4270
 4270
 4280
 4280
 4290
 4290
 4300
 4300
 4310
 4310
 4320
 4320
 4330
 4330
 4340
 4340
 4350
 4350
 4360
 4360
 4370
 4370
 4380
 4380
 4390
 4390
 4400
 4400
 4410
 4410
 4420
 4420
 4430
 4430
 4440
 4440
 4450
 4450
 4460
 4460
 4470
 4470
 4480
 4480
 4490
 4490
 4500
 4500
 4510
 4510
 4520
 4520
 4530
 4530
 4540
 4540
 4550
 4550
 4560
 4560
 4570
 4570
 4580
 4580
 4590
 4590
 4600
 4600
 4610
 4610
 4620
 4620
 4630
 4630
 4640
 4640
 4650
 4650
 4660
 4660
 4670
 4670
 4680
 4680
 4690
 4690
 4700
 4700
 4710
 4710
 4720
 4720
 4730
 4730
 4740
 4740
 4750
 4750
 4760
 4760
 4770
 4770
 4780
 4780
 4790
 4790
 4800
 4800
 4810
 4810
 4820
 4820
 4830
 4830
 4840
 4840
 4850
 4850
 4860
 4860
 4870
 4870
 4880
 4880
 4890
 4890
 4900
 4900
 4910
 4910
 4920
 4920
 4930
 4930
 4940
 4940
 4950
 4950
 4960
 4960
 4970
 4970
 4980
 4980
 4990
 4990
 5000
 5000
 5010
 5010
 5020
 5020
 5030
 5030
 5040
 5040
 5050
 5050
 5060
 5060
 5070
 5070
 5080
 5080
 5090
 5090
 5100
 5100
 5110
 5110
 5120
 5120
 5130
 5130
 5140
 5140
 5150
 5150
 5160
 5160
 5170
 5170
 5180
 5180
 5190
 5190
 5200
 5200
 5210
 5210
 5220
 5220
 5230
 5230
 5240
 5240
 5250
 5250
 5260
 5260
 5270
 5270
 5280
 5280
 5290
 5290
 5300
 5300
 5310
 5310
 5320
 5320
 5330
 5330
 5340
 5340
 5350
 5350
 5360
 5360
 5370
 5370
 5380
 5380
 5390
 5390
 5400
 5400
 5410
 5410
 5420
 5420
 5430
 5430
 5440
 5440
 5450
 5450
 5460
 5460
 5470
 5470
 5480
 5480
 5490
 5490
 5500
 5500
 5510
 5510
 5520
 5520
 5530
 5530
 5540
 5540
 5550
 5550
 5560
 5560
 5570
 5570
 5580
 5580
 5590
 5590
 5600
 5600
 5610
 5610
 5620
 5620
 5630
 5630
 5640
 5640
 5650
 5650
 5660
 5660
 5670
 5670
 5680
 5680
 5690
 5690
 5700
 5700
 5710
 5710
 5720
 5720
 5730
 5730
 5740
 5740
 5750
 5750
 5760
 5760
 5770
 5770
 5780
 5780
 5790
 5790
 5800
 5800
 5810
 5810
 5820
 5820
 5830
 5830
 5840
 5840
 5850
 5850
 5860
 5860
 5870
 5870
 5880
 5880
 5890
 5890
 5900
 5900
 5910
 5910
 5920
 5920
 5930
 5930
 5940
 5940
 5950
 5950
 5960
 5960
 5970
 5970
 5980
 5980
 5990
 5990
 6000
 6000
 6010
 6010
 6020
 6020
 6030
 6030
 6040
 6040
 6050
 6050
 6060
 6060
 6070
 6070
 6080
 6080
 6090
 6090
 6100
 6100
 6110
 6110
 6120
 6120
 6130
 6130
 6140
 6140
 6150
 6150
 6160
 6160
 6170
 6170
 6180
 6180
 6190
 6190
 6200
 6200
 6210
 6210
 6220
 6220
 6230
 6230
 6240
 6240
 6250
 6250
 6260
 6260
 6270
 6270
 6280
 6280
 6290
 6290
 6300
 6300
 6310
 6310
 6320
 6320
 6330
 6330
 6340
 6340
 6350
 6350
 6360
 6360
 6370
 6370
 6380
 6380
 6390
 6390
 6400
 6400
 6410
 6410
 6420
 6420
 6430
 6430
 6440
 6440
 6450
 6450
 6460
 6460
 6470
 6470
 6480
 6480
 6490
 6490
 6500
 6500
 6510
 6510
 6520
 6520
 6530
 6530
 6540
 6540
 6550
 6550
 6560
 6560
 6570
 6570
 6580
 6580
 6590
 6590
 6600
 6600
 6610
 6610
 6620
 6620
 6630
 6630
 6640
 6640
 6650
 6650
 6660
 6660
 6670
 6670
 6680
 6680
 6690
 6690
 6700
 6700
 6710
 6710
 6720
 6720
 6730
 6730
 6740
 6740
 6750
 6750
 6760
 6760
 6770
 6770
 6780
 6780
 6790
 6790
 6800
 6800
 6810
 6810
 6820
 6820
 6830
 6830
 6840
 6840
 6850
 6850
 6860
 6860
 6870

の方法が挙げられる。例えば，Soejima and Koda, Transfusion 45 (2005) 1934 - 1939; Yeh et al., Anesth. Analg. 101 (2005) 1401 - 1406; Chou et al., Am. J. Clin. Pathol. 124 (2005) 330 - 338を参照。

【0126】

上述のアッセイは，標準的な教科書等から当該技術分野において知られており，例えば，Lottspeich, Engel "Bioanalytik" Spektrum Akademischer Verlag (2006); Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989); Higgins and Hames (Eds.) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC, (1985); Nollau et al, Clin. Chem. 43 (1997), 1114 - 1128が挙げられる。記載されるアッセイのいくつかの使用は，下記の実施例において説明される。

10

【0127】

本発明の方法の別の好ましい態様においては，前記サンプルは，血液，血清，血漿，胎児組織，唾液，尿，粘膜組織，粘液，腔組織，腔から得られる胎児組織，皮膚，頭髮，毛包または他のヒト組織である。好ましくは，サンプルは，血液，血清，血漿，唾液，尿，粘膜組織，粘液である。

20

【0128】

本発明はまた，本発明の核酸分子，ベクター，非ヒト宿主，ポリペプチドまたは抗体，アダプターおよび/またはファージを1またはそれ以上の容器中に含むキットに関する。

【0129】

以下に実施例を参照して本発明を説明するが，これは単に例示であって，本発明の範囲を限定するものと解釈してはならない。

【実施例】

30

【0130】

実施例1：hH1.3コンストラクトのクローニング

プラスミドベクターpEGT1-rH1.3S1の構築

配列番号1に示されるように，ヒストンは，リジン残基の含有量が非常に高いため，強い正の電荷を示す。リジンのコドン使用頻度はEscherichia coliとヒトとの間で大きく異なるため，ヒトヒストンH1.3配列をE. coliのコドン使用頻度に適合させるために，コドン最適化を行った。

【0131】

配列番号2に示される配列の合成遺伝子を製造した。人工配列は2つの制限部位，すなわち，BspH1およびBamH1で挟んで，続いてpEGT1発現ベクターに導入できるようにした。翻訳開始コドンATGはNco1制限部位CCATGGに取り込ませた。最初のATGは二重にして，BspH1部位TCATGAとした。この粘着末端CATGはNco1と適合性である。すなわち，第2のメチオニン残基を第1の残基の後に取り込ませた。追加のBamH1部位GGATCCを終止コドンTAAの後に取り込ませた。この人工的遺伝子によりコードされるアミノ酸配列は配列番号3に示される。

40

【0132】

BspH1およびBamH1で切断することにより最適化した遺伝子をプラスミドから切り出し，標準的なプロトコルにしたがってNco1およびBamH1で線状にしたpEGT1発現ベクターに挿入して，プラスミドpEGT1-rH1.3S1を得た。

【0133】

50

ライゲーションしたベクター pEGT1-rH13S1を、標準的なプロトコルを用いて、エレクトロコンピテントのE.coli BL21[DE3]株にエレクトロポレーションにより導入し、トランスフォームした細胞を、カナマイシンを補充したLBプレートで選択した。1個のクローンを選択し、ヒストンをコードする挿入物の配列が配列番号2と完全にマッチすることを確認した。

【0134】

プラスミドベクター pEGT1-rH1.3S2の構築

rH13S1コンストラクト中に第2のメチオニンが挿入されることを抑制するため、第2の合成遺伝子を用いた。セリンをコードする2番目の元のコドンTCCをやはりセリンをコードするAGCに変更して、BspH1部位との適合性を確実にした。DNA配列は配列番号4に示され、この人工的遺伝子によりコードされる組換え蛋白質は配列番号5に示される。配列番号4の人工的遺伝子は、開始コドンにおけるBspH1制限部位TCATGAと終止コドンの1塩基対前のBamH1制限部位CCATGGにより挟まれているため、pEGT1-rH13S1について上述したものと同じクローニング戦略を用いた。

10

【0135】

BspH1およびBamH1で消化することにより最適化した遺伝子をプラスミドから切り出し、標準的なプロトコルにしたがって、NCO1およびBamH1で線状にしたpEGT1発現ベクターに挿入して、プラスミドpEGT1-rH13S2を得た。

【0136】

20

ライゲーションしたベクターpEGT1-rH13S2を、標準的なプロトコルを用いてエレクトロポレーションによりエレクトロコンピテントのE.coli BL21[DE3]株に挿入し、トランスフォームした細胞をカナマイシンを補充したLBプレート上で選択した。1つのクローンを選択し、ヒストンをコードする挿入物の配列が配列番号4と完全にマッチすることを確認した。

【0137】

実施例2：ヒストンH1.3の組換え生産

株

rh1.3Sを調製するために用いた細菌はEscherichia coli BL21(DE3)/pEGT1/H1.3Sの組換え株である。このコンストラクトを用いてE.coliのBL21(DE3)株をトランスフォームした。3つのクローンを選択して、発現スクリーニングを行い、1つのクローンを選択して、プレマスターシード(Pre-MS-05L23-H1B)を行った。

30

【0138】

マスターシード(MS-06D05-H1B)はPre-MS-05L23-H1Bを用いて製造し、作用シード(WS-06D06-H1B)はマスターシードを用いて製造した。

【0139】

シード培養

それぞれ500mlのYES培地(30g/l酵母エキス, 5g/lNaCl)を入れた2つの2リットル振盪フラスコに、100μlの作業シード(WS-06D06-H1B)を植菌した。培養物を270rpmで振盪しながら37℃で5h00(+/-0, 5hour)インキュベーションすると、OD(600nm)は1.5より高くなった。

40

【0140】

発酵

100リットルの発酵槽に100リットルのNRJ18培地を入れた。発酵槽を123で30分間滅菌した。滅菌後植菌前に、50mlのSAG471(消泡剤)を無菌的に加えた。600nmの理論的開始光学密度が 8.75×10^{-7} となるように、発酵槽にシード培養物を植菌した。計算上の植菌量を500mlのYES培地を含む移行瓶に加えた。

50

【0141】

発酵は37 で一晩行った。発酵プロセスの間、pHは、NaOH、4 MおよびHNO₃ 2, 24 Mを断続的に加えることによりpH7.0 ± 0.2に維持した。溶存酸素は攪拌により30%にフィードバック制御した。

【0142】

培養物のOD₆₀₀が15から20の間になったとき、1 mM IPTG (23.8 gを500 mlの高純水に溶解)の溶液で培養物を誘導した。

【0143】

1時間30分の誘導後、OD₆₀₀は24を越え、発酵槽を16 以下に冷却した。pHを制御して7.0 ± 0.2に維持した。冷却の間、他のパラメータは一定に保ち、ただし、圧力は300 mbar sに下げ、振盪を200 rpmに下げた。

【0144】

培地の温度が16 未満になったとき、培養物の容量を測定した。培養物全てをJLA 8.1000ローター(±6 L / 1回の遠心)を備えた2 Beckman Centrifuges JA10で、5200 RPM, 4 で20分間遠心分離した。

【0145】

細胞ペレットを回収し、遠心工程の間から徐々に-20 まで冷却して保存した。

【0146】

高圧ホモジナイザーによる細胞の破壊

細胞破壊の前日に、100リットルの培養物に対応する濃縮した細胞を室温で溶解した。

【0147】

破壊した日に、細胞ペレットを20 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O (pH7.0)で250 g / lに希釈し、懸濁液の温度を30 に上昇させた。

【0148】

次に、懸濁液をHeidolph R2R 2100プロペラでホモジナイズした。次に細胞を高圧ホモジナイザーPONY (800 bars)で溶解した。細胞懸濁液は細胞ホモジナイザーで2回処理した。

【0149】

実施例3：蛋白質の精製

精製のすべての工程は、発酵槽の総容量(すなわち100 L)について行った。

【0150】

1.2.5%過塩素酸による沈殿および8 M尿素抽出

回収した細胞に、1/7容量のHClO₄ 20% (最終濃度2.5%)を加えた。懸濁液を3番目のサイクルの前にPonyホモジナイザーで250 barsでホモジナイズした。溶液を穏やかな振盪下で室温で1時間維持した。次に、懸濁液を15分間遠心分離した(12, 200 g - 7, 000 rpm, 4 °C)。上清を回収し、10 M NaOHでpHを4.0 ± 0.1に調節し、0.45 / 0.22 μm Sartopore 2膜(2000 cm²)を通して濾過して滅菌バッグに入れた。

【0151】

尿素を加えて最終容量の2倍で濃度8 Mとし、20 mM Na₂HPO₄ pH7, 0バッファを用いて容量を調節した。溶液は室温で穏やかに振盪しながら一晩維持した。次に、37% HClまたは10 M NaOHでpHを4.0 ± 0.1に調節した。

【0152】

2. Q Sepharose Fast Flowアニオン交換クロマトグラフィー(QSFF) - ネガティブモード

この工程の目的は、エンドトキシンおよびDNAの含有量を低下させることである。Moduline 350 / 500カラム(Millipore Bio Process Division cat # 86351211)に充填したQ Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences cat. # 17-05

10

20

30

40

50

10 - 05) でアニオン交換クロマトグラフィーを行った。

【0153】

カラムを、高度に精製した水で溶出流速 120 cm/h (115.4 l/h) で充填した。充填カラムベッドのサイズは次のとおりである：直径 25 cm, 断面積 = 961 cm², ベッド = 18 cm, 充填容量 = 17.314 ± 0.962 l。カラムを 1.5 - 2.5 カラム容量 (CV) の 1 M NaOH + 2 M NaCl で、接触時間 2 時間、流速 96.2 l/h (100 cm/h - 1603 ml/min) で消毒した。

【0154】

クロマトグラフィーのすべての工程は線状流速約 100 cm/h (±96.2 l/h) で実施した。pH は 1 - 2 CV の 50 mM 酢酸アンモニウム + 1 M NaCl (pH 4.0) で一定にした。次にカラムを 3, 5 - 5 CV の 50 mM 酢酸アンモニウム + 8 M 尿素 pH 4.0 で平衡化した。

【0155】

10 mS/cm 未満の導電率を得るために、尿素抽出 (セクション 1 を参照) からの溶液を、50 mM 酢酸アンモニウム + 8 M 尿素 pH 4.0 で約 1.5 倍に希釈した。8 CV のみの尿素抽出溶液 (希釈前) を同時に負荷した。H1 蛋白質はフロースルーに回収され、平衡化 - 溶出は、1, 5 - 2, 5 CV の 50 mM 酢酸アンモニウム + 8 M 尿素 pH 4.0 で行った。

【0156】

溶出後、カラムを 1, 5 - 2, 5 CV の 50 mM 酢酸アンモニウム + 1 M NaCl (pH 4.0) で清浄にした。1 M NaCl 中のこの溶出により、DNA およびエンドトキシンが排除される。次に、カラムを 1.5 - 2.5 CV の 1 M NaOH + 2 M NaCl で消毒し (2 h), 20 mM NaOH 中で室温で保存した。

【0157】

3. Macroprep High S カチオン交換クロマトグラフィー (MHS - E) - ポジティブモード:

カチオン交換クロマトグラフィーは、Vantage 180/500 カラム (Millipore BioProcess Division cat# 87018001) を充填した Macroprep High S (Bio-Rad Laboratories cat.# 156-0033) を用いて行った。カラムは高度に精製した水で溶出流速 260 cm/h (66.1 l/h) で充填した。充填したカラムベッドの寸法は次のとおりである：直径 18 cm, 断面積 = 254.4 cm², ベッド = 36 cm, 充填容量 = 9.16 ± 0.25 l。

【0158】

カラムを 1.5 - 2.5 CV の 1 M NaOH + 2 M NaCl で接触時間 2 時間、流速 40 l/h (157 cm/h) で消毒した。最大流速は 250 cm/h とすることができる。pH は 1, 5 - 2, 5 CV の 50 mM 酢酸アンモニウム + 2 M NaCl (pH 2.0) で一定にした。次にカラムを 4 から 5.5 CV の 50 mM 酢酸アンモニウム pH 2.0 で平衡化した。

【0159】

QSF - FT 画分 (セクション 2 を参照) の pH は、37% HCl で 2.0 に調節した。この溶液を希釈せずに流速 125 cm/h (±31.8 l/h) で負荷した。ゲルの結合能力は 5 - 15 mg/ml マトリクスである。負荷後、カラムを 2 - 3 CV の 50 mM 酢酸アンモニウム pH 2.0 で流速 157 cm/h (40 l/h) で平衡化した。最大流速は 200 cm/h である。

【0160】

溶出は、10 CV の 50 mM 酢酸アンモニウム (pH 2.0) 中 25% (0.5 M NaCl) から 75% (1.5 M NaCl), および 50 mM 酢酸アンモニウム + 2 M NaCl (pH 2.0) で、電導率直線勾配で実施した。溶出は、流速 157 cm/h (40 l/h) で行った。最大流速は 200 cm/h である。溶出されたピークを回収して 2 リッ

10

20

30

40

50

トルの画分とし、これを SDS - PAGE により分析した後、プールした。プールした後、MHS - E プールを次の精製工程まで - 20 で、または 24 時間以内に用いる場合には 2 - 8 で保存した。

【0161】

次に、カラムを 1.5 - 2.5 CV の 1 M NaOH 1 M + 2 M NaCl (2 h) で消毒し、20 mM NaOH 中で室温で保存した。

【0162】

4. 濃縮 - 膜分離

濃縮は、2つの Sartocoon カセット (0.6 m², カットオフ 5 kDa) Hydrosart Sartorius 膜 (Sartopore cat # 3021442906E-SG) を用いて行った。膜を Proflox M12 システム (Millipore Bioprocess Division) に接続したホルダーにマウントした。膜を注射用水 (WFI) ですすいだ。消毒は、0.5 M NaOH の 60 分間の連続再循環により行った。次に、膜を Na₂HPO₄ · 12H₂O, 20 mM pH 7.0 で、通過物が pH = 7.0 ± 0.1 となるまですすいだ。次に、膜を PBS pH 7.4 (NaCl 8 g/l, KH₂PO₄ 0, 19 g/l, Na₂HPO₄ 2, 38 g/l) で通過物が pH = 7.4 ± 0.1 となるまで平衡化した。入口圧および出口圧は、それぞれ 1.5 ± 0.1 bar および 1.2 ± 0.1 bar に設定した。

【0163】

数回分の Macroprep High S 溶出物を一緒にプールし、蛋白質の総量にしたがって、理論的濃度 30 mg/ml に対応する容量に濃縮した。濃縮後、残留物を、10 倍容量の PBS pH 7.4 (NaCl 8 g/l, KH₂PO₄ 0, 19 g/l, Na₂HPO₄ 2, 38 g/l) に対して透析濾過した。残留物を回収し、膜を 7 回洗浄した。洗浄はそれぞれ、150 ml の PBS (pH 7.4) (NaCl 8 g/l, KH₂PO₄ 0, 19 g/l, Na₂HPO₄ 2, 38 g/l) で 3 分間、同じプロセスパラメータで行った。洗浄の間、通過のラインは閉じた。

【0164】

残留物およびそれぞれの洗浄画分について BCA 蛋白質アッセイを行った。残留物を選択された洗浄画分とともにプールして、12 mg/ml より高い合計濃度を、可能であれば 90% より高い収率で得た。膜を WFI で洗浄した。浄化は、0.5 M NaOH を 60 分間連続して循環させることにより行った。次に膜を 0.1 M NaOH 中で保存した。

【0165】

5. 滅菌濾過

残留物 + 選択された洗浄画分の滅菌濾過は 1000 cm² の 0.45 / 0.22 Sartopore 2 フィルター (Sartorius cat # 544 - 1307 - H8 - 00) で室温で行った。膜は、使用前に約 500 ml の PBS pH 7.4 (NaCl 8 g/l, KH₂PO₄ 0, 19 g/l, Na₂HPO₄ 2, 38 g/l) ですすいだ。

【0166】

濾過は、ペリスタポンプを用いて流速約 100 ml/min で行い、濾液を滅菌した無発熱物質の 5 L または 10 L の使い捨てボトルに回収した。

【0167】

濾過したバルクについて行った BCA アッセイにしたがって、PBS (pH 7.4) (NaCl 8 g/l, KH₂PO₄ 0, 19 g/l, Na₂HPO₄ 2, 38 g/l) を濾過により加えることにより、濃度を 10 mg/ml に調節した。サンプリングの後、滅菌したバルクを PETG 2000 ml Nalgene ボトル (± 1500 ml - 1700 ml / 本) に分注した。滅菌したバルクは - 20 で保存した。製造工程の概要図を図 1 に示す。

【0168】

実施例 4: hH1.3 および bis-methH1.3 の精製効率

50 L 発酵槽で BL21 [DE3] - bis-metrH1.3 を培養した結果、全溶

10

20

30

40

50

解細胞の段階的希釈の SDS - p a g e 分析で評価して、回収時の収量は少なくとも 6 0 0 m g / L 培養物であった。完全な精製プロセスの後の最終収量は、5 0 0 m g / L を越える純粋な b i s - m e t r H 1 3 であった。

【 0 1 6 9 】

5 0 L 発酵槽中で B L 2 1 [D E 3] - h H 1 . 3 を培養することにより、溶解細胞全体の連続希釈の SDS - p a g e 分析により評価して、回収時に少なくとも 6 0 0 m g / L の培養物が得られた。細胞は、標準的なプロトコルにしたがって、ホモジナイズおよび H C l O₄ 沈殿により処理した。得られた結果は予測と一致した。M a c r o P r e p H i g h - S への負荷も通常どおり行ったが、r h H 1 . 3 蛋白質は、1 0 C V の 1 0 m M N a C H₃ C O O (p H 2 . 0) 中 3 0 % (0 . 6 M N a C l) から 7 5 % (1 . 5 M N a C l) の導電率直線勾配および 1 0 m M N a C H₃ C O O + 2 M N a C l (p H 2 . 0) を用いてカラムから溶出することができなかった。

10

【 0 1 7 0 】

r h H 1 . 3 蛋白質は 2 M N a C l で溶出されたが、この工程によっては、十分な精製ができず、蛋白質をさらに加工することができなかった。したがって、精製は失敗であったと考えられる。この失敗は、2 つの異なる発酵物の 2 回の独立した精製の試行により確認された。

【 0 1 7 1 】

実施例 5 : b i s - m e t ヒストン H 1 . 3 のインビトロでの効果
阻害ゾーンアッセイ

20

抗微生物剤および抗ウイルス剤としての組換えヒストンの効果を測定するために、標準的な方法にしたがって阻害ゾーンアッセイを行った。さらに、抗真菌剤としての組換えヒストンの効果も試験した。細菌および真菌を、上述した方法にしたがって製造した b i s - m e t ヒストン H 1 . 3 の存在下で成長させ、平均ゾーン直径を測定した（表 1 を参照）。

【 0 1 7 2 】

グラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方および真菌は、表 1 に示されるように、有効に排除された。

【 0 1 7 3 】

【表 1】

表1:阻害ゾーンアッセイ

試験した生物	薬剤濃度[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	平均ゾーン直径 [mm]	
Bacillus megaterium	5	11.4	10
	2.50	10.5	
	1.25	9.7	
	0.625	8.6	
	0,31.	7.9	
	陽性対照 LL-37	9.8	
Escherichia coli D21	20.00	7.4	20
	10.00	6.3	
	5.00	4.8	
	2.50	0	
	1.25	0	
	陽性対照 LL-37	5	
Candida albicans	20.00	11.8	30
	5.00	8.1	
	2.50	6.1	
	1.25	4.4	
	陽性対照: ナイスタチン	20.9	

【0174】

細胞毒性アッセイ:

この細胞試験は、ヒストンがヒストン - 感受性白血病細胞株（例えば、U - 937）に及ぼす毒性効果を検出するものである。種々のヒストン濃度でインキュベーションした後の白血病癌細胞の生存率を、Alamar Blueアッセイにより、細胞の生存率に応答して変化する酸化還元指示薬の蛍光の観察に基づいてモニターした。ヒストンの抗癌活性は、IC50により特徴づけられ、これは癌細胞の50%の生存率が観察されるヒストン濃度に相当する。細胞毒性アッセイ、ならびに臨床試験に用いたバッチを表2にまとめる。表1に示されるように、試験したすべてのサンプルは、H1.3およびbis-Metの含有の相違にかかわらず、腫瘍細胞株U - 937に対して同様の高い細胞毒性を示す（表3を参照）。

【0175】

【表 2】

表 2: 臨床試験において用いたバッチの細胞毒性

サンプル (薬剤製品)	IC50 [μ M]
バッチ 1: M-H1A-P02	3.2 \pm 0.5
バッチ 2: M-H1A-Pool01	3.1 \pm 0.5
バッチ 3: M-H1A-Pool02	3.1 \pm 0.5
バッチ 4: M-H1A-Pool03	2.2 \pm 0.5

10

【0176】

表 1 に示す細菌および真菌に加えて、当該技術分野において知られる方法、例えば本明細書に概説される方法の任意のものを用いて、さらに別の細菌、真菌およびウイルスを適宜試験することができる。非限定的例としては、エプスタインバーウイルス、Staphylococcus aureus、Aspergillus niger、Enterococcus、Pseudomonas、Haemophilus influenzae および Salmonella が挙げられる。

【0177】

実施例 6：臨床データ

再発または不応性 AML の患者、および化学療法を拒否した患者または化学療法に適合しない患者において、組換えヒトヒストン H1.3 (rhH1.3) の最大耐量 (MTD) を評価するための第 I / II 相用量増加試験を実施した。

20

【0178】

対象患者選定基準は次のとおりである：インフォームドコンセントに署名、任意の人種、両方の性別、少なくとも 18 歳、骨髄に少なくとも 20% の芽球を有する、組織学的に証明された AML、標準的な化学療法後に失敗または不適合または拒否、適正な動作状態 (Karnofsky 指数 > 60%)、および少なくとも 30 日間の余命。患者の排除につながる基準は、顕著な臓器不全、既知の HIV 感染、既知の C 型肝炎ウイルスまたは B 型肝炎ウイルス感染、妊娠中または授乳中、他の悪性腫瘍、循環抗 H1 抗体、1 回目の来院前 2 週間または試験中におけるヘパリン治療、rhH1.3 治療に干渉する可能性のあることが知られている活動的な医学的状态、例えば、慢性関節リウマチまたは全身性エリテマトーデス (SLE)、ならびにアルコールおよび / または薬物乱用。

30

【0179】

実験の設計

患者には、1 週間に 3 回の注入を 3 週間続けて投与した。最初の用量は 38 mg / m² であった。用いた用量増加スキームは表 3 に示される。

【0180】

【表 3】

表 3: 用量漸増スキーム:

用量レベル	用量 mg/m ²	計画患者数	試験数	治療
1	38	3	7	完了
2	60	3	7	完了
3	96	3	3	完了
4	153	3	3	完了
新規用量増加				
5, 5, 6	245, 245, 392	1 (サイクル 1)	1	完了
6, 6, 7	392, 392, 628	(サイクル2, 上と同じ患者)		完了
6, 6, 7	392, 392, 628	1	1	完了

10

【0181】

AML (急性骨髄性白血病) 患者によるフェーズ I / II 臨床試験は, the Saarland University Hospital (Homburg) で実施した。この試験で用いた医薬品のバッチは, B1, B2, B3 および B4 であった。これらの4つのバッチおよび毒性試験で用いた1つのGLPバッチの特性を下記の表4に示す。

20

【0182】

【表 4】

表4: 実験に用いたポリペプチドのバッチの特性						
バッチ:	記述エンドトキシシン [EU/mg]	評価-エンドトキシ シンレベル	rh H1.3 MS ピーク [Da]	細胞試験における 抗癌活性IC50 [μM]		
L-H1A-03B07*	5	AL以下	H1.3 + bis Met	1.7-2.7		
M-H1A-P02 B1	12	AL以上	H1.3 + bis Met	3.2		
M-H1A-Pool01 B2	95	AL以上	主としてbis Met	3.1		
M-H1A-Pool02 B3	0.8	AL以下	主としてbis Met	3.1		
M-H1A-Pool03 B4	1.7	AL以下	主としてbis Met	2.2		
* 毒性試験で使用、臨床試験では使用せず						
AL: 許容限界						
MS ピーク:	22221 Da	H1.3	Metなし			
	22481 Da	bis Met	N末端 Met-Met			

10

20

30

【 0 1 8 3 】

6. 1 予備的評価

表 5 は、最初の 2 2 名の A M L 患者を、組換えヒトヒストン H 1 . 3 (r h H 1 . 3 , “ O n c o h i s t ”) で、漸増用量レベルで(いわゆる F i b o n a c c i スキーム)で治療した、前臨床試験の結果をまとめたものである。

40

【 0 1 8 4 】

患者 W W 1 3 および W W 2 7 には、それぞれ 2 回の治療サイクルを行った(1サイクルは 1 週間に 3 回の注入を 3 週間、全体で 9 回からなる)。W W 2 7 には、各サイクルについて用量を増加した。すなわち、5 - 5 - 6 : 2 週間、用量レベル 5 , 第 3 週、用量レベル 6 , 同様に第 2 サイクルの用量レベル: 6 - 6 - 7。

【 0 1 8 5 】

表5: 予備評価で得られた組換えヒトヒストンH1.3("Oncohist")で治療したAML患者の臨床結果

患者イニシヤル番号	注	薬剤製品	MSによる組成	エンドトキ	副作用
レベル		バッチ	(H1.3, bis Met)*	シンの夾雑	
				[EU/mg]	
AS 01	1	TTI	H1.3 + bis Met	12	中程度に許容
NM 02	1	TTI	H1.3 + bis Met		許容困難
HS 03	1	TLI	H1.3 + bis Met		許容良好
RH 04	1	TTI	H1.3 + bis Met		許容良好
MF 05	1	TTI, TLI	H1.3 + bis Met		許容困難
RS 07	1	TTI	H1.3 + bis Met		許容良好
PS 10	1	TTI	H1.3 + bis Met		許容良好
MT 11	2	B2	主としてbis Met	95	許容困難
MG 12	2	TLI	主としてbis Met		許容困難
WW 13	2	PR, TN	主としてbis Met		許容困難
AH 15	2	TTI, TLI	主としてbis Met		許容困難
GB 16	2	TN, TLI	主としてbis Met		許容困難
HF 18	2	TTI, TLI	主としてbis Met		許容困難

【表6】

エンドトキシンなしのヒストン薬剤開始									
ES 19	2	PR, TTI, TLI	B3	主としてbis Met	0.8	NSE			
IG 20	3		B3	主としてbis Met		NSE			
BG 21	3	TTI	B3	主としてbis Met		NSE			
GR 22	3		B3	主としてbis Met					
EL 23	4	TTI, TLI	B3	主としてbis Met		NSE			
EW 24	4		B3	主としてbis Met		NSE			
BH 26	4		B3	主としてbis Met		NSE			
		C1: 5,5,6;							
WW 27		C2: 6,6,7 PR, TTI	B3/B4	主としてbis Met	B4: 1.7	NSE			
PF 28		6,6,7	B3	主としてbis Met					

予備分析:

PR: 部分的寛解

TTI: 一次的血小板増加

TN: 正常レベルの血小板

TLI: 一次的白血球増加

NSE: 副作用なし

H1.3: 成熟組織換えヒトヒストンH1.3; bis Met: N-Met-Met-H1.3

10

20

30

【0187】

表5から明らかなように、薬剤の副作用は、エンドトキシンの夾雑の結果としてのみ生じた(表3も参照)。天然に生ずるヒストンH1.3と“bis Met”誘導体は両方とも、有効性の臨床兆候に関する限り、同様の特性を示す。

40

【0188】

免疫原性

すべての患者は、治療の前、間および後に、抗ヒストンH1.3自己抗体の存在について調べた。治療を受けた患者は、1サイクルの治療を受けた者も、2サイクルの治療を受けた者も、治療の間に自己抗体を生成しなかった。ヒストンH1は非常に進化的に保存された蛋白質であり、免疫原性であるとは予測されず、証明されていなかった。臨床データから、天然に生ずるヒストンH1.3または“bis Met”誘導体を用いたときに、免疫原性活性が観察されないことが確認された。

【0189】

50

治療効果

約50%の患者は血小板の増加を示し、これらの患者の一部は白血球の増加も示した。これらはいずれも、AMLの非常に重要なバイオマーカーである。3名の患者は部分的寛解を示した(腫瘍細胞は最初の値の50%未満に減少。患者WW13は血小板が正常レベル($210 \times 10^9 / l$)まで増加し、これは18か月継続した。Oncohistによる治療前のこの患者の血小板数は $47 \times 10^9 / l$ であった。

【0190】

6.2 臨床結果の最終評価

表6は、用量漸増レベル(Fibonacciスキーム)の組換えヒトヒストンH1.3(rhH1.3, "Oncohist")で治療した22名のAML患者のより詳細な分析後の臨床結果をまとめたものである。

10

【0191】

上述したように、患者WW13およびWW27は、それぞれ2サイクルの治療を受けた(1サイクルは1週間に3回の注入を3週間、合計9回からなる)。WW27は各サイクルで投与量を増加させた。すなわち、5-5-6:2週間投与量レベル5,第3週投与量レベル6,および同様に第2サイクルの投与量レベル:6-6-7。

【0192】

表6:最終評価において組換えヒトヒストンH1.3("Oncohist")で治療したAML患者の臨床結果

患者の イニシャル および番号	用量 レベル	注	薬剤製品 パッチ	MSIによる組成 (H1.3, bis Met)*	エンドトキ シン夾雑 [EU/mg]	副作用
AS 01	1		B1	H1.3 + bis Met	12	中程度に許容
NM 02	1	TI, LI	B1	H1.3 + bis Met		許容不十分
HS 03	1	TLI	B1	H1.3 + bis Met		中程度に許容
RH 04	1		B1	H1.3 + bis Met		許容良好
MF 05	1		B1	H1.3 + bis Met		許容不十分
RS 07	1		B1	H1.3 + bis Met		許容良好
PS 10	1		B1-21 バイアル, B2-4 バイアル	H1.3 + bis Met		許容良好
MT 11	2		B2	主としてbis Met	95	許容不十分
MG 12	2	LI	B2	主としてbis Met		許容不十分
WW 13	2	PR, TN	B2	主としてbis Met		許容不十分
AH 15	2	LI	B2	主としてbis Met		許容不十分
GB 16	2		B2	主としてbis Met		許容不十分
HF 18	2		B2	主としてbis Met		許容不十分

【表 8】

エンドキシンなしのヒストン薬剤開始						
ES 19	2	PR, TI,	B3	主としてbis Met	0.8	許容良好
IG 20	3		B3	主としてbis Met		許容良好
BG 21	3	TI	B3	主としてbis Met		許容良好
GR 22	3		B3	主としてbis Met		
EL 23	4	TI ^o , LI	B3	主としてbis Met		許容良好
EW 24	4		B3	主としてbis Met		許容良好
BH 26	4		B3	主としてbis Met		許容良好
WW 27	C2: 6,6,7	PR, TI, LI	B3/B4	主としてbis Met	B4: 1.7	許容良好
PF 28	6,6,7		B3	主としてbis Met		day 8**, day 19 SAE***

*予備分析

**9回の注入の1回の後AE, 回復

***最後の注入の間にSAE, 心房性細動、74歳の患者, 相関不明

PR: 部分寛解

TI: 血小板増加

TN: 正常レベルの血小板

LI: 白血球増加

AE: 有害事象, SAE: 重篤な有害事象

H1.3: 成熟 組換えヒトヒストン H1.3; bis Met: N-Met-Met-H1.3

10

20

30

【0194】

治療効果

最終評価にしたがえば、22名のうち7名の患者は、血小板の増加を示し、これらの患者の一部は白血球の増加も示した。これは両方とも、AMLの非常に重要なバイオマーカーである。3名の患者は部分寛解（腫瘍細胞は6 - 25%未満に低下し、同時に他の血液値は改善された）を示した。患者WW13は、血小板の正常レベル（ $210 \times 10^9 / l$ ）への増加を示し、これは18か月持続した。この患者のOncohistによる治療前の血小板カウントは $47 \times 10^9 / l$ であった。

40

【0195】

安全性評価

臨床試験報告では、rhH1.3 (Oncohist) は、これまでに治療した投与量では安全であることを示した。重篤な副作用は観察されなかったが、ただし1症例につい

50

て r h H 1 . 3 の注入により心房性細動があり，これはおそらく試験薬剤に関連するものと考えられた。17名の患者が1クルの治療（8 - 9回の投与）を完了し，応答した2名の患者は，副作用なしに第2クルの治療を受けた。用量制限毒性は認められず， $628 \text{ mg} / \text{m}^2$ では最大許容投与量に到達しなかった。

【0196】

最も重要なことには，純粋な，エンドトキシンを含まない試験薬剤は，細胞増殖抑制に反して，患者によりよく許容され，すなわち副作用がなかった。この結果は，前臨床試験の結果と一致しており，組換えヒトヒストンH1.3誘導体が健康な血液細胞に障害を与えず，耐性を引き起こさないことを示す。

【0197】

実施例7：サンプル中における b i s - m e t h H 1 . 3 の存在の評価

“ b i s - M e t ” ヒストン h H 1 . 3 は，MSにより，内因性ヒストンH1から容易に区別することができる。これは，元のプロセシングされていない r h H 1 . 3 薬品溶液の E S I - Q T O F 検出により，または R P - H P L C - E S I - M S プロセスによって，R P - H P L C クロマトグラフィー分離および続く E S I - M S 検出により，直接分析することができる。図2に示されるように，バッチB1は，ヒストンH1.3および N - M e t - M e t - 誘導体の両方を含む。図3は，3つのバッチの1つ（B2）を示し，これは主として N - M e t - M e t - H 1 . 3 から構成される。組成にかかわらず，異なるバッチは白血病細胞に対する同程度の細胞毒性活性を示す（表3）。

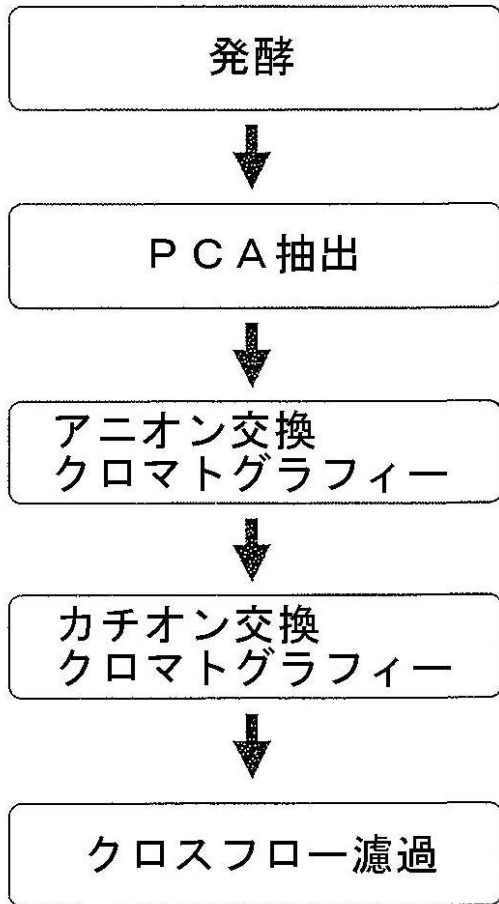
【0198】

下記のスペクトルは，タンデム質量分析（Q T O F ，四極子と飛行時間スペクトロメトリを組み合わせた単一の装置）により取得した。図2に示されるように，バッチB1はヒストンH1.3と t h e N - M e t - M e t - 誘導体の両方を含む。図3は，3つのバッチの1つ（B2）を示し，これは主として N - M e t - M e t - H 1 . 3 から構成される。組成にかかわらず，異なるバッチは白血病細胞に対する同程度の細胞毒性活性を示す（表3）。

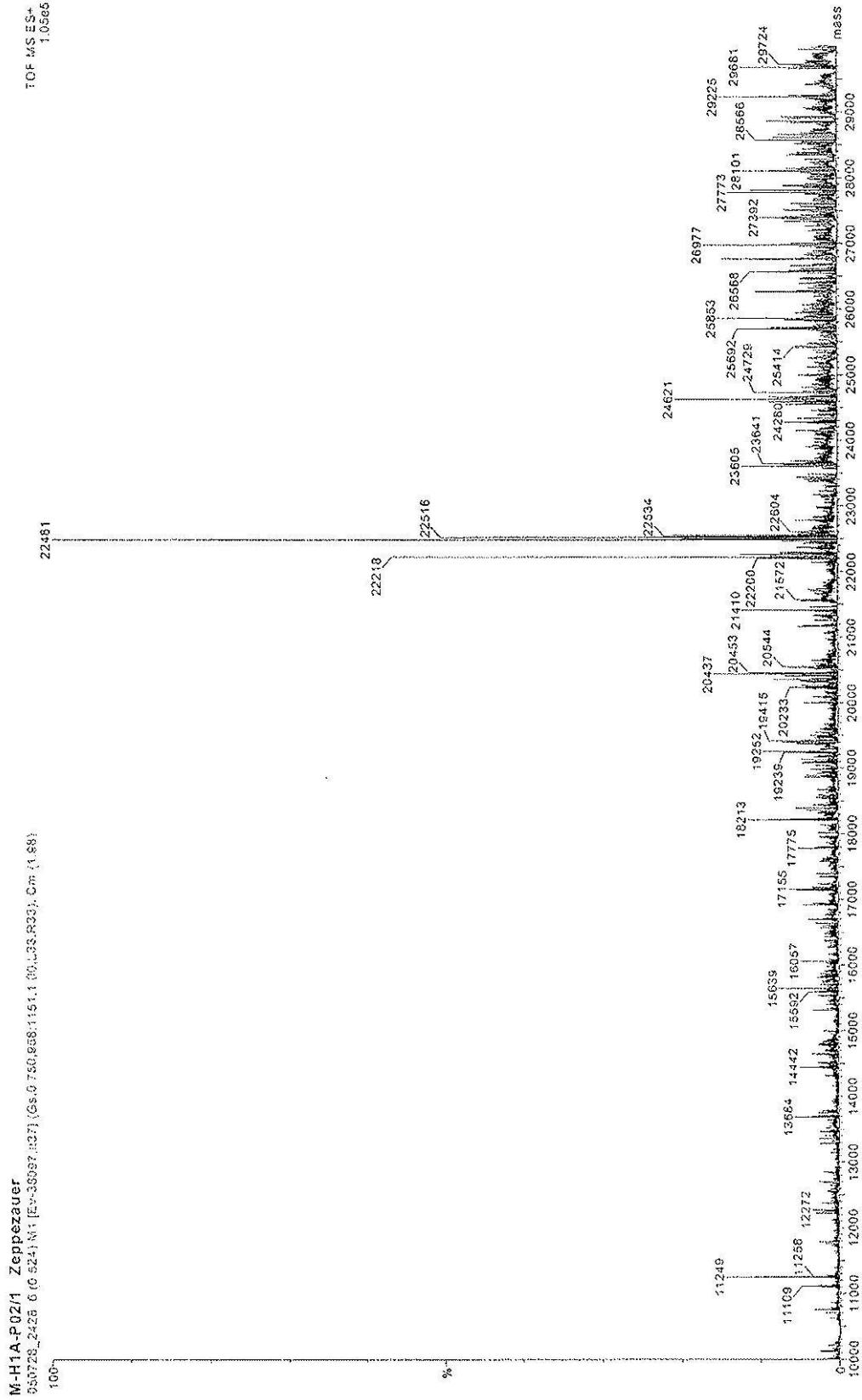
10

20

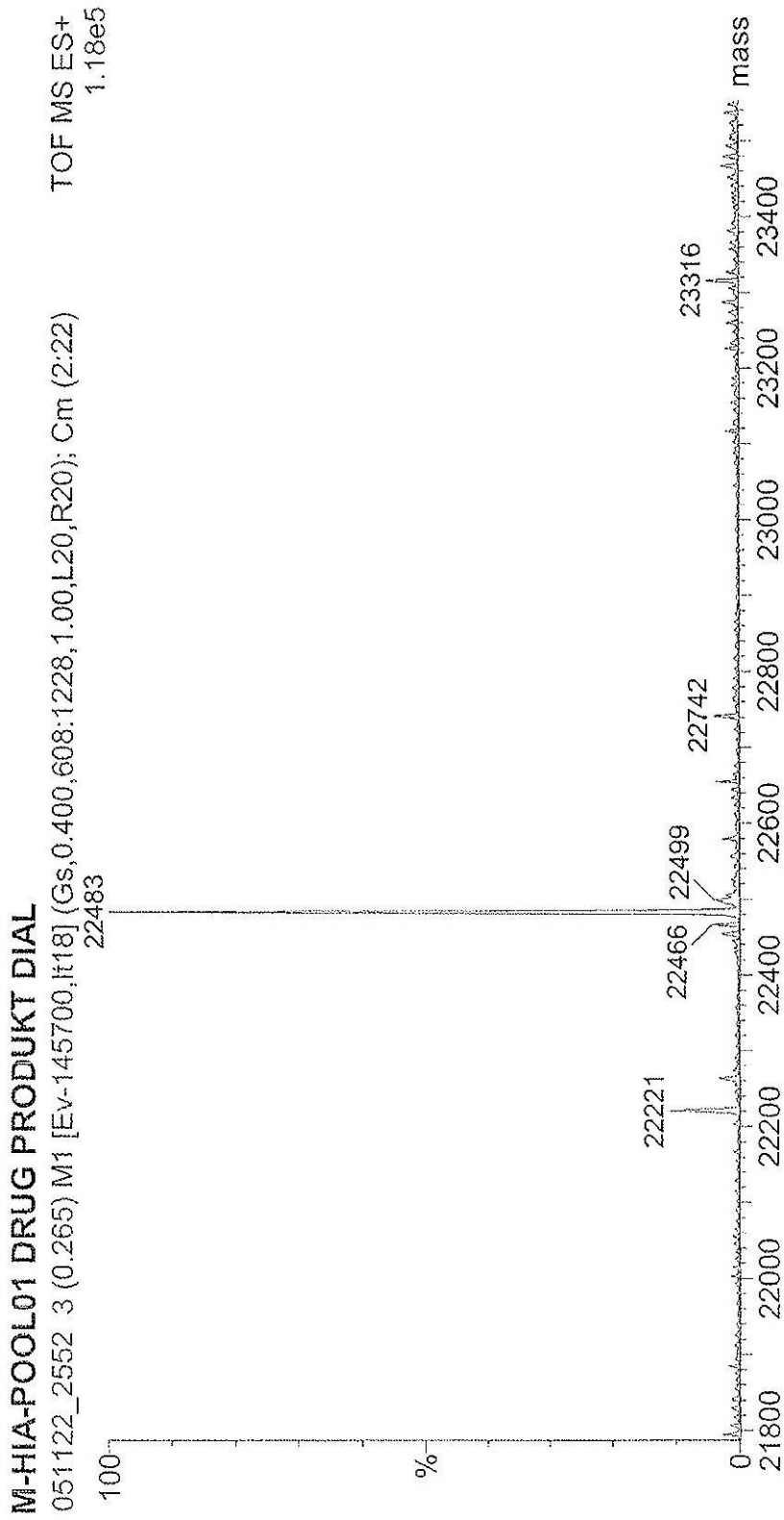
【図 1】



【 2 】



【 3 】



【 配列表 】

2010523093000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/002746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K14/47	A61K38/17	C12P21/02 A61K38/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12P A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/51511 A (STRATHMANN AG & CO [DE]; POHLMAYER KAI [DE]; BEHNKE BERT [DE]; WICK RA) 19 July 2001 (2001-07-19) the whole document	1-21
A	EP 1 114 865 A1 (ALLELIX BIOPHARMA [CA]) 11 July 2001 (2001-07-11) paragraphs [0039], [0057]	1-21
A	JERALA R ET AL: "CLONING A SYNTHETIC GENE FOR HUMAN STEFIN B AND ITS EXPRESSION IN E. COLI" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 239, no. 1, 24 October 1988 (1988-10-24), pages 41-44, XP000004445 ISSN: 0014-5793 figure 1	1-21
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*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</p> <p>*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</p> <p>*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.</p> <p>*&* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the International search		Date of mailing of the International search report
4 August 2008		19/08/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stolz, Beat

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/002746

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HIREL P-H ET AL: "Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 86, no. 21, November 1989 (1989-11), pages 8247-8251, XP002995219 ISSN: 0027-8424 figure 2</p>	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/002746

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0151511	A	19-07-2001	AU 778979 B2	23-12-2004
			AU 3728901 A	24-07-2001
			CA 2400899 A1	19-07-2001
			DE 10001113 A1	26-07-2001
			EP 1254166 A2	06-11-2002
			NZ 520690 A	29-08-2003
			US 2003078204 A1	24-04-2003
			EP 1114865	A1
AU 2851692 A	08-04-1993			
AU 627147 B2	20-08-1992			
AU 8104887 A	25-05-1988			
DE 3752375 D1	26-02-2004			
DE 3752375 T2	21-10-2004			
DE 3789316 D1	14-04-1994			
WO 8803165 A1	05-05-1988			
EP 0383751 A1	29-08-1990			
EP 0604706 A1	06-07-1994			
HK 68497 A	30-05-1997			
JP 2834111 B2	09-12-1998			
JP 10014587 A	20-01-1998			
JP 2828427 B2	25-11-1998			
JP 9110899 A	28-04-1997			
JP 2501108 T	19-04-1990			
JP 2777132 B2	16-07-1998			
US 6962796 B1	08-11-2005			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 H	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	

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

(74)代理人 100106840

弁理士 森田 耕司

(74)代理人 100105991

弁理士 田中 玲子

(74)代理人 100119183

弁理士 松任谷 優子

(74)代理人 100114465

弁理士 北野 健

(74)代理人 100156915

弁理士 伊藤 奈月

(72)発明者 ティリ, ミヒェル

ベルギー王国 ベー - 4 8 7 0 トウルーズ, カル デュ ビーフ 1 6 6

(72)発明者 グロス, ペーター

ドイツ連邦共和国 6 6 4 5 0 ベクスバッハ, レッシングシュトラッセ 2 0

(72)発明者 ヨーンバル, ハンス

スウェーデン王国 エス - 1 1 3 3 2 ストックホルム, セント エリクス プラン 1 0

(72)発明者 フォルミカ - ツェッペツァウアー, グラツィーナ

ドイツ連邦共和国 6 6 1 3 3 ザールブリュッケン, アウフ デン ヒュッテン 3 2

(72)発明者 ツェッペツァウアー, ミヒャエル

ドイツ連邦共和国 6 6 1 3 3 ザールブリュッケン, アウフ デン ヒュッテン 3 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 AA13 AA14 CA02 DA01 DA02 DA05 DA11 DA12
EA02 EA03 EA04 GA11
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ43 QQ52 QR32 QR35 QR39 QR40 QR59
QR72 QR73 QR75 QR76 QR80 QS05 QS32 QS33 QS38 QS40
4B064 AG01 CA02 CA05 CA06 CA10 CA11 CA19 CC24 CD20 DA01
DA14 DA15
4B065 AA01X AA58X AA72X AA89X AA90X AB01 AC14 BA02 BD39 CA24
CA44
4C084 AA02 AA13 BA44 CA53 NA14 ZA162 ZA222 ZA362 ZA512 ZA662
ZA682 ZB072 ZB152 ZB262 ZB322 ZB332 ZB352
4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZA16 ZA22 ZA36 ZA51 ZA66 ZA68
ZB07 ZB15 ZB32 ZB33 ZB35
4H045 AA10 AA20 AA30 CA30 CA40 EA28 EA29 EA51 EA52 EA53
FA74

专利名称(译)	Bis-met组蛋白		
公开(公告)号	JP2010523093A	公开(公告)日	2010-07-15
申请号	JP2010501447	申请日	2008-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	新生物技术公司对AFO方舟包装UND进入维克Rungu奥夫DEM的增益击败德阿维奥熙诺如酥油手套 Beshurenkuteru霍夫Tsongu THIRY米歇尔		
申请(专利权)人(译)	申生物技术GESELLSCHAFT UND加斯托夫芬Forushungu UND进入维克Rungu奥夫DEM Gebito德 Biotehinorogi手套Beshurenkuteru有限公司 THIRY, 米歇尔		
[标]发明人	テイリミヒエル グロスペーター ヨーンバルハンス フォルミカツエツアウアーグラツィーナ ツエツアウアーミヒヤエル		
发明人	テイリ,ミヒエル グロス,ペーター ヨーンバル,ハンス フォルミカ-ツエツアウアー,グラツィーナ ツエツアウアー,ミヒヤエル		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K16/18 C12N15/115 C12N7/00 C12Q1/68 A61K48/00 A61K38/00 A61K31/7088 A61P35/00 A61P7/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31 /10 A61P37/02 A61P1/04 A61P25/28 A61P25/16 A61P9/00 A61P29/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P9/00 A61P21/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/02 A61P35/00 A61P37/02 A61P37 /06 A61P43/00 C07K14/47 Y02A50/409 Y10T436/143333 C12Q1/68 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02.C C07K16/18 C12N15/00.H C12N7/00 C12Q1/68.A A61K48/00 A61K37/02 A61K31/7088 A61P35/00 A61P7/00 A61P31/04 A61P31 /12 A61P31/10 A61P37/02 A61P1/04 A61P25/28 A61P25/16 A61P9/00 A61P29/00.101 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA13 4B024/AA14 4B024/CA02 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024 /DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR39 4B063 /QR40 4B063/QR59 4B063/QR72 4B063/QR73 4B063/QR75 4B063/QR76 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS38 4B063/QS40 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064 /CA06 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CD20 4B064/DA01 4B064/DA14 4B064/DA15 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA89X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD39 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084 /BA44 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA162 4C084/ZA222 4C084/ZA362 4C084/ZA512 4C084 /ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZB072 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZB332 4C084 /ZB352 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA16 4C086/ZA22 4C086/ZA36 4C086/ZA51 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZB07 4C086/ZB15 4C086/ZB32 4C086/ZB33 4C086 /ZB35 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA30 4H045/CA40 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/EA51 4H045/EA52 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 松任谷裕子 北野 健		

優先権	2007007200 2007-04-05 EP 2007018956 2007-09-26 EP
其他公开文献	JP5634259B2
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明提供了编码多肽的核酸分子，所述多肽由两个甲硫氨酸残基组成，作为通过肽键与成熟真核组蛋白连接的第一和第二N-末端氨基酸残基。本发明还涉及载体，其包含所述核酸分子，用所述载体转化的宿主，由核酸分子编码的多肽，以及药物和诊断组合物。本发明还涉及用于制备根据本发明的核酸分子，载体，宿主和多肽的疾病的组合物的用途。此外，本发明涉及用于测试样品中核酸分子或多肽的存在的方法和试剂盒。

試験した生物	薬剤濃度[μg/μl]	平均ゾーン直径 [mm]
Bacillus megaterium	5	11.4
	2.50	10.5
	1.25	9.7
	0.625	8.6
	0.31	7.9
	陽性対照 LL-37	9.8
Escherichia coli D21	20.00	7.4
	10.00	6.3
	5.00	4.8
	2.50	0
	1.25	0
	陽性対照 LL-37	5
Candida albicans	20.00	11.8
	5.00	8.1
	2.50	6.1
	1.25	4.4
	陽性対照: ナイスタチン	20.9