

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-2138

(P2020-2138A)

(43) 公開日 令和2年1月9日(2020.1.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42 Z N A	4 C O 7 6
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	4 H O 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C O 7 K 14/075 (2006.01)	C O 7 K 14/075	

審査請求 有 請求項の数 16 O L 外国語出願 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-132760 (P2019-132760)	(71) 出願人	398062149
(22) 出願日	令和1年7月18日 (2019.7.18)		セダーズーシナイ メディカル センター
(62) 分割の表示	特願2015-525636 (P2015-525636)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 900
	の分割		48, ロサンゼルス, ベヴァリー ブ
原出願日	平成25年8月2日 (2013.8.2)		ールバード 8700
(31) 優先権主張番号	61/679, 306	(74) 代理人	100106002
(32) 優先日	平成24年8月3日 (2012.8.3)		弁理士 正林 真之
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100120891
			弁理士 林 一好
		(74) 代理人	100165157
			弁理士 芝 哲央
		(74) 代理人	100126000
			弁理士 岩池 満

最終頁に続く

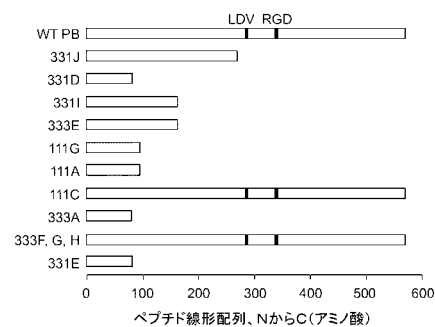
(54) 【発明の名称】 薬物送達タンパク質の輸送向上変異体の単離

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 薬物送達のための改善された細胞透過機能を有する新規タンパク質分子を含む担体の提供。

【解決手段】 Leu 60 Trp 変異を含む完全長 PB ポリペプチドである、あるいは、Lys 375 Glu 変異、Val 449 Met 変異及び Pro 469 Ser 変異を含む完全長 PB ポリペプチドである、等のペントンベース (PB) ポリペプチドを含む担体。

【選択図】 図 7



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞への輸送を向上させる方法であって、
細胞侵入を向上させる 1 つまたは複数の変異を有するペントンベース（P B）タンパク質を含む組成物を準備する工程と、
有効量の前記組成物を前記細胞に投与する工程と、
を含む、方法。

【請求項 2】

前記 1 つまたは複数の変異が 1 1 1 C および／または 3 3 3 F である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記組成物が、細胞質および／または細胞核を標的とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記組成物が、治療薬をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞が、腫瘍細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 1 つまたは複数の変異が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19 および／または配列番号 20 である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

細胞小器官を標的とする薬物送達分子を生成する方法であって、
a. ペントンベース（P B）遺伝子をコードするポリヌクレオチドを得、前記ポリヌクレオチドの変異体を生成する工程と、
b. 変異ポリヌクレオチドをファージベクター内でクローニングし、前記ファージベクターを含むファージライブラリーを生成する工程と、
c. 細胞を前記ファージライブラリーで形質転換する工程と、
d. 形質転換した細胞を分画し、前記形質転換した細胞から細胞小器官を収集する工程と、
e. 収集した細胞小器官からファージを増幅させる工程と、
f. 収集した前記細胞小器官から増幅させた前記ファージで細胞を形質転換する工程と、
g. 工程（d）、（e）、（f）および（g）を反復する工程と、
h. 各ラウンドから収集した前記細胞小器官から前記ファージを滴定する工程と、
i. 最も高い力価を有するファージを選択し、前記ファージから変異ポリヌクレオチドの配列を得る工程と、
j. 前記配列によってコードされるポリペプチドを生成する工程と、
を含み、前記ポリペプチドは細胞小器官を標的化する薬物送達分子である、方法。

30

40

【請求項 8】

前記細胞小器官は、ミトコンドリア、ゴルジ装置、小胞体、核、リボソーム、細胞膜および細胞質ゾルからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞は、哺乳動物または非哺乳動物細胞である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

変異体は、PCR ベースの方法、化学変異誘発、紫外線誘導性変異誘発またはそれらの組み合わせのいずれか一つもしくは複数を使用して生成される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記薬物送達分子は、標的ドメイン、エンドソーム溶解性リガンドドメインおよび正電

50

荷を持つドメインを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 1 2】

細胞小器官へ治療剤を送達するための担体であって、細胞侵入を向上させる 1 つまたは複数のペントンベース (PB) 変異によってコードされるポリペプチドを含む、担体。

【請求項 1 3】

前記 1 つまたは複数のペントンベース (PB) 変異が、1 1 1 C および／または 3 3 3 F を含む、請求項 1 2 に記載の担体。

【請求項 1 4】

ポリリシンモチーフをさらに含む、請求項 1 2 に記載の担体。

【請求項 1 5】

ヘレグリンの標的ドメインをさらに含む、請求項 1 2 に記載の担体。

【請求項 1 6】

1 つまたは複数の PB 変異が、C 末端欠失を含む、請求項 1 2 に記載の担体。

【請求項 1 7】

請求項 1 2 に記載の担体および治療薬を含む、治療剤。

【請求項 1 8】

前記治療薬が、化学療法剤である、請求項 1 7 に記載の治療剤。

【請求項 1 9】

増殖活性を有さない担体を生成する方法であって、

(a) ヘレグリン (Her) の受容体結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを得、前記ポリヌクレオチドの変異体を生成する工程と、

(b) 変異 Her ポリヌクレオチドをファージベクター内でクローニングし、前記ファージベクターを含むファージライブラリーを生成する工程と、

(c) 有糸分裂阻害剤の存在下で MDA-MB-435 細胞を前記ファージライブラリーで形質転換する工程と、

(d) 形質転換した細胞を分画し、前記 MDA-MB-435 細胞の膜分画を抽出する工程と、

(e) 前記膜分画から膜ファージを収集する工程と、

(f) 有糸分裂阻害剤の存在下で前記膜ファージを前記 MDA-MB-435 細胞内で形質転換する工程と、

(g) 工程 (d)、(e) および (f) を反復する工程と、

(h) 各ラウンドにおいて MDA-MB-435 細胞の増殖をモニタし、最も低い MDA-MB-435 細胞増殖を有する膜ファージを選択する工程と、

(i) 選択した前記膜ファージにおいて Her ポリヌクレオチド変異の配列を得る工程と、

(j) Her 配列およびペントンベース遺伝子によってコードされるポリペプチドを生成する工程と、

を含み、前記ポリペプチドは増殖活性を有さない担体である、方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の変異 Her 配列によってコードされるポリペプチドを含む、核に治療剤を送達するための担体。

【請求項 2 1】

ペントンベース (PB) タンパク質およびポリリシンモチーフをコードするポリペプチドをさらに含む、請求項 2 0 に記載の担体。

【請求項 2 2】

前記 PB タンパク質が、変異ペントンベースタンパク質である、請求項 2 0 に記載の担体。

【請求項 2 3】

請求項 1 9 に記載の担体および治療薬を含む治療剤。

【請求項 2 4】

前記治療薬が化学療法剤である、請求項 2 3 に記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府の権利

本発明は、国立衛生研究所（National Institutes of Health）によって与えられた認可番号 CA129822 および CA140995 の下で政府支援により行われた。政府は本発明において特定の権利を有する。

【0002】

発明の分野

本発明は、特定の細胞小器官への薬物送達を改善するための細胞透過機能のための方法および組成物を提供する。

【背景技術】

【0003】

指向進化が、新規向性、低下した非特異性送達、および免疫回避を用いて偽型アデノ随伴ウイルス（AAV）カプシドを生成するために使用されている（Kwon および Schaffer、2008；Maheshwari ら、2006）。異なる選択圧を用いたインビトロおよびインビボでのファージディスプレイおよび全ウイルスライブラリーのバイオパニングは、改善されたリガンド結合および取り込み、免疫相互作用、または酵素活性などの所望の特性を有する生成されたタンパク質を有する（Yuan ら、2005）。したがって、この方法論は強力であり得、改善された特徴を有する新たなタンパク質バリエーションを作製するための合理的変異に対する、より効果的な代替手段である。このプロセスに対する最近開発されたアプローチは、細胞特異的標的ベクターを選択するために異なる細胞種類に対してスクリーニングされ得るバリエーションのライブラリーを作製するためにエラープロード PCR を利用し、付着伸長を利用する（Zhao ら、1998）。今まで、改善された細胞内輸送機能を有するタンパク質バリエーションを単離するためのプロセスは開発されていなかった。本発明は、本発明の手順から得られる薬物送達のための改善された細胞透過機能を有する新規手順および新規タンパク質分子を紹介する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

種々の実施形態は、細胞への輸送を向上させる方法であって、細胞侵入を向上させる 1 つまたは複数の変異を有するペントンベース（PB）タンパク質を含む組成物を準備する工程と、有効量の組成物を細胞に投与する工程とを含む、方法を含む。一実施形態において、1 つまたは複数の変異は 111C および／または 333F である。別の実施形態において、組成物は細胞質および／または細胞核を標的とする。別の実施形態において、組成物は治療薬をさらに含む。別の実施形態において、細胞は腫瘍細胞である。別の実施形態において、1 つまたは複数の変異は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19 および／または配列番号 20 である。

【0005】

他の実施形態は、細胞小器官を標的とする薬物送達分子を生成する方法を含む。その方法は、以下の工程：a) ペントンベース（PB）遺伝子をコードするポリヌクレオチドを得、前記ポリヌクレオチドの変異体を生成する工程と、b) 変異ポリヌクレオチドをファージベクター内でクローニングし、ファージベクターを含むファージライブラリーを生成する工程と、c) 細胞をファージライブラリーで形質転換する工程と、d) 形質転換した細胞を分画し、形質転換した細胞から細胞小器官を収集する工程と、e) 収集した細胞小器官からファージを増幅させる工程と、f) 収集した細胞小器官から増幅させたファージで細胞を形質転換する工程と、g) 工程（d）、（e）、（f）および（g）を反復する

工程と、h) 各ラウンドから収集した細胞小器官からファージを滴定する工程と、i) 最も高い力価を有するファージを選択し、ファージから変異ポリヌクレオチドの配列を得る工程と、j) 前記配列によってコードされるポリペプチドを生成する工程と、を含み、前記ポリペプチドは細胞小器官を標的化する薬物送達分子である。別の実施形態において、細胞小器官は、ミトコンドリア、ゴルジ装置、小胞体、核、リボソーム、細胞膜および細胞質ゾルからなる群から選択される。別の実施形態において、細胞は哺乳動物または非哺乳動物細胞である。別の実施形態において、変異は、PCRベースの方法、化学変異誘発、紫外線誘導性変異誘発またはそれらの組み合わせのいずれか1つもしくは複数を使用して生成される。別の実施形態において、薬物送達分子は、標的ドメイン、エンドソーム溶解性リガンドドメインおよび正電荷を持つドメインを含む。

10

【0006】

他の実施形態は、細胞小器官へ治療剤を送達するための担体であって、細胞侵入を向上させる1つまたは複数のペントンベース(PB)変異によってコードされるポリペプチドを含む、担体を含む。別の実施形態において、1つまたは複数のペントンベース(PB)変異は111Cおよび/または333Fを含む。別の実施形態において、担体はポリリシンモチーフをさらに含む。別の実施形態において、担体は、ヘレグリンの標的ドメインを更に含む。別の実施形態において、1つまたは複数のPB変異はC末端欠失を含む。

【0007】

他の実施形態は、細胞侵入を向上させる1つまたは複数のペントンベース(PB)変異によってコードされるポリペプチドおよび治療薬を含む、細胞小器官へ治療剤を送達するための担体を含む治療剤を含む。別の実施形態において、治療薬は化学療法剤である。

20

【0008】

種々の他の実施形態は、増殖活性を有さない担体を生成する方法であって、a) ヘレグリン(He r)の受容体結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを得、前記ポリヌクレオチドの変異体を生成する工程と、b) 変異He rポリヌクレオチドをファージベクター内でクローニングし、ファージベクターを含むファージライブラリーを生成する工程と、c) 有糸分裂阻害剤の存在下でMDA-MB-435細胞をファージライブラリーで形質転換する工程と、d) 形質転換した細胞を分画し、MDA-MB-435細胞の膜分画を抽出する工程と、e) 前記膜分画から膜ファージを収集する工程と、f) 有糸分裂阻害剤の存在下で膜ファージをMDA-MB-435細胞内で形質転換する工程と、g) 工程(d)、(e)および(f)を反復する工程と、h) 各ラウンドにおいてMDA-MB-435細胞の増殖をモニタし、最も低いMDA-MB-435細胞増殖を有する前記膜ファージを選択する工程と、i) 選択した膜ファージにおいてHe rポリヌクレオチド変異の配列を得る工程と、j) He r配列およびペントンベース遺伝子によってコードされるポリペプチドを生成する工程と、を含み、前記ポリペプチドは増殖活性を有さない担体である、方法を含む。

30

【0009】

他の実施形態は、変異He r配列によってコードされるポリペプチドを含む、核に治療剤を送達するための担体を含む。別の実施形態において、担体は、ペントンベース(PB)タンパク質およびポリリシンモチーフをコードするポリペプチドをさらに含む。別の実施形態において、PBタンパク質は変異ペントンベースタンパク質である。

40

【0010】

他の実施形態は、担体および治療薬を含む治療剤を含む。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】本明細書の実施形態に係る、バイオパニングストラテジーを示す。

【図2】本明細書の実施形態に係る、ペントンベース遺伝子のPCRベースのランダム変異導入を示す。PCR産物(1600bpバンドの真上)は、濃度測定分析に基づいて100ngのDNAを含有し、約4800ngの全収率を得る。最初の標的DNAは97ngであったので、約50の収率/初期比および約5.6の重複数を有し、製造業者のプロ

50

トコル (Genemorph II, Strategene, La Jolla, CA, USA) で提供される標準曲線に対して推定すると、約 8/kb の変異率に対応する。

【図 3】本明細書の実施形態に係る、核分画において向上したパーティションを有するファージディスプレイペントンベースバリエーションの単離を示す。ランダム変異した PB を示す T7 ファージライブラリーを、細胞結合および取り込みのためのテキストに記載される条件に従って、 1×10^8 pfu にて 1×10^6 HeLa 細胞に加えた。細胞は、あらゆる表面結合ファージを取り除くためにトリプシン処理によって収集し、次いで市販の分画キット (Qproteome Cell Compartment Kit; Qia gen Inc., Valencia, CA, USA) を使用して分画した。ファージを、標準的な手順に従って各分画から一晚 PEG 沈殿させ、次いで TB 細菌培地に再懸濁し、BLT5403 細菌に加えて、単離したファージを増幅させた。増幅したファージをブランクアッセイによって滴定し、次いで上記と同じ力価および条件を使用して HeLa 上で再びパニングした。細胞質分画から得たファージを 3 ラウンドの細胞質バイオパニングに供したのに対して、核分画から得たファージを 2 ラウンドに供した。

【図 4】本明細書の実施形態に係る、バイオパニングから単離した輸送バリエーションのアラインメントを示す。

【図 5】本明細書の実施形態に係る、細胞質および核への向上した輸送を示す、完全長変異体、111C を示す。図 5 (A) は、タンパク質がアセトン沈殿によって各分画から沈殿したことを示し、ペレットを $40 \mu\text{L}$ の脱塩緩衝液に再懸濁し、続いて SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングにより分析した。図 5 (B) は、Image J を使用したバンド密度の分析が、野生型タンパク質と比較して、細胞質および核分画の両方における 111C の増加を示すことを示している。輸送および細胞分画アッセイ：フラスコ内で増殖させた接着 HeLa 細胞を、50 分間撹拌しながら 37°C のインキュベーションにて 5 mL の $1 \times \text{PBS} + 2 \text{ mM}$ の EDTA を用いて解離し、 15 mL のコニカルチューブに移した。細胞の密度を測定し、細胞を 5×10^6 細胞/チューブにて別のチューブ内に分配した。細胞を、 $1 \times \text{PBS} + \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ で 3 回洗浄して EDTA を除去し、細胞ペレットを、 0.7 mL の緩衝液 A (20 mM の HEPES、 $\text{pH} 7.4$; 2 mM の MgCl_2 ; DMEM 中の 3% BSA) に再懸濁した。野生型 (WT) または変異体 (111C、333F) ペントンベースタンパク質 ($450 \mu\text{g}$) を別の細胞アリコートに加え、混合物を 4°C にて 2 時間撹拌しながらインキュベートして、受容体結合を促進し、続いて 37°C にて 2 時間撹拌しながらインキュベートして、受容体結合タンパク質の内在化を促進した。コントロール処理は非タンパク質 (NP) を与えた。次いで細胞を収集し、Qproteome Cell Compartment アッセイキット (Qia gen) を使用して細胞成分分画のために処理した。

【図 6】本明細書の実施形態に係る、野生型 PB と比較して、向上した核侵入を示す、PB 変異体、111C および 333F を示す。図 6 (A) は、細胞内輸送および免疫細胞化学を示す。確立したプロトコルに従う手順は Gene Therapy (2006) 13、821-836 に詳細に述べられている。抗ペントンベース抗体 (Ad5 抗体) を $1:500$ 希釈で使用した。Alexa-Fluor 488 ヤギ抗ウサギを $1:400$ 希釈にて使用した (二次抗体)。ファロイジンを $1:100$ 希釈にて使用し、DAPI を 300 nM にて使用した。緑、野生型 (WT) または変異体 (111C、333F) PB; 赤、アクチン; 青、核。図 6 (B) は、タンパク質輸送の定量を示す。左のパネルに表した各処理からの 16 個の細胞を定量のために選択した。カウントは、Adobe Photoshop で各画像のヒストグラムに基づいた。バーは、グリーンチャンネルにおける $80 \sim 255$ ウィンドウ内のグリーンピクセルカウントを表す。

【図 7】本明細書の実施形態に係る、PB 変異体の更新されたアラインメントを示す。新たなペプチド長は変異体クロンの核酸配列から翻訳されたアミノ酸配列に基づく。配列は本明細書の図 8 ~ 17 に提供される。

【図 8】本明細書の実施形態に係る、分画 111 クローン A (111A) からの変異 PB の核酸およびペプチド配列を示す。

10

20

30

40

50

【図 9】本明細書の実施形態に係る、分画 1 1 1 クローン C (1 1 1 C) からの変異 P B の核酸および予測アミノ酸配列を示す。

【図 1 0】本明細書の実施形態に係る、分画 1 1 1 クローン G (1 1 1 G) からの変異 P B の核酸およびペプチド配列を示す。

【図 1 1】本明細書の実施形態に係る、分画 3 3 1 クローン E (3 3 1 E) からの変異 P B の核酸およびペプチド配列を示す。

【図 1 2】本明細書の実施形態に係る、分画 3 3 1 クローン I (3 3 1 I) からの変異 P B の核酸およびペプチド配列を示す。

【図 1 3】本明細書の実施形態に係る、分画 3 3 1 クローン J (3 3 1 J) からの変異 P B の核酸およびペプチド配列を示す。

【図 1 4】本明細書の実施形態に係る、分画 3 3 3 クローン A (3 3 3 A) からの変異 P B の核酸およびペプチド配列を示す。

【図 1 5】本明細書の実施形態に係る、分画 3 3 3 クローン D (3 3 3 D) からの変異 P B の核酸およびペプチド配列を示す。

【図 1 6】本明細書の実施形態に係る、分画 3 3 3 クローン E (3 3 3 E) からの変異 P B の核酸およびペプチド配列を示す。

【図 1 7】本明細書の実施形態に係る、分画 3 3 3、クローン F、G および H (3 3 3 F、3 3 3 G、3 3 3 H) からの変異 P B の核酸およびペプチド配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 2】

本明細書で使用する場合、「P B」という省略形はペントンベースを意味する。

【0 0 1 3】

種々の試薬が、治療剤および薬物を疾患細胞に送達するために開発されており、それらには、リポソーム、合成ポリマー、ペプチド、タンパク質、ウイルスおよびウイルスナノ粒子が含まれる (Medina-Kauwe, 2006; Medina-Kauwe ら、2005)。典型的に、これらの試薬によって形成される粒子は遺伝子の送達または薬物ペイロードを促進する修飾を必要とする。このような修飾には、付加する標的リガンドまたは抗体、膜透過剤、および／または細胞内標的 (例えば核標的) 剤が含まれる。これらの修飾は、通常、合理的設計により導入され、それにより、このような修飾によって生成される各々の新規バリエーションは経験的試験を必要とする。これは時間を消費し、大きな労力を必要とし得、最適以下の活性を生じる危険性がある。

【0 0 1 4】

細胞膜透過および／または細胞内輸送を改善する過去および現在の試みは、細胞透過または細胞内標的ペプチドを薬物担体にコンジュゲートする合理的設計が使用されている。このようなアプローチは各分子の経験的試験を必要とする。

【0 0 1 5】

多くの種類の細胞透過ペプチドが、遺伝子および薬物送達の向上について試験されており、それらには、Ant P、TAT、GALA、ミツバチメリチン、および同様のペプチドが含まれる (Medina-Kauwe, 2006; Medina-Kauwe ら、2005)。同様に、核標的活性が、SV40、NLS、HMG-1、プロタミン、および同様のペプチドまたはタンパク質などの異なる多塩基ドメインの付加によって遺伝子送達剤に加えられている (Medina-Kauwe, 2006; Medina-Kauwe ら、2005)。これらのペプチドの各々は、細胞膜を透過するかまたは核を含む細胞内コンパートメントを標的とする能力を有しているが、別の分子と共有結合した場合、または別の分子に対する融合タンパク質として発現された場合、これらの活性は変化する。さらに、これらのペプチドの各々の異なるバリエーションの経験的試験は時間を消費し、大きな労力を必要とする。従って、合理的設計および経験的試験がこの問題に対する既存の解決策であるが、このアプローチはその制限を有する。

【0 0 1 6】

本明細書に記載される発明は、改善された細胞透過、細胞内輸送、および／または細胞

10

20

30

40

50

成分標的化を獲得したタンパク質変異体を単離するための選択圧を使用することによって、細胞透過／細胞内輸送タンパク質／ペプチドの合理的設計および経験的試験に必要とされる時間および労力の問題を回避する。このプロセスから誘導されるタンパク質変異体は、人工進化／選択圧により獲得した改善された特徴のために、現在使用されている親タンパク質または既存の遺伝子／薬物送達タンパク質よりも特有の利点を有する。最後に、以下に記載されるプロセスによって単離された特定のタンパク質は、それらの改善された膜溶解および輸送特徴のために、既存の細胞透過ペプチドより利点を提供する。したがって、それらは遺伝子および薬物送達を増加させるために使用され得、それによりナノメディシンに使用される粒子の治療効果を向上させる。

【0017】

本発明は、細胞小器官を標的とする薬物送達分子を生成する方法を提供する。その方法は、(a) ペントンベース遺伝子をコードするポリヌクレオチドを得、ポリヌクレオチドの変異体を生成する工程と、(b) 変異ポリヌクレオチドをファージベクター内でクローニングし、ファージベクターを含むファージライブラリーを生成する工程と、(c) 細胞をファージライブラリーで形質転換する工程と、(d) 形質転換した細胞を分画し、形質転換した細胞から細胞小器官を収集する工程と、(e) 収集した細胞小器官からファージを増幅させる工程と、(f) 収集した細胞小器官から増幅させたファージで細胞を形質転換する工程と、(g) 工程(d)、(e)、(f) および (g) を反復する工程と、(h) 各ラウンドから収集した細胞小器官からファージを滴定する工程と、(i) 最も高い力価を有するファージを選択し、ファージから変異ポリヌクレオチドの配列を得る工程と、(j) 前記配列によってコードされるポリペプチドを生成する工程と、を含み、ポリペプチドは細胞小器官を標的化する薬物送達分子である。

【0018】

いくつかの実施形態において、細胞小器官は、ミトコンドリア、ゴルジ装置、小胞体、核、リボソーム、細胞膜および細胞質ゾルからなる群から選択される。細胞は哺乳動物または非哺乳動物細胞であってもよい。任意のランダム変異誘発法または標的変異誘発法を使用して変異体が生成されてもよい。変異体を生成するために使用され得る方法の例には、限定されないが、PCRベースの方法、化学変異誘発、紫外線誘導性変異誘発またはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数が含まれる。ペントンベース遺伝子の変異は、挿入、欠失、置換またはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数であってもよい。

【0019】

本発明の一実施形態において、薬物送達分子は、標的ドメイン、エンドソーム溶解性リガンドドメインおよび正電荷を持つドメインを含む。

【0020】

本発明はまた、変異ペントンベース遺伝子によってコードされるポリペプチドを含む、治療剤を細胞小器官に送達するための担体を提供する。ペントンベース遺伝子の変異は、(a) ペントンベース遺伝子をコードするポリヌクレオチドを得、ポリヌクレオチドの変異体を生成する工程と、(b) 変異ポリヌクレオチドをファージベクター内でクローニングし、ファージベクターを含むファージライブラリーを生成する工程と、(c) 細胞をファージライブラリーで形質転換する工程と、(d) 形質転換した細胞を分画し、形質転換した細胞から細胞小器官を収集する工程と、(e) 収集した細胞小器官からファージを増幅させる工程と、(f) 収集した細胞小器官から増幅させたファージで細胞を形質転換する工程と、(g) 工程(d)、(e)、(f) および (g) を反復する工程と、(h) 各ラウンドから収集した細胞小器官からファージを滴定する工程と、(i) 最も高い力価を有するファージを選択し、ファージから変異ポリヌクレオチドの配列を得る工程と、(j) 配列によってコードされるポリペプチドを生成する工程と、を含み、ポリペプチドは細胞小器官を標的化する薬物送達分子である、方法によって単離され得る。担体は、ポリリシンモチーフおよび標的ドメイン、例えば、ヘレグリンの標的ドメインをさらに含む。

【0021】

本発明はさらに、上記の担体および治療薬を含む治療剤を提供する。治療薬は、例えば、疾患の作用を治療、阻害、予防、軽減し、疾患の重症度を減少させ、疾患の発症の可能性を減少させ、疾患の進行を遅延し、および／または疾患を治癒する任意の薬物であってもよい。治療剤が標的とする疾患は、限定されないが、癌腫、肉腫、リンパ腫、白血病、胚細胞腫瘍、芽細胞腫、種々の免疫細胞で発現される抗原、および種々の血液疾患に関連する細胞で発現される抗原、自己免疫疾患、および／または炎症性疾患を含む。治療剤は化学療法剤であってもよい。

【0022】

本発明はまた、増殖活性を有さない担体を生成する方法を提供する。その方法は、(a) ヘレグリン (Her) の受容体結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを得、前記ポリヌクレオチドの変異を生成する工程と、(b) 変異 Her ポリヌクレオチドをファージベクター内でクローニングし、前記ファージベクターを含むファージライブラリーを生成する工程と、(c) 有糸分裂阻害剤 (例えば、タキソール) の存在下で MDA-MB-435 細胞をファージライブラリーで形質転換する工程と、(d) 形質転換した細胞を分画し、MDA-MB-435 細胞の膜分画を抽出する工程と、(e) 膜分画から膜ファージを収集する工程と、(f) 有糸分裂阻害剤の存在下で膜ファージを MDA-MB-435 細胞内で形質転換する工程と、(g) 工程 (d)、(e) および (f) を反復する工程と、(h) 各ラウンドにおいて MDA-MB-435 細胞の増殖をモニタし、最も低い MDA-MB-435 細胞増殖を有する膜ファージを選択する工程と、(i) 選択した膜ファージにおいて Her ポリヌクレオチド変異の配列を得る工程と、(j) Her 配列およびペントンベース遺伝子によってコードされるポリペプチドを生成する工程とを含み、前記ポリペプチドは増殖活性を有さない担体である。Her 遺伝子における変異は、挿入、欠失、置換またはそれらの組み合わせのいずれか 1 つまたは複数であってもよい。

【0023】

本発明はさらに、治療剤を核に送達するための担体であって、変異 Her 配列によってコードされるポリペプチドを含み、変異 Her は上記の方法に従って得られる、担体を提供する。担体はさらに、ペントンベースタンパク質およびポリリシンモチーフをコードするポリペプチドを含む。ペントンベースタンパク質は変異タンパク質であってもよい。

【実施例】

【0024】

実施例 1

輸送向上変異体の単離

以前に、インビボおよびインビトロで種々の治療分子を腫瘍細胞に標的化し、送達するために、組換えアデノウイルスペントンベースタンパク質が開発された (Agadjanian ら、2012; Agadjanian ら、2009; Agadjanian ら、2006; Medina-Kauwe ら、2001a; Medina-Kauwe ら、2001b; Rentsendorj ら、2008)。現在、ペントンベースの組換えタンパク質 (治療剤を HER2+ 腫瘍細胞に標的化するために使用される HerPBK10 の「PB」ドメインを含む同じもの; (Agadjanian ら、2012; Agadjanian ら、2009; Agadjanian ら、2006; Medina-Kauwe ら、2001b; Rentsendorj ら、2008) は、細胞結合後に複数の細胞侵入経路を介して進み、そのうちの全てではないが、いくつかは膜透過および細胞質ゾル内への侵入をサポートする (Rentsendorj ら、2006)。この機能を改善し、治療剤の細胞標的内への送達および透過を向上させるために、エンドソーム脱出により核内への侵入が可能となるので、指向進化アプローチが、読み出し情報として核内蓄積を使用することによって向上した細胞透過活性を有するペントンベースバリエーションを単離するために使用された (Rentsendorj ら、2006)。

【0025】

手順：この 2 工程プロセスは以下を含む：1. ランダム変異導入による変異体ライブラリーの作製、および 2. スクリーニングプロセスに応じて改良された機能を有するバリア

ントを単離するための選択圧の導入。ここで、細胞質ゾルおよび／または核内に生存侵入するファージの単離は選択圧として機能し、向上した細胞透過活性を有するバリエーションを生じると予想される（図1に要約される）。したがって、本発明者らは、ランダムに変異導入したペントンベース遺伝子を有し、K. T7ファージベクター内でクローニングした変異体のライブラリーを生成した。以前に確立された指向進化研究（Cherryら、1999；Shafikhaniら、1997；Wanら、1998；YouおよびArnold、1996）に基づいて、本発明者らは、遺伝子につき1～4アミノ酸変化（または2～7ヌクレオチド変化）の変異頻度を目的とした。特別なエラープロンポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法（GeneMorph II Random Mutagenesis Kit；Stratagene、La Jolla、CA、USA）を使用して生成された生成物に基づいて、本発明者らは、ペントンベース塩基遺伝子につき約8ヌクレオチド/kbまたは13.6ヌクレオチドの推定変異頻度を達成した（図2）。本発明者らは、この生成物をT7-選択ファージベクター内に挿入し、 5×10^{10} pfu/mLの増幅したライブラリー力価を生成するために組換えファージをパッケージ化した。

【0026】

ライブラリーはHeLa細胞（PBタンパク質の結合および取り込みのためのインテグリン受容体を発現する）でパニングした。ファージを、取り込みではなく、受容体結合を促進するために4℃にて1時間、細胞でインキュベートし、次いで細胞を洗浄し、内在化を促進するために37℃にて2時間インキュベートした。取り込み後、細胞質および核分画を単離するために、収集した細胞を分画した。各分画から増幅したファージを次いで反復バイオパニングに供し、対応する連続分画を細胞収集物から抽出した（すなわち、ラウンド1から単離した核ファージを増幅させ、細胞に戻し、続いて核ファージを再び得るために核分画の単離を反復した）。2回または3回のラウンドのバイオパニング後、各々の反復分画から単離したファージを、野生型ペントンベースを示すファージと比較して変異誘発ライブラリーからの核／細胞質ゾルファージの相対的濃縮を求めるために滴定した。

【0027】

結果：変異導入していない親ファージ、T7-PBは、1未満の核／細胞質ファージ力価を生じ、2時間までに核に到達するファージの比率は細胞質に残っているファージの比率未満であったことを示す（図3）。対照的に、2ラウンドのバイオパニングおよび核ファージ（3-3a）の単離後、T7-PBと比較して有意な増加で、細胞質保持と比較して、より高い核内蓄積へのシフトを観察した（ $P=0.05$ ）（図3）。さらに3ラウンドの細胞質分画パニングから単離したファージ（1-1-1）は、高い有意性ではないが（ $P=0.07$ ）、T7-PBと比較して核パーティションの増加を示した（図3）。

【0028】

3ラウンドのバイオパニングならびに細胞質および核変異体の単離後、本発明者らは、各々の濃縮集団からランダムに選択したクローンをシーケンスし、細胞質および核分画の両方から単離したクローンの大部分が、カルボキシー[C-]末端切断タンパク質をコードしたことを見出した（図4）。野生型ペントンベース（wt PB）線形配列の中央付近に位置する287LDVおよび340RGDインテグリン結合モチーフは、ほとんどの切断クローンにおいて保持されなかった。切断変異体の1つは、LDVを含有するが、RGDモチーフを含有しないのに対して、残りの切断型はLDVおよびRGDモチーフの両方を欠損する。バイオパニングから単離した完全長クローンはLDVおよびRGDモチーフの両方を保持するが、また、潜在的な機能を変化させるアミノ酸変化を導入するいくつかの点変異も含有する（図4）。これらの中で、細胞質分画クローン111CにおけるLeu60Trp置換；ならびに核分画クローン333FにおけるLys375Glu、Val449Met、およびPro469Serアミノ酸変化がある。向上した細胞質および／または核透過を与える各々の単離されたバリエーションの能力を試験するために、各々の細胞内輸送を、免疫蛍光および共焦点顕微鏡法によって親タンパク質と比較し、細胞成分分画法によって確認する。具体的には、完全長変異体（111Cおよび333F）および変異体331Jはインテグリン結合モチーフを保持するので、これらのバリエーションをw

t PBと比較して試験する。なぜなら、それらはインテグリン結合および取り込みにより細胞に侵入すると予測されるからである。その一方で、残りの切断型バリエーションは受容体結合モチーフを欠損するので、それらは、PBドメインを置換するためにHerPBK10内に挿入され、ヒト上皮成長因子受容体(HER)結合および取り込みにより細胞に侵入する親HerPBK10と比較して試験される。

【0029】

実施例2

鈍いシグナル伝達を有する受容体結合およびエンドサイトーシス変異体の単離

原理：腫瘍標的細胞透過タンパク質、HerPBK10は、HerPBK10の「Her」ドメインと本明細書に指定された、ヘレグリンの受容体結合ドメインを含めることにより、特異的にヒト上皮成長因子受容体(HER)に向けられる(Medina-Kauweら、2001b)。しかしながら、ヘレグリン受容体のライゲーションは、受容体ヘテロダイマー比、リガンドサブタイプ、細胞種類、および特定の細胞内分子の存在を含むいくつかの要因に応じて、腫瘍細胞増殖、分化、一部の場、アポトーシスを生じ得るシグナル伝達を誘導できる(Aguilarら、1999; Lewisら、1996; Weinsteinら、1998)。腫瘍進行などの有害事象を誘導する可能性は、有糸分裂阻害剤によって導入される選択圧が、増殖シグナルを欠く受容体結合およびエンドサイトーシス変異体を選択できるかどうかを検査することにつながる。本発明者らは、Herバリエーションを示すファージライブラリーを生成することによってこのアプローチを試験し、静止細胞から内在化したファージを単離し、非増殖ヒト乳癌細胞で再びパニングすることによって増殖シグナルを欠くHer種を内在化するためのライブラリーをスクリーニングすることを提案した。

【0030】

手順：コード配列にわたって分布している異なる変異体を含むHer配列のライブラリーは、エラープローンPCRおよび付着伸長によって生成され、鋳型配列の最初のプライミング後の変性および簡単なアニーリング/伸長の反復サイクルを必要とする(Zhaoら、1998)。得られたライブラリーは、T7選択バクテリオファージ(全タンパク質を示すために開発される)内に転移するための適切なベクターアーム内に挿入され、組換えファージは製造業者の指示書(Novagen、Gibbstown、NJ、USA)に従って生成した。進化したAAVカプシドのバイオパニングに基づいて、10×12ファージの初期力価が、タキソールなどの有糸分裂阻害剤を含む培地に維持されるMDA-MB-435細胞に加えられ、約30~45分後(結合および内在化に必要とされる時間; Medina-Kauweら、2000)、細胞をトリブシン/EDTAにより収集し(内在化していないファージを除去するため)、粗ウイルス(Qproteome Plasma Membrane Protein Kit、Qiagen Inc.、Valencia、CA、USA)のベシクル分画を単離するために膜抽出し、次いでそれはCsClバンド形成により単離できる。3~4ラウンドの選択(すなわち、単離したウイルスを新鮮な細胞に添加し、膜抽出を反復すること)を実施し、単離したウイルスを以下の方法で特徴付ける。最初に、濃縮したウイルスを受容する新鮮な細胞は固定され、単離したファージが内在化したままであることを確認するために抗ファージ抗体(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)を使用して免疫蛍光のために処理される。並行して処理した別々の細胞を、代謝アッセイによって偽および未処理の細胞と比較して増殖率について評価する。第2に、単離したファージからのHer配列を切除し、組換えタンパク質産生のための細菌発現ベクター内に挿入し(Medina-Kauweら、2001a)、次いで変異体Herを、親Herならびに偽および未処理の細胞と比較して、上記のMDA-MB-435ヒト乳癌細胞において内在化および増殖活性について試験した。変異体クローンを、変異領域を識別するためにシークエンスし、親「Her」を置換しているHerPBK10発現カセット内に戻して挿入する。

【0031】

上記の種々の方法および技術は、適用を実施するための多くの手段を提供する。もちろ

ん、記載される全ての目的または利点は、本明細書に記載される任意の特定の実施形態によって必ずしも達成されなくてもよいことは理解される。したがって、例えば、当業者は、方法が、本明細書に教示または示唆される他の目的または利点を必ずしも達成しなくても、本明細書に教示される1つの利点またはいくつかの利点を達成または最適化するように実施されてもよいことを認識する。種々の代替手段が本明細書に述べられている。いくつかの好ましい実施形態は、特に、1つ、別、またはいくつかの特徴を含むが、他の実施形態は、特に、1つ、別、またはいくつかの特徴を含まなくてもよく、さらに他の実施形態は、1つ、別、またはいくつかの有益な特徴を含むことによって特定の特徴を軽減してもよいことは理解される。

【0032】

さらに、当業者は、異なる実施形態から種々の特徴の適用性を認識する。同様に、上記の種々の要素、特徴および工程ならびに各々のこのような要素、特徴または工程についての他の公知の等価物が、本明細書に記載される原理に従って方法を実施するために、当業者により種々の組み合わせにおいて利用されてもよい。種々の要素、特徴および工程の中で、いくつかは、特に、異なる実施形態に含まれ、他は、特に、異なる実施形態で排除される。

【0033】

本出願は特定の実施形態および実施例に関して記載しているが、本出願の実施形態は、具体的に開示された実施形態を超えて、他の代替の実施形態ならびに／またはそれらの使用および修飾および等価物にも及ぶことは当業者により理解される。

【0034】

いくつかの実施形態において、「一つの(a)」および「一つの(an)」および「その(the)」という用語ならびに本出願の特定の実施形態を記載する文脈(特に以下の請求項の特定の文脈)で使用される同様の参照は、単数および複数の両方を含むと解釈され得る。本明細書における値の範囲の列挙は単に、この範囲内の各々の別の値に対する個々の参照を簡潔にした方法として役立つことを意図する。本明細書に他に示されない限り、各々の個々の値は、本明細書に個々に列挙されているかのように明細書に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書に他に示されない限り、または別様で文脈に明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施され得る。任意および全ての例の使用、または本明細書の特定の実施形態に対して提供される例示的な用語(例えば、「など」)は、本出願を単により良く例示することを意図し、別様で請求される本出願の範囲の制限を課しているわけではない。本明細書における用語は、本出願の実施に必須である請求されていない要素を示すものと解釈されるべきではない。

【0035】

本出願を実施するために本発明者に知られている最適な様式を含む、本出願の好ましい実施形態が本明細書に記載される。これらの好ましい実施形態に対する変更は、前述の説明を読んで当業者に明らかであろう。当業者は、必要に応じてこのような変更を利用でき、本出願は具体的に本明細書に記されているもの以外で実施されてもよいことを意図する。したがって、本出願の多くの実施形態は、適用可能な法律によって許可される添付の特許請求の範囲に記載される主題の全ての修飾および等価物を含む。さらに、全ての可能な変形における上記の要素の任意の組み合わせが、本明細書に他に示されない限り、または別様で文脈と矛盾しない限り、本出願に含まれる。

【0036】

本文書と矛盾したまたは紛争中の等価物、等価物のいずれかに関連する訴訟ファイルの履歴、あるいは本文書に現在または後で関連する請求項の広範な範囲に関して制限する影響を有し得る等価物のいずれかを除いて、本明細書に参照される、全ての特許、特許出願、特許公報、および論文、書籍、仕様書、刊行物、文書、事柄などの他の資料が、全ての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。例として、組み込まれた資料のいずれかに関連する用語の説明、定義および／または使用の間に不一致または矛盾が存在する場合、本文書における、説明、定義および／または使用に関連するものが有

10

20

30

40

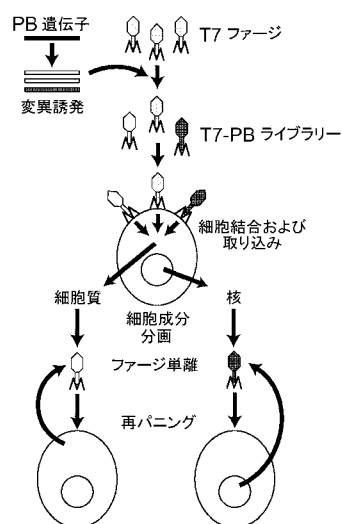
50

効である。

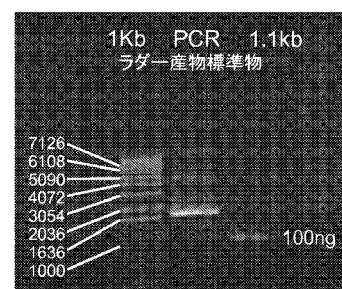
【0037】

結びに、本明細書に開示される本出願の実施形態は、本出願の実施形態の原理の例示であると理解される。利用され得る他の修飾は本出願の範囲内であってもよい。したがって、例として、限定されないが、本出願の実施形態の代替の構造が本明細書の教示に従って利用されてもよい。したがって、本出願の実施形態は正確に示され、記載されているものに限定されない。

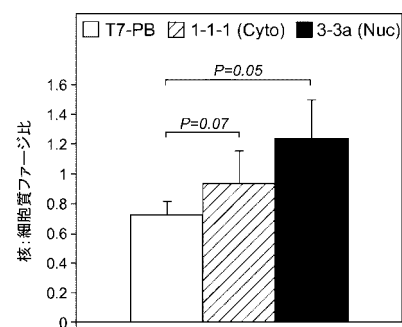
【図 1】



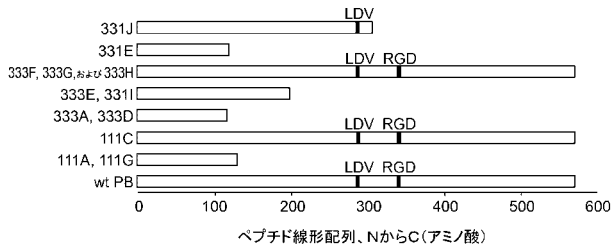
【図 2】



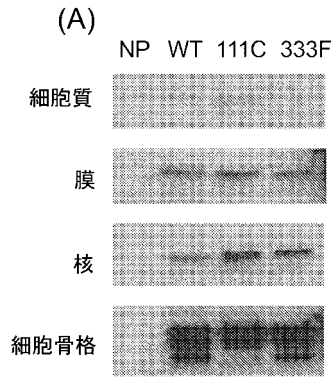
【図 3】



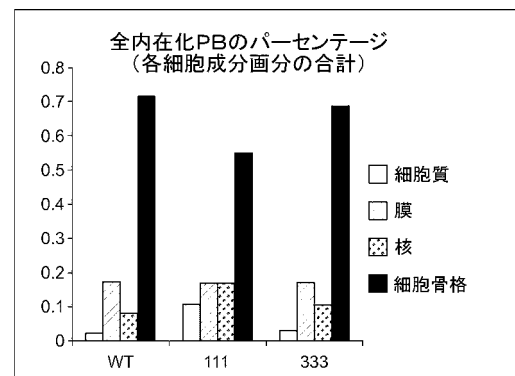
【図 4】



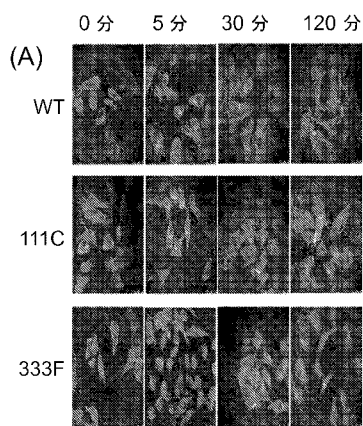
【図 5】



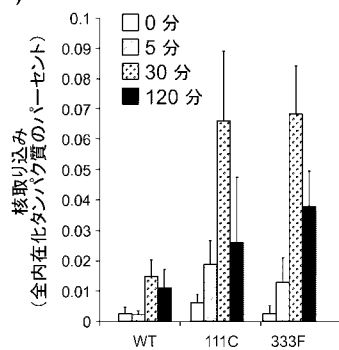
(B)



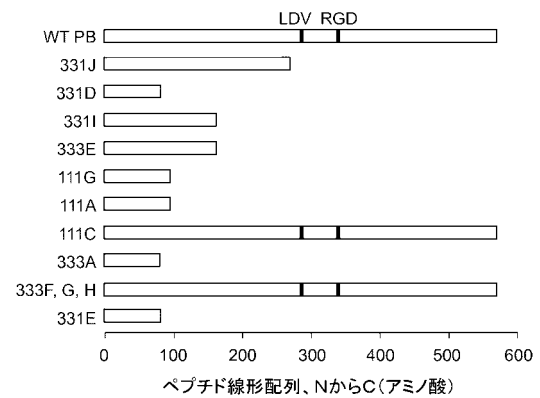
【図 6】



(B)



【図 7】



【図 8】

核酸配列

TTTGTCTTACTTTAAGAAGGATATACAT
ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG
ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT
AAG GAT CGA TGG **ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA**
GGT CCT CCT CCC TCC TAC GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG
GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG
TTT GTG CCT CCG GCG TAC CTG GCG CCT ACC GGG GGG AGA AAC AGC
ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC ACC CGT GTG
TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAC TAC
CAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT TAA AAC AAT
GAC TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC
GAC CGG TCG CAC TGG GGC GGT GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC
AAC ATG CCA AAT GTG AAC GAG TTC ATG TTT ACC AAT AAG TTT AAG
GCG CGG GTG ATG GTG TCG CGC TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG
GAG CTG AAA TAC GAG TGG GTG GAG TTC ACG CTG CCC GAG GGC AAC
TAC TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC AAC GCG ATC GTG
GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GSG GTT CTG GAA AGC
GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG GGG TTT
GAN CAC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA
GCC NNC CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGC GGG GTG GAC
TTC ACC CAC AGC CCG CTG AGC AAC TTG TTG GGC ATC CGC AAG CCG
CAA CCC TTN CAG GAN GGC TTT AGG ATC NNC NAC GAT GAT CTG GAG
GGT GGT ANC ATT CCC GCA CTG (配列番号 1).

太字およびイタリックの塩基は野生型PBからの変異を示す

変異

塩基 397 (wt 289) C>T, グルタミン>終止コドン
塩基 471 (wt 363) C>T, グリシン>グリシン

予測アミノ酸配列

MRRAAMYEEGPPPSYESVVSAAAPVAAALGSPFDAPLDPFPVPPRYLRPTGGRNSIRYS
ELAPLFDTTTRVYLVNDKSTDVASLNNQNDHSNFLTTVI (配列番号 2)

アミノ酸の数:96

分子量:10531.8

理論pI:5.15

【図 10】

核酸配列

TTTACTTTAAGAAGGAGANATACAT
ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TCC TAC
GAG AGT GCG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCG GCG TTT GTG CCT CCG GCG TAC CTG CCG CCT ACC
GGG GGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CGT GTG TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAC
TAC CAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT TAA AAC AAT GAC
TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC GAC CCG TCG
CAC TGG GGC GGC GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC AAC ATG CCA AAT GTG
AAC GAG TTC ATG TTT ACC AAT AAG TTT AAG GCG CCG GTG ATG GTG TCG CGC
TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG GAG CTG AAA TAC GAG TGG GTG GAG TTC
ACG CTG CCC GAG GGC AAC **TAA** TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC
AAC GCG ATC GTG GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG
GAA AGC GAC ATC GCG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG GGG TTT
GAC **CA**C GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA GCC TTC
CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGC GGG GTG GAC TTC ACC CAC AGC
CGC CTG ANC AAC TTG NTG GGC ATC CGC AAG CCG CAA CCN TTN CAG GAG GGC
TTT AGG ATC ANC TAC GAT GAT CTG GAG GGT G (配列番号 5)

太字およびイタリックの塩基は野生型からの変異を示す

変異

塩基 161 (wt 53) T>C, バリン>アラニン
塩基 398 (wt 290) C>T, グルタミン>終止
塩基 633 (wt 525) C>A, チロシン>終止
塩基 780 (wt 672) C>A, プロリン>ヒスチジン

アミノ酸配列

MRRAAMYEEGPPPSYESVVSAAAPVAAALGSPFDAPLDPFPVPPRYLRPTGGRNSIRYSELAPL
FDTRVYLVNDKSTDVASLNNQNDHSNFLTTVI (配列番号 6)

アミノ酸の数:96

分子量:10503.7

理論pI:5.15

【図 9】

核酸配列

TTTAAGAAGGAGANATACAT
ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG
ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT
AAG GAT CGA TGG GGA TCC ACG CGG GCG GCG GCG ATG TAT GAG GAA
GGT CCT CCT CCC TCC TAC GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG
GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG
TTT GTG CCT CCG CCG TAC CTG CCG CCT ACC GGG GGG AGA AAC AGC
ATC CGT TAC TCT GAG **TG**S GCA CCC CTA TTC GAC ACC ACC CGT GTG
TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAG TAC
CAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT CAA AAC AAT
GAC TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC
GAC CCG TCG CAC TGG GGC GGC GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC
AAC ATG CCA AAT GTG AAC GAG TTC ATG TTT ACC AAT AAG TTT AAG
GCG GCG GTG ATG GTG TCG CGC TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG
GAG CTG AAA TAC GAG TGG GTG GAG TTC ACG CTG CCC GAG GGC AAC
TAC TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC AAC GCG ATC GTG
GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG GAA AGC
GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG GGG TTT
GAC CCC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA
GCC TTC CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGC GGG GTG GAC
TTC ACC CAC AGC CGC CTG ANC AAC TTG TTG GGC ATC CGC AAG CCG
CAN CCC TTC CAG GAG GNN TTT AGG ATC ANC NAC GAT GAT CNG GAG
GGN NGN ANN ATN CCC GCA CTG (配列番号 3)

太字およびイタリックの塩基は野生型PBからの変異を示す

変異

塩基 110 (wt 2) T>C, メチオニン>トレオニン
塩基 179 (wt 71) T>G, ロイシン>トリプトファン
塩基 1044 C>T, セリン>セリン
塩基 1518 G>A, バリン>バリン

予測アミノ酸配列

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSTRRAAMYEEGPPPSYES
VVSAAAPVAAALGSPFDAPLDPFPVPPRYLRPTGGRNSIRYSEWAPLFDTRVYLVND
KSTDVASLNNQNDHSNFLTTVIQNNNDYSPGEASTQTINLDDRSHWGGDLKTLHTNM
PNVNEFMFTNKFKAQVMVSRLLPTKDNQVELKYEWVEFTLPNGNYSETMTIDLMMN
AIVEHYLKVGRQNGVLESIDIGVKFDRNFRGLFDPVTGLVMPGVYTNFAFHPDIIILLP
GCGVDFTHSRLXNLLGIRKXPFQEXFRIXDDXEXXXXPAL (配列番号 4)

【図 11】

核酸配列

TTAAGAAGGAGANATACAT
ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TAC TAC
GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG GCG CTG GGT TCT ACC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG TTT GTG CCT CCG CCG TAC CTG CCG CCT ACC
GGG GGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CGT GTG TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAC
TAC TAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT CAA AAC AAT GAC
TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC GAC CCG TCG
CAC TGG GGC GGC GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC AAC ATG CCA AAT GTG
AAC GAG TTC ATG **TAT** ACC AAT AAG TTT AAG GCG CCG GTG ATG GTG TCG CGC
TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG GAG CTG AAA TAC GAG TGG GTG **GG**S TTC
ACG CTG CCC GAG GGC AAC TAC TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC
AAC GCG ATC GTG GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG
GAA AGC GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG NGG TTT
GAC CCC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA GCC TTC
CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGN GGG GTG GNC TTC ACC CAC AGC
CGC CNG AGC AAC TTG TTG GGC ATC CGC AAG CNG CAA CCN TTN CAG GAG GGC
TTT ANG ATC ACC TAC NAT GAT CTG GAG GGN (配列番号 7)

変異

塩基 149 (wt 41) C>A, セリン>チロニン
塩基 199 (wt 91) C>A, プロリン>トレオニン
塩基 361 (wt 253) C>T, グルタミン>終止
塩基 524 (wt 416) T>A, フェニルアラニン>チロニン
塩基 608 (wt 500) A>G, グルタミン酸>グリシン

予測アミノ酸配列

MRRAAMYEEGPPPYYESVVSAAAPVAAALGSTFDAPLDPFPVPPRYLRPTGGRNSIRYSELAPLFDTR
VYLVNDKSTDVASLNN (配列番号 8)

アミノ酸の数:84

分子量:9241.4

理論pI:5.17

【図 1 2】

核酸配列

TTTAAGAAGGAGANATACAT

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG
ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT
AAG GAT CGA TGG GCA GGC ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA
GGT CCT CCT CCC TCC TAC GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG
GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG
TTT GTG CCT CCG CGG TAC CTG CGG CCT ACC GGG GGG AGA AAC AGC
ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC ACC CGT GTG
TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAC TAC
CAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT CAA AAC AAT
GAC TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC
GAC CGG TCG CAC TGG GGC GGC GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC
AAC ATG CCA AAT GTG AAC GAG TTC ATG TTT ACC AAT AAG TTT AAG
GCG CGG GTG ATG GTG TCG CGC TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG
GAG CTG AAA TAC GAG TAG GTG GAG TTC ACG CTG CCC GAG GGC AAC
TAC TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC AAC GCG ATC GTG
GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG GAA AGC
GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG GGG TTT
GAC CCC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA
GCC TTC CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGC GGG GTG GNC
TTC ACC CAC AGC GCG CTG AGC AAC TTG TTG GGC ATC CNC AAG CNG
CAA CCC NTT CCA GGA GGG CTT TAG GAT CAC CTA CGA TGA TCT GGA
GGG (配列番号 9)

変異

塩基 602 (wt 494) G > A, グルタミン > 終止

予測アミノ酸配列

MRRAAMYEEGPPPSYESVVS AAPVAAALGSPFDAPLDPFPVPPRYLRPTGGRNSIRYS
ELAPLFDITTRVYLVDNKSTDVASLNYQNDHSNFLT TVIQNNDYSPGEASTQTINLDD
RSHWGGDLKTLHTNMPNVNEFMFTNKFKARVMVSR LPTKDNQVELKYE (配列番号
10)

アミノ酸の数: 164

分子量: 18400. 5

理論pI: 5. 58

【図 1 4】

核酸配列

TTTAAGAAGGAGANATACAT

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
GCA GGC ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TCC TAC
GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG TTT GTG CCT CCG CGG TAC CTG CCG CCT ACC
GGG CGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CGT GCG TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GTG TGG CAT CCC TGA ACT
ACC AGA ACG ACC ACA GCA ACT TTC TGA CCA CGG TCA TTC AAA ACA GTG ACT
ACA GCC CGG GGG AGG CAA GCA CAC AGA CCA TCA ATC TTG ACG ACC GGT CGC
ACT GGG GCG GCG ACC TGA AAA CCA TCC TGC ATA CCA ACA TGC CAA ATG TGA
ACG AGT TCA TGT TTA CCA ATA AGT TTA AGG CGC GGG TGA TGG TGT CGC GCT
TGC CTA CTA AGG ACA ATC AGG TGG AGC TGA AAT ACG AGT GGG TGG AGT TCA
CGC TGC CCG AGG GCA ACT ACT CCG AGA CCA TGA CCA TAG ACC TTA TGA ACA
ACG CGA TCG TGG AGC ACT ACT TGA AAG TGG GCA GAC AGA ACG GGG TTC TGG
AAT GCG ACA TCG GGG TAA AGT TTG ACA CCC GCA ACT TCA GAC TGG GGT TTG
ATC CCG TCA CTG GTC TTG TCA TGN CTG GGG TAT ATA CAA ACG AAG CCT TCC
ATC CAG ACA TCA TTT TGC TGC CAG GAT GCG GGG TGG ACT TCA CCC ACA GCC
GCC TGA GCA ACT TGN TGG GCA TCC GCA TGC GGC AAN CNT TNC NGG AGG GCT
TTA GGA TCA CCN ACG ATG ATC TGN AGG (配列番号 13)

変異

塩基340(wt232)における欠失はフレームシフトを引き起こす。
Wtアミノ酸配列は:...Thr-Asp-Val-Ala-Ser-Leu...である。
変異配列は:...Thr-Val-Trp-His-Pro-Stop...である。

予測アミノ酸配列

5'3'フレーム1
GSMrRRRAAMrMeYEEGPPPSYESVVS AAPVAAALGSPFDAPLDPFPV
PPRYLRPTGGRNSIRYS ELAPLFDITTRVYLVDNKSTVWHP 終止 (配列
番号 14)

81アミノ酸をコードする

【図 1 3】

核酸配列

TTTAAGAAGGAGANATACAT

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
GCA GGC ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TCC TAC
GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG TTT GTG CCT CCG CGA TAC CTG CCG CCT ACC
GGG GGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CCT GTC TAC CTG CTG GAC TAC AAC TCA ACC CAT GTC GCA TCC CTG AAC
TAC CAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT CAA AAC AAT GAC
TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC GAC CGG TCG
CAG TGG GGC GGC GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC AAC ATG CCA AAT GTG
AAC GAG TTC ATG TTT ACC AAT AAG TTT AAG GCG CGG GTG ATG GTG TCG CGC
TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG GAG CTG AAA TAC GAG TGG GTG GAG TTC
ACG ATG CCC GAG GGC AAC TAC TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC
AAC GCG ATC GTG GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG
GAA AGC GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG GGG TTT
GAC CCC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG CTA TAT ACA AAC GAA GCC NTT
CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGC GGG GTG NAC TTC ACC CAC AGC
CGC CTG AGC AAC TTG TTG GGC ATC CGC AAG CGG CAA CCC NTN CCA GGA GGG
CTT TAG GNT CAC CTA CGA TGA TCT GGA GGG NTG GNA NCA TTC CCG CNC TGT
CTG CCA GGA TGC GGG GTG GAC TTC ACC CAC AGC CGC CTG AGC AAC TTG TTG
GGC ATC CGC AAG CGG CAA CCC TT CCA GGA GGG CTT TAG GAT CAC CTA CCG
GAT TGTG (配列番号 11)

変異

塩基 285 (wt 178) A > G, Arg > Arg
塩基 328 (wt 220) A > T, Asn > Tyr
塩基 616 (wt 508) C > A, Leu > Met

予測アミノ酸配列

MRRAAMYEEGPPPSYESVVS AAPVAAALGSPFDAPLDPFPVPPRYLRPTGGRNSIRYS
ELAPLFDITTRVYLVDYKSTDVASLNYQNDHSNFLT TVIQNNDYSPGEASTQTINLDD
RSHWGGDLK TLHTNMPNVNEFMFTNKFKARVMVSR LPTKDNQVELKYE
NAIVEHYLVGRQNGVLESDIGVKFDTRNFR LFGDPVTGLVMPGVYTNEAXHPDILLPGCG
VXFTHSRLSNLGI RKRQXPXGGL (配列番号 12)

アミノ酸の数: 271

分子量: 30339. 9

理論pI: 5. 70

【図 1 5】

核酸配列

TTTACTTTAAGAAGGAGANATACAT

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT NAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
GCA GGC ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TCC TAC
GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG TTT GTG CCT CCG CGG TAC CTG CCG CCT ACC
GGG GGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CGT GTG TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GTG TGG CAT CCC TGA ACT
ACC AGA ACG ACC ACA GCA ACT TTC TGA CCA CGG TCA TTC AAA ACA GTG ACT
ACA GCC CGG GGG AGG CAA GCA CAC AGA CCA TCA ATC TTG ACG ACC GGT CGC
ACT GGG GCG GCG ACC TGA AAA CCA TCC TGC ATA CCA ACA TGC CAA ATG TGA
ACG AGT TCA TGT TTA CCA ATA AGT TTA AGG CGC GGG TGA TGG TGT CGC GCT
TGC CTA CTA AGG ACA ATC AGG TGG AGC TGA AAT ACG AGT GGG TGG AGT TCA
CGC TGC CCG AGG GCA ACT ACT CCG AGA CCA TGA CCA TAG ACC TTA TGA ACA
ACG CGA TCG TGG AGC ACT ACT TGA AAG TGG GCA GAC AGA ACG GGG TTC TGG
AAT GCG ACA TCG GGG TAA AGT TTG ACA CCC GCA ACT TCA GAC TGG GGT TTG
ATC CCG TCA CTG GTC TTG TCA TGC CTG GGG TAT ATA CAA ACG AAG CCT TCC
ATC CAG ACA TCA TTT TGC TGC CAG GAT GCG GGG TGG ACT TCA CCC ACA GCC
GCC TGA GCA ACT TGT TGG GCA TCC GCA TGC GGC AAN CNT TNC NGG AGG GCT
TTA GGA TCA CCN ACG ATG ATC TGN AGG (配列番号 15)

塩基340(wt232)における欠失はフレームシフトを引き起こす。

予測アミノ酸配列

MRRAAMYEEGPPPSYESVVS AAPVAAALGSPFDAPLDPFPVPPRYLRPTG
GRNSIRYS ELAPLFDITTRVYLVDNKSTVWHP (配列番号 16)

アミノ酸の数: 81

分子量: 8918. 1

理論pI: 6. 54

【図 17】

核酸配列

ATTTTGT TACTTTAAGAAGGAGATACAT

CGA	CGG	GGT	TCT	CAT	CAT	CAT	CAT	GGT	ATG	GCT	AGC	ATG	ACT	GGT
AGA	CAG	CAA	ATG	GGT	GGC	GAT	CTG	TAC	GAC	GAT	AAG	GAT	CGA	TGG
CAT	GGT	ATG	GCG	GCG	GCG	GAT	TAT	GAG	GAA	GGT	CCT	CCT	TCC	TAC
GAG	AGT	GTG	GGC	AGC	GCG	ACA	GTG	GCG	GCG	CTG	GCT	TCT	CCT	TTC
GAT	GCT	CCT	CTG	GAC	CCG	CCT	TTT	GTG	CCT	CCG	GCG	TAC	CTG	ACC
GGG	GCG	AGA	AGC	AGC	CTG	TCT	CTG	GAT	TGA	CCC	CTA	TCT	GAC	ACC
ACC	CCT	GTG	TAC	CTG	GTG	GAC	AAC	TCA	ACG	GAT	GGC	TCC	CTG	AAC
TAC	CAG	AAC	GAC	AGC	AAC	TTT	CTG	ACC	ACG	CTC	ATT	CAA	AAT	GAC
TAC	ACC	CGC	GCG	GAG	GCA	AGC	ACA	CAG	ATC	ATC	CTT	GAC	GAC	CTG
CAC	TGG	GGC	GGC	GAT	CTG	AAA	ACC	ATC	CTG	CAT	ACC	AAC	CTG	GGC
AAC	GAG	TTT	ATG	TTT	ACC	AAT	AAG	TTT	AAG	GCG	GCG	GTG	ATG	GTG
TGT	CTT	ACT	AAG	GAC	AAT	CTG	GAG	CTG	AAA	TAC	GAG	TAG	GTG	ATC
ACG	CTG	CCC	GAG	GGC	AAC	TAC	CTG	GAG	ACC	ATC	ACC	ATA	GAC	TTT
AAC	GGC	ATC	GTG	GAG	CAC	TAC	TTT	AAA	GTC	GGC	AGA	CAC	GGG	GTG
GAA	AGC	GAC	ATC	GGG	ATA	AAG	TTG	ACC	ACC	GAC	TTT	ACA	GTG	TTT
CAC	CCC	CTC	ACT	GGT	CTT	GTG	CTA	CCT	GCG	TAT	ACA	AAC	GAA	CGC
GAT	CCA	GAC	ATC	ATT	CTG	CTG	ACA	GCA	TGT	GGG	GTG	GAC	TTC	ACC
CGC	CTG	AGC	AAC	TTG	TTG	GGC	ATC	CNC	AAG	CGG	CAA	CCC	TTN	CAG

番号 17)

(配列)

変異

塩基 602 (wt 494) G>Aグルタミン>終止. 331Iと同じ変異

予測アミノ酸配列

MRRAAMYEEGPPSPSYESVVSAPVAAALGSPFDAPLDPPFVPPRYLRPTGGRNSIRYSELAPL
FDTRRVYLVDNKSTDVASLNYQNDHSNFLTTVIQNDNDYSPGEASTQTINLDDRSHWGGDLK
TILHTNMPNVNEFMFTNKFKARVMVSRLPKDNQVELKYE (配列番号 18)

アミノ酸の数:164

分子量:18400.5

理論pl:5. 58

核酸配列

Bradley Reinfeldによる5' および3' データからの一緒に切断された配列

AGA	CGG	GGT	TCT	CAI	CTT	CAT	CAT	CGT	ATG	GCT	AGA	ATG	ACT	GSG
GGA	CAG	CAA	ATG	GGT	GGC	GAU	CTG	TAC	AAC	GAT	GAG	AAG	AAU	CGA
CGG	ATG	CGG	CGC	CGC	GGC	ATG	TAT	GAC	GAA	GCG	CGT	CCT	CGC	TCC
GAG	AGT	GTC	GTC	AGC	GGC	CAG	CGA	GTC	GCG	GCG	GCG	TGT	GGT	TCT
GAT	GCT	CGC	CTG	CAG	CCA	CGC	TTC	TGT	CGT	CGC	GCG	TCT	GCG	CGT
GGG	GGG	AGA	AAC	AGC	ATC	CGT	TAC	TCT	GAG	TTC	GCA	CCC	TAT	TCT
ACC	CGT	GTC	TAC	CTG	GTC	GAC	AAC	AGC	TAC	GAT	GTG	GCA	TCT	AGC
TCT	CAG	AAC	CAG	AGC	AAC	TTT	CTG	ACC	AGC	GTC	ATG	CAC	AAC	ATG
CGG	ATG	CGG	CGC	CGC	GGC	ATG	CGG	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC
CAG	TGG	GCG	GGC	GAG	CTG	AAU	AAU	CTG	ATC	CTG	AAC	GAA	CAA	ATG
AAC	GAG	TTC	ATG	TCT	ACC	AAT	AAG	TTT	AAC	GCG	GCG	CTG	ATG	TCC
TTC	CGT	ACT	AGC	AAC	BAT	CAG	GTC	GAG	CTG	AAA	TAC	GAG	TGG	TGC
AGC	CTG	CGC	GAG	GGC	AAC	TAC	TCC	GAG	ACC	ATG	ACT	ATA	GAG	CTT
CGG	AGC	ATC	GTC	GAG	CAG	TAC	TTC	AAA	GTC	GGC	AGA	CAG	AAC	GGG
CAA	AGC	GAC	TCT	GGG	GTA	TAU	TCT	GAC	ACC	GCG	TTC	AGA	CTG	GGG
CGC	CGC	GTC	ACT	GCT	CTT	GTC	ATG	CT	GGG	GTA	TAT	ACA	AAC	GAA
CAT	CAC	GAC	ATT	ATT	TTC	CAC	GGA	TTC	GGG	GTC	GAC	TTC	ATC	CGC
CGC	GTC	AGC	AAC	TTG	TTC	GGC	ATC	CGC	AAC	GCG	CAA	CCC	TCT	CAG
TCT	AGG	ATC	ACC	TAC	GAU	GAT	CTG	GAG	GST	GTT	AGT	CCC	GCA	CTG
GGT	GTC	CAG	GCN	TAC	CAG	CGC	AGC	TTC	AAA	GAT	GAG	CGC	GAG	CGC
GCT	GGC	GCA	GGC	GGC	AAC	AGC	ATC	GGC	AGC	GCC	GCC	GAA	GAG	AAC
AAC	CGC	GCA	CCC	CGC	CAT	CAG	CGC	GTC	GAG	GAG	ATG	AAC	GAT	ATC
ATT	CGC	GGC	AGC	ACC	TTT	GCC	ACA	CGG	GCT	GAG	GAG	AAC	CGG	GCT
GAA	CAC	CGC	CGC	GAA	GCT	CCC	CGC	CCC	CGC	CGC	CGC	CGC	GAG	GAG
CTT	CAG	GAG	AAA	CGC	GTC	ATC	AAA	CGC	CTG	ACA	GAG	AGC	AGC	AGC
AGT	TAT	CAG	ATA	AGA	AGT	GAG	AGC	ATC	ACC	AGC	TAC	CGC	AGC	TGG
CGG	ATG	CGG	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC
CGT	CTT	TGC	ACT	CGT	CAC	ATC	CGC	TGC	CGC	CGC	CGC	CGC	TAC	TGC
TTC	CAC	CAG	ATG	ATG	CAC	CGC	CCC	AGC	CTC	CGC	CCC	AGC	CGC	CAG
AGC	AAC	TTT	CGC	GTT	GGC	CGC	CGC	TTC	TCC	GTC	CGC	CAC	TCC	AGC
TTC	TAC	AAC	GAC	GAC	CGC	GTC	TAC	CGC	CAA	CTC	ATC	CGC	GTC	AGC
TTC	ACC	CAC	GTC	TTC	AAT	CGC	TTT	CCC	GAG	AAC	CAT	ATT	TTC	GGC
CCA	CGC	CCC	ACC	ATC	ACC	AGC	CTC	ATC	GAA	AAA	GTC	CTT	GCT	CTC
CAC	GGG	AGC	GTA	CGG	CTC	CAG	AGC	AGC	ATC	GGA	GGA	GTG	CAC	GGA
ATT	ATC	GAC	CGC	AGA	CGC	AGC	ACC	TGC	CGC	ATC	TAT	AAC	GGC	CTC
ATA	GTC	TGC	CGC	CGC	GTC	CTA	TGC	AGC	TAC	TTT	TGA	GAA	TTC	GAA
CGC	TCC	CGC	TCC	CAA	CAC	AGC	CGG	AAA	CAC	AGC	NGA	CTN	GGC	TCC

C (配列番号 19)

予測アミノ酸配列

[illegible]

アミノ酸の数:571

分子量: 63320.2

理論pI: 5.25

理論pI: 5.25

【手續補正書】

【提出日】 令和1年8月16日(2019.8.16)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ペントンベース（PB）ポリペプチドを含む担体であって、

(i) 前記 P B ポリペプチドが、L e u 6 0 T r p 変異を含む完全長 P B ポリペプチドであるか、又は

(i i) 前記 P B ポリペプチドが、 L y s 3 7 5 G l u 変異、 V a l 4 4 9 M e t 変異及び P r o 4 6 9 S e r 変異を含む完全長 P B ポリペプチドであるか、又は

(i i i) 前記 P B ポリペプチドが、P B ポリペプチドの C 末端を欠損する切断型であり、かつ R G D モチーフを欠損する C 末端切断型であり、

前記アミノ酸の番号付けは配列番号 20 における番号に基づき、

前記 P B ポリペプチドは、配列番号 4 (1 1 1 C) 又は配列番号 2 0 (3 3 3 F) で表されるペントンベースではない、担体。

【請求項2】

前記 P B ポリペプチドが L e u 6 0 T r p 変異を含む完全長 P B ポリペプチドである、
請求項 1 に記載の担体。

【請求項 3】

前記PBポリペプチドがLys375Glu変異、Val449Met変異及びPro469Ser変異を含む完全長PBポリペプチドである、請求項1に記載の担体。

【請求項 4】

前記 P B ポリペプチドが P B ポリペプチドの C 末端を欠損する切断型であり、かつ R G D モチーフを欠損する C 末端切断型である、請求項 1 に記載の担体。

【請求項 5】

前記 P B ポリペプチドが、配列番号 2 で表される P B ポリペプチド (1 1 1 A)、配列番号 8 で表される P B ポリペプチド (3 3 1 E)、配列番号 1 2 で表される P B ポリペプチド (3 3 1 J)、配列番号 1 8 で表される P B ポリペプチド (3 3 3 E) 又は配列番号 1 4 で表される P B ポリペプチド (3 3 3 A) を含む、請求項 4 に記載の担体。

【請求項 6】

前記担体が正電荷を持つドメインを含む、請求項 1 に記載の担体。

【請求項 7】

前記担体がポリリシンモチーフを含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の担体。

【請求項 8】

前記担体が細胞標的ドメインをさらに含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の担体。

。

【請求項 9】

前記細胞標的ドメインが哺乳動物細胞を標的とする、請求項 8 に記載の担体。

【請求項 10】

前記細胞標的ドメインが疾患細胞を標的とする、請求項 8 又は 9 に記載の担体。

【請求項 11】

前記細胞標的ドメインが癌細胞を標的とする、請求項 8 ～ 10 のいずれか一項に記載の担体。

【請求項 12】

前記細胞標的ドメインがヘレグリンまたはその変異体である、請求項 8 ～ 11 のいずれか一項に記載の担体。

【請求項 13】

治療薬又は遺伝子と複合体化している、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の担体を含む、治療剤。

【請求項 14】

前記治療薬が、化学療法剤である、請求項 13 に記載の治療剤。

【請求項 15】

細胞へ治療剤を送達するための、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の担体。

【請求項 16】

細胞への治療剤送達に用いられる、請求項 13 又は 14 に記載の治療剤。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	

(72)発明者 メディナーカウウェ ラリ ケー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 3 2 6 ポーター ランチ スチュワートン ドライブ
1 1 8 1 6

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC27 EE41 EE59 FF02
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 CA41 EA28 FA74

【外国語明細書】
2020002138000001.pdf