(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-537178
(P2024-537178A)
(43)公表日　令和6年10月10日(2024.10.10)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00	ZNA	4B065
C07K	*14/47*	*(2006.01)*	C07K	14/47		4C084
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K	16/18		4C086
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	4C087
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	C12N	15/12		4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全58頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-520883(P2024-520883)
(86)(22)出願日　令和4年10月7日(2022.10.7)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月28日(2024.5.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/077779
(87)国際公開番号　WO2023/060248
(87)国際公開日　令和5年4月13日(2023.4.13)
(31)優先権主張番号　63/253,759
(32)優先日　令和3年10月8日(2021.10.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　516127178
ソラ・バイオサイエンシズ・エルエルシー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１７６０，ネイティック，ストラスモア・ロード ２７，ラボナンバー ３
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾 淳一
(74)代理人　100196243
弁理士　運 敬太
(72)発明者　菱谷 彰徳
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ｐ５３媒介性癌の処置のための組成物および方法

(57)【要約】
ｐ５３機能を特異的に回復させるために、細胞の生得的なシャペロン機構、具体的にはＨｓｐ７０媒介性システムを動員する新規なクラスの融合タンパク質が開示される。
【選択図】図２

Construct No.	Construct Name	SEQ ID NO:	J Domain	P53-Binding Domain	Diagram
1	JB1-Domain only	79	DnaJB1	N/A	JB1
2	JB1-CDB3	80	DnaJB1	CDB3	JB1 CDB3
3	JB1-p53BP	81	DnaJB1	p53BP	JB1 p53BP
4	JB1-scFv(ME1)	82	DnaJB1	scFv1 (ME1)	JB1 ME1
5	JB1-scFv(11D3)	83	DnaJB1	scFv2 (11D3)	JB1 11D3
6	JB1-scFv(Fv421)	84	DnaJB1	scFv3 (421)	JB1 421
7	JB1-scFv(Pab421)	85	DnaJB1	scFv4 (Pab421)	JB1 Pab421
8	JB6-CDB3	86	DnaJB6	CDB3	JB6 CDB3
9	JB6-p53BP	87	DnaJB6	p53BP	JB6 p53BP
10	JB6-scFv(ME1)	88	DnaJB6	scFv1 (ME1)	JB6 ME1
11	JB6-scFv(scFv11D3)	89	DnaJB6	scFv2 (11D3)	JB6 11D3
12	JB6-scFv(scFv421)	90	DnaJB6	scFv3 (421)	JB6 421
13	JB6-scFv(Pab421)	91	DnaJB6	scFv4 (Pab421)	JB6 Pab421
16	JB1-G_4S-scFv(ME1)	100	DnaJB1	scFv1 (ME1)	JB1 ME1
17	JB1-G_4S-scFv(scFv11D3)	101	DnaJB1	scFv2 (11D3)	JB1 11D3
18	JB1-G_4S-scFv(scFv421)	102	DnaJB1	scFv3 (421)	JB1 421
19	JB1-G_4S-scFv(Pab421)	103	DnaJB1	scFv4 (Pab421)	JB1 Pab421
20	JB6-G_4S-scFv(ME1)	104	DnaJB6	scFv1 (ME1)	JB6 ME1
21	JB6-G_4S-scFv(scFv11D3)	105	DnaJB6	scFv2 (11D3)	JB6 11D3
22	JB6-G_4S-scFv(scFv421)	106	DnaJB6	scFv3 (421)	JB6 421
23	JB6-G_4S-scFv(Pab421)	107	DnaJB6	scFv4 (Pab421)	JB6 Pab421

FIG. 2

【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｊタンパク質のＪドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む単離された融合タンパク質。
【請求項２】
Ｊタンパク質のＪドメインが真核生物起源である、請求項１に記載の融合タンパク質。
【請求項３】
Ｊタンパク質のＪドメインがヒト起源である、請求項１または請求項２に記載の融合タンパク質。
【請求項４】
Ｊタンパク質のＪドメインが細胞質に局在する、請求項１～３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項５】
Ｊタンパク質のＪドメインが、配列番号１～５０からなる群から選択される、請求項１～４のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項６】
Ｊドメインが、配列番号１、５、６、１０、１６、２４、２５、３１、および４９からなる群から選択される配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項７】
Ｊドメインが配列番号５の配列を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項８】
Ｊドメインが配列番号１０の配列を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項９】
Ｊドメインが配列番号１６の配列を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項１０】
Ｊドメインが配列番号２５の配列を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項１１】
Ｊドメインが配列番号３１の配列を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項１２】
ｐ５３結合性ドメインが、例えばＥＬＩＳＡアッセイを用いて測定された場合、１μＭ以下、例えば、３００ｎＭ以下、１００ｎＭ以下、３０ｎＭ以下、１０ｎＭ以下の、ｐ５３に対するK_Dを有する、請求項１～１１のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項１３】
ｐ５３結合性ドメインが、配列番号５１～５６からなる群から選択される配列を含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項１４】
ｐ５３結合性ドメインが、配列番号５１～５３の配列を含む、請求項１～１３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項１５】
ｐ５３結合性ドメインが配列番号５１の配列を含む、請求項１～１３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項１６】
ｐ５３結合性ドメインが配列番号５２の配列を含む、請求項１～１３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項１７】
複数のｐ５３結合性ドメインを含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項１８】
２つのｐ５３結合性ドメインからなる、請求項１～１７のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項１９】
３つのｐ５３結合性ドメインからなる、請求項１～１８のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２０】
以下の構築物：
ａ．　ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｂ．　ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｃ．　ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｄ．　Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ、
ｅ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ、
ｆ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ、
ｇ．　Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｈ．　Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｉ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－ＴＴ、
ｊ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｋ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｌ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｍ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｎ．　ＤｎａＪ－Ｘ－ＤｎａＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｏ．　Ｔ－Ｘ－ＤｎａＪ－Ｘ－ＤｎａＪ、
ｐ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤｎａＪ－Ｘ－ＤｎａＪ
のうちの１つを含み、
ここで、
Ｔはｐ５３結合性ドメインであり、
ＤＮＡＪはＪタンパク質のＪドメインであり、
Ｘは任意選択のリンカーである、請求項１～１９のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２１】
配列番号５のＪドメイン配列および配列番号５２のｐ５３結合性ドメインを含む、請求項１～２０のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２２】
配列番号５のＪドメイン配列、および配列番号５２のｐ５３結合性ドメインの２個のコピーを含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２３】
配列番号８０～９１、１００～１０７からなる群から選択される配列を含む、請求項１～２２のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２４】
配列番号８０からなる群から選択される配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２５】
配列番号８１の配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２６】
配列番号８２の配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２７】

配列番号８３の配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２８】
配列番号８４の配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２９】
配列番号８５の配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３０】
配列番号８６の配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３１】
配列番号８７の配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３２】
配列番号８８の配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３３】
配列番号８９の配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３４】
配列番号９０の配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３５】
配列番号９１の配列を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３６】
標的化試薬をさらに含む、請求項１～３５のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３７】
エピトープをさらに含む、請求項１～３６のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３８】
エピトープが、配列番号６８～７４からなる群から選択されるポリペプチドである、請求項３７に記載の融合タンパク質。
【請求項３９】
細胞透過剤をさらに含む、請求項１～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項４０】
細胞透過剤が、配列番号７５～７８からなる群から選択される、請求項３９に記載の融合タンパク質。
【請求項４１】
シグナル配列をさらに含む、請求項１～４０のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項４２】
シグナル配列が、配列番号９４～９６からなる群から選択されるペプチド配列を含む、請求項４１に記載の融合タンパク質。
【請求項４３】
細胞においてｐ５３機能を回復させる能力がある、請求項１～４２のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項４４】
ｐ５３媒介性新生物を低下させる能力がある、請求項１～４３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項４５】
請求項１～４４のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸配列。
【請求項４６】
前記核酸がＤＮＡである、請求項４５に記載の核酸配列。
【請求項４７】
前記核酸がＲＮＡである、請求項４５に記載の核酸配列。
【請求項４８】
前記核酸が少なくとも１個の修飾核酸を含む、請求項４０～４２のいずれか一項に記載の核酸配列。
【請求項４９】

プロモーター領域、５’ＵＴＲ、ポリ（Ａ）シグナルなどの３’ＵＴＲをさらに含む、請求項４５～４８のいずれか一項に記載の核酸配列。
【請求項５０】
プロモーター領域が、ＣＭＶエンハンサー配列、ＣＭＶプロモーター、ＣＢＡプロモーター、ＵＢＣプロモーター、ＧＵＳＢプロモーター、ＮＳＥプロモーター、シナプシンプロモーター、ＭｅＣＰ２プロモーター、およびＧＦＡＰプロモーターからなる群から選択される配列を含む、請求項４９に記載の核酸配列。
【請求項５１】
請求項４５～５０のいずれか一項に記載の核酸配列を含むベクター。
【請求項５２】
アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス（ワクシニアまたは粘液腫）、パラミクソウイルス（麻疹、ＲＳＶ、またはニューキャッスル病ウイルス）、バキュロウイルス、レオウイルス、アルファウイルス、およびフラビウイルスからなる群から選択される、請求項５１に記載のベクター。
【請求項５３】
ＡＡＶである、請求項５１または請求項５２に記載のベクター。
【請求項５４】
カプシドおよび請求項５１～５３のいずれか一項に記載のベクターを含むウイルス粒子。
【請求項５５】
カプシドが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、偽型ＡＡＶ、アカゲザル由来ＡＡＶ、ＡＡＶｒｈ８、ＡＡＶｒｈ１０、およびＡＡＶ－ＤＪａｎ　ＡＡＶカプシド変異体、ＡＡＶハイブリッドセロタイプ、臓器向性ＡＡＶ、心臓向性ＡＡＶ、および心臓向性ＡＡＶＭ４１変異体からなる群から選択される、請求項５４に記載のウイルス粒子。
【請求項５６】
カプシドが、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、およびＡＡＶｒｈ１０からなる群から選択される、請求項５４または請求項５５に記載のウイルス粒子。
【請求項５７】
カプシドがＡＡＶ２である、請求項５４～５６のいずれか一項に記載のウイルス粒子。
【請求項５８】
カプシドがＡＡＶ５である、請求項５４～５６のいずれか一項に記載のウイルス粒子。
【請求項５９】
カプシドがＡＡＶ８である、請求項５４～５６のいずれか一項に記載のウイルス粒子。
【請求項６０】
カプシドがＡＡＶ９である、請求項５４～５６のいずれか一項に記載のウイルス粒子。
【請求項６１】
カプシドがＡＡＶ　ｒｈ１０である、請求項５４～５６のいずれか一項に記載のウイルス粒子。
【請求項６２】
請求項１～３９のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項１～３９のいずれか一項に記載の融合タンパク質を発現する細胞、請求項４０～４５のいずれか一項に記載の核酸、請求項４６～４８のいずれか一項に記載のベクター、請求項４９～５６のいずれか一項に記載のウイルス粒子からなる群から選択される作用物質、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む薬学的組成物。
【請求項６３】
細胞においてｐ５３タンパク質の毒性を低下させる方法であって、請求項１～３４のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項１～３４のいずれか一項に記載の融合タンパ

ク質を発現する細胞、請求項４５～５０のいずれか一項に記載の核酸、請求項５１～５３のいずれか一項に記載のベクター、請求項５４～６１のいずれか一項に記載のウイルス粒子、および請求項６２に記載の薬学的組成物からなる群から選択される１つまたは複数の作用物質の有効量と前記細胞を接触させるステップを含む、方法。

【請求項６４】

細胞が対象内にある、請求項６３に記載の方法。

【請求項６５】

対象がヒトである、請求項６４に記載の方法。

【請求項６６】

対象が癌を有すると同定されている、請求項６４または６５に記載の方法。

【請求項６７】

癌が、以下の部位の、原発性であると明言または推定される悪性新生物：頭頸部癌を含む、唇、口腔、および咽頭の悪性新生物；食道、結腸、肝臓、または膵臓癌を含む消化器官の悪性新生物；肺癌を含む、呼吸および胸腔内器官の悪性新生物；骨肉腫を含む、骨および関節軟骨の悪性新生物；メラノーマおよび皮膚の他の悪性新生物；肉腫を含む、中皮および軟部組織の悪性新生物；乳房の悪性新生物；卵巣癌を含む、女性生殖器の悪性新生物；前立腺癌を含む、男性生殖器の悪性新生物；膀胱癌を含む、尿路の悪性新生物；神経膠芽腫を含む、眼、脳、および中枢神経系の他の部分の悪性新生物；甲状腺癌を含む、甲状腺および他の内分泌腺の悪性新生物；明確に定義されていない、続発性の、および不特定の部位の悪性新生物；多発性骨髄腫、リンパ性白血病、または骨髄性白血病を含む、リンパ系、造血性、および関連組織の悪性新生物；骨髄異形成症候群を含む、不確定または不明な挙動の新生物からなる群から選択される、請求項６６に記載の方法。

【請求項６８】

対照細胞と比較した場合、細胞において異常ｐ５３タンパク質の量の低下がある、請求項６３～６７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６９】

癌の処置、防止、またはその進行の遅延を必要とする対象において癌を処置する、防止する、またはその進行を遅延させる方法であって、請求項１～３４のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項１～３４のいずれか一項に記載の融合タンパク質を発現する細胞、請求項４５～５０のいずれか一項に記載の核酸、請求項５１～５３のいずれか一項に記載のベクター、請求項５４～６１のいずれか一項に記載のウイルス粒子、および請求項６２に記載の薬学的組成物からなる群から選択される１つまたは複数の作用物質の有効量を投与するステップを含む、方法。

【請求項７０】

ｐ５３疾患が、以下の部位の、原発性であると明言または推定される悪性新生物：頭頸部癌を含む、唇、口腔、および咽頭の悪性新生物；食道、結腸、肝臓、または膵臓癌を含む消化器官の悪性新生物；肺癌を含む、呼吸および胸腔内器官の悪性新生物；骨肉腫を含む、骨および関節軟骨の悪性新生物；メラノーマおよび皮膚の他の悪性新生物；肉腫を含む、中皮および軟部組織の悪性新生物；乳房の悪性新生物；卵巣癌を含む、女性生殖器の悪性新生物；前立腺癌を含む、男性生殖器の悪性新生物；膀胱癌を含む、尿路の悪性新生物；神経膠芽腫を含む、眼、脳、および中枢神経系の他の部分の悪性新生物；甲状腺癌を含む、甲状腺および他の内分泌腺の悪性新生物；明確に定義されていない、続発性の、および不特定の部位の悪性新生物；多発性骨髄腫、リンパ性白血病、または骨髄性白血病を含む、リンパ系、造血性、および関連組織の悪性新生物；骨髄異形成症候群を含む、不確定または不明な挙動の新生物からなる群から選択される、請求項６９に記載の方法。

【請求項７１】

対象におけるｐ５３疾患の防止またはその進行の遅延に有用な医薬の調製における、請求項１～３４のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項１～３４のいずれか一項に記載の融合タンパク質を発現する細胞、請求項４５～５０のいずれか一項に記載の核酸、請求項５１～５３のいずれか一項に記載のベクター、請求項５４～６１のいずれか一項に

記載のウイルス粒子、および請求項６２に記載の薬学的組成物の１つまたは複数の使用。
【請求項７２】
ｐ５３疾患が癌である、請求項７１に記載の使用。
【請求項７３】
癌が、以下の部位の、原発性であると明言または推定される悪性新生物：頭頸部癌を含む、唇、口腔、および咽頭の悪性新生物；食道、結腸、肝臓、または膵臓癌を含む消化器官の悪性新生物；肺癌を含む、呼吸および胸腔内器官の悪性新生物；骨肉腫を含む、骨および関節軟骨の悪性新生物；メラノーマおよび皮膚の他の悪性新生物；肉腫を含む、中皮および軟部組織の悪性新生物；乳房の悪性新生物；卵巣癌を含む、女性生殖器の悪性新生物；前立腺癌を含む、男性生殖器の悪性新生物；膀胱癌を含む、尿路の悪性新生物；神経膠芽腫を含む、眼、脳、および中枢神経系の他の部分の悪性新生物；甲状腺癌を含む、甲状腺および他の内分泌腺の悪性新生物；明確に定義されていない、続発性の、および不特定の部位の悪性新生物；多発性骨髄腫、リンパ性白血病、または骨髄性白血病を含む、リンパ系、造血性、および関連組織の悪性新生物；骨髄異形成症候群を含む、不確定または不明な挙動の新生物からなる群から選択される、請求項７２に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
この出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられている、２０２１年１０月８日に出願された米国仮出願第６３／２５３，７５９号の優先権を主張する。
【０００２】
配列表
本出願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂを経由して、電子的に読み取り可能なＸＭＬフォーマットで本明細書と共に提出され、かつ全体として参照により本明細書に組み入れられている、配列表を含有する。２０２２年１０月７日に電子的に出願されかつ「２６９５４８－５１７３６５＿Ｓｅｑｕｅｎｃｅ－ｌｉｓｔｉｎｇ．ＸＭＬ」というファイル名の電子的配列表ファイルは、１４２，９５３バイトのファイルサイズを有する。
【０００３】
本開示は、ｐ５３媒介性癌の処置のためのシャペロン融合タンパク質の使用に関する。
【背景技術】
【０００４】
癌は、世界中で死亡の主な原因の一つである。男性および女性のおよそ３８．４％が生涯のある時点で癌と診断される（２０１３～２０１５データ：ＮＩＨ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈに基づいて）。癌の苦痛を減少させることは、生活の全体的な質の向上について社会全体へ多大な影響を及ぼすであろう。
【０００５】
伝統的な癌処置には、手術、放射線照射、薬物療法、および他の治療が挙げられる。これらのアプローチは、癌を治癒し、癌を縮小させ、または癌の進行を止める可能性がある。しかしながら、いったん癌浸潤または転移が観察されたならば、薬物療法での全身性処置が、症状を寛解させかつ生活の質を向上させるための防御の第一線となるであろう。癌を処置するために過去２０～３０年間の間に多くの薬物が開発されてきたが、それらのほとんどは満足できるものではなかった。免疫療法を用いる最近の開発は、非常に興奮させるものであるが、たいていの研究はまだ完了していない。癌処置に関連した困難の主な理由は、癌（腫瘍）細胞が正常細胞に由来し、それらは多くの特性を共有し、そのことが、薬物が腫瘍細胞のみを特異的に認識することを難しくしているということである。それでもなお、数え切れないほどの科学者による数十年にわたる努力によって、癌細胞における共通した多くの独特な特徴が同定されている。例えば、ヒト癌の５０％より多くは、ｐ５３遺伝子に変異を有することが知られている。ｐ５３は、遺伝毒性ストレスシグナルに応答して、細胞周期停止、老化、およびアポトーシスを誘導する転写因子として主要な機能

を発揮する（Ｖｏｇｅｌｓｔｅｉｎ，Ｂ．ら、（２０００）Ｎａｔｕｒｅ　４０８、３０７～３１０；Ｐｅｔｉｔｊｅａｎ，Ａ．ら、（２００７）Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　２６、２１５７～２１６５）。癌におけるｐ５３変異の高頻度ということから、ｐ５３変異体に介入することにより、癌治療における有望なストラテジーを開発することができると当然、思う。しかし、その望みはまだ実現されていない。

【０００６】

細胞内で発現した全てのタンパク質は、適切に機能するためにそれらの意図された構造へ正しくフォールドされる必要がある。増え続ける疾患および障害が、タンパク質の不適切なフォールディングならびに／またはタンパク質およびリポタンパク質、加えて感染性タンパク質性物質の不適切な沈着および凝集と関連づけられることが示されている。コンフォメーション病またはプロテオパチーとしても知られている、ミスフォールディングにより引き起こされる疾患の例には、アルツハイマー病（ＡＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、および前頭側頭葉型認知症（ＦＴＬＤ）が挙げられる。変異タンパク質は、細胞において凝集し、典型的な細胞毒性細胞封入体をもたらす。

【０００７】

野生型ｐ５３タンパク質は、３９３アミノ酸を含有し、いくつかの構造ドメインおよび機能ドメインで構成される。Ｎ末端領域は、トランス活性化ドメインおよびプロリンリッチな領域からなる。四量体形成ドメインおよび塩基性ドメインはＣ末端に位置する（Ｒｏｍｅｒ，Ｌ．ら、（２００６）Ａｎｇｅｗ　Ｃｈｅｍ　Ｉｎｔ　Ｅｄ　Ｅｎｇｌ　４５、６４４０～６４６０；Ｊｏｅｒｇｅｒ，Ａ．Ｃ．およびＦｅｒｓｈｔ，Ａ．Ｒ．（２００８）Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　７７、５５７～５８２；Ｊｏｅｒｇｅｒ，Ａ．Ｃ．およびＦｅｒｓｈｔ，Ａ．Ｒ．（２０１０）Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂ　Ｐｅｒｓｐｅｃｔ　Ｂｉｏｌ　２、ａ０００９１９）。癌細胞におけるｐ５３体細胞変異の大部分（約７４％）は、Ｒ１７５、Ｇ２４５、Ｒ２４８、Ｒ２４９、Ｒ２７３、およびＲ２８２などの、ｐ５３タンパク質において１アミノ酸置換をもたらす、「ホットスポット」と呼ばれるＤＮＡ結合ドメインにおけるミスセンス型変異である。これらの変異は、以下の２つのクラスへ分けることができる：１）ＤＮＡ結合残基の喪失を生じるＤＮＡ接触変異（Ｒ２４８、Ｒ２７３、およびＲ２８２）、および２）ｐ５３タンパク質のミスフォールディングをもたらす、ｐ５３において構造変化を引き起こす立体構造的変異（Ｒ１７５、Ｒ２４５、およびＲ２４９）（Ｓｔｒａｎｏ，Ｓ．ら、（２００７）Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　２６、２２１２～２２１９；Ｆｒｅｅｄ－Ｐａｓｔｏｒ，Ｗ．Ａ．およびＰｒｉｖｅｓ，Ｃ．（２０１２）Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ　２６、１２６８～１２８６）。ｐ５３は正常には四量体として機能するため、変異ｐ５３は、残りの野生型ｐ５３対応部分または他のｐ５３ファミリーメンバー、特にｐ６３およびｐ７３の腫瘍抑制機能を、「ドミナントネガティブな」機構を通して抑止し得る（Ｂｒｏｓｈ，Ｒ．およびＲｏｔｔｅｒ，Ｖ．（２００９）Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｃａｎｃｅｒ　９、７０１～７１３；Ｍｕｌｌｅｒ，Ｐ．Ａ．およびＶｏｕｓｄｅｎ，Ｋ．Ｈ．（２０１４）Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｌｌ　２５、３０４～３１７）。したがって、ｐ５３機能の回復または変異ｐ５３活性の抑制が、新規の有効なストラテジーとして大きな可能性があると考えられている。最近になって初めて、変異体発癌性ｐ５３タンパク質を標的化する化合物が出現した（Ｙｕ，Ｘ．、Ｎａｒａｙａｎａｎ，Ｓ．ら（２０１４）Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ　１９、１０５５～１０６８）。Ｒ２７３Ｈ変異で引き起こされた増殖抑制について、変異ｐ５３を特異的に標的化する化合物をスクリーニングすることを目指して、Ｂｙｋｏｖらは、ＰＲＩＭＡ－１（ｐ５３－ｒｅａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｍａｓｓｉｖｅ　ａｐｏｐｔｏｓｉｓ－１、ＡＰＲ－０１７）と名付けられた化合物２，２－ビス（ヒドロキシメチル）－１－アザビシクロ［２，２，２］オクタン－３－オンが、変異ｐ５３におけるチオール基を修飾することによりｐ５３のリフォールディングを促進し、いくつかのｐ５３標的遺伝子を誘導することを発見した（Ｂｙｋｏｖ，Ｖ．Ｊ．ら、（２００２）Ｎａｔ　Ｍｅｄ　８、２８２～２８８；Ｂｙｋｏｖ，Ｖ．Ｊ．ら、（２００２）Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎｅｓｉｓ　２３、２０１１～２０１８）。ＰＲＩＭＡ－１は、変異ｐ５３を有するヒト癌細胞

においてアポトーシスを促進し（Ｂｙｋｏｖ，Ｖ．Ｊ．ら、（２００５）Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ２４、３４８４～３４９１；Ｌａｍｂｅｒｔ，Ｊ．Ｍ．ら、（２００９）Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ １５、３７６～３８８）、血液悪性腫瘍および前立腺癌についての臨床試験第Ｉ相および第ＩＩ相へ前進している初めての化合物の一つになっている。

【０００８】

ｐ５３遺伝子における癌関連ミスセンス変異は、そのタンパク質の自由エネルギーを増加させ、変異型のｐ５３と野生型ｐ５３を分ける立体構造変化をもたらす場合が多い。そのような変異ｐ５３の抑制は、ｐ５３機能を回復させる有望なストラテジーの一つである。このストラテジーに沿って、温度を低下させることまたはグリセロールなどの化学シャペロンによる変異ｐ５３のリフォールディングが正常なｐ５３機能を回復させることが示されている（Ｂｒｏｗｎ，Ｃ．Ｒ．ら、（１９９７）Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ９９、１４３２～１４４４；Ｏｈｎｉｓｈｉ，Ｔ．ら、（１９９９）Ｉｎｔ Ｊ Ｒａｄｉａｔ Ｂｉｏｌ ７５、１０９５～１０９８；Ｏｈｎｉｓｈｉ，Ｔ．、Ｏｈｎｉｓｈｉ，Ｋ．ら、（１９９９）Ｒａｄｉａｔ Ｒｅｓ １５１、４９８～５００）。

【０００９】

熱ショック７０ｋＤａタンパク質（本明細書では「Ｈｓｐ７０ｓ」と呼ぶ）は、様々な種の細胞においてシャペロンタンパク質の遍在性クラスを構成する（Ｔａｖａｒｉａら、（１９９６） Ｃｅｌｌ Ｓｔｒｅｓｓ Ｃｈａｐｅｒｏｎｅｓ １、２３～２８）。Ｈｓｐ７０は、機能するために、Ｊドメインタンパク質およびヌクレオチド交換因子（ＮＥＦ）などのコシャペロンタンパク質と呼ばれるアシスタントタンパク質を必要とする（Ｈａｒｔlら、（２００９）Ｎａｔ Ｓｔｒｕｃｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １６、５７４～５８１）。タンパク質をフォールドするためのＨｓｐ７０シャペロン機構の最新モデルにおいて、Ｈｓｐ７０は、ＡＴＰ結合状態とＡＤＰ結合状態との間を循環し、Ｊドメインタンパク質は、フォールディングまたはリフォールディングを必要とする別のタンパク質（「クライアントタンパク質」と呼ばれる）と結合して、Ｈｓｐ７０のＡＴＰ結合型（Ｈｓｐ７０－ＡＴＰ）と相互作用する（Ｙｏｕｎｇ（２０１０）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ８８、２９１～３００；Ｍａｙｅｒ、（２０１０）Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ ３９、３２１～３３１）。Ｊドメインタンパク質－クライアントタンパク質複合体のＨｓｐ７０－ＡＴＰとの結合は、ＡＴＰ加水分解を刺激し、それは、Ｈｓｐ７０タンパク質において立体構造変化を引き起こし、ヘリックスの蓋を閉じ、それにより、クライアントタンパク質とＨｓｐ７０－ＡＤＰとの間の相互作用を安定化し、加えて、Ｊドメインタンパク質の放出を誘発し、その後、そのＪドメインタンパク質は、別のクライアントタンパク質と自由に結合できる。

【００１０】

したがって、このモデルにより、Ｊドメインタンパク質は、架橋として働き、かつ様々なクライアントタンパク質の捕獲およびそのＨｓｐ７０機構への提出を促進して、適切な立体構造へのフォールディングまたはリフォールディングを促すことにより、Ｈｓｐ７０機構内で重要な部分を果たす（Ｋａｍｐｉｎｇａ ＆ Ｃｒａｉｇ（２０１０）Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １１、５７９～５９２）。Ｊドメインファミリーは、原核生物（ＤｎａＪタンパク質）から真核生物（Ｈｓｐ４０タンパク質ファミリー）にわたる種において広く保存されている。Ｊドメイン（約６０～８０ａａ）は、４つのヘリックス：Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩ、およびＩＶで構成されている。ヘリックスＩＩおよびＩＩＩは、「ＨＰＤモチーフ」を含有する可動性ループを介して接続されており、そのＨＰＤモチーフは、Ｊドメインにわたって高度に保存されており、活性にとって重要な意味をもつと考えられる（Ｔｓａｉ ＆ Ｄｏｕｇｌａｓ、（１９９６）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７１、９３４７～９３５４）。ＨＰＤ配列内の変異は、Ｊドメイン機能を消失させることが見出されている。

【００１１】

プロテオパチーについて上記で提供された背景を考えると、ミスフォールドされたタンパク質のレベルを低下させることが、これらの壊滅的な障害の症状を処置する、防止する

、または別様に改善するための手段として役に立ち得ること、およびタンパク質ミスフォールディングを修復する細胞の生得的な能力の動員が、追求するべき当然の選択であろうことは明らかなように思われる。

【発明の概要】

【００１２】

本発明者らは、変異ｐ５３のレベルを特異的に低下させまたはその機能を回復させるために、細胞の生得的なシャペロン機構、具体的にはＨｓｐ７０媒介性システムを動員する新規なクラスの融合タンパク質を開発している。タンパク質分泌および発現を増強するために、Ｈｓｐ７０と相互作用するコシャペロンである、Ｈｓｐ４０タンパク質（Ｊタンパク質とも呼ばれる）の断片を含む融合タンパク質を用いる本発明者らによる以前の研究においてとは違って、本研究は、変異ｐ５３タンパク質のレベルを低下させ、またはその機能を回復させることを目的として、Ｊドメイン含有融合タンパク質を用いる。この関連において、本発明者らは、機能に必要とされるＪドメインのエレメントが、タンパク質発現および分泌を増強することにおけるＪドメインの使用とは全く異なるという驚くべき発見をし、本融合タンパク質の作用様式について別個の機構を実証した。本明細書に記載された融合タンパク質は、Ｊドメイン、およびｐ５３に対する親和性を有するドメインを含む。融合タンパク質内のｐ５３結合性ドメインの存在は、変異ｐ５３タンパク質の特異的な回復を生じる。

【００１３】

Ｅ１．　したがって、第１の態様において、Ｊタンパク質のＪドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む単離された融合タンパク質が本明細書で開示される。

Ｅ２．　Ｊタンパク質のＪドメインが真核生物起源である、Ｅ１に記載の融合タンパク質。

Ｅ３．　Ｊタンパク質のＪドメインがヒト起源である、Ｅ１～Ｅ２のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ４．　Ｊタンパク質のＪドメインが細胞質に局在する、Ｅ１～Ｅ３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ５．　Ｊタンパク質のＪドメインが、配列番号１～５０からなる群から選択される、Ｅ１～Ｅ４のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ６．　Ｊドメインが、配列番号１、５、６、１０、１６、２４、２５、３１、および４９からなる群から選択される配列を含む、Ｅ１～Ｅ５のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ７．　Ｊドメインが配列番号５の配列を含む、Ｅ１～Ｅ６のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ８．　Ｊドメインが配列番号１０の配列を含む、Ｅ１～Ｅ６のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ９．　Ｊドメインが配列番号１６の配列を含む、Ｅ１～Ｅ６のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ１０．　Ｊドメインが配列番号２５の配列を含む、Ｅ１～Ｅ６のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ１１．　Ｊドメインが配列番号３１の配列を含む、Ｅ１～Ｅ６のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ１２．　ｐ５３結合性ドメインが、例えばＥＬＩＳＡアッセイを用いて測定された場合、１μＭ以下、例えば、３００ｎＭ以下、１００ｎＭ以下、３０ｎＭ以下、１０ｎＭ以下の、ｐ５３に対するK_Dを有する、Ｅ１～Ｅ１１のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ１３．　ｐ５３結合性ドメインが、配列番号５１～５６からなる群から選択される配列を含む、Ｅ１～Ｅ１２のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ１４．　ｐ５３結合性ドメインが、配列番号５１～５３の配列を含む、Ｅ１～Ｅ１３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

Ｅ１５．　ｐ５３結合性ドメインが配列番号５１の配列を含む、Ｅ１～Ｅ１３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ１６．　ｐ５３結合性ドメインが配列番号５２の配列を含む、Ｅ１～Ｅ１３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ１７．　複数のｐ５３結合性ドメインを含む、Ｅ１～Ｅ１６のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ１８．　２つのｐ５３結合性ドメインからなる、Ｅ１～Ｅ１７のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ１９．　３つのｐ５３結合性ドメインからなる、Ｅ１～Ｅ１８のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ２０．　以下の構築物：
ａ．　ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｂ．　ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｃ．　ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｄ．　Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ、
ｅ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ、
ｆ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ、
ｇ．　Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｈ．　Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｉ．　ＴＤＮＡＪ－Ｘ－ＴＴＴＴＴＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｊ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－ＴＴ、
ｋ．　ＴＴＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＴＴＴＴＴＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｌ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｍ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｎ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｏ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｐ．　ＤｎａＪ－Ｘ－ＤｎａＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｑ．　Ｔ－Ｘ－ＤｎａＪ－Ｘ－ＤｎａＪ、
ｒ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤｎａＪ－Ｘ－ＤｎａＪ、および
ｓ．　Ｔ－Ｘ－ＴＤｎａＪ－Ｘ－ＴＤｎａＪ－Ｘ－ＴＴＴＴ
のうちの１つを含み、
ここで、
Ｔはｐ５３結合性ドメインであり、
ＤＮＡＪはＪタンパク質のＪドメインであり、
Ｘは任意選択のリンカーである、Ｅ１～Ｅ１９のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ２１．　配列番号５のＪドメイン配列および配列番号５２のｐ５３結合性ドメイン配列を含む、Ｅ１～Ｅ２０のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ２２．　配列番号５のＪドメイン配列、および配列番号５２のｐ５３結合性ドメイン配列の２個のコピーを含む、Ｅ１～Ｅ２１のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ２３．　配列番号８０～９１、および１００～１０７からなる群から選択される配列を含む、Ｅ１～Ｅ２２のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ２４．　配列番号８０からなる群から選択される配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ２５．　配列番号８１の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ２６．　配列番号８２の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ２７．　配列番号８３の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ２８．　配列番号８４の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タン

パク質。
Ｅ２９．　配列番号８５の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ３０．　配列番号８６の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ３１．　配列番号８７の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ３２．　配列番号８８の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ３３．　配列番号８９の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ３４．　配列番号９０の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ３５．　配列番号９１の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ３６．　配列番号１００の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ３７．　配列番号１０１の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ３８．　配列番号１０２の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ３９．　配列番号１０３の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ４０．　配列番号１０４の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ４１．　配列番号１０５の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ４２．　配列番号１０６の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ４３．　配列番号１０７の配列を含む、Ｅ１～Ｅ２３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ４４．　標的化試薬をさらに含む、Ｅ１～Ｅ４３のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ４５．　エピトープをさらに含む、Ｅ１～Ｅ４４のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ４６．　エピトープが、配列番号６８～７４からなる群から選択されるポリペプチドである、Ｅ４５に記載の融合タンパク質。
Ｅ４７．　細胞透過剤をさらに含む、Ｅ１～Ｅ４６のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ４８．　細胞透過剤が、配列番号７５～７８からなる群から選択される、Ｅ４７に記載の融合タンパク質。
Ｅ４９．　シグナル配列をさらに含む、Ｅ１～Ｅ４８のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ５０．　シグナル配列が、配列番号９４～９６からなる群から選択されるペプチド配列を含む、Ｅ４９に記載の融合タンパク質。
Ｅ５１．　細胞においてｐ５３機能を回復させる能力がある、Ｅ１～Ｅ５０のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ５２．　ｐ５３媒介性新生物を低下させる能力がある、Ｅ１～Ｅ５１のいずれか１つに記載の融合タンパク質。
Ｅ５３．　Ｅ１～Ｅ５２のいずれか１つに記載の融合タンパク質をコードする核酸配列。

Ｅ５４．　前記核酸がＤＮＡである、Ｅ５３に記載の核酸配列。
Ｅ５５．　前記核酸がＲＮＡである、Ｅ５４に記載の核酸配列。
Ｅ５６．　前記核酸が、少なくとも１個の修飾核酸を含む、Ｅ５３～Ｅ５５のいずれか１つに記載の核酸配列。
Ｅ５７．　プロモーター領域、５’ＵＴＲ、ポリ（Ａ）シグナルなどの３’ＵＴＲをさらに含む、Ｅ５３～Ｅ５６のいずれか１つに記載の核酸配列。
Ｅ５８．　プロモーター領域が、ＣＭＶエンハンサー配列、ＣＭＶプロモーター、ＣＢＡプロモーター、ＵＢＣプロモーター、ＧＵＳＢプロモーター、ＮＳＥプロモーター、シナプシンプロモーター、ＭｅＣＰ２プロモーター、およびＧＦＡＰプロモーターからなる群から選択される配列を含む、Ｅ５７に記載の核酸配列。
Ｅ５９．　Ｅ５３～Ｅ５８のいずれか１つに記載の核酸配列を含むベクター。
Ｅ６０．　アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス（ワクシニアまたは粘液腫）、パラミクソウイルス（麻疹、ＲＳＶ、またはニューキャッスル病ウイルス）、バキュロウイルス、レオウイルス、アルファウイルス、およびフラビウイルスからなる群から選択される、Ｅ５９に記載のベクター。
Ｅ６１．　ＡＡＶである、Ｅ５９またはＥ６０に記載のベクター。
Ｅ６２．　カプシドおよびＥ５９～Ｅ６１のいずれか１つに記載のベクターを含む、ウイルス粒子。
Ｅ６３．　カプシドが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、偽型ＡＡＶ、アカゲザル由来ＡＡＶ、ＡＡＶｒｈ８、ＡＡＶｒｈ１０、およびＡＡＶ－ＤＪａｎ　ＡＡＶカプシド変異体、ＡＡＶハイブリッドセロタイプ、臓器向性ＡＡＶ、心臓向性ＡＡＶ、および心臓向性ＡＡＶＭ４１変異体からなる群から選択される、Ｅ６２に記載のウイルス粒子。
Ｅ６４．　カプシドが、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、およびＡＡＶｒｈ１０からなる群から選択される、Ｅ６２またはＥ６３に記載のウイルス粒子。
Ｅ６５．　カプシドがＡＡＶ２である、Ｅ６２～Ｅ６４のいずれか１つに記載のウイルス粒子。
Ｅ６６．　カプシドがＡＡＶ５である、Ｅ６２～Ｅ６４のいずれか１つに記載のウイルス粒子。
Ｅ６７．　カプシドがＡＡＶ８である、Ｅ６２～Ｅ６４のいずれか１つに記載のウイルス粒子。
Ｅ６８．　カプシドがＡＡＶ９である、Ｅ６２～Ｅ６４のいずれか１つに記載のウイルス粒子。
Ｅ６９．　カプシドがＡＡＶｒｈ１０である、Ｅ６２～Ｅ６４のいずれか１つに記載のウイルス粒子。
Ｅ７０．　Ｅ１～Ｅ５２のいずれか１つに記載の融合タンパク質、Ｅ１～Ｅ５２に記載の融合タンパク質を発現する細胞、Ｅ５３～Ｅ５８のいずれか１つに記載の核酸、Ｅ５９～Ｅ６１のいずれか１つに記載のベクター、Ｅ６２～Ｅ６９のいずれか１つに記載のウイルス粒子からなる群から選択される作用物質、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む薬学的組成物。
Ｅ７１．　細胞においてｐ５３タンパク質の毒性を低下させる方法であって、Ｅ１～Ｅ５２のいずれか１つに記載の融合タンパク質、Ｅ１～Ｅ５２の融合タンパク質を発現する細胞、Ｅ５３～Ｅ５８のいずれか１つに記載の核酸、Ｅ５９～Ｅ６１のいずれか１つに記載のベクター、Ｅ６２～Ｅ６９のいずれか１つに記載のウイルス粒子、およびＥ７０に記載の薬学的組成物からなる群から選択される１つまたは複数の作用物質の有効量と前記細胞を接触させるステップを含む、方法。
Ｅ７２．　細胞が対象内にある、Ｅ７１に記載の方法。
Ｅ７３．　対象がヒトである、Ｅ７２に記載の方法。

Ｅ７４．　対象が癌を有すると同定されている、Ｅ７１～Ｅ７３のいずれか１つに記載の方法。

Ｅ７５．　癌が、以下の部位の、原発性であると明言または推定される悪性新生物：頭頸部癌を含む、唇、口腔、および咽頭の悪性新生物；食道、結腸、肝臓、または膵臓癌を含む消化器官の悪性新生物；肺癌を含む、呼吸および胸腔内器官の悪性新生物；骨肉腫を含む、骨および関節軟骨の悪性新生物；メラノーマおよび皮膚の他の悪性新生物；肉腫を含む、中皮および軟部組織の悪性新生物；乳房の悪性新生物；卵巣癌を含む、女性生殖器の悪性新生物；前立腺癌を含む、男性生殖器の悪性新生物；膀胱癌を含む、尿路の悪性新生物；神経膠芽腫を含む、眼、脳、および中枢神経系の他の部分の悪性新生物；甲状腺癌を含む、甲状腺および他の内分泌腺の悪性新生物；明確に定義されていない、続発性の、および不特定の部位の悪性新生物；多発性骨髄腫、リンパ性白血病、または骨髄性白血病を含む、リンパ系、造血性、および関連組織の悪性新生物；骨髄異形成症候群を含む、不確定または不明な挙動の新生物からなる群から選択される、Ｅ７４に記載の方法。

Ｅ７６．　対照細胞と比較した場合、細胞において異常ｐ５３タンパク質の量の低下がある、Ｅ７１～Ｅ７５のいずれか１つに記載の方法。

Ｅ７７．　癌の処置、防止、またはその進行の遅延を必要とする対象において、癌を処置する、防止する、またはその進行を遅延させる方法であって、Ｅ１～Ｅ５２のいずれか１つに記載の融合タンパク質、Ｅ１～Ｅ５２の融合タンパク質を発現する細胞、Ｅ５３～Ｅ５８のいずれか１つに記載の核酸、Ｅ５９～Ｅ６１のいずれか１つに記載のベクター、Ｅ６２～Ｅ６９のいずれか１つに記載のウイルス粒子、およびＥ７０に記載の薬学的組成物からなる群から選択される１つまたは複数の作用物質の有効量を投与するステップを含む、方法。

Ｅ７８．　ｐ５３疾患が、以下の部位の、原発性であると明言または推定される悪性新生物：頭頸部癌を含む、唇、口腔、および咽頭の悪性新生物；食道、結腸、肝臓、または膵臓癌を含む消化器官の悪性新生物；肺癌を含む、呼吸および胸腔内器官の悪性新生物；骨肉腫を含む、骨および関節軟骨の悪性新生物；メラノーマおよび皮膚の他の悪性新生物；肉腫を含む、中皮および軟部組織の悪性新生物；乳房の悪性新生物；卵巣癌を含む、女性生殖器の悪性新生物；前立腺癌を含む、男性生殖器の悪性新生物；膀胱癌を含む、尿路の悪性新生物；神経膠芽腫を含む、眼、脳、および中枢神経系の他の部分の悪性新生物；甲状腺癌を含む、甲状腺および他の内分泌腺の悪性新生物；明確に定義されていない、続発性の、および不特定の部位の悪性新生物；多発性骨髄腫、リンパ性白血病、または骨髄性白血病を含む、リンパ系、造血性、および関連組織の悪性新生物；骨髄異形成症候群を含む、不確定または不明な挙動の新生物からなる群から選択される、Ｅ７７に記載の方法。

Ｅ７９．　対象におけるｐ５３疾患の防止またはその進行の遅延に有用な医薬の調製における、Ｅ１～Ｅ５２のいずれか１つに記載の融合タンパク質、Ｅ１～Ｅ５２に記載の融合タンパク質を発現する細胞、Ｅ５３～Ｅ５８のいずれか１つに記載の核酸、Ｅ５９～Ｅ６１のいずれか１つに記載のベクター、Ｅ６２～Ｅ６９のいずれか１つに記載のウイルス粒子、およびＥ７０に記載の薬学的組成物の１つまたは複数の使用。

Ｅ８０．　ｐ５３疾患が癌である、Ｅ７９に記載の使用。

Ｅ８１．　癌が、以下の部位の、原発性であると明言または推定される悪性新生物：頭頸部癌を含む、唇、口腔、および咽頭の悪性新生物；食道、結腸、肝臓、または膵臓癌を含む消化器官の悪性新生物；肺癌を含む、呼吸および胸腔内器官の悪性新生物；骨肉腫を含む、骨および関節軟骨の悪性新生物；メラノーマおよび皮膚の他の悪性新生物；肉腫を含む、中皮および軟部組織の悪性新生物；乳房の悪性新生物；卵巣癌を含む、女性生殖器の悪性新生物；前立腺癌を含む、男性生殖器の悪性新生物；膀胱癌を含む、尿路の悪性新生物；神経膠芽腫を含む、眼、脳、および中枢神経系の他の部分の悪性新生物；甲状腺癌を含む、甲状腺および他の内分泌腺の悪性新生物；明確に定義されていない、続発性の、および不特定の部位の悪性新生物；多発性骨髄腫、リンパ性白血病、または骨髄性白血病を含む、リンパ系、造血性、および関連組織の悪性新生物；骨髄異形成症候群を含む、不

確定または不明な挙動の新生物からなる群から選択される、Ｅ８０に記載の使用。
【図面の簡単な説明】
【００１４】
【図１Ａ】代表的なヒトＪドメイン配列のＣｌｕｓｔａｌ　Ｏｍｅｇａ配列アラインメントを示す図である。高度に保存されたＨＰＤドメインは、強調表示された四角形内に示されている。
【図１Ｂ】代表的なヒトＪドメイン配列のＣｌｕｓｔａｌ　Ｏｍｅｇａ配列アラインメントを示す図である。
【図２】Ｊドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含むいくつかの実例的な融合タンパク質構築物を示す図である。
【図３】１００ｎＭ　ドキソルビシンの非存在下かまたは存在下のいずれかでの、単独でかまたは構築物２を同時発現するかのいずれかで、ｐ５３の野生型またはＲ１７５もしくはＲ２４９Ｓ変異体を発現することの、ｐ５３またはｐ２１の免疫検出可能レベルへの効果を示す図である。
【図４】１μＭ　ドキソルビシンありまたはなしで処理された、単独でかまたは構築物２の存在下のいずれかでの、ｐ５３のＲ２４９Ｓ変異体を安定的にトランスフェクトされたＨＣＴ－１１６細胞におけるｐ２１のＥＬＩＳＡに基づいた定量化を示す図である。
【図５】細胞毒性についての代替としてＬＤＨ活性を用いる、ｐ５３のＲ１７５Ｈかまたはは Ｒ２４９Ｓのいずれかの変異体を発現する構築物を安定的にトランスフェクトされたＨＣＴ－１１６細胞において構築物２を発現することの細胞毒性への効果を示す図である。
【図６】細胞毒性の指標としてＬＤＨ活性を用いる、ｐ５３の野生型、Ｒ１７５Ｈ変異体、またはＲ２４９変異体のいずれかを発現する構築物をトランスフェクトされた細胞において構築物３を発現することの細胞毒性への効果を示す図である。
【図７】細胞毒性の指標としてＬＤＨ活性を用いる、ｐ５３の野生型、Ｒ１７５Ｈ変異体、またはＲ２４９変異体のいずれかを発現する構築物をトランスフェクトされた細胞において構築物１６または構築物１７を発現することの細胞毒性への効果を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１５】
定義
本明細書および特許請求の範囲に用いられる場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、文脈が明らかに他に指図しない限り、複数の指示物を含む。例えば、用語「１つの細胞」は、その混合物を含む、複数の細胞を含む。
【００１６】
用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すのに本明細書で交換可能に用いられる。ポリマーは直鎖状または分岐状であり得、それは修飾アミノ酸を含んでもよく、それは非アミノ酸により中断されてもよい。それらの用語はまた、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識コンポーネントとのコンジュゲーションなどの任意の他の操作により、修飾されているアミノ酸ポリマーを包含する。
【００１７】
本明細書で用いられる場合、用語「アミノ酸」は、天然および／または非天然もしくは合成のアミノ酸のいずれかを指し、それには、Ｄ型またはＬ型の両方の光学異性体、ならびにアミノ酸類似体およびペプチド模倣体が挙げられるが、それらに限定されない。標準一文字または三文字コードが、アミノ酸を名付けるために用いられる。
【００１８】
「宿主細胞」は、対象ベクターについてのレシピエントであり得、またはレシピエントであった個々の細胞または細胞培養物を含む。宿主細胞は、単一の宿主細胞の子孫を含む。その子孫は、自然の、偶発的な、または計画的な変異によって、最初の親細胞と必ずしも完全に同一（形態において、または全ＤＮＡ相補体のゲノムにおいて）というわけではない。宿主細胞は、インビボでこの発明のベクターでトランスフェクトされた細胞を含む

。

【００１９】

本明細書で開示された様々なポリペプチドを記載するために用いられる場合の「単離された」は、その天然の環境のコンポーネントから識別および分離されており、ならびに／または回収されているポリペプチドを意味する。その天然の環境の夾雑コンポーネントは、典型的には、本ポリペプチドについての診断的または治療的使用に干渉する材料であり、それには、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質が挙げられ得る。当業者には明らかであるように、天然に存在しないポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片は、その天然に存在する対応物からそれを区別するために「単離」を必要としない。加えて、「濃縮された」、「分離された」、または「希釈された」ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片は、体積あたりの分子の濃度または数が、その天然に存在する対応物のそれより一般的に大きい点で、その天然に存在する対応物から区別可能である。一般的に、組換え手段により生成され、かつ宿主細胞において発現したポリペプチドは、「単離」されていると見なされる。

【００２０】

「単離された」ポリヌクレオチド、またはポリペプチドをコードする核酸、または他のポリペプチドをコードする核酸は、それが、そのポリペプチドをコードする核酸の天然源において通常付随している少なくとも１つの夾雑核酸分子から識別および分離されている核酸分子である。単離された、ポリペプチドをコードする核酸分子は、それが天然で見出される形または設定以外をとる。したがって、単離された、ポリペプチドをコードする核酸分子は、それが天然の細胞において存在する場合のその特定のポリペプチドをコードする核酸分子から区別される。しかしながら、単離された、ポリペプチドをコードする核酸分子には、そのポリペプチドを通常発現する細胞に含有される、ポリペプチドをコードする核酸分子が挙げられ、ここで、例えば、その核酸分子は、天然細胞の位置とは異なる、染色体または染色体外の位置にある。

【００２１】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」、「ヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」は交換可能に用いられる。それらは、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはその類似体のいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形を指す。ポリヌクレオチドは、任意の３次元構造を有し得、既知または未知の任意の機能を実施し得る。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的例である：遺伝子または遺伝子断片のコードまたは非コード領域、連鎖解析から定義される遺伝子座、エクソン、イントロン、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、リボザイム、ｃＤＮＡ、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたＤＮＡ、任意の配列の単離されたＲＮＡ、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含み得る。存在する場合、そのポリマーのアセンブリの前または後に、ヌクレオチド構造への修飾が与えられ得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチドコンポーネントによって中断され得る。ポリヌクレオチドは、標識コンポーネントとのコンジュゲーションなど、ポリマー化後にさらに修飾され得る。

【００２２】

本明細書で定義される場合、用語「ｐ５３障害」または「ｐ５３媒介性疾患」は、特にｐ５３変異タンパク質により引き起こされる、ｐ５３媒介性新生物形成に関連した障害を指す。ｐ５３障害の例には、限定されるわけではないが、好ましくは癌および他の新生物に関して、以下が挙げられるが、それらに限定されない：以下の部位の、原発性であると明言または推定される悪性新生物：頭頸部癌を含む、唇、口腔、および咽頭の悪性新生物；食道、結腸、肝臓、または膵臓癌を含む消化器官の悪性新生物；肺癌を含む、呼吸および胸腔内器官の悪性新生物；骨肉腫を含む、骨および関節軟骨の悪性新生物；メラノーマおよび皮膚の他の悪性新生物；肉腫を含む、中皮および軟部組織の悪性新生物；乳房の悪

性新生物；卵巣癌を含む、女性生殖器の悪性新生物；前立腺癌を含む、男性生殖器の悪性新生物；膀胱癌を含む、尿路の悪性新生物；神経膠芽腫を含む、眼、脳、および中枢神経系の他の部分の悪性新生物；甲状腺癌を含む、甲状腺および他の内分泌腺の悪性新生物；明確に定義されていない、続発性の、および不特定の部位の悪性新生物；多発性骨髄腫、リンパ性白血病、または骨髄性白血病を含む、リンパ系、造血性、および関連組織の悪性新生物；骨髄異形成症候群を含む、不確定または不明な挙動の新生物。

【００２３】

「ベクター」は、好ましくは適切な宿主において自己複製する、核酸分子であり、それは、挿入された核酸分子を宿主細胞の中へおよび／または宿主細胞間で転移させる。その用語は、主にＤＮＡまたはＲＮＡの細胞への挿入のために機能するベクター、主にＤＮＡまたはＲＮＡの複製のために機能する複製ベクター、ならびにＤＮＡまたはＲＮＡの転写および／または翻訳のために機能する発現ベクターを含む。また、上記の機能の１つより多くを提供するベクターも含まれる。「発現ベクター」は、適切な宿主細胞の中へ導入された場合、転写され、かつポリペプチドへ翻訳され得るポリヌクレオチドである。「発現系」は、通常、所望の発現産物を生じるように機能することができる発現ベクターで構成された適切な宿主細胞を含意する。

【００２４】

用語「作動可能に連結された」は、記載されたコンポーネントの並置であって、そこで、それらのコンポーネントが、それらの意図された様式でそれらが機能することを可能にする関係にある、並置を指す。コード配列と「作動可能に連結された」制御配列は、コード配列の発現が、制御配列と適合した条件下で達成されるように、ライゲーションされている。「作動可能に連結された」配列には、目的の遺伝子と近接する発現制御配列と、目的の遺伝子を制御するようにトランスでまたはある距離を置いて作用する発現制御配列の両方が挙げられ得る。用語「発現制御配列」は、それらがライゲーションされるコード配列の発現およびプロセシングに作用するのに必要であるポリヌクレオチド配列を指す。発現制御配列には、適切な転写開始、終結、プロモーター、およびエンハンサー配列；スプライシングなどの効率的なＲＮＡプロセシングシグナルおよびポリアデニル化シグナル；細胞質ｍＲＮＡを安定化させる配列；翻訳効率を増強する配列（例えば、コザックコンセンサス配列）；タンパク質安定性を増強する配列；ならびに、必要に応じて、タンパク質分泌を増強する配列が挙げられる。そのような制御配列の性質は、宿主生物体によって異なる；原核生物において、そのような制御配列には、一般的に、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列が挙げられる；真核生物において、一般的に、そのような制御配列には、プロモーターおよび転写終結配列が挙げられる。用語「制御配列」は、その存在が発現およびプロセシングに必須であるコンポーネントを含むことが意図され、その存在が有利である追加のコンポーネント、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列も含むことができる。他に言及がない限り、本発明の融合タンパク質をコードする核酸分子を発現ベクターへ挿入することの本明細書での記載または言及は、その挿入される核酸もまた、その挿入される核酸分子を含有する発現ベクターが適合性宿主細胞または生物体の適合性細胞へ導入される場合、コードされた融合タンパク質の発現に必要とされる、機能性プロモーターならびに他の転写および翻訳制御エレメントとベクター内で作動可能に連結されていることを意味する。

【００２５】

ポリヌクレオチドに適用される場合の「組換え型の」は、そのポリヌクレオチドが、宿主細胞において潜在的に発現し得る構築物を生じる、インビトロクローニング、制限および／またはライゲーションのステップ、ならびに他の手順の様々な組合せの産物であることを意味する。

【００２６】

用語「遺伝子」および「遺伝子断片」は、本明細書で交換可能に用いられる。それらは、転写および翻訳された後、特定のタンパク質をコードする能力がある少なくとも１つのオープンリーディングフレームを含有するポリヌクレオチドを指す。遺伝子または遺伝子

断片は、そのポリヌクレオチドが少なくとも１つのオープンリーディングフレームを含有する限り、ゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡであり得、それは、コード領域全体またはそのセグメントを網羅し得る。「融合遺伝子」は、一緒に連結されている少なくとも２つの異種性ポリヌクレオチドで構成される遺伝子である。

【００２７】

用語「疾患」および「障害」は、当技術分野において容認可能な医療水準および行為により同定された病的状態を示すように、交換可能に用いられる。

【００２８】

本明細書で用いられる場合、用語「有効量」は、疾患またはその１つもしくは複数の症状の重症度および／または期間を低下させまたは改善する；有害なまたは病的な状態の進展を防止する；病的状態の退行を引き起こす；病的状態に関連した１つまたは複数の症状の再発、発達、発生、または進行を防止する；障害を検出する；あるいは、治療（例えば、別の予防または治療剤の投与）の予防的または治療的効果を増強しまたは向上させるのに十分である治療の量を指す。

【００２９】

本明細書で用いられる場合、用語「Ｊドメイン」は、Ｈｓｐ７０およびその同族の内因性ＡＴＰアーゼ触媒活性を加速する能力を保持する断片を指す。様々なＪタンパク質のＪドメインが決定されており（例えば、Ｋａｍｐｉｎｇａら （２０１０）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．、１１：５７９～５９２；Ｈｅｎｎｅｓｓｙら （２００５）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ、１４：１６９７～１７０９参照（それぞれは、全体として参照により組み入れられている））、以下のいくつかのホールマークによって特徴づけられる：４つのαヘリックス（Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ）、および通常、ヘリックスＩＩとＩＩＩの間に高度に保存された、ヒスチジン、プロリン、およびアスパラギン酸のトリペプチド配列モチーフ（「ＨＰＤモチーフ」と呼ばれる）を有することにより特徴づけられる。典型的には、Ｊタンパク質のＪドメインは、５０アミノ酸長から７０アミノ酸長の間であり、Ｈｓｐ７０－ＡＴＰシャペロンタンパク質とのＪドメインの相互作用（結合）の部位は、ヘリックスＩＩ内から伸びる領域であると考えられており、ＨＰＤモチーフは、Ｈｓｐ７０ ＡＴＰアーゼ活性の刺激に必要である。本明細書で用いられる場合、用語「Ｊドメイン」は、Ｈｓｐ７０の内因性ＡＴＰアーゼ活性を加速する能力を保持する、天然のＪドメイン配列およびその機能性バリアントを含むことを意図され、その能力は、当技術分野においてよく知られた方法を用いて測定することができる（例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、Ｈｏｒｎｅら （２０１０）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２８５、２１６７９～２１６８８参照）。ヒトＪドメインの非限定的リストは、表１に提供されている。

【００３０】

詳細な説明

本発明者らは、Ｊタンパク質のＪドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む融合タンパク質構築物と細胞をある程度、接触させることが、変異ｐ５３機能を回復させる予想外の効果を生じることを見出している。変異ｐ５３は、いくつかの破壊的な新生物形成を引き起こすと考えられている。したがって、ｐ５３障害を処置するための、例えばそれを必要とする対象においての、有用な組成物および方法が本明細書に提供される。

【００３１】

シャペロンに基づいた治療に関連した問題を克服するために、本発明者らは、高い特異性を有する人工シャペロンタンパク質をデザインすることが可能であるかどうかを調べた。本発明者らは、Ｈｓｐ７０結合／活性化のためのエフェクタードメイン（Ｊドメイン配列）、およびｐ５３タンパク質に対する特異性を与えるドメインを含む一連の融合タンパク質構築物をデザインした。生じた融合タンパク質は、Ｈｓｐ７０およびその同族の内因性ＡＴＰアーゼ触媒活性を加速するように作用し、その結果として、タンパク質フォールディングの増加、機能の回復、および／またはクリアランスの加速を生じる。

【００３２】

Ｉ．　融合タンパク質構築物

ａ．　本発明における有用なＪドメイン

様々なＪタンパク質のＪドメインが決定されている。例えば、Ｋａｍｐｉｎｇａら、Ｎａｔ．Ｒｅｖ．、１１：５７９～５９２（２０１０）；Ｈｅｎｎｅｓｓｙら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、１４：１６９７～１７０９（２００５）参照。本発明の融合タンパク質を調製することにおいて有用なＪドメインは、主にＨｓｐ７０　ＡＴＰアーゼ活性を加速するＪドメインの特徴を定義する鍵を握る。したがって、本発明において有用な単離されたＪドメインは、４つのαヘリックス（Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ）、および通常、ヘリックスＩＩとＩＩＩの間に高度に保存された、ヒスチジン、プロリン、およびアスパラギン酸のトリペプチド配列（「ＨＰＤモチーフ」と呼ばれる）を有することにより特徴づけられる、ポリペプチドドメインを含む。典型的には、Ｊタンパク質のＪドメインは、５０アミノ酸長から７０アミノ酸長の間であり、Ｈｓｐ７０－ＡＴＰシャペロンタンパク質とのＪドメインの相互作用（結合）の部位は、ヘリックスＩＩ内から伸びる領域であると考えられており、ＨＰＤモチーフは、原始的な活性の基礎をなす。代表的なＪドメインには、ＤｎａＪＢ１、ＤｎａＪＢ２、ＤｎａＪＢ６、ＤｎａＪＣ６のＪドメイン、ＳＶ４０のラージＴ抗原のＪドメイン、および哺乳動物のシステインストリングタンパク質（ＣＳＰ－α）のＪドメインが挙げられるが、それらに限定されない。本発明の融合タンパク質に用いられ得るこれらを始めとするＪドメインについてのアミノ酸配列は、表１に提供されている。保存ＨＰＤモチーフは、太字で強調されている。一実施形態において、本明細書に開示された融合タンパク質は、配列番号１～５０からなる群から選択されるＪドメインを含む。別の実施形態において、本明細書に開示された融合タンパク質は、コンセンサスＨＰＤモチーフを含むＪドメインを含む。一つの特定の実施形態において、配列番号１～１５、１７～５０からなる群から選択される。特定の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号１、５、６、１０、１６、２４、２５、３１、および４９からなる群から選択から選択されるＪドメインを含む。

【００３３】

【表１－１】

表1. 代表的なヒトJドメイン配列

タンパク質名	配列番号	長さ	Jドメインアミノ酸配列
DNAJA1	1	63	TYYDVLGVKPNATQEELKKAYRKLALKY**HPD**KNPNEGEKFK QISQAYEVLSDAKKRELYDKGG
DNAJA2	2	63	KLYDILGVPPGASENELKKAYRKLAKEY**HPD**KNPNAGDKFK EISFAYEVLSNPEKRELYDRYG
DNAJA3	3	66	DYYQILGVPRNASQKEIKKAYYQLAKKY**HPD**TNKDDPKAKE KFSQLAEAYEVLSDEVKRKQYDAYG
DNAJA4	4	67	ETQYYDILGVKPSASPEEIKKAYRKLALKY**HPD**KNPDEGEK FKLISQAYEVLSDPKKRDVYDQGGEQ
DNAJB1	5	69	GKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRY**HPD**KNKEPGAE EKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEE
DNAJB2	6	70	ASYYEILDVPRSASADDIKKAYRRKALQW**HPD**KNPDNKEFA EKKFKEVAEAYEVLSDKHKREIYDRYGRE
DNAJB3	7	69	MVDYYEVLDVPRQASSEAIKKAYRKLALKW**HPD**KNPENKEE AERRFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDRYG
DNAJB4	8	69	GKDYYCILGIEKGASDEDIKKAYRKQALKF**HPD**KNKSPQAE EKFKEVAEAYEVLSDPKKREIYDQFGEE
DNAJB5	9	65	DYYKILGIPSGANEDEIKKAYRKMALKY**HPD**KNKEPNAEEK FKEIAEAYDVLSDPKKRGLYDQYG
DNAJB6	10	68	VDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKW**HPD**KNPENKEEA ERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYG
DNAJB7	11	67	DYYEVLGLQRYASPEDIKKAYHKVALKW**HPD**KNPENKEEAE RKFKEVAEAYEVLSNDEKRDIYDKYG
DNAJB8	12	67	NYYEVLGVQASASPEDIKKAYRKLALRW**HPD**KNPDNKEEAE KKFKLVSEAYEVLSDSKKRSLYDRAG
DNAJB9	13	65	SYYDILGVPKSASERQIKKAFHKLAMKY**HPD**KNKSPDAEAK FREIAEAYETLSDANRRKEYDTLG
DNAJB11	14	66	DFYKILGVPRSASIKDIKKAYRKLALQL**HPD**RNPDDPQAQE KFQDLGAAYEVLSDSEKRKQYDTYG
DNAJB12	15	65	YEILGVSRGASDEDLKKAYRRLALKF**HPD**KNHAPGATEAFK AIGTAYAVLSNPEKRKQYDQFGDD
DNAJB13	16	66	DYYSVLGITRNSEDAQIKQAYRRLALKHHPLKSNEPSSAEI FRQIAEAYDVLSDPMKRGIYDKFG
DNAJB14	17	65	NYYEVLGVTKDAGDEDLKKAYRKLALKF**HPD**KNHAPGATDA FKKIGNAYAVLSNPEKRKQYDLTG
DNAJC1	18	65	NFYQFLGVQQDASSADIRKAYRKLSLTL**HPD**KNKDENAETQ FRQLVAIYEVLKDDERRQRYDDIL
DNAJC2	19	74	DHYAVLGLGHVRYKATQRQIKAAHKAMVLKH**HPD**KRKAAGE PIKEGDNDYFTCITKAYEMLSDPVKRRAFNSVD
DNAJC3	20	69	DYYKILGVKRNAKKQEIIKAYRKLALQW**HPD**NFQNEEEKKK AEKKFIDIAAAKEVLSDPEMRKKFDDGE
DNAJC4	21	66	TYYELLGVHPGASTEEVKRAFFSKSKEL**HPD**RDPGNPSLHS RFVELSEAYRVLSREQSRRSYDDQL
DNAJC5	22	70	GESLYHVLGLDKNATSDDIKKSYRKLALKY**HPD**KNPDNPEA ADKFKEINNAHAILTDATKRNIYDKYGSL

【００３４】

【表１－２】

DNAJC5B	23	66	ALYEILGLHKGASNEEIKKTYRKLALKH**HPD**KNPDDPAATE KFKEINNAHAILTDISKRSIYDKYG
DNAJC6	24	65	TKWKPVGMADLVTPEQVKKVYRKAVLVV**HPD**KATGQPYEQY AKMIFMELNDAWSEFENQGQKPLY
DNAJC7	25	71	DYYKILGVDKNASEDEIKKAYRKRALMH**HPD**RHSGASAEVQ KEEEKKFKEVGEAFTILSDPKKKTRYDSGQ
DNAJC8	26	68	NPFEVLQIDPEVTDEEIKKRFRQLSILV**HPD**KNQDDADRAQ KAFEAVDKAYKLLLDQEQKKRALDVIQ
DNAJC9	27	68	DLYRVLGVRREASDGEVRRGYHKVSLQV**HPD**RVGEGDKEDA TRRFQILGKVYSVLSDREQRAVYDEQG
DNAJC10	28	66	DFYSLLGVSKTASSREIRQAFKKLALKL**HPD**KNPNNPNAHG DFLKINRAYEVLKDEDLRKKYDKYG
DNAJC11	29	69	DYYSLLNVRREASSEELKAAYRRLCMLY**HPD**KHRDPELKSQ AERLFNLVHQAYEVLSDPQTRAIYDIYG
DNAJC12	30	66	DYYTLLGCDELSSVEQILAEFKVRALEC**HPD**KHPENPKAVE TFQKLQKAKEILTNEESRARYDHWR
DNAJC13	31	66	DAYEVLNLPQGQGPHDESKIRKAYFRLAQKY**HPD**KNPEGRD MFEKVNKAYEFLCTKSAKIVDGPDP
DNAJC14	32	65	NPFHVLGVEATASDVELKKAYRQLAVMV**HPD**KNHHPRAEEA FKVLRAAWDIVSNAEKRKEYEMKR
DNAJC15	33	55	EAGLILGVSPSAGKAKIRTAHRRVMILN**HPD**KGGSPYVAAK INEAKDLLETTTKH
DNAJC16	34	65	DPYRVLGVSRTASQADIKKAYKKLAREW**HPD**KNKDPGAEDK FIQISKAYEILSNEEKRSNYDQYG
DNAJC17	35	66	DLYALLGIEEKAADKEVKKAYRQKALSC**HPD**KNPDNPRAAE LFHQLSQALEVLTDAAARAAYDKVR
DNAJC18	36	65	NYYEILGVSRDASDEELKKAYRKLALKF**HPD**KNCAPGATDA FKAIGNAFAVLSNPDKRLRYDEYG
DNAJC19	37	55	EAALILGVSPTANKGKIRDAHRRIMLLN**HPD**KGGSPYIAAK INEAKDLLEGQAKK
DNAJC20	38	72	DYFSLMDCNRSFRVDTAKLQHRYQQLQRLV**HPD**FFSQRSQT EKDFSEKHSTLVNDAYKTLLAPLSRGLYLLK
DNAJC21	39	67	CHYEALGVRRDASEEELKKAYRKLALKW**HPD**KNLDNAAEAA EQFKLIQAAYDVLSDPQERAWYDNHR
DNAJC22	40	65	LAYQVLGLSEGATNEEIHRSYQELVKVW**HPD**HNLDQTEEAQ RHFLEIQAAYEVLSQPRKPWGSRR
DNAJC23	41	62	NPYEVLNLDPGATVAEIKKQYRLLSLKY**HPD**KGGDEVMFMR IAKAYAALTDEESRKNWEEFG
DNAJC24	42	72	DWYSILGADPSANISDLKQKYQKLILMY**HPD**KQSTDVPAGT VEECVQKFIEIDQAWKILGNEETKREYDLQR
DNAJC25	43	76	DCYEVLGVSRSAGKAEIARAYRQLARRY**HPD**RYRPQPGDEG PGRTPQSAEEAFLLVATAYETLKDEETRKDYDYML
DNAJC26	44	65	SRWTPVGMADLVAPEQVKKHYRRAVLAV**HPD**KAAGQPYEQH AKMIFMELNDAWSEFENQGSRPLF
DNAJC27	45	57	DSWDMLGVKPGASRDEVNKAYRKLAVLL**HPD**KCVAPGSEDA FKAVVNARTALLKNIK

【００３５】

【表１－３】

DNAJC28	46	65	EYYRLLNVEEGCSADEVRESFHKLAKQY**HPD**SGSNTADSAT FIRIEKAYRKVLSHVIEQTNASQS
DNAJC29	47	88	ILKEVTSVVEQAWKLPESERKKIIRRLYLKW**HPD**KNPENHD IANEVFKHLQNEINRLEKQAFLDQNADRASRRTFSTSASRF QSDKYS
DNAJC30	48	66	ALYDLLGVPSTATQAQIKAAYYRQCFLY**HPD**RNSGSAEAAE RFTRISQAYVVLGSATLRRKYDRGL
SV40 Jドメイン	49	64	QLMDLLGLERSAWGNIPLMRKAYLKKCKEF**HPD**KGGDEEKM KKMNTLYKKMEDGVKYAHQPDFG
細菌 Jドメイン	50	70	KQDYYEILGVSKTAEEREIRKAYKRLAMKY**HPD**RNQGDKEA EAKFKEIKEAYEVLTDSQKRAAYDQYGHA

【００３６】

ｂ．　ｐ５３結合性ドメイン

融合タンパク質はまた、少なくとも１つのｐ５３結合性ドメインを含む。ｐ５３結合性ドメインは、融合タンパク質を形成するようにＪドメインと連結された一本鎖ポリペプチドまたは多量体ポリペプチドであり得る。

【００３７】

ｐ５３結合性ドメインが、細胞内において病的レベルで存在する時のｐ５３タンパク質を結合することができるような十分な親和性を有することは理想である。したがって、一実施形態において、融合タンパク質は、９６ウェルマイクロタイタープレート上でのＥＬＩＳＡにより試験された場合、例えば、２μＭ以下、１μＭ以下、５００ｎＭ以下、３００ｎＭ以下、１００ｎＭ以下、３０ｎＭ以下の、ｐ５３レポーター構築物に対するK_Dを有するｐ５３結合性ドメインを含む。

【００３８】

Ｈｓｐ７０機構が、ミスフォールドしたタンパク質だけに係合すると考えられていることは注目される。また一方、場合によっては、融合タンパク質が、ｐ５３のミスフォールド型だけを係合することが好ましくあり得る。したがって、いくつかの実施形態において、ｐ５３結合性ドメインは、ｐ５３のミスフォールド型と優先的に結合する。必ずしもではないが、ミスフォールド型（例えば、ｐ５３のＲ１７５、Ｒ２４５、およびＲ２４９変異型）に対して、より高い親和性を有するｐ５３結合性ドメインの能力は、融合タンパク質が病原型だけをＨｓｐ７０機構へより選択的に係合させることを可能にするであろう。

【００３９】

別の実施形態において、融合タンパク質はまた、Ｊドメインと化学的にコンジュゲートされているｐ５３結合性ドメインの使用を企図する。ｐ５３結合性ドメインは、Ｊドメインと直接的にコンジュゲートされ得る。あるいは、それは、リンカーによりＪドメインとコンジュゲートされ得る。例えば、当業者に知られて、かつｐ５３結合性ドメインをＪドメインと、または標的化ドメインを、ｐ５３結合性ドメインおよびＪドメインを含む融合タンパク質と架橋するのに有用である多数の化学的架橋剤がある。例えば、架橋剤は、分子を段階的な様式で連結するために用いることができるヘテロ二官能性架橋剤である。ヘテロ二官能性架橋剤は、タンパク質をコンジュゲートするためのより特異的なカップリング方法をデザインする能力を提供し、それにより、ホモタンパク質ポリマーなどの望ましくない副反応の発生を低下させる。様々なヘテロ二官能性架橋剤が当技術分野において知られており、それには、スクシンイジミル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）；Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（ＳＩＡＢ）、スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（ＳＭＰＢ）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドヒドロ

クロリド（ＥＤＣ）；４－スクシンイミジルオキシカルボニル－ａ－メチル－ａ－（２－ピリジルジチオ）－トルエン（ＳＭＰＴ）、Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、スクシンイミジル６－［３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート］ヘキサノエート（ＬＣ－ＳＰＤＰ）が挙げられる。Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド部分を有する架橋剤は、一般的により高い水溶性を有するＮ－ヒドロキシスルホスクシンイミド類似体として得ることができる。加えて、連結鎖内にジスルフィド架橋を有する架橋剤は、インビボでのリンカー切断の量を低下させるためにアルキル誘導体として、代わりに合成することができる。ヘテロ二官能性架橋剤に加えて、ホモ二官能性架橋剤および光反応性架橋剤を含む、いくつかの他の架橋剤が存在する。ジスクシンイミジルスベレート（ＤＳＳ）、ビスマレイミドヘキサン（ＢＭＨ）、およびジメチルピメリミデート・２ＨＣｌは、この開示に用いられる有用なホモ二官能性架橋剤の例であり、ビス－［Ｂ－（４－アジドサリチルアミド）エチル］ジスルフィド（ＢＡＳＥＤ）およびＮ－スクシンイミジル－６（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（ＳＡＮＰＡＨ）は、有用な光反応性架橋剤の例である。タンパク質カップリング技術の最近の概説について、参照により本明細書に組み入れられた、Ｍｅａｎｓら、（１９９０）Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．１：２～１２を参照されたい。

【００４０】

【表２】

表2: p53結合性ドメインの**例**

名前	配列番号	長さ	配列
p53BP	51	7	NPNSAQG
CDB3	52	9	REDEDEIEW
scFv1 (ME1)	53	256	QVKLQQSGAELAKPGASVKMSCKTSGYTFTSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGYINPTTGYTKYNQKFKDKATLTADKSSST AYMQLSSLTNVDSAVYYCTTGYSYFDYWGQGTTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTITCSA SSSVNYMHWFQQKPGTSPKLWISSTSNLASGVPARFSGS GSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPYTFGGGTKL QIKRAAAGAPVPYPDPLEPRAA
scFv2 (11D3)	54	249	QVKLQESGAELVRSGASVNLSCTASGFNIKDYYMHWVKQ RPEEGLEWIGYIDPESGETEYAPNFQGKATVTADTSSNT AYLHLSSLTSEDTTVYYCNAVIYYEYDGYALDYWGQGTT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPSSLAVSAGEKV AMSCKSSQSLFNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKVLIYWAS TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQS YNLPTFGGGTKLEIK
scFv3 (scFv421)	55	243	QVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQ RPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAPKFQGKATMTADTSSNT AYLQLSSLASEDTAVYYCNFYGDALDYWGQGTTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSDVLMTQTPLTLSVTIGQPASISCKS SQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVP DRFTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYYCWQGTHSPLTF GAGTKLEIK
scFv4 (Pab421)	56	233	QESGAELVRSGASVKLSCTTSGFNINDYYMHWVKKRPEQ GLEWIGRIDPENGDADMTRSSGVKATMTADTSSNTAYLQ LSSLTSEDTAVYYCNAGMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGR ASGGGGSDIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTS GYSYMHWNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGS GTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGTKLEI

【００４１】

ｃ．　任意選択のリンカー

本明細書に記載された融合タンパク質は、任意選択で、１つまたは複数のリンカーを含有することができる。リンカーは、ペプチド性または非ペプチド性であり得る。リンカーの目的は、とりわけ、タンパク質内の機能性ドメインの間（例えば、Ｊドメインとｐ５３結合性ドメインの間、ｐ５３結合性ドメインのタンデム配置の間、Ｊドメインとｐ５３結合性ドメインと任意選択の標的化試薬のいずれかの間、またはＪドメインとｐ５３結合性ドメインと任意選択の検出ドメインまたはエピトープのいずれかの間）に、そのドメインのそれぞれの最適な機能のために、適切な距離を与えることである。明らかに、リンカーは、好ましくは、本発明の融合タンパク質のＪドメイン、標的タンパク質結合性ドメインのそれぞれの機能に干渉しない。リンカーは、本発明の融合タンパク質に存在する場合には、標的タンパク質（ｐ５３タンパク質）によって引き起こされる細胞毒性を減弱するように選択され得、直接的付着が所望の効果を達成するならば、それは省略され得る。本発明の融合タンパク質に存在するリンカーは、本明細書に記載されているようなタンパク質ドメインまたは融合タンパク質全体をコードする核酸セグメントをインフレームで挿入されている発現ベクターのクローニング部位あたりの核酸のセグメント上に存在するヌクレ

オチド配列によってコードされる１個または複数のアミノ酸を含み得る。一実施形態において、ペプチドリンカーは、１アミノ酸長から２０アミノ酸長の間である。別の実施形態において、ペプチドリンカーは、２アミノ酸長から１５アミノ酸長の間である。なお別の実施形態において、ペプチドリンカーは、２アミノ酸長から１０アミノ酸長の間である。

本発明による融合タンパク質を作製するために１つまたは複数のポリペプチドリンカーを選択することは、当業者の知識と技能の範囲内である。例えば、Ａｒａｉら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．、１４（８）：５２９～５３２（２００１）；Ｃｒａｓｔｏら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．、１３（５）：３０９～３１４（２０００）；Ｇｅｏｒｇｅら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．、１５（１１）：８７１～８７９（２００３）；Ｒｏｂｉｎｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９５：５９２９～５９３４（１９９８）参照（それぞれ、全体として参照により本明細書に組み入れられている）。本発明による融合タンパク質を調製することにおいて用いられ得る２個以上のアミノ酸のリンカーの例には、下記の表３に提供されたものが挙げられるが、それらに限定されない。

【００４２】

【表３】

表3: リンカー配列

配列番号	長さ	配列
57	2	SR
58	4	GTGS
59	5	GLESR
60	4	GGSG
61	5	GGGGS
62	5	DIAAA
63	9	DIAAALESR
64	15	GGGGSGGGGSGGGGS
65	11	AEAAAKEAAAK
66	15	SGGGSGGGGSGGGGS
67	25	DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAA

【００４３】

ｄ．　標的化試薬

本明細書に開示された融合タンパク質はさらに、標的化部分を含み得る。本明細書で用いられる場合、用語「標的化部分」および「標的化試薬」は、交換可能に用いられ、細胞においてまたは対象の身体において、融合タンパク質の結合、輸送、蓄積、滞留時間、生物学的利用率を増強し、またはその生物活性もしくは治療効果を改変する、融合タンパク質に会合した物質を指す。標的化部分は、組織、細胞、および／または細胞内のレベルで機能性を有し得る。標的化部分は、例えば融合タンパク質の対象への投与により、融合タンパク質の特定の細胞、組織、もしくは器官への局在、または細胞内分布を方向づけることができる。一実施形態において、標的化部分は、融合タンパク質のＮ末端に位置する。別の実施形態において、標的化部分は、融合タンパク質のＣ末端に位置する。なお別の実施形態において、標的化部分は内部に位置する。別の実施形態において、標的化部分は、化学的コンジュゲーションを介して融合タンパク質と付着する。

【００４４】

標的化部分には、とりわけ、有機もしくは無機分子、ペプチド、ペプチド模倣体、タンパク質、抗体もしくはその断片、成長因子、酵素、レクチン、抗原もしくは免疫原、ウイルスもしくはそのコンポーネント、ウイルスベクター、受容体、受容体リガンド、毒素、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドもしくはアプタマー、ヌクレオチド、炭水化物、糖、脂質、糖脂質、核タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、ステロイド、ホルモ

ン、成長因子、化学誘引物質、サイトカイン、ケモカイン、薬物、または小分子が挙げられ得るが、それらに限定されない。

【００４５】

本発明の例示的実施形態において、標的化部分は、標的細胞または組織、例えば、神経細胞、中枢神経系、および／または末梢神経系において、プラットフォーム、またはその関連したリガンドおよび／もしくは活性物質の結合、輸送、蓄積、滞留時間、生物学的利用率を増強し、またはその生物活性もしくは治療効果を改変する。したがって、標的化部分は、中枢神経系に関連した細胞受容体に対する特異性を有し得、または血液脳関門（ＢＢＢ）を経由してのＣＮＳへの送達の増強に別様に関連する。結果的に、上記のようなリガンドは、リガンドと標的化部分の両方であり得る。

【００４６】

いくつかの実施形態において、標的化部分は、例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第１０，１１１，９６５号に記載されているような、細胞透過性ペプチドであり得る。別の実施形態において、標的化部分は、例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、米国特許出願第１６／１３１，５９１号に記載されているような、抗体またはその抗原結合性断片もしくは一本鎖誘導体であり得る。さらなる実施形態において、標的化部分は、核移行シグナルまたは核外移行シグナルについてのアミノ酸配列であり得る。

【００４７】

標的化部分は、標的化された細胞送達のためのプラットフォームに、そのコアと直接的または間接的に結合することにより、連結され得る。例えば、コアがナノ粒子を含む実施形態において、標的化部分のナノ粒子とのコンジュゲーションは、ナノ粒子にＰＥＧを繋ぎ止めるために用いられる類似した官能基を利用することができる。したがって、標的化部分は、標的化部分の官能化を通してナノ粒子と直接的に結合することができる。あるいは、標的化部分は、上記で論じられているように、標的化部分の官能化ＰＥＧとのコンジュゲーションを通して、ナノ粒子と間接的に結合することができる。標的化部分は、共有結合性、非共有結合性、または静電気性相互作用によってコアと接着することができる。一実施形態において、標的化部分はペプチドである。特定の実施形態において、標的化部分は、融合タンパク質のＮ末端と共有結合性に付着するペプチドである。

【００４８】

ｅ．　エピトープ

ある特定の実施形態において、本発明の融合タンパク質は、融合タンパク質に追加の性質を与えることができる任意選択のエピトープまたはタグを含有する。本明細書で用いられる場合、用語「エピトープ」および「タグ」は、典型的には融合タンパク質のＮ末端またはＣ末端と付着する、典型的には３００アミノ酸長以下の、アミノ酸配列を指すのに交換可能に用いられる。一実施形態において、本発明の融合タンパク質はさらに、精製を促進するために用いられるエピトープを含む。下記の表４に提供された、精製に有用なそのようなエピトープの例には、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ配列（配列番号６８）、ＦＬＡＧエピトープ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ、配列番号６９）、Ｈｉｓ６エピトープ（配列番号７０）、ｃ－ｍｙｃ（配列番号７１）、ＨＡ（配列番号７２）、Ｖ５エピトープ（配列番号７３）、またはグルタチオン－ｓ－トランスフェラーゼ（配列番号７４）が挙げられる。別の実施形態において、本発明の融合タンパク質はさらに、対象、例えばヒトへ投与された時、融合タンパク質の半減期を増加させるために用いられるエピトープを含む。半減期を増加させるために有用なそのようなエピトープの例には、ヒトＦｃ配列が挙げられる。したがって、一つの特定の実施形態において、融合タンパク質は、Ｊドメインおよびｐ５３結合性ドメインに加えて、ヒトＦｃエピトープを含む。エピトープは、融合タンパク質のＣ末端に位置する。

【００４９】

【表４】

表4: エピトープの代表例

配列番号	エピトープ	長さ	配列
68	ヒトIgG1 Fcドメイン	232	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
69	FLAGエピトープ	8	DYKDDDDK
70	His6	6	HHHHHH
71	c-myc	10	EQKLISEEDL
72	HA	9	YPYDVPDYA
73	V5エピトープ	14	GKPIPNPLLGLDST
74	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ	220	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDE GDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRY IADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAY SKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHV THPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEA IPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSD

【００５０】

ｆ．　細胞透過性ペプチド

なお他の実施形態において、本明細書に記載された融合タンパク質はさらに、細胞透過性ペプチドを含み得る。細胞透過性ペプチドは、コンジュゲートされたカーゴを、それが小分子であろうと、ペプチドであろうと、タンパク質であろうと、核酸であろうと、細胞へ運ぶことが知られている。本発明の融合タンパク質における細胞透過性ペプチドの非限定的例には、ポリカチオン性ペプチド、例えば、ＨＩＶ　ＴＡＴペプチド４９－５７、ポリアルギニン、およびペネトラチンｐＡｎｔａｎ（４３－５８）、両親媒性ペプチド、例えば、ｐｅｐ－１、疎水性ペプチド、例えば、Ｃ４０５Ｙ、およびその他同種類のものが挙げられる。下記の表５参照。

【００５１】

【表５】

表5: 細胞透過性ペプチドの例

配列番号	長さ	配列
75	9	RKKRRQRRR
76	15	RQIKWFQNRRMKWKK
77	21	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
78	17	CSIPPEVKFNKPFVYLI

【００５２】

したがって、一実施形態において、本融合タンパク質は、細胞透過性ペプチドおよび融合タンパク質を含み、前記細胞透過性ペプチドが、配列番号７５～７８からなる群から選択され、前記融合タンパク質がＪドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む。一実施形態において、前記融合タンパク質は、配列番号８０～９１および１００～１０７からなる

群から選択される。別の実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号７５のシグナル配列、ならびに配列番号８０～９１、１００～１０７からなる群から選択される融合タンパク質を含む。別の実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号７６の細胞透過性ペプチド、ならびに配列番号８０～９１、１００～１０７からなる群から選択される融合タンパク質を含む。なお別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号７７の細胞透過性ペプチド、ならびに配列番号８０～９１、１００～１０７からなる群から選択される融合タンパク質を含む。さらに別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号７８の細胞透過性ペプチド、ならびに配列番号８０～９１、１００～１０７からなる群から選択される融合タンパク質を含む。細胞透過性ペプチドを含む本融合タンパク質構築物を発現する細胞は、対象、例えばヒト対象（例えば、ｐ５３障害を有し、または患うリスクがある患者）へ投与され得る。融合タンパク質は、細胞から分泌され、ｐ５３機能を回復するのを助けおよび／またはｐ５３凝集を低下させる。

【００５３】

ｇ．　Ｊドメインおよびｐ５３結合性ドメインの配置

本明細書に記載された融合タンパク質は、多数の様式で配置され得る。一実施形態において、ｐ５３結合性ドメインは、ＪドメインのＣ末端側へ付着している。別の実施形態において、ｐ５３結合性ドメインは、ＪドメインのＮ末端側へ付着している。ｐ５３結合性ドメインおよびＪドメインは、いずれの立体配置においても、任意で、上記のようなリンカーを介して、分離され得る。

【００５４】

いくつかの実施形態において、Ｊドメインは、複数のｐ５３結合性ドメイン、例えば、２つのｐ５３結合性ドメイン、３つのｐ５３結合性ドメイン、４つのｐ５３結合性ドメイン、またはそれ以上と付着し得る。ｐ５３結合性ドメインは、ＪドメインのＮ末端側へ付着し得る。あるいは、ｐ５３結合性ドメインは、ＪドメインのＣ末端側へ付着し得る。なお別の実施形態において、ｐ５３結合性ドメインは、ＪドメインのＮ末端側およびＣ末端側に付着し得る。複数のｐ５３結合性ドメインのそれぞれは、同じｐ５３結合性ドメインであり得る。別の実施形態において、融合タンパク質における複数のｐ５３結合性ドメインのそれぞれは、異なるｐ５３結合性ドメイン（すなわち、異なる配列）であり得る。

【００５５】

いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、以下の群：

ａ．　ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｂ．　ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｃ．　ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｄ．　Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ、
ｅ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ、
ｆ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ、
ｇ．　Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｈ．　Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｉ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－ＴＴ、
ｊ．　ＴＴＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＴＴＴＴＴＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｋ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｌ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ、
ｍ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｎ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤＮＡＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｏ．　ＤｎａＪ－Ｘ－ＤｎａＪ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－Ｔ、
ｐ．　Ｔ－Ｘ－ＤｎａＪ－Ｘ－ＤｎａＪ、
ｑ．　Ｔ－Ｘ－Ｔ－Ｘ－ＤｎａＪ－Ｘ－ＤｎａＪ、および
ｒ．　Ｔ－Ｘ－ＴＤｎａＪ－Ｘ－ＴＤｎａＪ－Ｘ－ＴＴＴＴ

から選択される構造を含み得、

ここで、

Ｔはｐ５３結合性ドメインであり、
ＤＮＡＪはＪタンパク質のＪドメインであり、
Ｘは任意選択のリンカーである。
【００５６】
一実施形態において、融合タンパク質は、配列番号５、６、１０、２４、および３１からなる群から選択されるＪドメインを含む。一つの特定の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号５のＪドメインを含む。
【００５７】
別の実施形態において、ｐ５３結合性ドメインは、配列番号５１～５６からなる群から選択される。一つの特定の実施形態において、ｐ５３結合性ドメインは、配列番号５１～５２からなる群から選択される。
【００５８】
なお別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号５のＪドメインおよび配列番号５１のｐ５３結合性ドメインを含む。別の実施形態において、融合タンパク質は、配列番号５のＪドメイン、および配列番号５２のｐ５３結合性ドメインの少なくとも２個のコピーを含む。
【００５９】
Ｊドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む融合タンパク質構築物の非限定的例は、図２に模式的に描かれ、下記の表６にも示されている。別の実施形態において、特定の融合タンパク質構築物は、配列番号８０～９１からなる群から選択される。
【００６０】

【表６－１】

表6: 融合タンパク質構築物および対照構築物

構築物番号	配列番号	構築物名	長さ	配列
1	79	Jドメインのみ	75	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKE PGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGS
2	80	JB1-CDB3	89	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKE PGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSG GGGSREDEDEIEW
3	81	JB1-p53BP	87	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKE PGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSG GGGSNPNSAQG
4	82	JB1-scFv1	331	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKE PGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSQ VKLQQSGAELAKPGASVKMSCKTSGYTFTSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGYINPTTGYTKYNQKFKDKATLTADKSSS TAYMQLSSLTNVDSAVYYCTTGYSYFDYWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTIT CSASSSVNYMHWFQQKPGTSPKLWISSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPYTFG GGTKLQIKRAAAGAPVPYPDPLEPRAA
5	83	JB1- scFv2	324	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKE PGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSQ VKLQESGAELVRSGASVNLSCTASGFNIKDYYMHWVKQ RPEEGLEWIGYIDPESGETEYAPNFQGKATVTADTSSN TAYLHLSSLTSEDTTVYYCNAVIYYEYDGYALDYWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPSSLAVSAG EKVAMSCKSSQSLFNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKVLI YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVY YCKQSYNLPTFGGGTKLEIK
6	84	JB1-scFv3	318	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKE PGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSQ VQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQ RPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAPKFQGKATMTADTSSN TAYLQLSSLASEDTAVYYCNFYGDALDYWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSDVLMTQTPLTLSVTIGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYYCWQGTH SPLTFGAGTKLEIK
7	85	JB1-scFv4	308	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKE PGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSQ ESGAELVRSGASVKLSCTTSGFNINDYYMHWVKKRPEQ GLEWIGRIDPENGDADMTRSSGVKATMTADTSSNTAYL QLSSLTSEDTAVYYCNAGMDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GRASGGGGSDIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSV STSGYSYMHWNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFS GSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGT KLEI
8	86	JB6-CDB3	83	MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPEN KEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYGGGGGSRE DEDEIEW
9	87	JB6-p53BP	81	MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPEN KEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYGGGGGSNP NSAQG

【００６１】

【表６－２】

10	88	JB6- scFv1	325	MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPEN KEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYGQVKLQQS GAELAKPGASVKMSCKTSGYTFTSYWMNWVKQRPGQGL EWIGYINPTTGYTKYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQL SSLTNVDSAVYYCTTGYSYFDYWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSS VNYMHWFQQKPGTSPKLWISSTSNLASGVPARFSGSGS GTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPYTFGGGTKLQ IKRAAAGAPVPYPDPLEPRAA
11	89	JB6-scFv2	318	MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPEN KEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYGQVKLQES GAELVRSGASVNLSCTASGFNIKDYYMHWVKQRPEEGL EWIGYIDPESGETEYAPNFQGKATVTADTSSNTAYLHL SSLTSEDTTVYYCNAVIYYEYDGYALDYWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPSSLAVSAGEKVAMS CKSSQSLFNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKVLIYWASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSY NLPTFGGGTKLEIK
12	90	JB6-scFv3	312	MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPEN KEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYGQVQLQQS GAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGL EWIGWIDPENGDTEYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLQL SSLASEDTAVYYCNFYGDALDYWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSDVLMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQS LLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDR FTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYYCWQGTHSPLTFG AGTKLEIK
13	91	JB6-scFv4	302	MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPEN KEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYGQESGAEL VRSGASVKLSCTTSGFNINDYYMHWVKKRPEQGLEWIG RIDPENGDADMTRSSGVKATMTADTSSNTAYLQLSSLT SEDTAVYYCNAGMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGRASGG GGSDIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYS YMHWNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGT DFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGTKLEI
16	100	JB1-G_4S-scFv1	336	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKE PGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSG GGGSQVKLQQSGAELAKPGASVKMSCKTSGYTFTSYWM NWVKQRPGQGLEWIGYINPTTGYTKYNQKFKDKATLTA DKSSSTAYMQLSSLTNVDSAVYYCTTGYSYFDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGE KVTITCSASSSVNYMHWFQQKPGTSPKLWISSTSNLAS GVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSY PYTFGGGTKLQIKRAAAGAPVPYPDPLEPRAA
17	101	JB1-G_4S-scFv2	329	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKE PGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSG GGGSQVKLQESGAELVRSGASVNLSCTASGFNIKDYYM HWVKQRPEEGLEWIGYIDPESGETEYAPNFQGKATVTA DTSSNTAYLHLSSLTSEDTTVYYCNAVIYYEYDGYALD YWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPSSL AVSAGEKVAMSCKSSQSLFNSRTRKNYLAWYQQKPGQS PKVLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAE DLAVYYCKQSYNLPTFGGGTKLEIK

【００６２】

【表６－３】

18	102	JB1-G_4S-scFv3	323	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKE PGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSG GGGSQVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYM HWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAPKFQGKATMTA DTSSNTAYLQLSSLASEDTAVYYCNFYGDALDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVLMTQTPLTLSVTIGQ PASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYL VSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYYC WQGTHSPLTFGAGTKLEIK
19	103	JB1-G_4S-scFv4	313	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKE PGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSG GGGSQESGAELVRSGASVKLSCTTSGFNINDYYMHWVK KRPEQGLEWIGRIDPENGDADMTRSSGVKATMTADTSS NTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNAGMDYWGQGTTVTVSSG GGGSGGGRASGGGGSDIELTQSPASLAVSLGQRATISCR ASKSVSTSGYSYMHWNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGV PARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTR SEGGTKLEI
20	104	JB6-G_4S-scFv1	330	MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPEN KEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYGGGGGSQV KLQQSGAELAKPGASVKMSCKTSGYTFTSYWMNWVKQR PGQGLEWIGYINPTTGYTKYNQKFKDKATLTADKSSST AYMQLSSLTNVDSAVYYCTTGYSYFDYWGQGTTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTITC SASSSVNYMHWFQQKPGTSPKLWISSTSNLASGVPARF SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPYTFGG GTKLQIKRAAAGAPVPYPDPLEPRAA
21	105	JB6-G_4S-scFv2	323	MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPEN KEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYGGGGGSQV KLQESGAELVRSGASVNLSCTASGFNIKDYYMHWVKQR PEEGLEWIGYIDPESGETEYAPNFQGKATVTADTSSNT AYLHLSSLTSEDTTVYYCNAVIYYEYDGYALDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPSSLAVSAGE KVAMSCKSSQSLFNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKVLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYY CKQSYNLPTFGGGTKLEIK
22	106	JB6-G_4S-scFv3	317	MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPEN KEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYGGGGGSQV QLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQR PEQGLEWIGWIDPENGDTEYAPKFQGKATMTADTSSNT AYLQLSSLASEDTAVYYCNFYGDALDYWGQGTTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDVLMTQTPLTLSVTIGQPASISC KSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDS GVPDRFTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYYCWQGTHS PLTFGAGTKLEIK
23	107	JB6-G_4S-scFv4	307	MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPEN KEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYGGGGGSQE SGAELVRSGASVKLSCTTSGFNINDYYMHWVKKRPEQG LEWIGRIDPENGDADMTRSSGVKATMTADTSSNTAYLQ LSSLTSEDTAVYYCNAGMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGG RASGGGGSDIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVS TSGYSYMHWNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSG SGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGTK LEI

【００６３】

ＩＩ．　融合タンパク質構築物をコードする核酸

本発明の別の態様によれば、（ａ）前述の実施形態のいずれかに記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、または（ｂ）（ａ）のポリヌクレオチドの相補体から選択されるポリヌクレオチドを含む、単離された核酸が提供される。本発明は、Ｊドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む融合タンパク質をコードする、単離された核酸、ならびに融合タンパク質をコードするそのような核酸分子と相補的な配列、加えて、その相同バリアントを提供する。別の態様において、本発明は、本明細書に開示された融合タンパク質をコードする核酸、融合タンパク質をコードする核酸と相補的な配列、加えて、その

相同バリアントを作製するための方法を包含する。本発明のこの態様による核酸は、プレメッセンジャーＲＮＡ（ｐｒｅ－ｍＲＮＡ）、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）、ＰＣＲ増幅されたＤＮＡ、相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、合成ＤＮＡ、または組換えＤＮＡであり得る。

【００６４】

さらに別の態様において、（ａ）融合タンパク質をコードするヌクレオチドを合成しおよび／またはアセンブルするステップ、（ｂ）コード遺伝子を、宿主細胞に適切な発現ベクターへ組み入れるステップ、（ｃ）適切な宿主細胞を発現ベクターで形質転換するステップ、ならびに（ｄ）融合タンパク質が形質転換宿主細胞において発現することを引き起こしまたは可能にする条件下で宿主細胞を培養し、それにより、生物活性融合タンパク質を産生し、産生された生物活性融合タンパク質が、当技術分野において知られた標準タンパク質精製方法によって、単離された融合タンパク質として回収される、ステップを含む、融合タンパク質を産生する方法が開示される。分子生物学における標準組換え技術が、本発明のポリヌクレオチドおよび発現ベクターを作製するために用いられる。

【００６５】

本発明によれば、本明細書に開示された融合タンパク質をコードする核酸配列（またはその相補体）は、適切な宿主細胞において融合タンパク質の発現を指示する組換えＤＮＡ分子を作製するために用いられる。いくつかのクローニングストラテジーは、本発明を実施するのに適しており、その多くは、本発明の融合タンパク質またはその相補体をコードする遺伝子を含む構築物を作製するために用いられる。いくつかの実施形態において、クローニングストラテジーは、本発明の融合タンパク質またはその相補体をコードする遺伝子を産生するために用いられる。

【００６６】

ある特定の実施形態において、１つまたは複数の融合タンパク質をコードする核酸は、ＲＮＡ分子であり、プレメッセンジャーＲＮＡ（ｐｒｅ－ｍＲＮＡ）、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）、ＰＣＲ増幅されたＤＮＡ、相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、合成ＤＮＡ、または組換えＤＮＡであり得る。

【００６７】

様々な実施形態において、核酸は、所望のポリペプチドを一過性に発現するために細胞へ導入されるｍＲＮＡである。本明細書で用いられる場合、「一過性の」は、数時間、数日間、または数週間の期間の間の、組み込まれていない導入遺伝子の発現を指し、発現の期間は、ゲノムへ組み込まれ、または細胞における安定なプラスミドレプリコン内に含有される場合のポリヌクレオチドの発現についての期間より短い。

【００６８】

特定の実施形態において、ポリペプチドをコードするｍＲＮＡは、インビトロで転写されたｍＲＮＡである。本明細書で用いられる場合、「インビトロで転写されたＲＮＡ」とは、インビトロで合成されているＲＮＡ、好ましくはｍＲＮＡを指す。一般的に、インビトロで転写されたＲＮＡは、インビトロ転写ベクターから生成される。インビトロ転写ベクターは、インビトロで転写されたＲＮＡを生成するために用いられる鋳型を含む。

【００６９】

特定の実施形態において、ｍＲＮＡはさらに、５’キャップもしくは修飾５’キャップおよび／またはポリ（Ａ）配列を含み得る。本明細書で用いられる場合、５’キャップ（ＲＮＡキャップ、ＲＮＡ　７－メチルグアノシンキャップ、またはＲＮＡ　ｍ７Ｇキャップとも呼ばれる）は、転写の開始後すぐに真核生物メッセンジャーＲＮＡの「最前部（ｆｒｏｎｔ）」または５’末端に付加されている修飾グアニンヌクレオチドである。５’キャップは、最初に転写されたヌクレオチドに連結され、かつリボソームによって認識され、かつＲｎアーゼから保護される末端基を含む。キャッピング部分は、ｍＲＮＡの機能性、例えば、その安定性または翻訳の効率を調節するために修飾され得る。特定の実施形態において、ｍＲＮＡは、約５０個から約５０００個の間のアデニンのポリ（Ａ）配列を含む。一実施形態において、ｍＲＮＡは、約１００塩基から約１０００塩基の間、約２００塩基

から約５００塩基の間、または約３００塩基から約４００塩基の間のポリ（Ａ）配列を含む。一実施形態において、ｍＲＮＡは、約６５塩基、約１００塩基、約２００塩基、約３００塩基、約４００塩基、約５００塩基、約６００塩基、約７００塩基、約８００塩基、約９００塩基、または約１０００塩基もしくはそれ以上のポリ（Ａ）配列を含む。ポリ（Ａ）配列は、ｍＲＮＡの機能性、例えば、局在化、安定性、または翻訳の効率を調節するために化学的または酵素的に修飾され得る。

【００７０】

本明細書で用いられる場合、用語「ポリヌクレオチドバリアント」および「バリアント」およびその他同種類のものは、参照ポリヌクレオチド配列と実質的な配列同一性を示すポリヌクレオチド、または以下で定義されるストリンジェントな条件下で参照配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドを指す。これらの用語は、参照ポリヌクレオチドと比較して、１個または複数のヌクレオチドが、付加し、または欠失し、または異なるヌクレオチドに置き換えられているポリヌクレオチドを含む。この点において、変異、付加、欠失、および置換を含むある特定の変更を、参照ポリヌクレオチドに行うことができ、それにより変更されたポリヌクレオチドが、参照ポリヌクレオチドの生物学的機能または活性を保持することは、当技術分野においてよく理解されている。

【００７１】

ある特定の実施形態において、核酸配列は、目的の遺伝子（例えば、Ｊドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む融合タンパク質）をコードするヌクレオチド配列を核酸カセット内に含む。本明細書で用いられる場合、用語「核酸カセット」または「発現カセット」は、ＲＮＡおよびその後、ポリペプチドを発現することができるベクター内の遺伝的配列を指す。一実施形態において、核酸カセットは、目的の遺伝子、例えば、目的のポリヌクレオチドを含有する。別の実施形態において、核酸カセットは、１つまたは複数の発現制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリ（Ａ）配列、および目的の遺伝子、例えば目的のポリヌクレオチドを含有する。ベクターは、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、または１０個、またはそれ以上の核酸カセットを含み得る。核酸カセットは、カセット内の核酸がＲＮＡへ転写され、必要に応じて、タンパク質もしくはポリペプチドへ翻訳され、形質転換細胞における活性に必要とされる適切な翻訳後修飾を起こし、適切な細胞内コンパートメントへと標的化することまたは細胞外のコンパートメントへの分泌により、生物活性のために適切なコンパートメントへと転位することができるように、ベクター内に位置的にかつ順序的に方向づけられる。好ましくは、カセットは、ベクターへの即時挿入に適応した３’および５’末端を有し、例えば、それは、各末端に制限エンドヌクレアーゼ部位を有する。カセットは、単一ユニットとして、プラスミドまたはウイルスベクターへ除去および挿入され得る。

【００７２】

特定の実施形態における使用に適した実例的な遍在性発現制御配列には、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）最初期プロモーター、ウイルスのサルウイルス４０（ＳＶ４０）（例えば初期または後期）、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）ＬＴＲプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲ、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）（チミジンキナーゼ）プロモーター、ワクシニアウイルス由来のＨ５、Ｐ７．５、およびＰｌ　ｌプロモーター、伸長因子１－アルファ（ＥＦｌａ）プロモーター、初期増殖応答１（ＥＧＲ１）、フェリチンＨ（ＦｅｒＨ）、フェリチンＬ（ＦｅｒＬ）、グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）、真核生物の翻訳開始因子４Ａ１（ＥＩＦ４Ａ１）、熱ショック７０ｋＤａタンパク質５（ＨＳＰＡ５）、熱ショックタンパク質９０ｋＤａベータ、メンバー１（ＨＳＰ９０Ｂ１）、熱ショックタンパク質７０ｋＤａ（ＨＳＰ７０）、β－キネシン（ｂ－ＫＩＮ）、ヒトＲＯＳＡ　２６遺伝子座（Ｉｒｉｏｎｓら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２５、１４７７～１４８２（２００７））、ユビキチンＣプロモーター（ＵＢＣ）、ホスホグリセリン酸キナーゼ１（ＰＧＫ）プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリβ－アクチン（ＣＡＧ）プロモーター（Ｏｋａｂｅら　（１９９７）ＦＥＢＳ　ｌｅｔ．４０７：３１３～９）、ｂ－アク

チンプロモーターおよび骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負制御領域が欠失し、ｄｌ５８７ｒｅｖプライマー結合部位に置換された（ＭＮＤ）Ｕ３プロモーター（Ｈａａｓら、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ．２００３；７７（ｌ７）：９４３９～９４５０）が挙げられるが、それらに限定されない。

【００７３】

一実施形態において、プロモーターなどの導入遺伝子標的特異性および発現を増強するための少なくとも１つのエレメント（例えば、Ｐｏｗｅｌｌら （２０１５）Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ １９（１０２）：４９～５７（その内容は、全体として参照により本明細書に組み入れられている）参照）が、本明細書に記載されたポリヌクレオチドと共に用いられ得る。たいていの組織において発現を促進するプロモーターには、ヒト伸長因子ｌａ－サブユニット（ＥＦｌａ）、最初期サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ニワトリβ－アクチン（ＣＢＡ）およびその誘導体ＣＡＧ、βグルクロニダーゼ（ＧＵＳＢ）、またはユビキチンＣ（ＵＢＣ）が挙げられるが、それらに限定されない。組織特異的発現エレメントは、ある特定の細胞型へ発現を制限するために用いられ、それには、例えば、ニューロン、アストロサイト、またはオリゴデンドロサイトへ発現を制限するために用いられ得る神経系プロモーターが挙げられるが、それらに限定されない。ニューロンについての組織特異的発現エレメントの非限定的例には、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、血小板由来成長因子Ｂ鎖（ＰＤＧＦ－β）、シナプシン（Ｓｙｎ）、メチルＣｐＧ結合タンパク質２（ＭｅＣＰ２）、ＣａＭＫＩＩ、ｍＧｌｕＲ２、ＮＦＬ、ＮＦＨ、ηβ２、ＰＰＥ、Ｅｎｋ、およびＥＡＡＴ２のプロモーターが挙げられるが、それらに限定されない。アストロサイトについての組織特異的発現エレメントの非限定的例には、グリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）およびＥＡＡＴ２のプロモーターが挙げられる。オリゴデンドロサイトについての組織特異的発現エレメントの非限定的例には、ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）プロモーターが挙げられる。Ｙｕら（全体として参照により組み入れられた（２０１１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐａｉｎ、７：６３）は、ラットＤＲＧ細胞および一次ＤＲＧ細胞におけるＣＡＧ、ＥＦＩａ、ＰＧＫ、およびＵＢＣプロモーター下でのｅＧＦＰの発現を、レンチウイルスベクターを用いて評価し、ＵＢＣが、他の３つのプロモーターより弱い発現を示し、全てのプロモーターについてたった１０～１２％だけのグリア発現があることを見出した。Ｓｏｄｅｒｂｌｏｍら（全体として参照により組み入れられた、Ｅ．Ｎｅｕｒｏ ２０１５）は、ＣＭＶおよびＵＢＣプロモーターを有するＡＡＶ８ならびにＣＭＶプロモーターを有するＡＡＶ２におけるｅＧＦＰの発現を、運動皮質内の注射後、評価した。ＵＢＣまたはＥＦＩａプロモーターを含有するプラスミドの鼻腔内投与は、ＣＭＶプロモーターでの発現より高い持続性気道発現を示した（例えば、全体として参照により組み入れられた、Ｇｉｌｌら、（２００１）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ、８巻、１５３９～１５４６参照）。Ｈｕｓａｉｎら（全体として参照により組み入れられた（２００９）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ）は、ｈＧＵＳＢプロモーター、ＨＳＶ－１ＬＡＴプロモーター、およびＮＳＥプロモーターを有するＨβＨ構築物を評価し、ＨβＨ構築物が、マウス脳においてＮＳＥより弱い発現を示すことを見出した。ＰａｓｓｉｎｉおよびＷｏｌｆｅ（全体として参照により組み入れられた、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．２００１、１２３８２～１２３９２）は、新生仔マウスにおける脳室内注射後のＨβＨベクターの長期効果を評価し、少なくとも１年間の持続性発現があることを見出した。Ｘｕら（全体として参照により組み入れられた、（２００１）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ、８、１３２３～１３３２）により、ＣＭＶ－ｌａｃＺ、ＣＭＶ－ｌｕｃ、ＥＦ、ＧＦＡＰ、ｈＥＮＫ、ｎＡＣｈＲ、ＰＰＥ、ＰＰＥ＋ｗｐｒｅ、ＮＳＥ（０．３ｋｂ）、ＮＳＥ（１．８ｋｂ）、およびＮＳＥ（１．８ｋｂ＋ｗｐｒｅ）との比較として、ＮＦ－ＬおよびＮＦ－Ｈプロモーターが用いられた場合、全ての脳領域における低発現が見出された。Ｘｕらは、プロモーター活性が、降順で、ＮＳＥ（１．８ｋｂ）、ＥＦ、ＮＳＥ（０．３ｋｂ）、ＧＦＡＰ、ＣＭＶ、ｈＥＮＫ、ＰＰＥ、ＮＦＬ、およびＮＦＨであることを見出した。ＮＦＬは６５０ヌクレオチドのプロモーターであり、ＮＦＨは、９２０ヌクレオチドのプロモーターであり、両方とも肝臓に存在しないが、

ＮＦＨが、自己受容感覚ニューロン、脳、および脊髄において豊富であり、ＮＦＨは心臓に存在する。Ｓｃｎ８ａは、４７０ヌクレオチドのプロモーターであり、ＤＲＧ、脊髄、および脳中に発現し、特に、海馬ニューロンおよび小脳プルキンエ細胞、皮質、視床および視床下部に特に高い発現が見られる。（例えば、全体として参照により組み入れられた、Ｄｒｅｗｓら　２００７およびＲａｙｍｏｎｄら　２００４参照）。

【００７４】

ＩＩＩ．　融合タンパク質をコードする核酸を含むベクター

本発明による核酸を含むベクターもまた提供される。そのようなベクターは、好ましくは、ホスファターゼをコードする核酸配列の転写／翻訳に必要なエレメント（例えば、プロモーターおよび／またはターミネーター配列）などの追加の核酸配列を含む。前記ベクターはまた、前記ベクターで形質転換された宿主細胞を選択または維持するために選択マーカー（例えば、抗生物質）をコードする核酸配列を含み得る。用語「ベクター」は、別の核酸分子を移入させまたは輸送する能力がある核酸分子を指す。移入した核酸は、一般的に、ベクター核酸分子と連結され、例えば、その中へ挿入される。ベクターは、細胞において自己複製を指示する配列を含み得、または宿主細胞ＤＮＡへの組込みを可能にするのに十分な配列を含み得る。特定の実施形態において、非ウイルスベクターは、本明細書で企図された１つまたは複数のポリヌクレオチドを罹患細胞（例えば、神経細胞）へ送達するために用いられる。一実施形態において、ベクターは、Ｊドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む融合タンパク質をコードする、インビトロで合成されまたは合成的に調製されたｍＲＮＡである。非ウイルスベクターの実例には、ｍＲＮＡ、プラスミド（例えば、ＤＮＡプラスミドまたはＲＮＡプラスミド）、トランスポゾン、コスミド、および細菌人工染色体が挙げられるが、それらに限定されない。

【００７５】

ベクターの実例には、プラスミド、自己複製配列、および転位因子、例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃ、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ、Ｍｏｓｌ、Ｔｃｌ／ｍａｒｉｎｅｒ、Ｔｏｌ２、ｍｉｎｉ－Ｔｏｌ２、Ｔｃ３、ＭｕＡ、Ｈｉｍａｒ　Ｉ、Ｆｒｏｇ　Ｐｒｉｎｃｅ、およびそれらの誘導体が挙げられるが、それらに限定されない。ベクターの追加の実例には、非限定的に、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、またはＰｌ由来人工染色体（ＰＡＣ）などの人工染色体、ラムダファージまたはＭ１３ファージなどのバクテリオファージ、および動物ウイルスが挙げられる。ベクターとして有用なウイルスの実例には、非限定的に、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス（ｖｉｍｓ））、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、およびパポバウイルス（例えば、ＳＶ４０）が挙げられる。発現ベクターの実例には、哺乳動物細胞における発現のためのｐＣｌｎｅｏベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ）；哺乳動物細胞におけるレンチウイルス媒介性遺伝子移入および発現のためのｐＬｅｎｔｉ４／Ｖ　５－ＤＥＳＴ（商標）、ｐＬｅｎｔｉ６／Ｖ　５－ＤＥＳＴ（商標）、およびｐＬｅｎｔｉ６．２／Ｖ　５－ＧＷ／ｌａｃＺ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）が挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態において、本明細書に開示されたポリペプチドのコード配列は、哺乳動物細胞におけるポリペプチドの発現のためにそのような発現ベクターへライゲーションされ得る。

【００７６】

特定の実施形態において、ベクターは、エピソームベクター、または染色体外に維持されるベクターである。本明細書で用いられる場合、用語「エピソームの」は、宿主の染色体ＤＮＡへの組込みなしに、かつ分裂する宿主細胞から徐々に失われることなしに複製することができる、つまり、前記ベクターが染色体外にまたはエピソーム的に複製する、ベクターを指す。

【００７７】

ベクターは、様々な部位特異的リコンビナーゼのいずれかについての１つまたは複数の組換え部位を含み得る。部位特異的リコンビナーゼについての標的部位が、ベクター、例

えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターの組込みに必要とされる任意の部位に加えてであることは、理解されるべきである。本明細書で用いられる場合、用語「組換え配列」、「組換え部位」、または「部位特異的組換え部位」は、リコンビナーゼが認識しかつ結合する特定の核酸配列を指す。

【００７８】

例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼについての１つの組換え部位は、８塩基対コア配列に隣接する２つの１３塩基対逆方向反復（リコンビナーゼ結合部位として働く）を含む３４塩基対配列である、ｌｏｘＰである（Ｓａｕｅｒ，Ｂ．、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ５：５２１～５２７（１９９４）の図１参照）。ＦＬＰリコンビナーゼについての適切な認識部位には、ＦＲＴ（ＭｃＬｅｏｄら、１９９６）、ＦＩ、Ｆ２、Ｆ３（ＳｃｈｌａｋｅおよびＢｏｄｅ、１９９４）、ＦｙＦｓ（ＳｃｈｌａｋｅおよびＢｏｄｅ、１９９４）、ＦＲＴ（ＬＥ）（Ｓｅｎｅｃｏｆｆら、１９８８）、ＦＲＴ（ＲＥ）（Ｓｅｎｅｃｏｆｆら、１９８８）が挙げられるが、それらに限定されない。

【００７９】

認識配列の他の例は、ａｔｔＢ、ａｔｔＰ、ａｔｔＬ、およびａｔｔＲ配列であり、それらは、リコンビナーゼ酵素ｌインテグラーゼ、例えば、ｐｈｉ－ｃ３ｌによって認識される。（ｐＣ３ｌ ＳＳＲは、ヘテロタイプな部位、ａｔｔＢ（３４ｂｐ長）とａｔｔＰ（３９ｂｐ長）の間のみの組換えを媒介する（Ｇｒｏｔｈら、２０００）。細菌ゲノムおよびファージゲノム、それぞれにおけるファージインテグラーゼについての付着部位に関して名付けられたａｔｔＢおよびａｔｔＰはどちらも、おそらくφ０３１ホモダイマーにより結合される、不完全な逆方向反復を含有する（Ｇｒｏｔｈら、２０００）。生成部位、ａｔｔＬおよびａｔｔＲは、事実上、さらなるｔｐＱＡ １媒介性組換えに対して不活性であり（Ｂｅｌｔｅｋｉら、２００３）、反応を不可逆性にさせている。挿入を触媒することについて、ａｔｔＢ保有ＤＮＡは、ａｔｔＰ部位がゲノムａｔｔＢ部位へ挿入するより容易に、ゲノムａｔｔＰ部位へ挿入することが見出されている（Ｔｈｙａｇａｒａｊａｎら、２００１；Ｂｅｌｔｅｋｉら、２００３）。したがって、典型的なストラテジーは、相同組換えにより、ａｔｔＰ保有「ドッキング部位」を、限定された遺伝子座へ位置づけ、その後、そのａｔｔＰ保有「ドッキング部位」が、挿入としてのａｔｔＢ保有の入ってくる配列とパートナーを組まされる。

【００８０】

本明細書で用いられる場合、「配列内リボソーム進入部位」または「ＩＲＥＳ」は、シストロン（タンパク質コード領域）のＡＴＧなどの開始コドンへの直接的な配列内リボソーム進入を促進し、それにより、遺伝子のキャップ非依存性翻訳をもたらすエレメントを指す。例えば、Ｊａｃｋｓｏｎら、１９９０ Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｃｉ １５（１２）：４７７～８３、ならびにＪａｃｋｓｏｎおよびＫａｍｉｎｓｋｉ １９９５ ＲＮＡ １（１０）：９８５～１０００参照。特定の実施形態において、ベクターは、１つまたは複数のポリペプチドをコードする１つまたは複数の目的のポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、複数のポリペプチドのそれぞれの効率的な翻訳を達成するために、ポリヌクレオチド配列は、１つもしくは複数のＩＲＥＳ配列、または自己切断性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列によって分離され得る。一実施形態において、本明細書で企図されるポリヌクレオチドに用いられるＩＲＥＳは、ＥＭＣＶ ＩＲＥＳである。

【００８１】

本明細書で用いられる場合、用語「コザック配列」は、リボソームの小サブユニットとのｍＲＮＡの最初の結合を大いに促進し、翻訳を増加させる、短いヌクレオチド配列を指す（Ｋｏｚａｋ、１９８６、Ｃｅｌｌ ４４（２）：２８３～９２、およびＫｏｚａｋ、１９８７、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１５（２０）：８１２５－４８）。特定の実施形態において、ベクターは、コンセンサスコザック配列を有するポリヌクレオチド、ならびにＪドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む融合タンパク質をコードする

ポリヌクレオチドを含む。異種性核酸転写物の効率的な終結およびポリアデニル化を方向づけるエレメントは、異種性遺伝子発現を増加させる。転写終結シグナルは、一般的に、ポリアデニル化シグナルの下流に見出される。特定の実施形態において、ベクターは、発現されるべきポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの３’側にポリアデニル化配列を含む。

【００８２】

本明細書で企図された特定の実施形態における使用に適したウイルスベクター系の実例には、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、およびワクシニアウイルスのベクターが挙げられるが、それらに限定されない。

【００８３】

様々な実施形態において、Ｊドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む融合タンパク質をコードする１つまたは複数のポリヌクレオチドは、細胞、例えば、神経細胞へ、１つまたは複数のポリヌクレオチドを含む組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）を細胞に形質導入することにより、導入される。ＡＡＶは、小さい（約２６ｎｍ）複製欠損の、主にエピソーム性の、無エンベロープのウイルスである。ＡＡＶは、分裂細胞と非分裂細胞の両方に感染することができ、そのゲノムを宿主細胞のゲノムへ組み入れ得る。組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）は、典型的には、最小限で、導入遺伝子、ならびにその制御配列、ならびに５’および３’　ＡＡＶ末端逆位配列（ＩＴＲ）で構成される。ＩＴＲ配列は、約１４５ｂｐ長である。特定の実施形態において、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２（例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、ＵＳ６９６２８１５Ｂ２に記載された）、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５（例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、ＵＳ７４７９５５４Ｂ２に記載された）、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８（例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、ＵＳ７２８２１９９Ｂ２に記載された）、ＡＡＶ９（例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、ＵＳ９７３７６１８Ｂ２に記載された）、ＡＡＶ　ｒｈ１０（例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、ＵＳ９７９０４７２Ｂ２に記載された）、またはＡＡＶ１０から単離されたＩＴＲおよびカプシド配列を含む。一実施形態において、本発明のベクターは、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、およびＡＡＶ　ｒｈ１０からなる群から選択されるカプシド内へ被包される。一実施形態において、ベクターは、ＡＡＶ２内に被包される。一実施形態において、ベクターは、ＡＡＶ５内に被包される。一実施形態において、ベクターは、ＡＡＶ８内に被包される。一実施形態において、ベクターは、ＡＡＶ９内に被包される。なお一実施形態において、ベクターは、ＡＡＶ　ｒｈ１０内に被包される。

【００８４】

いくつかの実施形態において、ＩＴＲ配列が１つのＡＡＶ血清型から単離され、かつカプシド配列が異なるＡＡＶ血清型から単離されているキメラｒＡＡＶが用いられる。例えば、ＡＡＶ２に由来したＩＴＲ配列およびＡＡＶ６に由来したカプシド配列を有するｒＡＡＶは、ＡＡＶ２／ＡＡＶ６と呼ばれる。特定の実施形態において、ｒＡＡＶベクターは、ＡＡＶ２に由来したＩＴＲ、およびＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、またはＡＡＶ１０のいずれか１つに由来したカプシドタンパク質を含み得る。好ましい実施形態において、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ２に由来したＩＴＲ配列およびＡＡＶ６に由来したカプシド配列を含む。好ましい実施形態において、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ２に由来したＩＴＲ配列およびＡＡＶ２に由来したカプシド配列を含む。

【００８５】

いくつかの実施形態において、操作および選択方法は、目的の細胞を形質導入する可能性をより高くするために、ＡＡＶカプシドへ適用することができる。

【００８６】

ｒＡＡＶベクターの構築、その産生および精製は、例えば、米国特許第９，１６９，４

９４号；第９，１６９，４９２号；第９，０１２，２２４号；第８，８８９，６４１号；第８，８０９，０５８号；および第８，７８４，７９９号に開示されており、それらの特許のそれぞれは、全体として参照により本明細書に組み入れられている。

【００８７】

ＩＶ．　送達

特定の実施形態において、Ｊドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む融合タンパク質をコードする１つまたは複数のポリヌクレオチドは、非ウイルスまたはウイルスのベクターにより細胞へ導入される。特定の実施形態において企図されたポリヌクレオチドの非ウイルス性送達の実例的方法には、エレクトロポレーション、ソノポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ナノ粒子、ポリカチオンまたは脂質核酸コンジュゲート、裸のＤＮＡ、人工ビリオン、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介性移入、遺伝子銃、および熱ショックが挙げられるが、それらに限定されない。

【００８８】

特定の実施形態において企図された特定の実施形態における使用に適したポリヌクレオチド送達系の実例には、Ａｍａｘａ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍａｘｃｙｔｅ，Ｉｎｃ．、ＢＴＸ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、およびＣｏｐｅｒｎｉｃｕｓ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　Ｉｎｃ．により提供される送達系が挙げられるが、それらに限定されない。リポフェクション試薬は、商業的に販売されている（例えば、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ（商標）およびＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎ（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適しているカチオン性および中性脂質は、文献に記載されている。例えば、Ｌｉｕら、（２００３）Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　１０：１８０～１８７；およびＢａｌａｚｓら、（２０Ｗ）Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　２０１１：１～１２参照。抗体により標的化された、細菌由来の、非生存のナノセルに基づいた送達もまた、特定の実施形態において企図される。

【００８９】

特定の実施形態において企図されたポリヌクレオチドを含むウイルスベクターは、インビボで、個々の患者への投与により、典型的には、下に記載されているように、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、または頭蓋内の注入）により、くも膜下腔内注射、脳室内注射、または局所適用により、送達され得る。あるいは、ベクターは、個々の患者（例えば、動員末梢血、リンパ球、骨髄液、組織生検など）から外植された細胞または万能ドナーの造血幹細胞などのエクスビボでの細胞へ送達され、その後、その細胞を患者へ再植え込みされ得る。

【００９０】

一実施形態において、本明細書に開示された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むウイルスベクターは、インビボでの細胞の形質導入のために生物体へ直接的に投与される。

【００９１】

あるいは、裸のＤＮＡが投与され得る。投与は、分子を血液または組織細胞との最終的な接触へ導入するために通常用いられる経路のいずれかによってであり、その経路には、注射、注入、局所適用、およびエレクトロポレーションが挙げられるが、それらに限定されない。そのような核酸を投与する適切な方法が利用でき、当業者によく知られており、特定の組成物を投与するために１つより多い経路を用いることができるが、特定の経路が、別の経路より速効性が高くかつより効果的な反応を提供することができる。

【００９２】

様々な実施形態において、本明細書に開示された融合タンパク質をコードする１つまたは複数のポリヌクレオチドは、細胞、例えば、神経細胞または神経幹細胞へ、１つまたは複数のポリヌクレオチドを含むレトロウイルス、例えばレンチウイルスを細胞に形質導入することにより、導入される。本明細書で用いられる場合、用語「レトロウイルス」は、そのゲノムＲＮＡを直鎖状二本鎖ＤＮＡコピーへ転写し、その後、そのゲノムＤＮＡを宿

主ゲノムへ共有結合性に組み込む、ＲＮＡウイルスを指す。特定の実施形態における使用に適した実例的なレトロウイルスには、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭｕＬＶ）、モロニーマウス肉腫ウイルス（ＭｏＭＳＶ）、ハーベイマウス肉腫ウイルス（ＨａＭｕＳＶ）、マウス乳癌ウイルス（ＭｕＭＴＶ）、テナガザル白血病ウイルス（ＧａＬＶ）、ネコ白血病ウイルス（ＦＬＶ）、スプーマウイルス、フレンドマウス白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス（ＭＳＣＶ）、およびラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）、ならびにレンチウイルスが挙げられるが、それらに限定されない。本明細書で用いられる場合、用語「レンチウイルス」は、複雑なレンチウイルスの一群（または一属）を指す。実例的なレンチウイルスには、ＨＩＶ（ヒト免疫不全ウイルス；ＨＩＶ　１型およびＨＩＶ　２型を含む）；ビスナ・マエディウイルス（ＶＭＶ）；ヤギ関節炎脳炎ウイルス（ＣＡＥＶ）；ウマ伝染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）；ネコ免疫不全ウイルス（ＦＩＶ）；ウシ免疫不全ウイルス（ＢＩＶ）；およびサル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）が挙げられるが、それらに限定されない。一実施形態において、ＨＩＶに基づいたベクターバックボーン（すなわち、ＨＩＶシス作用性配列エレメント）が好ましい。

【００９３】

レンチウイルスベクターは、好ましくは、ＬＴＲを改変することの結果としてのいくつかの安全性の増強を含有する。「自己不活性化」（ＳＩＮ）ベクターは、複製欠損ベクター、例えば、Ｕ３領域として知られた、右側（３’）のＬＴＲエンハンサー－プロモーター領域が、ウイルス複製の最初のラウンドを超えてのウイルス転写を防止するように（例えば、欠失または置換により）改変されている、ベクターを指す。追加の安全性増強は、５’　ＬＴＲのＵ３領域を、ウイルス粒子の産生中にウイルスゲノムの転写を駆動させる異種性プロモーターと置き換えることにより提供される。用いられ得る異種性プロモーターの例には、例えば、ウイルスのサルウイルス４０（ＳＶ４０）（例えば、初期または後期）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）（例えば、最初期）、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）、および単純ヘルペスウイルス（ｖｉｍｓ）（ＨＳＶ）（チミジンキナーゼ）のプロモーターが挙げられる。ある特定の実施形態において、レンチウイルスベクターは、公知の方法に従って作製される。例えば、Ｋｕｔｎｅｒら、ＢＭＣ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００９；９：１０　Ｄｏｉ：１０．１１８６／１４７２－６７５０－９－１０；Ｋｕｔｎｅｒら、Ｎａｔ．Ｐｒｏｔｏｃ．２００９；４（４）：４９５～５０５　Ｄｏｉ：ｌ０．ｌ０３８／ｎｐｒｏｔ．２００９．２２参照。

【００９４】

本明細書で企図されたある特定の実施形態によれば、ウイルスベクターバックボーン配列の大部分または全部は、レンチウイルス、例えばＨＩＶ－１に由来している。しかしながら、レトロウイルスおよび／もしくはレンチウイルス配列の多くの異なる源が用いられ得、またはレンチウイルス配列のある部分における組み合わせられた多数の置換および変更が、トランスファーベクターが本明細書に記載された機能を実施する能力を損なうことなく、受け入れられ得ることは理解されるべきである。さらに、様々なレンチウイルスベクターが当技術分野において知られており、Ｎａｌｄｉｎｉら（ｌ９９６ａ、ｌ９９６ｂ、および１９９８）；Ｚｕｆｆｅｒｅｙら、（１９９７）；Ｄｕｌｌら、１９９８、米国特許第６，０１３，５１６号；および第５，９９４，１３６号を参照されたい（それらの多くは、本明細書で企図されたウイルスベクターまたはトランスファープラスミドを作製するように適応し得る）。

【００９５】

様々な実施形態において、本明細書に開示された融合タンパク質をコードする１つまたは複数のポリヌクレオチドは、標的細胞へ、１つまたは複数のポリヌクレオチドを含むアデノウイルスを細胞へ形質導入することにより導入される。アデノウイルスに基づいたベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率の能力があり、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターを用いて、高い力価および高いレベルの発現が得られている。このベクターは、相対的に単純な系において大量に産生され得る。たいていのアデノ

ウイルスベクターは、導入遺伝子がＡｄ　Ｅｌａ、Ｅｌｂ、および／またはＥ３遺伝子を置き換えるように操作され、その後、その複製欠損ベクターが、欠失した遺伝子機能をトランスに供給するヒト２９３細胞において増殖される。Ａｄベクターは、肝臓、腎臓、および筋肉内で見出される細胞などの非分裂性の分化細胞を含む複数の型の組織をインビボで形質導入することができる。通常のＡｄベクターは、大きな運搬能を有する。

【００９６】

複製欠損である、現在のアデノウイルスベクターの生成および伝播は、２９３と名付けられた固有のヘルパー細胞株を利用し得、その細胞株は、ヒト胚性腎臓細胞からＡｄ５ＤＮＡ断片により形質転換され、Ｅｌタンパク質を構成的に発現する（Ｇｒａｈａｍら、１９７７）。Ｅ３領域は、アデノウイルスゲノムからなくても済むため（Ｊｏｎｅｓ　＆　Ｓｈｅｎｋ、１９７８）、２９３細胞の助けを借りる現在のアデノウイルスベクターは、Ｅｌ、Ｅ３、または両方のいずれかの領域において外来ＤＮＡを有する（Ｇｒａｈａｍ　＆　Ｐｒｅｖｅｃ、１９９１）。アデノウイルスベクターは、真核生物遺伝子発現（Ｌｅｖｒｅｒｏら、１９９１；Ｇｏｍｅｚ－Ｆｏｉｘら、１９９２）およびワクチン開発（Ｇｒｕｎｈａｕｓ　＆　Ｈｏｒｗｉｔｚ、１９９２；Ｇｒａｈａｍ　＆　Ｐｒｅｖｅｃ、１９９２）に用いられている。異なる組織へ組換えアデノウイルスを投与することにおける研究には、気管滴下（Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、１９９１；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、１９９２）、筋肉注射（Ｒａｇｏｔら、１９９３）、末梢静脈内注射（Ｈｅｒｚ　＆　Ｇｅｒａｒｄ、１９９３）、および脳への定位接種（Ｌｅ　Ｇａｌ　Ｌａ　Ｓａｌｌｅら、１９９３）が挙げられる。臨床試験におけるＡｄベクターの使用の例は、筋肉内注射を用いた抗腫瘍免疫化のためのポリヌクレオチド治療を含んだ（Ｓｔｅｒｍａｎら、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．７：１０８３～９（１９９８））。

【００９７】

様々な実施形態において、本発明の融合タンパク質をコードする１つまたは複数のポリヌクレオチドは、対象の標的細胞へ、１つまたは複数のポリヌクレオチドを含む単純ヘルペスウイルス、例えば、ＨＳＶ－ｌ、ＨＳＶ－２を細胞に形質導入することにより導入される。

【００９８】

成熟ＨＳＶビリオンは、１５２ｋｂである直鎖状二本鎖ＤＮＡ分子からなるウイルスゲノムを含む、エンベロープ型正二十面体カプシドからなる。一実施形態において、ＨＳＶに基づいたウイルスベクターは、１つまたは複数の必須または非必須のＨＳＶ遺伝子が欠損している。一実施形態において、ＨＳＶに基づいたウイルスベクターは、複製欠損である。たいていの複製欠損ＨＳＶベクターは、複製を防止するために１つまたは複数の最初期、初期、または後期ＨＳＶ遺伝子を除去する欠失を含有する。例えば、ＨＳＶベクターは、ＩＣＰ４、ＩＣＰ２２、ＩＣＰ２７、ＩＣＰ４７、およびそれらの組合せからなる群から選択される最初期遺伝子が欠損し得る。ＨＳＶベクターの利点は、結果として長期ＤＮＡ発現を生じ得る、潜伏期を進入できるその能力、および最大２５ｋｂまでの外因性ＤＮＡ挿入断片を収容できるその大きなウイルスＤＮＡゲノムである。ＨＳＶに基づいたベクターは、例えば、米国特許第５，８３７，５３２号、第５，８４６，７８２号、および第５，８０４，４１３号、ならびに国際特許出願ＷＯ９１／０２７８８、ＷＯ９６／０４３９４、ＷＯ９８／１５６３７、およびＷＯ９９／０６５８３に記載されている（それらのそれぞれは、全体として参照により本明細書に組み入れられている）。

【００９９】

Ｖ．　融合タンパク質を発現する細胞

さらに別の態様において、本発明は、本明細書に記載された融合タンパク質を発現する細胞を提供する。細胞は、上記で記載されているような融合タンパク質をコードするベクターをトランスフェクトされ得る。一実施形態において、細胞は原核細胞である。別の実施形態において、細胞は真核細胞である。なお別の実施形態において、細胞は哺乳動物細胞である。特定の実施形態において、細胞はヒト細胞である。別の実施形態において、細胞は、ｐ５３媒介性新生物形成を患っておりまたは患うリスクがある患者に由来するヒト

細胞であり、ｐ５３媒介性新生物形成には、限定されるわけではないが、癌および他の新生物が挙げられ、その癌および他の新生物には、以下が挙げられるが、それらに限定されない：以下の部位の、原発性であると明言または推定される悪性新生物：頭頸部癌を含む、唇、口腔、および咽頭の悪性新生物；食道、結腸、肝臓、または膵臓癌を含む消化器官の悪性新生物；肺癌を含む、呼吸および胸腔内器官の悪性新生物；骨肉腫を含む、骨および関節軟骨の悪性新生物；メラノーマおよび皮膚の他の悪性新生物；肉腫を含む、中皮および軟部組織の悪性新生物；乳房の悪性新生物；卵巣癌を含む、女性生殖器の悪性新生物；前立腺癌を含む、男性生殖器の悪性新生物；膀胱癌を含む、尿路の悪性新生物；神経膠芽腫を含む、眼、脳、および中枢神経系の他の部分の悪性新生物；甲状腺癌を含む、甲状腺および他の内分泌腺の悪性新生物；明確に定義されていない、続発性の、および不特定の部位の悪性新生物；多発性骨髄腫、リンパ性白血病、または骨髄性白血病を含む、リンパ系、造血性、および関連組織の悪性新生物；骨髄異形成症候群を含む、不確定または不明な挙動の新生物。細胞は肝実質細胞または筋肉細胞であり得る。

【０１００】

融合タンパク質を発現する細胞は、融合タンパク質を産生することにおいて有用であり得る。この実施形態において、細胞は、融合タンパク質を過剰発現するベクターをトランスフェクトされる。融合タンパク質は、任意選択で、エピトープ、例えば、（それぞれ、プロテインＡカラムまたは抗ＦＬＡＧ抗体カラムを用いる）精製を促進する、本明細書に記載されているようなヒトＦｃドメインまたはＦＬＡＧエピトープを含有し得る。エピトープは、融合タンパク質の残りの部分と、リンカー、または精製中もしくは後にエピトープが融合タンパク質から除去され得るようにプロテアーゼ基質配列を介して、接続され得る。

【０１０１】

代替の実施形態において、融合タンパク質の分泌型を発現する細胞が用いられ得る。例えば、融合タンパク質構築物は、Ｎ末端にシグナル配列を有するようにデザインされ得る。代表的なシグナル配列は下記の表７に示されている。

【０１０２】

【表７】

表7: 代表的なシグナル配列

配列番号	配列
94	MGVKVLFALICIAVAEA
95	MAPVQLLGLLVLFLPAMRC
96	MAVLGLLFCLVTFPSCVLS

【０１０３】

したがって、一実施形態において、本融合タンパク質は、シグナル配列および融合タンパク質を含み、前記シグナル配列が配列番号９４～９６からなる群から選択され、前記融合タンパク質がＪドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む。一実施形態において、シグナル配列は、配列番号９４～９６からなる群から選択され、融合タンパク質は、配列番号８０～９１、１００～１０７からなる群から選択される。別の実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号９４のシグナル配列、ならびに配列番号８０～９１、１００～１０７からなる群から選択される融合タンパク質を含む。別の実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号９５のシグナル配列、ならびに配列番号８０～９１、１００～１０７からなる群から選択される融合タンパク質を含む。別の実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号９６のシグナル配列、ならびに配列番号８０～９１、１００～１０７からなる群から選択される融合タンパク質を含む。シグナル配列を含む融合タンパク質構築物を発現する細胞は、対象、例えばヒト対象（例えば、ｐ５３障害を有し、または患

うリスクがある患者）へ投与され得る。融合タンパク質は、細胞から分泌され、ｐ５３機能を回復するのを助けおよび／またはｐ５３凝集を低下させる。

【０１０４】

上記で記載されているように、ある特定の実施形態において、本融合タンパク質はさらに、細胞透過性ペプチドを含み得る。シグナル配列および細胞透過性ペプチドを含む融合タンパク質を発現する細胞は、シグナル配列を欠く融合タンパク質を分泌する能力がある。細胞透過性ペプチドも含む分泌性融合タンパク質は、その後、すぐ近くの細胞に進入する能力があり、それらの細胞において、ｐ５３機能を回復させおよび／またはｐ５３凝集を低下させる潜在能力を有する。

【０１０５】

ＶＩ．　使用方法

別の態様において、本発明は、障害において、および／または変異ｐ５３により媒介される障害もしくは状態である、ｐ５３障害において、有益な効果を達成するための方法を提供する。ｐ５３障害は癌である。癌には、以下のいずれかを挙げることができる：以下の部位の、原発性であると明言または推定される悪性新生物：頭頸部癌を含む、唇、口腔、および咽頭の悪性新生物；食道、結腸、肝臓、または膵臓癌を含む消化器官の悪性新生物；肺癌を含む、呼吸および胸腔内器官の悪性新生物；骨肉腫を含む、骨および関節軟骨の悪性新生物；メラノーマおよび皮膚の他の悪性新生物；肉腫を含む、中皮および軟部組織の悪性新生物；乳房の悪性新生物；卵巣癌を含む、女性生殖器の悪性新生物；前立腺癌を含む、男性生殖器の悪性新生物；膀胱癌を含む、尿路の悪性新生物；神経膠芽腫を含む、眼、脳、および中枢神経系の他の部分の悪性新生物；甲状腺癌を含む、甲状腺および他の内分泌腺の悪性新生物；明確に定義されていない、続発性の、および不特定の部位の悪性新生物；多発性骨髄腫、リンパ性白血病、または骨髄性白血病を含む、リンパ系、造血性、および関連組織の悪性新生物；骨髄異形成症候群を含む、不確定または不明な挙動の新生物。

【０１０６】

いくつかの実施形態において、本発明は、ｐ５３疾患、障害、または状態を有する、ヒトなどの対象を処置するための方法であって、治療的または予防的有効量の融合タンパク質、そのような融合タンパク質をコードする核酸、または本明細書に記載されたそのような融合タンパク質をコードするウイルスベクターを対象へ投与するステップを含み、前記投与が、結果として、ｐ５３疾患、障害、または状態に関連した１つまたは複数の生化学的もしくは生理学的パラメータまたは臨床エンドポイントの向上を生じる、方法を提供する。

【０１０７】

他の実施形態において、本発明は、細胞においてｐ５３機能を回復させおよび／またはｐ５３凝集を低下させる方法を提供する。細胞は培養細胞または単離された細胞であり得る。細胞はまた、対象、例えばヒト対象に由来し得る。一実施形態において、ヒト対象は、１つまたは複数の型の癌を含む、ｐ５３障害疾患を患っておりまたは患うリスクがある。

【０１０８】

ｐ５３タンパク質の活性は、いくつかの方法で検出することができる。一例において、ｐ５３の転写活性は、ｐ２１などの下流遺伝子によりモニターすることができる。別の実施形態において、ｐ５３機能は、人工レポーター構築物を含むレポーター遺伝子アッセイによりモニターされる。

【０１０９】

したがって、一実施形態において、方法は、未処理または対照細胞と比較した場合、少なくとも１０％、例えば、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、ｐ５３活性を回復させるのに有効な融合タンパク質、または前記融合

タンパク質をコードする核酸、ベクター、もしくはウイルス粒子の量と細胞を接触させるステップを含む。

【０１１０】

下記の実施例１に示されているように、Ｊドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む融合タンパク質の発現は、ｐ２１発現のレベルを回復させることが見出されている。そのようなものとして、別の実施形態において、方法は、未処理または対照細胞と比較した場合、少なくとも１０％、例えば、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、ｐ５３タンパク質の機能を回復させるのに有効な、融合タンパク質、融合タンパク質を発現する細胞、または融合タンパク質をコードする核酸、ベクター、もしくはウイルス粒子の量と細胞を接触させるステップを含む。

【０１１１】

ＶＩＩ．　薬学的組成物

本明細書で企図された組成物は、本明細書で企図されているような、Ｊドメインおよびｐ５３結合性ドメインを含む１つまたは複数の融合タンパク質、そのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、それを含むベクター、遺伝子修飾された細胞などを含み得る。組成物は、薬学的組成物が挙げられるが、それに限定されない。「薬学的組成物」は、単独かまたは１つもしくは複数の他の治療モダリティーと組み合わせての細胞または動物への投与のための薬学的に許容されるまたは生理学的に許容される溶液として製剤化された組成物を指す。必要に応じて、組成物は、なお他の作用物質、例えば、サイトカイン、成長因子、ホルモン、小分子、化学療法剤、プロドラッグ、薬物、抗体、または他の様々な薬学的活性物質も組み合わせて、投与され得ることも理解されるであろう。追加の作用物質が、意図された治療を送達する本組成物の能力に悪影響を及ぼさないならば、本組成物にまた含まれ得る他のコンポーネントに、事実上、制限はない。

【０１１２】

句「薬学的に許容される」は、合理的な利益／リスク比に釣り合って、過剰な毒性、刺激作用、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、ヒトおよび動物の組織と接触して用いるのに、健全な医学的判断の範囲内において、適している、化合物、材料、組成物、および／または剤形を指すように、本明細書で用いられる。

【０１１３】

本明細書で用いられる場合、「薬学的に許容される担体」、「希釈剤」、または「賦形剤」には、ヒトまたは家畜における使用について容認できるとして、米国食品医薬品局によって認可されている、非限定的に、任意のアジュバント、担体、賦形剤、流動促進剤、甘味剤、希釈剤、保存剤、色素／着色剤、香味料、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、安定剤、等張剤、溶剤、界面活性剤、または乳化剤が挙げられる。例示的な薬学的に許容される担体には、ラクトース、グルコース、およびスクロースなどの糖；コーン（ｃｏｍ）スターチおよびジャガイモデンプンなどのデンプン；セルロース、ならびにカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロースなどのその誘導体；トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；カカオバター、ワックス、動物および植物脂肪、パラフィン、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、酸化亜鉛；ピーナッツ油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、コーン（ｃｏｍ）油、およびダイズ油などの油；プロピレングリコールなどのグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；寒天；水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；パイロジェンフリーの水；等張食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；リン酸緩衝溶液；ならびに薬学的製剤中に用いられる任意の他の適合性物質が挙げられるが、それらに限定されない。

【０１１４】

ＶＩＩＩ．　投薬量

本明細書に記載された組成物（例えば、融合タンパク質構築物、核酸、または遺伝子治療ウイルス粒子を含む組成物）の投薬量は、本化合物の薬力学的性質；投与の様式；レシピエントの年齢、健康、および体重；症状の性質および程度；処置の頻度、およびもしあれば、同時処置の型；ならびに処置されることになっている動物における本化合物のクリアランス速度などの多くの因子に依存して変動し得る。本明細書に記載された組成物は、臨床応答に依存して、必要に応じて調整され得る、適切な投薬量で、最初、投与され得る。いくつかの態様において、組成物の投薬量は、予防的または治療的有効量である。

【０１１５】

ＩＸ．　キット

（ａ）本明細書に記載された、細胞または対象においてｐ５３機能を回復させる融合タンパク質構築物、そのような融合タンパク質をコードする核酸、またはそのような核酸を包含するウイルス粒子を含む薬学的組成物、および（ｂ）本明細書に記載された方法のいずれかを実施するための使用説明書を含む添付文書を含むキットが企図される。いくつかの態様において、キットは、（ａ）本明細書に記載された細胞または対象においてｐ５３機能を回復させる、本明細書に記載された組成物を含む薬学的組成物、（ｂ）追加の治療剤、および（ｃ）本明細書に記載された方法のいずれかを実施するための使用説明書を含む添付文書を含む。

【実施例】

【０１１６】

Ｊドメインが変異タンパク質の適切なフォールディングを促進するように特定的に操作され得るかどうかを試験するために、本発明者らは、ｐ５３タンパク質を標的化するようにデザインされたいくつかの融合タンパク質構築物をデザインし、試験した。

【０１１７】

実施例１：融合タンパク質デザイン

Ａ．　方法

一般的な技術および材料

本発明の実施は、他に指示がない限り、当業者の能力の範囲内である、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクス、および組換えＤＮＡの通常の技術を用いる。Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．ら、「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ」、第３版、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、２００１；「Ｃｕｒｒｅｎｔ　ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｂｉｏｌｏｇｙ」、Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌら編、１９８７；シリーズ「Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ」、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．；「ＰＣＲ　２：ａ　ｐｒａｃｔｉｃａｌ　ａｐｐｒｏａｃｈ」、Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ、Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ、およびＧ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ編、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ、１９９５；「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、ａ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　ｍａｎｕａｌ」　Ｈａｒｌｏｗ，Ｅ．およびＬａｎｅ，Ｄ．編、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、１９８８；「Ｇｏｏｄｍａｎ　＆　Ｇｉｌｍａｎ’ｓ　Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｂａｓｉｓ　ｏｆ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ」、第１１版、ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ、２００５；ならびにＦｒｅｓｈｎｅｙ，Ｒ．Ｉ．、「Ｃｕｌｔｕｒｅ　ｏｆ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌｓ：Ａ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｂａｓｉｃ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ」、第４版、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ、Ｓｏｍｅｒｓｅｔ、ＮＪ、２０００（それらの内容は、全体として参照により本明細書に組み入れられている）参照。ＨＥＫ－２９３細胞（ヒト胚性腎臓細胞）は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）から購入された。抗ＦＬＡＧ抗体は、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから購入された。ウサギ抗ＧＦＰ抗体は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔｓ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）から購入された。精製および特徴づけを容易にするために、この実施例１に用いられる融合タンパク質構築物のいくつかは、配列番号８０～９１に提供された配列に加えて、配列番号６９のＦＬＡＧ

エピトープを、そのタンパク質のＣ末端かまたはＮ末端のいずれかに、短いリンカー配列に加えて、含有する。

【０１１８】

ＨＣＴ－１１６細胞におけるタンパク質の発現および検出

様々なタンパク質構築物をコードする発現ベクタープラスミドを、ＨＣＴ－１１６細胞へ、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００トランスフェクション試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、トランスフェクトした。細胞可溶化物を、発現したタンパク質について、イムノブロットアッセイを用いて分析した。培地の試料を、分析前に、遠心分離して、デブリを除去した。細胞を、２ｍＭ　ＰＭＳＦおよびプロテアーゼカクテル（完全プロテアーゼ阻害剤カクテル；Ｓｉｇｍａ）を含有する溶解バッファー（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ、２％ＳＤＳ）中に溶解した。短時間の超音波処理後、試料を、発現したタンパク質について、イムノブロットアッセイを用いて分析した。イムノブロット分析について、試料を、ＳＤＳ試料バッファー中で煮沸し、ポリアクリルアミド電気泳動に流した。その後、分離されたタンパク質バンドを、ＰＶＤＦ膜へ転写した。

【０１１９】

発現したタンパク質を、化学発光シグナルを用いて検出した。簡単に述べれば、ブロットを、特定のタンパク質（例えば、ｐ２１）を結合する能力がある一次抗体と反応させた。反応していない一次抗体を洗い流した後、酵素連結型二次抗体（例えば、ＨＲＰ連結型抗ＩｇＧ抗体）を、ブロットと結合した一次抗体分子と反応させた。すすいだ後、化学発光試薬を加え、ブロットにおいて結果として生じた化学発光シグナルを、Ｘ線フィルム上に捕獲した。

【０１２０】

ＥＬＩＳＡ

ＨＣＴ－１１６細胞を、プロテアーゼ阻害剤カクテル、２ｍＭ　ＰＭＳＦ、１０ｍＭ　ＮａＦ、および２ｍＭ　Ｎａ３ＶＯ４を追加した溶解バッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ８．０、１２０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．５％　ＮＰ－４０）中にホモジナイズした。短時間の超音波処理後、遠心分離によりデブリを除去した。タンパク質濃度は、ＢＣＡアッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ）により測定される。上清を、製造業者の標準プロトコールを用いて、ＥＬＩＳＡ（Ｈｕｍａｎ　Ｔｏｔａｌ　ｐ２１／ＣＩＰ１／ＣＤＫＮ１Ａ　ＤｕｏＳｅｔ　ＩＣ　ＥＬＩＳＡ：Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）に供した。

【０１２１】

細胞毒性アッセイ（ＬＤＨアッセイ）

ＨＣＴ－１１６細胞またはｐ５３Ｒ２４９Ｓを安定的に発現するＨＣＴ－１１６細胞を、４８ウェル培養プレート上へ播種した。１日目において、培地を、８ｕｇ／ｍｌ　ポリブレンおよび構築物２を発現するレンチウイルス粒子または実質的な遺伝子をコードしない対照レンチウイルスを含有する新鮮な培地と交換した。７２時間後、培地を、１ｕＭ　ドキソルビシンを含有する新鮮な培地と交換し、細胞を、さらに１２時間、培養した。一部の研究について、構築物２を、リポフェクションにより発現させた。トランスフェクションから２４時間後、培地を、新鮮な培地と交換し、細胞をさらに２４～４８時間、培養した。その後、培地を収集し、製造業者のプロトコールを用いて、ＬＤＨアッセイ（ＬＤＨ－Ｃｙｔｏｘ（商標）アッセイキット：ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ：４２６４０１）に供した。

【０１２２】

Ｂ．　レポーター構築物

本発明者らは、まず、ｐ５３を標的化する本発明の融合分子が培養細胞においてそれの機能を回復させるかどうかを調べた。この目的を達成するために、本発明者らは、野生型ｐ５３、加えて、「立体構造的変異」として知られているＲ１７５ＨおよびＲ２４９Ｓ変異を含有するｐ５３を含むｐ５３構築物を作製した（下記の表８参照）。ＨＣＴ－１１６細胞を、培養し、野生型ｐ５３またはＲ１７５Ｈ（配列番号９８）もしくはＲ２４９Ｓ（

配列番号９９）を含有するｐ５３変異体をコードするプラスミドをトランスフェクトした。図３に示されているように、本発明者らは、Ｒ１７５Ｈ（左）またはＲ２４９Ｓ（右）を含有する変異ｐ５３が、野生型ｐ５３の代わりに発現した場合、ｐ５３によるｐ２１の下流誘導が消失すること（例えば、レーン２対３を比較する）を見出した。

【０１２３】

【表８】

表8: p53レポーター構築物

構築物名	配列番号	長さ	配列
p53WT	97	393	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDL MLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAP APAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPAL NKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEV VRRCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSV VVPYEPPEVGSDCTTIHYNYMCNSSCMGGMNRRPILTIITLEDSS GNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENLRKKGEPHHELPPGSTK RALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALEL KDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD
p53R175H	98	393	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDL MLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAP APAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPAL NKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEV VRHCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSV VVPYEPPEVGSDCTTIHYNYMCNSSCMGGMNRRPILTIITLEDSS GNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENLRKKGEPHHELPPGSTK RALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALEL KDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD
p53R249S	99	393	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDL MLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAP APAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPAL NKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEV VRRCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSV VVPYEPPEVGSDCTTIHYNYMCNSSCMGGMNRSPILTIITLEDSS GNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENLRKKGEPHHELPPGSTK RALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALEL KDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD

【０１２４】

Ｃ．　融合タンパク質構築物

本発明の融合タンパク質が、ｐ５３機能を回復させるのに用いることができるかどうかを決定するために、最初の実験をまず、変異ｐ５３を認識するペプチド配列とコンジュゲートされた、ヒトＨｓｐ４０　Ｊドメインタンパク質に由来したＪドメイン配列を含む融合タンパク質の同時発現により行った（データ未呈示）。構築物２（ＪＢ１－ＣＤＢ３）をコードするプラスミドを、レポーター構築物（ｐ５３Ｒ１７５Ｈまたはｐ５３Ｒ２４９Ｓ）と共にＨＣＴ－１１６細胞へトランスフェクトした。発現後、細胞を、溶解バッファー中に溶解し、続いて、抗ｐ２１抗体または抗ｐ５３抗体を用いるイムノブロッティングアッセイに供した。野生型ｐ５３の発現は、ｐ２１の誘導を生じ、一方、変異体（Ｒ１７５ＨまたはＲ２４９Ｓ）はそのように生じることができなかった。驚くべきことに、構築物２を発現する細胞は、ｐ２１発現の実質的な回復を示したが、ｐ５３タンパク質レベルそれ自体は、有意には変化しなかった（図３）。

【０１２５】

その結果をさらに検証するために、変異ｐ５３（Ｒ２４９Ｓ）を発現する安定細胞を、標準方法により確立した。最初のＨＣＴ－１１６細胞またはｐ５３Ｒ２４９Ｓを安定的に発現するＨＣＴ－１１６細胞を培養し、構築物２を発現するレンチウイルスとインキュベートした。インキュベーション後、細胞を、１ｕＭ　ドキソルビシンにより１２時間、刺激した。細胞を溶解し、タンパク質濃度をＢＣＡアッセイにより測定した。等量の細胞可溶化液をＥＬＩＳＡに供して、ｐ２１発現を定量化した。図４に示されているように、変異ｐ５３を安定的に発現する細胞は、より低いｐ２１発現レベルを保持した（１番目のバー対２番目のバー）。ドキソルビシンとのインキュベーションは、ｐ２１の発現を強く誘導したが（３番目のバー）、変異ｐ５３を発現する細胞においてはより弱く誘導した（４番目のバー）。驚くべきことに、構築物２は、ｐ２１の誘導を完全に回復させた（５番目のバー）。

【０１２６】

最後に、ｐ５３の細胞毒性活性を評価した。Ｒ１７５ＨかまたはＲ２４９Ｓのいずれかのｐ５３変異体を安定的に発現するＨＣＴ－１１６細胞を培養し、構築物２を、上記のようにレンチウイルスを用いて発現させた。発現後、細胞を、１μＭ　ドキソルビシンの存在下でさらに１２時間、培養した。培地を収集し、ＬＤＨ細胞毒性アッセイを実施した。図５に示されているように、構築物２を発現する細胞は、ドキソルビシンの細胞毒性効果に対して感受性がより高かった。これらのデータは、ｐ５３立体構造問題が、Ｈｓｐ７０媒介性経路を用いて解決され得ることを示唆した。

【０１２７】

同様に、追加の構築物を作製し、試験した。ｐ５３のＲ１７５ＨかまたはＲ２４９Ｓのいずれかの変異型を発現する細胞は、野生型ｐ５３と比較してより低い細胞毒性効果を示し、一方、構築物３（図６）、構築物１６、または構築物１７（図７）のいずれも、細胞毒性効果を部分的に回復した。

【０１２８】

その後、本発明者らは、表９に表されているように、一連の融合タンパク質構築物をデザインした。

【０１２９】

【表９－１】

表9. 融合タンパク質構築物および対照

構築物番号	配列番号	構築物名	注釈
1	79	Jドメインのみ	ヒトDnaJB1由来のJドメインを含有する対照
2	80	JB1-CDB3	p53を結合するCDB3と融合したDnaJB1Jドメイン
3	81	JB1-p53BP	p53を結合するp53BPと融合したDnaJB1Jドメイン
4	82	JB1-scFv1 (ME1)	p53を結合するscFv1と融合したDnaJB1Jドメイン
5	83	JB1-scFv2 (scFv11D3)	p53を結合するscFv2と融合したDnaJB1Jドメイン
6	84	JB1-scFv3 (scFv421)	p53を結合するscFv3と融合したDnaJB1Jドメイン
7	85	JB1-scFv4 (Pab421)	p53を結合するscFv4と融合したDnaJB1Jドメイン
8	86	JB6-CDB3	ヒトDnaJB6Jドメインを用いることを除けば、構築物2と同じ
9	87	JB6-p53BP	ヒトDnaJB6Jドメインを用いることを除けば、構築物3と同じ
10	88	JB6-scFv1	ヒトDnaJB6Jドメインを用いることを除けば、構築物4と同じ
11	89	JB6-scFv2	ヒトDnaJB6Jドメインを用いることを除けば、構築物5と同じ
12	90	JB6-scFv3	ヒトDnaJB6Jドメインを用いることを除けば、構築物6と同じ
13	91	JB6-scFv4	ヒトDnaJB6Jドメインを用いることを除けば、構築物7と同じ
16	100	JB1-G_4S-scFv1 (ME1)	Jドメインとp53結合性ドメインの間の追加のGGGGSリンカーを除けば、構築物4と同じ
17	101	JB1- G_4S -scFv2 (scFv11D3)	Jドメインとp53結合性ドメインの間の追加のGGGGSリンカーを除けば、構築物5と同じ
18	102	JB1- G_4S -scFv3 (scFv421)	Jドメインとp53結合性ドメインの間の追加のGGGGSリンカーを除けば、構築物6と同じ
19	103	JB1- G_4S -scFv4 (Pab421)	Jドメインとp53結合性ドメインの間の追加のGGGGSリンカーを除けば、構築物7と同じ

【０１３０】

【表９－２】

20	104	JB6- G_4S -scFv1 (ME1)	J ドメインと p53 結合性ドメインの間の追加の GGGGS リンカーを除けば、構築物 10 と同じ
21	105	JB6- G_4S -scFv2 (scFv11D3)	J ドメインと p53 結合性ドメインの間の追加の GGGGS リンカーを除けば、構築物 11 と同じ
22	106	JB6- G_4S -scFv3 (scFv421)	J ドメインと p53 結合性ドメインの間の追加の GGGGS リンカーを除けば、構築物 12 と同じ
23	107	JB6- G_4S -scFv4 (Pab421)	J ドメインと p53 結合性ドメインの間の追加の GGGGS リンカーを除けば、構築物 13 と同じ

【０１３１】

実施例２：融合タンパク質構築物をコードするＡＡＶベクター

例示的な遺伝子治療ベクターは、表９の融合タンパク質構築物をコードするコドン最適化ｃＤＮＡを有するＡＡＶ９ベクターにより構築される。構築物をコードするｃＤＮＡは、コザック配列の下流に位置し、ウシ成長ホルモンポリアデニル化（ＢＧＨｐＡ）シグナルによってポリアデニル化される。カセット全体は、ＡＡＶ－２の２つの非コード末端逆位配列によって隣接されている。

【０１３２】

組換えＡＡＶベクターは、上記のものと類似したバキュロウイルス発現系を用いて調製される（Ｕｒａｂｅら、２００２；Ｕｎｚｕら、２０１１（Ｋｏｔｉｎ、２０１１に概説されている））。簡単に述べれば、複製およびパッケージングのためのＲＥＰをコードする１つ、ＡＡＶ９のカプシドについてのＣＡＰ－５をコードする１つ、および発現カセットを有する１つである、３つの組換えバキュロウイルスが、ＳＦ９昆虫細胞に感染するために用いられる。精製は、ＡＶＢ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ高速アフィニティ媒体（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を用いて実施される。ベクターは、導入遺伝子についてのプライマー－プローブの組合せでのＱＰＣＲを用いて滴定され、力価は、１ｍｌあたりのゲノムコピー数（ＧＣ／ｍｌ）として表される。ベクターの力価は、およそ８×１０^{１３}～２×１０^{１４}ＧＣ／ｍｌの間である。

【０１３３】

他の態様

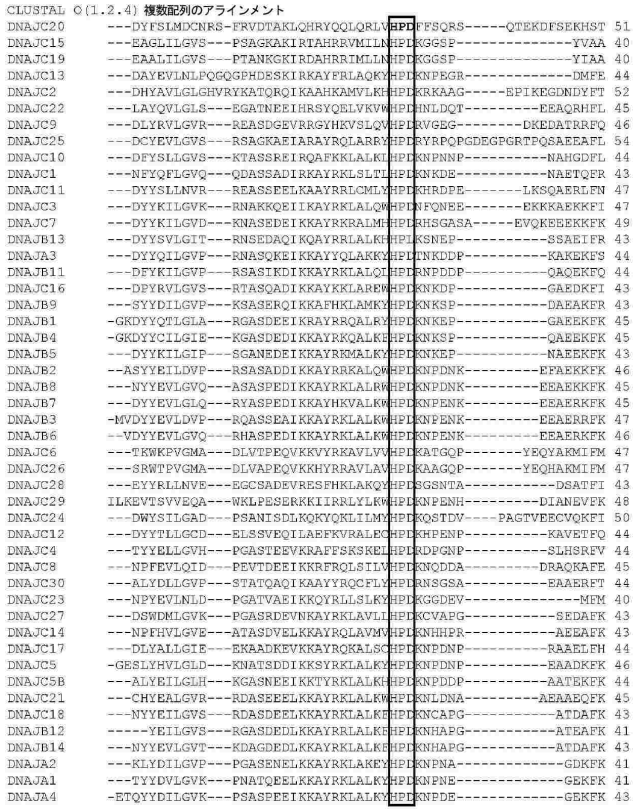
この明細書で言及された全ての刊行物、特許、および特許出願は、あたかも各個々の刊行物、特許、または特許出願が具体的かつ個々に示されて、全体として参照により組み入れられているかのように同じ程度で、全体として参照により本明細書に組み入れられている。本出願における用語が、参照により本明細書に組み入れられた文書においてと異なって定義されていることが見出された場合、本明細書に提供された定義がその用語についての定義としての役割を果たすものとする。

【０１３４】

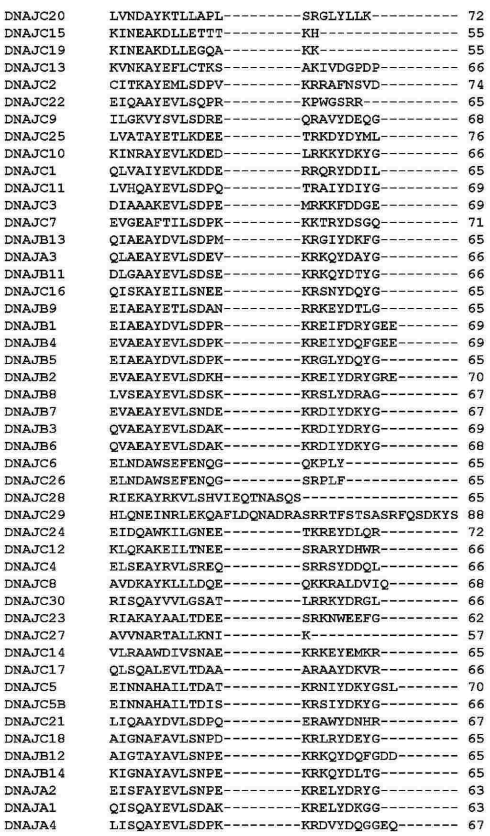
本発明は、その特定の態様に関連して記載されているが、本発明はさらに改変することができ、一般的に本発明の原理に従い、かつ当技術分野内での公知または慣習的な実施範囲内に入り、上記で示された本質的な特徴に適用することができような、本開示からの逸脱を含む、本発明の任意のバリエーション、使用、または適応を網羅することを、この出願は意図され、主張された範囲内に従うことは理解されるであろう。

【図面】

【図１Ａ】



【図１Ｂ】



【図２】

構築物番号	構築物名	配列番号	Jドメイン	p53結合性ドメイン	略図
1	JB1-ドメインのみ	79	DnaJB1	N/A	JB1
2	JB1-CDB3	80	DnaJB1	CDB3	JB1 CDB3
3	JB1-p53BP	81	DnaJB1	p53BP	JB1 p53BP
4	JB1-scFv(ME1)	82	DnaJB1	scFv1 (ME1)	JB1 ME1
5	JB1-scFv(11D3)	83	DnaJB1	scFv2 (11D3)	JB1 11D3
6	JB1-scFv(Fv421)	84	DnaJB1	scFv3 (421)	JB1 421
7	JB1-scFv(Pab421)	85	DnaJB1	scFv4 (Pab421)	JB1 Pab421
8	JB6-CDB3	86	DnaJB6	CDB3	JB6 CDB3
9	JB6-p53BP	87	DnaJB6	p53BP	JB6 p53BP
10	JB6-scFv(ME1)	88	DnaJB6	scFv1 (ME1)	JB6 ME1
11	JB6-scFv(scFv11D3)	89	DnaJB6	scFv2 (11D3)	JB6 11D3
12	JB6-scFv(scFv421)	90	DnaJB6	scFv3 (421)	JB6 421
13	JB6-scFv(Pab421)	91	DnaJB6	scFv4 (Pab421)	JB6 Pab421
16	JB1-G_4S-scFv(ME1)	100	DnaJB1	scFv1 (ME1)	JB1 ME1
17	JB1-G_4S-scFv(scFv11D3)	101	DnaJB1	scFv2 (11D3)	JB1 11D3
18	JB1-G_4S-scFv(scFv421)	102	DnaJB1	scFv3 (421)	JB1 421
19	JB1-G_4S-scFv(Pab421)	103	DnaJB1	scFv4 (Pab421)	JB1 Pab421
20	JB6-G_4S-scFv(ME1)	104	DnaJB6	scFv1 (ME1)	JB6 ME1
21	JB6-G_4S-scFv(scFv11D3)	105	DnaJB6	scFv2 (11D3)	JB6 11D3
22	JB6-G_4S-scFv(scFv421)	106	DnaJB6	scFv3 (421)	JB6 421
23	JB6-G_4S-scFv(Pab421)	107	DnaJB6	scFv4 (Pab421)	JB6 Pab421

【図３】

図３Ａ

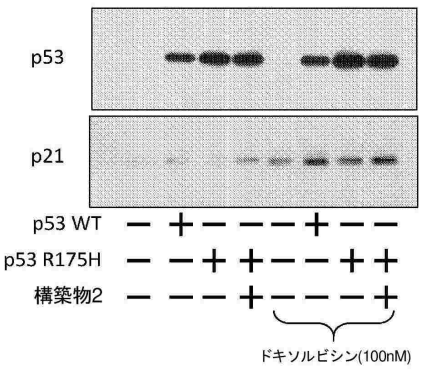
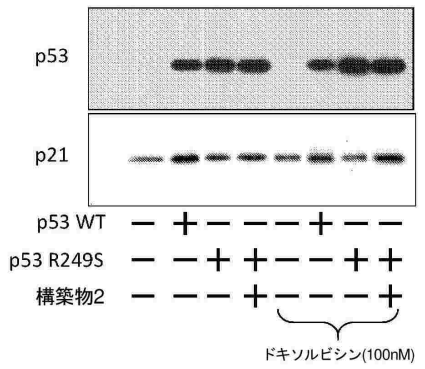
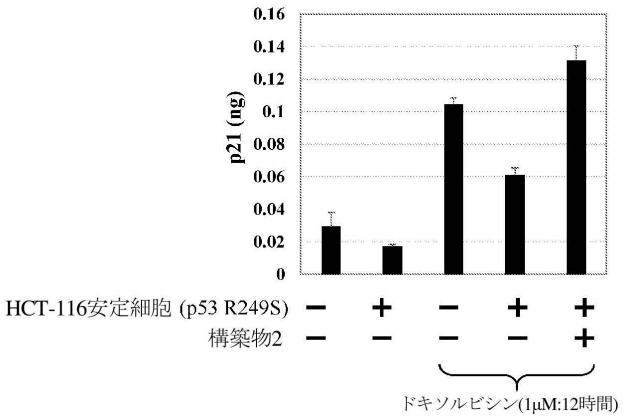


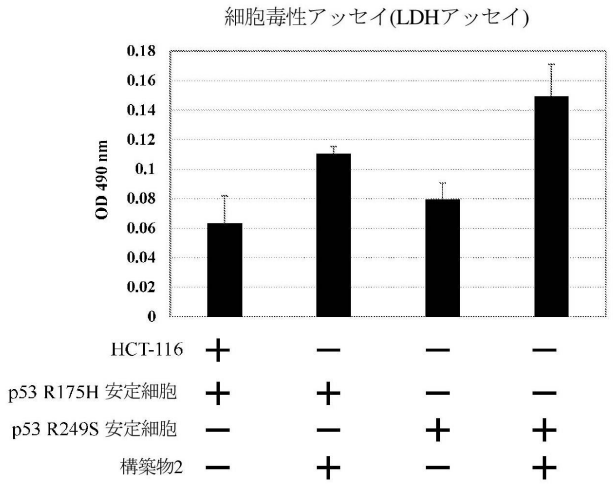
図３Ｂ



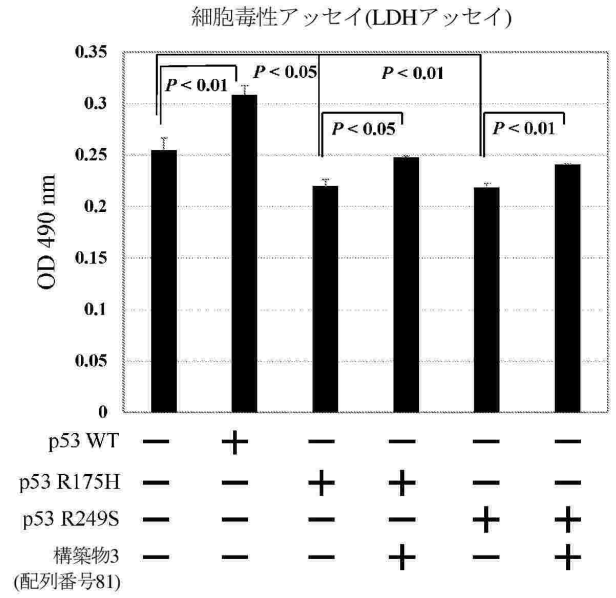
【図４】


p21 (ng)
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
HCT-116安定細胞 (p53 R249S) − + − + +
構築物2 − − − − +
ドキソルビシン(1μM:12時間)

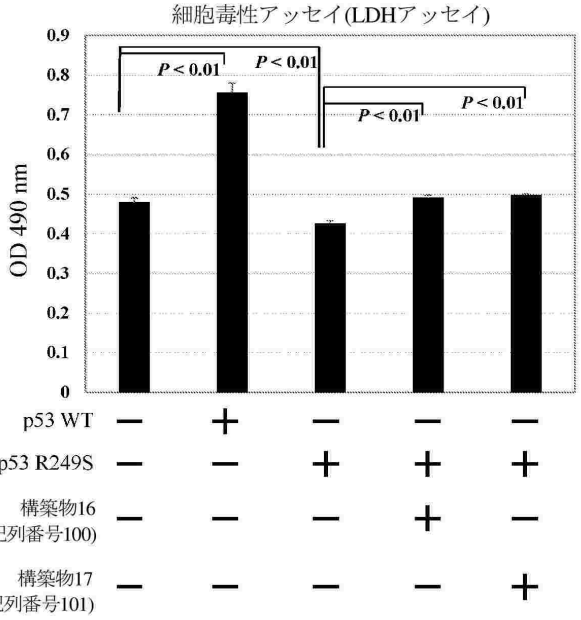
【図５】


細胞毒性アッセイ(LDHアッセイ)
OD 490 nm
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
HCT-116 + − − −
p53 R175H 安定細胞 + + − −
p53 R249S 安定細胞 − − + +
構築物2 − + − +

【図６】


細胞毒性アッセイ(LDHアッセイ)
OD 490 nm
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
P < 0.01
P < 0.05
P < 0.01
P < 0.05
P < 0.01
p53 WT − + − − − −
p53 R175H − − + + − −
p53 R249S − − − − + +
構築物3
(配列番号81) − − − + − +

【図７】


細胞毒性アッセイ(LDHアッセイ)
OD 490 nm
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
P < 0.01
P < 0.01
P < 0.01
P < 0.01
p53 WT − + − − −
p53 R249S − − + + +
構築物16
(配列番号100) − − − + −
構築物17
(配列番号101) − − − − +

【配列表】
20245371780000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/077779

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/47 A61P35/00
ADD. A61K38/00 C07K19/00

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)
A61P A61K C07K

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 practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/095484 A2 (MEDICAL RES COUNCIL [GB]; FERSHT ALAN [GB] ET AL.) 20 November 2003 (2003-11-20) pages 11-13; claims 1-13 peptide REDEDEIEW; page 21 - page 23; examples 5-8; table 1 -----	1-73
Y	WO 01/68801 A2 (UNIV RAMOT [IL]; SOLOMON BEKA [IL] ET AL.) 20 September 2001 (2001-09-20) claims 1-28; figure 2A; sequences 1,2 ----- -/--	1-73

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 January 2023	07/02/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schmidt-Yodlee, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/077779

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

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

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/077779

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HUPP T R ET AL: "SMALL PEPTIDES ACTIVATE THE LATENT SEQUENCE-SPECIFIC DNA BINDING FUNCTION OF P53", CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 83, 20 October 1995 (1995-10-20), pages 237-245, XP002003077, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/0092-8674(95)90165-5 abstract; figures 3,4	1-73
Y	WO 2014/089375 A1 (BOSTON STRATEGICS CORP [US]) 12 June 2014 (2014-06-12) page 85, line 12 - page 88, line 8; claims 1-55; figure 7; example 2; tables 24,25 page 8	1-73
Y	HISHIYA AKINORI ET AL: "Artificial DnaJ Protein for protein production and conformational diseases", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, no. 1, 17 August 2017 (2017-08-17) , XP055841518, DOI: 10.1038/s41598-017-09067-7 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/articles/s41598-017-09067-7> abstract; figures 1-3	1-73

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/077779

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03095484 A2	20-11-2003	AU 2003230003 A1	11-11-2003
		WO 03095484 A2	20-11-2003
WO 0168801 A2	20-09-2001	AT 353335 T	15-02-2007
		AU 3951701 A	24-09-2001
		DE 60126482 T2	29-11-2007
		EP 1272609 A2	08-01-2003
		US 6630584 B1	07-10-2003
		US 2003022244 A1	30-01-2003
		WO 0168801 A2	20-09-2001
WO 2014089375 A1	12-06-2014	AU 2013355120 A1	04-06-2015
		AU 2018200971 A1	01-03-2018
		CA 2893359 A1	12-06-2014
		CA 3138788 A1	12-06-2014
		CN 104968795 A	07-10-2015
		EP 2929045 A1	14-10-2015
		JP 6345688 B2	20-06-2018
		JP 6688237 B2	28-04-2020
		JP 2016500371 A	12-01-2016
		JP 2017113006 A	29-06-2017
		KR 20150093768 A	18-08-2015
		KR 20180049238 A	10-05-2018
		US 2015299756 A1	22-10-2015
		US 2018087081 A1	29-03-2018
		WO 2014089375 A1	12-06-2014

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13		
Ｃ１２Ｎ	*15/113(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/864(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/861(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/861	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/863(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/863	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/867(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/867	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/869(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/869	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/86 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/86	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/866(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/864	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*7/01 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/866	Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*38/16 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	7/01		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/16		
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ａ６１Ｋ	*31/711(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		
Ａ６１Ｋ	*35/761(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	31/711		
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/761		
Ａ６１Ｋ	*35/763(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		
Ａ６１Ｋ	*35/12 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/763		
		Ａ６１Ｋ	35/12		

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

アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４７８，ベルモント，リズリー・ロード １４

(72)発明者 コヤ，ケイゾウ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４６７，チェスナット・ヒル，ヒース・ストリート ８０５

Ｆターム（参考） 4B065 AA95X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA22 BA23 BA44 NA14 ZB26 ZB27 ZC41
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB27 ZC41
4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 BC83 CA09 CA12 NA14 ZB26 ZB27 ZC41
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA14 BA15 BA41 CA40 DA76 EA28 FA74