(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-541136
(P2024-541136A)
(43)公表日　令和6年11月7日(2024.11.7)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 15/31 (2006.01)		C12N	15/31	4H045
C07K 14/36 (2006.01)		C07K	14/36	ZNA
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z
C12N 15/115 (2010.01)		C12N	15/115	Z
C07K 14/195 (2006.01)		C07K	14/195	

審査請求　未請求　予備審査請求　有　（全75頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-527069(P2024-527069)
(86)(22)出願日　令和4年8月10日(2022.8.10)
(85)翻訳文提出日　令和6年7月2日(2024.7.2)
(86)国際出願番号　PCT/CA2022/051225
(87)国際公開番号　WO2023/077210
(87)国際公開日　令和5年5月11日(2023.5.11)
(31)優先権主張番号　20210100770
(32)優先日　令和3年11月4日(2021.11.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
ギリシャ(GR)
(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　524168563
ザ ホスピタル フォア シック チルドレン
カナダ国 オンタリオ州 エム５ジー １
エックス８，トロント ユニバーシティ
アベニュー ５５５
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100149010
弁理士　星川 亮
(72)発明者　メルニク，ロマン
カナダ国 オンタリオ州 エル６ジェイ
３エス３，オークビル ダグラス アベニ
ュー ２５４
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞送達に使用するための、新規細菌移行ドメインおよびそれを含む組換えポリペプチド

(57)【要約】
一般的に、本開示は、細胞送達に使用するための新規細菌移行ドメインを提供する。一例は、配列番号２のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質由来の、配列番号３のアミノ酸配列を有する移行ドメインである。他の細菌株および種由来のトランスロカーゼドメインも記載される（例えば、配列番号４～１７および３６～４８）。それらの移行ドメインを含む組換えポリペプチドが記載される。組換えポリペプチドは、疾患の処置に使用され得る治療用ポリペプチドを含むカーゴ分子の送達に使用することが意図される。

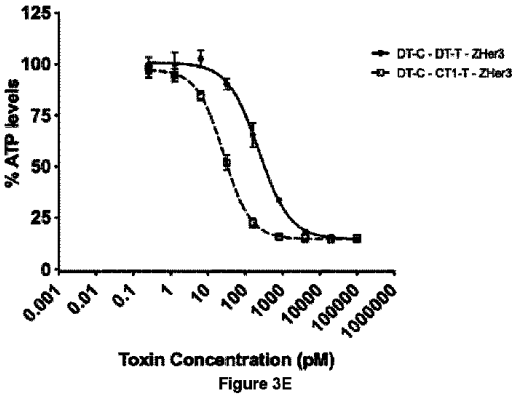


Figure 3E

【特許請求の範囲】
【請求項１】
一般式（Ｉ）：
Ａ－Ｂ－Ｃ（ｉ）
（式中、
Ａは、カーゴ分子であり、
Ｂは、以下：
ａ）
ｉ．配列番号２のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質、
ｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＰＳＪ２８９８５．１のストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム（Streptosporangium nondiastaticum）タンパク質、
ｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質、
ｉｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６０１５９３２８．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＳＬＢＮ－１１８タンパク質、
ｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６８０９６５３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＡ８タンパク質、
ｖｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７８６５９８６３．１のストレプトマイセス・ロゼオバーティシラタス（Streptomyces roseoverticillatus）タンパク質、
ｖｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＪＺ５８９０７．１のストレプトマイセス・ピニテレ（Streptomyces piniterrae）タンパク質、
ｖｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７９１１０３２１．１のストレプトマイセス（Streptomyces）ＭＢＴ７６タンパク質、
ｉｘ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質、
ｘ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０９５５８２０８２．１のストレプトマイセス・アルビレティクリ（Streptomyces albireticuli）タンパク質、
ｘｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１３３２５９９１７．１のストレプタシディフィルス・ピニコラ（Streptacidiphilus pinicola）タンパク質、
ｘｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７３１５６１８７．１のセイノネラ・ペプトノフィラ（Seinonella peptonophila）タンパク質、
ｘｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１８９０５３１６０．１のロンギミセリウム・ツルファネンス（Longimycelium tulufanense）タンパク質、
ｘｉｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質、
ｘｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質、
ｘｖｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＥＩＺ２９１３１３３．１のクレブシエラ・アエロゲネス（Klebsiella aerogenes）タンパク質、
ｘｖｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＣＨ０５５１５９０．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＭＵＭ１７８Ｊタンパク質、
ｘｖｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＢＢ４６７７７７７．１のクロシエラ・クリオフィラ（Crossiella cryophila）タンパク質、
ｘｉｘ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４３２６１７５９．１のアロクツネリア種（Allokutzneria sp.）ＮＲＲＬ　Ｂ－２４８７２タンパク質、
ｘｘ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１５６０５１９１４．１のアロクツネリア・アルバータ（Allokutzneria albata）タンパク質、
ｘｘｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１９９８９３２０４．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＶ１９タンパク質、

ｘｘｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４７２６４６０４．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＮＲＢＣ＿１１０６１１タンパク質、
ｘｘｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２０９５１３６１９．１のストレプトマイセス・シリンギウム（Streptomyces syringium）タンパク質、
ｘｘｉｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＲＪＱ６９５８９．１のシュードノカルディア細菌（Pseudonocardiaceae bacterium）ＹＩＭ　ＰＨ２１７２３タンパク質、
ｘｘｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４３２１８８９２．１のアクチノキネオスポラ・バンコケンシス（Actinokineospora bangkokensis）タンパク質、
ｘｘｖｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＢＦ６０５５８３４．１のストレプトマイセス・ユーロシディカス（Streptomyces eurocidicus）タンパク質、
ｘｘｖｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６９７９０９０８．１のストレプトマイセス・パソシディニ（Streptomyces pathocidini）タンパク質、もしくは
ｘｘｖｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１５７８６８４７２．１のストレプトマイセス・カーチンガエンシス（Streptomyces caatingaensis）タンパク質
由来の移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む移行ポリペプチドであり、
Ｃは、標的化部分である）
の組換えポリペプチド。
【請求項２】
一般式（Ｉ）：
Ａ－Ｂ－Ｃ（ｉ）
（式中、
Ａは、カーゴ分子であり、
Ｂは、以下：
ａ）
ｉ．配列番号２のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質、
ｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＰＳＪ２８９８５．１のストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム（Streptosporangium nondiastaticum）タンパク質、
ｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質、
ｉｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６０１５９３２８．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＳＬＢＮ－１１８タンパク質、
ｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６８０９６５３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＡ８タンパク質、
ｖｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７８６５９８６３．１のストレプトマイセス・ロゼオバーティシラタス（Streptomyces roseoverticillatus）タンパク質、
ｖｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＪＺ５８９０７．１のストレプトマイセス・ピニテレ（Streptomyces piniterrae）タンパク質、
ｖｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７９１１０３２１．１のストレプトマイセス（Streptomyces）ＭＢＴ７６タンパク質、
ｉｘ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質、
ｘ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１３３２５９９１７．１のストレプタシディフィルス・ピニコラ（Streptacidiphilus pinicola）タンパク質、
ｘｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１８９０５３１６０．１のロンギミセリウム・ツルファネンス（Longimycelium tulufanense）タンパク質、
ｘｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質、もしくは

ｘｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質
由来の移行ドメイン；
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン；
ｃ）配列番号３６～４８のいずれか１つのアミノ酸配列を含む移行ドメイン；または
ｄ）前記ｃ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む移行ポリペプチドであり、
Ｃは、標的化部分である）
の組換えポリペプチド。
【請求項３】
一般式（Ｉ）：
Ａ－Ｂ－Ｃ（ｉ）
（式中、
Ａは、カーゴ分子であり、
Ｂは、以下：
ａ）
ｉ．配列番号２のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質、
ｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質、
ｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質、
ｉｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質、もしくは
ｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質
由来の移行ドメイン；または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む移行ポリペプチドであり、
Ｃは、標的化部分である）
の組換えポリペプチド。
【請求項４】
一般式（Ｉ）：
Ａ－Ｂ－Ｃ（ｉ）
（式中、
Ａは、カーゴ分子であり、
Ｂは、以下：
ａ）
ｉ．配列番号２のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質、
ｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質
由来の移行ドメイン；または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む移行ポリペプチドであり、
Ｃは、標的化部分である）
の組換えポリペプチド。
【請求項５】
ａ）において、
オーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質由来の移行ド

メインが、配列番号３のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＰＳＪ２８９８５．１のストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム（Streptosporangium nondiastaticum）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号４のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号５のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６０１５９３２８．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＳＬＢＮ－１１８タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号６のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６８０９６５３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＡ８タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号７のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７８６５９８６３．１のストレプトマイセス・ロゼオバーティシラタス（Streptomyces roseoverticillatus）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号８のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＪＺ５８９０７．１のストレプトマイセス・ピニテレ（Streptomyces piniterrae）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号９のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７９１１０３２１．１のストレプトマイセス（Streptomyces）ＭＢＴ７６タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１０のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１１のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０９５５８２０８２．１のストレプトマイセス・アルビレティクリ（Streptomyces albireticuli）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１２のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１３３２５９９１７．１のストレプタシディフィルス・ピニコラ（Streptacidiphilus pinicola）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１３のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７３１５６１８７．１のセイノネラ・ペプトノフィラ（Seinonella peptonophila）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１４のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１８９０５３１６０．１のロンギミセリウム・ツルファネンス（Longimycelium tulufanense）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１５のアミノ酸配列を有する、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１６のアミノ酸配列を有する、および
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１７のアミノ酸配列を有する、
請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）オーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質由来の、配列番号３のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項７】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＰＳＪ２８９８５．１のストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム（Streptosporangium nondiastaticum）タンパク質由来の、配列番号４のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１または２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項８】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質由来の、配列番号５のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１から３のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項９】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６０１５９３２８．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＳＬＢＮ－１１８タンパク質由来の、配列番号６のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１または２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１０】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６８０９６５３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＡ８タンパク質由来の、配列番号７のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１または２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１１】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７８６５９８６３．１のストレプトマイセス・ロゼオバーティシラタス（Streptomyces roseoverticillatus）タンパク質由来の、配列番号８のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１または２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１２】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＪＺ５８９０７．１のストレプトマイセス・ピニテレ（Streptomyces piniterrae）タンパク質由来の、配列番号９のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１または２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１３】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７９１１０３２１．１のストレプトマイセス（Streptomyces）ＭＢＴ７６タンパク質由来の、配列番号１０のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１または２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１４】

前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質由来の、配列番号１１のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１から３のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１５】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０９５５８２０８２．１のストレプトマイセス・アルビレティクリ（Streptomyces albireticuli）タンパク質由来の、配列番号１２のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１６】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１３３２５９９１７．１のストレプタシディフィルス・ピニコラ（Streptacidiphilus pinicola）タンパク質由来の、配列番号１３のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１または２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１７】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７３１５６１８７．１のセイノネラ・ペプトノフィラ（Seinonella peptonophila）タンパク質由来の、配列番号１４のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１８】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１８９０５３１６０．１のロンギミセリウム・ツルファネンス（Longimycelium tulufanense）タンパク質由来の、配列番号１５のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１または２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項１９】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質由来の、配列番号１６のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１から３のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２０】
前記移行ポリペプチドが、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１１６１１５７３４．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質由来の、配列番号１７のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）前記ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメインを含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２１】
前記移行ドメインが、ｂ）に定義されるとおりであり、前記ａ）に定義される移行ドメ

インと、その全長にわたり少なくとも少なくとも８５％同一である、請求項１から２０のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２２】
前記移行ドメインが、ｂ）に定義されるとおりであり、前記ａ）に定義される移行ドメインと、その全長にわたり少なくとも少なくとも９０％同一である、請求項１から２０のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２３】
前記移行ドメインが、ｂ）に定義されるとおりであり、前記ａ）に定義される移行ドメインと、その全長にわたり少なくとも少なくとも９５％同一である、請求項１から２０のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２４】
前記移行ドメインが、ｂ）に定義されるとおりであり、前記ａ）に定義される移行ドメインと、その全長にわたり少なくとも少なくとも９８％同一である、請求項１から２０のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２５】
前記移行ドメインが、ｂ）に定義されるとおりであり、前記ａ）に定義される移行ドメインと、その全長にわたり少なくとも少なくとも９９％同一である、請求項１から２０のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２６】
前記移行ポリペプチドが、ａ）に定義されるとおりである、請求項１から２０のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２７】
ＡおよびＢが、アミノ酸リンカーにより分離されている、請求項１から２６のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２８】
前記アミノ酸リンカーが、$(G_4S)_2$を含む、請求項２７または２８に記載の組換えポリペプチド。
【請求項２９】
前記アミノ酸リンカーが切断可能であり、好ましくは、前記アミノ酸リンカーが、プロテアーゼ認識部位を含み、好ましくは、前記プロテアーゼ認識部位が、システイン残基に挟まれて位置し、より好ましくは、前記プロテアーゼ認識部位が、フリンプロテアーゼ認識部位である、請求項２７または２８に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３０】
前記アミノ酸リンカーが、フリンプロテアーゼ認識部位を含む配列番号３２を含む、請求項２９に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３１】
前記$(G_4S)_2$が、前記配列番号３２に関してＮ末端に位置する、請求項３０に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３２】
ＢおよびＣが、アミノ酸リンカーにより分離されている、請求項１から２７のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３３】
前記アミノ酸リンカーが、$(G_4S)_2$を含む、請求項２７または２８に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３４】
前記アミノ酸リンカーが、配列番号３３を含む、請求項３２または３３に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３５】
前記$(G_4S)_2$が、前記配列番号３３に関してＮ末端に位置する、請求項３４に記載の組換えポリペプチド。

【請求項３６】
配列番号２２のアミノ酸１～８２１と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２２のアミノ酸１～８２１と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２２のアミノ酸１～８２１と９５％同一である、さらにより好ましくは、配列番号２２のアミノ酸１～８２１と１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３７】
配列番号２２の配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３８】
配列番号２３のアミノ酸１～８２２と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２３のアミノ酸１～８２２と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２３のアミノ酸１～８２２と９５％同一である、さらにより好ましくは、配列番号２３のアミノ酸１～８２２と１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項３９】
配列番号２３の配列、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４０】
配列番号２４のアミノ酸１～８２２と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２４のアミノ酸１～８２２と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２４のアミノ酸１～８２２と９５％同一である、さらにより好ましくは、配列番号２４のアミノ酸１～８２２と１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４１】
配列番号２４の配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４２】
配列番号２５のアミノ酸１～８２１と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２５のアミノ酸１～８２１と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２５のアミノ酸１～８２１と９５％同一である、さらにより好ましくは、配列番号２５のアミノ酸１～８２１と１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４３】
配列番号２５の配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４４】
配列番号２６のアミノ酸１～８０６と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２６のアミノ酸１～８０６と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２６のアミノ酸１～８０６と９５％同一である、さらにより好ましくは、配列番号２６のアミノ酸１～８０６と１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４５】
配列番号２６の配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４６】
配列番号２７のアミノ酸１～８１１と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２７のアミノ酸１～８１１と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２７のアミノ酸１～８１１と９５％同一である、さらにより好ましくは、配列番号２７のアミノ酸１～８１１と１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項４７】
配列番号２７の配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４８】
配列番号２８のアミノ酸１～８２２と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２８のアミノ酸１～８２２と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２８のアミノ酸１～８２２と９５％同一である、さらにより好ましくは、配列番号２８のアミノ酸１～８２２と１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項４９】
配列番号２８の配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５０】
配列番号２９のアミノ酸１～７９６と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２９のアミノ酸１～７９６と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２９のアミノ酸１～７９６と９５％同一である、さらにより好ましくは、配列番号２９のアミノ酸１～７９６と１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５１】
配列番号２９の配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５２】
配列番号３０のアミノ酸１～８２２と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号３０のアミノ酸１～８２２と９０％同一である、より好ましくは、配列番号３０のアミノ酸１～８２２と９５％同一である、さらにより好ましくは、配列番号３０のアミノ酸１～８２２と１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５３】
配列番号３０の配列を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５４】
前記標的化部分が、標的化ポリペプチドまたはアプタマーを含む、請求項１から３５のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５５】
前記標的化ポリペプチドが、抗体、抗体の結合断片、アフィボディ、ペプチド、アフィチン、ＤＡＲＰｉｎ、または受容体リガンドを含む、請求項４８に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５６】
前記標的化ポリペプチドが、Ｈｅｒ３に対するアフィボディを含む、請求項５５に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５７】
前記Ｈｅｒ３に対するアフィボディが、配列番号１９のアミノ酸配列を含む、請求項５６に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５８】
前記標的化ポリペプチドが、ａｖβ６インテグリンに対する受容体リガンドを含む、請求項５９に記載の組換えポリペプチド。
【請求項５９】
前記ａｖβ６インテグリンに対する受容体リガンドが、配列番号２０のアミノ酸配列を含む、請求項５２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６０】

前記標的化部分が、少なくとも２つの標的化ポリペプチド、少なくとも２つのアプタマー、または標的化ポリペプチドとアプタマーとの組合せを含む、請求項５４に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６１】
前記少なくとも２つの標的化ポリペプチドが、抗体、抗体の結合断片、アフィボディ、ペプチド、アフィチン、ＤＡＲＰｉｎ、受容体リガンド、およびそれらの組合せの群から選択される、請求項６０に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６２】
前記少なくとも２つの標的化ポリペプチドが、Ｈｅｒ３に対するアフィボディを含む、請求項６０または６１に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６３】
前記Ｈｅｒ３に対するアフィボディが、配列番号１９のアミノ酸配列を含む、請求項６２に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６４】
前記少なくとも２つの標的化ポリペプチドが、ａｖβ６インテグリンに対する受容体リガンドを含む、請求項６０から６３のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６５】
前記ａｖβ６インテグリンに対する受容体リガンドが、配列番号２０のアミノ酸配列を含む、請求項６４に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６６】
前記少なくとも２つの少なくとも２つの標的化ポリペプチド、前記少なくとも２つのアプタマー、または前記組合せが、アミノ酸リンカーにより分離されている、請求項６０から６５のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６７】
前記アミノ酸リンカーが、$(G_4S)_2$を含む、請求項６６に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６８】
前記標的化部分が、細胞表面タンパク質に結合する、請求項１から３５および５４から６７のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項６９】
前記細胞表面タンパク質が、系統特異的または組織特異的である、請求項６８に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７０】
前記細胞表面タンパク質が、普遍的に発現している、請求項６７に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７１】
前記細胞表面タンパク質が、疾患細胞において発現している、請求項６７に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７２】
前記細胞表面タンパク質が、疾患細胞に特異的であり、対応する健常細胞では発現していない、請求項６７に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７３】
前記細胞表面タンパク質が、疾患細胞において、対応する健常細胞と比べて上昇した発現を有する、請求項６７に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７４】
前記疾患細胞が、がん細胞である、請求項７１から７３のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７５】
前記カーゴ分子が、治療用ポリペプチドを含む、請求項１から３５および５４から７４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項７６】
前記治療用ポリペプチドが、細胞傷害性ポリペプチド、好ましくは、ポリペプチド毒素またはその機能的断片を含む、請求項７５に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７７】
前記細胞傷害性ポリペプチドが、ジフテリア毒素由来の触媒ドメインを含む、請求項７６に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７８】
前記細胞傷害性ポリペプチドが、ケロネー（Chelona）毒素由来の触媒ドメインを含む、請求項７６に記載の組換えポリペプチド。
【請求項７９】
前記触媒ドメインが、
配列番号２に記載のケロネー毒素（ＣＴ１）、
配列番号２１に記載のケロネー毒素（ＣＴ２）、または
配列番号３５に記載のケロネー毒素（ＣＴ３）
に由来する、請求項７８に記載の組換えポリペプチド。
【請求項８０】
配列番号２に記載のケロネー毒素（ＣＴ１）由来の触媒ドメインが、配列番号２のアミノ酸１～１８６位によるアミノ酸配列を有する；
配列番号２１に記載のケロネー毒素（ＣＴ２）由来の触媒ドメインが、配列番号２１のアミノ酸１～１８６位によるアミノ酸配列を有する；または
配列番号３５に記載のケロネー毒素（ＣＴ３）由来の触媒ドメインが、配列番号３５のアミノ酸１～１９１位によるアミノ酸配列を有する、請求項７９に記載の組換えポリペプチド。
【請求項８１】
前記治療用ポリペプチドが、病態では欠損しているタンパク質、またはその機能的断片を含む、請求項７５に記載の組換えポリペプチド。
【請求項８２】
前記治療用ポリペプチドが、ビブリオ・バルニフィカス（Vibrio vulnificus）由来のＲａｓ／Ｒａｐ１特異的エンドペプチダーゼ（ＲＲＳＰ）（配列番号１８）を含む、請求項７５に記載の組換えポリペプチド。
【請求項８３】
前記カーゴ分子が、「クリック」ケミストリーに用いるＮ末端システイン残基を含む、請求項１から３５および５４から７４のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項８４】
前記カーゴ分子が、核酸分子を含む、請求項１から３５、５４から７４および８３のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項８５】
請求項１から８１のいずれか一項に記載の組換えポリペプチドをコードする、核酸。
【請求項８６】
請求項１から８２のいずれか一項に記載の組換えポリペプチドを、許容される賦形剤、希釈剤または担体と共に含む、組成物。
【請求項８７】
請求項１から８２のいずれか一項に記載の組換えポリペプチドを、医薬的に許容される賦形剤、希釈剤または担体と共に含む、医薬組成物。
【請求項８８】
カーゴ分子を細胞に送達する方法であって、
請求項１から８２のいずれか一項に記載の組換えポリペプチドと前記細胞を接触させるステップを含む、方法。
【請求項８９】
前記カーゴ分子を細胞に送達するための、請求項１から８２のいずれか一項に記載の組

換えポリペプチドの使用。
【請求項９０】
細胞への前記カーゴ分子の送達に使用するための、請求項１から８２のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【請求項９１】
対象におけるがんを処置する方法であって、
請求項１から８２のいずれか一項に記載の組換えポリペプチドを前記対象に投与するステップを含む、方法。
【請求項９２】
対象におけるがんを処置するための、請求項１から８２のいずれか一項に記載の組換えポリペプチドの使用。
【請求項９３】
対象におけるがんの処置に使用するための、請求項１から８２のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年１１月４日に出願した「細胞送達に使用するための、新規細菌移行ドメインおよびそれを含む組換えポリペプチド」なる名称のギリシャ国特許出願第２０２１０１００７７０号からの優先権の利益を主張するものである。
【０００２】
分野
本開示は、一般的に送達プラットフォームに関する。特に、本開示は、カーゴ分子を細胞に送達するための、細菌毒素ベースのプラットフォームに関する。
【０００３】
背景
治療用分子は、細胞に送達することがたびたび困難である。治療用分子はたびたび、生体膜を容易には透過しない。免疫毒素は、その受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）を再標的化してがん受容体を標的にすること、および細胞内がんタンパク質を標的とする酵素カーゴを送達することの両方により、例えば、がん標的療法へと再利用されている細菌毒素、例えば、ジフテリア毒素（ＤＴ）などからなる生物学的製剤の一種である。しかしながら、ジフテリアに対する世界的なワクチン接種プログラムが、ＤＴ、およびＤＴベースの治療薬に対する集団レベルの免疫をもたらした。
【０００４】
タンパク質ベース治療薬を含む治療薬を細胞に送達する可能性を提供する送達プラットフォームの必要性が依然として存在する。
【０００５】
要旨
以前のアプローチの少なくとも１つの欠点を除去または軽減することが、本開示の主題である。
【０００６】
第１の態様では、本開示は、一般式（Ｉ）：
Ａ－Ｂ－Ｃ（ｉ）
（式中、
Ａは、カーゴ分子であり、
Ｂは、
ａ）
配列番号２のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号（GenBank Accession）ＰＳＪ２８９８５．１のストレプト

スポランギウム・ノンジアスタチカム（Streptosporangium nondiastaticum）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６０１５９３２８．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＳＬＢＮ－１１８タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６８０９６５３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＡ８タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７８６５９８６３．１のストレプトマイセス・ロゼオバーティシラタス（Streptomyces roseoverticillatus）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＪＺ５８９０７．１のストレプトマイセス・ピニテレ（Streptomyces piniterrae）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７９１１０３２１．１のストレプトマイセス（Streptomyces）ＭＢＴ７６タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０９５５８２０８２．１のストレプトマイセス・アルビレティクリ（Streptomyces albireticuli）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１３３２５９９１７．１のストレプタシディフィルス・ピニコラ（Streptacidiphilus pinicola）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７３１５６１８７．１のセイノネラ・ペプトノフィラ（Seinonella peptonophila）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１８９０５３１６０．１のロンギミセリウム・ツルファネンス（Longimycelium tulufanense）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＥＩＺ２９１３１３３．１のクレブシエラ・アエロゲネス（Klebsiella aerogenes）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＣＨ０５５１５９０．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＭＵＭ１７８Ｊタンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＢＢ４６７７７７７．１のクロシエラ・クリオフィラ（Crossiella cryophila）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４３２６１７５９．１のアロクツネリア種（Allokutzneria sp.）ＮＲＲＬ　Ｂ－２４８７２タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１５６０５１９１４．１のアロクツネリア・アルバータ（Allokutzneria albata）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１９９８９３２０４．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＶ１９タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４７２６４６０４．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＮＲＢＣ＿１１０６１１タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２０９５１３６１９．１のストレプトマイセス・シリンギウム（Streptomyces syringium）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＲＪＱ６９５８９．１のシュードノカルディア細菌（Pseudonocardiaceae bacterium）ＹＩＭ　ＰＨ２１７２３タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４３２１８８９２．１のアクチノキネオスポラ・バンコケンシス（Actinokineospora bangkokensis）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＢＦ６０５５８３４．１のストレプトマイセス・ユーロシディカス（Streptomyces eurocidicus）タンパク質、

ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６９７９０９０８．１のストレプトマイセス・パソシディニ（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｐａｔｈｏｃｉｄｉｎｉ）タンパク質、もしくは
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１５７８６８４７２．１のストレプトマイセス・カーチンガエンシス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｃａａｔｉｎｇａｅｎｓｉｓ）タンパク質
由来の移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む移行ポリペプチドであり、
Ｃは、標的化部分である）
の組換えポリペプチドを提供する。

【０００７】

一態様では、本明細書で定義される組換えポリペプチドをコードする核酸が提供される。

【０００８】

一態様では、本明細書で定義される核酸を含むベクターが提供される。

【０００９】

さらなる態様では、本開示は、本明細書で定義される組換えポリペプチドを、許容される賦形剤、希釈剤または担体と共に含む組成物を提供する。

【００１０】

一つの態様の実施形態において、本明細書で定義される組換えポリペプチドを、医薬的に許容される賦形剤、希釈剤または担体と共に含む医薬組成物が提供される。

【００１１】

一態様では、細胞を、本明細書で定義される組換えポリペプチドと接触させるステップを含む、カーゴ分子を細胞に送達する方法が提供される。

【００１２】

一態様では、カーゴ分子を細胞に送達するための、本明細書で定義される組換えポリペプチドの使用が提供される。

【００１３】

一態様では、カーゴ分子を細胞に送達するための医薬の調製用の、本明細書で定義される組換えポリペプチドの使用が提供される。

【００１４】

一態様では、細胞へのカーゴ分子の送達に使用するための、本明細書で定義される組換えポリペプチドが提供される。

【００１５】

一態様では、本明細書で定義される組換えポリペプチドを対象に投与するステップを含む、対象におけるがんを処置する方法が提供される。

【００１６】

一態様では、対象におけるがんを処置するための、本明細書で定義される組換えポリペプチドの使用が提供される。

【００１７】

一態様では、対象におけるがんを処置するための医薬の調製用の、本明細書で定義される組換えポリペプチドの使用が提供される。

【００１８】

一態様では、対象におけるがんの処置に用いる、本明細書で定義される組換えポリペプチドが提供される。

【００１９】

本開示の他の態様および特徴は、具体的な実施形態に関する以下の記載を、添付図面と合わせて検討すると当業者には明らかになる。

【００２０】

本開示の実施形態をここで、単に例として添付図面に関連して記載する。

【図面の簡単な説明】

【００２１】
【図１－１】図１Ａは、ジフテリア毒素の細胞侵入機構の略図である。
【図１－２】図１Ｂは、触媒ドメイン（Ｃ）および架橋フリン認識部位（Ｆ）に続いてトランスロカーゼ（Ｔ）および受容体結合ドメイン（Ｒ）を示す、ＤＴおよびＣＴ１のドメイン構成を示す図である。
【図１－３】図１Ｃは、ジフテリア毒素およびＣＴ１の結晶構造を示す図である。
【図２－１】図２Ａは、ＣＴ１触媒ドメインの機能および放出を評価する実験の結果を示すグラフである。ＤＴ、およびＣＴ１のＣドメインを含有するＤＴキメラは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に対して同様の毒性を示す（ｂ）。
【図２－２】図２Ｂは、ＤＴ、およびＣＴ１のＣドメインを含有するＤＴキメラは、ＤＰＨ４－／－細胞での細胞生存率に対する効果を示さないことを示すグラフである。
【図２－３】図２Ｃは、ＤＴおよびＣＴ１を細胞溶解物とインキュベートすると、フリン認識部位での切断が存在したことを示す図である。
【図３－１】図３Ａは、ＤＴ、およびＣＴ１由来のフリン部位を含有するＤＴキメラは、Ｖｅｒｏ細胞に対して等効力であることを示すグラフであり、両毒素による効率的なカーゴ放出を示す。
【図３－２】図３Ｂは、ＤＴ－ＣのＣＴ１－Ｔ媒介送達による、Ｖｅｒｏ細胞中でのタンパク質合成の低下を示すグラフである。
【図３－３】図３Ｃは、非天然カーゴＲＲＳＰのＣＴ１－Ｔ媒介送達を示すグラフである。ＲＲＳＰは、ＣＦＰＡＣ－１などのＲＡＳ変異体細胞に対して毒性である。
【図３－４】図３Ｄは、送達が、ＲＲＳＰによる、細胞内ＲＡＳの切断により確証されたことを示す図である。
【図３－５】図３Ｅは、ＨＰＡＦ　ＩＩ細胞での細胞生存率の測定による、ＤＴ－ＣのＣＴ１－Ｔ媒介送達を示すグラフである。予想外に、ＣＴ１－Ｔは、ＤＴ－Ｒ以外の標的化ドメインと複合体形成した場合、ＤＴ－Ｔよりも効率的なトランスロカーゼである。
【図３－６】図３Ｆは、ＨＰＡＦ　ＩＩ細胞での細胞生存率の測定による、ＲＲＳＰのＣＴ１－Ｔ媒介送達を示すグラフである。
【図４－１】図４Ａは、ＣＴ１のヒト血清結合および中和を評価する実験の結果を示すグラフである。ヒト血清中に既存の抗ＤＴ抗体または抗ＣＴ１抗体のレベルを定量するために、ＤＴまたはＣＴ１を、Ｎｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレート上に固定化し、異なる希釈でのヒト血清とインキュベートした。次いでウェルを、ＨＲＰにコンジュゲートした抗ヒトＩｇＧ抗体とインキュベートし、ＴＭＢ試薬を用いてＨＲＰを発色させた。６３０ｎｍにおいて吸光度を読み取った。
【図４－２】図４Ｂは、ＣＴ１のヒト血清結合および中和を評価するさらなる実験の結果を示すグラフである。細胞を害する（intoxicate）ＤＴまたはＣＴ１の能力に対する中和抗体の効果を決定するために、様々なＤＴ／ＣＴ１毒素キメラ（表示）をヒト血清（またはＰＢＳ）とインキュベートし、次いでＶｅｒｏ細胞に添加し、タンパク質合成レベルを測定した。ＥＣ５０値を測定し、ＰＢＳ対照との倍率差（fold-difference）をプロットした。ヒト血清は、細胞を害するＣＴ１の能力に対して効果を有さず、ＣＴ１は、ヒト血清により中和されないことを実証する。
【図５】図５は、ＤＴとＣＴ１との間で（between DT an CT1）保存されている鍵残基の略図である。
【図６－１】図６Ａおよび図６Ｂは、トランスロカーゼの機能的特徴づけの結果を示すグラフである。
【図６－２】図６Ａおよび図６Ｂは、トランスロカーゼの機能的特徴づけの結果を示すグラフである。
【図７－１】図７Ａは、ヒト血清中の抗体が、ＤＴを認識するが、ＣＴ１には結合を示さないことを示すグラフである。
【図７－２】図７Ｂは、ヒト血清中の抗体が、ＤＴ由来のトランスロカーゼを認識するが、ＣＴ１由来は認識しないことを示すグラフである。

【図８】図８は、抗ＤＴ抗体が、ＣＴ１ベースの免疫毒素を中和しないことを示すグラフである。
【図９】図９は、様々なトランスロカーゼの関係を図解する系統樹を示す図である。
【００２２】
詳細な説明
一般的に、本開示は、細胞送達に使用するための新規細菌移行ドメインを提供する。それらの移行ドメインを含む組換えポリペプチドが記載される。組換えポリペプチドは、治療用ポリペプチドを含むカーゴ分子の送達における使用を目的としている。
【００２３】
組換えポリペプチド
一態様では、一般式（Ｉ）：
Ａ－Ｂ－Ｃ（ｉ）
（式中、
Ａは、カーゴ分子であり、
Ｂは、
ａ）
配列番号２のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＰＳＪ２８９８５．１のストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム（Streptosporangium nondiastaticum）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６０１５９３２８．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＳＬＢＮ－１１８タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６８０９６５３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＡ８タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７８６５９８６３．１のストレプトマイセス・ロゼオバーティシラタス（Streptomyces roseoverticillatus）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＪＺ５８９０７．１のストレプトマイセス・ピニテレ（Streptomyces piniterrae）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７９１１０３ｆ２１．１のストレプトマイセス（Streptomyces）ＭＢＴ７６タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０９５５８２０８２．１のストレプトマイセス・アルビレティクリ（Streptomyces albireticuli）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１３３２５９９１７．１のストレプタシディフィルス・ピニコラ（Streptacidiphilus pinicola）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７３１５６１８７．１のセイノネラ・ペプトノフィラ（Seinonella peptonophila）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１８９０５３１６０．１のロンギミセリウム・ツルファネンス（Longimycelium tulufanense）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＥＩＺ２９１３１３３．１のクレブシエラ・アエロゲネス（Klebsiella aerogenes）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＣＨ０５５１５９０．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＭＵＭ１７８Ｊタンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＢＢ４６７７７７７．１のクロシエラ・クリオフィラ（Cross

iella cryophila）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４３２６１７５９．１のアロクツネリア種（Allokutzneria sp.）ＮＲＲＬ　Ｂ－２４８７２タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１５６０５１９１４．１のアロクツネリア・アルバータ（Allokutzneria albata）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１９９８９３２０４．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＶ１９タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４７２６４６０４．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＮＲＢＣ＿１１０６１１タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２０９５１３６１９．１のストレプトマイセス・シリンギウム（Streptomyces syringium）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＲＪＱ６９５８９．１のシュードノカルディア細菌（Pseudonocardiaceae bacterium）ＹＩＭ　ＰＨ２１７２３タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４３２１８８９２．１のアクチノキネオスポラ・バンコケンシス（Actinokineospora bangkokensis）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＢＦ６０５５８３４．１のストレプトマイセス・ユーロシディカス（Streptomyces eurocidicus）タンパク質、
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６９７９０９０８．１のストレプトマイセス・パソシディニ（Streptomyces pathocidini）タンパク質、もしくは
ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１５７８６８４７２．１のストレプトマイセス・カーチンガエンシス（Streptomyces caatingaensis）タンパク質
由来の移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む移行ポリペプチドであり、
Ｃは、標的化部分である）
の組換えポリペプチドが提供される。
【００２４】
　一実施形態では、ａ）において、移行ドメインが、
－ 配列番号２のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＰＳＪ２８９８５．１のストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム（Streptosporangium nondiastaticum）タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６０１５９３２８．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＳＬＢＮ－１１８タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６８０９６５３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＡ８タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７８６５９８６３．１のストレプトマイセス・ロゼオバーティシラタス（Streptomyces roseoverticillatus）タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＪＺ５８９０７．１のストレプトマイセス・ピニテレ（Streptomyces piniterrae）タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７９１１０３２１．１のストレプトマイセス（Streptomyces）ＭＢＴ７６タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１３３２５９９１７．１のストレプタシディフィルス・ピニコラ（Streptacidiphilus pinicola）タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１８９０５３１６０．１のロンギミセリウム・ツルファネンス（Longimycelium tulufanense）タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（A

ustwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質、または
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質
に由来する。
【００２５】
一実施形態では、ａ）において、移行ドメインが、
－ 配列番号２のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質、または
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質
に由来する。
【００２６】
一実施形態では、ａ）において、移行ドメインが、
－ 配列番号２のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質、
－　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質
に由来する。
【００２７】
一実施形態では、ａ）において、
ｉ．本明細書でＣＴ１と呼ばれるオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号３のアミノ酸配列を有する、
ｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＰＳＪ２８９８５．１のストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム（Streptosporangium nondiastaticum）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号４のアミノ酸配列を有する、
ｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号５のアミノ酸配列を有する、
ｉｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６０１５９３２８．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＳＬＢＮ－１１８タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号６のアミノ酸配列を有する、
ｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６８０９６５３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＡ８タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号７のアミノ酸配列を有する、
ｖｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７８６５９８６３．１のストレプトマイセス・ロゼオバーティシラタス（Streptomyces roseoverticillatus）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号８のアミノ酸配列を有する、
ｖｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＪＺ５８９０７．１のストレプトマイセス・ピニテレ（Streptomyces piniterrae）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号９のアミノ酸配列を有する、
ｖｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７９１１０３２１．１のストレプトマイセス（Streptomyces）ＭＢＴ７６タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１０のアミノ酸配列を有する、
ｉｘ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１１のアミノ酸配列を有する、

ｘ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０９５５８２０８２．１のストレプトマイセス・アルビレティクリ（Streptomyces albireticuli）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１２のアミノ酸配列を有する、
ｘｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１３３２５９９１７．１のストレプタシディフィルス・ピニコラ（Streptacidiphilus pinicola）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１３のアミノ酸配列を有する、
ｘｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７３１５６１８７．１のセイノネラ・ペプトノフィラ（Seinonella peptonophila）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１４のアミノ酸配列を有する、
ｘｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１８９０５３１６０．１のロンギミセリウム・ツルファネンス（Longimycelium tulufanense）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１５のアミノ酸配列を有する、
ｘｉｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１６のアミノ酸配列を有する、
ｘｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１７のアミノ酸配列を有する、および
ｘｖｉ．移行ドメインが、配列番号３６～４８のいずれか１つのアミノ酸配列を有する。

【００２８】

一実施形態では、ａ）において、
ｉ．本明細書でＣＴ１と呼ばれるオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号３のアミノ酸配列を有する、
ｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＰＳＪ２８９８５．１のストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム（Streptosporangium nondiastaticum）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号４のアミノ酸配列を有する、
ｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号５のアミノ酸配列を有する、
ｉｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６０１５９３２８．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＳＬＢＮ－１１８タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号６のアミノ酸配列を有する、
ｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６８０９６５３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＡ８タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号７のアミノ酸配列を有する、
ｖｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７８６５９８６３．１のストレプトマイセス・ロゼオバーティシラタス（Streptomyces roseoverticillatus）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号８のアミノ酸配列を有する、
ｖｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＪＺ５８９０７．１のストレプトマイセス・ピニテレ（Streptomyces piniterrae）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号９のアミノ酸配列を有する、
ｖｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７９１１０３２１．１のストレプトマイセス（Streptomyces）ＭＢＴ７６タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１０のアミノ酸配列を有する、
ｉｘ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１１のアミノ酸配列を有する、
ｘｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１３３２５９９１７．１のストレプタシディフィルス・ピニコラ（Streptacidiphilus pinicola）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１３のアミノ酸配列を有する、

ｘｉｉｉ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１８９０５３１６０．１のロンギミセリウム・ツルファネンス（Longimycelium tulufanense）タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１５のアミノ酸配列を有する、
ｘｉｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１６のアミノ酸配列を有する、および
ｘｖ．ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質由来の移行ドメインが、配列番号１７のアミノ酸配列を有する。

【００２９】

本明細書で呼ばれる「移行ポリペプチド」は、移行ドメインを含むポリペプチドを指すと意図される。

【００３０】

本明細書で呼ばれる「移行ドメイン」は、細胞膜を介して起こる、タンパク質の輸送を促進するように機能して、それにより細胞侵入を促進するポリペプチド配列である。この活性は、例えば、本明細書に記載されるアッセイを使用して評価され得る。

【００３１】

一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）オーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）タンパク質であるＣＴ１由来の、配列番号３のアミノ酸配列を有する移行ドメイン（本明細書で「ＣＴ１－Ｔ」と呼ばれる）、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。

【００３２】

一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＰＳＪ２８９８５．１のストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム（Streptosporangium nondiastaticum）タンパク質由来の、配列番号４のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。

【００３３】

一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質由来の、配列番号５のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。

【００３４】

一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６０１５９３２８．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＳＬＢＮ－１１８タンパク質由来の、配列番号６のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。

【００３５】

一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６８０９６５３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＡ８タンパク質由来の、配列番号７のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン

を含む。
【００３６】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７８６５９８６３．１のストレプトマイセス・ロゼオバーティシラタス（Streptomyces roseoverticillatus）タンパク質由来の、配列番号８のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００３７】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＪＺ５８９０７．１のストレプトマイセス・ピニテレ（Streptomyces piniterrae）タンパク質由来の、配列番号９のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００３８】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７９１１０３２１．１のストレプトマイセス（Streptomyces）ＭＢＴ７６タンパク質由来の、配列番号１０のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００３９】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質由来の、配列番号１１のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００４０】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０９５５８２０８２．１のストレプトマイセス・アルビレティクリ（Streptomyces albireticuli）タンパク質由来の、配列番号１２のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００４１】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１３３２５９９１７．１のストレプタシディフィルス・ピニコラ（Streptacidiphilus pinicola）タンパク質由来の、配列番号１３のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００４２】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７３１５６１８７．１のセイノネラ・ペプトノフィラ（Seinonella peptonophila）タンパク質由来の、配列番号１４のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。

【００４３】
移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１８９０５３１６０．１のロンギミセリウム・ツルファネンス（Longimycelium tulufanense）タンパク質由来の、配列番号１５のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００４４】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質由来の、配列番号１６のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００４５】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質由来の、配列番号１７のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００４６】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＥＩＺ２９１３１３３．１のクレブシエラ・アエロゲネス（Klebsiella aerogenes）タンパク質由来の、配列番号３６のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００４７】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＣＨ０５５１５９０．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＭＵＭ１７８Ｊタンパク質由来の、配列番号３７のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００４８】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＢＢ４６７７７７７．１のクロシエラ・クリオフィラ（Crossiella cryophila）タンパク質由来の、配列番号３８のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００４９】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４３２６１７５９．１のアロクツネリア種（Allokutzneria sp.）ＮＲＲＬ　Ｂ－２４８７２タンパク質由来の、配列番号３９のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００５０】

一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１５６０５１９１４．１のアロクツネリア・アルバータ（Allokutzneria albata）タンパク質由来の、配列番号４０のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００５１】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１９９８９３２０４．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＶ１９タンパク質由来の、配列番号４１のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００５２】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４７２６４６０４．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＮＲＢＣ＿１１０６１１タンパク質由来の、配列番号４２のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００５３】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２０９５１３６１９．１のストレプトマイセス・シリンギウム（Streptomyces syringium）タンパク質由来の、配列番号４３のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００５４】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＲＪＱ６９５８９．１のシュードノカルディア細菌（Pseudonocardiaceae bacterium）ＹＩＭ　ＰＨ２１７２３タンパク質由来の、配列番号４４のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００５５】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４３２１８８９２．１のアクチノキネオスポラ・バンコケンシス（Actinokineospora bangkokensis）タンパク質由来の、配列番号４５のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００５６】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＭＢＦ６０５５８３４．１のストレプトマイセス・ユーロシディカス（Streptomyces eurocidicus）タンパク質由来の、配列番号４６のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００５７】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、

ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６９７９０９０８．１のストレプトマイセス・パソシディニ（Streptomyces pathocidini）タンパク質由来の、配列番号４７のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００５８】
　一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１５７８６８４７２．１のストレプトマイセス・カーチンガエンシス（Streptomyces caatingaensis）タンパク質由来の、配列番号４８のアミノ酸配列を有する移行ドメイン、または
ｂ）　ａ）に定義される移行ドメインと少なくとも８０％同一である移行ドメイン
を含む。
【００５９】
　ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質は、本明細書で「ＣＴ２」と呼ばれ得る。ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質は、本明細書で「ＣＴ３」と呼ばれ得る。
【００６０】
　一実施形態では、移行ドメインは、上記の実施形態のいずれか１つにおけるｂ）に定義されるとおりであり、ａ）に定義される移行ドメインと、その全長にわたり少なくとも少なくとも８５％同一である。一実施形態では、移行ドメインは、上記の実施形態のいずれか１つにおけるｂ）に定義されるとおりであり、ａ）に定義される移行ドメインと、その全長にわたり少なくとも少なくとも９０％同一である。一実施形態では、移行ドメインは、上記の実施形態のいずれか１つにおけるｂ）に定義されるとおりであり、ａ）に定義される移行ドメインと、その全長にわたり少なくとも少なくとも９５％同一である。一実施形態では、移行ドメインは、上記の実施形態のいずれか１つにおけるｂ）に定義されるとおりであり、ａ）に定義される移行ドメインと、その全長にわたり少なくとも少なくとも９８％同一である。一実施形態では、移行ドメインは、上記の実施形態のいずれか１つにおけるｂ）に定義されるとおりであり、ａ）に定義される移行ドメインと、その全長にわたり少なくとも少なくとも９９％同一である。
【００６１】
　一実施形態では、移行ポリペプチドは、上記の実施形態のいずれか１つにおけるａ）に定義されるとおりである。
【００６２】
　一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）オーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＣＴ１タンパク質由来の、配列番号３のアミノ酸配列を有する移行ドメイン
を含む。
【００６３】
　一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＰＳＪ２８９８５．１のストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム（Streptosporangium nondiastaticum）タンパク質由来の、配列番号４のアミノ酸配列を有する移行ドメイン
を含む。
【００６４】
　一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＳＤＴ８３３３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＴＬＩ０５３タンパク質由来の、配列番号５のアミノ酸配列を有する移行ドメイン

を含む。
【００６５】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６０１５９３２８．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＳＬＢＮ－１１８タンパク質由来の、配列番号６のアミノ酸配列を有する移行ドメイン
を含む。
【００６６】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６８０９６５３１．１のストレプトマイセス種（Streptomyces sp.）ＡＡ８タンパク質由来の、配列番号７のアミノ酸配列を有する移行ドメイン
を含む。
【００６７】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７８６５９８６３．１のストレプトマイセス・ロゼオバーティシラタス（Streptomyces roseoverticillatus）タンパク質由来の移行ドメイン
を含む。
【００６８】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＪＺ５８９０７．１のストレプトマイセス・ピニテレ（Streptomyces piniterrae）タンパク質由来の移行ドメイン
を含む。
【００６９】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７９１１０３２１．１のストレプトマイセス（Streptomyces）ＭＢＴ７６タンパク質由来の、配列番号１０のアミノ酸配列を有する移行ドメイン
を含む。
【００７０】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１２０７５７４７３．１のストレプトマイセス・クレンキイ（Streptomyces klenkii）タンパク質由来の移行ドメイン
を含む。
【００７１】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０９５５８２０８２．１のストレプトマイセス・アルビレティクリ（Streptomyces albireticuli）タンパク質由来の、配列番号１２のアミノ酸配列を有する移行ドメイン
を含む。
【００７２】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１３３２５９９１７．１のストレプタシディフィルス・ピニコラ（Streptacidiphilus pinicola）タンパク質由来の、配列番号１３のアミノ酸配列を有する移行ドメイン
を含む。
【００７３】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７３１５６１８７．１のセイノネラ・ペプトノフィ

ラ（Seinonella peptonophila）タンパク質由来の、配列番号１４のアミノ酸配列を有する移行ドメイン
を含む。
【００７４】
移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１８９０５３１６０．１のロンギミセリウム・ツルファネンス（Longimycelium tulufanense）タンパク質由来の、配列番号１５のアミノ酸配列を有する移行ドメイン
を含む。
【００７５】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿２１９１０６９９５．１のオーストウィッキア種（Austwickia sp.）ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂタンパク質由来の、配列番号１６のアミノ酸配列を有する移行ドメイン
を含む。
【００７６】
一実施形態では、移行ポリペプチドは、
ａ）ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１６２８７３０１７．１のオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）ＬＫ１６－１８タンパク質由来の、配列番号１７のアミノ酸配列を有する移行ドメイン
を含む。
【００７７】
一部の実施形態では、配列番号１２のアミノ酸配列（ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０９５５８２０８２．１のストレプトマイセス・アルビレティクリ（Streptomyces albireticuli）タンパク質由来）および配列番号１４のアミノ酸配列（ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿０７３１５６１８７．１のセイノネラ・ペプトノフィラ（Seinonella peptonophila）タンパク質由来）を有する移行ドメインは、上記の実施形態から除外される。
【００７８】
一部の実施形態では、移行ポリペプチドは、上記の対応する移行ドメインのいずれか１つを含む、全長タンパク質の機能的短縮化を含み得て、ただし、移行ドメインの機能は維持されている。
【００７９】
一実施形態では、ＡおよびＢは、リンカーにより分離されている。一実施形態では、ＡおよびＢは、アミノ酸リンカーにより分離されている。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、$(G_4S)_2$を含む。一実施形態では、リンカーは切断可能である。一実施形態では、リンカーは、プロテアーゼ認識部位を含む。一実施形態では、プロテアーゼ認識部位は、フリンプロテアーゼ認識部位である。一実施形態では、プロテアーゼ認識部位は、分子内ループを形成するジスルフィド結合の形成を可能にするシステイン残基に挟まれて位置する（bracketed by cysteine residues）。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、システイン残基に挟まれて位置するフリンプロテアーゼ認識部位を含む。一例示的実施形態では、アミノ酸リンカーは、フリンプロテアーゼ認識部位、およびそれを挟むシステイン残基を含む配列番号３２を含む。一実施形態では、前記$(G_4S)_2$は、前記配列番号３２に関してＮ末端に位置する。一実施形態では、リンカーは、自己切断性である。一実施形態では、リンカーは、自己排除性（self-clearing）である。一実施形態では、リンカーは、オートプロセシングドメインを含む。
【００８０】
一実施形態では、ＢおよびＣは、リンカーにより分離されている。一実施形態では、ＢおよびＣは、アミノ酸リンカーにより分離されている。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、（Ｇ４Ｓ）２を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、（Ｇ４Ｓ）２を含む

。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、配列番号３３を含む。一実施形態では、前記（Ｇ４Ｓ）２は、前記配列番号３３に関してＮ末端に位置する。

【００８１】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２２のアミノ酸１～８２１と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２２のアミノ酸１～８２１と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２２のアミノ酸１～８２１と９５％同一である、さらに好ましくは、配列番号２２のアミノ酸１～８２１と１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００８２】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２２の配列を含む。

【００８３】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２３のアミノ酸１～８２２と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２３のアミノ酸１～８２２と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２３のアミノ酸１～８２２と９５％同一である、さらに好ましくは、配列番号２３のアミノ酸１～８２２と１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００８４】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２３の配列を含む。

【００８５】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２４のアミノ酸１～８２２と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２４のアミノ酸１～８２２と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２４のアミノ酸１～８２２と９５％同一である、さらに好ましくは、配列番号２４のアミノ酸１～８２２と１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００８６】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２４の配列を含む。

【００８７】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２５のアミノ酸１～８２１と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２５のアミノ酸１～８２１と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２５のアミノ酸１～８２１と９５％同一である、さらに好ましくは、配列番号２５のアミノ酸１～８２１と１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００８８】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２５の配列を含む。

【００８９】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２６のアミノ酸１～８０６と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２６のアミノ酸１～８０６と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２６のアミノ酸１～８０６と９５％同一である、さらに好ましくは、配列番号２６のアミノ酸１～８０６と１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００９０】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２６の配列を含む。

【００９１】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２７のアミノ酸１～８１１と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２７のアミノ酸１～８１１と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２７のアミノ酸１～８１１と９５％同一である、さらに好ましくは、配列番号２７のアミノ酸１～８１１と１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００９２】

一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２７の配列を含む。

【００９３】
一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２８のアミノ酸１～８２２と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２８のアミノ酸１～８２２と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２８のアミノ酸１～８２２と９５％同一である、さらに好ましくは、配列番号２８のアミノ酸１～８２２と１００％同一であるアミノ酸配列を含む。
【００９４】
一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２８の配列を含む。
【００９５】
一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２９のアミノ酸１～７９６と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号２９のアミノ酸１～７９６と９０％同一である、より好ましくは、配列番号２９のアミノ酸１～７９６と９５％同一である、さらに好ましくは、配列番号２９のアミノ酸１～７９６と１００％同一であるアミノ酸配列を含む。
【００９６】
一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２９の配列を含む。
【００９７】
一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号３０のアミノ酸１～８２２と少なくとも８０％同一である、好ましくは、配列番号３０のアミノ酸１～８２２と９０％同一である、より好ましくは、配列番号３０のアミノ酸１～８２２と９５％同一である、さらに好ましくは、配列番号３０のアミノ酸１～８２２と１００％同一であるアミノ酸配列を含む。
【００９８】
一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号３０の配列を含む。
【００９９】
一実施形態では、標的化部分は、標的化ポリペプチドまたはアプタマーを含む。
【０１００】
一実施形態では、標的化ポリペプチドは、抗体、抗体の結合断片、アフィボディ（affibody）、アフィチン（affitin）、ＤＡＲＰｉｎ、または受容体リガンドを含む。
【０１０１】
一実施形態では、標的化ポリペプチドは、Ｈｅｒ３に対するアフィボディを含む。一実施形態では、Ｈｅｒ３に対するアフィボディは、配列番号１９のアミノ酸配列を含む。
【０１０２】
一実施形態では、標的化ポリペプチドは、ａｖβ６インテグリンに対する受容体リガンドを含む。一実施形態では、ａｖβ６インテグリンに対する受容体リガンドは、配列番号２０のアミノ酸配列を含む。
【０１０３】
一実施形態では、標的化部分は、少なくとも２つの標的化ポリペプチド、少なくとも２つのアプタマー、または標的化ポリペプチドとアプタマーとの組合せを含む。一実施形態では、少なくとも２つの標的化ポリペプチドは、抗体、抗体の結合断片、アフィボディ、ペプチド、アフィチン、ＤＡＲＰｉｎ、受容体リガンド、およびそれらの組合せの群から選択される。一実施形態では、少なくとも２つの標的化ポリペプチドは、Ｈｅｒ３に対するアフィボディを含む。一実施形態では、Ｈｅｒ３に対するアフィボディは、配列番号１９のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、少なくとも２つの標的化ポリペプチドは、ａｖβ６インテグリンに対する受容体リガンドを含む。一実施形態では、ａｖβ６インテグリンに対する受容体リガンドは、配列番号２０のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、少なくとも２つの標的化ポリペプチドは、Ｈｅｒ３に対するアフィボディおよびａｖβ６インテグリンに対する受容体リガンドの両方を含み、好ましくは、前者は配列番号１９のアミノ酸配列を含み、後者は配列番号２０のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、少なくとも２つの少なくとも２つの標的化ポリペプチド（at least two least two target

ing polypeptides）、少なくとも２つのアプタマー、またはその組合せは、アミノ酸リンカーにより分離されている。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、$(G_4S)_2$を含む。

【０１０４】

一実施形態では、標的化部分は、細胞表面タンパク質に結合する。

【０１０５】

一実施形態では、細胞表面タンパク質は、系統特異的（lineage-specific）または組織特異的である。

【０１０６】

一実施形態では、細胞表面タンパク質は、普遍的に（ユビキタスに（ubiquitously））発現している。

【０１０７】

一実施形態では、細胞表面タンパク質は、疾患細胞において発現している。

【０１０８】

一実施形態では、細胞表面タンパク質は、疾患細胞に特異的であり、対応する健常細胞では発現していない。

【０１０９】

一実施形態では、細胞表面タンパク質は、疾患細胞において、対応する健常細胞と比べて上昇した発現を有する。

【０１１０】

一実施形態では、疾患細胞は、がん細胞である。

【０１１１】

一実施形態では、カーゴ分子は、カーゴポリペプチドを含む。

【０１１２】

カーゴポリペプチドは、細胞送達が望まれるいずれかのポリペプチドを含み得る。カーゴポリペプチドは、酵素、または実質的に同じ活性を有するその活性断片を含み得る。「実質的に同じ活性」とは、酵素のコア機能が、断片において実質的に不変であることを意味する。

【０１１３】

カーゴポリペプチドは、１０ｋＤａ未満、１０ｋＤａ超、２０ｋＤａ超、３０ｋＤａ超、５０ｋＤａ超、１００ｋＤａ超、または１５０ｋＤａ超の分子量を有し得る。

【０１１４】

カーゴポリペプチドは、ゲノム修飾タンパク質を含む。ゲノム修飾タンパク質は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様エフェクタヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、またはＣＲＩＳＰＲ（規則的な間隔をもってクラスタ化された短鎖反復回文配列）タンパク質を含む。ＣＲＩＳＰＲタンパク質は、Ｃａｓ９であり得る。カーゴポリペプチドは、ゲノム修飾タンパク質と核酸、例えばガイド核酸などとの複合体を含み得る。例えば、Ｃａｓ９は、核酸（例えば、ガイドＲＮＡなど）、例えば、ｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡ、および／またはｓｇＲＮＡなどと複合体形成し得る。

【０１１５】

一実施形態では、カーゴ分子は、治療用ポリペプチドを含む。

【０１１６】

「治療用ポリペプチド」とは、その細胞送達が治療目的に使用され得るあらゆるタンパク質を意味する。例えば、多くのヒト疾患または障害は、タンパク質欠損を原因とするか、または特徴とすることが周知である。治療用タンパク質は、その送達がそのような欠損を改善または修正し得るタンパク質を含む。治療用タンパク質は、疾患または障害において欠損しているタンパク質を置換するように作用し得る。治療用タンパク質は、疾患または障害において欠損しているタンパク質であり得る。しかしながら、治療用タンパク質は、疾患または障害において欠損しているタンパク質と必ずしも同一である必要はない。例えば、治療用タンパク質は、欠損タンパク質の活性断片または修飾型であり得る。治療用

タンパク質はさらに、疾患または障害の根拠となるタンパク質欠損を部分的または完全に機能補償し得る。治療用タンパク質はさらに、特定のタンパク質の細胞欠損の下流効果または二次効果を改善または修正し得る。

【０１１７】

一実施形態では、治療用ポリペプチドは、細胞傷害性ポリペプチド、好ましくは、ポリペプチド毒素またはその機能的断片を含む。一実施形態では、細胞傷害性ポリペプチドは、ジフテリア毒素由来の触媒ドメインを含む。一実施形態では、細胞傷害性ポリペプチドは、ケロネー毒素（Chelona Toxin）に由来する、例えば、本明細書に記載されるＣＴ１（配列番号２）、ＣＴ２（配列番号２１）、またはＣＴ３（配列番号３５）などに由来する触媒ドメインを含む。

【０１１８】

一実施形態では、触媒ドメインは、ＣＴ１に由来する。一実施形態では、配列番号２（ＣＴ１）に記載のケロネー毒素由来の触媒ドメインは、配列番号２のアミノ酸１～１８６位によるアミノ酸配列を有する。

【０１１９】

一実施形態では、触媒ドメインは、ＣＴ２に由来する。一実施形態では、配列番号２１（ＣＴ２）に記載のケロネー毒素由来の触媒ドメインは、配列番号２１のアミノ酸１～１８６位によるアミノ酸配列を有する。

【０１２０】

一実施形態では、触媒ドメインは、ＣＴ３に由来する。一実施形態では、配列番号３５（ＣＴ３）に記載のケロネー毒素由来の触媒ドメインは、配列番号３５のアミノ酸１～１９１位によるアミノ酸配列を有する。

【０１２１】

一実施形態では、治療用ポリペプチドは、病態では欠損しているタンパク質（a protein that is deficient is a disease state）、またはその機能的断片を含む。

【０１２２】

一実施形態では、治療用ポリペプチドは、例えば、配列番号１８に記載される、ビブリオ・バルニフィカス（Vibrio vulnificus）由来のＲａｓ／Ｒａｐ１特異的エンドペプチダーゼ（ＲＲＳＰ）を含む。一部の実施形態では、治療用ポリペプチドは、ＲＲＳＰと少なくとも８０％同一であり得る。一部の実施形態では、治療用ポリペプチドは、ＲＲＳＰと少なくとも９０％同一であり得る。一部の実施形態では、治療用ポリペプチドは、ＲＲＳＰと少なくとも９５％同一であり得る。一部の実施形態では、治療用ポリペプチドは、ＲＲＳＰと少なくとも９８％同一であり得る。それらの配列バリアントは、全長ＲＲＳＰと実質的に同じ活性を保持し得る。

【０１２３】

一実施形態では、カーゴ分子は、「クリック」ケミストリーバイオコンジュゲーションに用いるＮ末端システイン残基を含む。

【０１２４】

一実施形態では、カーゴ分子は、核酸分子を含む。

【０１２５】

本明細書に記載される配列同一性パーセント（percent sequence identifies）は、アライメントの全長にわたって計算され得る。

【０１２６】

本明細書で呼ぶアミノ酸配列は、一部の実施形態では、参照配列（表１に記載されるものなど、下記）と比べて配列相違を含み得る。それは、バリアント、変異、挿入または欠失であり得る。一部の用途では、タンパク質の一次機能が実質的には変更または抑止されていないことの確保が重要であり得るが、それは、例えば、本明細書に記載されるアッセイを使用して容易に試験することができる。本明細書に記載されるアミノ酸配列は、参照配列との７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、または９９％以上の同一性の配列を含み得る。アミノ酸配列は、保存的アミノ酸置換（conservative

amino substitutions）を含み得る。当技術分野で公知の保存的アミノ酸置換は、丸括弧内に保存的置換可能候補アミノ酸を示す、以下のとおりである：Ａｌａ（Ｇｌｙ、Ｓｅｒ）；Ａｒｇ（Ｇｌｙ、Ｇｌｎ）；Ａｓｎ（Ｇｌｎ；Ｈｉｓ）；Ａｓｐ（Ｇｌｕ）；Ｃｙｓ（Ｓｅｒ）；Ｇｌｎ（Ａｓｎ、Ｌｙｓ）；Ｇｌｕ（Ａｓｐ）；Ｇｌｙ（Ａｌａ、Ｐｒｏ）；Ｈｉｓ（Ａｓｎ；Ｇｌｎ）；Ｉｌｅ（Ｌｅｕ；Ｖａｌ）；Ｌｅｕ（Ｉｌｅ；Ｖａｌ）；Ｌｙｓ（Ａｒｇ；Ｇｌｎ）；Ｍｅｔ（Ｌｅｕ、Ｉｌｅ）；Ｐｈｅ（Ｍｅｔ、Ｌｅｕ、Ｔｙｒ）；Ｓｅｒ（Ｔｈｒ；Ｇｌｙ）；Ｔｈｒ（Ｓｅｒ；Ｖａｌ）；Ｔｒｐ（Ｔｙｒ）；Ｔｙｒ（Ｔｒｐ；Ｐｈｅ）；Ｖａｌ（Ｉｌｅ；Ｌｅｕ）。いくつかのいわゆる「機能的」バリアント、変異、挿入、または欠失は、その機能が、例えば由来元の参照配列の機能と実質的に同じである配列を含む。それは、本明細書に記載されるものと同様のアッセイを使用して、容易に試験することができる。

【０１２７】

核酸およびベクター

一態様では、本明細書で定義される組換えポリペプチドをコードする核酸が提供される。一実施形態では、核酸は、ＤＮＡまたはＲＮＡである。ＲＮＡは、ｍＲＮＡであり得る。

【０１２８】

当業者は、例えば、遺伝暗号の縮重に起因して、本明細書に記載される組換えポリペプチドをコードする多くのやり方が存在することを容易に認識し、それらのすべては、特定の実施形態に含まれる。欠失、挿入、および置換も、タンパク質機能が実質的に完全なままであれば可能であり得る。例えば、野生型配列または参照配列と７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、または９９％以上の同一性を有し得る核酸が含まれ得る。前記の核酸は、その中で発現させることが意図される生物体または発現系に応じて、コドン最適化もされ得る。

【０１２９】

一態様では、本明細書で定義される核酸を含むベクターが提供される。

【０１３０】

一実施形態では、本明細書で定義される核酸または本明細書で定義されるベクターを含む宿主細胞が提供される。宿主細胞は、形質転換またはトランスフェクトされ得る。

【０１３１】

組成物

一態様では、本明細書で定義される組換えポリペプチドを、許容される賦形剤、希釈剤または担体と共に含む組成物が提供される。

【０１３２】

一態様では、本明細書で定義される組換えポリペプチドを、医薬的に許容される賦形剤、希釈剤または担体と共に含む医薬組成物が提供される。

【０１３３】

医薬的に許容される担体には、溶媒、希釈剤、液体ビヒクル、分散液、分散助剤または懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、保存剤、固体結合剤または滑沢剤が含まれる。担体は、選択された投与経路に適切な持続放出の滞留時間を延長するために選択され得る。例示的な担体には、糖、例えばグルコースおよびスクロースなど、デンプン、例えばコーンスターチおよびジャガイモデンプンなど、繊維、例えばセルロースおよびその誘導体、カルボキシルメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、アセチルセルロースなど、トラガント末、麦芽、ゼラチン、タルク、ココアバター、座薬用ワックス、油、例えばピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油など、グリコール、例えばプロピレングリコール、エステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリル酸エチルなど、寒天、緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなど、アルギン酸、パイロジェンフリー水、等張食塩水、リンゲル溶液、エチルアルコール、リン酸緩衝液、無毒適合性滑沢剤、例えばラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム、着色剤、放出剤、被覆剤、甘味剤、香料、芳

香剤、保存剤および抗酸化剤が含まれる。

【０１３４】

組成物は、いずれかの許容される経路、例えば、局所（散剤、軟膏または点滴薬）、経口、直腸、粘膜、舌下、非経口、嚢内、膣内、腹腔内、頬側（bucally）、眼または鼻腔内により対象に投与され得る。

【０１３５】

経口投与用の液体剤形には、乳剤、マイクロエマルジョン、液剤、懸濁剤、シロップ剤、およびエリキシル剤が含まれ得る。液体剤形は、不活性希釈剤、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、ジメチルホルムアミドなど、油、例えば、綿実油、ピーナッツ油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油など、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、ならびにソルビトール脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物を含有し得る。不活性希釈剤の他に、経口組成物にはさらに、アジュバント、例えば、湿潤剤、乳化剤、懸濁化剤、甘味剤、香味剤、および芳香剤などが含まれ得る。

【０１３６】

本発明による医薬組成物の局所または経皮投与用の剤形には、軟膏、ペースト剤、クリーム、ローション、ジェル、散剤、液剤、スプレー、吸入剤、またはパッチが含まれる。活性剤は、無菌条件下、医薬的に許容される担体、および必要とされるいずれかの保存剤または必要であり得る緩衝液と混合される。

【０１３７】

注射用調製物、例えば、水性または油性の無菌注射用懸濁液などは、公知の当技術分野に従い、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を使用して製剤化され得る。無菌注射用調製物は、非経口的に許容される無毒性の希釈剤または溶媒中の無菌注射用液剤、懸濁剤または乳剤でもあり得て、例えば、１，３－ブタンジオール中の液剤としてでもあり得る。利用可能である許容されるビヒクルおよび溶媒は、水、リンゲル溶液（米国薬局方）および等張塩化ナトリウム溶液である。さらに、溶媒または懸濁媒体として、無菌不揮発性油を通常は利用する。そのためには、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意の無刺激性不揮発性油を利用することができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸を、注射液の調製において使用する。注射用製剤は、例えば、細菌捕捉フィルタ（bacterial-retaining filter）を通したろ過によるか、または使用前に滅菌水もしくは他の無菌注射用媒体中に溶解または分散され得る無菌固体組成物の形の滅菌剤の組込みにより、芽胞の添加前に滅菌され得る。

【０１３８】

皮下注射または筋肉内注射からの薬剤の吸収を減速させることがたびたび望ましい。非経口投与された活性剤の遅延吸収は、オイルビヒクル中に薬剤を溶解または懸濁することにより実現され得る。注射用デポー形態は、薬剤のマイクロカプセル封入マトリクス（microencapsule matrices）を、ポリラクチド－ポリグリコライドなどの生分解性ポリマー中に形成することによって作製される。活性剤の、ポリマーに対する比、および利用される特定のポリマーの性質に応じて、活性剤放出の速度は制御され得る。他の生分解性ポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）が含まれる。デポー注射用製剤はさらに、薬剤を、身体組織と適合性であるリポソームまたはマイクロエマルジョン中に包括することによっても調製される。

【０１３９】

直腸投与または経膣投与用の組成物は、好ましくは座薬であり、その座薬は、本発明の活性剤を、周囲温度では固体であるが体温では液体であるため直腸または膣腔中で溶けて活性剤を放出する、適切な非刺激性賦形剤または担体、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコールまたは座薬用ワックスと混合することにより調製され得る。

【０１４０】

経口、粘膜または舌下投与用の固体剤形には、カプセル、錠剤、丸剤、散剤および顆粒剤が含まれる。そのような固体剤形中では、活性剤を、少なくとも１つの、医薬的に許容される不活性賦形剤または担体、例えば、クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウムなど、充填剤もしくは増量剤、例えば、デンプン、スクロース、グルコース、マンニトールおよびケイ酸など、結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよびアカシアなど、グリセロールなどの湿潤剤、崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプン、タピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウムなど、パラフィンなどの溶解遅延剤、第四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤、湿潤剤、例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロールなど、吸収剤、例えば、カオリンおよびベントナイト粘土など、ならびに滑沢剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、ならびにそれらの混合物と混合する。

【０１４１】

類似するタイプの固体組成物はさらに、乳糖ならびに高分子量ポリエチレングリコール等のような賦形剤を使用して、ソフトおよびハード充填ゼラチンカプセル中での充填剤として利用され得る。錠剤、カプセル、丸剤および顆粒剤の固体剤形は、コーティングおよびシェル、例えば、腸溶性コーティング、放出制御コーティング、および医薬製剤分野で周知の他のコーティングなどを用いて調製され得る。そのような固体剤形中では、活性剤は、少なくとも１つの不活性希釈剤、例えば、スクロースまたはデンプンなどと混合され得る。そのような剤形は、通常どおり、不活性希釈剤以外の追加物質、例えば、打錠用滑沢剤、ならびにステアリン酸マグネシウムおよび微結晶セルロースのような他の打錠助剤なども含み得る。カプセル、錠剤および丸剤の場合、剤形は緩衝剤も含み得る。それらの剤形は、場合により不透明化剤を含有し、活性剤のみを、優先的には腸管の特定の一部において、場合により遅延性に放出する組成物でもあり得る。使用され得る埋込み用組成物の例には、高分子物質およびワックスが含まれる。

【０１４２】

治療上有効量は、個別的に、または確立された必要量に基づいて決定され得る。個々の対象に対する用量は、処置される対象を考慮して選択される。用量および投与は、活性剤の十分なレベルをもたらすため、または所望の効果を維持するために調整され得る。考慮され得る要素には、病態の程度、過去における感染因子との接触、将来接触する可能性；対象の年齢、体重、性別；食事、投与の時間および頻度、薬物の組合せ、反応感度、ならびに療法に対する寛容性／応答が含まれる。徐放性組成物は、速効性組成物よりも低頻度で投与され得る。

【０１４３】

方法および使用

一態様では、細胞を、本明細書で定義される組換えポリペプチドと接触させるステップを含む、カーゴ分子を細胞に送達する方法が提供される。

【０１４４】

一態様では、カーゴ分子の細胞への送達に使用するための、本明細書で定義される組換えポリペプチドの使用が提供される。

【０１４５】

一態様では、カーゴ分子を細胞に送達するための医薬の調製用の、本明細書で定義される組換えポリペプチドの使用が提供される。

【０１４６】

一態様では、細胞へのカーゴ分子の送達に用いる、本明細書で定義される組換えポリペプチドが提供される。

【０１４７】

一態様では、本明細書で定義される組換えポリペプチドを対象に投与するステップを含む、対象におけるがんを処置する方法が提供される。

【０１４８】
一態様では、対象におけるがんを処置するための、本明細書で定義される組換えポリペプチドの使用が提供される。
【０１４９】
一態様では、対象におけるがんを処置するための医薬の調製用の、本明細書で定義される組換えポリペプチドの使用が提供される。
【０１５０】
一態様では、対象におけるがんの処置に用いる、本明細書で定義される組換えポリペプチドが提供される。
【０１５１】
一態様では、細胞を、本明細書に記載される組換えポリペプチドと接触させるステップを含む、細胞における酵素またはタンパク質欠損を緩和する方法が提供される。
【０１５２】
一態様では、細胞における酵素またはタンパク質欠損を緩和するための、本明細書に記載される組換えポリペプチドの使用が提供される。
【０１５３】
一態様では、細胞における酵素またはタンパク質欠損を緩和するための医薬の調製用の、本明細書に記載される組換えポリペプチドの使用が提供される。
【０１５４】
一態様では、細胞における酵素またはタンパク質欠損の緩和に用いる、本明細書に記載される組換えポリペプチドが提供される。
【０１５５】
本明細書で使用する「緩和する」とは、カーゴ分子が、タンパク質もしくは酵素の欠損、欠損タンパク質もしくは酵素の機能の一局面、またはその下流もしくは二次的な細胞効果もしくは結果の１つもしくは複数を修正または少なくとも部分的に改善することを意味する。
【０１５６】
上記の方法および使用に関する実施形態では、カーゴ分子は放出され得る。
【０１５７】
実施例
実施例１
緒言
操作されたキメラ毒素は、がんなどの挑戦的な疾患の新規治療薬の出現をもたらした。免疫毒素は、その受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）を標的がん受容体へと再標的化すること、および細胞内がんタンパク質を標的とする酵素カーゴを送達することの両方により、がん標的療法へと再利用されている細菌毒素、例えば、ジフテリア毒素（ＤＴ）など、からなる生物学的製剤の類である。しかしながら、ジフテリアに対する世界的なワクチン接種プログラムが、ＤＴ、およびＤＴベースの治療薬に対する集団レベルの免疫をもたらした。ＤＴに対する既存の中和抗体の問題を回避するために、わずかな配列同一性を共有する、ＤＴの遠縁ホモログは、ＤＴの機能を保持し得るが、ＤＴ特異的な中和抗体を回避し得るかどうかを調査した。ここで、ＤＴと３８％のみ同一であるオーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）由来の推定遺伝子配列を、構造的および機能的に特徴づけた。ケロネー毒素１（ＣＴ１）と名づけた。そのｘ線結晶構造は、２．５０Åまで分解され、その構造はＤＴと非常に類似することが見出された。様々な生化学的アッセイを使用して、ＤＴ様タンパク質が、毒素、および治療用タンパク質送達のための新規プラットフォームの両方ともとして機能する能力を調査するために、ドメイン単位分析（domain-by-domain analysis）を行った。この新規タンパク質の各ドメインは、毒素としてのそのそれぞれの機能を行い得る一方、ＣＴ１のトランスロカーゼ（ＣＴ１－Ｔ）は、非天然受容体を標的にして非天然カーゴを細胞内に送達するように操作され得ることが実証された。重要なことに、ＣＴ１は、ヒト血清中に見出される既存の抗ＤＴ抗体により認

識されず（CT1 is not recognized by to pre-existing anti-DT antibodies found in human sera）、細胞内へのカーゴの送達においてＤＴよりも予想外に優れている。ケロネー毒素は、毒素生物学に関する新規の洞察を提供し、治療用タンパク質送達のための改善されたプラットフォームを表す。

【０１５８】

材料および方法

Ａ．ケロネー（A. chelonae）由来のＤＴ様タンパク質の結晶化

ＤＴ機能性にとって重要であると同定された鍵残基の保存ゆえ、オーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）（本明細書では「ケロネー毒素１」のＣＴ１と呼ばれる）（配列番号２）種由来の最も近いＤＴ様タンパク質を、代替的な免疫毒素スキャフォールドの候補として選んだ（図５）。

【０１５９】

配列番号２は、毒素の２つの断片を表す２つのＯＲＦ（ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＷＰ＿１４３１１５２６３．１およびＷＰ＿０４０３２２８３５．１を参照）の組合せに由来する。オーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）（ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＮＺ＿ＢＡＧＺ０１０００００２４．１を参照）のゲノム配列と比べると、ゲノム配列中の１塩基対（ｂｐ）フレームシフトが、全長毒素の、２つのＯＲＦへの分離を引き起こしたように見えた。リーディングフレームは、１ｂｐを欠失させることにより回復され（ＮＺ＿ＢＡＧＺ０１０００００２４．１　Ｃ４１３９８）、その結果は全長毒素であり、続いて「ケロネー毒素１（ＣＴ１）」（配列番号２）と呼ばれた。１ｂｐ挿入は、オーストウィッキア・ケロネー（Austwickia chelonae）における配列エラーであったか、または真正変異を反映していたかは不明である。いずれにせよ、本明細書に記載される実験に用いるタンパク質および移行ドメインを産生するために、１ｂｐ挿入を除去した。

【０１６０】

ＣＴ１の構造を決定するために、大腸菌（E. coli）コドン最適化されたｇＢｌｏｃｋ遺伝子断片を、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社から注文し、ギブソン・アセンブリにより、Ｃｈａｍｐｉｏｎ（商標）ｐＥＴ　ＳＵＭＯ大腸菌（E. coli）発現系へとクローニングした。

【０１６１】

ＮｉＣｏ２１（ＤＥ３）大腸菌（E. coli）細胞（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）の５０ｍＬ種菌を、１ＬのＬＢ培地に接種し、０．１ｍＭ　ＩＰＴＧを加えて、１８℃で１８時間、誘導した。細胞を、５０００ｒｐｍで遠心分離し、溶解バッファ（１％のプロテアーゼ阻害剤カクテル、１ｍｇ／ｍＬのリゾチーム、０．０１％のＰｉｅｒｃｅ（商標）ユニバーサルヌクレアーゼ阻害剤、２０ｍＭイミダゾール、５００ｍＭ　ＮａＣＩ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＩ　ｐＨ７．５）中に再懸濁した。１５０００ｐｓｉにおいてＥｍｕｌｓｉｆｌｅｘＣ３（Ａｖｅｓｔｉｎ）を３回通して、細胞を溶解させた。全細胞溶解物を１８０００ｘｇで遠心分離し、０．４５μｍフィルタを通して上清をろ過し、ＨｉｓＴｒａｐ　ＦＦクルードカラム（Ｃｙｔｉｖａ）上を通過させた。タンパク質を５０～７５ｍＭイミダゾールで溶出し、１５０ｍＭ　ＮａＣＩ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＩ　ｐＨ７．５へと緩衝液交換し、ＳＵＭＯプロテアーゼを加えて４℃で一晩インキュベートし、６ｘＨｉｓ－ＳＵＭＯアフィニティタグを切断した。ＨｉｓＴｒａｐ　ＦＦクルードカラム上にタンパク質を流し、通過画分（タンパク質）を捕集し、遠心分離により、８ｍｇ／ｍＬへと濃縮した。

【０１６２】

ハンギングドロップ蒸気拡散法を使用して結晶を成長させた。ＣＴ１結晶が得られた条件は、２μＬの母液（０．２Ｍ塩化カルシウム、０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＩ　ｐＨ８．５、２５％（ｗ／ｖ）ＰＥＧ４０００）および１μＬの８ｍｇ／ｍＬタンパク質を含有した。液滴を１３０μＬの２Ｍ$(NH_4)_2PO_4$で４５分間脱水してから、液体窒素中で凍結した。データは、Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｐｈｏｔｏｎ　Ｓｏｕｒｃｅにおける２３－ＩＤ－Ｄビームラインで収集した。

【０１６３】
Ｐｈｅｎｉｘソフトウェアパッケージ中のＰｈａｓｅｒを用いて、乱雑ループが除去された個々のＤＴドメイン（Ｃドメイン残基１３～１６７、Ｒドメイン残基３９１～５３１、Ｔドメイン残基２０５～３７８）による多成分サーチモデルを使用することにより初期位相を決定した。ｐｈｅｎｉｘ．ｒｅｆｉｎｅおよびａｕｔｏｂｕｉｌｄの反復サイクルを使用して構造を微細化した。
【０１６４】
タンパク質合成アッセイ
Ｖｅｒｏ－ｎＬｕｃＰ細胞（Ｖｅｒｏ細胞のナノルシフェラーゼレポーター株）を、９６ウェル白色透明ボトムプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）中に、５０００細胞／ウェルでプレーティングした。翌日、タンパク質毒素を添加し、２４時間インキュベートした後、ＮａｎｏＧｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイキット（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｍ５ｅプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）上で細胞の発光シグナルを読み取った。データは、未処理細胞（１００％ナノルシフェラーゼシグナル）に対して補正した。
【０１６５】
リポソーム色素放出アッセイ
単層リポソーム（ＤＯＰＣ、０．８％　ＤＧＳ－ＮＴＡ、Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ）を、以前に記載されたように調製した。簡単に言うと、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ）を、０．８％の１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－［（Ｎ－（５－アミノ－１－カルボキシペンチル）イミノ二酢酸）スクシニル］（ニッケル塩）（ＤＧＳ－ＮＴＡ［Ｎｉ］）（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ）と組み合わせて、真空デシケータ中、N_2により１時間乾燥させた。２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８、３５ｍＭ　８－ヒドロキシピレン－１，３，６－トリスルホン酸（ＨＰＴＳ）、５０ｍＭ　ｐ－キシレン－ビス－ピリジニウムブロミド（ＤＰＸ）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ）中に脂質を再懸濁し、ドライアイスおよび４２℃の水浴中での１０Ｘ凍結融解サイクルにかけ、２００μｍフィルタを使用して１０Ｘ押し出した。次いで、Ｈｉ　Ｐｒｅｐ　１６／６０　Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－３００　ＨＲカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）および１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８緩衝液を用いたゲルろ過によりリポソームを精製した。ｐＨ４．０～７．５に及ぶ、０．５のｐＨ間隔での１５０ｍＭクエン酸リン酸緩衝液中でのおよそ４００μＭの最終リポソーム濃度で、タンパク質を、リポソームとの１：１０，０００の比において添加した。９６ウェル不透明プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）中でアッセイを行い、２０分間隔で蛍光をモニタリングし、読取りは３０秒ごとに行った（励起は４０３ｎｍ、発光は５１０ｎｍ）。０．３％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００の添加により、データを全ＨＰＴＳ蛍光の％に対して正規化した。
【０１６６】
血清抗体結合ＥＬＩＳＡ
Ｎｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を１％　ＢＳＡでブロッキングした後、２０００ｎｇのタンパク質を固定化し、続いて、様々な濃度でのヒト血清（凍結ヒトプール血清、Ｃｅｄａｒｌａｎｅ）を加えて１時間インキュベートした。ウェルをＰＢＳＴ（０．０１％　ｔｗｅｅｎ）で洗浄してから、ＨＲＰにコンジュゲートした抗ヒトＩｇＧ抗体（Ａｂｃａｍ、ａｂ１０２４２０）とインキュベートし、ＴＭＢ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いてＨＲＰを発色させた。吸光度を６３０ｎｍで読み取り、対照ウェル（タンパク質なし、＋ヒト血清）に対してタンパク質ウェルを補正した。
【０１６７】
血清毒性アッセイ
タンパク質毒素を、ヒト血清（凍結ヒトプール血清、Ｃｅｄａｒｌａｎｅ）またはマウス血清（凍結無菌マウス血清、Ｃｅｄａｒｌａｎｅ）のいずれかと１：１比で、室温で３

０分間インキュベートした。前日に９６ウェル白色透明ボトムプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）中で５０００細胞／ウェルにプレーティングしたＶｅｒｏ－ｎＬｕｃＰ細胞へと試料を添加した。細胞を２４時間インキュベートしてから、細胞を溶解させ、発光シグナルを評価した。１００％ナノルシフェラーゼシグナルおよび１００％タンパク質合成を表す、血清のみで処理した細胞に対して値を補正した。

【０１６８】

結果

Ａ．ケロネー（A. chelonae）由来のＤＴ様タンパク質の構造的特徴づけ

既存の抗ＤＴ抗体の影響を受けにくいが、機能的に活性である代替的なＤＴ様免疫毒素プラットフォームを見出す目的で、コリネバクテリウム（Corynebacterium）属以外の、進化的に最も近いＤＴ様タンパク質を選択した。配列によると、Ａ．ケロネー（A. chelonae）由来のＤＴ様タンパク質（ＣＴ１）は、ＤＴと３８％同一である。フリン認識部位と同様に、触媒活性残基（Ｅ１４８）、ならびに基質（ＮＡＤ）結合および配位に重要な残基（Ｈ２１、Ｙ５４、Ｙ６５）は、すべて保存されており、（ＤＴ中の）Ｃ１８６とＣ２０１との間で形成されるジスルフィド結合も、ＣＴ１配列中に存在する（表１）。

さらに、移行ドメインのｐＨ依存性アンフォールディングおよび細孔形成に関与する鍵ヒスチジン残基および荷電残基は、ＣＴ１由来の配列の予測される移行ドメイン中において保存されていることが見出された（表１）。ＣＴ１の推定ドメインが機能的であるかどうかを試験するために、タンパク質をクローニングし、発現させ、精製して構造的および機能的に試験した（図１Ｂ）。

【０１６９】

ＣＴ１のｘ線結晶構造を得るために、ハンギングドロップ蒸気拡散法を使用した。タンパク質の結晶化に成功し、２．５０Åまで回折した。分子置換のサーチモデルとして全長ＤＴ構造（ｐｄｂ　１ＭＤＴ）を使用することは不可能であった。しかしながら、１ＭＤＴを用いた部分的サーチモデルを使用して、構造を分解した（図１Ｃ）。ＣＴ１は、ＤＴに対する２．４ÅのＲＭＳＤを有し、ＤＴと同じ３ドメインのＹ字型構造を保持した。

【０１７０】

ＣＴ１のＣドメインは、機能的であり、ＤＴと同じ細胞内標的を有する

ＣＴ１－Ｃ（ＣＴ１の触媒ドメイン）の、DT_C（ＤＴ触媒ドメイン）に対する構造アライメントは、DT_C機能性に必要とされる鍵残基間での良好な構造的保存を示す。ＣＴ１－Ｃが機能的であるかどうかを試験するために、DT_CをＣＴ１－Ｃで置換したキメラを生成した（ＣＴ１－Ｃ－DT_T－DT_Rと呼ばれる）。ＤＰＨ４の遺伝子ノックアウト（$DPH4^{-/-}$）の有無両方のＨＥＫ２９３Ｔ細胞を用いて、キメラタンパク質を試験した。それらの細胞は、ジフタミド合成経路に欠損があり、ジフタミド修飾を伴わない真核生物伸長因子２（ｅＥＦ－２）を産生するため、ＤＴに対して完全に耐性である（図２Ａおよび図２Ｂ）。野生型ＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、野生型のＤＴおよびＣＴ１－Ｃ－DT_T－DT_Rの両方に対して感受性であるのに対して、ジフタミドノックアウト細胞はそうではなかった。それは、ＣＴ１の触媒ドメインが、ＤＴと同じ細胞内標的を有することを示す。

【０１７１】

ＣＴ１のＣドメインは効率良く放出される

ＤＴの有害（intoxication）機構の重要部分は、サイトゾルへの侵入時の、Ｃドメインの、分子の残部からの放出である。フリンプロテアーゼ認識部位は、ＣＴ１中で保存されている（ＣＴ１中のＲＡＫＲ）。フリン部位が認識され、Ｃドメインが、分子の残部から放出されることを確証するために、ＤＴおよびＣＴ１を哺乳類細胞溶解物と共に３７℃で一晩インキュベートした。ＤＴおよびＣＴ１の両方とも、ＣドメインとＴドメインとの間で切断された（図２Ｃ）。ＤＴＣ－ＣＴ１－Ｆ－ＤＴＴ－ＤＴＲは、Ｖｅｒｏ細胞に対して試験すると、ＤＴと同様に毒性であり（図３Ａ）、フリンにより効率良く切断されることを示唆する。

【０１７２】
ＣＴ１は、機能的トランスロカーゼを含有する
エンドソームの酸性化が、DT_Tのリフォールディングおよびエンドソーム膜への挿入、および続く、サイトゾルへのＣドメインの移行をもたらす。このプロセスは、DT_T中の９つの荷電残基により開始および駆動されると思われ、そのうちの６つはＣＴ１－Ｔ中で保存されている。ＣＴ１－Ｔが、ＤＴ様細孔を形成するかどうかを試験するために、単離したＴドメインを精製し、リポソームから色素を放出するその能力をｉｎ　ｖｉｔｒｏで試験した（データは示さず）。ＣＴ１－Ｔは、色素放出のｐＨ依存性上昇を示し、色素放出（細孔形成と解釈される）の開始はｐＨ５．５であった（DT_Tと同様）。

【０１７３】
トランスロカーゼは、細胞内にカーゴを送達するかどうかをさらに調査した。この目的に向けて、DT_TをＣＴ１－Ｔに交換したキメラＤＴを生成して（ＤＴｃ－ＣＴ１－Ｔ－DT_R）、タンパク質合成に対するその効果を測定した。キメラ毒素の量の増加と共に観察される、シグナルの低下が示すように、ＣＴ１－Ｔは、DT_Cを効果的に細胞内に送達した（図３Ｂ）。さらに、DT_Cを、Ｒａｓがんタンパク質を標的にする非天然カーゴ（Ｒａｓ／Ｒａｐ１特異的プロテアーゼ；ＲＲＳＰ）に交換すると、構造的に異なるこのカーゴを効果的に送達することが示された（ＣＦＰＡＣ－１細胞の細胞生存率、および細胞内Ｒａｓレベルを評価するウエスタンブロットにより示される；図３Ｃおよび図３Ｄ）。まとめると、これらの実験は、ＣＴ１－Ｔが、細胞のサイトゾル成分へと、様々なカーゴを送達することができる機能的トランスロカーゼであることを実証した。

【０１７４】
ＣＴ１の移行ドメインは、多様な受容体結合ドメインを収容することができる
ＣＴ１－Ｔは、Ｎ末端上での操作を許容することができると実証され（DT_CおよびＲＲＳＰを移行することができる）、次に、ＣＴ１－Ｔは、Ｃ末端上でのそのような操作を許容することができるかどうかを評価した。この目的に向けて、DT_C－ＣＴ１－Ｔ－DT_Rおよび$RRSP$－ＣＴ１－Ｔ－DT_Rの受容体結合ドメイン（DT_R）を、Ｈｅｒ３（ヒト上皮受容体３）標的化アフィボディ（ＺＨｅｒ３：０８６９９、以下ではＺＨｅｒ３と呼ぶ）と交換したキメラを生成し、その構築物を、ＨＰＡＦ　ＩＩ細胞上で試験した（図３Ｅおよび図３Ｆ）。ＣＴ１－Ｔは、Ｈｅｒ３発現細胞へと再標的化され得るのみならず、驚くべきことに、ＣＴ１－Ｔ含有構築物は、カーゴ送達においてDT_Tよりも効率的であるように見えたことが見出された。

【０１７５】
ＣＴ１は、ヒト血清により認識または中和されない
ヒト血清中に既存の抗ＤＴ抗体または抗ＣＴ１抗体のレベルを定量するためにＥＬＩＳＡアッセイを使用し、ＤＴまたはＣＴ１のいずれかを高結合プレート上に固定化し、異なる量のヒトプール血清とインキュベートした後、ＨＲＰにコンジュゲートした抗ＩｇＧ抗体を用いて抗体結合のレベルを決定した（図４Ａ）。ＤＴは、ヒト血清の存在下、用量依存性のシグナル上昇を示した一方、ＣＴ１はそうではなく、ＣＴ１は、ヒト血清中の抗体により認識されないことを示す。

【０１７６】
ＤＴは、ヒト血清中の抗体により中和されることを確証するために、ＤＴをヒトプール血清と３０分間インキュベートしてから、それをＶｅｒｏ細胞に添加した。ＤＴの毒性の６ｌｏｇのシフトが観察され、ヒト血清による中和を示す（図４Ｂ）。対照的に、ＣＴ１は、ヒト血清により中和されなかった。これは、ＣＴ１が、抗ＤＴ抗体により中和されないことを示す。これは、既存の中和抗ＤＴ抗体の問題を回避することにより、ＤＴベースベクターに勝る利点をＣＴ１ベース送達ベクターにもたらす。

【０１７７】
ＣＴ１の移行ドメイン（配列番号３）に加えて、配列番号１２および１４の移行ドメインも機能的であることが確立された。

【０１７８】

得られた結果に基づき、本明細書に記載される他の細菌株および種由来の、配列番号４～１１、１３、１５～１７および３６～４８（ならびにその関連配列）に記載される関連ポリペプチド配列も、本明細書に記載されるポリペプチド構築物の範囲内で活性である機能的移行ドメインであると予想される。図９は、トランスロカーゼドメイン間の関係を示す系統樹を提示する。

【０１７９】

実施例２

ＤＴに対する新規トランスロカーゼの機能を評価するために、各トランスロカーゼ配列「Ｔ」を、細胞内ＲＡＳ切断酵素ＲＲＳＰ（Ｒａｓ／Ｒａｐ１特異的ペプチダーゼ、配列番号１８；すなわちカーゴ）とＺＨｅｒ３－Ａ２０として公知の二重受容体結合ドメイン（Ｈｅｒ３に対するアフィボディ、配列番号１９と、Ａ２０ＦＭＤＶ２として公知の、αvβ６インテグリンに対するペプチド（Ａ２０）、配列番号２０とからなる）との間にクローニングし、構築物ＲＲＳＰ－Ｔ－ＺＨｅｒ３－Ａ２０（「Ｔ」は、トランスロカーゼを示す）をもたらした。同定された各構築物の一連のタンパク質濃度を、ヒト膵臓腺癌（ＨＰＡＦ－ＩＩ）細胞と７２時間（図６Ａ）、および／または上皮様細胞（Ｈ３５８細胞）と７２時間（図６Ｂ）インキュベートした。ＲＲＳＰは、細胞へと送達された後にアポトーシスを誘導するため、７２時間のインキュベーション後にヒト膵臓腺癌細胞を殺滅する、各構築物の能力の測定により、移行を定量した。

【０１８０】

図６Ａおよび図６Ｂは、トランスロカーゼの機能的特徴づけの結果を示す。ＲＲＳＰ－Ｔ－ＺＨｅｒ３－Ａ２０鋳型を用いて、各トランスロカーゼの機能を定量した。最大毒性の５０％（ＥＣ５０）により細胞生存率の低下をもたらす、所与の構築物の濃度を棒グラフで表す。より低い値は、より効率的なトランスロカーゼを表す。Ｓ．ピニコラ（S. pinicola）由来のトランスロカーゼは、発現されず、そのため評価することができなかった。Ｓ．ピニテレ（S. piniterrae）およびＬ．ツルファネンス（L. tulafanense）由来のトランスロカーゼは、試験した最大用量（１００ｎＭ）まで毒性が観察されなかったため、このアッセイでは非機能的であると決定された。残りの５つのトランスロカーゼは、このアッセイにおいて機能的であった。Ａ．ケロネー（A. chelonae）（配列番号２）およびＡ．ケロネー（A. chelonae）ＬＫ１６－１８（配列番号１７）由来のタンパク質のトランスロカーゼは、細胞に対して最も活性があり、ＤＴのトランスロカーゼよりも優れていた。観察された活性レベルは、ＲＲＳＰが、効率良く放出されたことを示す。

【０１８１】

ストレプトマイセス・アルビレティクリ（Streptomyces albireticuli）およびセイノネラ・ペプトノフィラ（Seinonella peptonophila）のトランスロカーゼドメインも機能的であることが示された（参照によりその全体が組み込まれているSugiman-Marangos et al. 2022を参照）。

【０１８２】

ジフテリアトキソイドワクチンは、ジフテリア疾患から守る役目を果たす世界的なワクチン接種プログラムの一部である。ヒト血清中の抗ＤＴ抗体は、ＤＴに結合してその機能を中和することにより、ＤＴの作用を妨げる。あいにく、この同じ抗体はさらに、ＤＴベースの治療薬に結合して中和する。ヒト血清中の抗ＤＴ抗体が、全長の毒素ＤＴおよびＣＴ１（配列番号２）、ならびにトランスロカーゼＤＴ－ＴおよびＣＴ１－Ｔ（配列番号３）を認識する程度を評価するために、ＥＬＩＳＡを行った。図７ＡのＥＬＩＳＡデータに示すように、ヒト血清中の抗体は、ＤＴを認識するが、ＣＴ１に対する結合は示さない。同様に、ＤＴ由来のトランスロカーゼに対しては高力価が認められるが、ＣＴ１に対しては認められない（図７Ｂ）。

【０１８３】

図７Ａおよび図７Ｂは合わせて、ヒト血清中に既存の抗ＤＴ抗体は、ＣＴ１ベースの免疫毒素を結合または中和しないことを示す。それぞれのタンパク質をプレート上に固定化して、異なる量の小児ヒト血清試料とインキュベートした後、ＨＲＰにコンジュゲートし

た抗ＩｇＧ抗体を用いて抗体結合のレベルを決定した。ＤＴおよびＤＴ－Ｔの両方とも、ヒト血清と共に、用量依存性のシグナル上昇を示したが、ＣＴ１およびＣＴ１－Ｔはそうではなかった。これは、全長ＣＴ１、およびまさにそのトランスロカーゼは、ヒト血清中の抗体により認識されるエピトープを含有しないことを示す。

【０１８４】

次いで、ヒト血清中に既存の抗ＤＴ抗体が、ＤＴベース治療薬、ならびに新規移行ドメインに基づく対応する治療薬を中和する程度を評価するために、Ａ．ケロネー（A. chelonae）ＬＫ１６－１８由来のＤＴベースおよびＣＴベースの免疫毒素をヒト血清とインキュベートした。それぞれの毒素のＣドメインおよびＴドメインを、ＺＨｅｒ３－Ａ２０に組換え的に付着させた（recombinantly attached）ＤＴベースおよびＣＴベースの免疫毒素（ＤＴ$_{1\sim389}$－ＺＨｅｒ３－Ａ２０またはＣＴ２$_{1\sim391}$－ＺＨｅｒ３－Ａ２０のいずれか）をクローニングして精製した。図８に示すように、ヒト血清の不在下（ＰＢＳ）、ＤＴ、ＤＴ$_{1\sim389}$－ＺＨｅｒ－３－Ａ２０、およびＣＴ２$_{1\sim391}$－ＺＨｅｒ３－Ａ２０はいずれも、ヒト細胞に対して毒性であった。ヒト血清の存在下（ヒト）、ＤＴおよびＤＴ$_{1\sim389}$－ＺＨｅｒ３－Ａ２０に関しては、毒性曲線の右方向シフトが認められ、ヒト血清は、それらの機能を阻害／中和したことを示す。逆に、ヒト血清は、ＣＴ２$_{1\sim391}$－ＺＨｅｒ３－Ａ２０の毒性曲線に対してはいかなる効果も有さず、ヒト血清は、ＣＴベース治療薬を認識または阻害／中和しなかったことを示す。

【０１８５】

図８は、抗ＤＴ抗体が、ＣＴベースの免疫毒素を中和しないことを示す。免疫毒素を、ＰＢＳ対照またはヒト血清のいずれかと３０分間インキュベートしてから、細胞に添加した。７２時間の時点で、細胞生存率を評価し、ヒト血清インキュベーション時に、ＤＴ$_{1\sim389}$－ＺＨｅｒ３－Ａ２０は、毒性がおよそ３ｌｏｇ低下し、ＣＴ２$_{1\sim391}$－ＺＨｅｒ３－Ａ２０はシフトしないことが見出された。

【０１８６】

実施例３

注釈付き構築物配列の例

ＲＲＳＰ－Ｔ（Ｃ．ジフテリア（C. diphtheriae））－ＺＨｅｒ３－Ａ２０（配列番号２２）

【０１８７】

【化１】

GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQLDLVHQAKGRDQI
AASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALTQLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIF
MVAIEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLGFDAKYHVDLGEHYADFK
QWLETSQSNGLLSKATLDESTKTVHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISG
DSAEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDAWDRRYSGTGYDELTNKLASA
TGVDEQLAVLLDDRKGLLIGEVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQPLI
DRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIVALDANSSARPNVQGTEHGLMYRA
GAANNIAVEVLQNLPDGEKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSNQFTVE
QDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGSCAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIR
DKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVF
AGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALS
SLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFGGGGSGGG
GSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKG
GGGSGGGGSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK

【０１８８】
上記中の
残基１～５１０＝ＲＲＳＰ
残基５１１～７２４＝Ｃ．ジフテリア（C. diphtheriae）由来のＴドメイン
残基７２５～７３４＝Ｇ４Ｓ２リンカー
残基７３５～７９２＝ＺＨｅｒ３：０８６９９アフィボディ
残基７９３～８０２＝Ｇ４Ｓ２リンカー
残基８０３～８２２＝Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド
残基８２３～８４０＝トロンビン切断部位およびｓｔｒｅｐタグＩＩ
【０１８９】
ＲＲＳＰ－Ｔ（Ａ．ケロネー（A. chelonae））－ＺＨｅｒ３－Ａ２０（配列番号２３）
【０１９０】
【化２】

GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQLDLVHQAKGRDQI
AASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALTQLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIF
MVAIEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLGFDAKYHVDLGEHYADFK
QWLETSQSNGLLSKATLDESTKTVHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISG
DSAEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDAWDRRYSGTGYDELTNKLASA
TGVDEQLAVLLDDRKGLLIGEVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQPLI
DRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIVALDANSSARPNVQGTEHGLMYRA
GAANNIAVEVLQNLPDGEKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSNQFTVE
QDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGSCAGNRVRRSVGSSLSCLSKINWKNV
REKADALTKKVHADKEFMDKLSTHHQRGEAPSVEKTTALHNALLEHESFSALKGARASGKV
GAAASTAAWGVAVAQAFTDPKADALTKTAATLSVVPGLGQALGIADGIKHENTEEIVVQSISL
AGLLAAQAIPVVGEAVDFGLLVYQLVETIVDLATHLSSAAANPAYSPGHKTQPFGGGGSGG
GGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK
GGGGSGGGGSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK

【０１９１】
上記中の
残基１～５１０＝ＲＲＳＰ
残基５１１～５２０＝Ｇ４Ｓ２リンカー
残基５２１～５３６＝フリンプロテアーゼ認識部位を含むＣ．ジフテリア（C. diphtheriae）配列
残基５３７～７１１＝Ａ．ケロネー（A. chelonae）由来のＴドメイン
残基７１２～７２３＝Ｃ．ジフテリア（C. diphtheriae）由来のリンカー配列
残基７２４～７３３＝Ｇ４Ｓ２リンカー
残基７３４～７９１＝ＺＨｅｒ３：０８６９９アフィボディ
残基７９２～８０１＝Ｇ４Ｓ２リンカー
残基８０２～８２１＝Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド
残基８２２～８３９＝トロンビン切断部位およびｓｔｒｅｐタグＩＩ
【０１９２】
ＲＲＳＰ－Ｔ（Ａ．ケロネー（A. chelonae）ＬＫ１６－１８）－ＺＨｅｒ３－Ａ２０（配列番号２４）
【０１９３】

【化３】

GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQLDLVHQAKGRDQI
AASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALTQLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIF
MVAIEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLGFDAKYHVDLGEHYADFK
QWLETSQSNGLLSKATLDESTKTVHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISG
DSAEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDAWDRRYSGTGYDELTNKLASA
TGVDEQLAVLLDDRKGLLIGEVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQPLI
DRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIVALDANSSARPNVQGTEHGLMYRA
GAANNIAVEVLQNLPDGEKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSNQFTVE
QDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGSCAGNRVRRSVGSSLSCLSKVKWEQ
VREKSKKIIDNVKDNPEFMKKLSAHHERGSAPTTEKITALHNELLDHESFSALKGARSSAGTA
ATAASAAAWGLAVAQAFTNPKADDLTKATAVLSAVPGLGQALGIADGIKHHNTEEIVVQSISL
TALIAAQAIPVVGELVDFGLLAYQLVESIIDLTRQLSVITANPAYSPGHKTQPFGGGGSGGGG
SAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGG
GGSGGGGSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK

【０１９４】

上記中の

残基１～５１０＝ＲＲＳＰ

残基５１１～５２０＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基５２１～５３６＝フリンプロテアーゼ認識部位を含むＣ．ジフテリア（C. diphtheriae）配列

残基５３７～７１２＝Ａ．ケロネー（A. chelonae）ＬＫ１６－１８由来のＴドメイン

残基７１３～７２４＝Ｃ．ジフテリア（C. diphtheriae）由来のリンカー配列

残基７２５～７３４＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基７３５～７９２＝ＺＨｅｒ３：０８６９９アフィボディ

残基７９３～８０２＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基８０３～８２２＝Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド

残基８２３～８４０＝トロンビン切断部位およびｓｔｒｅｐタグＩＩ

【０１９５】

ＲＲＳＰ－Ｔ（Ａ．ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂ）－ＺＨｅｒ３－Ａ２０（配列番号２５）

【０１９６】

【化４】

GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQLDLVHQAKGRDQI
AASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALTQLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIF
MVAIEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLGFDAKYHVDLGEHYADFK
QWLETSQSNGLLSKATLDESTKTVHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISG
DSAEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDAWDRRYSGTGYDELTNKLASA
TGVDEQLAVLLDDRKGLLIGEVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQPLI
DRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIVALDANSSARPNVQGTEHGLMYRA
GAANNIAVEVLQNLPDGEKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSNQFTVE
QDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGSCAGNRVRRSVGSSLSCLSNIKWERV
RQKSEELIKKLKDDENVKKAVQERKEGVKPTSDDLQNLHKALIDHESFKELKSVHSNGVKA
MDAANAALWGANVARVFSDSKSDGLEKATAALAAVPGLGQVMGVADGVTHHNTEEVVVQ
SVALAGFIAAQAIPVVGEIVDIGVLAYQFVEGVIDLSRQMMTSNARPAYSPGHKTQPFGGGG
SGGGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQ
APKGGGGSGGGGSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK

【０１９７】

上記中の

残基１～５１０＝ＲＲＳＰ

残基５１１～５２０＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基５２１～５３６＝フリンプロテアーゼ認識部位を含むＣ．ジフテリア（C. diphtheriae）配列

残基５３７～７１１＝Ａ．ＴＶＳ９６－４９０－７Ｂ由来のＴドメイン

残基７１２～７２３＝Ｃ．ジフテリア（C. diphtheriae）由来のリンカー配列

残基７２４～７３３＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基７３４～７９１＝ＺＨｅｒ３：０８６９９アフィボディ

残基７９２～８０１＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基８０２～８２１＝Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド

残基８２２～８３９＝トロンビン切断部位およびｓｔｒｅｐタグＩＩ

【０１９８】

ＲＲＳＰ－Ｔ（Ｓ．クレンキイ（S. klenkii）－ＺＨｅｒ３－Ａ２０（配列番号２６）

【０１９９】

【化５】

GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQLDLVHQAKGRDQI
AASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALTQLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIF
MVAIEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLGFDAKYHVDLGEHYADFK
QWLETSQSNGLLSKATLDESTKTVHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISG
DSAEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDAWDRRYSGTGYDELTNKLASA
TGVDEQLAVLLDDRKGLLIGEVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQPLI
DRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIVALDANSSARPNVQGTEHGLMYRA
GAANNIAVEVLQNLPDGEKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSNQFTVE
QDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGSCAGNRVRRSVGSSLSCLPVDWDKV
EEKAKATAKKVAQDAEHVEKLPKRSPKGPTWGEAHSTAELSHAKVREVSGAHVAASAAGV
GTWVYGMAKTFSDKDATTLDKVAVTGAVVPGLGQALGIADGIQHGDPEAIAVNAVALAALA
AAQVVPVVGEVVDAVLLTEQLVEVLVDVFRTATADPAYSPGHKTQPFGGGGSGGGGSAEA
KYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSG
GGGSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK

【０２００】

上記中の

残基１～５１０＝ＲＲＳＰ

残基５１１～５２０＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基５２１～５３６＝フリンプロテアーゼ認識部位を含むＣ．ジフテリア（C. diphtheriae）配列

残基５３７～７００＝Ｓ．クレンキイ（S. klenkii）由来のＴドメイン

残基７０１～７１２＝Ｃ．ジフテリア（C. diphtheriae）由来のリンカー配列

残基７１３～７２２＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基７２３～７８０＝ＺＨｅｒ３：０８６９９アフィボディ

残基７８１～７９０＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基７９１～８１０＝Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド

残基８１１～８２８＝トロンビン切断部位およびｓｔｒｅｐタグＩＩ

【０２０１】

ＲＲＳＰ－Ｔ（Ｓ．種ＴＬＩ０５３）－ＺＨｅｒ３－Ａ２０（配列番号２７）

【０２０２】

【化６】

GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQLDLVHQAKGRDQI
AASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALTQLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIF
MVAIEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLGFDAKYHVDLGEHYADFK
QWLETSQSNGLLSKATLDESTKTVHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISG
DSAEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDAWDRRYSGTGYDELTNKLASA
TGVDEQLAVLLDDRKGLLIGEVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQPLI
DRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIVALDANSSARPNVQGTEHGLMYRA
GAANNIAVEVLQNLPDGEKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSNQFTVE
QDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGSCAGNRVRRSVGSSLSCIPAASWEAI
EHRSKEMASAVARDTEYTKSLPNRHPKGPTWSEAHTTSTSTHARVSAKSGAHVAVGAFAV
GSWIYGMSETFANKNVTTLDKAAATVAIVPGIGHALGIAAALEHHDIEGVVVNAISIAALAAAQ
VVPVVGEIVDAALLAEQLVEVLVHVFRASTTEPAYSPGHKTQPFGGGGSGGGGSAEAKYAK
EKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGGG
SNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK

【０２０３】

上記中の

残基１～５１０＝ＲＲＳＰ

残基５１１～５２０＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基５２１～５３６＝フリンプロテアーゼ認識部位を含むＣ．ジフテリア（C. diphtheriae）配列

残基５３７～７０１＝Ｓ．種ＴＬＩ０５３由来のＴドメイン

残基７０２～７１３＝Ｃ．ジフテリア（C. diphtheriae）由来のリンカー配列

残基７１４～７２３＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基７２４～７８１＝ＺＨｅｒ３：０８６９９アフィボディ

残基７８２～７９１＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基７９２～８１１＝Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド

残基８１２～８２９＝トロンビン切断部位およびｓｔｒｅｐタグＩＩ

【０２０４】

ＲＲＳＰ－Ｔ（Ｌ．ツルファネンス（L. tulufanense））－ＺＨｅｒ３－Ａ２０（配列番号２８）

【０２０５】

【化７】

GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQLDLVHQAKGRDQI
AASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALTQLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIF
MVAIEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLGFDAKYHVDLGEHYADFK
QWLETSQSNGLLSKATLDESTKTVHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISG
DSAEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDAWDRRYSGTGYDELTNKLASA
TGVDEQLAVLLDDRKGLLIGEVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQPLI
DRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIVALDANSSARPNVQGTEHGLMYRA
GAANNIAVEVLQNLPDGEKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSNQFTVE
QDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGSCAGNRVRRSVGSSLSCERKTLDKLD
RKKIETRAKQVISKLAQDGDLRRELPRRTTTGHAHEEVRGVLAKSRGALHEIHGAATTVAMP
LATVAWVEDMARVFREKNATTLDKAATVSEIVPVAGQVLGMADGIAHRDAETVAVNAVVLA
AIAVSQAVPVVGELVDLGLTAYAVVDVVVRLFGPAREVPITQESYWPAYSPGHKTQPFGGG
GSGGGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDS
QAPKGGGGSGGGGSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK

【０２０６】

上記中の

残基１～５１０＝ＲＲＳＰ

残基５１１～５２０＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基５２１～５３６＝フリンプロテアーゼ認識部位を含むＣ．ジフテリア（C. diphtheriae）配列

残基５３７～７１４＝Ｌ．ツルファネンス（L. tulufanense）由来のＴドメイン

残基７１５～７２６＝Ｃ．ジフテリア（C. diphtheriae）由来のリンカー配列

残基７２７～７３６＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基７３７～７９４＝ＺＨｅｒ３：０８６９９アフィボディ

残基７９５～８０４＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基８０５～８２４＝Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド

残基８２５～８４２＝トロンビン切断部位およびｓｔｒｅｐタグＩＩ

【０２０７】

ＲＲＳＰ－Ｔ（Ｓ．ピニテレ（S. piniterrae））－ＺＨｅｒ３－Ａ２０（配列番号２９）

【０２０８】

【化８】

GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQLDLVHQAKGRDQI
AASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALTQLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIF
MVAIEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLGFDAKYHVDLGEHYADFK
QWLETSQSNGLLSKATLDESTKTVHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISG
DSAEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDAWDRRYSGTGYDELTNKLASA
TGVDEQLAVLLDDRKGLLIGEVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQPLI
DRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIVALDANSSARPNVQGTEHGLMYRA
GAANNIAVEVLQNLPDGEKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSNQFTVE
QDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGSCAGNRVRRSVGSSLSCELAKDKAR
DILSEAGNEVSLPQRDSDGLSKQEITATAEATRSKLGTGVHGAVSAAMVADWAHDVARTFA
DPKATKLDKAAAVTAIAPVIGQAVNIADGIQHHDKKTIVVNSLVLAAVVAAQAVPAVGEVVDA
AIVADFVVEKLVGWFTPTAKPGPEHVAPAYSPGHKTQPFGGGGSGGGGSAEAKYAKEKYN
AYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGGGSNAV
PNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK

【０２０９】

上記中の

残基１～５１０＝ＲＲＳＰ

残基５１１～５２０＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基５２１～５３６＝フリンプロテアーゼ認識部位を含むＣ．ジフテリア（C. diphtheriae）配列

残基５３７～６９５＝Ｓ．ピニテレ（S. piniterrae）由来のＴドメイン

残基６９６～７０７＝Ｃ．ジフテリア（C. diphtheriae）由来のリンカー配列

残基７０８～７１７＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基７１８～７７５＝ＺＨｅｒ３：０８６９９アフィボディ

残基７７６～７８６＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基７８６～８０５＝Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド

残基８０６～８２３＝トロンビン切断部位およびｓｔｒｅｐタグＩＩ

【０２１０】

ＲＲＳＰ－Ｔ（Ｓ．ピニコラ（S. pinicola））－ＺＨｅｒ３－Ａ２０（配列番号３０）

【０２１１】

【化９】

GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQLDLVHQAKGRDQI
AASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALTQLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIF
MVAIEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLGFDAKYHVDLGEHYADFK
QWLETSQSNGLLSKATLDESTKTVHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISG
DSAEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDAWDRRYSGTGYDELTNKLASA
TGVDEQLAVLLDDRKGLLIGEVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQPLI
DRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIVALDANSSARPNVQGTEHGLMYRA
GAANNIAVEVLQNLPDGEKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSNQFTVE
QDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGSCAGNRVRRSVGSSLSCKVNWKDAY
DRSMNIAQDIDGSAEFRATAPARPAAGKAMPEADVTRLVSTSEDFLEKSTKTSGVKKALKAI
NNQKMISWGSLLSNALANSHTWSDKNATNLDKAYAVVGGVPVLGEVIGIASGIDKQDAESIA
VNTLSLVGIVAATVCPPLGATVEFVMIGYTAIKLMLSWFTVETIPAYSPGHKTQPFGGGGSG
GGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAP
KGGGGSGGGGSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK

【０２１２】

上記中の

残基１～５１０＝ＲＲＳＰ

残基５１１～５２０＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基５２１～５３６＝フリンプロテアーゼ認識部位を含むＣ．ジフテリア（C. diphtheriae）配列

残基５３７～７１２＝Ｓ．ピニコラ（S. pinicola）由来のＴドメイン

残基７１３～７２４＝Ｃ．ジフテリア（C. diphtheriae）由来のリンカー配列

残基７２５～７３４＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基７３５～７９２＝ＺＨｅｒ３：０８６９９アフィボディ

残基７９３～８０２＝Ｇ４Ｓ２リンカー

残基８０３～８２２＝Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド

残基８２３～８４０＝トロンビン切断部位およびｓｔｒｅｐタグＩＩ

【０２１３】

ＤＴ－Ｈｅｒ３－Ａ２０（配列番号３１）

【０２１４】

【化１０】

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDW
KGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTE
PLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGKRG
QDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPN
KTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADN
LEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFV
ESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFGGGGSGGGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLT
KYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGGGSNAVPNLRGDLQVLAQ
KVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK

【０２１５】
上記中の
残基１～３８９＝Ｃ．ジフテリア（Ｃ．ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ）由来の配列
残基３９０～３９９＝Ｇ４Ｓ２リンカー
残基４００～４５７＝Ｈｅｒ３：０８６９９アフィボディ
残基４５８～４６７＝Ｇ４Ｓ２リンカー
残基４６８～４８７＝Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド
残基４８７～５０５＝トロンビン切断部位およびｓｔｒｅｐタグＩＩ
【０２１６】
ＣＴ２－ＺＨｅｒ３－Ａ２０（配列番号３２）
【０２１７】
【化１１】

YANDAVIADQSKTVDSFTSYHGAKPESFESVLAGIKKPESGSQGNHDPEWK
GFYTTDNKHAAAGYTVSDESVMTGKAGGVVKVTYPGKTRVLAVKPLSATELKTYLGLAADK
PLIDQLNNKDFINKFGEGASRVVLQMPFADGTSDVEYIHNWEDATQLQVATEVRFDNLGKR
GQDEMNRYMNLANCPSVSAVRVKRNPAKLCLSKVKWEQVREKSKKIIDNVKDNPEFMKKL
SAHHERGSAPTTEKITALHNELLDHESFSALKGARSSAGTAATAASAAAWGLAVAQAFTNP
KADDLTKATAVLSAVPGLGQALGIADGIKHHNTEEIVVQSISLTALIAAQAIPVVGELVDFGLLA
YQLVESIIDLTRQLSVITANPPTEVTHSSKLAGGGGSGGGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLP
NLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGGGSNAVPNLRGDLQV
LAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK

【０２１８】
上記中の
残基１～３９１＝Ａ．ケロネー（Ａ．ｃｈｅｌｏｎａｅ）ＬＫ１６－１８由来の配列
残基３９２～４０１＝Ｇ４Ｓ２リンカー
残基４０２～４５９＝Ｈｅｒ３：０８６９９アフィボディ
残基４６０～４６９＝Ｇ４Ｓ２リンカー
残基４７０～４８９＝Ａ２０ＦＭＤＶ２ペプチド
残基４９１～５０７＝トロンビン切断部位およびｓｔｒｅｐタグＩＩ
【０２１９】

【表１－１】

表 1: 配列の表

全長タンパク質			
配列番号	**種**	**配列**	**GenBank 登録番号**
1	*コリネバクテリウム・ジフテリア*	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKS GTQGNYDDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGV VKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGT EEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALS VELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLS CINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSE EKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAA WAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGA VHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNF VESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNT VEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGK LDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVG NGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDH TKVNSKLSLFFEIKS	WP_072564851.1 由来
2	*オーストウィッキア・ケロネー (Austwickia chelonae)(CT1)*	YANDVVLKDQSTTVDSFTSYHGAKPESFNAVLTGIKKPEK GSQGNNDPDWKGFYTTDNKHAAAGYTVSDESVLSGKAGGV VRVTYPGKTRILAVKSLSAAELKGKLGLDSAKPLIDQLND KSFLEKYGDGANRVVLKMPFADGTEDSEFIHNWKDAEQLS VETEVRFDNLGKRGQDAMNSYMNMANCPSTSAVRAKRSPG KICLSKINWKNVREKADALTKKVHADKEFMDKLSTHHQRG EAPSVEKTTALHNALLEHESFSALKGARASGKVGAAASTA AWGVAVAQAFTDPKADALTKTAATLSVVPGLGQALGIADG IKHENTEEIVVQSISLAGLLAAQAIPVVGEAVDFGLLVYQ LVETIVDLATHLSSAAANPPTEATDSVRPAVSLGLRAGWK TEEDAKLHIGSPYGMKFQRIVLSAEEGKEIPFVRAAVAVD SKFLKINGPRSFVVQNGIKTPMACFETEGNLAFCRPSRPI FLSSSSPATLHLSYVTNEHENGTIKNPTVDILGQRIVENK VITANKVSLVYKVDSSNTL	該当なし
21	*オーストウィッキア・ケロネー (Austwickia chelonae)LK16-18 (CT2)*	YANDAVIADQSKTVDSFTSYHGAKPESFESVLAGIKKPES GSQGNHDPEWKGFYTTDNKHAAAGYTVSDESVMTGKAGGV VKVTYPGKTRVLAVKPLSATELKTYLGLAADKPLIDQLNN KDFINKFGEGASRVVLQMPFADGTSDVEYIHNWEDATQLQ VATEVRFDNLGKRGQDEMNRYMNLANCPSVSAVRVKRNPA KLCLSKVKWEQVREKSKKIIDNVKDNPEFMKKLSAHHERG SAPTTEKITALHNELLDHESFSALKGARSSAGTAATAASA AAWGLAVAQAFTNPKADDLTKATAVLSAVPGLGQALGIAD GIKHHNTEEIVVQSISLTALIAAQAIPVVGELVDFGLLAY QLVESIIDLTRQLSVITANPPTEVTHSSKLAKSNGLLAGW KTDQDGVLSLGAPHGMKTQLISMSAEKGQEIPFTGAMIAV	WP_162873017.1 Y64-L603

【０２２０】

【表１－２】

		KKDLLTVNTPRVFVVQNGIRIPLRCSAAGETLTFCRPNHP VWLSEQHQATLHLSYVTQENESEKIDNPTVDILGQKIVDN KVSTANKVSLVYEVDRSNKL	
35	*オーストウィッキア種 (Austwickia sp.) TVS 96-490-7B* (CT3)	GAFASPISPAIDKEKSKVVENFTSYHGTKHQYIENVLKGI NKPETGSQGNHDPDWKGFYTTDSKYAAAGYTPDEENPMSG KAGGVVKVSYTGKTKILALKDMPAGKIKGHLGLDPNKPLT EQIKDQEFINKYGEGADRVVLQMPFAEGSSEVEYINNWDN AKDLKVEPEVRFDQHGKRGQDAMYEYMALASCESAGKAKR SVSKTCLSNIKWERVRQKSEELIKKLKDDENVKKAVQERK EGVKPTSDDLQNLHKALIDHESFKELKSVHSNGVKAMDAA NAALWGANVARVFSDSKSDGLEKATAALAAVPGLGQVMGV ADGVTHHNTEEVVVQSVALAGFIAAQAIPVVGEIVDIGVL AYQFVEGVIDLSRQMMTSNARGIAEKRQVVDIKDANGLSG GWLTPQDSKIHLPPHYGTKTQRLAVSANGDHNLPITGFKT SINPKFFNINESGSFIVQNGLKVPMNCSEEASKTEAVCIP VHPIWLTDKNNAIIHVSYQTKSPEGSRIDNPRLEVWGQIM HTEEGPKTNTINLGYSVDQEMPCYSSIKFENGGDYVGRLA VNSKDGKVTHSKMSGMRDKDKVDLSAFNSGEVLTTEISPT GGGAPTPGPSIKYCSDGGIEASIKSWGTKDKAFLGFN	WP_219106995.1 G27-N663
移行ドメイン			
配列番号	**種**	**移行ドメイン配列**	**ソース配列またはGenBank登録番号(座標を含む全長配列)**
3	*オーストウィッキア・ケロネー (Austwickia chelonae)*(CT1-T)	LSKINWKNVREKADALTKKVHADKEFMDKLSTHHQRGEAP SVEKTTALHNALLEHESFSALKGARASGKVGAAASTAAWG VAVAQAFTDPKADALTKTAATLSVVPGLGQALGIADGIKH ENTEEIVVQSISLAGLLAAQAIPVVGEAVDFGLLVYQLVE TIVDLATHLSSAAAN	配列番号 2 L204-N378
4	*ストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム (Streptosporangium nondiastaticum)*	LPVDWDKVEEKAKATAKKVAQDAEHVERLPKRSPKGPTWG EAHSTAELTHAKVREVSGAHVAASAAGVGTWVYGMAKTFS DKNATTLDKVAVTGAVVPGLGQALGIADGIQHGDPEAIAV NAVALAALAAAQVVPVVGEVVDAVLLTEQLVEVLVDVFRT ATAD	PSJ28985.1 L231-D394
5	*ストレプトマイセス種 (Streptomyces sp.)TLI 053*	IPAASWEAIEHRSKEMASAVARDTEYTKSLPNRHPKGPTW SEAHTTSTSTHARVSAKSGAHVAVGAFAVGSWIYGMSETF ANKNVTTLDKAAATVAIVPGIGHALGIAAALEHHDIEGVV VNAISIAALAAAQVVPVVGEIVDAALLAEQLVEVLVHVFR ASTTE	SDT83331.1 I198-E362

【０２２１】

【表１－３】

6	ストレプトマイセス種 (Streptomyces sp.) SLBN-118	LSEMDGEKVTKGAQSVADTLKGHGNLQPLVKRTRAEPRTQ QYLPPTRQQIDDAISAAQRVHPGVDTAMKHLGSAQALAGF ALDVSQGEPLRAAADVTAMLPRIGPGLGNALGLADSIVHD DPEGIAVNAIGLGAFIVAQAIPVIGELADLGFAAYALIET LKSMFAGPTLG	WP_160159328.1 L631-G801
7	ストレプトマイセス種 (Streptomyces sp.) AA8	LPVDWDKVEEKAKATAKKVAQDAEHVERLPKRNPKGPTWG EAHSTAELTHAKVRAVSGAHVAATAAGVGTWVYGMAKTFS DKDATTLDKVAVTGAVVPGLGQALGIADGIQHGDPEAVAV NAVALAALAAAQVVPVVGEVVDAALLTEQLVEVLVDVFRT ATAD	WP_168096531.1 L241-D404
8	ストレプトマイセス・ロセオバーティシラタス (Streptomyces roseoverticillatus)	LPVDWDKVEEKAKATAKKVAQDAEHVERLPKRNPKGPTWG EAHSTAELTHAKVRAVSGAHVAATAAGVGTWVYGMAKTFS DKDATTLDKVAVTGAVVPGLGQALGIADGIQHGDPEAVAV NAVALAALAAAQVVPVVGEVVDAALLTEQLVEVLVDVFRT ATAD	WP_078659863.1 L231-D394
9	ストレプトマイセス・ピニテレ (Streptomyces piniterrae)	ELAKDKARDILSEAGNEVSLPQRDSDGLSKQEITATAEAT RSKLGTGVHGAVSAAMVADWAHDVARTFADPKATKLDKAA AVTAIAPVIGQAVNIADGIQHHDKKTIVVNSLVLAAVVAA QAVPAVGEVVDAAIVADFVVEKLVGWFTPTAKPGPEHVA	JZ58907.1 E225-A383
10	ストレプトマイセス (Streptomyces) MBT76	LPVDWDKVEEKAKATAKKVAQDAEHAERLPKRNPKGPTWG EAHSTAELTHAKVREVSGTHVAATAAGVGTWVYGMAKTFS DKDATTLDKVAVTGAVVPGLGQALGIADGIQHGDPEAVAV NAVALAALAAAQVVPVVGEVVDAVLLTEQLVEVLVDVFRA ATAD	WP_079110321.1 L181-D344
11	ストレプトマイセス・クレンキイ (Streptomyces klenkii)	LPVDWDKVEEKAKATAKKVAQDAEHVEKLPKRSPKGPTWG EAHSTAELSHAKVREVSGAHVAASAAGVGTWVYGMAKTFS DKDATTLDKVAVTGAVVPGLGQALGIADGIQHGDPEAIAV NAVALAALAAAQVVPVVGEVVDAVLLTEQLVEVLVDVFRT ATAD	WP_120757473.1 L227-D390
12	ストレプトマイセス・アルビレティクリ (Streptomyces albireticuli)	GINVAAYKADIEKLIKDVYEDPNFSDLKNRTGGPQKDKDT LKGYYERLKPKVETLRPLKAGVSSAVGAAGAISWAIGVAD AFTSENVSSFDKAAAVTAIVPGLGECVGIANAIDKRDPEG LIINTISMAALMASAAVPVLAPIGVALDAGLAAAQGVATV LEYLEIGQ	WP_095582082.1 G232-Q399
13	ストレプタシディフィルス・ピニコラ (Streptacidiphilus pinicola)	KVNWKDAYDRSMNIAQDIDGSAEFRATAPARPAAGKAMPE ADVTRLVSTSEDFLEKSTKTSGVKKALKAINNQKMISWGS LLSNALANSHTWSDKNATNLDKAYAVVGGVPVLGEVIGIA SGIDKQDAESIAVNTLSLVGIVAATVCPPLGATVEFVMIG YTAIKLMLSWFTVETI	WP_133259917.1 K246-I421
14	セイノネラ・ペプトノフィラ (Seinonella peptonophila)	LDWEKIKTESQRIVKQIIEEHPELQSHSKNAVTDKEKLQK IYNDYAPKIDKLSSLKEGVSRATTAINIASWAAGLAETFS NKNADGLDKAAAVTAIIPGLGQAVGIANGIEKHDGEAIAI NSIALSALVVAQAIPIVGEIADVVGAGLILAGGLAQLIQS VSPDT	WP_073156187.1 L252-T416

【０２２２】

【表１－４】

15	ロンギミセリウム・ツルファネンス (Longimycelium tulufanense)	ERKTLDKLDRKKIETRAKQVISKLAQDGDLRRELPRRTTT GHAHEEVRGVLAKSRGALHEIHGAATTVAMPLATVAWVED MARVFREKNATTLDKAATVSEIVPVAGQVLGMADGIAHRD AETVAVNAVVLAAIAVSQAVPVVGELVDLGLTAYAVVDVV VRLFGPAREVPITQESYW	WP_189053160.1 E249-W426
16	オーストウィッキア種 (Austwickia sp.) TVS 96-490-7B (CT3-T)	LSNIKWERVRQKSEELIKKLKDDENVKKAVQERKEGVKPT SDDLQNLHKALIDHESFKELKSVHSNGVKAMDAANAALWG ANVARVFSDSKSDGLEKATAALAAVPGLGQVMGVADGVTH HNTEEVVVQSVALAGFIAAQAIPVVGEIVDIGVLAYQFVE GVIDLSRQMMTSNAR	WP_219106995.1 L233-R407
17	オーストウィッキア・ケロネー (Austwickia chelonae) LK16-18 (CT2-T)	LSKVKWEQVREKSKKIIDNVKDNPEFMKKLSAHHERGSAP TTEKITALHNELLDHESFSALKGARSSAGTAATAASAAAW GLAVAQAFTNPKADDLTKATAVLSAVPGLGQALGIADGIK HHNTEEIVVQSISLTALIAAQAIPVVGELVDFGLLAYQLV ESIIDLTRQLSVITAN	WP_116115734.1 L267-N442
36	クレブシエラ・アエロゲネス (Klebsiella aerogenes)	GLNWGSIREKAVDKAKSVTSDKKFINSLPERGKNSPANKN DINTIYESSANHSTLKGGSEVIHKASLLLWVANTADVLTS NSSSTLDKATAIIGIVPGIGDAFSLADSIEHDDVEGIITS SIALAAFTVAQAVPVVGELVDIALLTEAAISSLVNVISNY IQSTQR	EIZ2913133.1 G211-R376
37	ストレプトマイセス種 (Streptomyces sp.) MUM 178J	ADLDWEKVRSRAKETARQVAQDSEHVSGLPERRAEGLTKS EAHAVAERTHAKVSEVSGTRVAATAFGVGTWAYGMAQTFT DQNATTLDKVAVTTAIVPGVGNALGIADGIEHHDPEAVAV NAVALAALVAAQAVPVVGELVDTVLLTEQIVETFVNIFQR ATAA	MCH0551590.1 A229-A392
38	クロシエラ・クリオフィラ (Crossiella cryophila)	ETADSLGELFHQGMTIAGEAVAELLDLEEALKSQKVAKGDA RAVVAGKVAAVGKQVGKSSALAKFKEVLKPSKGVIALWAV SALYTLAQEDVSTVDKAEAVLAIVPILGPLFSFGNSYRKE DVEGMVISTVALAATLIAFLCPPVGAGIGVGLAVYQVVRA FC	MBB4677777.1 E56-C217
39	アロクツネリア種 (Allokutzneria sp.) NRRL B-24872	SLVKGKTDAQAVSAVKQLFENSKTVATSLVADSDMADAIK DAKKAAKVGVAPPVDKVKKVTDPLVEKALKSKSFANTKAG KYLKNAQPSKAGTALWAATTVATFLDGSSSASDKAVAAVG IIPVVGQLASLIHTTIKDPSDVEGIVTGTIGLAAAVITIA C	WP_143261759.1 S60-C220
40	アロクツネリア・アルバータ (Allokutzneria albata)	KAIGATRESARKFVANILSKSEKATTTLAASNDYKSSMKGF SESFAKLRKAAAETKKPIPTADIKKLLTPHLDKVSTVKDFK KYFTNLKPSQGSAATWLVNLAATVANEESSKADVAVAAAGI IPVVGQVAAIANSVSQGDVEGTVTSAIALAANIAIAVGAG	WP_156051914.1 K78-G240
41	ストレプトマイセス種 (Streptomyces sp.) AV19	CDIGVRDHAEVARKHQERLRAHGDDVEYVTTLDEFEKNPK SLLSPLRETNGVLNDAAAAELGAKDFEAFSTRVTEALGRD LRAVHGLSTDTTLLAKVARQAGRAAELGAKALPYVGIAAT GYAIAEDVKAGDYANLAFDSVAEGLQVAMVAQPELVPLLE PVLFAEQLAQIVYDEIAGWFKRQEQLDHDRKQWDSAAEDL	WP_199893204.1 C260-P481

【０２２３】

【表１－５】

		VEHRDGQWRDHLVGQALQKLFP	
42	ストレプトマイセス種 (Streptomyces sp.) NRBC_110611	CGWGDDGVAHTQRERLRAQGGDVEYVTSLEEFEKNPKALL SPLRETNKVLNDAASAELGAKDFETFSARVGAAFSRDLRA VQGLTTDTGLLAGVGRQVGRAGDLGVKVLPYVGIAVTGYA VAEDAKAGDYANLAFDSVAEGLQVAMVAQPEVAPLLEPAL LAEQLAQLVYNEVAGWIAEQKQLEHDRAQWDGAVKDLVAH RDTQWRDRLVGQAVQELFP	WP_147264604.1 C231-P449
43	ストレプトマイセス・シリンギウム (Streptomyces syringium)	CGIAAADDAKVARTHQERLRAQGADVEYVTSLEEFEKNPK ALMSPLRETSKVLNGAAAAELGAKDFEAFSTQVTEALGRD LKAVHGLTTDTGLLAEVGRRVGRAGELGVKILPYAGIAAT GYAVAEDAKAGDYGNLAFDSVAEGLQVAMVAQPELTPLLE PALLAEQLAQLVYDEVAGWIAEQKQLAHDRGQWDDAVKDL VAHRDTQWRNRLEGQALQELFP	WP_209513619.1 C232-P453
44	シュートノカルディア (Pseudonocardiaceae) 細菌 YIM PH 21723	RIGKAALAKATAEAQADAQKILKDPSFKPPHPAPHQKLTD AELTQVANDLAKRVSALHPGARDLTGLGKGLAKALKGVIS GVTAGIQAAEIAESAAGSNSGDLEKVCSALGPIPIVGDIA GIVNAAAEGDAVEIVKNVLTLGLSMVSVAFPPLAPVADAV AFVLEVAVFLGKYLWGLLF	RJQ69589.1 R276-F454
45	アクチノキネオスポラ・バンコケンシス (Actinokineospora bangkokensis)	SLSQDQLDQAVADAQATAHQVIDDPRSFELPELAKGQVLS EQELAALANGVAQDVAAANSGGERAIVPAYVTRALSKAIP AIAEHGHDAFLKVSAVEGVLTEGNGALAKVTSVVGPVPVL GSLAGIVNEAVGISADDPPAAIAQKALEIAKNVAGVALTV MAIAFPPFAPVAALATAAWEVGAALGKYLLGFLL	WP_143218892.1 S322-L515
46	ストレプトマイセス・ユーロシディカス (Streptomyces eurocidicus)	CETADGGDTAEEGKQPGEGRQATESDSTEGRNPQGEEGPA EAGKPVADEEWVARVQRERLARHGSDVEYVTSVAELEKNP KAVLSPLRETNTTLNKARDKPLTAAEYEAFASKAAEAMSK DLKGVQAASTDSTVLAKVGAKLARGGSIAVKVGRPVLKRR LLRSSAASSR	MBF6055834.1 C280-R449
47	ストレプトマイセス・パソシディニ (Streptomyces pathocidini)	GTGRQDGGFSSEGREGAVTKEDLKGDPQKVVEINRSRIAR HGADVDYVTSLDALAANPKAVLIPLRNSSQTLDAALGKSH LTVDEFDRFSAELTQSFGRDLQAVENLSTSEKLLSSIGKG ARAGGEGLLKVVPFAGVAASSAALAEDLKSGENGDA	WP_169790908.1 G270-A425
48	ストレプトマイセス・カーチンガエンシス (Streptomyces caatingaensis)	SADIARTHRERLRAHGDDVEYVTSLAEFEKNPKALLSPLR ETGKVLNDAGNAGLSAGDFETFSARVGEAFERDLRAAHEL TTDTGLLARVGAEAGRAAELGAKALPFVGIAATGYAVAED VKSGDYANLAFDSVAEGLQVAMTAQPEFA	WP_157868472.1 S241-A389
構築物およびモジュール			
配列番号	**説明**	**配列**	**ソース**
18	ビブリオ・バルニフィカス (Vibrio vulnificus) (RRSP)	GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQ LDLVHQAKGRDQIAASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALT QLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIFMVA IEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLG	WP_011081430.1 G3580–L4089

【０２２４】

【表１－６】

		FDAKYHVDLGEHYADFKQWLETSQSNGLLSKATLDESTKT VHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISGDS AEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDA WDRRYSGTGYDELTNKLASATGVDEQLAVLLDDRKGLLIG EVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQP LIDRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIV ALDANSSARPNVQGTEHGLMYRAGAANNIAVEVLQNLPDG EKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSN QFTVEQDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSL	
19	*Her3 アフィボディ (ZHer3:08699)*	AEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQ SSELLSEAKKLNDSQAPK	Nazari ら (2019)
20	*A20 ペプチド (A20FMDV2)*	NAVPNLRGDLQVLAQKVART	DiCara ら (2007)
22	RRSP – DT-T - ZHer3-A20 構築物	GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQ LDLVHQAKGRDQIAASFELNKKTNDYIAEHPTSGRNQALT QLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIFMVA IEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLG FDAKYHVDLGEHYADFKQWLETSQSNGLLSKATLDESTKT VHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISGDS AEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDA WDRRYSGTGYDELTNKLASATGVDEQLAVLLDDRKGLLIG EVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQP LIDRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIV ALDANSSARPNVQGTEHGLMYRAGAANNIAVEVLQNLPDG EKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSN QFTVEQDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGS CAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGP IKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKT VTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALS ILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIP LVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHK TQPFGGGGSGGGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQ KAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGG GSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK	該当なし
23	RRSP – CT1-T - ZHer3-A20 構築物	GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQ LDLVHQAKGRDQIAASFELNKKTNDYIAEHPTSGRNQALT QLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIFMVA IEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLG FDAKYHVDLGEHYADFKQWLETSQSNGLLSKATLDESTKT VHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISGDS AEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDA WDRRYSGTGYDELTNKLASATGVDEQLAVLLDDRKGLLIG EVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQP LIDRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIV	該当なし

【０２２５】

【表１－７】

		ALDANSSARPNVQGTEHGLMYRAGAANNIAVEVLQNLPDG EKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSN QFTVEQDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGS CAGNRVRRSVGSSLSCLSKINWKNVREKADALTKKVHADK EFMDKLSTHHQRGEAPSVEKTTALHNALLEHESFSALKGA RASGKVGAAASTAAWGVAVAQAFTDPKADALTKTAATLSV VPGLGQALGIADGIKHENTEEIVVQSISLAGLLAAQAIPV VGEAVDFGLLVYQLVETIVDLATHLSSAAANPAYSPGHKT QPFGGGGSGGGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQK AAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGGG SNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK	
24	RRSP – CT2-T - ZHer3-A20 構築物	GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQ LDLVHQAKGRDQIAASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALT QLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIFMVA IEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLG FDAKYHVDLGEHYADFKQWLETSQSNGLLSKATLDESTKT VHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISGDS AEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDA WDRRYSGTGYDELTNKLASATGVDEQLAVLLDDRKGLLIG EVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQP LIDRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIV ALDANSSARPNVQGTEHGLMYRAGAANNIAVEVLQNLPDG EKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSN QFTVEQDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGS CAGNRVRRSVGSSLSCLSKVKWEQVREKSKKIIDNVKDNP EFMKKLSAHHERGSAPTTEKITALHNELLDHESFSALKGA RSSAGTAATAASAAAWGLAVAQAFTNPKADDLTKATAVLS AVPGLGQALGIADGIKHHNTEEIVVQSISLTALIAAQAIP VVGELVDFGLLAYQLVESIIDLTRQLSVITANPAYSPGHK TQPFGGGGSGGGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQ KAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGG GSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK	該当なし
25	RRSP – CT3-T - ZHer3-A20 構築物	GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQ LDLVHQAKGRDQIAASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALT QLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIFMVA IEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLG FDAKYHVDLGEHYADFKQWLETSQSNGLLSKATLDESTKT VHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISGDS AEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDA WDRRYSGTGYDELTNKLASATGVDEQLAVLLDDRKGLLIG EVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQP LIDRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIV ALDANSSARPNVQGTEHGLMYRAGAANNIAVEVLQNLPDG EKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSN	該当なし

【０２２６】

【表１－８】

		QFTVEQDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGSGGGGS CAGNRVRRSVGSSLSCLSNIKWERVRQKSEELIKKLKDDE NVKKAVQERKEGVKPTSDDLQNLHKALIDHESFKELKSVH SNGVKAMDAANAALWGANVARVFSDSKSDGLEKATAALAA VPGLGQVMGVADGVTHHNTEEVVVQSVALAGFIAAQAIPV VGEIVDIGVLAYQFVEGVIDLSRQMMTSNARPAYSPGHKT QPFGGGGSGGGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQK AAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGGG SNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK	
26	RRSP-T(S.ｸﾚﾝｷｲ (S. klenkii)-ZHer3-A20 構築物	GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILD QLDLVHQAKGRDQIAASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQA LTQLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIF MVAIEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETP SDLGFDAKYHVDLGEHYADFKQWLETSQSNGLLSKATLD ESTKTVHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKAD PISGDSAEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSS HETDIDAWDRRYSGTGYDELTNKLASATGVDEQLAVLLD DRKGLLIGEVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLE HLRSDLAQPLIDRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFE NARANGMRIVALDANSSARPNVQGTEHGLMYRAGAANNI AVEVLQNLPDGEKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHR LDLPALKVSDSNQFTVEQDDVSLRVVYDDVANKPKITFK GSLGGGGSGGGGSCAGNRVRRSVGSSLSCLPVDWDKVEE KAKATAKKVAQDAEHVEKLPKRSPKGPTWGEAHSTAELS HAKVREVSGAHVAASAAGVGTWVYGMAKTFSDKDATTLD KVAVTGAVVPGLGQALGIADGIQHGDPEAIAVNAVALAA LAAAQVVPVVGEVVDAVLLTEQLVEVLVDVFRTATADPA YSPGHKTQPFGGGGSGGGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQL PNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK GGGGSGGGGSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGS AWSHPQFEK	該当なし
27	RRSP-T(S.種 TLI053)-ZHer3-A20 構築物	GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQ LDLVHQAKGRDQIAASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALT QLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIFMVA IEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLG FDAKYHVDLGEHYADFKQWLETSQSNGLLSKATLDESTKT VHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISGDS AEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDA WDRRYSGTGYDELTNKLASATGVDEQLAVLLDDRKGLLIG EVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQP LIDRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIV ALDANSSARPNVQGTEHGLMYRAGAANNIAVEVLQNLPDG EKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSN QFTVEQDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGSGGGGS	該当なし

【０２２７】

【表１－９】

		CAGNRVRRSVGSSLSCIPAASWEAIEHRSKEMASAVARDT EYTKSLPNRHPKGPTWSEAHTTSTSTHARVSAKSGAHVAV GAFAVGSWIYGMSETFANKNVTTLDKAAATVAIVPGIGHA LGIAAALEHHDIEGVVVNAISIAALAAAQVVPVVGEIVDA ALLAEQLVEVLVHVFRASTTEPAYSPGHKTQPFGGGGSGG GGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDD PSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGGGSNAVPNLRGD LQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK	
28	RRSP-T(L.ツルファネンス (L. tulufanense))-ZHer3-A20 構築物	GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQ LDLVHQAKGRDQIAASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALT QLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIFMVA IEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLG FDAKYHVDLGEHYADFKQWLETSQSNGLLSKATLDESTKT VHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISGDS AEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDA WDRRYSGTGYDELTNKLASATGVDEQLAVLLDDRKGLLIG EVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQP LIDRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIV ALDANSSARPNVQGTEHGLMYRAGAANNIAVEVLQNLPDG EKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSN QFTVEQDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGS CAGNRVRRSVGSSLSCERKTLDKLDRKKIETRAKQVISKL AQDGDLRRELPRRTTTGHAHEEVRGVLAKSRGALHEIHGA ATTVAMPLATVAWVEDMARVFREKNATTLDKAATVSEIVP VAGQVLGMADGIAHRDAETVAVNAVVLAAIAVSQAVPVVG ELVDLGLTAYAVVDVVVRLFGPAREVPITQESYWPAYSPG HKTQPFGGGGSGGGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTK YQKAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSG GGGSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQF EK	該当なし
29	RRSP-T(S.ピニテレ (S. piniterrae))-ZHer3-A20 構築物	GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQ LDLVHQAKGRDQIAASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALT QLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPELAARIFMVA IEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLG FDAKYHVDLGEHYADFKQWLETSQSNGLLSKATLDESTKT VHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISGDS AEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDA WDRRYSGTGYDELTNKLASATGVDEQLAVLLDDRKGLLIG EVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQP LIDRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIV ALDANSSARPNVQGTEHGLMYRAGAANNIAVEVLQNLPDG EKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSN QFTVEQDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGS CAGNRVRRSVGSSLSCELAKDKARDILSEAGNEVSLPQRD	該当なし

【０２２８】

【表１－１０】

		SDGLSKQEITATAEATRSKLGTGVHGAVSAAMVADWAHDV ARTFADPKATKLDKAAAVTAIAPVIGQAVNIADGIQHHDK KTIVVNSLVLAAVVAAQAVPAVGEVVDAAIVADFVVEKLV GWFTPTAKPGPEHVAPAYSPGHKTQPFGGGGSGGGGSAEA KYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQSSE LLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGGGSNAVPNLRGDLQVLAQ KVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK	
30	RRSP-T(S.ﾋﾟﾆｺﾗ (S. pinicola))-ZHer3-A20 構築物	GDKTKVVVDLAQIFTVQELKERAKVFAKPIGASYQGILDQ LDLVHQAKGRDQIAASFELNKKINDYIAEHPTSGRNQALT QLKEQVTSALFIGKMQVAQAGIDAIAQTRPEILAARIFMVA IEEANGKHVGLTDMMVRWANEDPYLAPKHGYKGETPSDLG FDAKYHVDLGEHYADFKQWLETSQSNGLLSKATLDESTKT VHLGYSYQELQDLTGAESVQMAFYFLKEAAKKADPISGDS AEMILLKKFADQSYLSQLDSDRMDQIEGIYRSSHETDIDA WDRRYSGTGYDELTNKLASATGVDEQLAVLLDDRKGLLIG EVHGSDVNGLRFVNEQMDALKKQGVTVIGLEHLRSDLAQP LIDRYLATGVMSSELSAMLKTKHLDVTLFENARANGMRIV ALDANSSARPNVQGTEHGLMYRAGAANNIAVEVLQNLPDG EKFVAIYGKAHLQSHKGIEGFVPGITHRLDLPALKVSDSN QFTVEQDDVSLRVVYDDVANKPKITFKGSLGGGGSGGGGS CAGNRVRRSVGSSLSCKVNWKDAYDRSMNIAQDIDGSAEF RATAPARPAAGKAMPEADVTRIVSTSEDFLEKSTKTSGVK KALKAINNQKMISWGSLLSNALANSHTWSDKNATNLDKAY AVVGGVPVLGEVIGIASGIDKQDAESIAVNTLSLVGIVAA TVCPPLGATVEFVMIGYTAIKLMLSWFTVETIPAYSPGHK TQPFGGGGSGGGGSAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQ KAAFIGKLQDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGG GSNAVPNLRGDLQVLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK	該当なし
31	DT_{1-389}-ZHer3-A20 構築物	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKS GTQGNYDDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGV VKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGT EEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALS VELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLS CINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSE EKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAA WAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGA VHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNF VESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFGGGGSGGGGSA EAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPSQS SELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGGGSNAVPNLRGDLQVL AQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK	該当なし
32	$CT2_{1-391}$-ZHer3-A20 構築物	YANDAVIADQSKTVDSFTSYHGAKPESFESVLAGIKKPES GSQGNHDPEWKGFYTTDNKHAAAGYTVSDESVMTGKAGGV VKVTYPGKTRVLAVKPLSATELKTYLGLAADKPLIDQLNN	該当なし

【０２２９】

【表１－１１】

		KDFINKFGEGASRVVLQMPFADGTSDVEYIHNWEDATQLQ VATEVRFDNLGKRGQDEMNRYMNLANCPSVSAVRVKRNPA KLCLSKVKWEQVREKSKKIIDNVKDNPEFMKKLSAHHERG SAPTTEKITALHNELLDHESFSALKGARSSAGTAATAASA AAWGLAVAQAFTNPKADDLTKATAVLSAVPGLGQALGIAD GIKHHNTEEIVVQSISLTALIAAQAIPVVGELVDFGLLAY QLVESIIDLTRQLSVITANPPTEVTHSSKLAGGGGSGGGG SAEAKYAKEKYNAYYEIWQLPNLTKYQKAAFIGKLQDDPS QSSELLSEAKKLNDSQAPKGGGGSGGGGSNAVPNLRGDLQ VLAQKVARTRQALVPRGSAWSHPQFEK	
33	(括るように挟むｼｽﾃｲﾝを含む)ﾌﾘﾝ認識部位を含有するC.ｼﾞﾌﾃﾘｱ(C. diphtheriae)由来ﾘﾝｶｰ	CAGNRVRRSVGSSLSC	該当なし
34	Tﾄﾞﾒｲﾝに続くﾘﾝｶｰ、C.ｼﾞﾌﾃﾘｱ(C. diphtheriae)由来	PAYSPGHKTQPF	該当なし

【０２３０】

参考文献

【０２３１】

【表２】

Orrell, K. E., Mansfield, M. J., Doxey, A. C. & Melnyk, R. A. The C. difficile toxin B membrane translocation machinery is an evolutionarily conserved protein delivery apparatus. *Nature Communications* **11**, 1–11 (2020).

Park, M. *et al.* Intracellular Delivery of Human Purine Nucleoside Phosphorylase by Engineered Diphtheria Toxin Rescues Function in Target Cells. *Molecular Pharmaceutics* **15**, 5217–5226 (2018).

Nazari, M.; Zamani Koukhaloo, S.; Mousavi, S.; Minai-Tehrani, A.; Emamzadeh, R.; Cheraghi, R. Development of a ZHER3-Affibody-Targeted Nano-Vector for Gene Delivery to HER3-Overexpressed Breast Cancer Cells. Macromol. Biosci. 2019, 19 (11).

DiCara, D.; Rapisarda, C.; Sutcliffe, J. L.; Violette, S. M.; Weinreb, P. H.; Hart, I. R.; Howard, M. J.; Marshall, J. F. Structure-Function Analysis of Arg-Gly-Asp Helix Motifs in Avβ6 Integrin Ligands. J. Biol. Chem. 2007, 282 (13), 9657–9665.

Sugiman-Marangos, S.N., Gill, S.K., Mansfield, M.J. et al. Structures of distant diphtheria toxin homologs reveal functional determinants of an evolutionarily conserved toxin scaffold. Commun Biol 5, 375 (2022).

【０２３２】

前述の記載では説明を目的として、実施形態の完全な理解を提供するために多数の詳細を記載する。しかしながら、それらの具体的詳細は不要であることが当業者には明らかになる。他の場合、理解を不明瞭にさせないために、周知の電気的構造および電気回路をブ

ロック図の形で示す。例えば、本明細書に記載される実施形態が、ソフトウェアルーチン、ハードウェア回路、ファームウェア、またはそれらの組合せとして実施されるかどうかに関する具体的詳細は提供されない。

【０２３３】

上記の実施形態は、単に例であると意図される。当業者により、特定の実施形態に対して、変更、修正、および変形が達成され得る。特許請求の範囲は、本明細書に記載される特定の実施形態により限定されるべきでなく、全体としての明細書と一致したやり方で解釈されるべきである。

【図面】

【図１－１】

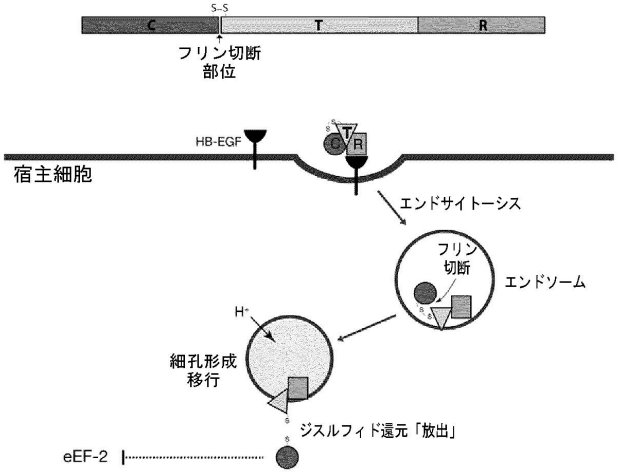


図 1A

【図１－２】

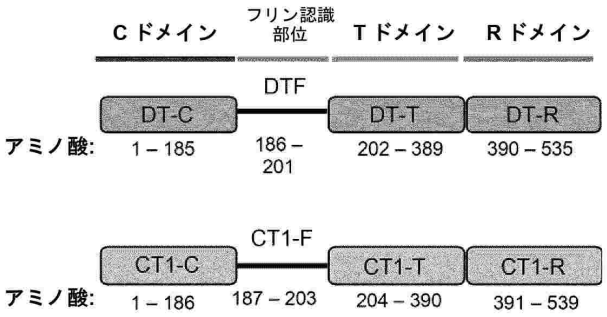


図 1B

【図１－３】



ジフテリア毒素(DT)
(PDB ID:1MDT)

ケロネー毒素 1(CT1)
DT 様オーストウィッキア・ケロネー
(Austwickia chelonae)
分解能:2.50Å DT に
対する RMSD:2.4Å

図 1C

【図２－１】

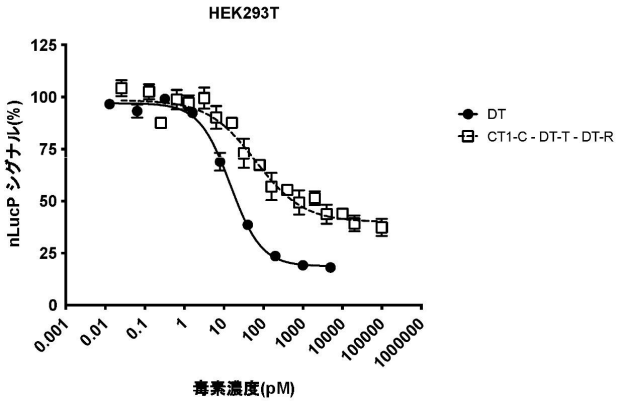


図 2A

【図２－２】

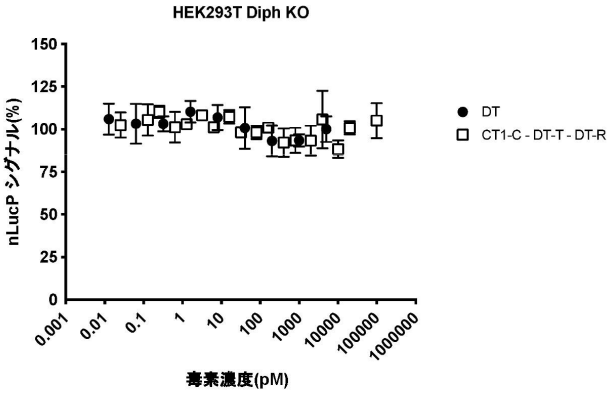


図 2B

【図２－３】

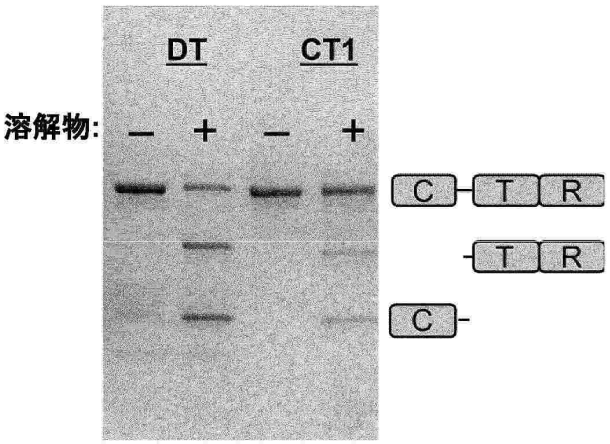


図 2C

【図３－１】

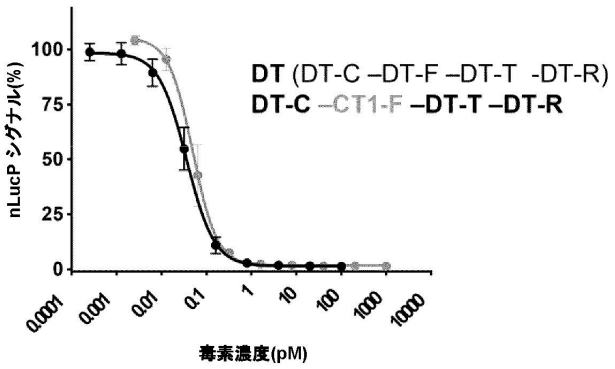


図 3A

【図３－２】

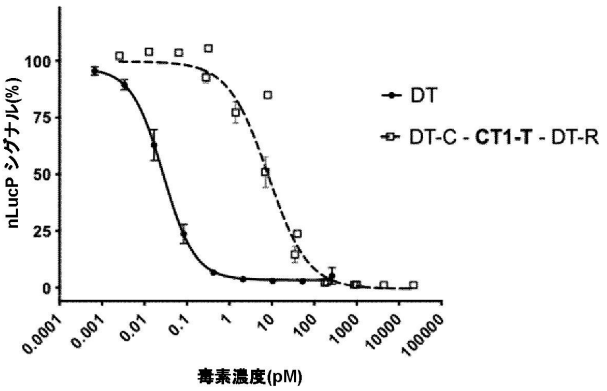


図 3B

【図３－３】

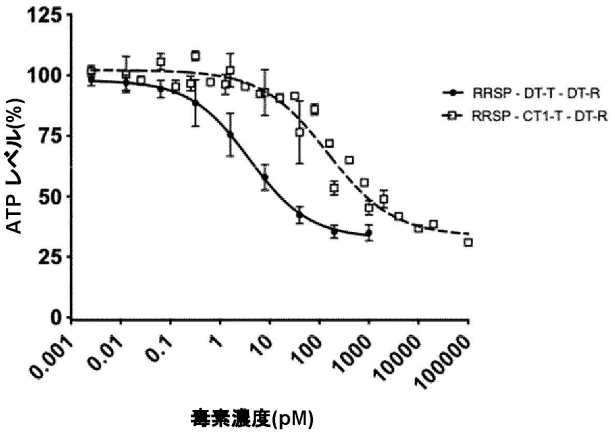


図 3C

【図３－４】

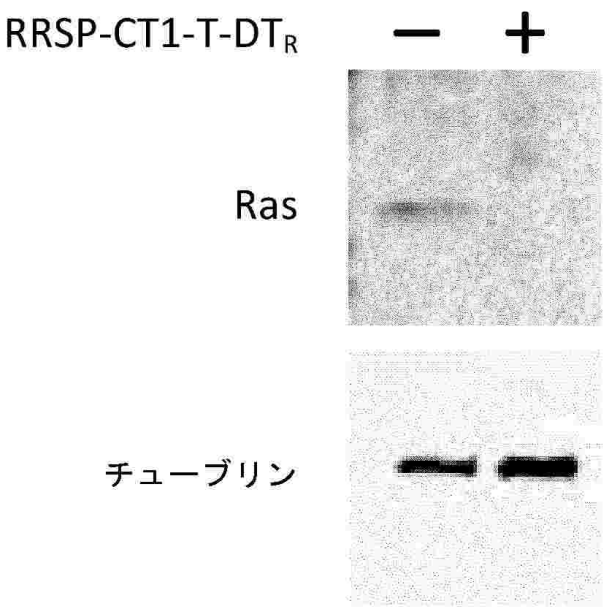


図 3D

【図３－５】

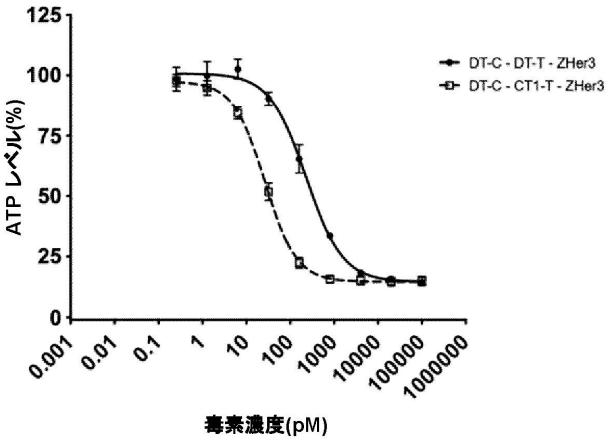


図 3E

【図３－６】

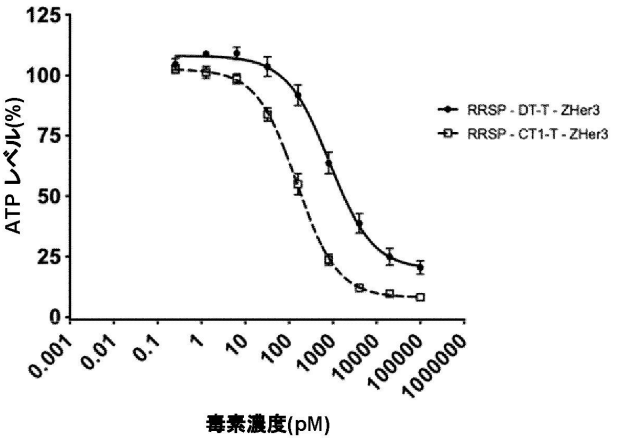


図 3F

【図４－１】

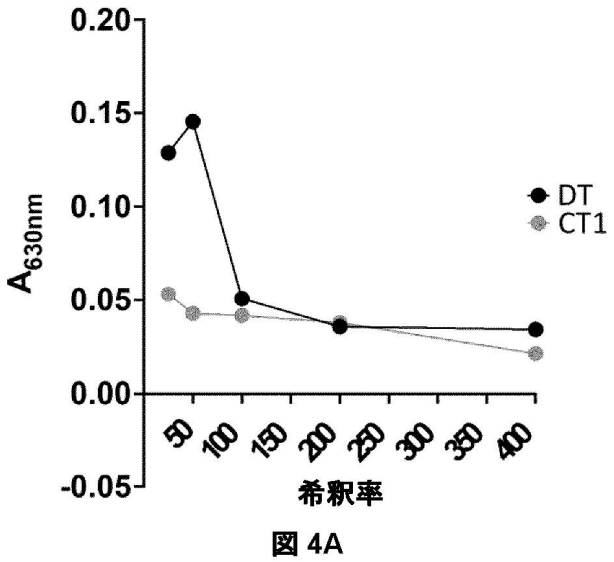


図 4A

【図４－２】

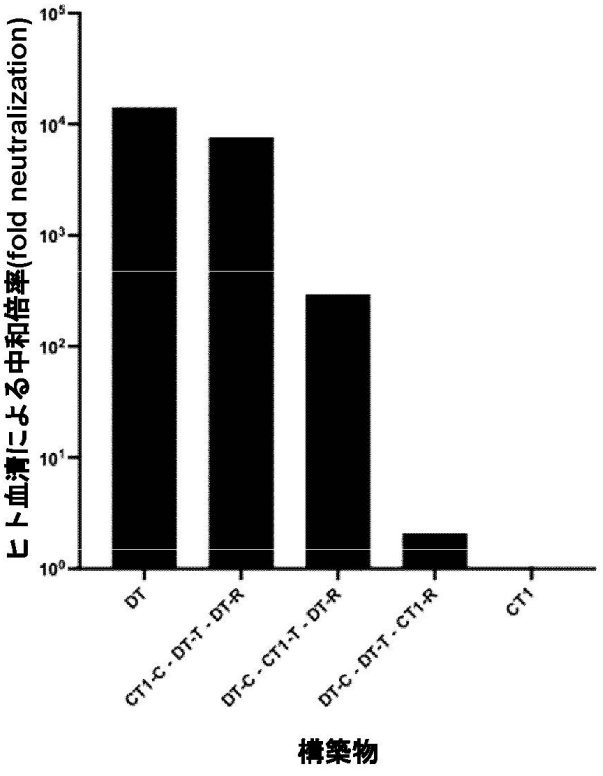


図 4B

【図５】

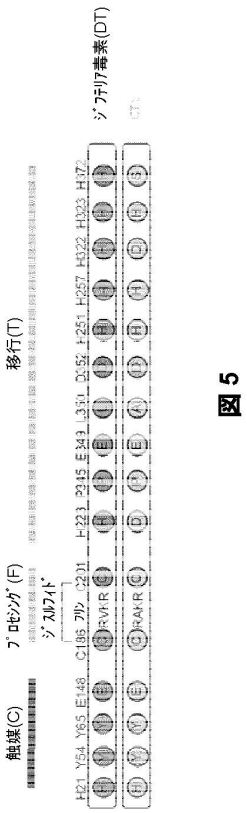


図 5

【図６－１】

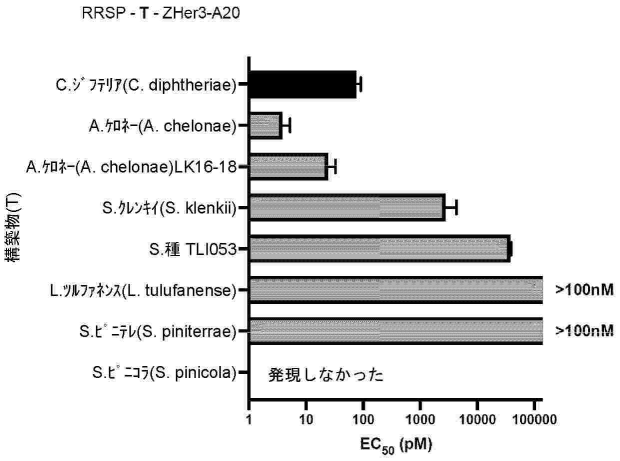


図 6A

【図６－２】

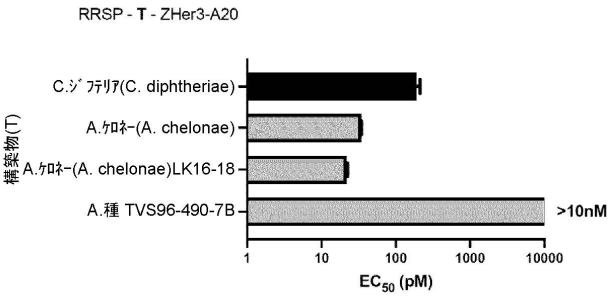


図 6B

【図７－１】

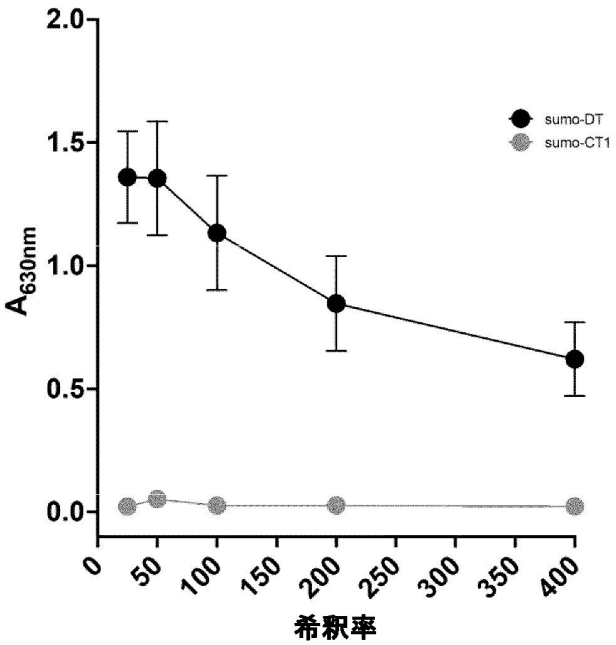


図 7A

【図７－２】

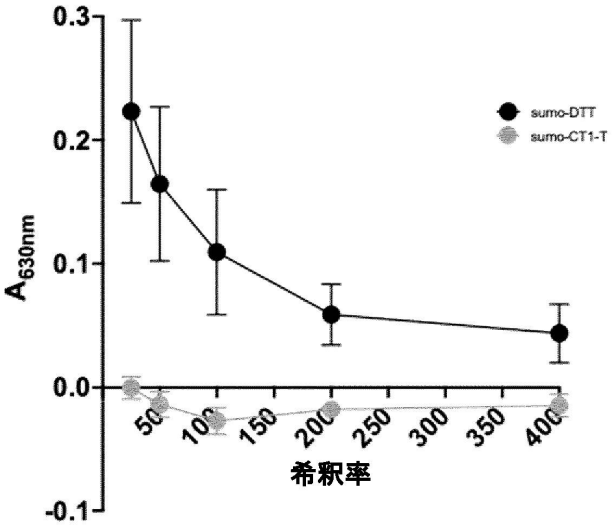


図 7B

【図８】

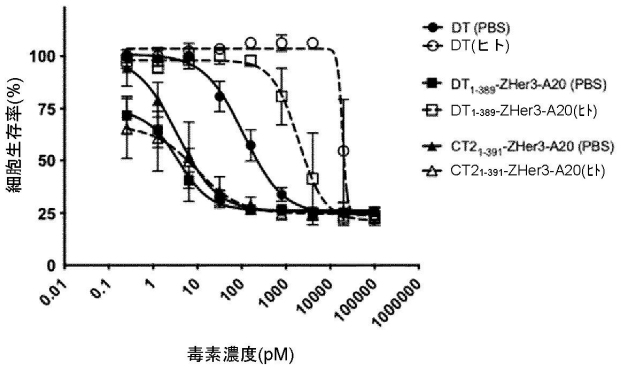


図 8

【図９】

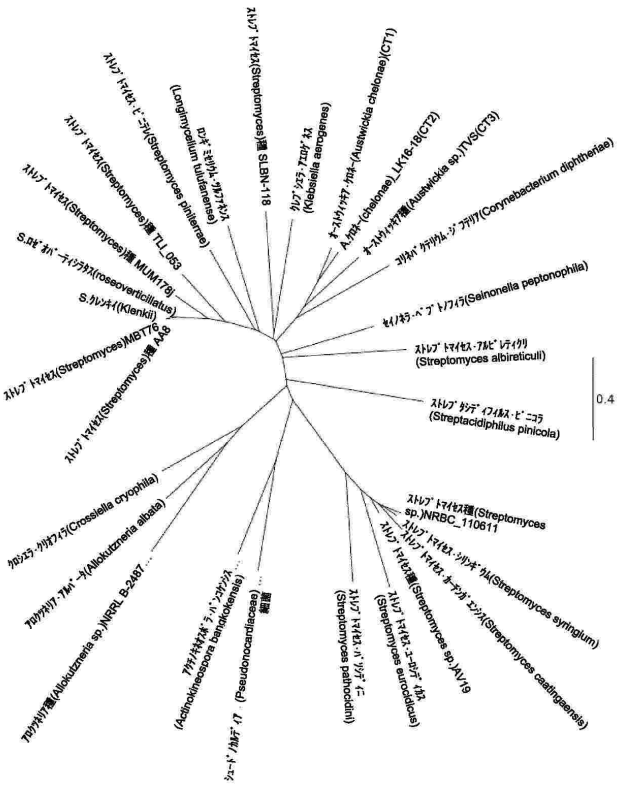


図 9

【配列表】

<u>２０２４５４１１３６０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/051225

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: ***C07K 19/00*** (2006.01), ***A61K 47/64*** (2017.01), ***A61P 35/00*** (2006.01), ***C07K 14/35*** (2006.01), ***C07K 14/36*** (2006.01), ***C07K 14/195*** (2006.01) (more IPCs on the last page)

CPC: **C07K 14/36** (2020.01), A61K 47/64 (2020.01), A61P 35/00 (2020.01), C07K 14/35 (2020.01), C07K 14/195 (2020.01), C07K 16/00 (2020.01) (more CPCs on the last page)

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)
Keywords used across the whole IPC and CPC.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)
Databases: Google, Scopus, Questel Orbit, STN (CAPLUS, REGISTRY), GenomeQuest.
Keywords: Austwickia chelonae, diphtheria toxin, translocation domain, cancer, Ras/Rap1-specific endopeptidase (RRSP), neoplasm, and immunotoxin.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A X	SHAFIEE, F. et AL, "*Targeted Diphtheria Toxin-Based Therapy: A Review Article*". Frontiers in Microbiology, 18 October 2019 (18-10-2019), Vol. 10, pp. 1-23, ISSN 1664302X, <doi: 10.3389/fmicb.2019.02340>	5 and 22-26 (insofar as they pertain to Group 1); 1-4, 6, 21, 27-35, 38, 39, 54, 60-91 (insofar as they pertain to Group 1)
A X	VIDIMAR, V.ET AL, "*An engineered chimeric toxin that cleaves activated mutant and wild-type RAS inhibits tumor growth*". PNAS, 21 July 2020 (21-07-2020), Vol. 117(29), pp. 16938-16948, ISSN 00278424, <doi: 10.1073/pnas.2000312117>	5 and 22-26 (insofar as they pertain to Group 1); 1-4, 6, 21, 27-35, 38, 39, 54, 60-91 (insofar as they pertain to Group 1)

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	
"D" document cited by the applicant in the international application	
"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 24 November 2022 (24-11-2022)	Date of mailing of the international search report 25 November 2022 (25-11-2022)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476	Authorized officer Darryl Jones (873) 354-9761

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/051225

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A X	LI, Z. et AL, "*HER2-targeting recombinant protein with truncated pseudomonas exotoxin A translocation domain efficiently kills breast cancer cells*". Cancer Biology and Therapy, 1 August 2008 (01-08-2008), Vol. 7(8), pp. 1226-1231, ISSN 15384047, <doi: 10.4161/cbt.7.8.6261>	5 and 22-26 (insofar as they pertain to Group 1); 1-4, 6, 21, 27-35, 38, 39, 54, 60-91 (insofar as they pertain to Group 1)
A X	MANSFIELD, M.J. et AL, "*Identification of a diphtheria toxin-like gene family beyond the Corynebacterium genus*". FEBS Letters, 16 August 2018 (16-08-2018), Vol. 592(16), pp. 2693-2705, ISSN 00145793, <doi: 10.1002/1873-3468.13208>	5 and 22-26 (insofar as they pertain to Group 1); 1-4, 6, 21, 27-35, 38, 39, 54, 60-91 (insofar as they pertain to Group 1)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/051225

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. ☒ 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/CA2022/051225

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group 1: Claims 6, 38 and 39 (all completely); and claims 1-5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety (claims 1-6, 21-35, 38, 39, 54 and 60-82), a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises the CT1 translocation domain defined by SEQ ID NO:3 from the *Austwickia chelonae* protein defined by SEQ ID NO: 2 or a translocation domain that is at least 80% identical SEQ ID NO:3.

Continued on extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:

6, 38 and 39 (all completely); and claims 1-5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) which relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, wherein said translocation polypeptide comprises the CT1 translocation domain defined by SEQ ID NO:3 from the *Austwickia chelonae* protein defined by SEQ ID NO: 2 or a translocation domain that is at least 80% identical SEQ ID NO:3. **(Group 1)**

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2022/051225

Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group 2: Claims 7, 10, 11, 13, 14 and 44 (all completely), 45 (completely in regards to SEQ ID NO:11), and 1-3, 5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by one of SEQ ID NOs: 4, 7, 8, 10 and 11 (which have greater than 95% identity to each other) or a translocation domain that is at least 80% identical thereto.

Group 3: Claims 8, 46 and 47 (all completely) and 1-3, 5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by SEQ ID NO: 5 or a translocation domain that is at least 80% identical thereto.

Group 4: Claim 9 (completely) and 1, 2, 5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by SEQ ID NO: 6 or a translocation domain that is at least 80% identical thereto.

Group 5: Claims 12, 50 and 51 (all completely) and 1, 2, 5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by SEQ ID NO: 9 or a translocation domain that is at least 80% identical thereto.

Group 6: Claim 15 (completely) and 1, 5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by SEQ ID NO: 12 or a translocation domain that is at least 80% identical thereto.

Group 7: Claims 16, 52, 53, 58 and 59 (all completely) and 1, 2, 5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by SEQ ID NO: 13 or a translocation domain that is at least 80% identical thereto.

Group 8: Claim 17 (completely) and 1, 5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by SEQ ID NO: 14 or a translocation domain that is at least 80% identical thereto.

Group 9: Claims 18, 48, 49 and 55-57 (all completely) and 1, 2, 5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by SEQ ID NO: 15 or a translocation domain that is at least 80% identical thereto.

Group 10: Claims 19, 42 and 43 (all completely) and 1-3, 5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by SEQ ID NO: 16 or a translocation domain that is at least 80% identical thereto.

Group 11: Claims 20, 40 and 41 (all completely) and 1-5, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by SEQ ID NO: 17 or a translocation domain that is at least 80% identical thereto.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/051225

Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Groups 12-22: Claims 1, 2, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by one of SEQ ID NOs: 36-41 and 44-48 or a translocation domain that is at least 80% identical thereto, wherein each of SEQ ID NOs: 36-41 and 44-48 represents a separate invention.

Group 23: Claims 1, 2, 21-35, 54 and 60-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide, wherein said translocation polypeptide comprises a translocation domain defined by one of SEQ ID NO: 42 or 43 (which have 81.98% identity to each other) or a translocation domain that is at least 80% identical thereto.

Group 24: Claims 36 and 37 (all completely); and claims 83-91 (all partially) relate to a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety comprising the sequence of SEQ ID NO: 22 or a sequence at least 80% identical thereto, a nucleic acid encoding the recombinant polypeptide (claim 83), and compositions (claims 84 and 85), methods of delivery or treatment (claims 86 and 89), and uses (claims 87, 88, 90 and 91) comprising the recombinant polypeptide. The recombinant polypeptide defined by SEQ ID NO: 22 comprises the diphtheria toxin (DT) translocation domain from *Corynebacterium diphtheriae* (SEQ ID NO: 1). It is noted claims 36 and 37 depend on any one of claims 1 to 4, but claims 1 to 4 do not define a translocation domain from *Corynebacterium diphtheriae*.

Reference is made to the following documents:
D1: SHAFIEE, F. et AL, "*Targeted Diphtheria Toxin-Based Therapy: A Review Article*". Frontiers in Microbiology, 18 October 2019 (18-10-2019), Vol. 10, pp. 1-23, ISSN 1664302X, <doi: 10.3389/fmicb.2019.02340>
D2: VIDIMAR, V.ET AL, "*An engineered chimeric toxin that cleaves activated mutant and wild-type RAS inhibits tumor growth*". PNAS, 21 July 2020 (21-07-2020), Vol. 117(29), pp. 16938-16948, ISSN 00278424, <doi: 10.1073/pnas.2000312117>
D3: LI, Z. et AL, "*HER2-targeting recombinant protein with truncated pseudomonas exotoxin A translocation domain efficiently kills breast cancer cells*". Cancer Biology and Therapy, 1 August 2008 (01-08-2008), Vol. 7(8), pp. 1226-1231, ISSN 15384047, <doi: 10.4161/cbt.7.8.6261>
D4: MANSFIELD, M.J. et AL, "*Identification of a diphtheria toxin-like gene family beyond the Corynebacterium genus*". FEBS Letters, 16 August 2018 (16-08-2018), Vol. 592(16), pp. 2693-2705, ISSN 00145793, <doi: 10.1002/1873-3468.13208>

D1 reviews diphtheria toxin based therapies for targeted treatment of cancers. D1 discloses immunotoxin fusion proteins comprising a diphtheria toxin (DT) moiety, comprising an A fragment that includes a catalytic domain that stops protein synthesis within eukaryotic cells and a portion of the B fragment comprising a transmembrane domain, fused to a targeting moiety (see Table 1).

D2 discloses a pan-RAS biologic inhibitor composed of the RAS-RAP1–specific endopeptidase (RRSP) fused to the protein delivery machinery of diphtheria toxin (DT). The disclosed chimeric toxin comprises RRSP fused to the DT B fragment that includes both a translocation domain and a receptor-binding domain (see Figure 1).

D3 discloses a recombinant polypeptide comprising constitutively active granzyme B (ImmunoGrB), the translocation domain of Pseudomonas exotoxin A (PEAII), and an antibody targeting moiety (see Figure 1).

D4 discloses a diphtheria toxin (DT)-like gene family in several bacterial lineages outside of *Corynebacterium*, including *Austwickia* and *Streptomyces*, including the *Austwickia* sequence (WP_040322835.1) having 85.84% identity to SEQ ID NO:3. These DT-like genes form sister lineages in the DT phylogeny and conserve key DT features including catalytic and translocation motifs (see Table 1 and Figures 3-5).

As required by PCT Rule 13.1, the application shall relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. The common inventive concept linking the inventions of Groups 1-24 is seen as a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety. However, this concept is already independently known from D1 and D2, which disclose different immunotoxin fusion proteins comprising the DT translocation domain. The inventive concept linking the inventions of Groups 1-23 is seen as a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety, wherein the translocation domain is not from DT. However, this concept is already known from D3 which discloses a recombinant polypeptide comprising the translocation domain of Pseudomonas exotoxin A (PEAII). Furthermore, D4 discloses several DT-like genes encoding peptides which comprise alternate catalytic and translocation motifs that share conservation with DT. It follows, the features a recombinant polypeptide comprising (a) a cargo molecule, (b) a translocation polypeptide, and (c) a targeting moiety or said recombinant polypeptide wherein the translocation domain is not from DT were already known in the art, and cannot serve as a single general inventive concept a posteriori linking the claimed subject matter.

Therefore, the requirement of unity of invention referred to in PCT Rule 13.1 has not been fulfilled because there is no technical feature among the alleged inventions identified above that defines a contribution over the prior art and the claimed inventions are not linked so as to form a single general inventive concept.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/051225

IPC:
C07K 16/00 (2006.01), ***C07K 16/28*** (2006.01), ***C12N 15/62*** (2006.01)

CPC:
C07K 16/28 (2020.01), C12N 15/62 (2020.01), C07K 2319/01 (2020.01)

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）
Ｃ０７Ｋ	*16/28*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28	
Ｃ０７Ｋ	*19/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

２．ＴＲＩＴＯＮ

(72)発明者　ベイルハーツ，グレッグ
カナダ国 オンタリオ州 エル７エル ７ケー９，バーリントン ベネッサ ドライブ ２３３５

(72)発明者　ギル，シブニート
カナダ国 オンタリオ州 エル６ワイ ２ケー９，ブランプトン バンティング クレセント ３８

(72)発明者　スギマン－マランゴス，セイジ
カナダ国 オンタリオ州 エム４ケー １ワイ２，トロント フルトン アベニュー １５９

Ｆターム（参考）　4H045　AA10 AA11 BA09 BA41 BA72 CA11 DA50 DA75 EA20 FA74