(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-505948
(P2024-505948A)
(43)公表日　令和6年2月8日(2024.2.8)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/31 (2006.01)		C12N	15/31		4B064
C07K 14/30 (2006.01)		C07K	14/30	ZNA	4B065
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00		4C084
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z	4C085
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z	4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全124頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-546323(P2023-546323)
(86)(22)出願日　令和4年2月3日(2022.2.3)
(85)翻訳文提出日　令和5年9月29日(2023.9.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/015127
(87)国際公開番号　WO2022/169984
(87)国際公開日　令和4年8月11日(2022.8.11)
(31)優先権主張番号　63/145,188
(32)優先日　令和3年2月3日(2021.2.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　514299550
ザ ユニバーシティ オブ ノース カロライナ アット チャペル ヒル
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７５１６， チャペル ヒル，チャーチ ストリート １０９
(74)代理人　100113376
弁理士　南条 雅裕
(74)代理人　100179394
弁理士　瀬田 あや子
(74)代理人　100185384
弁理士　伊波 興一朗
(74)代理人　100137811
弁理士　原 秀貢人
(72)発明者　アスキュー チャールズ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　タンパク質M類似体及び融合タンパク質、並びに抗体機能を阻害するためのそれらの使用

(57)【要約】
本発明は、抗体を結合させるための方法及び組成物に関する。方法は、抗体を単離するため、過剰な抗体と関連する障害を治療するため、自己免疫性又は炎症性応答を止めるために抗体を急性的にブロックするため、及び中和抗体を阻害するために使用され得る。実施形態において、本発明は、異種薬剤が対象に投与される場合に、異種薬剤に対する中和抗体を阻害する方法であって、有効量のマイコプラズマタンパク質M又はその機能的断片若しくは誘導体を対象に投与し、それによって異種薬剤の中和を阻害することを含む、方法に関する。本発明は更に、野生型タンパク質Mと比較して増加した熱安定性を有する修飾マイコプラズマタンパク質M又はその機能的断片、及び本発明の方法におけるそれらの使用に関する。
【選択図】図１

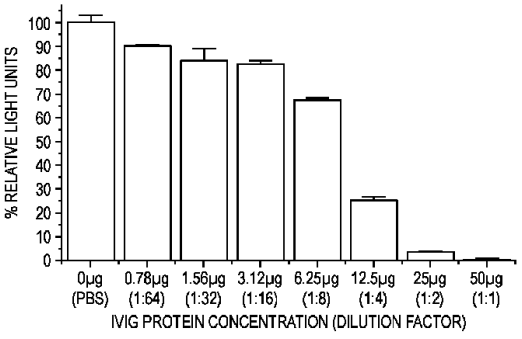


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片であって、野生型マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片と比較して、前記マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片のｐＨ安定性又は熱安定性を増加又は維持する１つ以上のアミノ酸変異を有し、熱安定性が、最大７５度、７０度、６５度、６０度、５５度、５０度、４５度、４０度、若しくは３８度で維持され、かつ／又はｐＨ安定性が、ｐＨ２～８、ｐＨ２．５～７．５、若しくはｐＨ４．５～７．５で維持される、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項２】
野生型マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片と比較して、前記マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくは機能的断片のｐＨ安定性又は熱安定性を増加させる１つ以上のアミノ酸変異を有する、請求項１に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項３】
前記タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体が、タンパク質Ｍ断片である、請求項１又は２に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項４】
Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ、又はＭｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓのタンパク質Ｍに由来する、請求項１～３のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項５】
前記タンパク質Ｍの機能的断片が、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）のアミノ酸残基１７～５３７、３７～５５６、３７～４８２、３７～４６８、３７～４４２、７４～４６８、７４～４７９、７４～４８２、７４～４６８、若しくは７４～４４２、又は別のタンパク質Ｍからの同等の残基を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項６】
Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号３）の約残基７４～約残基４７９、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基の断片である、請求項１～５のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項７】
前記１つ以上の変異が、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の残基７７、１２５、１６５、１７０、及び２８０、又はそれらの任意の組み合わせにある、請求項１～６のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項８】
前記１つ以上の変異が、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）のＡ７７Ｅ、Ｋ１２５Ｒ、Ｖ１６５Ｑ、Ｈ１７０Ｔ、及びＡ２８０Ｖ、又はそれらの任意の組み合わせである、請求項７に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項９】
前記１つ以上の変異が、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の
ａ）１５９、
ｂ）１８２、
ｃ）１０２、
ｄ）１６１、
ｅ）８６、

ｆ）１０１、
ｇ）１４７、
ｈ）２３６、
ｉ）３４８、
ｊ）４２４、
ｋ）１４７、
ｌ）３２１、
ｍ）３８９、
ｎ）４４２、
ｏ）１１９、
ｐ）１７９、
ｑ）１８６、若しくは
ｒ）１０３
、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせから選択される残基にある、請求項１～６のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項１０】
前記１つ以上の変異が、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の
ａ）Ｑ１５９Ｃ及びＡ１８２Ｃ、
ｂ）Ａ１０２Ｃ及びＴ１６１Ｃ、若しくは
ｃ）Ｉ８６Ｃ及びＦ１０１Ｃ
、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせから選択され、前記ａ）、ｂ）、又はｃ）の修飾残基が、前記修飾残基間にジスルフィド結合を形成することができる（例えば、配列番号３４）、請求項９に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項１１】
前記１つ以上の変異が、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の
ａ）Ｈ１４７Ｙ、
ｂ）Ｈ２３６Ｙ、
ｃ）Ｈ３４８Ｙ、
ｄ）Ｈ４２４Ｙ、若しくは
ｅ）Ｈ１４７Ｑ
、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせから選択され、前記変異が、低ｐＨでのその部位でのヒスチジンプロトン化を防ぎ、それによってタンパク質不安定化を防ぐことができる、請求項９に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項１２】
前記１つ以上の変異が、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の
ａ）Ｎ３２１Ｈ、
ｂ）Ｙ３８９Ｈ、
ｃ）Ｎ４４２Ｈ、
ｄ）Ｐ１１９Ｈ、
ｅ）Ｔ１７９Ｈ、
ｆ）Ｇ１８６Ｈ、若しくは
ｇ）Ｎ１０３Ｈ
、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせから選択され、前記変異が、ｐＨ感受性を増加させ、それによって抗体精製の溶出条件を改善することができる、請求項９に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。
【請求項１３】

前記変異が、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の残基３３８（例えば、Ｙ３８８Ｎ）、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基にある、請求項１～６のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。

【請求項１４】

前記修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片が、１つ以上のグリコシル化部位を除去するために更に修飾される、請求項１～１３のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。

【請求項１５】

Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の約残基１８５～約残基３４２、又は別のマイコプラズマタンパク質Ｍの同等の残基の欠失を有する、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。

【請求項１６】

前記欠失が、アミノ酸１８５～３４２である、請求項１５に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。

【請求項１７】

欠失した前記アミノ酸が、短いリンカーによって置換される、請求項１５又は１６に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。

【請求項１８】

新たに露出した疎水性残基が、１つ以上の変異を有する、請求項１５～１７のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片。

【請求項１９】

融合タンパク質であって、

請求項１～１８のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片と、

リンカーと、

ペプチドと、を含む、融合タンパク質。

【請求項２０】

前記修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片が、抗体に対する前記修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片の親和性又は結合力を増強する１つ以上の変異を有する、請求項１９に記載の融合タンパク質。

【請求項２１】

前記ペプチドが、二量体化ペプチド（例えば、ＩＬ－ＧＣＮ４、Ｃ－ＩＬ－ＧＣＮ４、配列番号３６）である、請求項１９又は２０に記載の融合タンパク質。

【請求項２２】

前記ペプチドが、Ｆａｂ結合ポリペプチド又はＦｃ結合ポリペプチドである、請求項１９又は２０に記載の融合タンパク質。

【請求項２３】

前記Ｆａｂ結合ポリペプチドが、プロテインＬである、請求項２２に記載の融合タンパク質。

【請求項２４】

前記Ｆａｂ結合ポリペプチド又はＦｃ結合ポリペプチドが、プロテインＡ又はその機能的断片である、請求項２２に記載の融合タンパク質。

【請求項２５】

前記融合タンパク質が、免疫グロブリンのＦｃ部分と結合し、かつ／又は前記免疫グロブリンのＦｃ受容体リサイクリングを減少させ、かつ／又は前記融合タンパク質の免疫グロブリンとの結合を増加させる、請求項２４に記載の融合タンパク質。

【請求項２６】

前記Ｆａｂ結合ポリペプチド又はＦｃ結合ポリペプチドが、プロテインＧ又はその機能的断片である、請求項２２に記載の融合タンパク質。

【請求項２７】
前記融合タンパク質が、免疫グロブリンのＦｃ部分と結合し、かつ／又は前記免疫グロブリンのＦｃ受容体リサイクリングを減少させ、かつ／又は前記融合タンパク質の免疫グロブリンとの結合を増加させる、請求項２６に記載の融合タンパク質。
【請求項２８】
前記ペプチドが、二量体化ペプチド及びプロテインＬを含む、請求項１９又は２０に記載の融合タンパク質。
【請求項２９】
前記融合タンパク質が、Ｎ末端から始まり、二量体化ペプチド、第１のリンカー、プロテインＬ、第２のリンカー、及び請求項１～１８のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片を順に含む、請求項２８に記載の融合タンパク質。
【請求項３０】
前記ペプチドが、Ｆｃ結合ポリペプチドである、請求項１９又は２０に記載の融合タンパク質。
【請求項３１】
前記Ｆｃ結合ポリペプチドが、Ｆｃ受容体である、請求項１９又は２０に記載の融合タンパク質。
【請求項３２】
前記ペプチドが、Ｆａｂ結合ポリペプチド及びプロテインＬを含む、請求項１９又は２０に記載の融合タンパク質。
【請求項３３】
前記融合タンパク質が、Ｎ末端から始まり、Ｆｃ結合ポリペプチド、第１のリンカー、プロテインＬ、第２のリンカー、及び請求項１～１８のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片を順に含む、請求項３２に記載の融合タンパク質。
【請求項３４】
前記ペプチドが、Ｆｃドメインである、請求項１９又は２０に記載の融合タンパク質。
【請求項３５】
前記Ｆｃドメインが、Ｆｃ受容体と結合するための補体結合残基を含む、請求項３４に記載の融合タンパク質。
【請求項３６】
前記Ｆｃドメインが、Ｆｃ受容体と結合するための補体結合残基の１つ以上の変異を有する、請求項３５に記載の融合タンパク質。
【請求項３７】
前記ペプチドが、Ｆｃ受容体タンパク質であり、前記融合タンパク質が、抗体の細胞取り込みを減少させ、抗体リサイクリングを減少させ、抗体リサイクリングの減少により免疫グロブリン枯渇を引き起こすか、又は免疫グロブリンに対する前記融合タンパク質の親和性を増加させる、請求項１９又は２０に記載の融合タンパク質。
【請求項３８】
請求項１～１８のいずれか一項に記載の第２の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片を更に含む、請求項１９～３７のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３９】
半減期延長部分、例えば、ヒトアルブミン若しくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）の添加、タンパク質修飾、例えば、アシル化、メチル化、リン酸化、硫酸化、ファルネシル化、ユビキチン化、部位選択的結合、グリコシル化、ＰＴＭの導入、ＰＥＧ化、ライゲーション、タンパク質系開始剤の重合、又は結合、親和性、結合標的、若しくはそれらの任意の組み合わせを変更し得る任意の修飾を更に含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片、又は請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項４０】

請求項１～１８のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片、又は請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。
【請求項４１】
プロモーターと作動可能に連結されている、請求項４０に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４２】
前記プロモーターが、細菌プロモーターである、請求項４１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４３】
前記プロモーターが、哺乳動物プロモーターである、請求項４１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４４】
前記ポリヌクレオチドが、Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌における発現のためにコドン最適化されている、請求項４０～４３のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４５】
前記ポリヌクレオチドが、ヒト細胞などの哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項４０～４３のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４６】
前記ポリヌクレオチドが、Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌及びヒト細胞などの哺乳動物細胞の両方における発現のためにコドン最適化されている、請求項４０～４３のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４７】
請求項４０～４６のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。
【請求項４８】
前記ベクターが、細菌ベクターである、請求項４７に記載のベクター。
【請求項４９】
前記ベクターが、哺乳動物ベクターである、請求項４７に記載のベクター。
【請求項５０】
請求項４０～４６のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、及び／又は請求項４７～４９のいずれか一項に記載のベクターを含む、形質転換細胞。
【請求項５１】
Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌細胞である、請求項５０に記載の形質転換細胞。
【請求項５２】
ヒト細胞などの哺乳動物細胞である、請求項５０に記載の形質転換細胞。
【請求項５３】
前記ポリヌクレオチドが、前記細胞のゲノムに安定して組み込まれる、請求項５０～５２のいずれか一項に記載の形質転換細胞。
【請求項５４】
対象への異種薬剤の投与時に抗体を中和することによって前記異種薬剤の中和を阻害する方法であって、有効量の請求項１～１８のいずれか一項に記載のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質を前記対象に投与し、それによって前記異種薬剤の中和を阻害することを含む、方法。
【請求項５５】
前記異種薬剤が、核酸送達ベクターである、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記核酸送達ベクターが、ウイルスベクターである、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記ウイルスベクターが、腫瘍溶解性ベクターである、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ポリオウイルス、又はアデノウイルスベクターである、請求項５６に記載の方法。

【請求項５９】

前記核酸送達ベクターが、非ウイルスベクターである、請求項５５に記載の方法。

【請求項６０】

前記非ウイルスベクターが、プラスミド、リポソーム、荷電脂質、核酸－タンパク質複合体、又は生体高分子（例えば、ＰＥＧ）である、請求項５９に記載の方法。

【請求項６１】

前記異種薬剤が、遺伝子編集複合体である、請求項５４に記載の方法。

【請求項６２】

前記遺伝子編集複合体が、ＣＲＩＳＰＲ複合体である、請求項６１に記載の方法。

【請求項６３】

前記異種薬剤が、タンパク質又は核酸である、請求項５４に記載の方法。

【請求項６４】

前記タンパク質が、酵素である、請求項６３に記載の方法。

【請求項６５】

前記核酸が、アンチセンス核酸又は阻害性ＲＮＡである、請求項６３に記載の方法。

【請求項６６】

前記有効量のタンパク質Ｍが、中和を少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８、９９％、９９．５％、又は９９．９％阻害するのに十分な量である、請求項５４～６５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６７】

前記有効量のタンパク質Ｍが、モルベースで約０．５：１～約５：１、例えば、約２：１の前記対象におけるタンパク質Ｍの総免疫グロブリンに対する比を生成するのに十分な量である、請求項５４～６６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６８】

前記タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは前記融合タンパク質が、前記異種薬剤の投与前（例えば、約１分～約３日前、約５分～約４８時間前、約１０分～約２４時間前、約２０分～約１２時間前、約３０分～約６時間前、又は約１時間～約３時間前）に前記対象に投与される、請求項５４～６７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６９】

前記タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは前記融合タンパク質が、前記異種薬剤の投与と同時に前記対象に投与される、請求項５４～６７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７０】

前記異種薬剤が、前記対象への投与前に、前記タンパク質Ｍ、又はその断片若しくは誘導体、あるいは前記融合タンパク質と組み合わされる、請求項６９に記載の方法。

【請求項７１】

前記タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体が、前記対象へ１回よりも多く投与される、請求項５４～７０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７２】

第２の用量が、第１の用量の約２日後～約１０年以上後に投与される、請求項７１に記載の方法。

【請求項７３】

前記タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体が、前記異種薬剤が前記対象に投与されるときに毎回、前記対象に投与される、請求項７１に記載の方法。

【請求項７４】

同じタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体が、毎回投与される、請求項７１～７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５】
異なるタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体が、毎回投与される、請求項７１～７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６】
前記対象における抗体濃度を低減させるための追加の治療を前記対象に施すことを更に含む、請求項５４～７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７】
前記追加の治療が、血漿交換、抗体消化酵素、例えば、ＩｄｅＳ若しくはＩｄｅＺの投与、ＦｃＲｎ受容体と結合する抗体の投与、ＦｃＲｎ受容体と結合するＦｃ断片の投与、Ｂ細胞上のＣＤ１９と結合して、若しくはＣＤ２０と結合してそれらを枯渇させる抗体の投与、又は他のＢ細胞枯渇方法、例えば、脾臓摘出術、化学療法、免疫療法、若しくは放射線療法である、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
前記追加の治療が、前記タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体の投与前、投与中、及び／又は投与後に施される、請求項７６又は７７に記載の方法。
【請求項７９】
前記投与が、局所的である、請求項５４～７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８０】
前記投与が、全身的である、請求項５４～７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８１】
前記投与が、抗体サイクリングの量を減少させ、前記減少の開始が、約５分～約８週、約５分～約１時間、約１時間～約２日、又は約２日～約８週である、請求項５４～８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８２】
前記投与が、抗体サイクリングの量を減少させ、前記減少の開始が、約１時間～約３時間である、請求項５４～８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８３】
前記投与が、約１ｅ９ｖｇ／ｋｇ～約１ｅ１４ｖｇ／ｋｇ、約１ｅ１０ｖｇ／ｋｇ～約１ｅ１３ｖｇ／ｋｇ、又は約１ｅ１１ｖｇ／ｋｇ～約１ｅ１２ｖｇ／ｋｇのＡＡＶ、約１μｌ～約６Ｌの血清、及び約１ｍｇ／ｋｇ～約１０００ｍｇ／ｋｇ、約１０ｍｇ／ｋｇ～約９００ｍｇ／ｋｇ、約２５ｍｇ／ｋｇ～約８００ｍｇ／ｋｇ、約５０ｍｇ／ｋｇ～約６００ｍｇ／ｋｇ、約１００ｍｇ／ｋｇ～約５００ｍｇ／ｋｇ、又は約２００ｍｇ／ｋｇ～約４００ｍｇ／ｋｇのタンパク質Ｍを含む、請求項５４～８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８４】
前記投与が、タンパク質Ｍの血清免疫グロブリンに対する約０．５：１～約５０：１のモル比を達成するのに十分なタンパク質Ｍを含む、請求項５４～８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８５】
前記投与が、自己中和抗体に勝る、請求項５４～８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６】
対象においてポリペプチド又は機能的核酸を発現させる方法であって、（ａ）前記ポリペプチド又は機能的核酸をコードする核酸送達ベクターと、（ｂ）有効量の請求項１～１８のいずれか一項に記載のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質と、を前記対象に投与し、それによって前記対象において前記ポリペプチド又は機能的核酸を発現させること、を含む、方法。
【請求項８７】

障害を治療することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、前記障害が、前記対象においてポリペプチド又は機能的核酸を発現させることによって治療可能であり、（ａ）治療有効量の前記ポリペプチド又は機能的核酸をコードする核酸送達ベクターと、（ｂ）有効量の請求項１～１８のいずれか一項に記載のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質と、を前記対象に投与し、それによって前記対象の前記障害を治療することを含む、方法。

【請求項８８】

対象の遺伝子を編集する方法であって、（ａ）有効量の遺伝子編集複合体と、（ｂ）有効量の請求項１～１８のいずれか一項に記載のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質と、を前記対象に投与し、それによって前記対象において前記ポリペプチド又は機能的核酸を発現させることを含む、方法。

【請求項８９】

自己免疫疾患を治療することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、治療有効量の請求項１～１８のいずれか一項に記載のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質を前記対象に投与し、それによって前記自己免疫疾患を治療することを含む、方法。

【請求項９０】

過剰な抗体と関連する障害を治療することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、治療有効量の請求項１～１８のいずれか一項に記載のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質を前記対象に投与し、それによって前記過剰な抗体と関連する障害を治療することを含む、方法。

【請求項９１】

前記過剰な抗体と関連する障害が、多発性骨髄腫、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症（ＭＧＵＳ）、ワルデンストレームマクログロブリン血症、サイトカイン放出症候群、又は急性自己免疫攻撃、例えば、突然発症する重度の自己免疫性血管炎である、請求項９０に記載の方法。

【請求項９２】

レシピエント抗体による移植の認識と関連する固形臓器の急性移植拒絶反応を予防及び／又は治療することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、治療有効量の請求項１～１８のいずれか一項に記載のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質を前記移植前及び／又は移植後に前記対象に投与し、それによって前記急性移植拒絶反応を治療することを含む、方法。

【請求項９３】

前記マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体が、経口、直腸、経粘膜、鼻腔内、吸入、口腔（例えば舌下）、膣、髄腔内、眼球内、硝子体内、蝸牛内、経皮、内皮内、子宮内（又は胚内）、非経口（例えば、静脈内、皮下、皮内、頭蓋内、筋肉内［骨格筋、横隔膜及び／又は心筋への投与を含む］、胸膜内、脳内、及び関節内）、局所（例えば、皮膚及び粘膜表面（気道表面を含む）の両方、及び経皮投与）、リンパ内など、並びに直接的な組織又は臓器注入（例えば、肝臓、眼、骨格筋、心筋、横隔膜筋又は脳）から選択される経路によって、前記対象へ投与される、請求項５４～９２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９４】

前記マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体が、骨格筋、平滑筋、心臓、横隔膜、気道上皮、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、皮膚、肺、耳、又は眼へ投与される、請求項５４～９２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９５】
前記マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体が、病変組織又は臓器へ投与される、請求項５４～９４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９６】
前記対象が、ヒトである、請求項５４～９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７】
試料から抗体軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変領域を含む化合物を単離する方法であって、前記方法が、前記化合物を、固体支持体に付着した請求項１～１８のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片、又は請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質と接触させ、次いで、前記化合物を前記修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片、又は融合タンパク質から溶出することを含む、方法。
【請求項９８】
抗体軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変領域を含む前記化合物が、抗体又はその抗原結合断片である、請求項９７に記載の方法。
【請求項９９】
前記固体支持体が、ビーズ又は粒子である、請求項９７又は９８に記載の方法。
【請求項１００】
前記固体支持体が、アガロース、ポリアクリルアミド、デキストラン、セルロース、多糖類、ニトロセルロース、シリカ、アルミナ、酸化アルミニウム、チタニア、酸化チタン、ジルコニア、スチレン、ポリビニルジフルオリドナイロン、スチレン及びジビニルベンゼンのコポリマー、ポリメタクリレートエステル、誘導体化アズラクトンポリマー若しくはコポリマー、ガラス、又はセルロースを含む、請求項９７～９９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０１】
前記化合物が、ｐＨの変化によって溶出される、請求項９７～１００のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０２】
固体支持体に付着した、請求項１～１８のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片、又は請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項１０３】
免疫測定法を実施する方法であって、前記方法が、請求項１～１８のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片、又は請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質を使用して、抗体軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変領域を含む化合物と結合させることを含む、方法。
【請求項１０４】
前記免疫測定法が、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）アッセイ、酵素免疫測定法（ＥＩＡ）、サンドイッチアッセイ、ゲル拡散沈殿反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、免疫蛍光アッセイ、蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）アッセイ、免疫組織化学アッセイ、プロテインＡ免疫測定法、プロテインＧ免疫測定法、プロテインＬ免疫測定法、ビオチン／アビジンアッセイ、ビオチン／ストレプトアビジンアッセイ、免疫電気泳動アッセイ、沈殿／フロキュレーション反応、免疫ブロット（ウエスタンブロット；ドット／スロット・ブロット）；免疫拡散アッセイ；リポソーム免疫測定法、化学発光アッセイ、ライブラリスクリーニング、発現アレイ、免疫沈降、競合結合アッセイ、及び免疫組織化学染色から選択される、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０５】
請求項１～１８のいずれか一項に記載の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片、又は請求項１９～３８のいずれか一項に記載の融合タンパク質、又は請求項１０２に記載の固体支持体を含む、キット。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
優先権の陳述
本出願は、２０２１年２月３日に出願された米国仮出願第６３／１４５，１８８号の利益を主張し、その内容全体は参照により本明細書中に援用される。
【０００２】
本発明は、抗体を結合させるための方法及び組成物に関する。方法は、抗体を単離するため、過剰な抗体と関連する障害を治療するため、自己免疫性又は炎症性応答を止めるために抗体を急性的にブロックするため、及び中和抗体を阻害するために使用され得る。実施形態において、本発明は、異種薬剤が対象に投与される場合に、異種薬剤に対する中和抗体を阻害する方法であって、有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を対象に投与し、それによって異種薬剤の中和を阻害することを含む、方法に関する。本発明は更に、野生型タンパク質Ｍと比較して増加した熱安定性を有する修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、及び本発明の方法におけるそれらの使用に関する。
【背景技術】
【０００３】
米国内の約１０人に１人が稀な遺伝子疾患を患っており、寿命、生活の質、自立、及び経済情勢に重大な影響を及ぼし得る。遺伝子療法は、遺伝性疾患を矯正するための処置の最も有望な形態である。遺伝子療法の中でも、送達ビヒクル、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターが、非常に多くの臨床試験において治療的効果を示している。最初にＦＤＡが承認した遺伝子療法は盲目患者で用いられている。ＡＡＶ遺伝子療法に関する臨床試験数は、長期の治療的遺伝子発現に関し、その安全性及び多くの異なるタイプの臓器の標的化における成功に起因して実質的に増えている。臨床的な成功にもかかわらず、ＡＡＶが介在する遺伝子送達に対する主な障壁は、標的組織のベクター形質導入をブロックする中和抗体（ＮＡｂ）の高い出現率である。一般集団の９０％よりも多くが、自然感染を介してＡＡＶに曝露されており、５０％よりも多くの人が、ＡＡＶに対するＮＡｂに関して血清陽性である。ＮＡｂは治療的有効性を著しく減衰させ、成果の変動性を生じさせるので、臨床試験スクリーニング中の特定の閾値を超える既存のＮＡｂの同定は、患者の登録を不適格にさせる。
【０００４】
ＡＡＶ　ＮＡｂを克服するために、いくつかのアプローチ：連続的な血漿交換、免疫抑制薬、及び、免疫エピトープを除去するためのベクターカプシドの変更が採用されている。血漿交換は非効率であり、セッションごとに残存するＮＡｂの２～３倍を取り出す複数回を要し、低力価のＮＡｂしか対処することができない。また、血漿交換は時間がかかり、同時の抗体欠乏及び繰り返しの静脈内の針曝露を介して患者を院内感染の伝染リスクに曝す。Ｂ細胞を死滅化させるためのステロイド又は薬理学的免疫抑制は重大な健康リスクを有しており、ＮＡｂを更に１０倍減少させるためには長期のレジメンを必要とする。ＡＡＶカプシド工学は革新的な方法であるが、ポリクローナル抗ＡＡＶ血清に対しては最終的に不十分であり、抗体エスケープのわずか１０倍の増加がインビボで観察される。更に、ＮＡｂ認識エピトープを変更するためのカプシド構造の修飾は、これらの変更された表面領域は多機能性であるので、典型的に、強力でないベクター及び不完全なベクターの産生をもたらす。現在のアプローチは、臨床試験除外に関して設定された典型的な閾値を超える既存の抗ＡＡＶ　ＮＡｂをうまく克服せず、又は同じＡＡＶベクターの繰り返し投与を可能にしない。
【０００５】
マイコプラズマタンパク質Ｍは、非特異的に抗体と結合し、抗原と抗体が結合する能力をブロックすることが可能であるとして同定されている（米国特許第９，５９３，１５０号；米国公開第２０１７／０３２０９２１号）。

【０００６】
本発明は、抗体結合に基づいてＮａｂを普遍的にブロックするベクター非依存性タンパク質に基づく方法、並びに他の方法及び組成物を提供することによって、当該技術分野における欠点を克服する。
【発明の概要】
【０００７】
本発明は、ＮＡｂを普遍的にブロックするためのベクター非依存性のタンパク質に基づく方法の開発及び当該方法が広範囲の既存のＮＡｂ濃度に対して効果的であるという実証に部分的に基づく。本発明は、異種薬剤（例えば、ＡＡＶベクター）を対象へ投与した際のＮＡｂによる異種薬剤の中和を防止することにより成功的な遺伝子送達を可能にするために、独特なマイコプラズマ由来タンパク質及びその類似体（タンパク質Ｍと呼ばれる）の使用を開拓する。タンパク質Ｍは、抗体軽鎖及び重鎖上の保存領域に普遍的に結合して、抗原認識ＣＤＲ領域と構造的干渉を生じさせることにより、種及び抗原に依存しない様式で哺乳動物のＩｇＧ、ＩｇＭ、及びＩｇＡ抗体クラスをブロックすることが示された。タンパク質Ｍは、ナノモルの親和性で抗体と結合し、様々な異なる試験された免疫グロブリン／抗原ペアに関して抗原抗体結合を妨げる。本発明者らは、タンパク質Ｍが抗体によるＡＡＶの認識をブロックすること、及び抗体が介在するＡＡＶの中和を防止することを見出した。ＮＡｂからエスケープするＡＡＶベクターのレベルは、ＮＡｂ力価及び体積、タンパク質Ｍの量、及びＡＡＶの量に比例することが示された。タンパク質Ｍが介在するＮＡｂエスケープは、ヒト血清（ＩＶＩＧ）及びＡＡＶ免疫化マウス由来の血清を用いてインビトロ及びインビボで確認された。タンパク質Ｍは、ＮＡｂ回避のために、ＡＡＶ投与の前に単独で投与することができ、又はＡＡＶとともに製剤化することができることが示された。このアプローチの有効性は、ＡＡＶが中和される前の免疫グロブリンとタンパク質Ｍの相互作用に依存する。このアプローチは、特有の遺伝子療法適用のための各薬剤の独特又は有益な特性を維持しながら、複数の異種薬剤（例えば、ＡＡＶベクター血清型）に対するＮＡｂを克服するために用いることができる。
【０００８】
本発明は更に、自己免疫障害の治療、過剰抗体と関連する障害の治療、抗体を単離する方法、及び免疫測定法を行う方法を含む、抗体と結合することが有益である他の方法におけるタンパク質Ｍの使用に関する。
【０００９】
本発明は更に、本発明の方法をインビボ又は高温で実施するために増加した熱安定性及び／又は他の有利な特性（例えば、野生型マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片と比較して増加又は維持されたｐＨ安定性）を有する修飾タンパク質Ｍタンパク質に関する。
【００１０】
したがって、本発明の一態様は、野生型マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片と比較して、マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片の熱安定性及び／又はｐＨ安定性を増加又は維持する１つ以上のアミノ酸変異を有する、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片に関する。いくつかの実施形態において、熱安定性は、最大７５℃、７０℃、６５℃、６０℃、５５℃、５０℃、４５℃、４０℃、若しくは３８℃で維持され、かつ／又はｐＨ安定性は、ｐＨ２～８、ｐＨ２．５～７．５、若しくはｐＨ４．５～７．５に維持される。
【００１１】
本発明の別の態様は、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片と、リンカーと、ペプチドと、を含む、融合タンパク質に関する。
【００１２】
本発明の更なる一態様は、本発明の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片をコードするポリヌクレオチド及びそれを含むベクター又は形質転換された細胞に関する。

【００１３】
本発明の別態様は、対象への異種薬剤の投与時に抗体を中和することによって異種薬剤の中和を阻害する方法であって、有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を対象に投与し、それによって異種薬剤の中和を阻害することを含む、方法に関する。
【００１４】
本発明の更なる態様は、対象においてポリペプチド又は機能的核酸を発現させる方法であって、（ａ）ポリペプチド又は機能的核酸をコードする核酸送達ベクターと、（ｂ）有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体と、を対象に投与し、それによって対象においてポリペプチド又は機能的核酸を発現させること、を含む、方法に関する。
【００１５】
本発明の更なる態様は、障害を治療することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、障害が、対象においてポリペプチド又は機能的核酸を発現させることによって治療可能であり、（ａ）治療有効量のポリペプチド又は機能的核酸をコードする核酸送達ベクターと、（ｂ）有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体と、を対象に投与し、それによって対象の障害を治療することを含む、方法に関する。
【００１６】
本発明の別の態様は、対象の遺伝子を編集する方法であって、（ａ）遺伝子編集複合体と、（ｂ）有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体と、を対象に投与し、それによって対象においてポリペプチド又は機能的核酸を発現させることを含む、方法に関する。
【００１７】
本発明の更なる態様は、自己免疫疾患を治療することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を対象に投与し、それによって自己免疫疾患を治療することを含む、方法に関する。
【００１８】
本発明の更なる態様は、過剰な抗体と関連する障害を治療することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、治療有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を対象に投与し、それによって過剰な抗体と関連する障害を治療することを含む、方法に関する。本発明の別の態様は、レシピエント抗体による移植の認識と関連する固形臓器の急性移植拒絶反応を治療及び／又は予防することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、治療有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を移植前及び／又は移植後に対象に投与し、それによって急性移植拒絶反応を治療することを含む、方法に関する。
【００１９】
本発明の別の態様は、試料から抗体軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変領域を含む化合物を単離する方法であって、方法が、化合物を、固体支持体に付着した本発明の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片と接触させ、次いで、化合物を修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片から溶出することを含む、方法に関する。
【００２０】
本発明の更なる態様は、免疫測定法を実施する方法であって、方法が、本発明の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片を使用して、抗体軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変領域を含む化合物と結合させることを含む、方法に関する。
【００２１】
本発明の更なる態様は、本発明の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片を含む、キットに関する。
【００２２】

本発明のこれら及び他の態様は、以下の本発明の説明においてより詳細に示される。

【図面の簡単な説明】

【００２３】

【図１】ヒトＩＶＩＧが、用量依存的にＡＡＶ形質導入を阻害するＡＡＶ中和抗体を含むことを示す。ヒトＩＶＩＧの２倍希釈比を用いてＡＡＶ２中和プロットを作成した。５０μｇで始めて、ＩＶＩＧを１μｇ未満まで段階的に希釈して、各希釈物をＡＡＶ２－ルシフェラーゼの２×１０^{8}ウイルスゲノムと４℃で１時間インキュベートした後に、各ウェルに播種した。ＡＡＶ２導入遺伝子発現によって生じる発光レポーターシグナルは、ＡＡＶ形質導入の関数的読み取り値であり、培養ＨＥＫ－２９３細胞を形質導入するのに利用できたＡＡＶの量に比例する。この実験では、４８ウェルプレートの各ウェルに１×１０^{5}細胞を播種して、血清フリー培地中２，０００のＭＯＩで形質導入した（条件当たりｎ＝３の技術的レプリケート）。ルシフェラーゼ活性の測定を形質導入の４８時間後にプレートリーダー上で細胞溶解及びルシフェリンの添加後に行った。所定のＩＶＩＧ量に関して中和されたＡＡＶの割合間の関係は、１２．５μｇのＩＶＩＧにおいて、同等の容量のリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を含むＩＶＩＧなし対照と比較して、７２％（＋／－１．３％）の中和であると決定された。更に、２５μｇのＩＶＩＧはＡＡＶ２の９６％（±０．２％）を中和し、５０μｇのＩＶＩＧは９９％（±０．１７％）を中和した。

【図２】タンパク質ＭがヒトＩＶＩＧに存在する中和抗体からＡＡＶを保護することを示す。前の図で２ｘ１０^{8}ｖｇの用量で約７０％のＡＡＶ２を中和することが確立された１２．５μｇのＩＶＩＧを使用し、抗体媒介中和からのエスケープをタンパク質Ｍの２倍希釈比を使用して調査した。この場合では、１分子のＩｇＧに対して８分子のタンパク質Ｍのモル比で実験を始め、それは、１分子のＩｇＧが、完全な抗体不活性化のために占有されるべきであるタンパク質Ｍ結合部位を２個有することを考慮すると、４倍過剰のタンパク質Ｍである。各ウェルにおいて、ＩＶＩＧを最初に個々のタンパク質Ｍ希釈物と４℃で１時間インキュベートし、続いてＡＡＶ２－ルシフェラーゼ（２×１０^{8}ｖｇ）を添加し、４℃で更に１時間インキュベートした。次いで、ＨＥＫ－２９３細胞（１×１０^{5}）をウェルに加え、４８時間インキュベートした後、ルシフェラーゼレポーターシグナルを測定した。ＩＶＩＧを含むがタンパク質Ｍを含まないウェルは、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を含むＩＶＩＧなし対照ウェルと比較して、ＡＡＶシグナルの約６８％（＋／－３．３％）減少を示した。しかしながら、タンパク質Ｍは、２：１よりも高いモル比で、ＡＡＶの中和を用量依存的にブロックし、中和を完全に防止したが（ＩＶＩＧなし対照の１０８％～１９３％）、１：１又は０．５：１の比は部分的にのみ中和をブロックした（それぞれＩＶＩＧなし対照の５２％及び４０％）。更に、８：１及び４：１の比率で、ＩＶＩＧなし対照よりもＡＡＶルシフェラーゼシグナルの用量依存的な増加が観察された。全てのウェルを、４８ウェルプレート中の血清フリー培地（条件当たりｎ＝３の技術的レプリケート）においてトリプリケートで行い、ルシフェラーゼシグナルを形質導入の４８時間後に測定した。

【図３】過剰なタンパク質Ｍが、８：１よりも高いモル比では、ＮＡｂからの更なる保護をほとんど提供しないこと、及びタンパク質ＭがＡＡＶ形質導入を高めることを示す。ＡＡＶの形質導入を保護又は高めるタンパク質Ｍモル比の上限を確立する試みにおいて、中和抗体の条件とともに又は伴わずに、ＮＡｂエスケープアッセイを、８：１又は２０：１のモル比で繰り返した。１２．５μｇのＩＶＩＧの添加は、ＩＶＩＧなしＰＢＳ対照ウェルと比較して、８０％（＋／－２．６％）のＡＡＶ２－ルシフェラーゼシグナルを中和した。前の実験と同様に、１２．５μｇのＩＶＩＧ（８：１モル比、３３μｇのタンパク質Ｍ）で４℃で１時間、続いてＡＡＶと４℃で１時間インキュベーションしたタンパク質Ｍは、ＡＡＶ中和を防止し、ＰＢＳを用いたＩＶＩＧなし対照の１９４％（＋／－２４％）までルシフェラーゼシグナルを増強した。ＮＡｂエスケープに必要なタンパク質Ｍの量の１０倍では（２０：１モル比、７５μｇタンパク質Ｍ）、ＰＢＳを含むＩＶＩＧなし対照に対して２５６％（＋／－４４％）へと、ルシフェラーゼ活性のわずかな増加が観察された。ＩＶＩＧ存在下で、２０：１比のルシフェラーゼシグナルは、８：１比と統計的に違

いがなかった。更に、ＩＶＩＧなしでは、７５μｇ又は３３μｇのタンパク質Ｍを単独でＡＡＶ２－ルシフェラーゼと４℃で１時間インキュベートした場合、ルシフェラーゼシグナルの量に有意差はなく（それぞれ２０８％対２１６％）、ＰＢＳ対照と比較したルシフェラーゼシグナルの増加が、タンパク質Ｍに基づく増強に起因することが確認された。各ウェルに血清フリー培地中の1×10^{5}ＨＥＫ－２９３細胞を播種し、４８ウェルプレートのフォーマットにおいて２，０００のＭＯＩで形質導入した（ウェル条件当たりｎ＝３の技術的レプリケート）。

【図４】ＡＡＶ形質導入のタンパク質Ｍ増強が用量依存的であることを示す。３３μｇで始めて、２倍希釈比のタンパク質Ｍは、タンパク質ＭとＡＡＶ２－ルシフェラーゼのインキュベーションが、ＰＢＳ＋ＡＡＶ対照と比較してルシフェラーゼシグナルの増加をもたらすことを示す。ルシフェラーゼシグナルの増強は、2×10^{8}ウイルスゲノムに関して２μｇ未満のタンパク質Ｍの濃度において、すなわち、ゲノム含有ＡＡＶ２－ルシフェラーゼ１粒子に対して４０，０００分子のタンパク質Ｍのモル比においては消失する。増強は、2×10^{8}ベクター粒子に関して約３３μｇのタンパク質Ｍ、又はゲノム含有ＡＡＶ２－ルシフェラーゼ１粒子に対して約７００，０００分子のタンパク質Ｍで飽和し始める。タンパク質Ｍ希釈物を、形質導入前にＡＡＶとともに４℃で１時間インキュベートした。各ウェルに血清フリー培地中の1×10^{5}ＨＥＫ－２９３細胞を播種し、４８ウェルプレートのフォーマットにおいて２，０００のＭＯＩで形質導入した（ウェル条件当たりｎ＝３の技術的レプリケート）。

【図５】タンパク質Ｍに基づくＡＡＶ形質導入の増強が、ＡＡＶカプシドとタンパク質Ｍの直接的な相互作用に依存することを示す。３つの異なる条件を、ＡＡＶ２－ルシフェラーゼとともに試験した：形質導入前１時間（－１時間）のＡＡＶとタンパク質Ｍの事前インキュベーション、形質導入付近の時点（０時間）におけるＡＡＶへのタンパク質Ｍの添加、又はＡＡＶによる形質導入の１８時間後（１８時間）のウェルへのタンパク質Ｍの添加。タンパク質Ｍを含まない２つの陰性対照条件を使用した：ＡＡＶを単独で、細胞播種及び形質導入の前に細胞培養培地中で４℃にて１時間インキュベートし（事前インキュベーション及び形質導入付近の群における条件を表す）、又はＡＡＶをＰＢＳ中に希釈して、細胞播種及び形質導入の時点において細胞培養物へ添加した（形質導入後の群における条件を表す）。形質導入の１８時間後に、追加容量のＰＢＳをＰＢＳ対照群に添加して、同等容量のタンパク質Ｍが形質導入後の群に添加される条件を模した。タンパク質Ｍが形質導入付近又は形質導入後に添加されたウェルにおいてはＡＡＶルシフェラーゼシグナルの増強は見られなかったが、事前インキュベーションの群において用量依存的な増強が観察され、ＡＡＶとタンパク質Ｍの相互作用が増強メカニズムに必要であることが示された。全てのウェルには1×10^{5}Ｈｕｈ７細胞が播種され、各ウェルは2×10^{8}ｖｇのＡＡＶによって形質導入され、４８ウェルプレートのフォーマットにおいてウェル条件当たりｎ＝３の技術的レプリケートであった。

【図６】タンパク質Ｍは、ＮＡｂがカプシドと結合した後にＡＡＶ中和を防止しないことを示す。ＡＡＶ２－ルシフェラーゼをまず、異なる希釈度のＩＶＩＧとともに４℃で１時間インキュベートし、次いでタンパク質Ｍを添加し、４℃で更に１時間インキュベートした。二重陰性対照群はＡＡＶのみを受け、一方で陽性対照は、形質導入前にＡＡＶと４℃で１時間インキュベートした３３μｇのタンパク質Ｍを受けた。２００μｇ、５０μｇ、又は１２．５μｇを含む３つの異なる希釈のＩＶＩＧを用いた。ＩＶＩＧの希釈物とともにインキュベートされたＡＡＶのみを含むタンパク質Ｍ陰性対照群と比較して、３３μｇのタンパク質Ｍは、５０μｇ又は２００μｇのＩＶＩＧによって９９％のＡＡＶが既に中和されている場合は、中和後の増強又は中和抗体からのエスケープを可能にしない。しかしながら、１２．５μｇのＩＶＩＧがＡＡＶとともにインキュベートされる場合は、約３０％のベクターが中和されないままであり（図１、２、及び３を参照）、３３μｇのタンパク質Ｍは、ＡＡＶ及び１２．５μｇのＩＶＩＧを含むタンパク質Ｍ陰性対照ウェルと比較して、中和後のこの画分の形質導入を増強することができた。前の図とは異なり、ルシフェラーゼ測定は形質導入後わずか２４時間で行われ、１２．５μｇのＩＶＩＧ＋ＡＡＶ

を有する群によるルシフェラーゼシグナルが二重陰性対照の３０％未満である理由を説明することができる。各ウェルに血清フリー培地中の１×１０^{5}ＨＥＫ－２９３細胞を播種し、４８ウェルプレートのフォーマットにおいて２，０００のＭＯＩで形質導入した（ウェル条件当たりｎ＝３の技術的レプリケート）。

【図７】ＡＡＶとタンパク質Ｍの事前インキュベーションが、ＩＶＩＧによるその後の中和からベクターを保護することを示す。この中和アッセイについては、タンパク質Ｍの量を同一（８．２５μｇ）に維持したが、様々な量のＩＶＩＧを用いて異なるモル比を達成した（５０μｇ～３．１２μｇのＩＶＩＧ）。タンパク質Ｍを最初にＡＡＶ２－ルシフェラーゼとともに４℃で１時間インキュベートして、その後ＩＶＩＧを添加して４℃で１時間インキュベートした後、細胞培養物を形質導入した。陽性対照群は、ＡＡＶ＋３３μｇ、８．２５μｇ、又は１μｇのタンパク質Ｍを含んでおり、陰性対照群はＰＢＳとともにインキュベートされたＡＡＶのみを含んでいた。タンパク質Ｍが介在することによりＡＡＶの非中和画分が２～３倍増強されることが観察された。各ウェルに血清フリー培地中の１×１０^{5}ＨＥＫ－２９３細胞を播種し、４８ウェルプレートのフォーマットにおいて２，０００のＭＯＩで形質導入した（ウェル条件当たりｎ＝３の技術的レプリケート）。ルシフェラーゼ測定を形質導入の２４時間後に行った。

【図８】ＡＡＶとタンパク質Ｍの事前インキュベーションが、過剰なバックグラウンド血清免疫グロブリンにおいてＩＶＩＧによる中和からベクターを保護することを示す。この実験については、２×１０^{8}ウイルスゲノムの用量のＡＡＶ２－ルシフェラーゼの約９５％を中和することが以前に示された２５μｇのＩＶＩＧを用いた。２５μｇのヒトＩＶＩＧを、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含む細胞培養ウェルに添加し、製造元が実施したＥＬＩＳＡによって測定された推定ウシＩｇＧ濃度は３５０μｇであった。同量の１０％ＦＢＳを含む細胞培養ウェルの別のセットをＩＶＩＧなし対照として用いた。モル比４：１、２：１、及び１：１（ウシＩｇＧ含有量に基づく）のタンパク質Ｍを、４℃で１時間、ＡＡＶとともにインキュベートした後に、ＩＶＩＧなし対照ウェル又は２５μｇのＩＶＩＧ含有ウェルにそれぞれ１０％ＦＢＳを添加した。陰性対照群においてはタンパク質Ｍの代わりにＰＢＳとともにＡＡＶをインキュベートして、１０％ＦＢＳを含むウェル又は２５μｇのＩＶＩＧとともに１０％ＦＢＳを含むウェルに添加した。結果は、タンパク質Ｍの事前インキュベーションは、１分子のウシＩｇＧに対して１分子のタンパク質Ｍの比でさえもＩＶＩＧによる中和からＡＡＶ２－ルシフェラーゼを保護したことを示すが、この量のタンパク質Ｍ（１０８μｇ）は、依然としてヒトＩＶＩＧ（２５μｇ）よりも１２倍高い比であった。各ウェルに１×１０^{5}ＨＥＫ－２９３細胞を播種し、４８ウェルプレートのフォーマットにおいて２，０００のＭＯＩで形質導入した（ウェル条件当たりｎ＝３の技術的レプリケート）。ルシフェラーゼ測定を形質導入の２４時間後に行った。

【図９】タンパク質Ｍが、ＡＡＶ８免疫化マウスから回収されたプールされたポリクローナル血清において見られる中和抗体からのＡＡＶ８のインビトロエスケープを可能にすることを示す。この実験については、ＡＡＶ８免疫化マウス由来の１０μｌのプールされたポリクローナル血清をＰＢＳ中に段階希釈して、最初に１０倍希釈して１μｌ及び０．１μｌの血清含有ウェルを作製した。次いで、０．１μｌの血清ウェルを２倍希釈比で更に希釈した。ＡＡＶ８－ルシフェラーゼベクター（ウェル当たり２×１０^{8}ウイルスゲノム）を中和血清の希釈物とともに４℃で１時間インキュベートした後に形質導入した。タンパク質Ｍを、同一のＡＡＶ８中和マウス血清の１０倍希釈比に、概算で１分子の免疫グロブリンに対して２分子のタンパク質Ｍの比で添加した。１μｌの中和マウス血清中、概算１０μｇの免疫グロブリンに対して６．５μｇのタンパク質Ｍで始めて、それぞれのタンパク質Ｍ及び血清試料を別個に相互希釈した後、４℃で１時間のインキュベーションのために合わせた。次いで、全ての試料をＡＡＶ８－ルシフェラーゼともに４℃で１時間インキュベートした後に細胞へ添加した。得られた中和実験からのデータを、ＡＡＶ８のみを含む血清なし対照ウェルに対して正規化して、次いで、ルシフェラーゼシグナルを二重指数減衰関数に適合させて、データのポイント間の曲線を推測した。モデル化された曲線を使用して、ポリクローナル血清によるＡＡＶ８の５０％の中和が、１：２，５６４の有効

力価に対して０．００３９μｌの体積で生じたことが見出された。しかしながら、２：１のモル比のタンパク質Ｍとインキュベートした同じ血清の５０％の中和は、０．２７４４μｌの血清体積で発生し、１：３６の推定有効力価をもたらした。この結果は、タンパク質Ｍが、インビトロで、ほぼ１００倍差の血清濃度にわたりＡＡＶを保護することが可能であることを示している。９６ウェルプレートのフォーマットにおいて、全てのウェルに５×１０^{4}ＨＥＫ－２９３細胞を播種し（４，０００のＭＯＩ）、ウェル条件当たりｎ＝３の技術的レプリケートであり、ルシフェラーゼは形質導入の４８時間後に測定された。

【図１０】ＡＡＶ８に対する受動免疫を有するマウスへのタンパク質Ｍのインビボ投与が、中和抗体エスケープをもたらすことを示す。この実験では、マウスに、ＩＶ注入を介した受動移入によって様々な容量のポリクローナルＡＡＶ８血清（以前の図から、力価１：２，５６４）を与え、その後１５～２０分以内に、２×１０^{10}ウイルスゲノムのＡＡＶ８－ルシフェラーゼをＩＶ投与した。これにより、各マウスに送達された血清体積に基づく中和曲線が確立された。血清が受動移入されていないナイーブマウス群と比較して、ＡＡＶ８－ルシフェラーゼシグナルの５０％を超える中和が、１μｌ～０．００１μｌの移入された血清で起こることが判明した。しかしながら、推定２：１の比のタンパク質Ｍ（６．３ｍｇ）が受動移入後、ＡＡＶ投与前にマウスに送達された場合、次いで、中和抗体からの完全なエスケープは、０．３μｌの移入した血清体積で達成され、１μｌは、ＮＡｂ濃度の１，０００倍変化のタンパク質Ｍを介在した中和抗体からのエスケープを示した。更に、中和からのエスケープは、０．３μｌの受動移入血清群について用量依存的であり、ＮＡｂエスケープが、血清なし対照群と比較して、１：１（３．１５ｍｇ）及び０．５：１（１．５８ｍｇ）の概算のモル比が減少することを示す。全ての群に関して、群の条件当たりｎ＝５匹のマウスであり、肝臓からのルシフェラーゼシグナルをＡＡＶ投与の２４時間後に測定した。

【図１１】図１０の結果から定量化された平均の生発光（ｒａｗ　ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ）を示す。

【図１２】タンパク質Ｍ／抗体複合体が、インビトロでの形成後に安定していることを示す。この実験において、概算で１０μｇの免疫グロブリンを含む１μｌのポリクローナル血清（力価１：２，５６４）を用いてタンパク質Ｍ（２：１モル比、６．６μｇ）と様々な持続時間でインキュベートした後にＡＡＶ８－ルシフェラーゼを添加した。陰性対照群は中和血清＋培地を含んでおり、陽性対照群は培地＋ＰＢＳ又はタンパク質Ｍ＋培地を含んでいた。７２時間、４８時間、２４時間、１６時間、４時間、２時間、及び１時間のインキュベーション間隔を全ての群に適用した。全てのインキュベーション持続時間は、培地＋ＰＢＳの陰性対照と比較して、タンパク質Ｍが介在する、中和からのＡＡＶ８の保護を示した。９６ウェルプレートのフォーマットにおいて、５×１０^{4}ＨＥＫ－２９３細胞を播種する時（０時間）にＡＡＶ８－ルシフェラーゼをウェルに添加して、４，０００のＭＯＩで形質導入した（ウェル条件当たりｎ＝３の技術的レプリケート）。ルシフェラーゼ測定を形質導入の４８時間後に行った。

【図１３】インビボでのタンパク質Ｍによる中和抗体エスケープの効能が不安定であることを示す。図１０及び図１１と同一の実験を行ったが、今回は、ＮＡｂエスケープの耐久性を試験するために、タンパク質Ｍ投与の５分後、又はタンパク質Ｍ投与の３時間後にＡＡＶ８を添加した。ＡＡＶ８－ルシフェラーゼシグナルは、ＡＡＶ８を投与するまで３時間待った後は血清なし対照群の約１／３であったが、タンパク質Ｍの後にＡＡＶ８を投与するまで５分だけ待った場合は、ルシフェラーゼシグナルは血清なし対照群とほぼ同等であった。概算で２：１の比のタンパク質Ｍ（６．３ｍｇ）を、受動移入後であるがＡＡＶ投与前のマウスに、ｎ＝３匹のマウスを含む３時間間隔群を除いて、群条件当たりｎ＝５匹のマウスに送達した。肝臓からのルシフェラーゼシグナルをＡＡＶ投与の２４時間後に測定した。

【図１４】Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（ＭＧ　ＷＴ）由来の切断されたタンパク質Ｍが、体温で不安定であることを示す。融解温度（Ｔｍ）を、ナノ示差走査型蛍光透視法（ＮａｎｏＤＳＦ）を用いて決定した。一次導関数の変曲点はＴｍを示す。タンパク質をＥ．ｃ

ｏｌｉ内で組換えにより発現して、測定前にニッケルカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。円偏光二色性アッセイにより、ＭＧ　ＷＴが２０℃で少なくとも２時間安定であり、目に見える析出物が形成されないことが示された。しかしながら、３７℃では、ＭＧ　ＷＴは１５分後にアンフォールディングし始めて、目に見える析出物が生じた。このことは、タンパク質が標準的なヒト体温付近で不安定であることを示す。０～１００℃の温度勾配は、ＭＧ　ＷＴの即時的なアンフォールディング及び約４１．２℃の融解温度（Ｔｍ）を示した。アンフォールディングは、目に見える沈殿物の凝集が伴った。

【図１５Ａ－１５Ｂ】Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（ＭＧ　ＷＴ）及びＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（ＭＰ　ＷＴ）由来の切断されたタンパク質Ｍ、並びにＭＧ　ＷＴよりも融解温度が少なくとも１度改善したタンパク質Ｍの類似体（Ａ）又はＭＧ　ＷＴの融解温度を維持するタンパク質Ｍの類似体（Ｂ）の融解温度を示す。融解温度は、ＷＴ及びＥ．ｃｏｌｉからの小スケールのタンパク質生産によって生産された変異体タンパク質類似体に関して、示差走査型蛍光透視法（ＮａｎｏＤＳＦ）によって決定した。変異の数及びそれらの対応するアミノ酸置換を右に列挙する。類似体は様々な熱安定性を示し、多重変異は相加効果を生じさせて融解温度を増加させる。

【図１６】ＭＧ　ＷＴ及びＭＧ２９の融解温度を測定するために示差走査型蛍光透視法（ＤＳＦ）を用いたデータの例を示す。全ての類似体について融解温度を決定して、ＭＧ　ＷＴ（Ｔｍ＝４１．９℃）及びＭＧ２９（Ｔｍ＝５５．２℃）の結果をここに示す。一次導関数の変曲点は融解温度（Ｔｍ）を示す。タンパク質をＥ．ｃｏｌｉ内で組換えにより発現して、測定前にニッケルカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。

【図１７Ａ－１７Ｃ】ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって決定されたタンパク質Ｍ類似体の可溶性画分評価を示す。各タンパク質の７個のアリコート（０．４ｍｇ／ｍＬ）を、３７℃で異なる時間インキュベートした。試料を１５，０００×Ｇで１０分間遠心分離することによって析出タンパク質をペレット化した後に可溶性画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で泳動した。評価の０、１、４、２４、４８、７２、又は９６時間前にタンパク質を加熱した。結果は、加熱の１～４時間後にＭＧ　ＷＴ（Ａ）が、溶液から析出し始めることを示す。ＭＧ２７（Ｂ）及びＭＧ２９（Ａ）は、７２時間にわたり可溶性を維持し、ＭＧ３１（Ｂ）及びＭＧ４０（Ｃ）は２４時間にわたり可溶性を維持する。

【図１８Ａ－１８Ｃ】異なるタンパク質Ｍ類似体が、インビトロ中和アッセイ中に、プールされたヒト静脈内免疫グロブリンガンマ（ＩＶＩＧ）をブロックして、ＡＡＶ２－ルシフェラーゼベクターの中和を防止することを示す：１時間（Ａ及びＢ）又は２４時間（Ｃ）インキュベーションに関する４℃対３７℃の熱負荷の比較。４：１比のタンパク質Ｍ対ＩＶＩＧ。ルシフェラーゼ活性によって生産された相対発光量を、９６ウェルプレートのフォーマットにおいてトリプリケートで行われたＡＡＶ２－ルシフェラーゼレポーターベクター（２Ｅ８ｖｇ）による形質導入の２４時間後に細胞培養物から測定した。結果を、ＡＡＶ２及びリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）のみを含むウェルに対して正規化した（白いバー）。ＩＶＩＧ（１２μｇ）とともに１時間インキュベートしたＡＡＶ２は、ＡＡＶのほぼ完全な中和を示した。４℃でインキュベートしたタンパク質Ｍ類似体（１６μｇ）は、ＡＡＶの前に１時間、一緒にインキュベートした場合、ＩＶＩＧによるＡＡＶの中和を防止した。これを、ＩＶＩＧとインキュベートせずに４℃でインキュベートしたタンパク質Ｍ類似体と比較した（ＭＧ８及びＭＧ２４については行わなかった）。類似体がＩＶＩＧとのインキュベーション前に３７℃で熱負荷された場合、ＭＧ　ＷＴ及びより低い融解温度を有する一部の類似体は中和からＡＡＶを保護しなかったが、より高いＴｍを有する他の類似体は、中和からＡＡＶを保護する能力を維持した。大部分の変異ＭＧ類似体は、１時間の３７℃負荷後に、中和抗体をブロックする能力を維持した。しかしながら、ＭＧ２７、ＭＧ２９、及びＭＧ４６は、２４時間の３７℃負荷後にＡＡＶの中和を防止した。

【図１９】一次ＡＡＶ投与の１ヶ月後のＡＡＶ再投与に関して、ＭＧ　ＷＴがＮＡｂをブロックすることを示す。野生型Ｃ５７ＢＬ６雌マウスを、ＡＡＶ８－ＧＦＰ（１Ｅ９ｖｇ）の腹腔内投与を介して免疫化して、血清を１ヶ月後に回収してＡＡＶ中和抗体力価をイ

ンビトロで評価した。それから、マウスにＡＡＶ８－ルシフェラーゼレポーターベクターを筋肉内投与し（１Ｅ９ｖｇ／脚）、ここで、マウスの右脚に対してはＭＧ　ＷＴとの単純な混合としてＡＡＶを製剤化し（３３μｇ／脚）、又は、マウスの左脚に対してはビヒクル対照としてリン酸緩衝生理食塩水を用いてＡＡＶを製剤化した。脚筋の発光イメージングを、ＡＡＶ８－ルシフェラーゼ投与の２週間後に実施した。１：１０のＡＡＶ中和抗体力価を有する３匹のマウスは、生理食塩水で製剤化された脚においてＡＡＶルシフェラーゼレポーターベクターの中和を示したが、ＡＡＶルシフェラーゼレポーターベクターは、同じマウスのＭＧ　ＷＴが製剤化された脚において中和抗体から保護された。生理食塩水の脚におけるＡＡＶの中和は、ＭＧ　ＷＴが製剤化された脚よりも８０％低い平均ルシフェラーゼシグナルを生じた。この結果は、以前のＡＡＶ投与によって誘発された中和抗体の産生後に、タンパク質Ｍを用いて成功的にＡＡＶを再投与することができることを示している。

【図２０】ＭＧ２９が、一次ＡＡＶ投与の１ヶ月後のＡＡＶ再投与に関してＮＡｂをブロックすることを示す。野生型Ｃ５７ＢＬ６雌マウスを、ＡＡＶ８－ＧＦＰ（５Ｅ８ｖｇ）の腹腔内投与を介して免疫化して、血清を１ヶ月後に回収してＡＡＶ中和抗体力価をインビトロで評価した。次いで、マウスにＡＡＶ８－ルシフェラーゼレポーターベクターを筋肉内投与し（２Ｅ９ｖｇ／脚）、ここで、マウスの右脚に対しては操作類似体ＭＧ２９との単純な混合としてＡＡＶを製剤化し（５００μｇ／脚）、又はマウスの左脚に対してはビヒクル対照としてリン酸緩衝生理食塩水を用いてＡＡＶを製剤化した。脚筋の発光イメージングを、ＡＡＶ８－ルシフェラーゼ投与の２週間後に実施した。１：１００未満のＡＡＶ中和抗体力価（個々に１：８、１：３２、及び１：６４）をそれぞれ有する３匹のマウスは、生理食塩水で製剤化された脚においてＡＡＶルシフェラーゼレポーターベクターの中和を示したが、ＡＡＶルシフェラーゼレポーターベクターは、同じマウスのＭＧ２９が製剤化された脚において中和抗体から保護された。生理食塩水の脚におけるＡＡＶの中和は、ＭＧ　ＷＴが製剤化された脚よりも少なくとも９８％低い平均ルシフェラーゼシグナルを生じた。この結果は、以前のＡＡＶ投与によって誘発された中和抗体の産生後に、操作タンパク質Ｍ類似体を用いて成功的にＡＡＶを再投与することができることを示している。

【図２１】操作タンパク質Ｍ類似体が、ＩｇＧに関して異なる親和性を示すことを示す。特定のタンパク質Ｍ類似体の親和性を、バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）を用いて測定した。結合定数（ＫＤ）を、１５．６ｎＭ～２５０ｎＭのタンパク質Ｍ濃度範囲にわたる会合速度及び解離速度（動態解析）を用いて計算した。結果は、ＭＧ　ＷＴと比較した、ＢＬＩプローブに付着されたＩｇＧに対する親和性の増加又は低減を示す。

【図２２】動態解析によって作成されたＢＬＩ親和性データの一例を示す。曲線は、動態学的ＫＤ値を予測するために用いられる。曲線フィットが、収集データ上に重ねられている。

【図２３】変異体の安定化の成功率を示す。ＭＧ　ＷＴに関してＲｏｓｅｔｔａによって予測された変異が、安定性を増加した（Ｔｍ＋１℃）、低減した（Ｔｍ－１℃）、又は影響がなかった頻度を表す。「組み合わせの変異」は、ＭＧ　ＷＴを個々に安定化した変異構築物のマージによって構築された構築物を表す。

【図２４】ＭＰ　ＷＴ配列の保存を示す。ＭＰ　ＷＴのホモロジーモデルを２方向で示し、ＢＬＯＳＵＭ６２マトリックスに従ってＭＧ　ＷＴ配列に対する保存によって色付けした。残基は、白（同一）から黒（有意に異なる）にわたる保存の程度に従って色付けされている。ホモロジーレベルを、ＰＤＢ　ＩＤ：４ＮＺＲをテンプレートとして用いて構築した。

【図２５】タンパク質ＭのＤＮＡ配列のコドン最適化によって、製造収率が高くなることを示す。ＭＧ　ＷＴタンパク質をコードするＤＮＡプラスミドを、ＭＧ２８１にネイティブの細菌コドン（オリジナルＰＭ）、又は細菌及びヒトコドン使用頻度の両方に対して最適化されたコドン（最適化ＰＭ）を用いて生産した。同等濃度のオリジナルＰＭプラスミド又は最適化ＰＭプラスミドによって形質転換された３つのプールされた細菌コロニーを

培養して、同等の一晩の期間、同等の増殖培地容量（１０ｍＬ）中で増殖させた。細菌をペレット化して、凍結融解及び同等容量の溶解緩衝液中の溶解によって粗溶解物を生産した。粗溶解物を遠心分離して、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上でのタンパク質分離のために上清を回収した。各溶解物からの同等容量をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上に流し、ウエスタンブロット上へ移して、次いで、ＭＧ　ＷＴのアミノ末端に存在する６×ヒスチジンタグに対するマウス抗体を用いてプローブした後に、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）にコンジュゲートされたヤギ抗マウス二次抗体を用いてプローブした。ＭＧ　ＷＴタンパク質のバンド強度を、ルミノール化学発光アッセイを用いて測定した。得られたＭＧ　ＷＴ収率を、細菌ペレットの重量に対して正規化されたウエスタンブロットバンド強度に基づいて計算した。最適化ＰＭプラスミドは、オリジナルＰＭプラスミドと比較した場合、ＭＧ　ＷＴタンパク質収率がほぼ４倍増加した。

【図２６】変異体のｐＨ安定性の改善を示す。融解温度（Ｔｍ）を、異なるｐＨ条件でＮａｎｏＤＳＦを用いて決定した。タンパク質をＰＢＳ中でＳＥＣを介して精製して、グリシン（ｐＨ２．５及び３．５）、酢酸（ｐＨ４．５及び５．５）、及びリン酸（ｐＨ６．５及び７．５）緩衝液に緩衝液交換した。

【図２７Ａ－２７Ｄ】野生型Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍアミノ酸７４～４７９（配列番号３）及び修飾タンパク質Ｍ　ＭＧ１（配列番号４）、ＭＧ８（配列番号５）、ＭＧ１３（配列番号６）、ＭＧ１５（配列番号７）、ＭＧ２１（配列番号８）、ＭＧ２２（配列番号９）、ＭＧ２３（配列番号１０）、ＭＧ２４（配列番号１１）、ＭＧ２７（配列番号１２）、ＭＧ２８（配列番号１３）、ＭＧ２９（配列番号１４）、ＭＧ３１（配列番号１５）、ＭＧ３３（配列番号１６）、ＭＧ３８（配列番号１７）、ＭＧ４０（配列番号１８）、ＭＧ４３（配列番号１９）、ＭＧ４４（配列番号２０）、ＭＧ４５（配列番号２１）、及びＭＧ４６（配列番号２２）の配列アライメントを示す。

【図２８】野生型Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍアミノ酸７４～４７９（配列番号３）、及びＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍの同等の断片（配列番号２３）の配列アライメントを示す。

【図２９】投与後の発光の棒グラフである。図２９は、投与７日後のインビボ抗体の中和を示す。ＡＡＶ８で連続的に免疫したマウスから血清を収集し、プールした。インビトロ中和アッセイにより、プールした血清の抗ＡＡＶ８中和力価がおよそ１：１０，０００であることが決定された。異なる量の抗ＡＡＶ８血清（血清体積によって決定される）は、受動移入実験において、ＡＡＶナイーブマウス群にＩＶ注射を介して投与し、続いて２０～２５分後にＡＡＶ８－ルシフェラーゼレポーターベクターの２ｅ１０ウイルスゲノム（ｖｇ）をＩＶ注射した。一部の群のマウスに、ＡＡＶ投与の５分前にＩＶ注射を介してタンパク質Ｍを投与した。ルシフェラーゼ活性の非侵襲的なインビボイメージングを７日後に実施して、ＡＡＶ８ベクターからの遺伝子発現の代用としての発光を定量化し、発光シグナルの減少は、血清によるＡＡＶ８ルシフェラーゼ中和を示す。０．０００３ｕｌの血清を与えられたマウスは、ＡＡＶ８を中和できず、２ｅ１０ｖｇのＡＡＶ８－ルシフェラーゼのみを注射された血清なしナイーブマウスと比較して、ほぼ１００％の発光シグナルを生じた。中和血清の量を増加させたマウス群は、ＡＡＶ８－ルシフェラーゼを徐々に中和し、０．００１ｕｌ～０．００３ｕｌの血清でＡＡＶの約半分が中和され、０．３ｕｌ以上の血清でＡＡＶの９９％以上が中和された。３ｕｌの血清、続いてＭＧ８８又はＭＧ１１８、次いで２ｅ１０ｖｇのＡＡＶ８－ルシフェラーゼを投与されたマウスの群は、タンパク質Ｍ融合タンパク質ＭＧ２９（６．３ｍｇ）、ＭＧ２９＊（６．３ｍｇ）、及びＭＧＷＴ＊（６．３ｍｇ）、ＭＧ１１８（９ｍｇ）、及びＭＧ８８（６．３ｍｇ）による中和抗体の抑制による中和からのエスケープを示す遺伝子発現をもたらした。

【図３０】マウス由来の高力価抗ＡＡＶ８血清を２倍希釈で滴定し、Ｘ軸に示すようにウェルに添加した、インビトロ中和アッセイを示す。次いで、異なるタンパク質Ｍ類似体（ＭＧ２９、ＭＧ６６、ＭＧ７１、及びＭＧ６４）を、図の凡例に示される分子比でウェルに添加し、１時間インキュベートした。生理食塩水を血清のみのウェルに添加した（黒丸）。次いで、ＡＡＶ８－ルシフェラーゼ（２×１０^{10}ウイルスゲノム）を各ウェルに添

加し、１時間インキュベートした後、無血清培地中に５×１０^{4}のＨｕｈ７細胞を添加した。細胞を４８時間培養し、中和の代用となるルシフェラーゼレポーターシグナルを読み取り、定量化した。これらのデータは、これらの類似体が中和抗体ブロック機能を有し、それによって中和曲線をシフトさせ、ＭＧ６４Ｆｃ－タンパク質Ｍ融合二量体（Ｆｃ－ＰＭ）がタンパク質Ｍ単量体類似体よりも大きく曲線をシフトさせることを示す。

【発明を実施するための形態】

【００２４】

本発明は、以下により詳細に説明される。この説明は、本発明が実施され得る全ての異なる方法又は本発明に加えられ得る全ての特徴の詳細なカタログであることを意図しない。例えば、一実施形態に関して説明される特徴は、他の実施形態に組み込まれてよく、特定の実施形態に関して説明される特徴は、その実施形態から削除されてよい。更に、本明細書において示唆される様々な実施形態に対する非常に多くのバリエーション及び付加は、本開示に照らして当業者に明らかであり、本発明から逸脱しない。それ故に、以下の明細書は、本発明の一部の特定の実施形態を説明することを意図し、それらの全ての並べ替え、組み合わせ、及びバリエーションを網羅的に特定することを意図しない。

【００２５】

文脈が別段の指示をしない限り、本明細書に記載される本発明の様々な特徴は、任意の組み合わせで用いられ得ることが明確に意図される。更に、本発明は、本発明のいくつかの実施形態において、本明細書中に示される任意の特徴若しくは特徴の組み合わせが除外又は省略され得ることも企図する。例示するために、本明細書が、複合体が構成要素Ａ、Ｂ、及びＣを含むと述べている場合、Ａ、Ｂ、又はＣのいずれか、又はそれらの組み合わせが、単独又は任意の組み合わせで省略及び免責できることが特に意図される。

【００２６】

別段の定義がされない限り、本明細書において用いられる全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する当業者の一人によって一般に理解されるのと同一の意味を有する。本明細書における本発明の説明で使用される用語は、特定の実施形態を説明する目的のためのみであり、本発明の制限を意図しない。

【００２７】

ヌクレオチド配列は、別段の明確な指示がない限り、本明細書において、一本鎖のみによって、５’から３’の方向で、左から右に示される。ヌクレオチド及びアミノ酸は、本明細書において、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎによって推奨される様式で、又は、（アミノ酸については）一文字コード又は三文字コードのいずれかによって、どちらも３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．§１．８２２及び確立された使用法に従って表される。

【００２８】

別段の指示がある場合を除き、当業者に公知の標準的な方法が、組換え及び合成ポリペプチド、抗体又はその抗原結合断片の生産、核酸配列の操作、形質転換された細胞の生産、ｒＡＡＶ構築物、修飾カプシドタンパク質、ＡＡＶ ｒｅｐ及び／又はｃａｐ配列を発現するパッケージングベクター、及び、一時的及び安定的にトランスフェクトされたパッケージング細胞の構築のために用いられ得る。かかる技術は当業者に公知である。例えば、ＳＡＭＢＲＯＯＫ ｅｔ ａｌ．，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：ラボマニュアル第２版（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９８９）、Ｆ．Ｍ．ＡＵＳＵＢＥＬ ｅｔ ａｌ．ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ（Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．及びＪｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）を参照されたい。

【００２９】

本明細書において言及される全ての刊行物、特許出願、特許、ヌクレオチド配列、アミノ酸配列及び他の参考文献は、参照によってそれらの全体で援用される。

【００３０】

定義

本発明の説明及び添付の特許請求の範囲において用いられるように、単数形「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、文脈が明確に別段の指示をしない限り、複数形も含むことが意図される。

【００３１】

本明細書において用いられる「及び／又は」は、関係がある挙げられたアイテムの１つ以上の任意及び全てのあり得る組み合わせ、並びに、選択的に解釈される場合（「又は」）は、組み合わせの欠失を指し、かつ包含する。

【００３２】

更に、本発明はまた、本発明のいくつかの実施形態において、本明細書に記載の任意の特徴若しくは特徴の組み合わせを除外又は省略できることも企図する。

【００３３】

更に、本明細書において用いられる用語「約」は、本発明の化合物又は薬剤の量、用量、時間、温度などの測定可能な値を指す場合、規定の量の±１０％、±５％、±１％、±０．５％、又は更には±０．１％の変動を包含することを意味する。

【００３４】

本明細書において用いられる移行句「から本質的になる」は、列挙された材料又はステップ、及び、特許請求の範囲に記載された発明の基礎的及び新規の特徴（単数又は複数）に実質的に影響を及ぼさないものを包含すると解釈されるべきである。したがって、本明細書において用いられる用語「から本質的になる」は、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」と同等であると解釈されるべきでない。

【００３５】

本発明のポリヌクレオチド又はポリペプチド配列に適用される用語「から本質的になる」（及び文法上の変形）は、列挙された配列（例えば、配列番号）、及び、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの機能が実質的に変更されないような、列挙された配列の５’及び／又は３’又はＮ末端及び／又はＣ末端上又は２つの末端の間（例えばドメイン間）の、合計で１０個以下（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個）の更なるヌクレオチド又はアミノ酸の、両方からなるポリヌクレオチド又はポリペプチドを意味する。合計で１０個以下の更なるヌクレオチド又はアミノ酸は、更なるヌクレオチド又はアミノ酸の合計数を合わせて含む。本発明のポリヌクレオチドに適用される用語「実質的に変更される」は、列挙された配列からなるポリヌクレオチドの発現レベルと比較して少なくとも約５０％以上の、コードされるポリペプチドを発現する能力の増加又は低減を指す。本発明のポリペプチドに適用される用語「実質的に変更される」は、列挙された配列からなるポリペプチドの活性と比較して少なくとも約５０％以上の、生物学的活性の増加又は低減を指す。

【００３６】

本明細書において用いられる用語「パルボウイルス」は、Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅファミリーを包含し、自律複製するパルボウイルス及びディペンドウイルスを含む。自律的パルボウイルスは、パルボウイルス、エリスロウイルス、デンソウイルス、イテラウイルス、及び、コントラウイルス（Ｃｏｎｔｒａｖｉｒｕｓ）属のメンバーを含む。例示的な自律的パルボウイルスは、限定されないが、マウスの微小ウイルス、ウシのパルボウイルス、イヌのパルボウイルス、ニワトリのパルボウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ネコのパルボウイルス、ガチョウのパルボウイルス、Ｈ１パルボウイルス、バリケンのパルボウイルス、ヘビのパルボウイルス、及びＢ１９ウイルスを含む。他の自律的パルボウイルスは、当業者に公知である。例えば、ＦＩＥＬＤＳ ｅｔ ａｌ．，ＶＩＲＯＬＯＧＹ、第２巻、第６９章（第４版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）を参照。

【００３７】

ディペンドウイルス属は、制限されないが、ＡＡＶタイプ１、ＡＡＶタイプ２、ＡＡＶ

タイプ３（タイプ３Ａ及び３Ｂを含む）、ＡＡＶタイプ４、ＡＡＶタイプ５、ＡＡＶタイプ６、ＡＡＶタイプ７、ＡＡＶタイプ８、ＡＡＶタイプ９、ＡＡＶタイプ１０、ＡＡＶタイプ１１、ＡＡＶタイプ１２、ＡＡＶタイプ１３、鳥類ＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ヤギＡＡＶ、ヘビＡＡＶ、ウマＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶを含む、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を含む。例えば、ＦＩＥＬＤＳ ｅｔ ａｌ．，ＶＩＲＯＬＯＧＹ、第２巻、第６９章（第４版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）；及び表１を参照。

【００３８】

本発明の文脈における用語「アデノ随伴ウイルス」（ＡＡＶ）は、限定されないが、ＡＡＶタイプ１、ＡＡＶタイプ２、ＡＡＶタイプ３（タイプ３Ａ及び３Ｂを含む）、ＡＡＶタイプ４、ＡＡＶタイプ５、ＡＡＶタイプ６、ＡＡＶタイプ７、ＡＡＶタイプ８、ＡＡＶタイプ９、ＡＡＶタイプ１０、ＡＡＶタイプ１１、鳥類ＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶ、並びに、現在知られ又は後に発見される任意の他のＡＡＶを含む。例えば、ＢＥＲＮＡＲＤ Ｎ．ＦＩＥＬＤＳ ｅｔ ａｌ．，ＶＩＲＯＬＯＧＹ、第２巻、第６９章（第４版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）を参照。多くの追加のＡＡＶ血清型及びクレードが同定されており（例えば、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，（２００４）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７８：６３８１－６３８８及び表１を参照）、それらも用語「ＡＡＶ」に包含される。

【００３９】

本発明のパルボウイルス粒子及びゲノムは、限定されないが、ＡＡＶ由来であり得る。様々な血清型のＡＡＶ及び自律的パルボウイルスのゲノム配列、並びに、ネイティブＩＴＲ、Ｒｅｐタンパク質、及びカプシドサブユニットの配列は、当技術分野で知られている。かかる配列は、文献又はＧｅｎＢａｎｋのような公共データベースに見られ得る。例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＣ＿００２０７７、ＮＣ＿００１４０１、ＮＣ＿００１７２９、ＮＣ＿００１８６３、ＮＣ＿００１８２９、ＮＣ＿００１８６２、ＮＣ＿０００８８３、ＮＣ＿００１７０１、ＮＣ＿００１５１０、ＮＣ＿００６１５２、ＮＣ＿００６２６１、ＡＦ０６３４９７、Ｕ８９７９０、ＡＦ０４３３０３、ＡＦ０２８７０５、ＡＦ０２８７０４、Ｊ０２２７５、Ｊ０１９０１、Ｊ０２２７５、Ｘ０１４５７、ＡＦ２８８０６１、ＡＨ００９９６２、ＡＹ０２８２２６、ＡＹ０２８２２３、ＡＹ６３１９６６、ＡＸ７５３２５０、ＥＵ２８５５６２、ＮＣ＿００１３５８、ＮＣ＿００１５４０、ＡＦ５１３８５１、ＡＦ５１３８５２、及びＡＹ５３０５７９を参照されたく、それらの開示は、パルボウイルス及びＡＡＶの核酸並びにアミノ酸配列を教示するために参照により本明細書に組み込まれる。また、例えば、Ｂａｎｔｅｌ－Ｓｃｈａａｌ ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７３：９３９、Ｃｈｉｏｒｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７１：６８２３、Ｃｈｉｏｒｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７３：１３０９、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９９：１１８５４、Ｍｏｒｉｓ ｅｔ ａｌ．，（２００４）Ｖｉｒｏｌ．３３－：３７５－３８３、Ｍｏｒｉ ｅｔ ａｌ．，（２００４）Ｖｉｒｏｌ．３３０：３７５、Ｍｕｒａｍａｔｓｕ ｅｔ ａｌ．，（１９９６）Ｖｉｒｏｌ．２２１：２０８、Ｒｕｆｆｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，（１９９４）Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．７５：３３８５、Ｒｕｔｌｅｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：３０９、Ｓｃｈｍｉｄｔ ｅｔ ａｌ．，（２００８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．８２：８９１１、Ｓｈａｄｅ ｅｔ ａｌ．，（１９８６）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．５８：９２１、Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ ｅｔ ａｌ．，（１９８３）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．４５：５５５、Ｘｉａｏ ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７３：３９９４、国際特許公開第００／２８０６１号、同第９９／６１６０１号、同第９８／１１２４４号、及び米国特許第６，１５６，３０３号も参照されたく、それらの開示は、パルボウイルス及びＡＡＶの核酸並びにアミノ酸配列を教示するために参照により本明細書に組み込まれる。また、表１も参照されたい。ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、及びＡＡＶ３ＩＴＲ配列の初期の説明は、Ｘｉａｏ，Ｘ．，（１９９６），“Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏ

ｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ（ＡＡＶ）ＤＮＡ ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ”、博士論文、ピッツバーグ大学、ピッツバーグ、ペンシルバニア州によって提供される（その全体で本明細書中に援用される）。

【００４０】

「キメラ」ＡＡＶ核酸カプシドコード配列又はＡＡＶカプシドタンパク質は、２以上のカプシド配列の部分を組み合わせたものである。「キメラ」ＡＡＶビリオン又は粒子は、キメラＡＡＶカプシドタンパク質を含む。

【００４１】

本明細書において用いられる用語「指向性（ｔｒｏｐｉｓｍ）」は、特定の細胞又は組織タイプへのベクター（例えば、ウイルスベクター）の優先的だが必ずしも排他的でない侵入及び／又は特定の細胞又は組織タイプへの侵入を促進する細胞表面との優先的だが必ずしも排他的でない相互作用を指し、任意に、及び好ましくは、細胞における、ベクター内容物（例えばウイルスゲノム）によって保有される配列の発現（例えば転写、翻訳であってもよい）、例えば、組換えウイルスについては、異種ヌクレオチド配列の発現が続く。当業者は、ウイルスゲノム由来の異種核酸配列の転写は、例えば、誘導性プロモーター又は他の方法で調節される核酸配列に関するトランス作用因子が不存在では開始され得ないことを理解している。ｒＡＡＶゲノムの場合は、ウイルスゲノムからの遺伝子発現は、安定的に組み込まれたプロウイルス由来であってよく、及び／又は、組み込まれていないエピソーム、並びに、ウイルス核酸が細胞内でとり得る任意の他の形態由来であってよい。

【００４２】

用語「指向性プロファイル」は、１つ以上の標的細胞、組織及び／又は臓器の形質導入パターンを指す。キメラＡＡＶカプシドの代表的な例は、末梢臓器の形質導入がわずかである中枢神経系（ＣＮＳ）の細胞の効率的な形質導入によって特徴付けられる指向性プロファイルを有する（例えば米国特許第９，６３６，３７０号（ＭｃＣｏｗｎら）、及び米国特許公開第２０１７／０３６０９６０号（Ｇｒａｙら）を参照）。特異的な指向性プロファイルを発現するベクター（例えば、ウイルスベクター、例えば、ＡＡＶカプシド）は、それらの指向性プロファイルについて「指向性」、例えば、神経指向性、肝臓指向性などと呼ばれ得る。

【００４３】

本明細書において用いられる、ウイルスベクター（例えばＡＡＶベクター）による細胞の「形質導入」は、細胞内へのベクターの侵入及びウイルスベクター内への核酸の取り込みによる細胞内への遺伝物質の移行及びウイルスベクターを介した細胞内へのその後の移行を意味する。

【表１】

表1

AAV 血清型/単離物	GenBank 受入番号	AAV 血清型/単離物	GenBank 受入番号	AAV 血清型/単離物	GenBank 受入番号
クローン単離物		Hu52	AY530614	Cy3	AY243019
トリ AAV ATCC VR-865	AY186198,AY629583,NC004828	Hu T41	AY695378	Cy5	AY243017
トリ AAV 株 DA-1	NC006263,AY629583	Hu S17	AY695376	Rh13	AY243013
ウシ AAV	NC005889,AY388617	Hu T88	AY695375		
AAV4	NC001829	Hu T71	AY695374	Clade E	
AAV5	AY18065, AF085716	Hu T70	AY695373	Rh38	AY530558
Rh34	AY243001	Hu T40	AY695372	Hu66	AY530626
Rh33	AY243002	Hu T32	AY695371	Hu42	AY530605
Rh32	AY243003	Hu T17	AY695370	Hu67	AY530627
AAV10	AY631965	Hu LG15	AY695377	Hu40	AY530603
AAV11	AY631966			Hu41	AY530604
AAV12	DQ813647	Clade C		Hu37	AY530600
AAV13	EU285562	AAV3	NC001729	Rh40	AY530559
		AAV3B	NC001863	Rh2	AY243007
Clade A		Hu9	AY530629	Bb1	AY243023
AAV1	NC002077,AF063497	Hu10	AY530576	Bb2	AY243022
AAV6	NC 001862	Hu11	AY530577	Rh10	AY243015
Hu.48	AY530611	Hu53	AY530615	Hu11	AY530582
Hu43	AY530606	Hu55	AY530617	Hu6	AY530621
Hu44	AY530607	Hu54	AY530616	Rh25	AY530557
Hu46	AY530609	Hu7	AY530628	Pi2	AY530554
		Hu18	AY530583	Pi1	AY530553
Clade B		Hu15	AY530580	Pi3	AY530555
Hu19	AY530584	Hu16	AY530581	Rh57	AY530569
Hu20	AY530586	Hu25	AY530591	Rh50	AY530563
Hu23	AY530589	Hu60	AY530622	Rh49	AY530562
Hu22	AY530588	Ch5	AY243021	Hu39	AY530601
Hu24	AY530590	Hu3	AY530595	Rh58	AY530570
Hu21	AY530587	Hu1	AY530575	Rh61	AY530572
Hu27	AY530592	Hu4	AY530602	Rh52	AY530565
Hu28	AY530593	Hu2	AY530585	Rh53	AY530566
Hu29	AY530594	Hu61	AY530623	Rh51	AY530564
Hu63	AY530624			Rh64	AY530574
Hu64	AY530625	Clade D		Rh43	AY530560
Hu13	AY530578	Rh62	AY530573	AAV8	AF513852
Hu56	AY530618	Rh48	AY530561	Rh8	AY242997

Hu57	AY530619		Rh54	AY530567		Rh1	AY530556
Hu49	AY530612		Rh55	AY530568			
Hu58	AY530620		Cy2	AY243020		Clade F	
Hu34	AY530598		AAV7	AF513851		AAV9(Hu14)	AY530579
Hu35	AY530599		Rh35	AY243000		Hu31	AY530596
AAV2	NC001401		Rh37	AY242998		Hu32	AY530597
Hu45	AY530608		Rh36	AY242999			
Hu47	AY530610		Cy6	AY243016			
Hu51	AY530613		Cy4	AY243018			

【００４４】
別段の指示がない限り、「効率的な形質導入」、又は「効率的な指向性」、又は同様の用語は、好適な陽性対照又は陰性対照を参照することによって決定することができる（例えば、陽性対照の形質導入若しくは指向性のそれぞれ少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％以上、又は陰性対照の形質導入又は指向性のそれぞれ少なくとも約１１０％、１２０％、１５０％、２００％、３００％、５００％、１０００％以上）。
【００４５】
同様に、ウイルスが標的組織に対して「効率的に形質導入しない」、又は「効率的な指向性を有さない」、又は同様の用語は、好適な対照を参照することによって決定することができる。特定の実施形態では、ウイルスベクターは、ＣＮＳ以外の組織、例えば、肝臓、腎臓、生殖腺及び／又は生殖細胞を効率的に形質導入しない（すなわち、効率的な指向性を有さない）。特定の実施形態では、組織（例えば肝臓）の望ましくない形質導入は、望ましい標的組織（例えばＣＮＳ細胞）の形質導入レベルの、２０％以下、１０％以下、５％以下、１％以下、０．１％以下である。
【００４６】
用語「５’部分」及び「３’部分」は、２つ以上の要素間の空間的関係を定義するための相対的用語である。したがって、例えば、ポリヌクレオチドの「３’部分」は、別のセグメントの下流であるポリヌクレオチドのセグメントを示す。用語「３’部分」は、セグメントが必ずしもポリヌクレオチドの３’末端にあることを示すことを意図せず、又は、必ずしもポリヌクレオチドの３’の半分にあることさえ意図しないが、そうであってよい。同様に、ポリヌクレオチドの「５’部分」は、別のセグメントの上流であるポリヌクレオチドのセグメントを示す。用語「５’部分」は、セグメントが必ずしもポリヌクレオチドの５’末端にあることを示すことを意図せず、又は、必ずしもポリヌクレオチドの５’の半分にあることさえ意図しないが、そうであってよい。
【００４７】
本明細書において用いられる用語「ポリペプチド」は、別段の指示がない限り、ペプチド及びタンパク質の両方を包含する。
【００４８】
「ポリヌクレオチド」、「核酸」又は「ヌクレオチド配列」は、ＲＮＡ、ＤＮＡ又はＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド配列（天然起源及び非天然起源ヌクレオチドの両方を含む）であってよいが、好ましくは一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ配列のいずれかである。
【００４９】
用語「調節要素」は、核酸配列の発現のいくつかの態様を制御する遺伝要素を指す。例えば、プロモーターは、作動可能に連結されたコドン領域の転写の開始を促進する調節要素である。他の調節要素は、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナル、終結シグナルなどである。１つ以上の調節要素が見られる核酸配列又はポリヌクレオチド内の領域は、「調節領域」と呼ばれ得る。
【００５０】

ポリペプチドに適用される場合、断片という用語は、参照ポリペプチド又はアミノ酸配列と比較して長さが減少したアミノ酸配列を意味し、参照ポリペプチド又はアミノ酸配列と同一の連続アミノ酸のアミノ酸配列を含む、本質的にそれからなる、及び／又はそれからなると理解されるであろう。いくつかの実施形態において、そのような断片は、本発明に係るポリペプチド又はアミノ酸配列の少なくとも約４、６、８、１０、１２、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５、１００、１５０、２００個、又はそれよりも多くの長さの連続するアミノ酸を有するペプチドを含むことができ、から本質的になることができ、かつ／又は、からなることができる。いくつかの実施形態では、そのような断片は、本発明に係るポリペプチド又はアミノ酸配列の約４、６、８、１０、１２、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、又は５００個未満の長さの連続するアミノ酸を有するペプチドを含むことができ、から本質的になることができ、かつ／又は、からなることができる。

【００５１】

本明細書において用いられる「機能的断片」は、そのポリペプチドと通常関連する少なくとも１つの生物学的活性（例えば、抗体結合）を実質的に維持するものを指す。「機能的断片」は、修飾されていないポリペプチドが有する活性の全てを実質的に維持する。生物学的活性を「実質的に維持する」とは、ポリペプチドが、ネイティブのポリペプチドの生物学的活性の少なくとも約２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７５％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、又はそれよりも多くを維持する（及び、ネイティブのポリペプチドよりも高い活性レベルを有することもできる）ことを意味する。「非機能性」ポリペプチドとは、そのポリペプチドと通常関連する検出可能な生物学的活性をほとんど示さないか、又は本質的に示さないものを指す（例えば、せいぜい、ほんのわずかな量、例えば約１０％未満又は実に５％）。抗体結合のような生物学的活性は、当技術分野でよく知られており本明細書中に記載されるアッセイを用いて測定することができる。

【００５２】

核酸に関して本明細書において用いられる用語「作動可能に連結される」とは、２つ以上の核酸の間の機能的な連結を指す。例えば、プロモーター配列は、異種核酸配列の転写を開始及び／又は媒介するため、プロモーター配列は異種核酸配列と「作動可能に連結」されると記載され得る。いくつかの実施形態では、作動可能に連結された核酸配列は、連続しており、かつ／又は、同一のリーディングフレーム内にある。

【００５３】

本明細書において用いられる用語「オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）」は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば遺伝子）の部分を指し、ポリペプチドの転写を開始する開始スタート部位（すなわち、コザック配列）を含む。用語「コード領域」は、オープンリーディングフレームと互換的に用いられ得る。

【００５４】

本明細書において用いられる用語「コドン最適化」は、コード配列（例えば、野生型配列、例えばタンパク質Ｍに関するコード配列を含む）内に通常存在する１つ以上のコドンを、同一（同義）アミノ酸に関するコドンで置換することによって、発現を増加させるように最適化されている遺伝子コード配列を指す。この様式において、遺伝子によってコードされるタンパク質は同一であるが、根底となる遺伝子の核酸塩基配列又は対応するｍＲＮＡは異なる。いくつかの実施形態では、最適化は、１つ以上のレアコドン（すなわち、特定の種由来の細胞において相対的に稀に生じるｔＲＮＡに関するコドン）を、翻訳の効率を改善するために、より頻繁に生じる同義コドンによって置換する。例えば、ヒトコドン最適化では、コード配列内の１つ以上のコドンは、同一アミノ酸に関してヒト細胞においてより頻繁に生じるコドンによって置換される。コドン最適化は、転写及び／又は翻訳の効率を改善し得る他のメカニズムを通して遺伝子発現を増加することもできる。ストラテジーは、制限されずに、合計ＧＣ含有量（すなわち、コード配列全体におけるグアニン

及びシトシンのパーセント）の増加、ＣｐＧ含有量（すなわち、コード配列におけるＣＧ又はＧＣジヌクレオチドの数）の低減、潜在的スプライスのドナー又はアクセプター部位の除去、及び／又は、コザック配列のようなリボソームエントリー及び／又は開始部位の付加又は除去を含む。望ましくは、コドン最適化遺伝子は、改善されたタンパク質発現を示し、例えば、それによってコードされるタンパク質は、他の点で同様の細胞において野生型遺伝子によって提供されるタンパク質の発現レベルと比較して、細胞において、検出可能により大きなレベルで発現される。コドン最適化はまた、インビトロ又はインビボで、内因性遺伝子及び／又は対応するｍＲＮＡからコドン最適化遺伝子及び／又は対応するｍＲＮＡを区別する能力を提供する。

【００５５】

本明細書において用いられる用語「配列同一性」は、当技術分野における標準的な意味を有する。当技術分野で知られているように、多くの異なるプログラムを用いて、ポリヌクレオチド又はポリペプチドが公知配列と配列同一性又は類似性を有するかどうか同定することができる。配列同一性又は類似性は、Ｓｍｉｔｈ＆Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２（１９８１）のローカル配列同一性アルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ＆Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３（１９７０）の配列同一性アライメントアルゴリズムにより、Ｐｅａｒｓｏｎ＆Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５：２４４４（１９８８）の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装により（ＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、及びＴＦＡＳＴＡ、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、５７５Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）、Ｄｅｖｅｒｅｕｘ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１２：３８７（１９８４）により記載されるＢｅｓｔ Ｆｉｔ配列プログラムを含むがこれらに限定されない、当技術分野で知られている標準的な技術を使用して、好ましくはデフォルト設定を用いて、又は調査により、決定され得る。

【００５６】

有用なアルゴリズムの例は、ＰＩＬＥＵＰである。ＰＩＬＥＵＰは、プログレッシブ・ペアワイズアライメントを用いて、関連のある配列のグループから複数の配列アライメントを作る。また、アライメントを作るために用いられるクラスタリング関係を示すツリーをプロットすることもできる。ＰＩＬＥＵＰは、Ｆｅｎｇ＆Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｖｏｌ．３５：３５１（１９８７）の漸進的アライメント方法を簡略化したものを使用し、この方法は、Ｈｉｇｇｉｎｓ＆Ｓｈａｒｐ，ＣＡＢＩＯＳ５：１５１（１９８９）に記載されるものと同様である。

【００５７】

有用なアルゴリズムの別の例は、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３（１９９０）及びＫａｒｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０：５８７３（１９９３）に記載されるＢＬＡＳＴアルゴリズムである。特に有用なＢＬＡＳＴプログラムは、ＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２プログラムであり、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，２６６：４６０（１９９６）；ｂｌａｓｔ．ｗｕｓｔｌ／ｅｄｕ／ｂｌａｓｔ／ＲＥＡＤＭＥ．ｈｔｍｌから入手した。ＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２は、いくつかの検索パラメーターを用いて、それらは好ましくは、デフォルト値に設定されている。パラメーターは、動的な値であり、特定の配列の構成、及び目的の配列が検索されている特定のデータベースの構成に応じて、プログラム自体によって確立されるが；感度を増加させるために値を調整することもできる。

【００５８】

追加の有用なアルゴリズムは、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９（１９９７）によって報告されるようなギャップＢＬＡＳＴである。

【００５９】

アミノ酸配列同一性の値のパーセンテージは、一致する同一残基の数を、アライメントされた領域内の「より長い」配列の残基の総数で割ることによって決定される。「より長い」配列は、アライメントされた領域内の実際の残基が最も多いものである（アライメントスコアを最大化するためにＷＵ－Ｂｌａｓｔ－２により導入されるギャップは無視する）。

【００６０】

同様の様式で、核酸配列同一性パーセントは、本明細書において具体的に開示されるポリヌクレオチド内のヌクレオチドと同一である候補配列内のヌクレオチド残基のパーセンテージとして定義される。

【００６１】

アライメントは、並べられる配列内のギャップの導入を含んでよい。更に、本明細書において具体的に開示されるポリヌクレオチドよりも多い又は少ないヌクレオチドを含む配列に関して、一実施形態では、配列同一性のパーセンテージは、ヌクレオチドの合計数に対する、同一のヌクレオチドの数に基づいて決定されることが理解される。したがって、例えば、本明細書に具体的に開示される配列よりも短い配列の配列同一性は、一実施形態では、より短い配列におけるヌクレオチドの数を用いて決定される。同一性のパーセントの計算においては、相対的重みづけは、配列バリエーション、例えば挿入、欠失、置換などの様々な出現に割り当てられない。

【００６２】

一実施形態では、同一性のみが正にスコアされて（＋１）、ギャップを含む全ての形態の配列バリエーションは「０」の値に割り当てられて、配列類似性計算に関して以下に記載される重みづけスケール又はパラメーターの必要性を取り除く。配列同一性パーセントは、例えば、一致する同一残基の数を、アライメントした領域内の「より短い」配列の総残基数で割り、１００を掛けることによって計算することができる。「より長い」配列は、アライメントされた領域内で最も多くの実際の残基を有する配列である。

【００６３】

本明細書において用いられる「単離された」核酸又はヌクレオチド配列（例えば、「単離されたＤＮＡ」又は「単離されたＲＮＡ」）は、天然起源の生物又はウイルスの他の構成要素の少なくとも一部、例えば、細胞又はウイルスの構造的構成要素又は核酸又はヌクレオチド配列と関連して一般に見られる他のポリペプチド又は核酸から、分離された又は実質的に含まれない核酸又はヌクレオチド配列を意味する。

【００６４】

同様に、「単離された」ポリペプチドは、天然起源の生物又はウイルスの他の構成要素の少なくとも一部、例えば、細胞又はウイルスの構造的構成要素又はポリペプチドと関連して一般に見られる他のポリペプチド又は核酸から、分離された又は実質的に含まれないポリペプチドを意味する。

【００６５】

本明細書で使用される場合、用語「修飾された」は、ポリヌクレオチド又はポリペプチド配列に適用される場合、１つ以上の欠失、付加、置換、又はそれらの任意の組み合わせにより野生型配列とは異なる配列を指す。

【００６６】

本明細書において用いられる、ウイルスベクターを「単離する」（又は文法上の同等物）によって、ウイルスベクターが、出発原料中の他の構成要素の少なくとも一部から少なくとも部分的に分離されることを意味する。

【００６７】

用語「治療する（ｔｒｅａｔ）」、「治療する（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」又は「の治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ　ｏｆ）」（又は文法上の同等の用語）によって、対象の状態の重症度を減少させること、又は、少なくとも部分的に改善又は改良すること、及び／又は、少なくとも１つの臨床症候を緩和、軽減又は低減させること、及び／又は、症状の進行を遅延させることを意味する。

【００６８】
本明細書において用いられる用語「予防する（ｐｒｅｖｅｎｔ）」、「予防する（ｐｒｅｖｅｎｔｓ）」、又は「予防（ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ）」（及びその文法上の同等物）は、疾患の発症を遅延又は阻害することを意味する。用語は、疾患の完全な消滅を必要とすることを意味せず、症状の発生率を減少させるため、又は症状の発症を遅らせるための、任意のタイプの予防的治療を包含する。
【００６９】
本明細書において用いられる「治療有効」量は、対象に対して何らかの改善又は利益を与えるのに十分な量である。別の言い方をすると、「治療有効」量は、対象における少なくとも１つの臨床症候の何らかの緩和、軽減、低減又は安定化を提供する量である。当業者は、何らかの利益が対象に提供される限り治療的効果は完全又は治癒的である必要はないことを理解している。
【００７０】
本明細書で使用される「予防有効量」は、本発明の方法が存在しない場合に起こるものと比較して、対象における疾患、障害、及び／若しくは臨床症状の発症を予防並びに／又は遅らせる、かつ／あるいは対象における疾患、障害、及び／若しくは臨床症状の発症の重篤度を軽減並びに／又は遅らせるのに十分な量である。当業者は、何らかの利益が対象に提供される限り予防のレベルは完全である必要はないことを理解している。
【００７１】
ウイルスに関する、「異種ヌクレオチド配列」又は「異種核酸」は、それぞれ、ウイルスにおいて天然起源でない配列又は核酸である。一般に、異種核酸又はヌクレオチド配列は、ポリペプチド及び／又は非翻訳ＲＮＡをコードするオープンリーディングフレームを含む。
【００７２】
「ベクター」は、外来遺伝物質を別の細胞（そこで複製及び／又は発現されることができる）へ運ぶためのビヒクルとして用いられる化合物を指す。外来核酸を含むクローニングベクターは、組換えベクターと呼ばれる。核酸ベクターの例は、プラスミド、ウイルスベクター、コスミド、発現カセット、及び人工染色体である。組換えベクターは典型的に、複製起点、マルチクローニング部位、及び選択可能マーカーを含む。核酸配列は典型的に、挿入物（組換え核酸又は導入遺伝子）及びベクターの「主鎖」として働くより大きな配列からなる。遺伝情報を別の細胞へ移行させるベクターの目的は典型的に、標的細胞において、挿入物を単離、増殖、又は発現させることである。発現ベクター（発現構築物又は発現カセット）は、標的細胞における外因性遺伝子の発現のためのものであり、一般に、外因性遺伝子／ＯＲＦの発現を駆動するプロモーター配列を有する。標的細胞へのベクターの挿入は、細菌及び真核生物細胞については形質転換又はトランスフェクションと呼ばれるが、ウイルスベクターの挿入は、しばしば形質導入と呼ばれる。また、用語「ベクター」は一般に、外来遺伝物質を別の細胞、例えば制限されないが、形質転換される細胞又はナノ粒子へ運ぶ働きをするためのアイテムを説明するために用いられてもよい。
【００７３】
本明細書において用いられる用語「ベクター」、「ウイルスベクター」、「送達ベクター」（及び同様の用語）は、特定の実施形態では、一般に、核酸送達ビヒクルとして機能するウイルス粒子を指し、ビリオン内にパッケージされたウイルス核酸（すなわち、ベクターゲノム）を含む。本発明に係るウイルスベクターは、本発明に係るキメラＡＡＶカプシドを含み、ＡＡＶ若しくはｒＡＡＶゲノム又は任意の他の核酸（ウイルス核酸を含む）をパッケージすることができる。あるいは、一部の文脈においては、用語「ベクター」、「ウイルスベクター」、「送達ベクター」（及び同様の用語）は、ビリオンが不存在のベクターゲノム（例えば、ｖＤＮＡ）、及び／又は、カプシドにつながれた、又はカプシド内にパッケージされた分子を送達するための輸送体として作用するウイルスカプシドを指すために用いられ得る。
【００７４】

本発明のウイルスベクターは更に、国際特許公開第０１／９２５５１号に記載される二重パルボウイルス粒子であってよい（その開示は参照によりその全体で本明細書中に援用される）。したがって、いくつかの実施形態では、二本鎖（二重）ゲノムがパッケージされ得る。

【００７５】

「組換えＡＡＶベクターゲノム」又は「ｒＡＡＶゲノム」は、少なくとも１つの逆位末端配列（例えば、１、２、又は３つの逆位末端配列）及び１つ以上の異種ヌクレオチド配列を含むＡＡＶゲノム（すなわち、ｖＤＮＡ）である。ｒＡＡＶベクターは一般に、ウイルスを産生するためにシスで１４５塩基の末端反復（単数又は複数）（ＴＲ（ｓ））を保持しているが、部分的又は完全に合成の配列を含む修飾ＡＡＶ　ＴＲ及び非ＡＡＶ　ＴＲも、この目的を果たすことができる。全ての他のウイルス配列は必ずしも必要でなく、トランスで供給されてよい（Ｍｕｚｙｃｚｋａ，（１９９２）Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：９７）。ｒＡＡＶベクターは、２つのＴＲ（例えば、ＡＡＶ　ＴＲ）を含んでもよく、それらは一般に、異種ヌクレオチド配列（単数又は複数）の５’及び３’末端にあるが、それに連続している必要はない。ＴＲは、互いに同一又は異なってよい。ベクターゲノムは、単一のＩＴＲをその３’又は５’末端に含んでもよい。

【００７６】

用語「末端反復」又は「ＴＲ」は、ヘアピン構造を形成して逆位末端配列（ＩＴＲ）として機能する（すなわち、複製、ウイルスパッケージング、インテグレーション及び／又はプロウイルスレスキューなどの所望の機能を仲介する）、任意のウイルス末端反復又は合成配列を含む。ＴＲは、ＡＡＶ　ＩＴＲ又は非ＡＡＶ　ＴＲであってよい。例えば、他のパルボウイルス（例えば、イヌパルボウイルス（ＣＰＶ）、マウスパルボウイルス（ＭＶＭ）、ヒトパルボウイルスＢ－１９）のもののような非ＡＡＶ　ＴＲ配列、又は、ＳＶ４０複製起源として作用するＳＶ４０ヘアピンを、ＴＲとして用いることができ、それは、トランケーション、置換、欠失、挿入及び／又は付加によって更に修飾されてよい。更に、ＴＲは、Ｓａｍｕｌｓｋｉらの米国特許第５，４７８，７４５号に記載されている「ダブル－Ｄ配列」など、部分的又は完全に合成することができる。

【００７７】

パルボウイルスゲノムは、回文構造の配列をその５’及び３’両末端に有する。配列の回文構造の性質は、相補塩基対の間の水素結合の形成によって安定化されるヘアピン構造の形成を生じさせる。このヘアピン構造は、「Ｙ」又は「Ｔ」形状をとると考えられている。例えば、ＦＩＥＬＤＳ　ｅｔ　ａｌ．，ＶＩＲＯＬＯＧＹ、第２巻、第６９＆７０章（第４版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）を参照。

【００７８】

「ＡＡＶ逆位末端反復」又は「ＡＡＶ　ＩＴＲ」は、制限されないが、血清型１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０若しくは１１、又は、現在知られ又は後に発見される任意の他のＡＡＶを含む任意のＡＡＶ由来であってよい（例えば、表１を参照）。ＡＡＶＩＴＲは、ＩＴＲが所望の機能、例えば、複製、ウイルスパッケージング、組み込み、及び／又はプロウイルスレスキューなどを媒介する限り、天然のＩＴＲ配列を有する必要はない（例えば、天然のＡＡＶ　ＩＴＲ配列は、挿入、欠失、切断、及び／又はミスセンス変異によって変更され得る）。

【００７９】

用語「ｒＡＡＶ粒子」及び「ｒＡＡＶビリオン」は、本明細書において互換的に用いられる。ｒＡＡＶ粒子」又は「ｒＡＡＶビリオン」は、ＡＡＶカプシド内にパッケージされたｒＡＡＶベクターゲノムを含む。

【００８０】

本発明のウイルスベクターは更に、国際特許公開第００／２８００４号及びＣｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ２：６１９に記載されている「標的化」ウイルスベクター（例えば、方向付けされた指向性を有する）及び／又は「ハイブリ

ッド」パルボウイルス（すなわち、ウイルスＩＴＲ及びウイルスカプシドが異なるパルボウイルスに由来する）であり得る。

【００８１】

更に、ウイルスカプシド又はゲノム要素は、挿入、欠失及び／又は置換を含む他の修飾を含むことができる。

【００８２】

本明細書において用いられる用語「アミノ酸」は、任意の天然起源アミノ酸、それらの修飾された形態、及び合成アミノ酸を包含し、非天然起源アミノ酸を含む。

【００８３】

天然起源、左旋性（Ｌ－）アミノ酸を表２に示す。

【表２】

表２

アミノ酸残基	略称	
	3文字コード	1文字コード
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸(アスパル	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン	Gln	Q
グルタミン酸(グルタメー	Glu	E
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

【００８４】

あるいは、アミノ酸は、修飾アミノ酸残基（非限定的な例を表３に示す）であってもよいし、翻訳後修飾（例えば、アセチル化、アミド化、ホルミル化、ヒドロキシル化、メチル化、リン酸化、又は硫酸化）によって修飾されたアミノ酸であってもよい。

【表３】

表３：アミノ酸残基誘導体

修飾アミノ酸残基	略称
2-アミノアジピン酸	Aad
3-アミノアジピン酸	bAad
ベータ-アラニン、ベータ-アミノプロプリオン酸	bAla
2-アミノ酪酸	Abu
4-アミノ酪酸、ピペリジン酸	4Abu
6-アミノカプロン酸	Acp
2-アミノヘプタン酸	Ahe
2-アミノイソ酪酸	Aib
3-アミノイソ酪酸	bAib
2-アミノピメリン酸	Apm
t-ブチルアラニン	t-BuA
シトルリン	Cit
シクロヘキシルアラニン	Cha
2,4-ジアミノ酪酸	Dbu
デスモシン	Des
2,2’-ジアミノピメリン酸	Dpm
2,3-ジアミノプロプリオン酸	Dpr
N-エチルグリシン	EtGly
N-エチルアスパラギン	EtAsn
ホモアルギニン	hArg
ホモシステイン	hCys
ホモセリン	hSer
ヒドロキシリジン	Hyl
アロ-ヒドロキシリジン	aHyl
3-ヒドロキシプロリン	3Hyp
4-ヒドロキシプロリン	4Hyp
イソデスモシン	Ide
アロ-イソロイシン	aIle
メチオニンスルホキシド	MSO
N-メチルグリシン、サルコシン	MeGly
N-メチルイソロイシン	MeIle
6-N-メチルリシン	MeLys
N-メチルバリン	MeVal
2-ナフチルアラニン	2-Nal
ノルバリン	Nva
ノルロイシン	Nle
オルニチン	Orn
4-クロロフェニルアラニン	Phe(4-C1)
2-フルオロフェニルアラニン	Phe(2-F)
3-フルオロフェニルアラニン	Phe(3-F)
4-フルオロフェニルアラニン	Phe(4-F)
フェニルグリシン	Phg
ベータ-2-チエニルアラニン	Thi

【００８５】

更に、非天然アミノ酸は、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，（２００６）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｓｔｒｕｃｔ．３５：２２５－４９によって記載されているような「非天然」アミノ酸であり得る。これらの非天然アミノ酸は、目的分子をＡＡＶカプシドタンパク質に化学的に連結させるために有利に用いることができる。

【００８６】

保存的アミノ酸置換は、当技術分野で知られている。特定の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、以下の群：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、ア

ルギニン；及び／又はフェニルアラニン、チロシンの１つ以上における置換を含む。
【００８７】
用語「テンプレート」又は「基質」は、本明細書において、パルボウイルスのウイルスＤＮＡを生産するために複製され得るポリヌクレオチド配列を指すために用いられる。ベクター生産の目的のために、テンプレートは、典型的に、制限されないが、プラスミド、ネイキッドＤＮＡベクター、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）又はウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ＡＡＶ、バキュロウイルス、レトロウイルスベクターなど）を含む、より大きなヌクレオチド配列又は構築物内に埋め込まれる。あるいは、テンプレートは、パッケージング細胞の染色体内に安定的に組み込まれ得る。
【００８８】
本明細書において用いられる、パルボウイルス又はＡＡＶ「Ｒｅｐコード配列」は、ウイルス複製及び新たなウイルス粒子の生産を仲介するパルボウイルス又はＡＡＶの非構造的タンパク質をコードする核酸配列を示す。パルボウイルス及びＡＡＶ複製遺伝子並びにタンパク質は、例えば、ＦＩＥＬＤＳ　ｅｔ　ａｌ．，ＶＩＲＯＬＯＧＹ、第２巻、第６９章及び第７０章（第４版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）に記載されている。
【００８９】
「Ｒｅｐコード配列」は、パルボウイルス又はＡＡＶ　Ｒｅｐタンパク質の全てをコードする必要はない。例えば、ＡＡＶに関しては、Ｒｅｐコード配列は、４つのＡＡＶ　Ｒｅｐタンパク質（Ｒｅｐ７８、Ｒｅｐ６８、Ｒｅｐ５２及びＲｅｐ４０）の全てをコードする必要はなく、実際に、ＡＡＶ５は、スプライスされたＲｅｐ６８及びＲｅｐ４０タンパク質のみを発現すると考えられている。代表的な実施形態では、Ｒｅｐコード配列は、ウイルスゲノム複製及び新しいビリオンへのパッケージングに必要な複製タンパク質を少なくともコードする。Ｒｅｐコード配列は、一般に、少なくとも１つの大きなＲｅｐタンパク質（すなわち、Ｒｅｐ７８／６８）及び１つの小さなＲｅｐタンパク質（すなわち、Ｒｅｐ５２／４０）をコードする。特定の実施形態では、Ｒｅｐコード配列は、ＡＡＶ　Ｒｅｐ７８タンパク質、並びにＡＡＶ　Ｒｅｐ５２及び／又はＲｅｐ４０タンパク質をコードする。他の実施形態では、Ｒｅｐコード配列は、Ｒｅｐ６８及びＲｅｐ５２及び／又はＲｅｐ４０タンパク質をコードする。更に、更なる実施形態では、Ｒｅｐコード配列は、Ｒｅｐ６８及びＲｅｐ５２タンパク質、Ｒｅｐ６８及びＲｅｐ４０タンパク質、Ｒｅｐ７８及びＲｅｐ５２タンパク質、又は、Ｒｅｐ７８及びＲｅｐ４０タンパク質をコードする。
【００９０】
本明細書において用いられる用語「大きなＲｅｐタンパク質」は、Ｒｅｐ６８及び／又はＲｅｐ７８を指す。特許請求の範囲に記載される発明の大きなＲｅｐタンパク質は、野生型又は合成のいずれかであってよい。野生型の大きなＲｅｐタンパク質は、制限されないが、血清型１、２、３ａ、３ｂ、４、５、６、７、８、９、１０、１１、又は１３を含む任意のパルボウイルス又はＡＡＶ、又は、現在知られ又は後に発見される任意の他のＡＡＶ由来であってよい（例えば、表１を参照）。合成の大きなＲｅｐタンパク質は、挿入、欠失、トランケーション及び／又はミスセンス変異によって変更され得る。
【００９１】
当業者は、複製タンパク質が同一のポリヌクレオチドによってコードされる必要はないことを更に理解する。例えば、ＭＶＭに関しては、ＮＳ－１及びＮＳ－２タンパク質（スプライスバリアント）は、互いに独立して発現され得る。同様に、ＡＡＶに関しては、ｐ１９プロモーターは不活化され、大きなＲｅｐタンパク質は１つのポリヌクレオチドから発現され、小さなＲｅｐタンパク質は異なるポリヌクレオチドから発現され得る。しかしながら、典型的には、単一の構築物から複製タンパク質を発現させる方がより便利である。一部のシステムでは、ウイルスプロモーター（例えば、ＡＡＶ　ｐ１９プロモーター）は、細胞によって認識されなくてよく、したがって、別個の発現カセットから大きな及び

小さなＲｅｐタンパク質を発現する必要がある。他の例では、大きなＲｅｐタンパク質及び小さなＲｅｐタンパク質を、別個に、すなわち、別個の転写及び／又は翻訳制御要素の制御下で発現することが望ましくあり得る。例えば、小さなＲｅｐタンパク質に対する大きな方の比を低減させるように、大きなＲｅｐタンパク質の発現を制御することが望ましくあり得る。昆虫細胞の場合は、細胞に対する毒性を避けるために、大きなＲｅｐタンパク質（例えば、Ｒｅｐ７８／６８）の発現を下方調節することが有利であり得る（例えば、Ｕｒａｂｅ　ｅｔ　ａｌ．，（２００２）Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ１３：１９３５を参照）

【００９２】

本明細書において用いられる、パルボウイルス又はＡＡＶ「ｃａｐコード配列」は、機能的なパルボウイルス又はＡＡＶカプシドを形成する（すなわち、ＤＮＡをパッケージングして標的細胞に感染することができる）構造タンパク質をコードする。典型的に、ｃａｐコード配列は、パルボウイルス又はＡＡＶカプシドサブユニットの全てをコードするが、機能性カプシドが生産される限り、全てよりも少ないカプシドサブユニットがコードされてよい。典型的に、必ずしもではないが、ｃａｐコード配列は、単一の核酸分子上に存在する。

【００９３】

自律的パルボウイルス及びＡＡＶのカプシド構造は、ＢＥＲＮＡＲＤ　Ｎ．ＦＩＥＬＤＳ　ｅｔ　ａｌ．，ＶＩＲＯＬＯＧＹ、第２巻、第６９章及び第７０章（第４版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）に更に詳細に記載されている。

【００９４】

特性を「実質的に維持する」とは、特性（例えば、活性又は他の測定可能な特徴）の少なくとも約７５％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％又は１００％が維持されることを意味する。

【００９５】

抗体と結合するためのタンパク質Ｍ及びその誘導体を使用する方法

本発明の一態様は、対象への異種薬剤の投与時に抗体を中和することによって異種薬剤の中和を阻害する方法であって、有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質を対象に投与し、それによって異種薬剤の中和を阻害することを含む、方法に関する。

【００９６】

本発明の別の態様は、対象においてポリペプチド又は機能的核酸を発現させる方法であって、（ａ）ポリペプチド又は機能的核酸をコードする核酸送達ベクターと、（ｂ）有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいはマイコプラズマタンパク質Ｍも又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質と、を対象へ投与し、それによって対象においてポリペプチド又は機能的核酸を発現させることを含む、方法に関する。

【００９７】

本発明の更なる態様は、対象における遺伝子を編集する方法であって、（ａ）遺伝子編集複合体と、（ｂ）有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質と、を対象に投与し、それによって対象においてポリペプチド又は機能的核酸を発現させることを含む、方法に関する。

【００９８】

本明細書において用いられる用語「異種薬剤」は、その薬剤が投与される対象において天然に見られない薬剤を指す。その用語はまた、対象において天然に見られる因子の組換え又は合成バージョンも含む。異種薬剤は、それに対する中和抗体が異種薬剤の投与前に対象内に存在するものであってよく、又は対象への投与の際に中和抗体を産生する可能性があるものであってよい。異種薬剤は、対象へ投与されたことが一度もないものであって

よい。異種薬剤は、以前に対象へ投与されたことがあるものであってよい。

【００９９】

本明細書において用いられる用語「中和抗体」は、対象へ投与された後に、異種薬剤と特異的に結合して、異種薬剤の１つ以上の生物学的活性を阻害する抗体を指す。

【０１００】

いくつかの実施形態では、異種薬剤は、核酸送達ベクター、例えば、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターであってよい。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、腫瘍溶解性ベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ポリオウイルス、又はアデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、非ウイルスベクターは、プラスミド、リポソーム、荷電脂質、核酸タンパク質複合体、又は生体高分子である。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、異種薬剤は、遺伝子編集複合体、例えばＣＲＩＳＰＲ複合体である。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、異種薬剤は、タンパク質又は核酸である。いくつかの実施形態では、タンパク質は、酵素、調節タンパク質、又は構造タンパク質、例えば、対象における欠失又は欠陥タンパク質の代わりに用いることができるものである。いくつかの実施形態では、核酸は、機能的核酸、例えば、アンチセンス核酸又は阻害性ＲＮＡである。

【０１０３】

有効量のタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、中和抗体による異種薬剤の阻害を少なくとも部分的にブロックする、及び／又は自己中和抗体の異種薬剤と結合する能力を打ち負かす量である。いくつかの実施形態では、有効量のタンパク質Ｍ又はその機能性断片若しくは誘導体は、中和を少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８、９９％、９９．５％、又は９９．９％阻害するのに十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量のタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、対象におけるタンパク質Ｍの総免疫グロブリンに対する比がモル基準で約０．５：１～約８：１、又はその中の任意の範囲、例えば、約０．５：１、１：１、１．５：１、２：１、２．５：１、３：１、３．５：１、４：１、４．５：１、５．５：１、６：１、６．５：１、７：１、７．５：１、若しくは８：１、又はその中の任意の範囲を生成するのに十分な量である。他の実施形態では、比は、約８：１～約５０：１である。いくつかの実施形態では、比は、約０．５：１～約６：１、約０．５：１～約４：１、約０．５：１～約２．５：１、約０．５：１～約２：１、約１：１～約８：１、約１．５：１～約８：１、又は約２：１～約８：１である。一実施形態では、比は、約１：１～約３：１、例えば、約２：１である。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、投与は、約１ｅ９ｖｇ／ｋｇ～約１ｅ１４ｖｇ／ｋｇ、約１ｅ１０ｖｇ／ｋｇ～約１ｅ１３ｖｇ／ｋｇ、又は約１ｅ１１ｖｇ／ｋｇ～約１ｅ１２ｖｇ／ｋｇのＡＡＶ、約１μｌ～約６Ｌの血清、及び約１ｍｇ／ｋｇ～約１０００ｍｇ／ｋｇ、約１０ｍｇ／ｋｇ～約９００ｍｇ／ｋｇ、約２５ｍｇ／ｋｇ～約８００ｍｇ／ｋｇ、約５０ｍｇ／ｋｇ～約６００ｍｇ／ｋｇ、約１００ｍｇ／ｋｇ～約５００ｍｇ／ｋｇ、又は約２００ｍｇ／ｋｇ～約４００ｍｇ／ｋｇのタンパク質Ｍを含む。

【０１０５】

総免疫グロブリンは、総血清免疫グロブリンであってよい（例えばタンパク質Ｍの全身投与について）。総免疫グロブリンは、局在化された流体又は組織における合計レベルで

あってよい（例えば、眼、耳、肺、脳、筋肉、関節などへの特異的な送達について）。総免疫グロブリンは、当技術分野で知られている任意の技術によって、例えば、免疫グロブリンのＦｃ領域と結合する抗体を用いた血清に対するＥＬＩＳＡを行うことによって、又は免疫グロブリンと結合するプロテインＡ又はＧを用いることによって、測定され得る。更に、マウスについては、それらの血清は５ｍｇ／ｍｌ～１０ｍｇ／ｍｌの免疫グロブリンを含むことが知られている。ヒトにおける血清免疫グロブリンに関する正常範囲は８～１０ｍｇ／ｍｌである。インビボでの概算については、１０ｍｇ／ｍｌの最上位（ｈｉｇｈ　ｅｎｄ）を用いて比を計算することができる。局所的な免疫グロブリン含有量は、組織重量（４０ｍＬの血清／１ｋｇ体重）、又は特定の体液中のＩｇの濃度、及び血液血清よりも少ない場合はその臓器内の体液容量（例えば、眼、脳脊髄液）に基づいて概算することができる。

【０１０６】

タンパク質Ｍは、中和抗体による異種薬剤の阻害をブロックするのに効果的であることが見出された任意のスケジュールによって対象へ投与され得る。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、異種薬剤の投与前、例えば、異種薬剤の投与の少なくとも約、１、５、１０、１５、２０、３０、４０、若しくは５０分、又は少なくとも約１、２、３、４、５、６、１２、１８、２４、４８、若しくは７２時間前に対象へ投与される。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、異種薬剤の投与と同時に対象に投与される。本明細書において用いられる用語「同時に（ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔｌｙ）」は、組み合わせた効果を生じるのに十分に近い時間を意味する（すなわち、「同時に（ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔｌｙ）」とは、「一緒に（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓｌｙ）」であってよく、又は、短期間内に互いに前後して生じる２つ以上のイベントであってよい）。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、異種薬剤は、対象への投与前に、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質と組み合わされ、例えば、２つの成分は、単一の組成物中に、投与される前に一緒に混合される。異種薬剤は、対象への投与の少なくとも約１、５、１０、１５、２０、３０、４０、若しくは５０分、又は少なくとも約１、２、３、４、５、６、１２、１８、若しくは２４時間前に、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質と組み合わせることができる。他の実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質及び異種薬剤は、別個の組成物で投与される。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、治療的効果又は有益な効果を提供するために、異種薬剤及び／又は、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質を対象に１回を超えて投与することが必要であり得る。タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、例えば、１、２、３、４回、又はそれ以上投与され得る。投与は、数日、数週間、数ヶ月、又は数年（例えば、約２日～約１０年以上）間隔であり得る。いくつかの実施形態では、投与は、抗体サイクリングの量を減少させ、減少の開始は、約１時間～約３時間である。いくつかの実施形態では、投与は、抗体サイクリングの量を減少させ、減少の開始が、約５分～約８週、約５分～約１時間、約１時間～約２日、又は約２日～約８週である。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘

導体を含む融合タンパク質は、異種薬剤が対象へ投与されるときに毎回、例えば、上述と同様の様式で、例えば、異種薬剤の前又は同じ時間に、対象へ投与される。異種薬剤の各投与に伴うタンパク質Ｍの使用は、再投与の際にしばしば問題となる異種薬剤に対するＮＡｂの効果が存在し得る。いくつかの実施形態では、同じタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質が、毎回投与される。他の実施形態では、異なるタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質、例えば、以下で更に説明するように、異なる修飾タンパク質Ｍが毎回投与される。理論によって拘束されずに、各投与で異なるタンパク質Ｍ誘導体を使用することは、同一タンパク質の再投与によって生じ得るタンパク質Ｍに対する阻害抗体の効果を制限し得ると考えられる。また、飽和用量のタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質の投与は、タンパク質Ｍに対する任意の阻害抗体を打ち負かし、抗原認識を妨げると考えられる。いくつかの実施形態では、投与は、自己中和抗体に勝る。

【０１０９】

タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質が抗体と非特異的に結合する能力は、抗原との抗体の結合を阻害することが有益な他の方法、例えば、免疫抑制が望ましい場合又は過剰な抗体が存在する場合に有利に使用され得る。

【０１１０】

本発明の更なる態様は、自己免疫疾患を治療することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、治療有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質を対象に投与し、それによって自己免疫疾患を治療することを含む、方法に関する。

【０１１１】

本明細書において用いられる用語「自己免疫疾患」は、自己免疫反応と関連する任意の障害を指す。例には、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸症候群、過敏性腸症候群、ブドウ膜炎、インスリン依存性糖尿病、溶血性貧血（例えば、温式自己免疫性溶血性貧血）、リウマチ熱、グッドパスチャー症候群、ギラン・バレー症候群、乾癬、甲状腺炎、バセドウ病、重症筋無力症、糸球体腎炎、自己免疫性肝炎、免疫性血小板減少性紫斑病、急性炎症性脱髄性多発神経障害、抗体媒介性急速進行性糸球体腎炎、慢性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、過粘度症候群、再発性限局性分節性糸球体硬化症、視神経脊髄炎スペクトル障害、クリオグロブリン血症、自己免疫性脳炎、自己免疫性神経障害、ＡＮＣＡ血管炎、自己免疫性好中球減少症、抗ＧＢＭ疾患、尋常性天疱瘡、シェーグレン症候群、ループス腎炎、及び免疫性血球減少症が含まれるが、これらに限定されない。

【０１１２】

本発明の更なる態様は、過剰な抗体と関連する障害を治療することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、治療有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質を対象に投与し、それによって過剰な抗体と関連する障害を治療することを含む、方法に関する。本明細書において用いられる用語「過剰抗体と関連する障害」は、障害の原因又は少なくとも１つの症候が、血中又は体内の他の場所における、平均よりも高い抗体レベルに起因する任意の障害を指す。例としては、多発性骨髄腫、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症（ＭＧＵＳ）、ワルデンストレームマクログロブリン血症、サイトカイン放出症候群、又は急性自己免疫攻撃、例えば、突然発症する重度の自己免疫性血管炎が挙げられるが、これらに限定されない。また、方法は、自己免疫性イベント、例えば、サイトカイン放出症候群又は急性自己免疫性

発作、例えば、突然発症する重度の自己免疫性血管炎を急速に止めるための全抗体の急性的なブロック、又は抗体が介在する免疫複合体の形成によって引き起こされる移植組織及び／若しくは移植臓器に対する損傷の防止に有用であり得る。

【０１１３】

本発明の方法のいずれについても、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、有効であることが分かっている任意の投与経路（例えば、局所的又は全身的）によって対象に投与することができる。

【０１１４】

最も適切な経路は、治療される対象及び治療される障害又は状態に依存する。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、経口、直腸、経粘膜、鼻腔内、吸入（例えばエアロゾルによる）、口腔（例えば舌下）、膣、髄腔内、眼球内、硝子体内、蝸牛内、経皮、内皮内、子宮内（又は胚内）、非経口（例えば、静脈内、皮下、皮内、頭蓋内、筋肉内［骨格筋、横隔膜及び／又は心筋への投与を含む］、胸膜内、脳内、及び関節内）、局所（例えば、皮膚及び粘膜表面（気道表面を含む）の両方、及び経皮投与）、リンパ内など、並びに直接的な組織又は臓器注入（例えば、肝臓、眼、骨格筋、心筋、横隔膜筋又は脳）から選択される経路によって、対象へ投与される。

【０１１５】

タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、対象の任意の組織若しくは器官に送達又は標的化され得る。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、例えば、骨格筋、平滑筋、心臓、横隔膜、気道上皮、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、皮膚、肺、耳、及び眼へ投与される。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、疾患組織又は臓器、例えば、腫瘍に投与される。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、異種薬剤及びタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、同じ経路によって投与される。他の実施形態では、異種薬剤及びタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、異なる経路によって投与され、例えば、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質が静脈内投与され、異種薬剤が標的組織又は臓器（例えば、疾患組織又は臓器）に局所的に投与される。

【０１１７】

任意の上記方法は、抗体濃度を減少させるため、又は対象における抗体機能を阻害するための、追加の治療を対象に施すことを更に含み得る。追加の治療は、当技術分野で知られている任意の方法であり得、血漿交換、ＩｄｅＳ若しくはＩｄｅＺのような抗体消化酵素の投与、ＦｃＲｎ受容体と結合する抗体の投与、ＦｃＲｎ受容体と結合するＦｃ断片の投与、免疫抑制剤薬物（例えば、コルチコステロイド（例えば、プレドニゾン、ブデソニド、プレドニゾロン）、Ｊａｎｕｓキナーゼ阻害剤（例えば、トファシチニブ）、カルシニューリン阻害剤（例えば、シクロスポリン、タクロリムス）、ｍＴＯＲ阻害剤（例えば、シロリムス、エベロリムス）、ＩＭＤＨ阻害剤（例えば、アザチオプリン、レフルノミド、ミコフェノール酸）、又は生物製剤（例えば、アバタセプト、アダリムマブ、アナキンラ、セルトリズマブ、エタネルセプト、ゴリムマブ、インフリキシマブ、イキセキズマ

ブ、ナタリズマブ、リツキシマブ、セクキヌマブ、トシリズマブ、ウステキヌマブ、ベドリズマブ、バシリキシマブ、ダクリズマブ）の投与、Ｂ細胞上のＣＤ１９と結合する抗体若しくはＣＤ２０と結合してそれらを枯渇させる抗体の投与、又はＢ細胞を阻害若しくは破壊するように設計された他の治療（例えば、脾臓摘出術、化学療法、免疫療法、放射線療法）が挙げられるが、これらに限定されない。追加の治療は、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質の投与前、投与中、及び／又は投与後に投与することができる。

【０１１８】

タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質が抗体と非特異的に結合する能力は、精製方法において有利に使用され得る。抗体の精製は、抗体のＦｃ領域と結合する薬剤に依拠することが多いが（例えばプロテインＡ及びプロテインＧ）、タンパク質Ｍは、抗体の可変領域に非特異的に結合する。したがって、タンパク質Ｍを用いて、Ｆｃ領域を含まない抗体断片及び抗体誘導体（例えば単鎖可変断片）及び抗体可変領域を取り込んだ他の分子を単離することができる。

【０１１９】

したがって、本発明の一態様は、試料から抗体軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変領域を含む化合物を単離する方法であって、化合物を、固体支持体に付着した本発明の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質と接触させ、次いで、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質から化合物を溶出することを含む、方法に関する。いくつかの実施形態では、抗体軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変領域を含む化合物は、抗体又はその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、抗体軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変領域を含む化合物は、抗体誘導体、免疫グロブリン足場などである。本発明の修飾タンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、熱安定性の増加により、野生型タンパク質Ｍよりも有利である。このことは、タンパク質Ｍを複数の精製に関して再利用可能にさせ、野生型タンパク質Ｍであれば不安定化させる溶出条件の使用を可能にする。

【０１２０】

当該方法は、親和性精製の分野でよく知られている技術を用いて行われ得る。固体支持体は、親和性クロマトグラフィー又はバッチ精製に適切な任意の材料であり得る。好適な材料は、限定されないが、アガロース、ポリアクリルアミド、デキストラン、セルロース、多糖類、ニトロセルロース、シリカ、アルミナ、酸化アルミニウム、チタニア、酸化チタン、ジルコニア、スチレン、ポリビニルジフルオリドナイロン、スチレン及びジビニルベンゼンのコポリマー、ポリメタクリレートエステル、誘導体化アズラクトンポリマー若しくはコポリマー、ガラス、又はセルロースを含む。いくつかの実施形態では、固体支持体は、樹脂である。いくつかの実施形態では、固体支持体は、ビーズ又は粒子である。いくつかの実施形態では、固体支持体は、例えばプレート、バイアル、又はカラムの表面である。

【０１２１】

接触するステップは、任意の好適な方法によって、例えば、化合物を含む試料をカラム内の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質を通して通過させることによって、又は化合物を含む組成物を修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質とともに容器又はプレートのウェル内でインキュベートすることによって実施され得る。接触するステップは、化合物が修飾マイコプラズマタンパ

ク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質と結合することができるのに十分な時間実施され得る。修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質と結合した化合物を試料中の他の成分から分離する、洗浄、遠心分離、又は他の形式の分離後、化合物は、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質から溶出される。溶出は、当技術分野で知られている任意の方法、例えばイオン濃度、温度などの変化によって実施され得る。一実施形態では、溶出は、ｐＨ変化によって実施され得る。本発明の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片は有利に、野生型タンパク質Ｍよりも広い範囲のｐＨにわたって安定である。これにより、修飾タンパク質Ｍは化合物の溶出を可能にする低いｐＨで安定した状態を維持することができる。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、接触するステップは、結合緩衝液中で（例えば、中性ｐＨで）実施され、溶出は、中和緩衝液（例えば、ｐＨ８～９の１Ｍリン酸塩又は１Ｍトリスなどの高イオン強度のアルカリ性緩衝液）中の低ｐＨ緩衝液（例えば、０．１ＭグリシンｐＨ２～３．５又は０．１Ｍ酢酸ｐＨ３．５～４．５）を用いて実施される。

【０１２３】

本発明の更なる態様は、上述の固体支持体と付着した修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質に関する。修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、例えば、共有結合で、例えば、リンカー分子を使用して、当技術分野で知られている任意の手段によって固体支持体と付着させることができる。

【０１２４】

タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質が抗体と有利に非特異的に結合する能力は、抗体、その断片又は誘導体、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質を結合するステップを伴う任意の免疫測定法に使用することができる。

【０１２５】

したがって、本発明の一態様は、免疫測定法を実施する方法であって、方法が、本発明の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質を使用して、抗体軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変領域を含む化合物と結合させることを含む、方法に関する。

【０１２６】

修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合タンパク質は、任意の一般的又は特異的な抗体結合分子、例えば、プロテインＡ、プロテインＧ、又は二次抗体を置換することができる。修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片、あるいは有効量のマイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を含む融合は、タンパク質当該技術分野で周知のように、例えば、放射性、化学発光、又は酵素による検出のために標識され得る。

【０１２７】

免疫測定法の例としては、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）アッセイ、酵素免疫測定法（ＥＩＡ）、サンドイッチアッセイ、ゲル拡散沈殿反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、免疫蛍光アッセイ、蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）アッセイ、免疫組織化学アッセイ、プロテインＡ免疫測定法、プロテインＧ

免疫測定法、プロテインＬ免疫測定法、ビオチン／アビジンアッセイ、ビオチン／ストレプトアビジンアッセイ、免疫電気泳動アッセイ、沈殿／フロキュレーション反応、免疫ブロット（ウエスタンブロット；ドット／スロット・ブロット）；免疫拡散アッセイ；リポソーム免疫測定法、化学発光アッセイ、ライブラリスクリーニング、発現アレイ、免疫沈降、競合結合アッセイ、及び免疫組織化学染色が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２８】

タンパク質Ｍ及びその誘導体

本発明の使用において用いられるタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、抗体と結合するタンパク質Ｍを産生する任意のマイコバクテリア種由来であり得る。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ、又はＭｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓ由来である。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、ＰＣＴ公開第２０１４／０１４８９７号及び米国公開第２０１７／０３２０９２１号に記載される任意のタンパク質Ｍ配列であってよく、それらの全体で参照により本明細書中に援用される。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（ＭＧ２８１、配列番号１）又はその機能的断片若しくは誘導体（例えば、配列番号３に示される断片又はその誘導体）である。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（ＭＰＮ４００、配列番号２３）又はその機能的断片若しくは誘導体（例えば、配列番号２４に示される断片又はその誘導体）である。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体である。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、タンパク質Ｍ断片又はその断片の誘導体、例えば、膜貫通ドメインを含まない、及び／又はＣ末端を含まない断片、例えば、例えば、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）のアミノ酸残基１７～５３７、３７～５５６、３７～４８２、３７～４６８、３７～４４２、７４～４６８、７４～４７９、７４～４８２、７４～４６８、７４～４４２、若しくは７４－５５６、又は別のタンパク質Ｍからの同等の残基を含む、本質的にそれらからなる、若しくはそれらからなる機能的断片である。列挙された断片の各々の末端に適用される「約」という用語は、末端残基の一方又は両方がわずかに、例えば、列挙された残基の両側で約５、４、３、又は２アミノ酸ずつ変化し得ることを意味する。別のタンパク質Ｍからの同等の残基は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍと他のタンパク質Ｍとの間の配列アライメントを実施することにより、当業者によって容易に決定され得る。例えば、図２７は、野生型Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍのアミノ酸７４～４７９（配列番号３）と、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍの同等の断片（配列番号２４）との配列アライメントを示す。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、Ｎ末端６－Ｈｉｓタグとそれに続くトロンビン切断部位を有するタンパク質Ｍの可溶性形態（配列番号１のアミノ酸残基３７～５５６）である、配列番号２のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。

【０１３０】

本明細書で使用される場合、「誘導体」という用語は、天然起源のタンパク質Ｍ又はタンパク質Ｍの機能的断片とは、天然起源のポリペプチドへのわずかな修飾によって異なるが、タンパク質Ｍの生物学的活性を有意に保持しているポリペプチドを指すために使用される。わずかな修飾は、限定されずに、１個又は数個のアミノ酸側鎖の変更、１個又は数個のアミノ酸の変更（欠失、挿入、及び／又は置換を含む）、１個又は数個の原子の立体化学の変更（例えば、Ｄ－アミノ酸）、及び、限定されないが以下を含む小さな誘導体化：メチル化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ミリストイル化、プレニル化、パルミテート化（ｐａｌｍｉｔａｔｉｏｎ）、アミド化、及びグリコシルホスファチジルイノ

シトールの付加を含む。本明細書において用いられる用語「実質的に維持する」は、天然起源ポリペプチドの活性（例えば、抗体結合）の少なくとも約２０％、例えば、約３０％、４０％、５０％又はそれよりも多くを維持する、ポリペプチドの断片、誘導体、又は他の変異体を指す。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はタンパク質Ｍ機能的断片の誘導体は、２０以下のアミノ酸残基の変異（任意の組み合わせでの欠失、挿入、及び／又は置換）、例えば、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、又は２又はそれよりも少ない変異を含む。いくつかの実施形態では、プロテインＭ誘導体は、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍの配列番号１、配列番号２、若しくは配列番号３のアミノ酸配列、又は別のマイコプラズマタンパク質Ｍの野生型配列、若しくはその機能的断片と少なくとも約８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、又は９９．９％同一であるアミノ酸配列を含む。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、インビボでの関連ポリペプチドの生存を促進するために、アミノ末端及び／又はカルボキシル末端にブロッキング剤を付加することによって、インビボで使用するために修飾され得る。これは、ペプチド末端がプロテアーゼによって分解される傾向がある状況で有用であり得る。かかるブロッキング剤としては、限定されないが、投与されるタンパク質のアミノ末端残基及び／又はカルボキシル末端残基と結合され得る追加の関連ペプチド配列又は非関連ペプチド配列が含まれ得る。これは、タンパク質の合成中に化学的に、又は、平均的な技術の当業者に馴染みのある方法による組換えＤＮＡ技術によって、行うことができる。あるいは、ブロッキング剤、例えばピログルタミン酸又は当技術分野で知られている他の分子を、アミノ及び／又はカルボキシル末端残基に付着させることができ、又はアミノ末端のアミノ基若しくはカルボキシル末端のカルボキシル基を異なる部分で置換することができる。同様に、タンパク質は、投与前に、薬学的に許容される「担体」タンパク質と共有結合又は非共有結合させることができる。

【０１３２】

本発明の一態様では、タンパク質Ｍ誘導体は、タンパク質Ｍの熱安定性を増加又は少なくとも維持する変異を含む修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片である。これらの修飾タンパク質Ｍ誘導体は、野生型タンパク質Ｍが変性され得る、高い温度（例えば、約３７℃）を必要とするインビボ法及び他の方法での使用に対する改善された適合性を有する。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ誘導体は、野生型マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片と比較して、マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片の熱安定性を増加又は維持する１つ以上のアミノ酸変異を有する、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片である。いくつかの実施形態では、修飾タンパク質Ｍ又はその機能的断片は、野生型タンパク質Ｍ又はその機能的断片のＴｍより少なくとも０．５℃、例えば、０．５℃、１．０℃、１．５℃、２．０℃、２．５℃、３．０℃、３．５℃、４．０℃、４．５℃、５．０℃、５．５℃、６．０℃、６．５℃、７．０℃、７．５℃、８．０℃、８．５℃、９．０℃、９．５℃、１０．０℃、１１．０℃、１２．０℃、１３．０℃、１４．０℃、１５．０℃、１６．０℃、１７．０℃、１８．０℃、１９．０℃、２０．０℃、２５．０℃、３０．０℃、又はそれ以上の増加した融解温度（Ｔｍ）を有する。いくつかの実施形態では、修飾タンパク質Ｍ又はその機能的断片は、野生型タンパク質Ｍ又はその機能的断片のＴｍと比較して維持された（すなわち、０．５℃以内の）Ｔｍを有する。Ｔｍは、示差走査型蛍光透視法又は任意の他の好適な技術によって測定され得る。野生型Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ　ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質ＭのＴｍは約４１．９℃であり、野生型Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質ＭのＴｍは約４４．１℃である。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、又は２０個、又はそれよりも多くの変異を有してよい。いくつかの実施形態では、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片は、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２個、又はそれよりも少ない変異を有してよい。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片は、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ、又はＭｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓのタンパク質Ｍに由来する。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号３）の約残基７４（例えば、残基６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９）～約残基４７９（例えば、残基４７４、４７５、４７６、４７７、４７８、４７９、４８０、４８１、４８２、４８３、４８４）の断片、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２４）の同等の残基である。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、熱安定性に影響を与えることが知られているタンパク質Ｍの部分に位置している。いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、タンパク質Ｍの生物学的活性において他の役割を有することが知られているタンパク質Ｍのタンパク質には位置しない。一実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）のタンパク質Ｍの抗体結合部位の５Å以内の残基（すなわち、残基９５、９９、１０２、１０３、１０５、１０６、１０７、１０９、１１０、１１４、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１４４、１５８、１６０、１６１、１６２、１６３、１７７、１７８、１７９、１８０、１８１、１８６、１８７、１８８、１９１、３２１、３３８、３４０、３４１、３４５、３８１、３８４、３８７、３８８、３８９、３９０、３９１、３９２、３９３、３９４、３９５、３９６、３９７、４２６、４２７、４２９、４３６、４３８、４３９、４４０、４４１、４４２、４４４、４４５、４４６、４４７、４４８、４４９、４５２、４５３、４５５、４５６、４５７、４６２、４６６）、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基にはない。一実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）のタンパク質Ｍの抗体結合部位の５Å以内の残基（すなわち、残基１００、１０４、１０７、１０８、１１０、１１１、１１２、１１４、１１５、１１９、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１４９、１６３、１６５、１６６、１６７、１６８、１８２、１８３、１８４、１８５、１８６、１９２、１９３、１９６、３３７、３３８、３５４、３５６、３５７、３９９、４０２、４０４、４０５、４０６、４０７、４０８、４０９、４１０、４１１、４１２、４４２、４４３、４４５、４５４、４５５、４５６、４５７、４５８、４６０、４６１、４６２、４６３、４６４、４６５、４６８、４６９、４７２、４７３、４７８）にはない。一実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の残基４６９～４７９、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基のいずれにもない。

【０１３８】

本発明者らは、コンピュータ分析を用いて、変異した場合にタンパク質のＴｍを増加又は維持することが予測されるタンパク質Ｍ内の残基を同定した。したがって、いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の残基７８、８１、８３、８４、８５、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９６、９７、１００、１０１、１０８、１１１、１１２、１１３、１２２、１２３、１２５、１２６、１２７、１２８、１３０、１３１、１３３、１３４、１３６、１３７、１３９、１４１、１４２、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５３、１５４、１５５、１

５６、１６４、１６７、１７０、１７５、１７６、１８４、１８５、１８９、１９２、１９３、１９６、１９８、２０１、２０２、２０４、２０５、２０６、２０７、２０９、２１１、２１５、２１８、２２０、２２４、２２５、２２６、２２７、２３１、２３２、２３４、２３５、２３６、２３７、２３９、２４１、２４３、２４４、２４５、２４６、２４７、２４９、２５０、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２５９、２６４、２６９、２７０、２７２、２７４、２７５、２７６、２７９、２８２、２８４、２８６、２８７、２８８、２９１、２９７、２９９、３００、３０２、３０３、３０４、３０５、３０７、３０８、３０９、３１０、３１１、３１３、３１７、３１８、３１９、３２０、３２２、３２６、３２７、３２９、３３１、３３２、３３３、３３５、３３７、３４２、３４３、３４７、３４８、３５１、３５４、３５５、３５７、３５８、３５９、３６０、３６１、３６２、３６３、３６７、３６９、３７０、３７１、３７２、３７３、３７４、３７５、３７８、３８５、３９９、４００、４０１、４０２、４０５、４０６、４０７、４０８、４０９、４１１、４１３、４１４、４１７、４１８、４１９、４２４、４２８、４３４、４３５、４４３、４５０、４５９、４６０、４６３、４６４、４６５、４６８、若しくはＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせにある。いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、表４に列挙される変異、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせ８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１０１、１０２、１０３、１０５、１０６、１０９、１１３、１１６、１１７、１１８、１２０、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１５０、１５１、１５２、１５３、１５４、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６４、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、１８０、１８１、１８７、１８８、１８９、１９０、１９１、１９４、１９５、１９７、１９８、１９９、２００、２０１、２０２、２０３、２０４、２０５、２０６、２０７、２０８、２０９、２１０、２１１、２１２、２１３、２１４、２１５、２１６、２１７、２１８、２１９、２２０、２２１、２２２、２２３、２２４、２２５、２２６、２２７、２２８、２２９、２３０、２３１、２３２、２３３、２３４、２３５、２３６、２３７、２３８、２３９、２４０、２４１、２４２、２４３、２４４、２４５、２４６、２４７、２４８、２４９、２５０、２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２５９、２６０、２６１、２６２、２６３、２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７０、２７１、２７２、２７３、２７４、２７５、２７６、２７７、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２８６、２８７、２８８、２８９、２９０、２９１、２９２、２９３、２９４、２９５、２９６、２９７、２９８、２９９、３００、３０１、３０２、３０３、３０４、３０５、３０６、３０７、３０８、３０９、３１０、３１１、３１２、３１３、３１４、３１５、３１６、３１７、３１８、３１９、３２０、３２１、３２２、３２３、３２４、３２５、３２６、３２７、３２８、３２９、３３０、３３１、３３２、３３３、３３４、３３５、３３６、３３９、３４０、３４１、３４２、３４３、３４４、３４５、３４６、３４７、３４８、３４９、３５０、３５１、３５２、３５３、３５５、３５８、３５９、３６０、３６１、３６２、３６３、３６４、３６５、３６６、３６７、３６８、３６９、３７０、３７１、３７２、３７３、３７４、３７５、３７６、３７７、３７８、３７９、３８０、３８１、３８２、３８３、３８４、３８５、３８６、３８７、３８８、３８９、３９０、３９１、３９２、３９３、３９４、３９５、３９６、３９７、３９８、４００、４０１、４０３、４１３、４１４、４１５、４１６、４１７、４１８、４１９、４２０、４２１、４２２、４２３、４２４、４２５、４２６、４２７、４２８、４２９、４３０、４３１、４３２、４３３、４３４、４３５、４３６、４３７、４３８、４３９、４４０、４４１、４４４、４４６、４４７、４４８、４４９、

４５０、４５１、４５２、４５３、４５９、４６６、４６７、４７０、４７１、４７４、４７５、４７６、４７７、４７９、４８０、４８１、４８２、４８３、４８４にある。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の残基８３、９０、９２、９４、１３７、１４２、１４７、１５０、１５６、１８４、１９６、１９８、２０５、２１１、２１５、２２５、２３１、２３２、２３４、２３５、２３６、２３７、２３９、２４３、２４５、２５０、２５５、２５６、２５９、２６４、２７２、２７４、２７５、２７６、２７９、２８２、２９７、３００、３０２、３１０、３２０、３２６、３３１、３３２、３３５、３４２、３４３、３４７、３４８、３５５、３５７、３６１、３７１、３７４、３７８、３８５、４０１、４０２、４０９、４１３、４２４、４６０、４６３、４６４、４６８、若しくはＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせにある。いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、表５に列挙される変異、又はそれらの任意の組み合わせである。

【０１４０】

本発明者らは、予測される残基リストからの非常に多くの変異を、単独で、又は成功率の高い熱安定性増加（安定化変異）若しくは少なくとも熱安定性維持（中立変異）と組み合わせて、調製及び試験した。図２３を参照すると、試験した点変異の７９％が安定化又は中立であったことが示されている。データは更に、Ｔｍを増加させる点変異の組み合わせが、更により高いＴｍを有する修飾されたタンパク質Ｍを生じさせる傾向があることを示す（図１５Ａを参照）。

【０１４１】

したがって、いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、単独で、又は他の変異と組み合わせてのいずれかで、Ｔｍを増加させることが実証されている残基にあり、例えば、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の残基１５０、１９６、１９８、２０１、２０５、２２４、２３２、２３７、２７４、２８２、３４２、３５５、３７３、４００、４０２、４０７、４０９、４１３、１３５、若しくはＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせにある。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の以下の残基

ａ）２３７（ＭＧ１）；
ｂ）２３２（ＭＧ８）；
ｃ）２８２（ＭＧ１３）；
ｄ）１５０、１９６、１９８、４００、４０２、４０７、４０９（ＭＧ１５）；
ｅ）４１３、４３５（ＭＧ２１）；
ｆ）３７３、４００（ＭＧ２２）；
ｇ）４０２、４０７、４０９、４１３（ＭＧ２３）；
ｈ）３４２（ＭＧ２４）；
ｉ）１５０、１９６、１９８、２３２、２３７、２８２、３４２、３７３、４００、４０２、４０７、４０９、４１３、４３５（ＭＧ２７）；
ｊ）２７４（ＭＧ２８）；
ｋ）１５０、１９６、１９８、２３２、２３７、３４２、４００、４０２、４０７、４０９（ＭＧ２９）；
ｌ）３７３、４１３、４３５（ＭＧ３１）
ｍ）２０５（ＭＧ３３）；
ｎ）３５５（ＭＧ３８、ＭＧ４０）；
ｏ）１５０、１９６、１９８、３４２、３７３、４００、４０２、４０７、４０９（ＭＧ４３）；

ｐ）１５０、１９６、１９８、２３２、２３７、３４２、３７３、４００、４０２、４０７、４０９（ＭＧ４４）；
ｑ）２０１、２２４（ＭＧ４５）；
ｒ）１５０、１９６、１９８、２０１、２２４、２３２、２３７、３４２、４００、４０２、４０７、４０９（ＭＧ４６）；
ｓ）１５０、１９６、１９８、２３２、２３７、３４２、３９０、４００、４０２、４０７、４０９、４４４（ＭＧ４７）；
ｔ）１５０、１９６、１９８、２０１、２０５、２２４、２３２、２３７、２７４、３４２、３５５、４００、４０２、４０７、４０９（ＭＧ４８）；若しくは
ｕ）１５０、１９６、１９８、２３２、２３７、３４２、３９１、４００、４０２、４０７、４０９（ＭＧ４９）
、若しくはＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、又は残基の組み合わせから選択される残基にある。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の
ａ）Ｆ２３７Ｔ（ＭＧ１）；
ｂ）Ｓ２３２Ｑ（ＭＧ８）；
ｃ）Ｑ２８２Ｄ（ＭＧ１３）；
ｄ）Ｓ１５０Ｅ、Ｓ１９６Ｒ、Ｓ１９８Ｐ、Ｖ４００Ｉ、Ｎ４０２Ｉ、Ｋ４０７Ｐ、Ｓ４０９Ｖ（ＭＧ１５）；
ｅ）Ｌ４１３Ｉ、Ｔ４３５Ｉ（ＭＧ２１）；
ｆ）Ｖ３７３Ｉ、Ｖ４００Ｉ（ＭＧ２２）；
ｇ）Ｎ４０２Ｌ、Ｋ４０７Ｐ、Ｓ４０９Ｖ、Ｌ４１３Ｉ（ＭＧ２３）；
ｈ）Ａ３４２Ｖ（ＭＧ２４）；
ｉ）Ｓ１５０Ｅ、Ｓ１９６Ｒ、Ｓ１９８Ｐ、Ｓ２３２Ｑ、Ｆ２３７Ｔ、Ｑ２８２Ｄ、Ａ３４２Ｖ、Ｖ３７３Ｉ、Ｖ４００Ｉ、Ｎ４０２Ｉ、Ｋ４０７Ｐ、Ｓ４０９Ｖ、Ｌ４１３Ｉ、Ｔ４３５Ｉ（ＭＧ２７）；
ｊ）Ｎ２７４Ｄ（ＭＧ２８）；
ｋ）Ｓ１５０Ｅ、Ｓ１９６Ｒ、Ｓ１９８Ｐ、Ｓ２３２Ｑ、Ｆ２３７Ｔ、Ａ３４２Ｖ、Ｖ４００Ｉ、Ｎ４０２Ｉ、Ｋ４０７Ｐ、Ｓ４０９Ｖ（ＭＧ２９）；
ｌ）Ｖ３７３Ｉ、Ｌ４１３Ｉ、Ｔ４３５Ｉ（ＭＧ３１）
ｍ）Ａ２０５Ｐ（ＭＧ３３）；
ｎ）Ｔ３５５Ｄ（ＭＧ３８）；
ｏ）Ｔ３５５Ｐ（ＭＧ４０）；
ｐ）Ｓ１５０Ｅ、Ｓ１９６Ｒ、Ｓ１９８Ｐ、Ａ３４２Ｖ、Ｖ３７３Ｉ、Ｖ４００Ｉ、Ｎ４０２Ｉ、Ｋ４０７Ｐ、Ｓ４０９Ｖ（ＭＧ４３）；
ｑ）１５０、１９６、１９８、２３２、２３７、３４２、３７３、４００、４０２、４０７、４０９（ＭＧ４４）；
ｒ）Ｓ２０１Ｃ、Ａ２２４Ｃ（ＭＧ４５）；
ｓ）Ｓ１５０Ｅ、Ｓ１９６Ｒ、Ｓ１９８Ｐ、Ｓ２０１Ｃ、Ａ２２４Ｃ、Ｓ２３２Ｑ、Ｆ２３７Ｔ、Ａ３４２Ｖ、Ｖ４００Ｉ、Ｎ４０２Ｉ、Ｋ４０７Ｐ、Ｓ４０９Ｖ（ＭＧ４６）
ｔ）Ｓ１５０Ｅ、Ｓ１９６Ｒ、Ｓ１９８Ｐ、Ｓ２３２Ｑ、Ｆ２３７Ｔ、Ａ３４２Ｖ、Ｆ３９０Ｅ、Ｖ４００Ｉ、Ｎ４０２Ｉ、Ｋ４０７Ｐ、Ｓ４０９Ｖ　Ｙ４４４Ｋ（ＭＧ４７）；
ｕ）Ｓ１５０Ｅ、Ｓ１９６Ｒ、Ｓ１９８Ｐ、Ｓ２０１Ｃ、Ａ２０５Ｐ、Ａ２２４Ｃ、Ｓ２３２Ｑ、Ｆ２３７Ｔ、Ｎ２７４Ｄ、Ａ３４２Ｖ、Ｔ３５５Ｐ、Ｖ４００Ｉ、Ｎ４０２Ｉ、Ｋ４０７Ｐ、Ｓ４０９Ｖ（ＭＧ４８）；若しくは
ｖ）Ｓ１５０Ｅ、Ｓ１９６Ｒ、Ｓ１９８Ｐ、Ｓ２３２Ｑ、Ｆ２３７Ｔ、Ａ３４２Ｖ、Ａ３９１Ｐ、Ｖ４００Ｉ、Ｎ４０２Ｉ、Ｋ４０７Ｐ、Ｓ４０９Ｖ（ＭＧ４９）
、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基から選択さ

れる。
【０１４４】
いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、単独で、又は他の変異と組み合わせてのいずれかで、Ｔｍを維持することが実証されている残基にあり、例えば、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の残基１４７、１５０、１５６、２２５、２３２、２４５、２７２、２７６、２７７、２７９、３００、３１０、３５５、３７８、４６８、若しくはＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせにある。
【０１４５】
いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の以下の残基
ａ）４６８（ＭＧ２）；
ｂ）１５０（ＭＧ４）；
ｃ）１４７（ＭＧ５）；
ｄ）２７２（ＭＧ１０）；
ｅ）３５５（ＭＧ１２）；
ｆ）２７６、２７７、２７９（ＭＧ１７）；
ｇ）３００（ＭＧ１８）；
ｈ）３７８（ＭＧ２０）；
ｉ）１５６（ＭＧ３２）；
ｊ）２３２（ＭＧ３４）；
ｋ）２４５（ＭＧ３５）；
ｌ）２７６（ＭＧ３６）
ｍ）２２５（ＭＧ４１）；若しくは
ｎ）３１０（ＭＧ４２）
、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいは残基の組み合わせから選択される残基にある。
【０１４６】
いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の
ａ）Ｒ４６８Ｑ（ＭＧ２）；
ｂ）Ｓ１５０Ｅ（ＭＧ４）；
ｃ）Ｈ１４７Ｆ（ＭＧ５）；
ｄ）Ｓ２７２Ｇ（ＭＧ１０）；
ｅ）Ｔ３５５Ｇ（ＭＧ１２）；
ｆ）Ｓ２７６Ｅ、Ｑ２７７Ｌ、Ｎ２７９Ｒ（ＭＧ１７）；
ｇ）Ｎ３００Ｑ（ＭＧ１８）；
ｈ）Ｎ３７８Ｙ（ＭＧ２０）；
ｉ）Ｓ１５６Ｋ（ＭＧ３２）；
ｊ）Ｓ２３２Ｌ（ＭＧ３４）；
ｋ）Ａ２４５Ｑ（ＭＧ３５）；
ｌ）Ｓ２７６Ｄ（ＭＧ３６）
ｍ）Ｋ２２５Ｐ（ＭＧ４１）、若しくは
ｎ）Ｖ３１０Ｅ（ＭＧ４２）
、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基から選択される。
【０１４７】
いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の
ａ）Ａ７７Ｅ、

ｂ）Ｋ１２５Ｒ、
ｃ）Ｖ１６５Ｑ、
ｄ）Ｈ１７０Ｔ、又は
ｅ）Ａ２８０Ｖ
から選択される。
【０１４８】
いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の
ａ）１５９；
ｂ）１８２；
ｃ）１０２；
ｄ）１６１；
ｅ）８６；
ｆ）１０１；
ｇ）１４７；
ｈ）２３６；
ｉ）３４８；
ｊ）４２４；
ｋ）１４７；
ｌ）３２１；
ｍ）３８９；
ｎ）４４２；
ｏ）１１９；
ｐ）１７９；
ｑ）１８６、若しくは
ｒ）１０３
、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせから選択される。
【０１４９】
いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の
ａ）Ｑ１５９Ｃ及びＡ１８２Ｃ、
ｂ）Ａ１０２Ｃ及びＴ１６１Ｃ、若しくは
ｃ）Ｉ８６Ｃ及びＦ１０１Ｃ
、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせから選択され、ａ）、ｂ）、又はｃ）の修飾残基は、修飾残基間にジスルフィド結合を形成することができる。
【０１５０】
いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の
ａ）Ｈ１４７Ｙ、
ｂ）Ｈ２３６Ｙ、
ｃ）Ｈ３４８Ｙ、
ｄ）Ｈ４２４Ｙ、若しくは
ｅ）Ｈ１４７Ｑ
、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせから選択され、変異は、低ｐＨでのその部位でのヒスチジンプロトン化を防ぎ、それによってタンパク質不安定化を防ぐことができる。
【０１５１】
いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ

（配列番号１）の
ａ）Ｎ３２１Ｈ、
ｂ）Ｙ３８９Ｈ、
ｃ）Ｎ４４２Ｈ、
ｄ）Ｐ１１９Ｈ、
ｅ）Ｔ１７９Ｈ、
ｆ）Ｇ１８６Ｈ、若しくは
ｇ）Ｎ１０３Ｈ
、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせから選択され、変異は、ｐＨ感受性を増加させ、それによって抗体精製の溶出条件を改善することができる。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の残基１５５、２０３、２４３、２４８、及び３５８にある。

【０１５３】

いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）のＡ１５５Ｅ、Ｋ２０３Ｒ、Ｈ２４３Ｔ、Ｖ２４８Ｑ、及びＡ３５８Ｖである。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の残基３３８にある（例えば、Ｙ３８８Ｎ）。

【０１５５】

修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片は、アミノ酸配列内の変異以外の更なる修飾を含んでよい。いくつかの実施形態では、タンパク質Ｍ配列内の１つ以上のグリコシル化部位、例えば、１、２、又は３グリコシル化部位が除去される。３つのＮ－グリコシル化部位は、ＮＧｌｙｃＰｒｅｄサーバを用いた配列及び構造の両方の分析に基づき、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍにおいて予測される。これらは、Ｎ１７７、Ｎ２１３、及びＮ２７４を含む。２つのＯ－グリコシル化部位は、ＮｅｔＯＧｌｙｃ４．０サーバを用いた構造分析に基づきＭ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍにおいて予測される。これらは、Ｔ１１０及びＴ２０６を含む。好適な変異は、限定されずに、Ｎ１７７Ｄ、Ｔ２１５Ｙ、Ｎ２７４Ｄ、Ｓ１１２Ｉ、及びＴ２０６Ｙを任意の組み合わせで含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のグリコシル化部位が、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片に付加される。グリコシル化パターンの変更は、タンパク質の熱安定性を追加し得て、及び／又は、抗体認識をブロックすることによりタンパク質の免疫原性を変更させ得る。

【０１５６】

発現及び精製目的のために、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又は機能的断片は、分泌ペプチドを、例えばＮ末端に含んでよく、それにより、発現されるタンパク質は、それが発現される細胞から分泌され得て、培養培地から回収され得る。好適な分泌ペプチドは、限定されずに、ヒト血清アルブミン由来のもの、インターロイキン－２、ＣＤ５、免疫グロブリンκ軽鎖、トリプシノーゲン、又は哺乳動物細胞のプロラクチン、及び細菌細胞のＳｅｃ又はＴａｔを含む。分泌ペプチドは、タンパク質Ｍから、本発明の方法において用いられる前に除去されてよく、又は除去されなくてよい。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又は機能的断片は、タンパク質の１つ以上の生物学的機能又は物理的特徴を変更する１つ以上の追加の変異を含み得る。いくつかの実施形態では、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又は機能的断片は、抗体に関するタンパク質の親和性を変更する１つ以上の追加の変異を含み得る。本発明者らは、コンピュータ分析を用いて、変異した場合に抗体に関するタンパク質の親和性を増加させることが予測されるタンパク質Ｍ内の残基を同定した。したがって、いくつかの実施形

態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の残基９５、１０２、１０３、１０６、１０７、１１４、１１６、１６０、１６１、１６２、１６３、１８１、１８６、３２１、３８１、３８４、３８９、３９０、３９１、３９６、３９７、４２６、４２９、４３６、４３８、４３９、４４１、４４２、４４７、４４８、４４９、４５２、４５３、４５５、４５６、４６２、若しくは４６６、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせにある。いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、表６に列挙される変異、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の残基、あるいはそれらの任意の組み合わせ１００、１０４、１０７、１０８、１１０、１１１、１１２、１１４、１１５、１１９、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１４９、１６３、１６５、１６６、１６７、１６８、１８２、１８３、１８４、１８５、１８６、１９２、１９３、１９６、３３７、３３８、３５４、３５６、３５７、３９９、４０２、４０４、４０５、４０６、４０７、４０８、４０９、４１０、４１１、４１２、４４２、４４３、４４５、４５４、４５５、４５６、４５７、４５８、４６０、４６１、４６２、４６３、４６４、４６５、４６８、４６９、４７２、４７３、４７８にある。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又は機能的断片は、タンパク質のｐＨ感受性を修飾することにより抗体に関するタンパク質の親和性を変更する１つ以上の追加の変異を含み得る。本発明者らは、コンピュータ分析を用いて、変異した場合にｐＨ感受性を修飾することにより抗体に関する親和性を増加させることが予測されるタンパク質Ｍ内の残基を同定した。これらの変異体は、溶出のためのｐＨ変化を用いる能力に起因して、抗体単離に特に有用であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の残基９５、１０３、１１６、１８６、３２１、３８９、４２９、４４２、若しくは４６６、又はそれらの任意の組み合わせ、あるいはＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基にある。いくつかの実施形態では、１つ以上の変異は、表７に列挙される変異、又はそれらの任意の組み合わせである。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又は機能的断片は、抗体に関する親和性を減少又は除去する１つ以上の追加の変異を含み得る。例としては、限定されないが、残基３９０及び４４４、例えば、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の３９０Ｅ及びＹ４４４Ｋ、又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ（配列番号２３）の同等の残基における変異が挙げられる。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又は機能的断片は、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１）の約残基１８５～約残基３４２、又は別のマイコプラズマタンパク質Ｍの同等の残基の欠失を含み得る。いくつかの実施形態では、欠失したアミノ酸は、短いリンカーによって置き換えられる。いくつかの実施形態では、欠失により新たに露出した疎水性残基が生じ、これらの新たに露出した残基は１つ以上の変異を有する。

【０１６１】

本発明の一態様では、融合タンパク質は、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片と、リンカーと、ペプチドと、を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、抗体に対する修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片の親和性又は結合力を増強する１つ以上の変異を有する、修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片を有する。いくつかの実施形態では、ペプチドは、二量体化ペプチド（例えば、ＩＬ－ＧＣＮ４、Ｃ－ＩＬ－ＧＣＮ４）である。他の実施形態では、ペプチドは、Ｆａｂ結合ポリペプチド又はＦｃ結合ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、Ｆａｂ結合ポリペプチドは、プロテインＬ、プロテインＡ、又はプロテインＧである。いくつか

の実施形態では、Ｆａｂ結合ポリペプチドは、免疫グロブリンのＦｃ部分と結合し、かつ／又は免疫グロブリンのＦｃ受容体リサイクリングを減少させ、及び／又は免疫グロブリンとの融合タンパク質の結合を増加させる。他の実施形態では、ペプチドは二量体化ペプチド及びプロテインＬを含む。一実施形態では、融合タンパク質は、Ｎ末端から始まり、二量体化ペプチド、第１のリンカー、プロテインＬ、第２のリンカー、及び修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片を順に含む。

【０１６２】

他の実施形態では、ペプチドは、Ｆｃ結合ポリペプチドであり、それはＦｃ受容体ポリペプチドであり得る。いくつかの実施形態では、ペプチドは、Ｆｃ結合ポリペプチド及びプロテインＬを含む。一実施形態では、融合タンパク質は、Ｎ末端から始まり、Ｆｃ結合ポリペプチド、第１のリンカー、プロテインＬ、第２のリンカー、及び修飾マイコプラズマタンＭ又はその機能的断片を順に含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは、Ｆｃドメインであり、Ｆｃ受容体ポリペプチドと結合するための補体結合残基、及び／又はＦｃ受容体ポリペプチドと結合するための補体結合残基の１つ以上の変異を含み得る。いくつかの実施形態では、ペプチドはＦｃ受容体タンパク質であり、融合タンパク質は、抗体の細胞取り込みを減少させ、抗体リサイクリングを減少させ、抗体リサイクリングの減少により免疫グロブリン枯渇を引き起こし、かつ／又は免疫グロブリンに対する融合タンパク質の親和性を増加させる。他の実施形態では、融合タンパク質は、２つ以上の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ又はその機能的断片を含む。他の実施形態では、融合タンパク質は、半減期延長部分、例えば、ヒトアルブミン若しくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）の添加、タンパク質修飾、例えば、アシル化、メチル化、リン酸化、硫酸化、ファルネシル化、ユビキチン化、部位選択的結合、グリコシル化、ＰＴＭの導入、ＰＥＧ化、ライゲーション、タンパク質系開始剤の重合、又は結合、親和性、結合標的、若しくはそれらの任意の組み合わせを変更し得る任意の修飾を含む。

【０１６３】

本発明に係るタンパク質Ｍタンパク質は、当技術分野でよく知られており本明細書中に記載される方法、例えば組換え発現によって、生産及び特徴付けられる。

【０１６４】

本発明の更なる態様は、本発明のタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体をコードする単離ポリヌクレオチド、及びタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を産生するための発現カセットを提供する。

【０１６５】

ポリヌクレオチドは、タンパク質の発現を助けるための調節要素と作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、プロモーターと作動可能に連結される。プロモーターは、細菌プロモーター（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉにおいて作動可能）又は哺乳動物プロモーター（例えばヒトプロモーター）であり得る。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、宿主細胞におけるタンパク質の発現を高めるためにコドン最適化され得る。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌における発現のためにコドン最適化される。別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ヒト細胞などの哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化される。１つの例は、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化された配列番号２６の配列、又はそれと少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは９９．５％同一の配列である。更なる実施形態では、ポリヌクレオチドは、Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌、及びヒト細胞などの哺乳動物細胞の両方における発現のためにコドン最適化される。１つの例は、Ｅ．ｃｏｌｉ及びヒト細胞の両方における発現のためにコドン最適化された配列番号２５の配列、又はそれと少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は９９．５％同一の配列である。

【０１６７】

本発明の別態様は、本発明のポリヌクレオチドを含む、ベクター、例えば発現ベクターである。ベクターは、限定されずに、プラスミドベクター及びウイルスベクターを含む、当技術分野で知られている任意のタイプのベクターであり得る。ベクターは、例えば、細菌ベクター（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉベクター）又は哺乳動物細胞ベクター（例えば、ヒト細胞ベクター）であり得る。

【０１６８】

本発明の更なる態様は、本発明のポリヌクレオチド及び／又はベクターを含む細胞（例えば、単離細胞、形質転換細胞、組換え細胞など）に関する。したがって、本発明の様々な実施形態は、ベクター（例えば、発現カセット）を含む組換え宿主細胞を対象とする。そのような細胞は、単離細胞であり得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、細胞のゲノム内に安定的に取り込まれる。いくつかの実施形態では、細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌細胞、又はヒト細胞などの哺乳動物細胞であり得る。

【０１６９】

本発明の更なる一態様は、本発明の修飾マイコプラズマタンパク質Ｍ若しくはその機能的断片、ポリヌクレオチド、ベクター、及び／又は形質転換細胞を含むキットに関する。キットは、本明細書に記載の方法の１つを実施するための追加の試薬を含み得る。試薬は、適切なパッケージ又は容器内に含まれ得る。追加の試薬には、緩衝液、標識、酵素、検出試薬などが含まれるが、これらに限定されない。

【０１７０】

キットが供給される場合、異なる構成要素が別個の容器内にパッケージされて、使用の直前に混合されてよい。構成要素をそのように別個にパッケージすることは、活性成分の機能を失わずに長期保存を可能にし得る。キットは更に、指示資料とともに供給されてもよい。指示は、紙又は別の基材上に印刷されてよく、及び／又は電子可読媒体として供給されてよい。

【０１７１】

異種薬剤

上述のように、異種薬剤は、異種薬剤の投与前に、それに対する中和抗体が対象内に存在するものであってよく、又は対象への投与の際に中和抗体が産生される可能性があるものであってよい。いくつかの実施形態では、異種薬剤は、核酸送達ベクター（例えば、ウイルスベクター又は非ウイルスベクター）、遺伝子編集複合体（例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体）、タンパク質、又は核酸であり得る。

【０１７２】

任意の目的の核酸配列は、本発明の核酸送達ベクターにおいて送達され得る。目的の核酸は、治療的（例えば、医薬又は獣医学用途）、免疫原性（例えばワクチンのため）、又は診断ポリペプチドを含む、ポリペプチドをコードする核酸を含む。

【０１７３】

治療的ポリペプチドには、嚢胞性線維症膜貫通調節タンパク質（ＣＦＴＲ）、ジストロフィン（ミニジストロフィン及びマイクロジストロフィンを含む（例えば、Ｖｉｎｃｅｎｔ ｅｔ ａｌ．，（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ５：１３０、米国特許公開第２００３／０１７１３１号、国際公開第２００８／０８８８９５号、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９７：１３７１４－１３７１９（２０００）、及びＧｒｅｇｏｒｅｖｉｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１６：６５７－６４（２００８）を参照）、ミオスタチンプロペプチド、フォリスタチン、アクチビンＩＩ型可溶性受容体、ＩＧＦ－１、抗炎症性ポリペプチド、例えば、ＩカッパＢ優性変異体、サルコスパン、ユートロフィン（Ｔｉｎｓｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ３８４：３４９）、ミニユートロフィン、凝固因子（例えば、第ＶＩＩＩ因子、第ＩＸ因子、第Ｘ因子など）、エリスロポエチン、アンジオスタチン、エンドスタチン、カタラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、レプチン、ＬＤＬ受容体、リポタンパク質リパーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、β－グロビン、α－グロビン、スペクトリン、α_1－アンチトリプシン、アデノシンデアミ

ナーゼ、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、β－グルコセレブロシダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、リソソームヘキソサミニダーゼＡ、分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ、ＲＰ６５タンパク質、サイトカイン（例えば、α－インターフェロン、β－インターフェロン、インターフェロン－γ、インターロイキン－２、インターロイキン－４、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、リンホトキシンなど）、ペプチド成長因子、神経栄養因子、及びホルモン（例えば、成長ホルモン、インスリン、インスリン様成長因子１及び２、血小板由来成長因子、上皮成長因子、線維芽細胞成長因子、神経成長因子、神経栄養因子－３及び－４、脳由来神経栄養因子、骨形成タンパク質［ＲＡＮＫＬ及びＶＥＧＦを含む］、グリア由来成長因子、トランスフォーミング成長因子－α及び－βなど）、リソソーム酸α－グルコシダーゼ、α－ガラクトシダーゼＡ、受容体（例えば、腫瘍壊死増殖因子α可溶性受容体）、Ｓ１００Ａ１、パルブアルブミン、アデニリルシクラーゼ６型、Ｇタンパク質共役型受容体キナーゼ２型ノックダウンに影響を与える分子、例えば、切断型構成的活性型ｂＡＲＫｃｔ、抗炎症性因子、例えば、ＩＲＡＰ、抗ミオスタチンタンパク質、アスパルトアシラーゼ、及びモノクローナル抗体（単鎖モノクローナル抗体を含む；例示的なＭａｂは Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）Ｍａｂである）が含まれるが、これらに限定されない。他の例示的な異種核酸配列は、自殺遺伝子産物（例えば、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、腫瘍壊死因子）、がん治療に使用される薬剤に対する耐性を付与するタンパク質、腫瘍抑制遺伝子産物（例えば、ｐ５３、Ｒｂ、Ｗｔ－１）、ＴＲＡＩＬ、ＦＡＳリガンド、及びそれを必要とする対象において治療的効果を有する他のポリペプチドをコードする。パルボウイルスベクターは、モノクローナル抗体及び抗体断片、例えば、ミオスタチンに対する抗体又は抗体断片を送達するために使用することもできる（例えば、Ｆａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：５８４－５９０（２００５）を参照）。

【０１７４】

ポリペプチドをコードする核酸配列は、レポーターポリペプチド（例えば酵素）をコードするものを含む。レポーターポリペプチドは当技術分野で知られており、限定されないが、グリーン蛍光タンパク質、β－ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、及びクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含む。

【０１７５】

あるいは、本発明の特定の実施形態では、核酸は、機能的核酸、すなわち、タンパク質に翻訳されずに機能する核酸、例えば、アンチセンス核酸、リボザイム（例えば、米国特許第５，８７７，０２２号に記載されているような）、スプライセオソーム媒介トランススプライシングに影響を及ぼすＲＮＡ（Ｐｕｔｔａｒａｊｕ ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１７：２４６、米国特許第６，０１３，４８７号、米国特許第６，０８３，７０２号を参照）、遺伝子サイレンシングを媒介するｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、又はｍｉＲＮＡを含む干渉ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）（Ｓｈａｒｐ ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ｓｃｉｅｎｃｅ２８７：２４３１を参照）、及び他の非翻訳ＲＮＡ、例えば「ガイド」ＲＮＡ（Ｇｏｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９５：４９２９、Ｙｕａｎ ｅｔ ａｌの米国特許第５，８６９，２４８号）などをコードし得る。例示的な非翻訳ＲＮＡには、多剤耐性（ＭＤＲ）遺伝子産物に対するＲＮＡｉ（例えば、腫瘍の治療及び／若しくは予防のため、並びに／又は化学療法による損傷を防ぐための心臓への投与のため）、ミオスタチンに対するＲＮＡｉ（例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー）、ＶＥＧＦに対するＲＮＡｉ（例えば、腫瘍の治療及び／又は予防）、ホスホランバンに対するＲＮＡｉ（例えば、心血管疾患の治療のため、例えば、Ａｎｄｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ．１０：１３２－１４２（２００８）、及びＬｉ ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｓｉｎ．２６：５１－５５（２００５）を参照）、ホスホランバン阻害分子又はドミナントネガティブ分子、例えば、ホスホランバンＳ１６Ｅ（例えば、心血管疾患の治療のため、例えば、Ｈｏｓｈｉｊｉｍａ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ．Ｍｅｄ．８：８６４－８７１（２００２）を参照）、アデノシンキナーゼに対するＲＮＡｉ（例えば、てんかん）、サルコグリ

カン［例えば、α、β、γ］に対するＲＮＡｉ、ミオスタチン、ミオスタチンプロペプチド、フォリスタチン、又はアクチビンＩＩ型可溶性受容体に対するＲＮＡｉ、抗炎症性ポリペプチドに対するＲＮＡｉ、例えば、ＩカッパＢ優性変異体、並びに病原体及びウイルスに対するＲＮＡｉ（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ＣＭＶ、単純ヘルペスウイルス、ヒトパピローマウイルス）が含まれる。

【０１７６】

あるいは、本発明の特定の実施形態では、核酸は、プロテインホスファターゼ阻害剤Ｉ（Ｉ－１）、ｓｅｒｃａ２ａ、ホスホランバン遺伝子を調節するジンクフィンガータンパク質、Ｂａｒｋｃｔ、β２－アドレナリン受容体、β２－アドレナリン受容体キナーゼ（ＢＡＲＫ）、ホスホイノシチド－３キナーゼ（ＰＩ３キナーゼ）、Ｇタンパク質共役型受容体キナーゼ２型ノックダウンに影響を与える分子、例えば、切断型構成的活性型ｂＡＲＫｃｔ、カルサルシン、ホスホランバンに対するＲＮＡｉ、ホスホランバン阻害分子又はドミナントネガティブ分子、例えば、ホスホランバンＳ１６Ｅ、ｅｎｏｓ、ｉｎｏｓ、又は骨形成タンパク質（ＢＮＰ２、７など、ＲＡＮＫＬ及び／又はＶＥＧＦを含む）をコードし得る。

【０１７７】

核酸送達ベクターはまた、宿主染色体上の遺伝子座と相同性を共有し、それと組換える核酸を含んでもよい。この手法は、例えば、宿主細胞における遺伝的欠陥を修正するために使用することができる。

【０１７８】

本発明はまた、例えばワクチン接種のための、免疫原性ポリペプチドを発現する核酸送達ベクターを提供する。核酸は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、インフルエンザウイルス、ＨＩＶ又はＳＩＶ　ｇａｇタンパク質、腫瘍抗原、がん抗原、細菌抗原、ウイルス抗原などに由来する免疫原を含むがこれに限定されない、当該技術分野で知られている任意の免疫原をコードし得る。

【０１７９】

ワクチンベクターとしてのパルボウイルスの使用は当技術分野で知られている（例えば、Ｍｉｙａｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ９１：８５０７、Ｙｏｕｎｇらの米国特許第５，９１６，５６３号、Ｍａｚｚａｒａらの米国特許第５，９０５，０４０号、Ｓａｍｕｌｓｋｉらの米国特許第５，８８２，６５２号、米国特許第５，８６３，５４１号を参照）。抗原は、パルボウイルスカプシド内に存在し得る。あるいは、抗原は、組換えベクターゲノム内に導入された核酸によって発現され得る。本明細書に記載の及び／又は当技術分野で知られているような任意の目的の免疫原を、核酸送達ベクターによって提供することができる。

【０１８０】

免疫原性ポリペプチドは、限定されないが、微生物、細菌性、原生動物、寄生性、真菌及び／又はウイルス性の感染及び疾患を含む感染及び／又は疾患に対して、免疫応答を引き起こす及び／又は対象を保護するのに適切な任意のポリペプチドであり得る。例えば、免疫原性ポリペプチドは、オルソミクソウイルス免疫原（例えば、インフルエンザウイルス免疫原、例えばインフルエンザウイルスヘマグルチニン（ＨＡ）表面タンパク質、又はインフルエンザウイルス核タンパク質、又はウマインフルエンザウイルス免疫原）、又はレンチウイルス免疫原（例えば、ウマ伝染性貧血ウイルス免疫原、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）免疫原、又はヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）免疫原、例えば、ＨＩＶ又はＳＩＶエンベロープＧＰ１６０タンパク質、ＨＩＶ又はＳＩＶマトリックス／カプシドタンパク質、及びＨＩＶ又はＳＩＶ　ｇａｇ、ｐｏｌ及びｅｎｖ遺伝子産物）であることができる。免疫原性ポリペプチドはまた、アレナウイルス免疫原（例えば、ラッサ熱ウイルス免疫原、例えばラッサ熱ウイルスヌクレオカプシドタンパク質及びラッサ熱エンベロープ糖タンパク質）、ポックスウイルス免疫原（例えば、ワクシニアウイルス免疫原、例えばワクシニアＬ１又はＬ８遺伝子産物）、フラビウイルス免疫原（例えば、黄熱病ウイルス免疫原又は日本脳炎ウイルス免疫原）、フィロウイルス免疫原（例えば、エボラウイルス

免疫原、又はマールブルグウイルス免疫原、例えばＮＰ及びＧＰ遺伝子産物）、ブニヤウイルス免疫原（例えば、ＲＶＦＶ、ＣＣＨＦ、及び／又はＳＦＳウイルス免疫原）、又はコロナウイルス免疫原（例えば、感染性ヒトコロナウイルス免疫原、例えばヒトコロナウイルスエンベロープ糖タンパク質、又はブタ伝染性胃腸炎ウイルス免疫原、又はトリ伝染性気管支炎ウイルス免疫原）であることもできる。免疫原性ポリペプチドは更に、ポリオ免疫原、ヘルペス免疫原（例えば、ＣＭＶ、ＥＢＶ、ＨＳＶ免疫原）流行性耳下腺炎免疫原、麻疹免疫原、風疹免疫原、ジフテリア毒素又は他のジフテリア免疫原、百日咳抗原、肝炎（例えば、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎など）免疫原、及び／又は、現在当技術分野で知られている、若しくは後に免疫原として同定される任意の他のワクチン免疫原であることもできる。

【０１８１】

あるいは、免疫原性ポリペプチドは、任意の腫瘍又はがん細胞抗原であり得る。任意に、腫瘍又はがん抗原は、がん細胞の表面上に発現される。例示的ながん及び腫瘍細胞抗原は、Ｓ．Ａ．Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ（Ｉｍｍｕｎｉｔｙ１０：２８１（１９９１））に記載されている。他の例示的ながん及び腫瘍抗原としては、限定されないが、以下が挙げられる：ＢＲＣＡ１遺伝子産物、ＢＲＣＡ２遺伝子産物、ｇｐ１００、チロシナーゼ、ＧＡＧＥ－１／２、ＢＡＧＥ、ＲＡＧＥ、ＬＡＧＥ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＣＤＫ－４、β－カテニン、ＭＵＭ－１、カスパーゼ－８、ＫＩＡＡ０２０５、ＨＰＶＥ、ＳＡＲＴ－１、ＰＲＡＭＥ、ｐ１５、黒色腫腫瘍抗原（Ｋａｗａｋａｍｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９１：３５１５、Ｋａｗａｋａｍｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９４）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１８０：３４７、Ｋａｗａｋａｍｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９４）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５４：３１２４）、ＭＡＲＴ－１、ｇｐ１００ ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－２、ＭＡＧＥ－３、ＣＥＡ、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、Ｐ－１５、チロシナーゼ（Ｂｒｉｃｈａｒｄ ｅｔ ａｌ．，（１９９３）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７８：４８９）、ＨＥＲ－２／ｎｅｕ遺伝子産物（米国特許第４，９６８，６０３号）、ＣＡ１２５、ＬＫ２６、ＦＢ５（エンドシアリン）、ＴＡＧ７２、ＡＦＰ、ＣＡ１９－９、ＮＳＥ、ＤＵ－ＰＡＮ－２、ＣＡ５０、ＳＰａｎ－１、ＣＡ７２－４、ＨＣＧ、ＳＴＮ（シアリルＴｎ抗原）、ｃ－ｅｒｂＢ－２タンパク質、ＰＳＡ、Ｌ－ＣａｎＡｇ、エストロゲン受容体、乳脂肪グロブリン、ｐ５３腫瘍抑制タンパク質（Ｌｅｖｉｎｅ，（１９９３）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：６２３）、ムチン抗原（国際特許公開第９０／０５１４２号）；テロメラーゼ；核マトリックスタンパク質；前立腺酸性ホスファターゼ；パピローマウイルス抗原；及び／又は以下のがんと関連することが現在知られている、若しくは後に発見された抗原：黒色腫、腺がん、胸腺腫、リンパ腫（例えば、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫）、肉腫、肺がん、肝臓がん、結腸がん、白血病、子宮がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、膀胱がん、腎臓がん、膵臓がん、脳がん、及び現在知られている、又は後に特定される他のがん若しくは悪性疾患（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，（１９９６）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．４７：４８１－９１を参照）。

【０１８２】

当業者であれば、目的の核酸を適切な制御配列と機能的に結合させることができることを理解するであろう。例えば、異種核酸は、発現制御要素、例えば、転写／翻訳制御シグナル、複製起点、ポリアデニル化シグナル、内部リボソームエントリー部位（ＩＲＥＳ）、プロモーター、及び／又はエンハンサーなどと、作動可能に結合することができる。

【０１８３】

当業者であれば、所望のレベル及び組織特異的発現に応じて、様々なプロモーター／エンハンサー要素を使用できることが理解されよう。プロモーター／エンハンサーは、所望の発現パターンに応じて、構成的又は誘導性であることができる。プロモーター／エンハンサーは、ネイティブ又は外来であってよく、天然又は合成の配列であることができる。外来とは、転写開始領域が導入される野生型宿主において、その転写開始領域が見られないことを意図する。

【０１８４】
特定の実施形態では、プロモーター／エンハンサー要素は、治療される標的細胞又は対象にとってネイティブのものであり得る。代表的な実施形態では、プロモーター／エンハンサー要素は、異種核酸配列にとってネイティブのものであり得る。プロモーター／エンハンサー要素は一般に、目的の標的細胞内で機能するように選択される。更に、特定の実施形態では、プロモーター／エンハンサー要素は、哺乳動物のプロモーター／エンハンサー要素である。プロモーター／エンハンサー要素は、構成的又は誘導性であってよい。
【０１８５】
誘導性発現制御要素は、典型的には、核酸配列の発現に対する調節を提供することが望ましい用途において有利である。遺伝子送達のための誘導性プロモーター／エンハンサー要素は、組織特異的又は好適プロモーター／エンハンサー要素であってよく、筋肉特異的又は好適（心筋、骨格筋及び／又は平滑筋特異的又は好適を含む）、神経組織特異的又は好適（脳特異的又は好適を含む）、眼特異的又は好適（網膜特異的及び角膜特異的を含む）、肝臓特異的又は好適、骨髄特異的又は好適、膵臓特異的又は好適、脾臓特異的又は好適、及び肺特異的又は好適プロモーター／エンハンサー要素を含む。他の誘導性プロモーター／エンハンサー要素としては、ホルモン誘導性及び金属誘導性要素が挙げられる。例示的な誘導性プロモーター／エンハンサー要素は、限定されないが、Ｔｅｔ　ｏｎ／ｏｆｆ要素、ＲＵ４８６誘導性プロモーター、エクジソン誘導性プロモーター、ラパマイシン誘導性プロモーター、及びメタロチオネインプロモーターを含む。
【０１８６】
核酸配列が、標的細胞において、転写されて、それから翻訳される実施形態では、特異的な開始シグナルが一般に、挿入されたタンパク質コード配列の効率的な翻訳のために含まれる。これらの外因的な転写制御配列は、ＡＴＧ開始コドン及び隣接配列を含んでよく、天然及び合成の両方の様々な起源であってよい。
【０１８７】
核酸送達ベクターは、分裂細胞及び非分裂細胞を含む広範な細胞へ核酸を送達するための手段を提供する。核酸送達ベクターは、例えばエクスビボでの遺伝子療法のために、目的の核酸を細胞にインビトロで送達するために用いることができる。核酸送達ベクターは、例えば、免疫原性又は治療的ポリペプチド又は機能性ＲＮＡを発現するために、それを必要とする対象へ核酸を送達する方法において更に有用である。この様式において、ポリペプチド又は機能性ＲＮＡは、対象においてインビボで生産され得る。対象はポリペプチドが不足しているため、そのポリペプチドを必要とし得る。更に、対象におけるポリペプチド又は機能性ＲＮＡの産生が何らかの有益な効果を与え得るため、当該方法が実施され得る。
【０１８８】
核酸送達ベクターはまた、対象において目的のポリペプチド又は機能性ＲＮＡを産生するために用いることもできる（例えば、ポリペプチドを産生するため、又は例えば、スクリーニング法と組み合わせて対象に対する機能的核酸の効果を観察するため、バイオリアクターとして対象を用いる）。
【０１８９】
一般に、本発明の核酸送達ベクターを用いて、治療的ポリペプチド又は機能的核酸を送達することが有益である任意の病態を治療及び／又は予防するために、ポリペプチド又は機能的核酸をコードする核酸を送達することができる。例示的な疾患状態には、限定されないが、嚢胞性線維症（嚢胞性線維症膜貫通調節タンパク質）及び他の肺疾患、血友病Ａ（第ＶＩＩＩ因子）、血友病Ｂ（第ＩＸ因子）、サラセミア（β－グロビン）、貧血（エリスロポエチン）及び他の血液疾患、アルツハイマー病（ＧＤＦ；ネプリライシン）、多発性硬化症（β－インターフェロン）、パーキンソン病（グリア細胞株由来神経栄養因子［ＧＤＮＦ］）、ハンチントン病（ＲＮＡｉによるリピート除去）、筋萎縮性側索硬化症、てんかん（ガラニン、神経栄養因子）、他の神経疾患、がん（エンドスタチン、アンジオスタチン、ＴＲＡＩＬ、ＦＡＳリガンド、インターフェロンを含むサイトカイン；ＶＥ

ＧＦ又は多剤耐性遺伝子産物に対するＲＮＡｉを含むＲＮＡｉ）、糖尿病（インスリン）、デュシェンヌ型（ジストロフィン、ミニジストロフィン、インスリン様成長因子Ｉ、サルコグリカン［例えば、α、β、γ］）、ミオスタチンに対するＲＮＡｉ、ミオスタチンプロペプチド、フォリスタチン、アクチビンＩＩ型可溶性受容体、抗炎症性ポリペプチド、例えば、ＩカッパＢ優性変異、サルコスパン、ユートロフィン、ミニユートロフィン、ジストロフィン遺伝子のスプライスジャンクションに対するＲＮＡｉによるエクソンスキッピングの誘導［例えば、ＷＯ／２００３／０９５６４７を参照］、エクソンスキッピングを誘導するＵ７ｓｎＲＮＡに対するアンチセンス［例えば、ＷＯ／２００６／０２１７２４を参照］、及びミオスタチン若しくはミオスタチンプロペプチドに対する抗体又は抗体断片）、及びベッカー型を含む筋ジストロフィー、ゴーシェ病（グルコセレブロシダーゼ）、ハーラー病（α－Ｌ－イズロニダーゼ）、アデノシンデアミナーゼ欠損症（アデノシンデアミナーゼ）、糖原病（例えば、ファブリー病［α－ガラクトシダーゼ］及びポンペ病［リソソーム酸α－グルコシダーゼ］）及び他の代謝異常、先天性肺気腫（α１－アンチトリプシン）、レッシュ・ナイハン症候群（ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ）、ニーマン・ピック病（スフィンゴミエリナーゼ）、テイ・サックス病（リソソームヘキソサミニダーゼＡ）、メープルシロップ尿症（分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ）、網膜変性疾患（眼及び網膜の他の疾患、例えば、黄斑変性症に対するＰＤＧＦ）、脳などの固形臓器の疾患（パーキンソン病［ＧＤＮＦ］、星状細胞腫［エンドスタチン、アンジオスタチン及び／又はＶＥＧＦに対するＲＮＡｉ］、神経膠芽腫［エンドスタチン、アンジオスタチン、及び／又はＶＥＧＦに対するＲＮＡｉ］を含む）、肝臓、腎臓、うっ血性心不全又は末梢動脈疾患（ＰＡＤ）を含む心臓（例えば、プロテインホスファターゼ阻害剤Ｉ（Ｉ－１）、ｓｅｒｃａ２ａ、ホスホランバン遺伝子を調節するジンクフィンガータンパク質、Ｂａｒｋｃｔ、β２－アドレナリン受容体、β２－アドレナリン受容体キナーゼ（ＢＡＲＫ）、ホスホイノシチド－３キナーゼ（ＰＩ３キナーゼ）、Ｓ１００Ａ１、パルブアルブミン、アデニリルシクラーゼ６型、Ｇタンパク質共役型受容体キナーゼ２型ノックダウンに影響を与える分子、例えば、切断型構成的活性型ｂＡＲＫｃｔ；カルサルシン、ホスホランバンに対するＲＮＡｉ；ホスホランバン阻害分子又はドミナントネガティブ分子、例えば、ホスホランバンＳ１６Ｅなどを送達することによって）、関節炎（インスリン様成長因子）、関節障害（インスリン様成長因子１及び／又は２）、内膜過形成（例えば、ｅｎｏｓ、ｉｎｏｓを送達することによって）、心臓移植の生存率の改善（スーパーオキシドジスムターゼ）、ＡＩＤＳ（可溶性ＣＤ４）、筋肉消耗（インスリン様成長因子Ｉ）、腎臓欠乏（エリスロポエチン）、貧血（エリスロポエチン）、関節炎（抗炎症性因子、例えば、ＩＲＡＰ及びＴＮＦα可溶性受容体）、肝炎（α－インターフェロン）、ＬＤＬ受容体欠損症（ＬＤＬ受容体）、高アンモニア血症（オルニチントランスカルバミラーゼ）、クラッベ病（ガラクトセレブロシダーゼ）、バッテン病、ＳＣＡ１、ＳＣＡ２、及びＳＣＡ３を含む脊髄性脳失調症、フェニルケトン尿症（フェニルアラニンヒドロキシラーゼ）、自己免疫疾患などが含まれる。本発明は更に、臓器移植の前及び／又は後に、移植の成功を増加させるため、及び／又は、臓器移植の負の副作用を減少させるために、又は、補助療法を、用いることができる（例えば、サイトカイン生産をブロックするための免疫抑制剤又は阻害核酸を投与することにより）。別の例として、骨形成タンパク質（ＢＮＰ２、７など、ＲＡＮＫＬ及び／又はＶＥＧＦを含む）は、例えば、がん患者の骨折又は外科的除去後に、骨同種移植片とともに投与することができる。

【０１９０】

遺伝子導入は、病態について理解して療法を提供するための実質的な潜在的用途を有している。欠陥遺伝子が知られており、クローン化されている遺伝性疾患が数多く存在する。一般に、上記病態は２つのクラス：一般に劣性遺伝性であり、通常は酵素の欠乏状態、及び調節又は構造タンパク質が関与し得る、典型的に優勢遺伝性である、不均衡状態に分類される。欠乏状態の疾患については、遺伝子導入は、正常遺伝子を補充療法のために影響を受けた組織へ運ぶため、及び、アンチセンス変異を用いて疾患に関する動物モデルを作製するために、用いることができる。不均衡病態については、遺伝子導入は、モデル系

における病態を作製するために用いることができ、それから、病態に対抗する試みにおいて用いることができる。したがって、核酸送達ベクターは、遺伝子疾患の治療及び／又は予防を可能にする。

【０１９１】

核酸送達ベクターはまた、インビトロ又はインビボで細胞に機能的核酸を提供するためにも用いられ得る。細胞における機能的核酸の発現は、例えば、細胞による特定の標的タンパク質の発現を減少させることができる。したがって、機能的核酸は、特定のタンパク質の発現を低減させるために、それを必要とする対象において投与することができる。

【０１９２】

核酸送達ベクターは、診断法及びスクリーニング法において用途が見出され、それにより、目的の核酸がトランスジェニック動物モデルにおいて一時的又は安定的に発現される。

【０１９３】

核酸送達ベクターはまた、当業者に明らかであるように、限定されないが、遺伝子標的化、クリアランス、転写、翻訳などを評価するためのプロトコルにおける使用を含む、様々な非治療的目的のために用いることもできる。核酸送達ベクターはまた、安全性（蔓延、毒性、免疫原性など）を評価する目的のために用いることもできる。そのようなデータは、例えば、臨床有効性の評価前の規制上の承認プロセスの一部として米国食品医薬品局によって考慮される。

【０１９４】

更なる一態様として、本発明の核酸送達ベクターは、対象における免疫応答を産生するために用いられ得る。この実施形態によれば、免疫原性ポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸送達ベクターを対象に投与して、免疫原性ポリペプチドに対して対象によって能動的な免疫応答を開始することができる。免疫原性ポリペプチドは上記に説明したとおりである。いくつかの実施形態では、防御免疫応答が誘発される。

【０１９５】

あるいは、核酸送達ベクターは、エクスビボで細胞へ投与されてよく、変更された細胞が対象へ投与される。核酸を含む核酸送達ベクターは細胞に導入され、細胞は対象に投与され、そこで免疫原をコードする核酸が発現され、対象において免疫原に対する免疫応答を誘導することができる。特定の実施形態では、細胞は抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）である。

【０１９６】

「能動免疫応答」又は「能動免疫」は、「免疫原との遭遇後の宿主組織及び細胞の参加」によって特徴付けられる。それは、リンパ細網組織内の免疫担当細胞の分化及び増殖を含み、抗体の合成若しくは細胞が介在する反応度の発達、又は両方を生じさせる。」 Ｈｅｒｂｅｒｔ Ｂ．Ｈｅｒｓｃｏｗｉｔｚ，Ｉｍｍｕｎｏｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ：Ｃｅｌｌ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ ｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｆｏｒｍａｔｉｏｎ，ｉｎ ＩＭＭＵＮＯＬＯＧＹ：ＢＡＳＩＣ ＰＲＯＣＥＳＳＥＳ１１７（Ｊｏｓｅｐｈ Ａ．Ｂｅｌｌａｎｔｉ ｅｄ．，１９８５）。別の言い方をすると、能動免疫応答は、感染又はワクチン接種によって免疫原に曝露された後に宿主によって開始される。能動免疫は、「能動的に免疫化された宿主から非免疫宿主への、予め形成された物質（抗体、伝達因子、胸腺移植組織、インターロイキン－２）の移行」によって獲得される受動免疫と対比することができる。Ｉｄ．

【０１９７】

本明細書において用いられる「防御」免疫応答又は「防御」免疫は、免疫応答が、疾患の発生を防止又は減少させるという点で何らかの利益を対象に与えることを示す。あるいは、防御免疫応答又は防御免疫は、疾患、特にがん又は腫瘍の処置及び／又は予防において、（例えば、がん又は腫瘍の形成を防止することにより、がん又は腫瘍の回帰を生じさせることにより、及び／又は、転移を防止することにより、及び／又は、転移小結節の増殖を防止することにより）有用であり得る。防御効果は、治療の利益がその任意の不利な

点に勝る限り、完全又は部分的であってよい。
【０１９８】
特定の実施形態では、核酸送達ベクター又は核酸を含む細胞は、以下に記載するように、免疫原的に有効な量で投与することができる。
【０１９９】
核酸送達ベクターはまた、１つ以上のがん細胞抗原（又は免疫学的に似ている分子）又はがん細胞に対して免疫応答を産生する任意の他の免疫原を発現する核酸送達ベクターの投与によって、がん免疫療法のために投与することもできる。説明すると、例えば、がんを有する患者を治療するため、及び／又はがんが対象において発生するのを防止するために、がん細胞抗原をコードする核酸を含む核酸送達ベクターを投与することにより、免疫応答が対象においてがん細胞抗原に対して産生され得る。核酸送達ベクターは、本明細書中に記載のように、インビボで、又はエクスビボの方法を用いることにより、対象へ投与され得る。あるいは、がん抗原は、核酸送達ベクターの一部として発現され得る。
【０２００】
別の代替としては、当技術分野で知られている任意の他の治療的核酸（例えば、ＲＮＡｉ）又はポリペプチド（例えば、サイトカイン）を投与して、がんを治療及び／又は予防することができる。
【０２０１】
本明細書において用いられる用語「がん」は、腫瘍形成がんを包含する。同様に、用語「がん性組織」は、腫瘍を包含する。「がん細胞抗原」は、腫瘍抗原を包含する。
【０２０２】
用語「がん」は、当該分野におけるその理解された意味を有し、例えば、身体の離れた部位へ広がる（すなわち、転移する）潜在性を有する細胞の無制御な増殖である。例示的ながんとしては、限定されないが、黒色腫、腺がん、胸腺腫、リンパ腫（例えば、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫）、肉腫、肺がん、肝臓がん、結腸がん、白血病、子宮がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、膀胱がん、腎臓がん、膵がん、脳腫瘍及び任意の他のがん、又は現在既知若しくは後に同定される悪性状態が含まれる。代表的な実施形態では、本発明は、腫瘍形成がんを処置及び／又は予防する方法を提供する。
【０２０３】
用語「腫瘍」はまた、例えば、多細胞生物内の未分化細胞の異常な塊として、当該分野において理解される。腫瘍は、悪性又は良性であり得る。代表的な実施形態では、本明細書に開示される方法は、悪性腫瘍を予防及び治療するために用いられる。
【０２０４】
用語「がんを治療する」、「がんの治療」及び同等の用語により、がんの重症度が減少又は少なくとも部分的に除去されること、並びに／又は疾患の進行が遅延及び／若しくは制御されること、並びに／又は疾患が安定することが意図される。特定の実施形態では、これらの用語は、がんの転移が防止若しくは減少又は少なくとも部分的に除去されること、及び／あるいは転移小結節の増殖が防止若しくは減少又は少なくとも部分的に除去されることを示す。
【０２０５】
用語「がんの予防」又は「がんを予防する」及び同等の用語は、方法が、がんの発症の発生率及び／若しくは重症度を少なくとも部分的に排除、又は減少、及び／又は遅延させることを意図する。別の言い方をすると、対象におけるがんの発症は、可能性又は確率が減少し、かつ／又は遅延される。
【０２０６】
特定の実施形態では、細胞は、がんを有する対象から取り出して、核酸送達ベクターと接触され得る。それから、修飾細胞が対象に投与され、それによってがん細胞抗原に対する免疫応答が誘発される。この方法は、インビボで十分な免疫応答を開始することができない（すなわち、増強抗体を十分な量で産生することができない）免疫不全の対象で有利に用いることができる。

【０２０７】
免疫応答は、免疫調節性サイトカイン（例えば、α－インターフェロン、β－インターフェロン、γ－インターフェロン、ω－インターフェロン、τ－インターフェロン、インターロイキン－１α、インターロイキン－１β、インターロイキン－２、インターロイキン－３、インターロイキン－４、インターロイキン５、インターロイキン－６、インターロイキン－７、インターロイキン－８、インターロイキン－９、インターロイキン－１０、インターロイキン－１１、インターロイキン１２、インターロイキン－１３、インターロイキン－１４、インターロイキン－１８、Ｂ細胞増殖因子、ＣＤ４０リガンド、腫瘍壊死因子－α、腫瘍壊死因子－β、単球化学誘引タンパク質－１、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子、及びリンホトキシン）によって増強され得ることが当技術分野で知られている。したがって、免疫調節性サイトカイン（好ましくは、ＣＴＬ誘導性サイトカイン）は、ウイルスベクターと組み合わせて対象に投与され得る。
【０２０８】
サイトカインは、当技術分野で知られている任意の方法によって投与され得る。外因性サイトカインを対象に投与してもよく、あるいは、サイトカインをコードする核酸を適切なベクターを使用して対象に送達し、サイトカインをインビボで産生してもよい。
【０２０９】
対象、薬学的製剤、及び投与モード
本発明の方法は、獣医学及び医療用途の両方での使用を見出す。好適な対象は、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、及び哺乳動物を含む。本明細書において用いられる用語「哺乳動物」は、制限されないが、ヒト、霊長類、非ヒト霊長類（例えば、サル及びヒヒ）、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ウサギ、齧歯類（例えば、ラット、マウス、ハムスターなど）などを含む。ヒト対象は、新生児、幼児、青少年、及び成人を含む。任意に、対象は、例えば、本明細書に記載されるものを含む障害を対象が有する又はそのリスクがあると考えられ、又は、本明細書に記載されるものを含むポリヌクレオチドの送達によって利益を得るので、本発明の方法を「必要」とする。更なる選択肢として、対象は、実験動物及び／又は疾患の動物モデルであり得る。好ましくは、対象は、ヒトである。
【０２１０】
特定の実施形態では、異種薬剤及びタンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、対象の人生においてできるだけ早く、例えば、対象が疾患又は障害であると診断されたらすぐに、それを必要とする対象へ投与される。いくつかの実施形態では、方法は、新生児対象に対して、例えば、新生児スクリーニングによって疾患又は障害が同定された後に行われる。いくつかの実施形態では、方法は、１０才よりも前、例えば１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０才よりも前の対象に対して行われる。いくつかの実施形態では、当該方法は、１０才よりも後の若年又は成人対象に対して行われる。いくつかの実施形態では、当該方法は、子宮内の胎児に対して、例えば出生前スクリーニングによって疾患又は障害が同定された後に行われる。いくつかの実施形態では、方法は、対象が疾患又は障害と関連する症候を発症したらすぐに、対象に対して行われる。いくつかの実施形態では、方法は、対象が疾患又は障害と関連する症候を発症する前に、例えば、疾患又は障害を有している疑いがあり、又はそのように診断されるが症候を示し始めていない対象に対して行われる。
【０２１１】
特定の実施形態では、本発明は、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体を、単独で、又は異種薬剤、薬学的に許容される担体、及び任意で、他の薬用剤、医薬品、安定化剤、緩衝剤、担体、アジュバント、希釈剤などと組み合わせて含む１つ以上の薬学的組成物を提供する。注射の場合、担体は、通常は液体である。他の投与方法では、担体は、固体又は液体のいずれかであり得る。吸入投与の場合、担体は吸入可能であり、固体又は液体の微粒子形態であり得る。
【０２１２】
「薬学的に許容される」とは、毒性又は他の望ましくない物質、すなわち、いかなる望

ましくない生物学的影響も引き起こすことなく対象に投与され得る物質を意味する。

【０２１３】

本発明の一態様は、インビトロで、例えばエクスビボ方法の一部として、核酸を細胞へ導入する方法である。異種薬剤（例えば、核酸送達ベクター、例えば、ウイルスベクター）は、特定の標的細胞に好適な標準的な形質導入法に従って、適切な量、例えば、感染多重度で細胞に導入され得る。投与するウイルスベクターの力価は、標的細胞の種類及び数、並びに特定のウイルスベクターに応じて変化し得、当業者であれば過度の実験を伴うことなく決定することができる。代表的な実施形態では、少なくとも約10^3感染単位、より好ましくは少なくとも約10^5感染単位が細胞へ導入される。

【０２１４】

核酸送達ベクターが導入される細胞は任意の種類であり得、限定されないが、神経系細胞（末梢及び中枢神経系の細胞、特に、脳細胞、例えばニューロン及びオリゴデンドロサイトを含む）、肺細胞、眼の細胞（網膜細胞、網膜色素上皮、及び角膜細胞を含む）、血管細胞（例えば、内皮細胞、内膜細胞）、上皮細胞（例えば、消化管及び呼吸器上皮細胞）、筋肉細胞（例えば、骨格筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞及び／又は横隔膜筋細胞）、樹状細胞、膵臓細胞（膵島細胞を含む）、肝細胞、腎細胞、心筋細胞、骨細胞（例えば、骨髄幹細胞）、造血幹細胞、脾臓細胞、ケラチン生成細胞、線維芽細胞、内皮細胞、前立腺細胞、生殖細胞などを含む。代表的な実施形態では、細胞は、任意の前駆細胞であり得る。更なる可能性としては、細胞は、幹細胞（例えば、神経幹細胞、肝臓幹細胞）であり得る。更なる代替としては、細胞は、がん又は腫瘍細胞であり得る。更に、細胞は、上記に記載したような任意の起源の種に由来し得る。

【０２１５】

核酸送達ベクターは、修飾細胞を対象に投与する目的で、インビトロで細胞に導入することができる。特定の実施形態では、細胞が対象から取り出されて、核酸送達ベクターがその中に導入されて、次いで、細胞が元の対象へ投与される。エクスビボでの操作のために細胞を対象から取り出して、その後に元の対象へ導入する方法は、当技術分野で知られている（例えば、米国特許第５，３９９，３４６号を参照）。あるいは、核酸送達ベクターを、ドナー対象由来の細胞へ、培養細胞へ、又は、任意の他の適切な起源由来の細胞へ導入することができ、細胞が、それを必要とする対象（すなわち、「レシピエント」対象）へ投与される。

【０２１６】

エクスビボでの遺伝子送達に好適な細胞は上述のとおりである。対象へ投与する細胞の投薬量は、対象の年齢、状態及び種類、細胞のタイプ、細胞によって発現される核酸、投与様式などによって変化するであろう。典型的に、少なくとも約10^2～約10^8細胞又は少なくとも約10^3～約10^6細胞が、薬学的に許容される担体において用量当たり投与される。特定の実施形態では、核酸送達ベクターを用いた細胞形質導入が、治療有効量又は予防有効量で薬学的担体と組み合わせて対象に投与される。

【０２１７】

いくつかの実施形態では、核酸送達ベクターは、細胞に導入され、細胞は、送達されたポリペプチド（例えば、導入遺伝子として又はカプシド内で発現される）に対する免疫原性応答を誘発するために対象に投与され得る。典型的に、免疫原的有効量のポリペプチドを発現するある量の細胞が、薬学的に許容される担体と組み合わせて投与される。「免疫原的有効量」は、医薬製剤が投与される対象において、ポリペプチドに対する能動的な免疫応答を誘発するのに十分な、発現されるポリペプチドの量である。特定の実施形態では、投薬量は、防御免疫応答（上記に定義）を生じるのに十分である。与えられる防御の程度は、免疫原性ポリペプチドを投与する利益がその任意の不利な点に勝る限り、完全又は永久である必要はない。

【０２１８】

本発明の更なる一態様は、異種薬剤（例えば、核酸送達ベクター）を対象へ投与する方法である。核酸送達ベクターの、それを必要とするヒト対象又は動物への投与は、当技術

分野で知られている任意の手段によることができる。任意に、核酸送達ベクターは、薬学的に許容される担体中で治療有効量又は予防有効量で送達される。

【０２１９】

核酸送達ベクターは更に、免疫原性応答を誘発するために（例えば、ワクチンとして）投与することができる。典型的に、本発明の免疫原性組成物は、免疫原的有効量の核酸送達ベクターを、薬学的に許容される担体と組み合わせて含む。任意に、投薬量は、防御免疫応答（上記に定義）を生じるのに十分な量である。与えられる防御の程度は、免疫原性ポリペプチドを投与する利益がその任意の不利な点に勝る限り、完全又は永久である必要はない。対象及び免疫原は上述のとおりである。

【０２２０】

対象へ投与される核酸送達ベクター（例えば、ウイルスベクター）の投薬量は、投与様式、治療及び／若しくは予防される疾患又は状態、個々の対象の状態、特定の核酸送達ベクター、並びに送達される核酸などに依存し、ルーチン的な様式で決定することができる。治療的効果を達成するための例示的な用量は、少なくとも約10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}形質導入単位、任意に約10^8～10^{13}形質導入単位の力価である。

【０２２１】

特定の実施形態では、様々な間隔、例えば、毎日、毎週、毎月、毎年などの期間にわたって、１回を超える投与（例えば、２回、３回、４回、又はそれよりも多くの投与）を用いて、所望のレベルの遺伝子発現が達成され得る。

【０２２２】

例示的な投与様式としては、経口、直腸、経粘膜、鼻腔内、吸入（例えば、エアロゾルによる）、口腔（例えば舌下）、膣、髄腔内、眼球内、経皮、内皮内、子宮内（又は胚内）、非経口（例えば、静脈内、皮下、皮内、頭蓋内、筋肉内［骨格筋、横隔膜及び／又は心筋への投与を含む］、胸膜内、脳内、及び関節内）、局所（例えば、皮膚及び粘膜表面（気道表面を含む）の両方、及び経皮投与）、リンパ内など、並びに直接的な組織又は臓器注入（例えば、肝臓、眼、骨格筋、心筋、横隔膜筋又は脳）が挙げられる。

【０２２３】

投与は、対象における任意の部位であることができ、限定されずに、脳、骨格筋、平滑筋、心臓、横隔膜、気道上皮、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、皮膚、及び眼からなる群から選択される部位を含む。

【０２２４】

投与は、腫瘍（例えば、腫瘍又はリンパ節内、又はその付近）に対するものであってもよい。任意の所定の場合における最も好適な経路は、治療及び／又は予防される症状の性質及び重症度、並びに用いられる特定のベクターの性質に依存する。

【０２２５】

本発明による骨格筋への投与は、限定されないが、四肢（例えば、上腕、前腕、上腿、及び／又は下腿）、背中、首、頭部（例えば、舌）、胸部、腹部、骨盤／会陰、及び／又は指における骨格筋への投与を含む。好適な骨格筋としては、限定されないが、小指外転筋（手の）、小指外転筋（足の）、母趾外転筋、中足骨外転筋、短母指外転筋、長母指内転筋、短母指内転筋、母趾内転筋、長母指内転筋、大内転筋、母指内転筋、肘筋、前斜角筋、関節筋属、上腕二頭筋、大腿二頭筋、上腕筋、腕橈骨筋、頬筋、烏口腕筋、上皺筋、三角筋、口角圧筋、下唇圧筋、二腹筋、背側骨間筋（手の）、背側骨間筋（足の）、短橈側手根伸筋、長橈側手根伸筋、尺側手根伸筋、小指伸筋、指伸筋、短趾伸筋、長趾伸筋、短母趾伸筋、長母趾伸筋、印伸筋、短母指伸筋、長母指伸筋、橈骨手根屈筋、尺側手根屈筋、短小指屈筋（手の）、短小指屈筋（足の）、短趾屈筋、長趾屈筋、深趾屈筋、浅趾屈筋、短母趾屈筋、長母趾屈筋、短母指屈筋、長母指屈筋、前頭筋、腓腹筋、オトガイ舌骨筋、大殿筋、中殿筋、小殿筋、薄筋、頸腸肋筋、腰腸肋筋、胸腸肋筋、腸骨筋、下双子筋、下斜筋、下直筋、棘下筋、棘間筋、横突間筋、外側翼突筋、外側直筋、広背筋、口角挙筋、上唇挙筋、上唇鼻翼挙筋、上眼瞼挙筋、肩甲挙筋、長回旋筋、頭最長筋、頚最長筋、

胸最長筋、頭長筋、頚長筋、中様筋（手の）、中様筋（足の）、咬筋、内側翼突筋、内側直筋、中斜角筋、多裂筋、顎舌骨筋、下頭斜筋、上頭斜筋、外閉鎖筋、内閉鎖筋、後頭筋、片舌骨、小指の反対側、母指の反対側、眼輪筋、口輪筋、掌側骨間筋、短掌筋、長掌筋、恥骨筋、大胸筋、小胸筋、短腓骨筋、長腓骨筋、第三腓骨筋、梨状筋、足底骨間筋、足底筋、広頸筋、膝窩筋、後斜角筋、方形回内筋、円回内筋、大腰筋、大腿方形筋、足底方形筋、前頭直筋、外側頭直筋、大後頭直筋、小後頭直筋、大腿直筋、大菱形筋、小菱形筋、笑筋、縫工筋、小斜角筋、半膜様筋、頭半棘筋、頸半棘筋、胸半棘筋、半腱様筋、前鋸筋、短回旋筋（ｓｈｏｒｔ　ｒｏｔａｔｏｒ）、ヒラメ筋、頭棘筋、頚棘筋、胸棘筋、頭板状筋、頚板状筋、胸鎖乳突筋、胸骨舌骨筋、胸骨甲状筋、茎突舌骨筋、鎖骨下筋、肩甲下筋、上双子筋、上斜筋、上直筋、回外筋、棘上筋、側頭筋、大腿筋膜張筋、大円筋、小円筋、胸筋、甲状舌骨、前脛骨筋、後脛骨筋、僧帽筋、上腕三頭筋、中間広筋、外側広筋、内側広筋、大頬骨筋、及び小頬骨筋、並びに当技術分野で知られている他の任意の好適な骨格筋が含まれる。

【０２２６】

異種薬剤は、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、四肢灌流（任意に、足及び／又は腕の分離式四肢灌流であってもよい；例えばＡｒｒｕｄａ　ｅｔ　ａｌ．，（２００５）Ｂｌｏｏｄ１０５：３４５８－３４６４を参照）、及び／又は直接的な筋肉内注入によって、骨格筋に送達することができる。特定の実施形態では、異種薬剤は、四肢灌流、場合によっては隔離された四肢灌流（例えば、静脈内又は静脈内によって、対象（例えば、ＤＭＤなどの筋ジストロフィーを有する対象）の四肢（腕及び／又は脚）に投与される。本発明の実施形態では、異種薬剤は、「流体力学」技術を使用せずに有利に投与することができる。従来技術のベクターの組織送達（例えば、筋肉へ）は、多くの場合、流体力学技術（例えば、静脈内／大量の静脈内投与）によって強化され、これにより、血管系内の圧力が増加し、因子が内皮細胞障壁を通過する能力が促進される。特定の実施形態では、異種薬剤は、大量注入及び／又は血管内圧の上昇（例えば、正常な収縮期圧より高い、例えば、正常な収縮期圧を超える血管内圧の５％、１０％、１５％、２０％、２５％以下の増加）などの流体力学技術の非存在下で投与することができる。そのような方法は、浮腫、神経損傷及び／又は区画症候群のような、流体力学技術と関連する副作用を減少又は回避し得る。

【０２２７】

心筋への投与は、左心房、右心房、左心室、右心室及び／又は隔膜への投与を含む。異種薬剤は、静脈内投与、動脈内投与、例えば、大動脈内投与、直接的な心臓注入（例えば、左心房、右心房、左心室、右心室へ）、及び／又は冠動脈灌流によって、心筋へ送達され得る。

【０２２８】

横隔膜筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、及び／又は腹膜内投与を含む任意の好適な方法によることができる。

【０２２９】

平滑筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、及び／又は腹膜内投与を含む任意の好適な方法によることができる。一実施形態では、平滑筋内、平滑筋付近、及び／又は平滑筋上に存在する内皮細胞へ投与することができる。

【０２３０】

標的組織への送達は、異種薬剤を含むデポーを送達することによっても達成することができる。代表的な実施形態では、異種薬剤を含むデポーは、骨格筋、平滑筋、心筋及び／又は横隔膜筋組織へ埋め込まれるか、又は異種薬剤を含むフィルム若しくは他のマトリックスと組織を接触させることができる。そのような埋め込み可能なマトリックス又は基材は、米国特許第７，２０１，８９８号に記載されている。

【０２３１】

特定の実施形態では、異種薬剤は、骨格筋、横隔膜筋及び／又は心筋へ投与される（例えば、筋ジストロフィー又は心疾患［例えば、ＰＡＤ又はうっ血性心不全］を治療及び／

又は予防するため）。
【０２３２】
代表的な実施形態では、本発明は、骨格筋、心筋及び／若しくは横隔膜筋の障害を治療並びに／又は予防するために用いられる。
【０２３３】
代表的な実施形態では、本発明は、それを必要とする対象における筋ジストロフィーを治療及び／又は予防する方法を提供し、方法は、治療又は予防有効量の異種薬剤を哺乳動物の対象へ投与することを含み、異種薬剤は、ジストロフィン、ミニジストロフィン、マイクロジストロフィン、ミオスタチンプロペプチド、フォリスタチン、アクチビンＩＩ型可溶性受容体、ＩＧＦ－１、抗炎症性ポリペプチド、例えばＩカッパＢドミナント変異体、サルコスパン、ユートロフィン、マイクロジストロフィン、ラミニン－α２、α－サルコグリカン、β－サルコグリカン、γ－サルコグリカン、δ－サルコグリカン、ＩＧＦ－１、ミオスタチン若しくはミオスタチンプロペプチドに対する抗体若しくは抗体断片、及び／又は、ミオスタチンに対するＲＮＡｉをコードする核酸を含む。特定の実施形態では、異種薬剤は、本明細書中の他の場所で説明したように、骨格筋、横隔膜筋及び／又は心筋へ投与することができる。
【０２３４】
あるいは、血中又は他の組織への全身性送達のために通常循環するポリペプチド（例えば、酵素）又は機能性核酸（例えば、機能性ＲＮＡ、例えば、ＲＮＡｉ、マイクロＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ）の産生のためのプラットフォームとして用いられる骨格筋、心筋又は横隔膜筋へ核酸を送達するために本発明を実施して、障害を治療及び／又は予防することができる（例えば代謝障害、例えば糖尿病（例えば、インスリン）、血友病（例えば、ＩＸ因子又はＶＩＩＩ因子）、ムコ多糖障害（例えば、スライ症候群、ハーラー症候群、シャイエ症候群、ハーラー－シャイエ症候群、ハンター症候群、サンフィリポ症候群Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、モルキオ症候群、Ｍａｒｏｔｅａｕｘ－Ｌａｍｙ症候群など）又はリソソーム蓄積症（例えばゴーシェ病［グルコセレブロシダーゼ］、ポンペ病［リソソーム酸α－グルコシダーゼ］又はファブリー病［α－ガラクトシダーゼＡ］）又は糖原病（例えばポンペ病［リソソーム酸αグルコシダーゼ］）。代謝障害を治療及び／又は予防するための他の好適なタンパク質は上述のとおりである。目的の核酸を発現するためのプラットフォームとしての筋肉の使用は、米国特許公開第２００２／０１９２１８９号に記載されている。
【０２３５】
したがって、一態様として、本発明は、代謝障害を治療及び／又は予防することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、方法が、治療又は予防有効量の異種薬剤を対象に（例えば、対象の骨格筋に）投与することを含み、異種薬剤が、ポリペプチドをコードする核酸を含み、代謝障害が、ポリペプチドの欠損及び／又は欠陥の結果である、方法を包括する。例示的な代謝障害及びポリペプチドをコードする核酸が本明細書に記載される。ポリペプチドは分泌されてもよい（例えば、その本来の状態で、分泌されるポリペプチドであるポリペプチド、又は例えば、当技術分野で知られている分泌シグナル配列との作動可能な関連性によって、分泌されるように操作されているポリペプチド）。本発明のいかなる特定の理論にも制限されずに、本実施形態によれば、骨格筋への投与は、体循環へのポリペプチドの分泌及び標的組織への送達をもたらすことができる。異種薬剤を骨格筋へ送達する方法は、本明細書中により詳細に記載されている。
【０２３６】
また、本発明を実施して、全身性送達のためにアンチセンスＲＮＡ、ＲＮＡｉ又は他の機能性ＲＮＡ（例えば、リボザイム）を産生することもできる。
【０２３７】
本発明はまた、先天性心不全又はＰＡＤを治療及び／又は予防することを必要とする対象においてそれを実施する方法であって、方法が、治療又は予防有効量の本発明の異種薬剤を哺乳動物対象に投与することを含み、異種薬剤が、例えば、筋小胞体（ｓａｒｃｏｐ

ｌａｓｍｉｃ ｅｎｄｏｒｅｔｉｃｕｌｕｍ）Ｃａ$^{2+}$－ＡＴＰａｓｅ（ＳＥＲＣＡ２ａ）、血管新生因子、ホスファターゼ阻害剤Ｉ（Ｉ－１）、ホスホランバンに対するＲＮＡｉ；ホスホランバン阻害分子又はドミナントネガティブ分子、例えば、ホスホランバンＳ１６Ｅなど、ホスホランバン遺伝子を調節するジンクフィンガータンパク質、β２－アドレナリン受容体、β２－アドレナリン受容体キナーゼ（ＢＡＲＫ）、ＰＩ３キナーゼ、カルサルカン、β－アドレナリン受容体キナーゼ阻害剤（βＡＲＫｃｔ）、プロテインホスファターゼ１の阻害剤１、Ｓ１００Ａ１、パルブアルブミン、アデニリルシクラーゼ６型、Ｇタンパク質共役型受容体キナーゼ２型ノックダウンに影響を与える分子、例えば、例えば、切断型構成的活性型ｂＡＲＫｃｔ、Ｐｉｍ－１、ＰＧＣ－１α、ＳＯＤ－１、ＳＯＤ－２、ＥＣ－ＳＯＤ、カリクレイン、ＨＩＦ、チモシン－β４、ｍｉｒ－１、ｍｉｒ－１３３、ｍｉｒ－２０６、及び／又はｍｉｒ－２０８をコードする核酸を含む、方法が提供される。

【０２３８】

注入剤は、液体溶液若しくは懸濁液、注入前の液体中の溶液若しくは懸濁液に好適な固体形態、又はエマルションのいずれかとして、従来の形態で調製することができる。あるいは、全身ではなく局所的な様式で、例えばデポー又は徐放性製剤において、異種薬剤を投与してよい。更に、異種薬剤は、外科的に埋め込み可能なマトリックスに付着させて送達することができる（例えば、米国特許公開第２００４－００１３６４５号に記載されている）。

【０２３９】

本明細書に開示される異種薬剤は、任意の好適な手段によって、任意に、対象が吸入する異種薬剤からなる吸入可能粒子のエアロゾル懸濁液を投与することによって、対象の肺へ投与することができる。呼吸用粒子は、液体又は固体であってよい。異種薬剤を含む液体粒子のエアロゾルは、当業者に公知のように、任意の好適な手段によって、例えば、圧力駆動型のエアロゾル噴霧器又は超音波噴霧器を用いて産生され得る。例えば、米国特許第４，５０１，７２９号を参照。異種薬剤を含む固体粒子のエアロゾルは、製薬分野で公知の技術により、任意の固体微粒子薬物エアロゾル発生器を用いて同様に産生され得る。

【０２４０】

異種薬剤は、ＣＮＳの組織（例えば、脳、眼）へ投与することができ、本発明が存在しない場合に観察されるものよりも広範な分配の異種薬剤を有利にもたらし得る。

【０２４１】

特定の実施形態では、異種薬剤は、遺伝性障害、神経変性障害、精神障害及び腫瘍を含むＣＮＳの疾患を治療するために投与され得る。ＣＮＳの例示的な疾患は、限定されないが、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、カナバン病、リー病、レフサム病、トゥレット症候群、原発性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、進行性筋萎縮症、ピック病、筋ジストロフィー、多発性硬化症、重症筋無力症、ビンスワンガー病、脊髄又は頭部の傷害に起因する外傷、テイ・サックス病、Ｌｅｓｃｈ－Ｎｙａｎ疾患、てんかん、脳梗塞、気分障害を含む精神障害（例えば、鬱病、双極性感情障害、持続的な情動障害、二次気分障害）、神経分裂症、薬物依存症（例えば、アルコール中毒及び他の物質依存症）、ノイローゼ（例えば、不安、強迫観念的（ｏｂｓｅｓｓｉｏｎａｌ）障害、身体表現性障害、解離性障害、悲嘆、産後鬱病）、精神病（例えば、幻覚及び妄想）、認知症、偏執病、注意欠陥障害、精神性的障害、睡眠障害、疼痛性障害、摂食又は体重障害（例えば、肥満、カヘキシー、神経性食欲不振、及び過食症）並びにＣＮＳのがん及び腫瘍（例えば、下垂体腫瘍）を含む。

【０２４２】

ＣＮＳの障害は、網膜、後方路、及び視神経が関与する眼の障害（例えば、網膜色素変性症、糖尿病性網膜症及び他の網膜変性疾患、ブドウ膜炎、加齢黄斑変性、緑内障）を含む。

【０２４３】

全てではないとしても大部分の眼の疾患及び障害は、３つのタイプの適応症：（１）血

管新生、（２）炎症、及び（３）変性のうちの１つ以上と関連する。本発明の異種薬剤を用いて、抗血管新生因子；抗炎症性因子；細胞変性を遅延させ、細胞温存を促進し、又は細胞増殖を促進する因子、及び前述の組み合わせを送達することができる。

【０２４４】

糖尿病性網膜症は、例えば、血管新生によって特徴付けられる。糖尿病性網膜症は、１つ以上の抗血管新生因子を、眼内（例えば硝子体内）又は眼周囲（例えば、テノン嚢下領域）に送達することによって治療され得る。１つ以上の神経栄養因子もまた、眼内（例えば、硝子体内）又は眼周囲のいずれかに共送達され得る。

【０２４５】

ブドウ膜炎は炎症を伴う。１つ以上の抗炎症性因子は、本発明の送達ベクターの眼内（例えば、硝子体又は前房）投与によって投与され得る。

【０２４６】

網膜色素変性症は、比較によって、網膜変性によって特徴付けられる。代表的な実施形態では、網膜色素変性症は、１つ以上の神経栄養因子をコードする異種薬剤の眼球内（例えば、硝子体投与）によって治療され得る。

【０２４７】

加齢黄斑変性は、血管新生及び網膜変性の両方が関与する。この障害は、１つ以上の神経栄養因子をコードする異種薬剤を眼内（例えば、硝子体）に、及び／又は１つ以上の抗血管新生因子を眼内若しくは眼周囲（例えば、テノン嚢下領域）に投与することによって治療され得る。

【０２４８】

緑内障は、眼圧の増加及び網膜神経節細胞の喪失によって特徴付けられる。緑内障のための治療は、異種薬剤を用いて、興奮毒性損傷から細胞を保護する１つ以上の神経保護剤を投与することを含む。このような薬剤には、眼内、任意には硝子体内に送達される、Ｎ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸（ＮＭＤＡ）アンタゴニスト、サイトカイン、及び神経栄養因子が含まれる。

【０２４９】

他の実施形態では、本発明は、発作を治療するために、例えば、発作の発症、発生率又は重症度を軽減するために使用され得る。発作に対する治療の有効性は、行動（例えば、震え、目又は口のチック）、及び／又は電気記録的手段（ほとんどの発作は特徴的な電気記録的異常を有する）によって評価することができる。したがって、本発明は、経時的な複数の発作を特徴とするてんかんを治療するためにも用いられ得る。

【０２５０】

代表的な一実施形態では、下垂体腫瘍を治療するために、本発明の異種薬剤を使用してソマトスタチン（又はその活性断片）が脳に投与される。この実施形態によれば、ソマトスタチン（又はその活性断片）をコードする異種薬剤は、微量注入によって下垂体へ投与される。同様に、かかる治療を用いて、先端巨大症（下垂体からの異常な成長ホルモン分泌）を治療することができる。ソマトスタチンの核酸（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｊ００３０６）及びアミノ酸（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｐ０１１６６；プロセシングされた活性ペプチドソマトスタチン－２８及びソマトスタチン－１４を含む）配列は、当技術分野で知られている。

【０２５１】

特定の実施形態では、異種薬剤は、米国特許第７，０７１，１７２号に記載の分泌シグナルを含むことができる。

【０２５２】

本発明の代表的な実施形態では、異種薬剤は、ＣＮＳ（例えば、脳又は眼）へ投与される。異種薬剤は、脊髄、脳幹（延髄、脳橋）、中脳（視床下部、視床、視床上部、脳下垂体、黒質、松果体）、小脳、終脳（線条体、大脳、以下を含む：後頭、側頭、頭頂及び前頭葉．皮質、基底核、海馬及び扁桃体（ｐｏｒｔａａｍｙｇｄａｌａ））、辺縁系、新皮質、線条体、大脳、及び下丘へ導入され得る。異種薬剤はまた、眼の異なる領域、例えば

網膜、角膜及び／又は視神経へ投与され得る。
【０２５３】
異種薬剤は、異種薬剤のより分散した投与のために、脳脊髄液へ（例えば腰椎穿刺によって）送達され得る。異種薬剤は更に、血液脳関門が撹乱した状況（例えば、脳腫瘍又は脳梗塞）において、ＣＮＳへ血管内投与され得る。
【０２５４】
異種薬剤は、髄腔内、眼内、脳内、脳室内、静脈内（例えば、マンニトールなどの糖の存在下）、鼻腔内、耳内、眼内（例：硝子体内、網膜下、前房）、及び眼周囲（例えば、テノン嚢下領域）送達、並びに運動ニューロンへの逆行性送達を伴う筋肉内送達を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の経路によってＣＮＳの所望の領域に投与することができる。
【０２５５】
特定の実施形態では、異種薬剤は、液体製剤において、直接注入（例えば定位的注入）によって、ＣＮＳ内の所望の領域又は区画へ投与される。他の実施形態では、異種薬剤は、所望の領域への局所適用によって、又はエアロゾル製剤の鼻腔内投与によって提供され得る。眼への投与は、液滴の局所適用によるものであってよい。更なる代替としては、異種薬剤は、固体の徐放製剤として投与され得る（例えば、米国特許第７，２０１，８９８号を参照）。
【０２５６】
更なる実施形態では、異種薬剤を逆行性輸送のために用いて、運動ニューロンが関与する疾患及び障害（例えば、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ）など）を治療及び／又は予防することができる。例えば、異種薬剤を筋組織へ送達することができ、そこからニューロンへと移行することができる。
【０２５７】
タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、異種薬剤に関して上述した任意の経路又はスケジュールによって投与され得、タンパク質Ｍ又はその機能的断片若しくは誘導体は、異種薬剤とは異なる経路又はスケジュールによって投与され得る。
【０２５８】
本発明を説明したので、同様のことを、以下の実施例においてより詳細に説明するが、それらは例示目的だけのために本明細書中に含まれており、本発明に対する限定を意図しない。
【実施例】
【０２５９】
実施例１：方法
ＡＡＶウイルス産生：ＡＡＶベクターを、ＨＥＫ２９３細胞に３つのプラスミドをトランスフェクションする標準的なアプローチを用いて生産した。簡潔には、ＡＡＶ導入遺伝子プラスミドｐＴＲ－ＣＢＡ－Ｌｕｃを、ＡＡＶ　Ｒｅｐ／Ｃａｐヘルパープラスミド（ｐＸＲ２又はｐＸＲ８）及びアデノウイルスヘルパープラスミドｐＸＸ６－８０で共トランスフェクトした。７２時間後、細胞培養物を回収して、凍結融解及び超音波処理によって溶解させた。清澄化した細胞溶解物をＤＮＡｓｅ処理して、１５％／２５％／４０％／６０％イオジキサノール段階勾配中で超遠心分離して、陰イオン交換Ｑ－カラムによって精製した。精製したＡＡＶベクターを、パッケージされたＡＡＶ導入遺伝子のセグメントを増幅することを目的とするプライマーを用いたｑＰＣＲによって力価測定した。
【０２６０】
タンパク質産生：タンパク質Ｍ、膜貫通ドメイン（アミノ酸７４～４７９）を欠く切断型Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質ＭＧ２８１をコードし、Ｎ末端Ｈｉｓ－Ｔａｇ及びトロンビン切断部位を有する、プラスミドｐＥＴ－２８ｂ（＋）は、Ｒａｊｅｓｈによって提供された。プラスミドをエレクトロコンピテントＤＨ１０Ｂ細胞中で増殖させて、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎによるＰｕｒｅＬｉｎｋ　Ｍａｘｉ－Ｐｒｅｐキットを用いて精製した。ｐＥＴ－２８ｂ（＋）プラスミドを、一晩のスターター培養を用いてＢＬ２１／Ｄ

Ｅ３細胞内に一時的にトランスフェクトした。自己誘導培地（ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＭａｇｉｃ培地）にスターター培養物を播種して、１Ｌ～４Ｌ培養容量で、１８℃で３日間増殖させた。次いで、培養物を遠心分離によってペレット化して、－８０℃で凍結させた。

【０２６１】

タンパク質精製：凍結した細菌細胞培養物ペレットを解凍して、超音波処理によって溶解させて、ＤＮＡｓｅ処理して、遠心分離によって清澄化した。清澄化した細菌溶解物をニッケル結合緩衝液（２０ｍＭイミダゾール、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．４、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０２％アジ化ナトリウム）中で透析し、ＦＰＬＣを用いてニッケルＨｉｓ－ｔｒａｐ　ＦＦカラムに通した。次いで、ニッケルカラムと結合したタンパク質Ｍを、５００ｍＭイミダゾールを含んでいるが同一緩衝液ベースによって溶出させた。それから、タンパク質Ｍを、Ｓ－１００サイズ排除カラムに通して、２％グリセロールを含むリン酸緩衝生理食塩水中へ透析して、分光光度法を用いて定量化した。タンパク質Ｍの同一性をタンパク質分離のためのＳＤＳ－ＰＡＧＥタンパク質ゲル電気泳動を用いて確認して、その後にクーマシーブルーのタンパク質染色を行い、４８ｋＤａのタンパク質Ｍバンドを正しく同定した。

【０２６２】

ウエスタンブロット：８％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルでのタンパク質分離後に、タンパク質をＰＶＤＦメンブレン上に転写した。免疫ブロット法を５％脱脂乳中で抗Ｈｉｓ一次抗体１：１０００希釈（１０μｇ／ｍｌ）を用いて行った。二次ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼとコンジュゲートした（１：１０，０００希釈）。

【０２６３】

細胞培養：ＨＥＫ－２９３細胞及びＨｕｈ７細胞を、それぞれ、全てのインビトロＡＡＶ中和実験及び形質導入の増強に用いた。細胞を、１０％ウシ胎仔血清及びペニシリン－ストレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地を用いて５％ＣＯ２中３７℃で維持した。

【０２６４】

ヒトＩＶＩＧ及び免疫化マウス血清：１０％ヒトＩＶＩＧ（Ｇａｍｕｎｅｘ）をＧｒｉｆｏｌｓ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　Ｉｎｃ．（Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｔｒｉａｎｇｌｅ　Ｐａｒｋ，ＮＣ，ＵＳＡ）から購入した。１２匹の異なるマウス（５０％雄、５０％雌）に、3×10^{10}ウイルスゲノムのＡＡＶ８－ＦＶＩＩＩのＩＰ投与の後、２週間後に同一ベクターのブースト投与、及び１回目の投与の６週間後に２回目のブーストをした後、血清を回収してプールした。ヒトＩＶＩＧ及びマウス血清を分取して、その後の使用のために－８０℃で保管した。

【０２６５】

インビトロＡＡＶ中和アッセイ：ＮＡｂ分析を、わずかに変更を加えて前述したように行った。細胞を遠心分離によってペレット化して、無血清のＸ－Ｖｉｖｏ１０培地中に再懸濁し、次いで、４８ウェル又は９６ウェルプレートのいずれかのフォーマットでプレーティングした。ヒトＩＶＩＧ又は血清を、２倍又は１０倍のいずれかで連続希釈した。ＡＡＶ－Ｌｕｃを、ヒトＩＶＩＧ又はマウス血清のいずれかと４℃で１時間インキュベートした後、ＡＡＶを添加し、４℃で更に１時間インキュベートした。次いで、ＡＡＶ＋血清培養物を、プレーティング時に無血清培地中に懸濁した細胞と混合した。タンパク質Ｍを用いた中和実験では、４℃で１時間の各ステップで３つの異なるインキュベーションのシナリオを試験した：中和血清を最初にタンパク質Ｍとインキュベートした後にＡＡＶとインキュベート、ＡＡＶを最初に中和血清とインキュベートした後にタンパク質Ｍとインキュベート、及び、ＡＡＶを最初にタンパク質Ｍとインキュベートした後に中和血清とインキュベートした。細胞を、２００μｌ培地中の４８ウェルプレート、又は１００μｌ培地中の９６ウェルプレートに播種した。形質導入後、細胞を２４～４８時間３７℃で培養して、ＡＡＶ－ルシフェラーゼ導入遺伝子を発現させた。Ｌｕｃ活性を測定するために、細胞を受動的溶解緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ，ＵＳＡ）で溶解させて

、ルシフェラーゼシグナルをＷａｌｌａｃ１４２０　Ｖｉｃｔｏｒ２自動化プレートリーダーで測定した。ＮＡｂ力価を、ルシフェラーゼ活性が無血清対照よりも５０％低い最大希釈として定義した。

【０２６６】

ＮＡｂ血清のインビボＡＡＶ中和及び受動的導入：ＡＡＶ　ＮＡｂを含んでいる異なる量の血清をＣ５７ＢＬ／６マウスの後眼窩静脈内に注入して、２０分後にＡＡＶを注入した。ＡＡＶ投与前にタンパク質Ｍ治療を受けたマウスについては、タンパク質Ｍ（２：１比で６．３ｍｇ、１：１比で３．１５ｍｇ、又は０．５：１比で１．５８ｍｇのいずれか）を、血清注入の５～１５分後に眼窩後静脈から送達した。ＡＡＶを、２×１０^{12}粒子／ｋｇのＡＡＶ－Ｌｕｃベクターの全身注入によって５分後に投与した。イメージングをＡＡＶ投与の１日後、並びに注入後１週間及び９日の時点で行った。

【０２６７】

実施例２：タンパク質Ｍは、ＡＡＶ形質導入に対するＩＶＩＧの阻害活性を妨げる

タンパク質Ｍが抗体をブロックする機能を試験するために、ヒト静脈内免疫グロブリンガンマ（ＩＶＩＧ）によるＡＡＶのインビトロ中和アッセイを設定した。ＩＶＩＧの段階希釈を用いてＡＡＶ中和アッセイを行い、所定量のＡＡＶ２を中和するＩＶＩＧの量を決定した。ＡＡＶ－ルシフェラーゼベクターを用いた細胞形質導入により生成されたルシフェラーゼ活性は、遺伝子発現の関数的な読み取り値としての役割を果たした。中和を、ＩＶＩＧなし対照に対して正規化されたルシフェラーゼ活性のパーセントとして決定した。１２．５μｇのＩＶＩＧは７５％（＋／－５％）のＡＡＶ２を中和することが判明し（図１）、この量のＩＶＩＧを、実験デザインを進めるのに選択して、ＡＡＶ中和に対するＩＶＩＧのタンパク質Ｍブロッキングを試験する実験計画を進めた。次に、トロンビン切断によってＨｉｓタグを除去することによって収集されたタンパク質Ｍ（配列番号２）の用量希釈比を行い、それは１２．５μｇのＩＶＩＧをブロックする能力があり（図２）、タンパク質Ｍは細胞培養で形質導入する前に、ＩＶＩＧと１時間、続いてＡＡＶ２と４℃で１時間インキュベートした。１分子のＩｇＧに対する２分子のタンパク質Ｍのモル比は、ＩＶＩＧなし対照と同等レベルまで中和を防ぐのに十分であることが分かった。更に、ＩＶＩＧに対するタンパク質Ｍのより高いモル比は、ＩＶＩＧなし対照よりも高いレベルまでルシフェラーゼシグナルを増強させることが分かった（図２）。１分子のＩｇＧに対する８分子のタンパク質Ｍは、ルシフェラーゼ発現を２倍増加させた。より高いモル比によって増強が更に増加するかを確認するために、８：１及び２０：１比のタンパク質Ｍ対ＩＶＩＧを同じ実験条件で試験した。タンパク質Ｍの用量を２．５倍（８：１から２０：１の比）増加させても、対応するシグナルは８：１の比よりも０．２５倍しか増加しないため、更なる増強はほとんど得られないことが判明した（図３）。更に、タンパク質Ｍが免疫グロブリンをブロックする活性は、Ｎ末端Ｈｉｓタグの切断に依存しないことが分かり、したがって、Ｈｉｓタグを切断していないタンパク質Ｍを次の実験に用いた。

【０２６８】

実施例３：ＡＡＶベクタービリオンとタンパク質Ｍの相互作用は、ＡＡＶ形質導入を増強する

本発明者らによる以前に研究により、ＡＡＶビリオンと血清タンパク質の相互作用はＡＡＶ形質導入を増強させることができることが示されている。ＡＡＶ形質導入に対するタンパク質Ｍの増強機能を更に特徴付けるために、ＩＶＩＧを用いずに２倍段階希釈のタンパク質Ｍを細胞培養物の形質導入の前にＡＡＶとともに１時間インキュベートして、用量応答アッセイを行った。図４では、以前の実験による８：１比（３３μｇタンパク質Ｍ）のタンパク質Ｍは、ＩＶＩＧの非存在下でＡＡＶ形質導入を用量依存的に増強することができること、及びその増強は、２×１０^{8}ウイルス粒子に関して２μｇを下回るタンパク質Ｍの希釈で失われることが分かった。増強が失われるタンパク質Ｍ分子対ＡＡＶ粒子の等価モル比は４０，０００：１を下回った。次に、タンパク質Ｍによる形質導入の増強は、ＡＡＶとタンパク質Ｍのインキュベーションに依存することが示された。図５では、細胞培養物の形質導入アッセイを行い、タンパク質Ｍは、細胞に添加する１時間前にＡＡＶ

に添加されたか（事前インキュベーション、－１時間時点）、事前インキュベーションせずに、形質導入の時点で添加されたか（形質導入付近、０時間時点）、又はＡＡＶを細胞に添加した１８時間後に添加された（形質導入後、１８時間時点）。用量依存的増強が、図４と同様に事前インキュベーション群において見られるが、タンパク質Ｍ及びＡＡＶ２がアッセイの前に一緒にインキュベートされない他の２つの群では見られないことが分かった。更に、この結果は、形質導入の時にタンパク質Ｍを細胞に添加することはルシフェラーゼシグナルに対して影響を与えなかったので、タンパク質Ｍ増強のメカニズムが、ベクターカプシドとの相互作用を含んでおり、細胞に対するタンパク質Ｍの生物学的効果は含まないことも示している。最後に、タンパク質Ｍは、ＩＶＩＧが最初にＡＡＶ２と１時間事前インキュベートされて、その後にタンパク質Ｍと１時間インキュベーションした場合、中和をブロックすることができないこと、及びタンパク質ＭによるＡＡＶ２ルシフェラーゼシグナルの増強は、ＡＡＶ２がＩＶＩＧによって完全に中和されていない場合にのみ生じることが示された。このアッセイについては、１２．５μｇのＩＶＩＧ（７５～８０％のＡＡＶ２を中和する）、５０μｇのＩＶＩＧ（９９％のＡＡＶ２を中和する、図１）、又は２００μｇのＩＶＩＧ（１００％のＡＡＶ２を中和する）を用いた。図６では、９９～１００％のＡＡＶ２がＩＶＩＧ（５０μｇ及び２００μｇ）によって中和された場合、タンパク質Ｍは中和をブロックすることができず、形質導入の増強を与えることができないことが観察された。図２及び図３のデータと合わせて、この結果は、免疫グロブリンに対する結合後の過剰量のタンパク質Ｍは、ＡＡＶビリオンと相互作用することが可能であり、形質導入の増強をもたらすことを示唆している。

【０２６９】

実施例４：ＡＡＶベクタービリオンとタンパク質Ｍの事前インキュベーションは、ＩＶＩＧのＡＡＶ中和を保護する

次に、タンパク質Ｍを最初にＩＶＩＧと相互作用させる代わりに、タンパク質Ｍを最初にＡＡＶと事前インキュベーションして、その後にＩＶＩＧとインキュベーションする効果を試験することにした。タンパク質ＭをＡＡＶ２とともに１時間インキュベートした後にＩＶＩＧを添加して、更に１時間４℃でインキュベートした後に細胞形質導入を行った場合の、タンパク質Ｍが中和をブロックする能力を試験した。図７では、タンパク質Ｍ濃度を一定（８．２５μｇ）に保ち、ＩＶＩＧの用量を５０μｇから３．１２μｇ（タンパク質Ｍ対ＩＶＩＧのモル比１：２から８：１）まで段階的に希釈すると、中和からのベクターの保護が２：１以上の比率で達成されることが判明し、これは、ＡＡＶ添加前にタンパク質ＭをＩＶＩＧとインキュベートした場合の以前の結果と同様である。ＩｇＧ以外の他のタイプのタンパク質が血清中に存在するインビボ状況により近い環境をシミュレートする試みにおいて、同様のインビトロ中和試験を、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）の存在下で行った。ウシ血清に関する製造元のＩｇＧ定量化に従って、培地容量は、ウェル当たり約３５０μｇのウシＩｇＧを含むと概算された。次いで、２５μｇのＩＶＩＧ又は無血清培地をウェルの半分にスパイクして、ＡＡＶを中和するか、又は中和活性のない対照として機能させた。図８では、タンパク質Ｍを形質導入前にＡＡＶとともに１時間インキュベートし、総ＩｇＧ（ヒト及びウシ）を異なるモル比４：１、２：１、及び１：１（タンパク質Ｍ対ＩｇＧ）で添加した場合、中和からの保護が１：１比でさえも観察された。これらの結果は、タンパク質Ｍが、他の血清タンパク質が存在している場合であっても、免疫グロブリンと結合してブロックすることが可能であることを示す。

【０２７０】

実施例５：インビトロでの、ＡＡＶに対するマウス血清の中和活性に対する、タンパク質Ｍの効率的なブロック機能

ＩＶＩＧからの発見を実際の状況に移すために、インビトロでの中和実験を、最初に、ＡＡＶ８カプシドベクターで免疫化されたマウス由来の血清を用いてＡＡＶ８－ルシフェラーゼベクターで行った。免疫化マウス由来の血清及びタンパク質Ｍの両方を段階希釈して２：１のモル比を維持した場合、結果を血清のみの対照と比較すると、タンパク質Ｍは、概算で約１００倍の希釈の１：２，５６４の力価の中和血清に対して、中和からエスケ

ープさせることが分かった（タンパク質Ｍの存在下、０．００３９μｌの血清対０．２７４４μｌの血清での５０％中和、図９）。

【０２７１】

実施例６：インビボでの、ＡＡＶに対するマウス血清の中和活性に対する、タンパク質Ｍの効率的なブロック機能

次に、インビボ実験を行い、異なる容量の中和血清を、後眼窩注入を介してナイーブマウスに受動移入した。マウスに５～１５分間、血清灌流させた後、タンパク質Ｍを、同じく後眼窩注入を介してマウスに全身投与して、５分後にＡＡＶ８－Ｌｕｃ（２×１０^{１０}ウイルスゲノム）を投与した。図１０は、マウスにおける総免疫グロブリンに対して概算のモル比２：１（６．３ｍｇ）のタンパク質Ｍは、１μｌのＡＡＶ８－ＮＡｂ血清（力価１：２，５６４）によるＡＡＶ８の中和を防止することができることを示す。このことは、５０％よりも多くのＡＡＶ８－Ｌｕｃが１μｌ～０．００１μｌの血清容量で中和されて１，０００倍差の濃度にわたるＡＡＶ　ＮＡｂエスケープを表す、段階希釈された抗ＡＡＶ８血清のインビボ中和アッセイと比較される（図１１）。

【０２７２】

実施例７：タンパク質Ｍ／免疫グロブリン複合体の安定性

免疫グロブリンとタンパク質Ｍの複合体がどのくらい安定であるか試験するために、アッセイを最初にインビトロで行った。タンパク質Ｍをマウス血清と２：１の分子比で、１時間～７２時間の異なる持続時間、３７℃で事前インキュベートして、それから、中和分析のために４℃で更に１時間、ＡＡＶ８ベクターを添加した。図１２に示すように、マウス血清中の抗ＡＡＶ８免疫グロブリンとタンパク質Ｍとの間で事前に形成された複合体は、細胞培養物に添加される前に３７℃でインキュベートした場合、中和血清を含むがタンパク質Ｍを含まない対照又はＰＢＳ若しくは培地のみを含む対照と比較すると、７２時間以上安定であった。この結果は、タンパク質Ｍと免疫グロブリンとで形成された複合体は、インビトロで非常に安定であることを示唆している。

【０２７３】

次に、０．３μｌのＡＡＶ８中和血清の受動移入後のタンパク質Ｍのインビボ安定性を調査した。タンパク質Ｍが投与されて５分ではなく３時間待った場合は、タンパク質Ｍが抗体をブロックする機能は、３．５×１０^{５}から１×１０^{５}光子／秒／ｃｍ^{２}／自発率（ｓｐｏｎｔａｎｅｏｕｓ　ｒａｔｅ）に約７０％減少することが分かった（図１３）。この結果は、タンパク質ＭのＮＡｂブロック効果がインビボで短期間であることを示す。

【０２７４】

ＡＡＶベクターを用いた遺伝子療法は、臨床試験において成功している。しかしながら、ヒト集団におけるＡＡＶ中和抗体の高い出現率は、より多くの患者がこの効果的な遺伝子送達から利益を受けるのを妨げている。本研究では、マイコプラズマ由来のタンパク質Ｍが、ＮＡｂと相互作用してＡＡＶ形質導入を増強することが可能であることが見出された。ＮＡｂ活性をブロックするために必要なタンパク質Ｍの最小用量は免疫グロブリンの２倍の分子であった。ＡＡＶビリオンとタンパク質Ｍの直接的な相互作用もまた、ＡＡＶ形質導入を増加させた。中和抗体アッセイは、インビトロでＡＡＶ免疫化マウス血清をタンパク質Ｍとともにインキュベートした場合に、ＮＡｂ活性が約１００倍低減し、タンパク質Ｍが適用された場合に、ＮＡｂ陽性血清を養子移入したマウスにおいて１０００倍を超える保護が観察されることを示した。免疫グロブリンとタンパク質Ｍの複合体はインビトロで経時的に安定であったが、タンパク質Ｍは、インビボで、免疫グロブリンの中和からの、その保護機能を徐々に失う。

【０２７５】

ＡＡＶ　ＮＡｂを克服するために、複数のストラテジーが研究室において利用されている。１つのアプローチは、コーティングのためのポリマー又はエキソソームを用いて、Ｎａｂ認識をブロックするためにＡＡＶ表面をマスクすることである。このアプローチは有望ではあるが、ＡＡＶ形質導入プロファイルを変更し得る。２つめのアプローチは、エラープローンＰＣＲ又はＤＮＡシャッフリングを用いてＡＡＶカプシドバリアントのライブ

ラリを産生し、ＮＡｂ存在下でＮＡｂエスケープ変異体をインビトロ及びインビボで選択することである。このアプローチは、新規のカプシドを産生したが、これらの変異体は動物組織から単離されて動物組織において試験され、動物試験によるデータは常にヒトに移されるわけではなく、ヒト組織におけるＡＡＶ形質導入を予測するために利用できる信頼性のあるシステムは存在しないので、ヒトにおける形質導入効率が未知であるカプシドを生産する潜在的制限を抱えている。３つめのアプローチは、ＮＡｂ交差反応性が低いか又は存在しない、ＡＡＶの代替の血清型を使用することである。この一般的なストラテジーは、論理的かつ動物モデルにおいて成功的であるが、動物では予測され得ない、大部分のヒトにおける交差反応性の存在について懸念が残る。最後の実験アプローチは、ＡＡＶカプシド表面上のＮＡｂ結合ドメインを合理的に操作してＮＡｂ結合部位を除去することである。このストラテジーは、モノクローナル抗体エピトープ及びＡＡＶビリオンの構造に関する情報を必要とし、ヒト血清由来のＮＡｂはポリクローナルであるという事実に起因して本質的に制限され、全ての生産されたＮＡｂを表すヒト由来のｍＡｂを得ることは不可能である。いくつかの臨床関連のアプローチも研究されている：１つの例は、ベクター送達の前に血漿交換を行うことである。しかしながら、各回のアフェレーシスの相対的非効率性及び低力価のＮＡｂ（＜１：５）でさえＡＡＶ形質導入を抑制することができるという事実に起因して、このストラテジーは、ＡＡＶ　ＮＡｂの開始力価がより低い患者にのみ適切であり、複数セッションのアフェレーシスを必要とする。同様に、抗ＣＤ２０抗体（リツキシマブ）の使用は、Ｂ細胞の枯渇を達成することができるが、長い時間がかかり（約６～９ヶ月）、少数の対象においてＡＡＶ　ＮＡｂを減少させるのに効果的なだけである。最後の臨床アプローチは、過剰な空ＡＡＶカプシドをＮＡｂに関するデコイとして使用することである。空粒子の添加は、ＡＡＶカプシドの負荷を増加させ、それにより、カプシド特異的な細胞傷害性免疫応答が介在するＡＡＶ形質導入細胞の除去が潜在的に増加し、おそらく、効果的な形質導入に関して完全なＡＡＶ粒子と競合するという懸念が残る。更に、空のカプシドは、完全なＡＡＶベクターよりも大きな肝臓炎症を誘導し得る。ＮＡｂ保護の低効率又は上記アプローチの複雑性と比較して、本研究では、中和抗体活性をブロックするための、より大きな潜在性を有するストラテジーが、免疫グロブリン結合タンパク質Ｍを用いて示された。タンパク質Ｍを使用した場合、ＮＡｂ回避能力はインビトロで１００倍、インビボで１０００倍を超えて達成された。

【０２７６】

タンパク質Ｍは、抗体軽鎖及び重鎖上の保存領域に普遍的と結合して、抗原認識又はＣＤＲ領域との構造的干渉を生じさせることによって哺乳動物のＩｇＧ、ＩｇＭ、及びＩｇＡ抗体クラスをブロックする普遍的な抗体結合タンパク質として機能する。タンパク質Ｍは、抗体と結合して、抗原抗体結合を妨げるが、以前に形成された抗原抗体複合体を破壊しない。抗体とタンパク質Ｍの相互作用は、ウエスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、ｘ線結晶学、電子顕微鏡、及びバイオレイヤー干渉法によって検証されている。タンパク質Ｍは、ベクターとは独立に用いることができるので、以前にＦＤＡによって承認された遺伝子療法を含む治療レジメンに取り込むことができる。このことは、カプシドに基づく免疫回避よりも有利であり、なぜならば、それぞれの個々のカプシドは、それぞれの疾患標的についてその独自の臨床試験を経なければならないからである。タンパク質Ｍの特性に基づき、このタンパク質は、任意のウイルスベクターが介在する遺伝子送達に適用することができるだけでなく、体液性免疫応答が介在するクリアランスを回避するためのＣＲＩＳＰＲ／ｃａｓ９のような一過性のタンパク質療法にも適用することができる。また、タンパク質Ｍは、自己抗体により生じる自己免疫障害を治療する潜在性も有する。

【０２７７】

本研究では、少なくとも２分子又はそれよりも多くのタンパク質Ｍが、１分子の免疫グロブリンをブロックするために必要であり、全身投与後のＮＡｂ回避のために血中の全ての免疫グロブリンと相互作用するためには多くの量のタンパク質Ｍが必要となり得ることが示された。高用量の組換えタンパク質、例えばヒト血清アルブミン及び免疫グロブリンが臨床試験において用いられているが、高用量のタンパク質Ｍの潜在的な合併症による懸

念は、臨床試験前に大きな動物において対処される必要がある。タンパク質ＭがＡＡＶ投与のために局所的に用いられる場合は大きな問題ではないだろう。

【０２７８】

インビトロ試験は、タンパク質Ｍ／免疫グロブリンの複合体が相対的に長期間安定であることを示したが、インビボ実験では、ＡＡＶベクターが、タンパク質Ｍ適用のずっと後に投与された場合、タンパク質Ｍ機能の喪失が徐々に表れた。血中でのタンパク質Ｍ／免疫グロブリン複合体の動力学及び動態学を理解することが重要であり、この情報は、タンパク質Ｍの投与後のＡＡＶ注入に関するウインドウに関する価値のある情報を提供する。

【０２７９】

他の懸念は、繰り返し投与に関するタンパク質Ｍの免疫原性である。タンパク質Ｍは外来タンパク質であるので、体液性免疫応答を誘発して抗体が産生される。タンパク質Ｍは、全ての免疫グロブリンと結合することによってその保護機能を発揮し、タンパク質Ｍに対する特異的なＩｇの量は、全てのＩｇの非常に小さな部分であり、したがって、高用量のタンパク質ＭがＡＡＶ　ＮＡｂをブロックする目的のために用いられる場合、タンパク質Ｍ特異的なＩｇの量は、非常に少量のタンパク質Ｍを中和するだけであり、したがって、投与されるタンパク質Ｍは、ＡＡＶ　ＮＡｂからＡＡＶを保護する機能に影響し得ない。タンパク質Ｍは、Ｂ細胞表面と結合することができ、Ｂ細胞の増殖を刺激する潜在性を有する。以前の研究により、無傷のタンパク質ＭはＢ細胞の増殖を誘導することが可能であるが、切断されたタンパク質Ｍは、この機能を失うことが示されている。タンパク質Ｍ投与後のインビボでの長期のフォローアップが行われるべきである。

【０２８０】

結論として、この結果は、１分子のＩｇＧに対してタンパク質Ｍが２分子以上の分子比で存在する場合に、タンパク質Ｍは、免疫グロブリンがＡＡＶを中和するのを防止することを示している。ＡＡＶベクターの保護は、ＡＡＶの免疫グロブリン中和前にタンパク質Ｍが免疫グロブリンと相互作用することに依存している。タンパク質Ｍは、インビボで、１，０００倍範囲のＮＡｂ力価にわたってＡＡＶを中和から保護することができる。この研究は、ＮＡｂを有する患者における将来のＡＡＶ臨床試験において、又は再投与のために、ＮＡｂ活性からのＡＡＶベクタービリオンの保護のためのタンパク質Ｍの使用に対して重要な知見を提供した。

【０２８１】

実施例８：増強された特性を有する操作されたタンパク質Ｍバリアント

上記の実施例は、遺伝子療法ベクターに対する中和抗体を回避するための、抗体をブロックするタンパク質としてのマイコプラズマタンパク質Ｍの使用を説明している。異なるマイコプラズマ種由来の天然起源タンパク質Ｍホモログは、大部分の哺乳動物抗体クラスにナノモルの親和性で結合するが（Ｇｒｏｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ３４３：６５６（２０１４））、天然起源タンパク質の多くの特徴は、治療薬としての使用に不適切である。ネイティブのタンパク質Ｍは可溶性でないが、細菌細胞膜内にそれを固定するＮ末端膜貫通ドメインによって膜結合されている。更に、ネイティブのタンパク質は、薬物様分子として予想外に挙動し得る無秩序なＣ末端を有する。Ｎ末端膜貫通ドメイン及び無秩序なＣ末端セグメントが欠失している、ネイティブのタンパク質Ｍ切断型（Ｇｒｏｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ３４３：６５６（２０１４）によるタンパク質ＭＴＤ）を、治療用抗体ブロッキング分子として用いた検証が行われたが、このタンパク質は、体温（３７℃）でインキュベートした場合に構造的安定性がないという重要な知見がなされた。

【０２８２】

切断されたタンパク質Ｍ（配列番号３）を、単純なインビトロでの緩衝液懸濁液中で３７℃に曝露すると、目に見える析出及び凝集が短時間（１５分～１時間）で生じた。円偏光二色性を用いた分析において、タンパク質を３７℃に加熱することは、１時間以内の明瞭なタンパク質アンフォールディングのイベントと関連し、タンパク質の即時的な融解が４１．２℃で生じるが、２時間にわたって続く２０℃インキュベーションでは、アンフォ

ールディングのイベントは生じないことが判明した（図１４）。タンパク質のアンフォールディングは、ウエスタンブロットによって評価される溶液中の可溶性画分の測定される低減とも相関する。不安定なタンパク質を用いることの治療的制限を克服するために、合理的な設計アプローチを使用して、Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（ＭＧ２８１）及びＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（ＭＰＮ４００）からの変異相同体を含む、切断されたタンパク質Ｍの変異類似体を生成した。このアプローチは、タンパク質モデリングへの入力としてタンパク質Ｍの結晶構造及びアミノ酸配列（ＰＤＢ　ＩＤ：４ＮＺＲ及び４ＮＺＴ）、並びに、Ｒｏｓｅｔｔａと呼ばれるエンジニアリング・ソフトウェアを用いた。自由エネルギー計算及び３Ｄモデルを用いて、どのアミノ酸配列変化が三次構造の安定化をもたらすか予測し、８５０＋を超えるアミノ酸置換のリストを出力した。個々の変異体及び組み合わせた複数の変異体のＤＮＡ合成により、合理的に設計されたバリアントのライブラリを用いて変異体タンパク質を産生した。表４は、熱安定性に関して野生型タンパク質よりも良いスコアを有していた８８５個のコンピュータによって同定された点変異をリスト化している。表５は、熱安定性に関して野生型タンパク質よりも実質的に優れたスコア（デルタスコア－３．０を越える）を示す、コンピュータによって同定された１６５個の点変異をリスト化している。

【０２８３】

異なるタンパク質Ｍ変異体を、示差走査型蛍光透視法を使用して検証し、タンパク質融解温度を計算した（図１５、１６）。次いで、変異体を異なる時間、３７℃の温度曝露に供して、溶解度（図１７Ａ～１７Ｃ）及びインビトロ中和アッセイにおけるプールしたヒト静脈内ＩｇＧ（ＩＶＩＧ）によるＡＡＶ中和を防止する能力（１８Ａ～１８Ｃ）を測定した。Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ由来のタンパク質Ｍの類似体を試験するのに加えて、Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａに由来する類似体も生産した。それから、いくつかの変異体をバイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって試験して、マウスＩｇＧに対する変異体タンパク質の親和性を決定し、変異体が、免疫グロブリン基質に関する変異体の親和性を変化させることができることが示された（図２１、２２）。変異体はまた、安定性野生型タンパク質Ｍよりも広いｐＨ範囲にわたる安定性によって証明されるように安定性の増加も示した（図２６）。ＭＧ２９は、３７℃で増加した安定性を有しておりＩｇＧに関するナノモル親和性を維持している、リード類似体の１つであり、ＡＡＶカプシドに対するマウスの直接免疫化後のインビボでのＡＡＶ中和抗体のブロックを試験するために用いた。一方の脚にリン酸緩衝生理食塩水で製剤化したＡＡＶを筋肉内注入し、他方の脚にＭＧ２９で製剤化したＡＡＶを筋肉内注入した結果により、ＭＧ２９が、ＡＡＶ免疫化マウスにおいてＡＡＶ中和抗体をブロックし、効果的な遺伝子送達及びＡＡＶの再投与を可能することが示された（図１９、２０）。

【０２８４】

Ｒｏｓｅｔｔａソフトウェアを用いた合理的なエンジニアリング・ストラテジーの第２ラウンドは、親和性及び結合を増強又は減少させる変異体タンパク質Ｍ類似体の結合部位の修飾を予測するための、平均モデルの多くのヒト免疫グロブリン構造を用いた変異体タンパク質の親和性の変更を含んでいた。更に、合理的な設計ストラテジーの第３ラウンドは、Ｒｏｓｅｔｔａモデル及び異なるマイコプラズマ種由来の天然起源タンパク質Ｍ配列の多様性の両方の使用を組み入れて、天然には存在しない抗原的に別個の類似体を作製した。これらの類似体は、全タンパク質又は個々エピトープの、キメラ、モザイク、又はデノボの合理的に変更されたアミノ酸変異体であることができる。同一又は異なる類似体は、タンパク質Ｍ類似体に対して生産された阻害抗体の存在下でさえ、複数ラウンドの再投与のためにＡＡＶとともに用いることができる。これは、タンパク質Ｍ類似体が抗体結合及び抗原認識のブロック、更には阻害抗体によるそれ自身の認識に関して直接競合するためである。飽和用量のタンパク質Ｍ類似体は、初回の免疫曝露後にタンパク質Ｍ類似体に対して産生される少量の免疫グロブリンに対して過剰である。更に、エピトープ多様性が増加したタンパク質Ｍ類似体の作製は、タンパク質Ｍ阻害抗体からの免疫回避の更なる層を提供することができる。リスト化された操作ストラテジーのそれぞれを組み合わせて、

又は互いの上に重ねて、複数の異なる特性を有するタンパク質Ｍ類似体を作製することができると考えられる。

【０２８５】

最後に、タンパク質産物収率が増強されたタンパク質ＭのＤＮＡコドン最適化バージョンを生産した（図２５）。親の切断されたタンパク質Ｍ配列の２つのコドン最適化バージョンを生産した：一方の配列は、Ｅ．ｃｏｌｉ及びＨ．ｓａｐｉｅｎｓのコドン使用について最適化され、他方はＨ．ｓａｐｉｅｎｓのコドン使用のみについて最適化される。Ｅ．ｃｏｌｉ及びＨ ｓａｐｉｅｎｓの二重コドン構築物をＥ．ｃｏｌｉでタンパク質を生成するために使用し、親の最適化されていないプラスミドと比較して、タンパク質収率の約４倍の増加を示した。Ｈ．ｓａｐｉｅｎｓのみ最適化された構築物は、ＩＬ－２分泌ペプチド又はアルブミン分泌ペプチド配列を含んでおり、培養培地からのタンパク質Ｍ類似体の回収のために哺乳動物細胞株からのタンパク質の分泌を可能にする。タンパク質Ｍ変異類似体は、両方のタイプの最適化ＤＮＡ配列にクローニング又は合成されて、増強されたタンパク質生産のために用いられる。３７℃で安定なタンパク質Ｍ類似体は、分泌後、タンパク質アンフォールディングの影響を受けずにヒト細胞内で成長することができる。更に、類似体ＭＧ２８（Ｎ２７４Ｄ）など、タンパク質Ｍ類似体のグリコシル化部位は、結合部位のグリコシル化を除去するため、又は外側表面にグリコシル化を追加するために置換されている。外側表面へのグリコシル化部位の追加は、タンパク質Ｍ類似体の免疫回避を増強させるため、及び、タンパク質Ｍ類似体の複数回投与に関するタンパク質Ｍ阻害抗体の認識を減少させるための、別のメカニズムである。最後に、タンパク質Ｍ類似体のＤＮＡ配列は、３７℃で安定であってグリコシル化部位が除去又は新たに追加された分泌タンパク質を生産するために、哺乳動物細胞株に安定的に組み込まれる。

【０２８６】

方法

ＡＡＶウイルス産生：ＡＡＶベクターを、ＨＥＫ２９３細胞に３つのプラスミドをトランスフェクションする標準的なアプローチを用いて生産した。簡潔には、ＡＡＶ導入遺伝子プラスミドｐＴＲ－ＣＢＡ－Ｌｕｃを、ＡＡＶ Ｒｅｐ／Ｃａｐヘルパープラスミド（ｐＸＲ２又はｐＸＲ８）及びアデノウイルスヘルパープラスミドｐＸＸ６－８０で共トランスフェクトした。７２時間後、細胞培養物を回収して、凍結融解及び超音波処理によって溶解させた。清澄化した細胞溶解物をＤＮＡｓｅ処理して、１５％／２５％／４０％／６０％イオジキサノール段階勾配中で超遠心分離して、陰イオン交換Ｑ－カラムによって精製した。精製したＡＡＶベクターを、パッケージされたＡＡＶ導入遺伝子のセグメントを増幅することを目的とするプライマーを用いたｑＰＣＲによって力価測定した。

【０２８７】

タンパク質産生：プラスミドｐＥＴ－２８ｂ（＋）は、タンパク質Ｍ類似体、膜貫通ドメインを欠くＭ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ又はＭ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａ由来の切断型タンパク質をコードし、Ｎ末端Ｈｉｓ－Ｔａｇ及びトロンビン切断部位を有する。プラスミドをエレクトロコンピテントＤＨ１０Ｂ細胞中で増殖させて、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎによるＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｍａｘｉ－Ｐｒｅｐキットを用いて精製した。ｐＥＴ－２８ｂ（＋）プラスミドを、一晩のスターター培養を用いてＢＬ２１／ＤＥ３細胞内に一時的にトランスフェクトした。自己誘導培地（ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎによるＭａｇｉｃ培地）にスターター培養物を播種して、１８℃で３日間増殖させた。それから、培養物を遠心分離によってペレット化して、－８０℃で凍結させた。

【０２８８】

タンパク質精製：凍結した細菌細胞培養物ペレットを解凍して、超音波処理によって溶解させて、ＤＮＡｓｅ処理して、遠心分離によって清澄化した。清澄化した細菌溶解物をニッケル結合緩衝液（２０ｍＭイミダゾール、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．４、５００ｍＭ ＮａＣｌ、０．０２％アジ化ナトリウム）中で透析し、ＦＰＬＣを用いてニッケルＨｉｓ－ｔｒａｐ ＦＦカラムに通した。次いで、ニッケルカラムと結合したタンパク質Ｍを、５００ｍＭイミダゾールを含んでいるが同一緩衝液ベースによって溶出させ

た。それから、タンパク質Ｍを、Ｓ－１００サイズ排除カラムに通して、２％グリセロールを含むリン酸緩衝生理食塩水中へ透析して、分光光度法を用いて定量化した。タンパク質Ｍの同一性をタンパク質分離のためのＳＤＳ－ＰＡＧＥタンパク質ゲル電気泳動を用いて確認して、その後にクーマシーブルーのタンパク質染色を行い、４５ｋＤａ～４８ｋＤａのタンパク質Ｍバンドを正しく同定した。

【０２８９】

一部のタンパク質の生産のために、２つのストラテジーのいずれかを実施して、タンパク質Ｍバリアントを精製した。第１のプロトコル（Ｎｉ－Ｐｕｒｉｔｙ）は、ＮａｎｏＤＳＦのための小スケール生産に関するものであった。溶解は、細胞ペレットを、２．５ｍｇ／ｍＬリゾチーム、２５％Ｂ－ＰＥＲ、７５％リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）ｐＨ７．４、及びプロテアーゼ阻害剤（ＰＭＳＦ、ベスタチン、及びペプスタチン）からなる緩衝液と混合することによって実施した。室温で３０分間混合した後、粗溶解物を１５，０００ｒｃｆで２０分間遠心分離し、上清をＮｉ樹脂と４℃で１時間インキュベートした。次いで、樹脂を洗浄し（ＰＢＳ＋２０ｍＭイミダゾール）、タンパク質を（ＰＢＳ＋５００ｍＭイミダゾール）で溶出した。溶出したタンパク質を、Ｚｅｂａ脱塩カラムを用いてＰＢＳ　ｐＨ７．４中に交換した後、安定性アッセイを行った。第２のプロトコル（ＳＥＣ－Ｐｕｒｉｔｙ）は、大スケールの生産に関するものであり、タンパク質試料から更なる汚染物質／凝集体を除去した。超音波処理を介して細胞を溶解させ、ニッケル樹脂を用いて精製し（第１のプロトコルと同一の緩衝液）、最後にＰＢＳ＋２％グリセロール中へサイズ排除クロマトグラフィーを行った後、試料を凍結させた。

【０２９０】

ウエスタンブロット：８％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルでのタンパク質分離後に、タンパク質をＰＶＤＦメンブレン上に転写した。免疫ブロット法を５％脱脂乳中で抗Ｈｉｓ一次抗体１：１０００希釈（１０μｇ／ｍｌ）を用いて行った。二次ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼとコンジュゲートした（１：１０，０００希釈）。

【０２９１】

タンパク質の融解温度及びアンフォールディングの決定：融解温度（Ｔｍ）を、ナノ示差走査型蛍光定量法（ＮａｎｏＤＳＦ）を用いて決定し、タンパク質のアンフォールディングを、円偏光二色性アッセイを用いて異なる温度で決定した。一次導関数の変曲点は、Ｔｍ又はアンフォールディングを示す。タンパク質を、プロトコル１（Ｎｉ－Ｐｕｒｉｔｙ）に従って精製した。

【０２９２】

溶解度アッセイ：熱安定性の経時変化は、各ＳＥＣ精製タンパク質（０．４ｍｇ／ｍＬ）の７個のアリコートを３７℃で異なる時間インキュベートすることによって行った。析出したタンパク質を、試料を１５，０００×Ｇで１０分間遠心分離することによってペレット化させてから、ＳＤＳ－ＰＡＧＥのためにゲルにロードした。タンパク質を、プロトコル２（ＳＥＣ－Ｐｕｒｉｔｙ）に従って精製した。

【０２９３】

バイオレイヤー干渉法による親和性評価：バイオレイヤー干渉法を３７℃で行って、タンパク質Ｍ構築物の親和性を評価した。タンパク質を、プロトコル２（ＳＥＣ－Ｐｕｒｉｔｙ）に従って精製した。１０００ｎＭ～１５．６ｎＭの範囲の２倍希釈比の各Ｍ構築物は、ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｋｉｎｅｔｉｃｓ緩衝液（ＰＢＳ＋洗浄剤）を用いて行った。抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ　Ｃａｐｔｕｒｅバイオセンサーに対する結合を評価した。各プロトコルは、ベースライン、会合、及び解離ステップを、それぞれ１０分、５分、及び５分含んでいた。データは、緩衝液中の会合ステップと並行して実行された参照センサーから差し引かれた。親和性データを、ＦｏｒｔｅＢｉｏデータ分析ｖ９．０ソフトウェア内の１：１曲線フィットに基づいて計算した。報告された安定状態の結合定数を、各濃度（ｎ＝７）における最大応答に基づいて計算した。Ｘ２を最小限にするために、反応速度データは、２５０～１５．６ｎＭ希釈範囲（ｎ＝５）に関するデータのみ含めた。

【０２９４】

構造モデリング及び合理的なタンパク質操作：タンパク質Ｍ（ＰＭ）の類似体の熱安定性の最適化を、免疫グロブリンと結合したＰＭの既存の結晶構造（４ＮＺＴ及び４ＮＺＲ）に基づき、インシリコの合理的なタンパク質操作アプローチを用いて達成した。Ｒｏｓｅｔｔａソフトウェア・パッケージを用いて、ＰＭペプチドを安定化させる変異を同定した。第１のプロトコルは、部位飽和変異誘発をインシリコで行い、隣接するアミノ酸を変異残基付近に再充填させた。第２のプロトコルは、結晶構造内の充填不足の領域においてコンビナトリアル変異を生じさせた。変異体を、野生型アミノ酸と置換の間のスコアの違いに従ってランク分けした。更なる目視検査を行って、好ましい変異体を同定した。変異体を、ｐＥＴ－２８ｂ＋ベクター内にＴｗｉｓｔ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓによってクローニングして合成した。結合部位の親和性の変更及び別個の抗原性を有するＰＭ類似体の作製のための更なる設計ストラテジーを行った。

【０２９５】

ＭＰ　ＷＴの相同性モデルを、Ｓｗｉｓｓ－Ｍｏｄｅｌウェブサーバを用いて構築した（図２４）。ＭＧ及びＭＰ　ＷＴアイソフォームの間の保存スコアを、ＢＬＯＳＵＭ９０マトリックスに従って計算した。画像をＰｙＭｏｌで表した。

【０２９６】

細胞培養：ＨＥＫ－２９３細胞又はＨｕｈ７細胞を、全てのインビトロＡＡＶ中和実験に用いた。細胞を１５ｃｍ組織培養プレート上で増殖させ、１０％ウシ胎仔血清及びペニシリン－ストレプトマイシンで補充されたダルベッコ修飾イーグル培地を用いて５％ＣＯ２中３７℃で維持した。

【０２９７】

インビトロ中和実験のためのヒトＩＶＩＧ：１０％ヒトＩＶＩＧのストック（Ｇａｍｕｎｅｘ）を、Ｇｒｉｆｏｌｓ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　Ｉｎｃ．（Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｔｒｉａｎｇｌｅ　Ｐａｒｋ，ＮＣ，ＵＳＡ）から購入した。個々のアリコートをリン酸緩衝生理食塩水中で１ｍｇ／ｍＬに希釈して、後の使用のために－８０℃で保管した。１２匹の異なるマウス（５０％雄、５０％雌）に、３×１０^{10}ウイルスゲノムのＡＡＶ８－ＦＶＩＩＩのＩＰ投与の後、２週間後に同一ベクターのブースト投与、及び１回目の投与の６週間後に２回目のブーストをした後、血清を回収してプールした。マウス血清を分取して、後の使用のために－８０℃で保管した。

【０２９８】

インビトロＡＡＶ中和アッセイ：Ｎａｂ分析を、わずかな修正をして以前に記載されるとおりに行った（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２２：９８４（２０１５））。細胞を遠心分離によってペレット化して、無血清のＸ－Ｖｉｖｏ１０培地中に再懸濁し、次いで、４８ウェル又は９６ウェルプレートのいずれかのフォーマットでプレーティングした。ヒトＩＶＩＧ又は血清を、２倍又は１０倍のいずれかで連続希釈した。ＡＡＶ－Ｌｕｃを、ヒトＩＶＩＧ又はマウス血清のいずれかと４℃で１時間インキュベートした後、ＡＡＶを添加し、４℃で更に１時間インキュベートした。次いで、ＡＡＶ＋血清培養物を、プレーティング時に無血清培地中に懸濁した細胞と混合した。タンパク質Ｍを用いた中和実験では、４℃、１時間の各ステップで３つの異なるインキュベーションのシナリオを試験した：中和血清を最初にタンパク質ＭとインキュベートしたＡＡＶとインキュベート、ＡＡＶを最初に中和血清とインキュベートした後にタンパク質Ｍとインキュベート、及び、ＡＡＶを最初にタンパク質Ｍとインキュベートした後に中和血清とインキュベートした。細胞を、２００μｌ培地中の４８ウェルプレート、又は１００μｌ培地中の９６ウェルプレートに播種した。形質導入後、細胞を３７℃で２４～４８時間培養して、ＡＡＶ－ルシフェラーゼ導入遺伝子を発現させた。Ｌｕｃ活性を測定するために、細胞を受動的溶解緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ，ＵＳＡ）で溶解させて、ルシフェラーゼシグナルをＷａｌｌａｃ１４２０　Ｖｉｃｔｏｒ２自動化プレートリーダーで測定した。Ｎａｂ力価を、ルシフェラーゼ活性が無血清対照よりも５０％低い最大希釈として定義した。

【０２９９】

ＡＡＶ免疫化マウスにおけるインビボでのＡＡＶ再投与：Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、８Ｅ５ｖｇ又は１Ｅ９ｖｇのＡＡＶ８－ＧＦＰのいずれかのＩ．Ｐ．注入によって免疫化した。およそ１ヶ月後に、ＡＡＶ８インビトロ中和アッセイによる力価測定のためにマウスから血清を回収した。１日後、Ｉ．Ｍ．注入を行い、それぞれの脚は、等用量の１Ｅ９ｖｇ又は２Ｅ９ｖｇ　ＡＡＶ８－ルシフェラーゼを含み、ここで、一方の脚はリン酸緩衝生理食塩水で製剤化されたＡＡＶを投与し、他方の脚はタンパク質Ｍ類似体で製剤化したＡＡＶを注入の直前の単純な混合で投与した。合計容量２００μｌが、脚ごとに注入された。Ｄ－ルシフェリン基質をＩ．Ｐ．投与した後に、ＡＡＶ－Ｌｕｃ投与の２週間後に発光イメージングを行った。

【０３００】

実施例９：修飾タンパク質Ｍ及びタンパク質Ｍとの融合タンパク質の動態

バイオレイヤー干渉法を、タンパク質Ｍ濃度の段階希釈で行った。図２２は、ＭＧ２９の例示的なデータを示す。ＭＧ２９及び他のタンパク質Ｍ構築物からのデータを、表８、９、及び図２１に要約する。

【表４】

表８

試料	KD(nM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	完全X^2	完全R^2	最大濃度(nM)	適合点数
WT*	0.80	8.38E+04	6.73E-05	1.55	1.00	50	6
21*	0.74	5.23E+04	3.85E-05	0.48	1.00	50	6
29*	0.92	8.00E+04	7.35E-05	0.80	1.00	50	6
27*	1.05	5.65E+04	5.95E-05	0.61	1.00	50	6
66*	0.69	8.01E+04	5.55E-05	0.84	1.00	50	6

【表５】

表９

試料ID	KD(nM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	完全X^2	完全R^2	最大濃度(nM)	希釈数
MG64	<0.001	2.21E+04	<1.0E-07	0.09	1.00	500	5
MG29	7.9	4.3E+04	3.4E-04	1.7	1.00	250	5

【０３０１】

抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ捕捉（ＡＨＣ）バイオセンサー及び抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ捕捉バイオセンサー（ＡＭＣ）を、ＦｏｒｔｅＢｉｏから購入した。実験を３７℃で１０分間の会合及び解離を行って実施した。結果を１：１結合曲線に適合させた。アスタリスク＊は、アミノ酸Ｙ３３８を示す。＊のない類似体はＮ３３８である。

【０３０２】

実施例１０：インビボでの抗体中和

ＡＡＶ８で連続的に免疫したマウスから血清を収集し、プールした。インビトロ中和アッセイにより、プールした血清の抗ＡＡＶ８中和力価がおよそ１：１０，０００であることが決定された。異なる量の抗ＡＡＶ８血清（血清体積によって決定される）は、受動移入実験において、ＡＡＶナイーブマウス群にＩＶ注射を介して投与し、続いて２０～２５分後にＡＡＶ８－ルシフェラーゼレポーターベクターの２ｅ１０ウイルスゲノム（ｖｇ）をＩＶ注射した。一部の群のマウスに、ＡＡＶ投与の５分前にＩＶ注射を介してタンパク質Ｍを投与した。ルシフェラーゼ活性の非侵襲的なインビボイメージングを７日後に実施して、ＡＡＶ８ベクターからの遺伝子発現の代用としての発光を定量化し、発光シグナルの減少は、血清によるＡＡＶ８ルシフェラーゼ中和を示す。結果を図２９に示す。０．００３ｕｌの血清を与えられたマウスは、ＡＡＶ８を中和できず、２ｅ１０ｖｇのＡＡＶ８－ルシフェラーゼのみを注射された血清なしナイーブマウスと比較して、ほぼ１００％の発光シグナルを生じた。中和血清の量を増加させたマウス群は、ＡＡＶ８－ルシフェラ

ーゼを徐々に中和し、０．００１ｕｌ～０．００３ｕｌの血清でＡＡＶの約半分が中和され、０．３ｕｌ以上の血清でＡＡＶの９９％以上が中和された。３ｕｌの血清、続いてＭＧ８８又はＭＧ１１８、次いで２ｅ１０ｖｇのＡＡＶ８－ルシフェラーゼを投与されたマウスの群は、タンパク質Ｍ融合タンパク質による中和抗体の抑制による中和からのエスケープを示す遺伝子発現をもたらした。ＭＧ８８、ＭＧ２９、ＭＧ２９＊、及びＭＧＷＴ＊の具体的の用量は６．３ｍｇであり、ＭＧ１１８の用量はマウス当たり９ｍｇであり、マウスの平均体重は２１グラムであった。

【０３０３】

実施例１１：タンパク質Ｍのジスルフィド変異の熱安定性

変異は、以下の変異を含む安定化バージョンのタンパク質Ｍ（開始）に追加した：Ｓ１５０Ｅ、Ｓ１９６Ｒ、Ｓ１９８Ｐ、Ｆ２３７Ｔ、Ｓ２３２Ｑ、Ａ３４２Ｖ、Ｎ２７４Ｄ、Ａ２０５Ｐ、及びＴ３５５Ｐ（表１０）。融解温度（Ｔｍ）をＮａｎｏＤＳＦで決定した。２つのキャピラリを同じ試料（Ｔｍ１及びＴｍ２）で実行した。ΔＴｍは、開始構築物と比較したＴｍ１及びＴｍ２の平均の差を表す。

【表６】

表１０

内部番号	名称	Tm1	Tm2	ΔTm	変異*
66	開始*	61.2℃	61.2℃	0	
48	Disulf1	64.9℃	64.9℃	3.7	S201C&A224C
87	Disulf2	64.6℃	64.5℃	3.4	Q159C&A182C
91	Disulf3	60.8℃	60.7℃	-0.5	A102C&T161C
92	Disulf4	61.0℃	61.1℃	-0.1	I86C&F101C
112	Disulf1 及び 2	68.6℃	68.5℃	7.3	

【０３０４】

実施例１２：インビトロでの抗体中和

図３０は、マウス由来の高力価抗ＡＡＶ８血清を２倍希釈で滴定し、Ｘ軸に示すようにウェルに添加した、インビトロ中和アッセイを示す。次いで、異なるタンパク質Ｍ類似体（ＭＧ２９、ＭＧ６６、ＭＧ７１、及びＭＧ６４）を、図の凡例に示される分子比でウェルに添加し、１時間インキュベートした。生理食塩水を血清のみのウェルに添加した（黒丸）。次いで、ＡＡＶ８－ルシフェラーゼ（２×１０^{10}ウイルスゲノム）を各ウェルに添加し、１時間インキュベートした後、無血清培地中に５×１０^{4}のＨｕｈ７細胞を添加した。細胞を４８時間培養し、中和の代用となるルシフェラーゼレポーターシグナルを読み取り、定量化した。

【０３０５】

このデータは、これらの類似体が中和抗体ブロック機能を有し、それによって中和曲線をシフトさせ、ＭＧ６４Ｆｃ－タンパク質Ｍ融合二量体（Ｆｃ－ＰＭ）がタンパク質Ｍ単量体類似体よりも大きく曲線をシフトさせることを示す。バイオレイヤー干渉法に基づき、ＭＧ６４は免疫グロブリンに対するナノモル以下の親和性を有する。

【０３０６】

前述の実施例は本発明を例示するものであり、本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。本発明は、好ましい実施形態に関して詳細に説明されているが、以下の特許請求の範囲において記載及び定義されるように、バリエーション及び修飾が本発明の範囲及び趣旨内に存在する。

【表７】

表４：ＭＧ　ＷＴの安定性を改善すると予測される８８５個の点変異。デルタスコアは、変異のスコアーＷＴ残基のスコアを指す。このリストは、ＰＤＢ　ＩＤ：４ＮＺＲ内の抗体界面の５Ａ以内の残基を除く残基７８～４６８を考慮した。

デルタスコア	WT残基	残基番号	変異残基
-1.941	N	78	A
-1.209	N	78	D
-2.37	N	78	K
-2.042	N	78	P
-0.503	N	78	R
-2.53	S	81	D
-1.123	S	81	Q
-1.913	Q	83	F
-1.083	Q	83	H
-0.893	Q	83	K
-2.313	Q	83	W
-3.922	Q	83	Y
-0.688	S	84	I
-0.532	S	84	N
-1.437	S	84	T
-0.66	E	85	G
-0.797	E	85	M
-0.601	S	89	R
-0.891	G	90	A
-1.407	G	90	D
-2.616	G	90	E
-2.329	G	90	F
-2.57	G	90	H
-2.587	G	90	K
-1.955	G	90	L
-0.961	G	90	M
-2.926	G	90	Q
-1.886	G	90	R
-1.851	G	90	S
-0.542	G	90	T
-0.794	G	90	W
-3.813	G	90	Y
-1.071	G	91	D
-0.548	G	91	S
-1.752	A	92	D
-1.759	A	92	E
-1.217	A	92	F
-3.819	A	92	G
-2.717	A	92	H
-1.365	A	92	K
-2.814	A	92	L
-1.631	A	92	M
-0.523	A	92	N
-2.818	A	92	Q
-2.113	A	92	R
-1.364	A	92	S
-1.66	A	92	T
-1.995	A	92	W
-3.614	A	92	Y
-0.571	N	93	D
-0.867	N	93	E
-3.022	F	94	T
-0.67	F	94	V
-1.789	E	96	D
-0.618	K	97	Y
-0.729	N	100	E
-0.506	N	100	G
-0.817	N	100	K
-0.705	N	100	S
-0.569	N	100	T
-2.662	F	101	W
-0.531	A	108	H
-1.192	A	108	V
-1.094	A	108	W
-0.723	N	111	H
-1.94	N	111	K
-1.372	N	111	R
-0.545	N	111	Y
-1.2	S	112	A
-3	S	112	I
-0.791	S	112	N
-1.232	S	112	Q
-2.525	S	112	T
-1.568	S	112	V
-2.517	S	112	Y
-0.871	P	113	E
-0.828	K	122	Q
-1.059	K	122	R
-0.876	T	123	F
-0.857	T	123	R

-2.035	T	123	V
-0.542	T	123	Y
-0.636	I	125	V
-1.039	S	126	A
-1.739	S	126	T
-2.338	S	126	V
-0.914	S	126	Y
-1.447	G	127	V
-0.932	L	128	I
-0.743	L	128	R
-0.66	L	128	V
-0.978	K	130	L
-0.557	K	130	R
-1.688	K	130	Y
-2.35	T	131	L
-0.832	D	133	W
-1.585	N	134	I
-1.077	N	134	K
-1.851	N	134	L
-1.405	N	134	M
-0.653	N	134	R
-0.558	N	134	W
-0.966	N	134	Y
-1.303	I	136	Y
-1.332	T	137	C
-4.319	T	137	I
-0.647	T	137	M
-2.796	T	137	V
-2.106	S	139	D
-0.656	S	139	N
-1.302	S	139	P
-0.713	K	141	I
-0.59	K	141	L
-0.687	K	141	V
-1.754	K	141	W
-3.179	A	142	I
-1.581	A	142	T
-3.178	A	142	V
-0.904	D	146	F
-1.939	D	146	I
-2.182	D	146	L
-0.705	D	146	V
-1.628	D	146	W
-1.335	D	146	Y
-5.122	H	147	F
-2.485	H	147	L

-2.909	H	147	M
-0.596	H	147	W
-3.907	H	147	Y
-2.12	V	148	F
-1.976	V	148	I
-1.402	V	148	L
-1.182	V	148	Q
-0.697	V	148	W
-1.809	V	148	Y
-1.083	A	149	L
-2.315	A	149	T
-1.928	A	149	V
-2.153	S	150	A
-3.033	S	150	D
-7.399	S	150	E
-2.785	S	150	H
-2.321	S	150	K
-1.154	S	150	L
-1.469	S	150	N
-2.975	S	150	Q
-1.326	S	150	R
-0.648	S	150	Y
-1.674	S	153	R
-1.26	L	154	I
-0.729	L	155	R
-1.276	L	155	Y
-0.943	S	156	C
-2.615	S	156	F
-4.064	S	156	I
-4.341	S	156	K
-3.463	S	156	L
-2.776	S	156	M
-0.936	S	156	N
-1.309	S	156	P
-0.846	S	156	R
-4.236	S	156	T
-3.759	S	156	V
-4.005	S	156	W
-2.623	S	156	Y
-1.007	F	164	L
-0.618	F	164	Y
-0.571	R	167	F
-2.262	R	167	W
-1.335	M	170	F
-2.097	T	175	P
-0.937	T	176	N

-1.299	N	184	E
-1.904	N	184	F
-2.794	N	184	I
-1.554	N	184	T
-3.268	N	184	V
-1.558	N	184	Y
-0.501	R	185	F
-1.262	R	185	I
-2.285	R	185	L
-2.347	R	185	M
-0.999	D	189	Q
-0.831	R	192	D
-2.382	R	192	G
-1.519	R	192	T
-1.168	R	192	V
-0.527	Q	193	K
-1.143	Q	193	R
-0.963	S	196	E
-1.34	S	196	F
-1.583	S	196	I
-1.214	S	196	K
-1.886	S	196	L
-0.669	S	196	M
-0.517	S	196	N
-3.217	S	196	Q
-3.52	S	196	R
-0.976	S	196	V
-3.279	S	196	Y
-1.692	S	198	A
-2.806	S	198	F
-1.083	S	198	H
-2.867	S	198	I
-3.325	S	198	K
-3.234	S	198	L
-2.335	S	198	M
-1.628	S	198	N
-3.686	S	198	P
-2.556	S	198	Q
-3.722	S	198	R
-0.646	S	198	T
-1.334	S	198	V
-6.127	S	198	Y
-1.375	S	201	D
-1.334	S	201	E
-1.914	S	201	F
-1.701	S	201	G

-0.869	S	201	H
-1.426	S	201	K
-1.078	S	201	N
-1.07	S	201	Q
-2.311	S	201	T
-1.826	S	201	V
-2.775	S	201	Y
-0.788	N	202	A
-2.384	N	202	F
-2.528	N	202	I
-0.825	N	202	S
-2.151	N	202	T
-1.783	N	202	V
-2.941	N	202	W
-2.296	N	202	Y
-2.388	K	204	P
-1.227	K	204	Q
-0.519	A	205	C
-2.228	A	205	I
-1.657	A	205	L
-3.12	A	205	P
-1.408	A	205	Q
-0.669	A	205	T
-0.817	A	205	V
-1.201	T	206	D
-0.502	T	206	E
-0.83	T	206	F
-1.418	T	206	I
-0.654	T	206	L
-0.73	T	206	Q
-1.067	T	206	V
-1.448	T	206	Y
-0.588	T	207	R
-0.717	S	209	E
-1.577	S	209	F
-1.686	S	209	I
-0.958	S	209	K
-1.783	S	209	L
-1.567	S	209	M
-0.791	S	209	Q
-1.454	S	209	R
-1.638	S	209	T
-1.984	S	209	V
-1.384	S	209	W
-2.308	S	209	Y
-1.891	S	211	D

-3.197	S	211	K
-0.9	S	211	N
-0.542	S	211	P
-2.202	S	211	Q
-1.875	T	215	F
-1.234	T	215	H
-1.064	T	215	Q
-1.375	T	215	W
-3.349	T	215	Y
-0.856	K	218	I
-0.888	K	218	R
-1.308	K	218	V
-0.656	T	220	F
-1.52	T	220	I
-1.372	T	220	K
-0.646	T	220	L
-0.945	T	220	R
-1.702	T	220	V
-0.666	T	220	W
-0.891	T	220	Y
-1.113	F	222	R
-2.105	A	224	E
-1.543	A	224	Q
-0.698	K	225	E
-3.025	K	225	P
-1.562	G	226	D
-0.743	S	227	T
-2.441	D	231	C
-3.049	D	231	I
-2.346	D	231	K
-0.937	D	231	L
-0.738	D	231	R
-3.258	D	231	T
-0.971	S	232	A
-1.24	S	232	C
-5.712	S	232	D
-6.694	S	232	E
-3.533	S	232	F
-3.132	S	232	H
-6.649	S	232	I
-4.075	S	232	K
-6.718	S	232	L
-4.104	S	232	M
-3.012	S	232	N
-6.497	S	232	Q
-4.977	S	232	R

-3.937	S	232	V
-1.104	S	232	W
-1.517	S	232	Y
-1.935	P	234	A
-3.303	P	234	D
-1.38	P	234	E
-1.214	P	234	F
-3.816	P	234	K
-2.003	P	234	L
-4.159	P	234	Q
-4.154	P	234	R
-2.314	P	234	S
-2.296	P	234	T
-0.924	P	234	W
-1.709	P	234	Y
-3.955	N	235	W
-0.751	H	236	A
-4.755	H	236	F
-3.111	H	236	I
-1.635	H	236	K
-3.932	H	236	M
-2.882	H	236	T
-5.392	H	236	V
-2.542	H	236	W
-3.223	H	236	Y
-1.625	F	237	C
-3.832	F	237	D
-3.074	F	237	E
-3.752	F	237	I
-4.054	F	237	K
-2.101	F	237	L
-1.774	F	237	N
-1.465	F	237	P
-1.24	F	237	Q
-4.499	F	237	R
-3.617	F	237	T
-3.417	F	237	V
-2.078	E	239	D
-4.044	E	239	F
-1.146	E	239	I
-0.577	E	239	K
-0.717	E	239	L
-1.1	E	239	R
-0.829	E	239	S
-0.933	E	239	T
-0.887	E	239	V

-1.193	E	239	W
-3.362	E	239	Y
-2.128	V	241	I
-0.684	V	241	M
-2.872	T	243	I
-3.525	T	243	V
-1.174	L	244	M
-2.811	A	245	D
-1.161	A	245	E
-1.134	A	245	F
-3.259	A	245	I
-3.917	A	245	L
-2.947	A	245	M
-5.98	A	245	Q
-2.926	A	245	R
-0.579	A	245	S
-4.056	A	245	V
-0.829	I	246	Y
-1.007	D	247	E
-1.005	D	247	F
-1.068	D	247	G
-2.402	D	247	H
-1.724	D	247	I
-0.822	D	247	L
-0.793	D	247	M
-1.467	D	247	N
-1.068	D	247	V
-1.243	D	247	W
-1.512	D	247	Y
-0.559	K	249	N
-1.533	K	249	R
-2.761	D	250	E
-0.872	D	250	F
-1.268	D	250	H
-1.039	D	250	I
-0.698	D	250	M
-1.318	D	250	N
-3.546	D	250	Q
-0.744	D	250	R
-3.286	D	250	W
-1.838	D	250	Y
-1.447	S	252	G
-2.581	A	253	K
-0.599	A	253	N
-1.189	A	253	Q
-1.419	A	253	R

-0.52	L	254	H
-4.297	K	255	C
-2.226	K	255	F
-0.65	K	255	G
-4.582	K	255	I
-6.318	K	255	L
-4.961	K	255	M
-1.004	K	255	N
-1.368	K	255	Q
-1.305	K	255	R
-1.12	K	255	T
-2.993	K	255	V
-0.79	K	255	W
-2.48	K	255	Y
-1.663	T	256	A
-4.605	T	256	D
-3.077	T	256	E
-2.088	T	256	F
-1.105	T	256	H
-1.273	T	256	I
-2.344	T	256	K
-1.261	T	256	L
-2.018	T	256	N
-1.721	T	256	Q
-1.135	T	256	R
-1.085	T	256	S
-3.685	T	256	W
-3.064	T	256	Y
-1.052	T	257	E
-0.905	T	257	F
-1.179	T	257	H
-1.169	T	257	L
-2.225	T	257	M
-1.898	T	257	V
-0.719	T	257	W
-2.493	T	257	Y
-1.846	I	258	F
-0.602	D	259	I
-2.52	D	259	L
-2.002	D	259	M
-2.419	D	259	N
-4.395	D	259	R
-0.504	D	259	T
-1.555	D	259	Y
-3.113	T	264	D
-0.619	T	264	G

-0.606	T	264	H
-1.036	T	264	I
-2.271	T	264	K
-2.231	T	264	N
-1.027	T	264	Q
-1.297	T	264	R
-1.789	T	264	V
-1.162	R	269	F
-2.384	R	269	W
-0.916	R	269	Y
-1.668	G	270	K
-1.018	G	270	N
-7.501	S	272	G
-6.59	N	274	D
-1.29	N	274	H
-1.438	N	274	K
-1.345	N	274	Q
-1.128	N	274	R
-1.046	N	274	S
-6.425	G	275	A
-6.719	G	275	C
-3.004	G	275	E
-3.439	G	275	F
-2.989	G	275	H
-5.834	G	275	L
-5.771	G	275	M
-4.083	G	275	N
-2.832	G	275	Q
-5.141	G	275	S
-6.48	S	276	D
-4.126	S	276	E
-4.296	S	276	F
-3.057	S	276	G
-1.099	S	276	H
-1.014	S	276	L
-1.983	S	276	M
-4.191	S	276	Q
-1.244	S	276	R
-4.129	S	276	T
-2.589	S	276	W
-3.747	S	276	Y
-1.295	N	279	D
-1.316	N	279	E
-1.933	N	279	F
-0.519	N	279	M
-2.816	N	279	R

-1.667	N	279	S
-2.151	N	279	W
-5.197	N	279	Y
-5.082	Q	282	D
-1.912	Q	282	E
-3.221	Q	282	G
-2.608	Q	282	H
-3.413	Q	282	N
-1.175	P	284	A
-0.563	P	284	C
-1.726	P	284	D
-0.948	P	284	R
-0.824	S	286	D
-0.7	S	286	T
-0.836	V	287	I
-1.126	V	287	L
-0.679	K	288	R
-1.935	S	291	T
-4.25	T	297	D
-5.165	T	297	G
-2.506	T	297	H
-0.602	T	297	K
-0.653	T	297	L
-3.168	T	297	N
-3.251	T	297	Q
-0.569	T	297	R
-0.607	T	297	Y
-0.622	V	299	I
-3.283	N	300	A
-0.67	N	300	D
-2.389	N	300	E
-4.801	N	300	F
-0.955	N	300	G
-2.175	N	300	H
-2.688	N	300	K
-1.342	N	300	L
-1.566	N	300	M
-4.67	N	300	Q
-4.369	N	300	R
-2.253	N	300	T
-3.152	N	300	W
-4.116	N	300	Y
-0.711	A	302	D
-1.057	A	302	K
-2.367	A	302	N
-3.445	A	302	P

-1.437	A	302	Q
-1.562	A	302	R
-1.241	A	302	S
-1.665	A	302	T
-0.918	A	302	V
-1.631	K	303	M
-1.841	Q	304	P
-1.3	I	305	L
-0.931	A	307	G
-1.57	N	308	I
-1.084	N	308	R
-1.003	N	308	Y
-0.919	V	309	I
-1.968	V	309	L
-3.222	V	310	D
-4.277	V	310	E
-1.284	V	310	G
-2.278	V	310	I
-1.206	V	310	K
-2.64	V	310	L
-1.981	V	310	M
-1.643	V	310	Q
-0.603	V	310	R
-1.476	V	310	Y
-0.969	E	311	D
-0.741	E	313	T
-0.584	T	317	L
-1.56	T	317	Q
-0.974	S	318	T
-1.689	K	319	G
-1.245	K	319	P
-0.645	K	319	Q
-0.662	K	319	S
-1.445	A	320	N
-2.732	A	320	S
-3.457	A	320	T
-1.693	S	322	D
-1.149	S	322	E
-2.31	S	322	F
-0.547	S	322	L
-1.208	S	322	Q
-1.229	S	322	R
-1.363	S	322	W
-2.665	S	322	Y
-1.806	N	326	C
-1.348	N	326	E

-6.807	N	326	I
-3.008	N	326	L
-4.117	N	326	M
-0.912	N	326	Q
-3.518	N	326	T
-6.143	N	326	V
-1.18	N	326	W
-1.944	P	327	I
-0.929	P	327	L
-1.154	V	329	I
-1.555	G	331	C
-7.293	G	331	D
-1.759	G	331	E
-2.826	G	331	H
-0.631	G	331	I
-1.148	G	331	K
-2.247	G	331	M
-5.615	G	331	N
-3.757	G	331	Q
-1.709	G	331	R
-5.193	G	331	S
-6.058	G	331	T
-2.025	G	331	V
-1.709	S	332	D
-4.232	S	332	G
-1.172	K	333	D
-0.711	K	333	F
-1.439	K	333	H
-1.286	K	333	I
-0.779	K	333	M
-0.688	K	333	N
-0.984	K	333	Q
-0.517	K	333	R
-0.911	K	333	V
-2.311	N	335	F
-0.994	N	335	H
-1.861	N	335	I
-0.569	N	335	K
-1.288	N	335	Q
-1.41	N	335	R
-1.375	N	335	V
-2.167	N	335	W
-4.264	N	335	Y
-1.842	I	337	L
-2.65	A	342	F
-2.784	A	342	I

-3.644	A	342	L
-4.974	A	342	V
-2.055	S	343	F
-1.081	S	343	H
-2.498	S	343	I
-0.647	S	343	L
-1.148	S	343	M
-2.983	S	343	T
-5.103	S	343	V
-3.4	T	347	L
-0.929	T	347	Y
-2.024	H	348	F
-1.537	H	348	I
-3.436	H	348	L
-0.527	H	348	T
-0.875	H	348	W
-2.087	H	348	Y
-0.64	L	351	W
-2.674	L	351	Y
-0.9	V	354	I
-0.894	V	354	W
-2.123	T	355	A
-6.547	T	355	D
-2.908	T	355	E
-0.505	T	355	F
-6.168	T	355	G
-1.467	T	355	H
-1.937	T	355	I
-2.431	T	355	K
-1.713	T	355	L
-1.509	T	355	M
-2.926	T	355	N
-4.599	T	355	P
-2.548	T	355	Q
-1.312	T	355	R
-1.839	T	355	S
-1.912	T	355	V
-0.851	T	355	W
-3.208	T	355	Y
-1.345	Q	357	A
-2.15	Q	357	D
-1.018	Q	357	E
-2.172	Q	357	F
-0.616	Q	357	K
-0.946	Q	357	L
-0.974	Q	357	M

-2.632	Q	357	N
-3.698	Q	357	P
-1.047	Q	357	R
-3.433	Q	357	S
-1.903	Q	357	T
-2.693	Q	357	W
-3.419	Q	357	Y
-1.398	N	358	A
-0.821	N	358	T
-0.616	N	358	V
-1.062	N	358	Y
-1.438	S	359	D
-1.059	S	359	E
-1.378	S	359	K
-2.104	S	359	R
-1.28	D	360	N
-2.902	N	361	D
-3.808	N	361	G
-0.729	N	361	Q
-3.46	N	361	S
-0.856	S	362	T
-0.513	A	363	F
-0.78	A	363	N
-0.774	A	363	R
-0.558	A	363	T
-0.668	A	363	Y
-1.701	N	367	D
-2.021	N	367	E
-2.692	N	367	R
-1.089	N	367	T
-1.429	L	369	F
-1.334	L	369	Y
-0.878	K	370	Q
-1.132	Q	371	E
-4.072	Q	371	G
-1.78	Q	371	K
-0.776	Q	371	N
-1.402	Q	371	S
-1.278	Q	371	T
-1.584	A	372	F
-1.167	A	372	M
-0.734	A	372	Q
-1.863	A	372	Y
-1.946	V	373	F
-1.549	V	373	I
-0.698	V	373	L

-2.254	V	373	W
-2.226	V	373	Y
-2.604	G	374	A
-0.584	G	374	C
-1.9	G	374	D
-2.244	G	374	E
-1.248	G	374	F
-2.467	G	374	H
-2.244	G	374	I
-2.238	G	374	K
-2.56	G	374	L
-2.589	G	374	M
-1.682	G	374	N
-2.086	G	374	Q
-1.912	G	374	R
-2.461	G	374	S
-1.343	G	374	T
-1.743	G	374	V
-1.968	G	374	W
-3.292	G	374	Y
-2.883	D	375	E
-2.01	D	375	F
-2.704	D	375	Y
-1.033	N	378	D
-2.421	N	378	F
-0.527	N	378	H
-4.306	N	378	I
-2.095	N	378	L
-2.91	N	378	V
-2.298	N	378	W
-5.452	N	378	Y
-1.64	Q	385	I
-1.14	Q	385	L
-6.284	Q	385	Y
-1.657	L	399	Y
-2.025	V	400	I
-1.497	V	400	L
-0.776	V	400	M
-4.382	K	401	G
-0.99	N	402	D
-0.666	N	402	H
-3.648	N	402	I
-0.629	N	402	K
-3.676	N	402	L
-1.291	N	402	M
-4.123	N	402	Q

-1.9	N	402	R
-0.632	N	402	T
-2.535	N	402	V
-2.104	N	402	Y
-1.381	T	405	D
-1.16	T	405	E
-1.456	T	405	G
-0.661	T	405	N
-1.568	T	405	P
-0.659	T	405	S
-1.621	N	406	D
-1.036	K	407	Q
-0.624	D	408	E
-1.367	S	409	A
-1.017	S	409	D
-1.012	S	409	E
-2.884	S	409	F
-2.887	S	409	G
-3.223	S	409	H
-2.537	S	409	I
-2.811	S	409	K
-1.925	S	409	L
-2.672	S	409	N
-0.58	S	409	Q
-2.919	S	409	R
-2.456	S	409	V
-1.9	S	409	W
-3.769	S	409	Y
-0.703	D	411	I
-0.601	D	411	N
-1.019	D	411	W
-2.19	D	411	Y
-3.008	L	413	I
-0.851	L	413	R
-0.557	L	413	T
-2.019	V	414	F
-1.445	V	414	W
-2.099	V	414	Y
-1.502	S	417	A
-1.726	S	417	L
-1.482	S	417	M
-1.798	S	417	T
-2.722	S	417	V
-2.372	S	417	W
-1.977	S	417	Y
-1.184	L	418	F

-0.84	L	418	Y
-0.759	K	419	E
-1.798	K	419	I
-2.514	K	419	L
-1.942	K	419	M
-1.308	K	419	Q
-3.11	H	424	F
-1.633	H	424	L
-1.004	H	424	M
-3.125	H	424	Y
-0.972	A	428	C
-1.093	A	428	I
-1.48	A	428	L
-2.906	A	428	T
-2.715	A	428	V
-2.242	N	434	A
-1.994	N	434	F
-1.556	N	434	G
-1.092	N	434	I
-0.835	N	434	L
-1.969	N	434	Q
-2.092	N	434	R
-1.518	N	434	T
-0.503	N	434	V
-0.931	T	435	I
-1.41	T	435	V
-1.764	Y	443	E
-2.209	Y	450	W
-0.751	S	459	K
-1.234	S	459	L
-1.791	S	459	M
-2.107	S	459	P
-0.934	E	460	D
-3.904	E	460	G
-1.489	E	460	K
-1.046	E	460	Q
-1.919	E	460	R
-0.581	N	463	A
-2.529	N	463	D
-3.986	N	463	E
-4.058	N	463	K
-0.527	N	463	L
-2.682	N	463	Q
-2.561	N	463	R
-0.51	N	463	T
-1.797	N	463	V

-3.545	E	464	A
-3.37	E	464	D
-2.285	E	464	H
-2.454	E	464	I
-5.122	E	464	K
-2.639	E	464	L
-3.909	E	464	M
-2.144	E	464	N
-2.078	E	464	Q
-3.742	E	464	R
-2.292	E	464	S
-2.385	E	464	T
-1.377	E	464	W
-0.612	E	464	Y
-2.49	I	465	L
-1.611	I	465	Y
-1.788	R	468	G
-0.909	R	468	K
-1.169	R	468	L
-4.089	R	468	Q
-0.664	R	468	S
-1.506	R	468	T
-1.095	R	468	W

【表８】

表５：ＭＧ　ＷＴの安定性を改善すると予測される１６５個の点変異。デルタスコアは、変異のスコア－ＷＴ残基のスコアを指す。このリストは、ＰＤＢ　ＩＤ：４ＮＺＲ内の抗体界面の５Ａ以内の残基を除く残基７８～４６８を考慮した。

デルタスコア	WT残基	残基番号	変異残基
-3.9	Q	83	Y
-3.8	G	90	Y
-3.8	A	92	G
-3.6	A	92	Y
-3.0	F	94	T
-4.3	T	137	I
-3.2	A	142	I
-3.2	A	142	V
-5.1	H	147	F
-3.9	H	147	Y
-3.0	S	150	D
-7.4	S	150	E
-4.1	S	156	I
-4.3	S	156	K
-3.5	S	156	L
-4.2	S	156	T
-3.8	S	156	V
-4.0	S	156	W
-3.3	N	184	V
-3.2	S	196	Q
-3.5	S	196	R
-3.3	S	196	Y
-3.3	S	198	K
-3.2	S	198	L
-3.7	S	198	P
-3.7	S	198	R
-6.1	S	198	Y
-3.1	A	205	P
-3.2	S	211	K
-3.3	T	215	Y
-3.0	K	225	P
-3.0	D	231	I
-3.3	D	231	T
-5.7	S	232	D
-6.7	S	232	E
-3.5	S	232	F
-3.1	S	232	H
-6.6	S	232	I
-4.1	S	232	K
-6.7	S	232	L
-4.1	S	232	M
-3.0	S	232	N
-6.5	S	232	Q
-5.0	S	232	R
-3.9	S	232	V
-3.3	P	234	D
-3.8	P	234	K
-4.2	P	234	Q
-4.2	P	234	R
-4.0	N	235	W
-4.8	H	236	F
-3.1	H	236	I
-3.9	H	236	M
-5.4	H	236	V
-3.2	H	236	Y
-3.8	F	237	D
-3.1	F	237	E
-3.8	F	237	I
-4.1	F	237	K
-4.5	F	237	R
-3.6	F	237	T
-3.4	F	237	V
-4.0	E	239	F
-3.4	E	239	Y
-3.5	T	243	V
-3.3	A	245	I
-3.9	A	245	L
-6.0	A	245	Q
-4.1	A	245	V
-3.5	D	250	Q
-3.3	D	250	W
-4.3	K	255	C
-4.6	K	255	I
-6.3	K	255	L
-5.0	K	255	M
-4.6	T	256	D
-3.1	T	256	E
-3.7	T	256	W
-3.1	T	256	Y
-4.4	D	259	R

-3.1	T	264	D
-7.5	S	272	G
-6.6	N	274	D
-6.4	G	275	A
-6.7	G	275	C
-3.0	G	275	E
-3.4	G	275	F
-5.8	G	275	L
-5.8	G	275	M
-4.1	G	275	N
-5.1	G	275	S
-6.5	S	276	D
-4.1	S	276	E
-4.3	S	276	F
-3.1	S	276	G
-4.2	S	276	Q
-4.1	S	276	T
-3.7	S	276	Y
-5.2	N	279	Y
-5.1	Q	282	D
-3.2	Q	282	G
-3.4	Q	282	N
-4.3	T	297	D
-5.2	T	297	G
-3.2	T	297	N
-3.3	T	297	Q
-3.3	N	300	A
-4.8	N	300	F
-4.7	N	300	Q
-4.4	N	300	R
-3.2	N	300	W
-4.1	N	300	Y
-3.4	A	302	P
-3.2	V	310	D
-4.3	V	310	E
-3.5	A	320	T
-6.8	N	326	I
-3.0	N	326	L
-4.1	N	326	M
-3.5	N	326	T
-6.1	N	326	V
-7.3	G	331	D
-5.6	G	331	N
-3.8	G	331	Q
-5.2	G	331	S
-6.1	G	331	T

-4.2	S	332	G
-4.3	N	335	Y
-3.6	A	342	L
-5.0	A	342	V
-5.1	S	343	V
-3.4	T	347	L
-3.4	H	348	L
-6.5	T	355	D
-6.2	T	355	G
-4.6	T	355	P
-3.2	T	355	Y
-3.7	Q	357	P
-3.4	Q	357	S
-3.4	Q	357	Y
-3.8	N	361	G
-3.5	N	361	S
-4.1	Q	371	G
-3.3	G	374	Y
-4.3	N	378	I
-5.5	N	378	Y
-6.3	Q	385	Y
-4.4	K	401	G
-3.6	N	402	I
-3.7	N	402	L
-4.1	N	402	Q
-3.2	S	409	H
-3.8	S	409	Y
-3.0	L	413	I
-3.1	H	424	F
-3.1	H	424	Y
-3.9	E	460	G
-4.0	N	463	E
-4.1	N	463	K
-3.5	E	464	A
-3.4	E	464	D
-5.1	E	464	K
-3.9	E	464	M
-3.7	E	464	R
-4.1	R	468	Q

【表９】

表６：抗体に対するＭＧ　ＷＴの親和性を改善すると予測される１２８個の点変異。デルタスコアは、変異のスコアーＷＴ残基のスコアを指す。このリストは、ＰＤＢ　ＩＤ：４ＮＺＲ内の抗体界面の５Å以内の７０残基を考慮した。

デルタスコア	WT残基	残基番号	変異残基
-1.6	R	95	E
-0.6	A	102	I
-0.7	A	102	L
-1.3	N	103	A
-0.9	N	103	C
-1.5	N	103	D
-2.5	N	103	E
-0.8	N	103	F
-0.7	N	103	H
-3.5	N	103	I
-2.6	N	103	K
-0.8	N	103	L
-1.5	N	103	M
-1.8	N	103	Q
-2.5	N	103	R
-1.0	N	103	S
-2.3	N	103	T
-2.1	N	103	V
-1.3	N	103	Y
-0.8	S	106	A
-0.9	E	107	K
-0.7	E	107	L
-0.7	K	114	F
-0.7	K	114	L
-1.1	K	114	M
-2.1	K	114	T
-1.6	L	116	D
-1.4	L	116	E
-2.4	L	116	K
-3.9	L	116	R
-1.0	L	116	W
-1.3	S	160	A
-1.5	S	160	P
-0.9	T	161	I
-0.9	T	161	L
-2.3	T	161	P
-0.6	E	162	L
-0.5	Y	163	F
-1.0	M	181	F
-0.8	M	181	I
-1.8	M	181	W
-0.6	G	186	A
-0.5	G	186	C
-0.5	G	186	D
-1.6	G	186	F
-2.3	G	186	H
-0.8	G	186	K
-0.5	G	186	L
-0.6	G	186	Q
-2.4	G	186	R
-3.0	G	186	S
-3.0	G	186	T
-1.8	N	321	H
-0.8	N	321	K
-1.9	R	381	F
-1.6	R	381	W
-2.0	R	381	Y
-0.7	R	384	L
-0.5	Y	389	A
-2.3	Y	389	D
-2.5	Y	389	E
-1.7	Y	389	K
-1.1	Y	389	L
-2.4	Y	389	P
-1.2	Y	389	Q
-0.8	Y	389	S
-0.8	F	390	Y
-2.9	A	391	I
-0.8	A	391	T
-2.8	A	391	V
-1.7	D	396	A
-0.9	K	397	I
-0.8	K	397	V
-1.6	E	426	I
-1.0	E	426	L
-0.9	Y	429	E
-0.9	Y	436	L
-1.5	R	438	F
-1.6	R	438	I
-0.6	R	438	Q
-0.7	R	438	V
-3.0	V	439	F

-1.2	V	439	L
-1.4	V	439	Y
-1.1	E	441	Q
-1.0	N	442	D
-3.5	N	442	E
-4.0	N	442	F
-0.6	N	442	H
-1.7	N	442	I
-1.2	N	442	L
-1.2	N	442	M
-1.9	N	442	V
-1.6	N	442	W
-4.4	N	442	Y
-1.0	A	447	L
-0.5	A	447	N
-0.8	S	448	Y
-0.7	I	449	K
-2.5	I	449	R
-0.7	N	452	A
-3.5	N	452	F
-1.1	N	452	K
-0.6	N	452	Q
-1.1	E	453	K
-1.3	E	453	L
-2.0	E	453	Q
-1.7	E	453	R
-0.6	A	455	M
-2.0	S	456	A
-3.7	S	456	F
-4.7	S	456	K
-0.6	S	456	L
-1.7	S	456	M
-1.0	S	456	N
-3.2	S	456	R
-1.3	S	456	Y
-0.8	Q	462	A
-0.6	Q	462	F
-1.4	Q	462	K
-1.8	Q	462	L
-2.7	Q	462	R
-1.1	Q	462	Y
-0.5	L	466	D
-1.2	L	466	E
-1.5	L	466	K
-1.3	L	466	R
-0.7	L	466	Y

【表１０】

表７：抗体に対するMG　WTの親和性を改善すると予測される１７個の点変異。デルタスコアは、変異のスコアーwt残基のスコアを指す。このリストは、PDB　ID：4NZR内の抗体界面の5Å以内の７０残基を考慮した。

デルタスコア	WT残基	残基番号	変異残基
-0.7	N	103	H
-2.3	G	186	H
-1.8	N	321	H
-0.6	N	442	H
-1.5	N	103	D
-1.6	L	116	D
-0.5	G	186	D
-2.3	Y	389	D
-1.0	N	442	D
-0.5	L	466	D
-1.6	R	95	E
-2.5	N	103	E
-1.4	L	116	E
-2.5	Y	389	E
-0.9	Y	429	E
-3.5	N	442	E
-1.2	L	466	E

配列

配列番号１：野生型M. ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質M

【配列表１－１】

```
Met Gln Phe Lys Lys His Lys Asn Ser Val Lys Phe Lys Arg Lys Leu
1               5                  10                  15

Phe Trp Thr Ile Gly Val Leu Gly Ala Gly Ala Leu Thr Thr Phe Ser
            20                  25                  30

Ala Val Met Ile Thr Asn Leu Val Asn Gln Ser Gly Tyr Ala Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ser Gly Arg Ser Gly Asn Leu Gly Phe Lys Leu Phe Ser Thr Gln
    50                  55                  60

Ser Pro Ser Ala Glu Val Lys Leu Lys Ser Leu Ser Leu Asn Asp Gly
65                  70                  75                  80

Ser Tyr Gln Ser Glu Ile Asp Leu Ser Gly Gly Ala Asn Phe Arg Glu
                85                  90                  95

Lys Phe Arg Asn Phe Ala Asn Glu Leu Ser Glu Ala Ile Thr Asn Ser
            100                 105                 110

Pro Lys Gly Leu Asp Arg Pro Val Pro Lys Thr Glu Ile Ser Gly Leu
        115                 120                 125

Ile Lys Thr Gly Asp Asn Phe Ile Thr Pro Ser Phe Lys Ala Gly Tyr
    130                 135                 140

Tyr Asp His Val Ala Ser Asp Gly Ser Leu Leu Ser Tyr Tyr Gln Ser
145                 150                 155                 160

Thr Glu Tyr Phe Asn Asn Arg Val Leu Met Pro Ile Leu Gln Thr Thr
                165                 170                 175

Asn Gly Thr Leu Met Ala Asn Asn Arg Gly Tyr Asp Asp Val Phe Arg
            180                 185                 190

Gln Val Pro Ser Phe Ser Gly Trp Ser Asn Thr Lys Ala Thr Thr Val
        195                 200                 205

Ser Thr Ser Asn Asn Leu Thr Tyr Asp Lys Trp Thr Tyr Phe Ala Ala
    210                 215                 220

Lys Gly Ser Pro Leu Tyr Asp Ser Tyr Pro Asn His Phe Phe Glu Asp
225                 230                 235                 240

Val Lys Thr Leu Ala Ile Asp Ala Lys Asp Ile Ser Ala Leu Lys Thr
                245                 250                 255

Thr Ile Asp Ser Glu Lys Pro Thr Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Leu Ser
            260                 265                 270

Gly Asn Gly Ser Gln Leu Asn Glu Leu Gln Leu Pro Glu Ser Val Lys
        275                 280                 285

Lys Val Ser Leu Tyr Gly Asp Tyr Thr Gly Val Asn Val Ala Lys Gln
    290                 295                 300
```

【配列表１－２】

```
Ile Phe Ala Asn Val Val Glu Leu Glu Phe Tyr Ser Thr Ser Lys Ala
305                 310                 315                 320

Asn Ser Phe Gly Phe Asn Pro Leu Val Leu Gly Ser Lys Thr Asn Val
                325                 330                 335

Ile Tyr Asp Leu Phe Ala Ser Lys Pro Phe Thr His Ile Asp Leu Thr
            340                 345                 350

Gln Val Thr Leu Gln Asn Ser Asp Asn Ser Ala Ile Asp Ala Asn Lys
        355                 360                 365

Leu Lys Gln Ala Val Gly Asp Ile Tyr Asn Tyr Arg Arg Phe Glu Arg
    370                 375                 380

Gln Phe Gln Gly Tyr Phe Ala Gly Gly Tyr Ile Asp Lys Tyr Leu Val
385                 390                 395                 400

Lys Asn Val Asn Thr Asn Lys Asp Ser Asp Asp Asp Leu Val Tyr Arg
                405                 410                 415

Ser Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Leu Glu Glu Ala Tyr Arg Glu Gly
            420                 425                 430

Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Val Asn Glu Asn Tyr Tyr Pro Gly Ala Ser
        435                 440                 445

Ile Tyr Glu Asn Glu Arg Ala Ser Arg Asp Ser Glu Phe Gln Asn Glu
    450                 455                 460

Ile Leu Lys Arg Ala Glu Gln Asn Gly Val Thr Phe Asp Glu Asn Ile
465                 470                 475                 480

Lys Arg Ile Thr Ala Ser Gly Lys Tyr Ser Val Gln Phe Gln Lys Leu
                485                 490                 495

Glu Asn Asp Thr Asp Ser Ser Leu Glu Arg Met Thr Lys Ala Val Glu
            500                 505                 510

Gly Leu Val Thr Val Ile Gly Glu Glu Lys Phe Glu Thr Val Asp Ile
        515                 520                 525

Thr Gly Val Ser Ser Asp Thr Asn Glu Val Lys Ser Leu Ala Lys Glu
    530                 535                 540

Leu Lys Thr Asn Ala Leu Gly Val Lys Leu Lys Leu
545                 550                 555
```

配列番号２：Ｎ末端６－Ｈｉｓタグとそれに続くトロンビン切断部位を有する可溶型のＭ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ（配列番号１のアミノ酸残基３７～５５６）

【配列表２－１】

```
His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His
1               5                   10                  15

Met Thr Asn Leu Val Asn Gln Ser Gly Tyr Ala Leu Val Ala Ser Gly
            20                  25                  30

Arg Ser Gly Asn Leu Gly Phe Lys Leu Phe Ser Thr Gln Ser Pro Ser
        35                  40                  45
```

【配列表２－２】

```
Ala Glu Val Lys Leu Lys Ser Leu Ser Leu Asn Asp Gly Ser Tyr Gln
    50                  55                  60

Ser Glu Ile Asp Leu Ser Gly Gly Ala Asn Phe Arg Glu Lys Phe Arg
65                  70                  75                  80

Asn Phe Ala Asn Glu Leu Ser Glu Ala Ile Thr Asn Ser Pro Lys Gly
                85                  90                  95

Leu Asp Arg Pro Val Pro Lys Thr Glu Ile Ser Gly Leu Ile Lys Thr
            100                 105                 110

Gly Asp Asn Phe Ile Thr Pro Ser Phe Lys Ala Gly Tyr Tyr Asp His
        115                 120                 125

Val Ala Ser Asp Gly Ser Leu Leu Ser Tyr Tyr Gln Ser Thr Glu Tyr
    130                 135                 140

Phe Asn Asn Arg Val Leu Met Pro Ile Leu Gln Thr Thr Asn Gly Thr
145                 150                 155                 160

Leu Met Ala Asn Asn Arg Gly Tyr Asp Asp Val Phe Arg Gln Val Pro
                165                 170                 175

Ser Phe Ser Gly Trp Ser Asn Thr Lys Ala Thr Thr Val Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Asn Asn Leu Thr Tyr Asp Lys Trp Thr Tyr Phe Ala Ala Lys Gly Ser
        195                 200                 205

Pro Leu Tyr Asp Ser Tyr Pro Asn His Phe Phe Glu Asp Val Lys Thr
    210                 215                 220

Leu Ala Ile Asp Ala Lys Asp Ile Ser Ala Leu Lys Thr Thr Ile Asp
225                 230                 235                 240

Ser Glu Lys Pro Thr Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Leu Ser Gly Asn Gly
                245                 250                 255

Ser Gln Leu Asn Glu Leu Gln Leu Pro Glu Ser Val Lys Lys Val Ser
            260                 265                 270

Leu Tyr Gly Asp Tyr Thr Gly Val Asn Val Ala Lys Gln Ile Phe Ala
        275                 280                 285

Asn Val Val Glu Leu Glu Phe Tyr Ser Thr Ser Lys Ala Asn Ser Phe
    290                 295                 300

Gly Phe Asn Pro Leu Val Leu Gly Ser Lys Thr Asn Val Ile Tyr Asp
305                 310                 315                 320

Leu Phe Ala Ser Lys Pro Phe Thr His Ile Asp Leu Thr Gln Val Thr
                325                 330                 335

Leu Gln Asn Ser Asp Asn Ser Ala Ile Asp Ala Asn Lys Leu Lys Gln
            340                 345                 350

Ala Val Gly Asp Ile Tyr Asn Tyr Arg Arg Phe Glu Arg Gln Phe Gln
        355                 360                 365
```

【配列表２－３】

```
Gly Tyr Phe Ala Gly Gly Tyr Ile Asp Lys Tyr Leu Val Lys Asn Val
    370                 375                 380

Asn Thr Asn Lys Asp Ser Asp Asp Asp Leu Val Tyr Arg Ser Leu Lys
385                 390                 395                 400

Glu Leu Asn Leu His Leu Glu Glu Ala Tyr Arg Glu Gly Asp Asn Thr
                405                 410                 415

Tyr Tyr Arg Val Asn Glu Asn Tyr Tyr Pro Gly Ala Ser Ile Tyr Glu
            420                 425                 430

Asn Glu Arg Ala Ser Arg Asp Ser Glu Phe Gln Asn Glu Ile Leu Lys
        435                 440                 445

Arg Ala Glu Gln Asn Gly Val Thr Phe Asp Glu Asn Ile Lys Arg Ile
    450                 455                 460

Thr Ala Ser Gly Lys Tyr Ser Val Gln Phe Gln Lys Leu Glu Asn Asp
465                 470                 475                 480

Thr Asp Ser Ser Leu Glu Arg Met Thr Lys Ala Val Glu Gly Leu Val
                485                 490                 495

Thr Val Ile Gly Glu Glu Lys Phe Glu Thr Val Asp Ile Thr Gly Val
            500                 505                 510

Ser Ser Asp Thr Asn Glu Val Lys Ser Leu Ala Lys Glu Leu Lys Thr
        515                 520                 525

Asn Ala Leu Gly Val Lys Leu Lys Leu
    530                 535
```

配列番号３：野生型Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ断片７４～４７９

ＳＬＳＬＮＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰ
ＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧＤＮＦ　ＴＩＰＳ　ＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＳＤ
ＧＳＬＬＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬＭＡＮＮＲＧＹＤＤＶＦ
ＲＱＶＰＳ　Ｆ　ＳＧＷＳＮＴＫＡＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧＳ　Ｐ
ＬＹ　ＤＳ　Ｙ　ＰＮＨＦＦＥＤＶＫＴＬＡＩ　ＤＡＫＤＩ　ＳＡＬＫＴＴ　Ｉ　Ｄ　ＳＥ
ＫＰＴ　ＹＬ　Ｉ　ＩＲＧＬＳ　ＧＮＧＳ　ＱＬＮＥＬＱＬ　ＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧＤ
ＹＴＧＶＮＶＡＫＱＩＦＡＮＶＶＥＬＥＦＹＳＴＳＫＡＮ　Ｓ　ＦＧＦＮＰＬＶＬＧＳＫ
ＴＮＶＩＮＤＬ　ＦＡＳＫＰＦＴＨＩＤＬＴＱＶＴＬＱＮＳ　ＤＮＳＡＩＤＡＮＫＬＫＱ
ＡＶＧＤＩＹＮＹＲＲＦＥ　ＲＱＦＱＧＹＦＡＧＧＹＩＤＫＹＬＶＫＮＶＮＴＮＫＤＳＤ
ＤＤＬＶＹＲＳＬＫＥＬＮＬＨＬＥＥＡＹＲＥＧＤＮＴＹＹＲＶＮＥＮＹＹＰ　ＧＡＳ
ＩＹＥＮＥＲＡＳＲＤＳＥＦＱＮＥＩＬＫＲＡＥＱＮＧＶＴＦＤＥＮ

配列番号４：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ　ＭＧ１

ＳＬＳＬＮＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰ
ＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧＤＮＦ　ＴＩＰＳ　ＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＳＤ
ＧＳＬＬＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬＭＡＮＮＲＧＹＤＤＶＦ
ＲＱＶＰＳ　Ｆ　ＳＧＷＳＮＴＫＡＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧＳ　Ｐ
ＬＹ　ＤＳ　Ｙ　ＰＮＨＴ　ＦＥＤＶＫＴＬＡＩ　ＤＡＫＤＩ　ＳＡＬＫＴＴ　Ｉ　Ｄ　Ｓ
ＥＫＰＴ　ＹＬ　Ｉ　ＩＲＧＬＳ　ＧＮＧＳ　ＱＬＮＥＬＱＬ　ＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧ
ＤＹＴＧＶＮＶＡＫＱＩＦＡＮＶＶＥＬＥＦＹＳＴＳＫＡＮ　Ｓ　ＦＧＦＮＰＬＶＬＧＳ
ＫＴＮＶＩＮＤＬ　ＦＡＳＫＰＦＴＨＩＤＬＴＱＶＴＬＱＮＳ　ＤＮＳＡＩＤＡＮＫＬＫ
ＱＡＶＧＤＩＹＮＹＲＲＦＥ　ＲＱＦＱＧＹＦＡＧＧＹＩＤＫＹＬＶＫＮＶＮＴＮＫＤＳ

DDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS
IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN
配列番号５：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ８
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPS FKAGYYDHVASD
GSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVF
RQVPS F SGWSNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS P
LY DQY PNHFFEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D SEK
PT YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYGDY
TGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKT
NVINDL FASKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQA
VGDIYNYRRFE RQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKDSDD
DLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS I
YENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN
配列番号６：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ１３
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF ITPSFKAGYYDHVASDG
SLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVFR
QVPSF SGWSNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS PLY
DS Y PNHFFEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D S EKP
T YL I IRGLS GNGS QLNELDL PESVKKVSLYGDYT
GVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTN
VINDL FASKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQAV
GDIYNYRRFE RQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKDSDDD
LVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IY
ENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN
配列番号７：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ１５
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPS FKAGYYDHVAED
GSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVF
RQVPRF PGWSNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS PL
Y DS Y PNHFFEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D S E
KPT YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYGD
YTGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSK
TNVINDL FASKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQ
AVGDIYNYRRFE RQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKDSD
DDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS
IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN
配列番号８：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ２１
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF ITPSFKAGYYDHVASDG
SLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVFR
QVPSF SGWSNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS PLY
DS Y PNHFFEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D S EKP
T YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYGDYT
GVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTN
VINDL FASKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQAV
GDIYNYRRFE RQFQGY FAGGY I DKYL IKIVNTNP
DVDDDIVYRSLKELNLHLEEAYREGDNI YYRVNENYY P
GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

配列番号９：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ　ＭＧ２２
ＳＬＳＬＮＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰ
ＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧＤＮＦ　ＩＴＰＳＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＳＤＧ
ＳＬＬＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬＭＡＮＮＲＧＹＤＤＶＦＲ
ＱＶＰＳＦ　ＳＧＷＳＮＴＫＡＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧＳ　ＰＬＹ
ＤＳ　Ｙ　ＰＮＨＦＦＥＤＶＫＴＬＡＩ　ＤＡＫＤＩ　ＳＡＬＫＴＴ　Ｉ　Ｄ　Ｓ　ＥＫＰ
Ｔ　ＹＬ　Ｉ　ＩＲＧＬＳ　ＧＮＧＳ　ＱＬＮＥＬＱＬ　ＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧＤＹＴ
ＧＶＮＶＡＫＱＩＦＡＮＶＶＥＬＥＦＹＳＴＳＫＡＮ　Ｓ　ＦＧＦＮＰＬＶＬＧＳＫＴＮ
ＶＩＮＤＬ　ＦＡＳＫＰＦＴＨＩＤＬＴＱＶＴＬＱＮＳ　ＤＮＳＡＩＤＡＮＫＬＫＱＡＩ
ＧＤＩＹＮＹＲＲＦＥ　ＲＱＦＱＧＹ　ＦＡＧＧＹ　Ｉ　ＤＫＹＬ　ＩＫＮＶＮＴＮＫＤ
Ｓ　ＤＤＤＬＶＹＲＳＬＫＥＬＮＬＨＬＥＥＡＹＲＥＧＤＮＴ　ＹＹＲＶＮＥＮＹＹ　Ｐ
ＧＡＳ　ＩＹＥＮＥＲＡＳＲＤＳＥＦＱＮＥＩＬＫＲＡＥＱＮＧＶＴＦＤＥＮ
配列番号１０：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ　ＭＧ２３
ＳＬＳＬＮＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰ
ＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧＤＮＦ　ＴＩＰＳ　ＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＳＤ
ＧＳＬＬＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬＭＡＮＮＲＧＹＤＤＶＦ
ＲＱＶＰＳ　Ｆ　ＳＧＷＳＮＴＫＡＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧＳ　Ｐ
ＬＹ　ＤＳ　Ｙ　ＰＮＨＦＦＥＤＶＫＴＬＡＩ　ＤＡＫＤＩ　ＳＡＬＫＴＴ　Ｉ　Ｄ　ＳＥ
ＫＰＴ　ＹＬ　Ｉ　ＩＲＧＬＳ　ＧＮＧＳ　ＱＬＮＥＬＱＬ　ＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧＤ
ＹＴＧＶＮＶＡＫＱＩＦＡＮＶＶＥＬＥＦＹＳＴＳＫＡＮ　Ｓ　ＦＧＦＮＰＬＶＬＧＳＫ
ＴＮＶＩＮＤＬ　ＦＡＳＫＰＦＴＨＩＤＬＴＱＶＴＬＱＮＳ　ＤＮＳＡＩＤＡＮＫＬＫＱ
ＡＶＧＤＩＹＮＹＲＲＦＥ　ＲＱＦＱＧＹ　ＦＡＧＧＹ　Ｉ　ＤＫＹＬＶＫＬＶＮＴＮＰ
ＤＶＤＤＤＩＶＹＲＳＬＫＥＬＮＬＨＬＥＥＡＹＲＥＧＤＮＴ　ＹＹＲＶＮＥＮＹＹ　Ｐ
ＧＡＳ　ＩＹＥＮＥＲＡＳＲＤＳＥＦＱＮＥＩＬＫＲＡＥＱＮＧＶＴＦＤＥＮ
配列番号１１：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ　ＭＧ２４
ＳＬＳＬＮＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰ
ＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧＤＮＦ　ＴＩＰＳ　ＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＳＤ
ＧＳＬＬＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬＭＡＮＮＲＧＹＤＤＶＦ
ＲＱＶＰＳ　Ｆ　ＳＧＷＳＮＴＫＡＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧＳ　Ｐ
ＬＹ　ＤＳ　Ｙ　ＰＮＨＦＦＥＤＶＫＴＬＡＩ　ＤＡＫＤＩ　ＳＡＬＫＴＴ　Ｉ　Ｄ　ＳＥ
ＫＰＴ　ＹＬ　Ｉ　ＩＲＧＬＳ　ＧＮＧＳ　ＱＬＮＥＬＱＬ　ＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧＤ
ＹＴＧＶＮＶＡＫＱＩＦＡＮＶＶＥＬＥＦＹＳＴＳＫＡＮ　Ｓ　ＦＧＦＮＰＬＶＬＧＳＫ
ＴＮＶＩＮＤＬ　ＦＶＳＫＰＦＴＨＩＤＬＴＱＶＴＬＱＮＳ　ＤＮＳＡＩＤＡＮＫＬＫＱ
ＡＶＧＤＩＹＮＹＲＲＦＥ　ＲＱＦＱＧＹＦＡＧＧＹＩＤＫＹＬＶＫＮＶＮＴＮＫＤＳＤ
ＤＤＬＶＹＲＳＬＫＥＬＮＬＨＬＥＥＡＹＲＥＧＤＮＴＹＹＲＶＮＥＮＹＹＰ　ＧＡＳ
ＩＹＥＮＥＲＡＳＲＤＳＥＦＱＮＥＩＬＫＲＡＥＱＮＧＶＴＦＤＥＮ
配列番号１２：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ　ＭＧ２７
ＳＬＳＬＮＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰ
ＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧＤＮＦ　ＴＩＰＳ　ＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＥＤ
ＧＳＬＬＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬＭＡＮＮＲＧＹＤＤＶＦ
ＲＱＶＰＲＦ　ＰＧＷＳＮＴＫＡＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧＳ　ＰＬ
Ｙ　ＤＱＹ　ＰＮＨＴ　ＦＥＤＶＫＴＬＡＩ　ＤＡＫＤＩ　ＳＡＬＫＴＴ　Ｉ　Ｄ　ＳＥＫ
ＰＴ　ＹＬ　Ｉ　ＩＲＧＬＳ　ＧＮＧＳ　ＱＬＮＥＬＤＬ　ＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧＤＹ
ＴＧＶＮＶＡＫＱＩＦＡＮＶＶＥＬＥＦＹＳＴＳＫＡＮ　Ｓ　ＦＧＦＮＰＬＶＬＧＳＫＴ
ＮＶＩＮＤＬ　ＦＶＳＫＰＦＴＨＩＤＬＴＱＶＴＬＱＮＳ　ＤＮＳＡＩＤＡＮＫＬＫＱＡ
ＩＧＤＩＹＮＹＲＲＦＥ　ＲＱＦＱＧＹ　ＦＡＧＧＹ　Ｉ　ＤＫＹＬ　ＩＫＩＶＮＴＮＰ
ＤＶＤＤＤＩＶＹＲＳＬＫＥＬＮＬＨＬＥＥＡＹＲＥＧＤＮＩ　ＹＹＲＶＮＥＮＹＹ　Ｐ
ＧＡＳ　ＩＹＥＮＥＲＡＳＲＤＳＥＦＱＮＥＩＬＫＲＡＥＱＮＧＶＴＦＤＥＮ
配列番号１３：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ　ＭＧ２８
ＳＬＳＬＮＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰ

KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPS FKAGYYDHVASD
GSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVF
RQVPS F SGWSNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS P
LY DS Y PNHFFEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D SE
KPT YL I IRGLS GDGS QLNELQL PESVKKVSLYGD
YTGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSK
TNVINDL FASKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQ
AVGDIYNYRRFE RQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKDSD
DDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS
IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

配列番号１４：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ２９
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPS FKAGYYDHVAED
GSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVF
RQVPRF PGWSNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS PL
Y DQY PNHT FEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D SEK
PT YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYGDY
TGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKT
NVINDL FVSKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQA
VGDIYNYRRFE RQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKDSDD
DLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS I
YENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

配列番号１５：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ３１
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPS FKAGYYDHVASD
GSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVF
RQVPS F SGWSNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS P
LY DS Y PNHFFEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D SE
KPT YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYGD
YTGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSK
TNVINDL FASKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQ
AIGDIYNYRRFE RQFQGY FAGGY I DKYL IKIVNTN
P DVDDDIVYRSLKELNLHLEEAYREGDNI YYRVNENYY
P GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

配列番号１６：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ３３
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPS FKAGYYDHVASD
GSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVF
RQVPS F SGWSNTKPTTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS P
LY DS Y PNHFFEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D SE
KPT YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYGD
YTGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSK
TNVINDL FASKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQ
AVGDIYNYRRFE RQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKDSD
DDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS
IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

配列番号１７：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ３８
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPS FKAGYYDHVASD
GSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVF

RQVPS F SGWSNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS P
LY DS Y PNHFFEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D SE
KPT YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYGD
YTGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSK
TNVINDL FASKPFTHIDLTQVDLQNS DNSAIDANKLKQ
AVGDIYNYRRFE RQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKDSD
DDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS
IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN
配列番号１８：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ４０
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPS FKAGYYDHVASD
GSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVF
RQVPS F SGWSNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS P
LY DS Y PNHFFEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D SE
KPT YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYGD
YTGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSK
TNVINDL FASKPFTHIDLTQVPLQNS DNSAIDANKLKQ
AVGDIYNYRRFE RQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKDSD
DDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS
IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN
配列番号１９：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ４３
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPS FKAGYYDHVAED
GSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVF
RQVPRF PGWSNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS PL
Y DS Y PNHFFEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D SEK
PT YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYGDY
TGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKT
NVINDL FVSKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQA
IGDIYNYRRFE RQFQGY FAGGY I DKYL IKNVNTNK
DS DDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNT YYRVNENYY
P GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN
配列番号２０：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ４４
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF IT PS FKAGYYDHVAE
DGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDV
FRQVPRF PGWSNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFAAKGS P
LY DQY PNHT FEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D SE
KPT YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYGD
YTGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSK
TNVINDL FVSKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQ
AIGDIYNYRRFE RQFQGY FAGGY I DKYL IKNVNTN
KDS DDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNT YYRVNENYY
P GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN
配列番号２１：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ４５
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF IT PS FKAGYYDHVAS
DGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDV
FRQVPS F SGWCNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFACKGS
PLY DS Y PNHFFEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D S

EKPT YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYG
DYTGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGS
KTNVINDL FASKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLK
QAVGDIYNYRRFE RQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKDS
DDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS
IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN
配列番号２２：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ４６
SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF IT PS FKAGYYDHVAE
DGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDV
FRQVPRF PGWCNTKATTVSTSNNLTYDKWTYFACKGS P
LY DQY PNHT FEDVKTLAI DAKDI SALKTT I D SE
KPT YL I IRGLS GNGS QLNELQL PESVKKVSLYGD
YTGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSK
TNVINDL FVSKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQ
AVGDIYNYRRFE RQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKDSD
DDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS
IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN
配列番号２３：野生型Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ
MKLNFKIKDKKTLKRLKKGGFWALGLFGAAINAFSAVL I
VNEVLRLQSGETL IASGRSGNLS FQLYSKVNQNAKSKL
NS I S LT DGGYRSEI DLGDGSNFREDFRNFANNL S
EAT T DAPKDLLRP VPKVEVS GL I KT S S T FIT
PNFKAGYYDQVAADGKTLKYYQST EY FNNRVVMP ILQ
TTNGTLT ANNRAYDDI FVDQGVPKFPGWFHDVDKAYYA
GS NGQS EYL FKEWNYYVANGS PLYNVYPNHH FKQI
KTIAFDAPRIKQGNIDGINLNLKQRNPDYVIINGLIGDGS
TLKDLELPESVKKVS I YG DYHS INVAKQIFKNVLEL
EFYSTNQDNNFGFNPLVLGDHTNI I YDL FASKP FNY
I DLT SLEL KDNQDNI DAS KLKRAVS DI Y IRRRF
ERQMQGYWAGGY I DRYLVKNTNE KNVNKDNDTVYAAL
KDINLHLEET YTHGGNTMYRVNENYY PGASAYEAERAT
RDSE FQKEIVQRAEL IGVVFEYGV KNLRPGLKYTVKF
ES PQEQVALKSTDKFQPVIGSVTDMSKSVIDLIGVLRDN
AEILNITNVS KDETVVAELKEKL DRENVFQE I RT
配列番号２４：野生型Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ断片
S I SLT DGGYRSEI DLGDGSNFREDFRNFANNLS EA
IT DAPKDLLRPVPKVEVS GL IKT S ST F IT PNFK
AGYYDQVAADGKILKYYQSTEYFNNRVVMPILQTTNGTLT
ANNRAYDDIFVDQGVP KFPGWFHDVDKAYYAGSNGQSEY
L FKEWNYYVANGS PLYNVYPNHHFKQIKT IAFDAPRI
KQ GNT DGINLNLKQRNPDYVI INGLTGDGSTLKDLEL
PESVKKVS I YGDYHS INVAKQI FKNVL ELEFYSTN
QDNNFGFNPLVLGDHTNI I YDL FAS KP FNY I DLT
SLELKDNQDNIDASKLKRAV S DI Y I RRRFERQMQG
YWAGGY I DRYLVKNTNEKNVNKDNDTVYAALKDINLHL
EETYTHGGN TMYRVNENYY PGASAYEAE RAT RD S E
FQKE IVQRAEL I GVVFE
配列番号２５：細菌及びヒト発現の両方のためにコドン最適化されたＭ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍをコードするポリヌクレオチド

ＡＴＧＧＧＣＡＧＣ ＡＧＣ ＣＡＴＣＡＣ ＣＡＴＣＡＴＣＡＴＣＡＣＡＧＣ ＡＧＣ
ＧＧＴＣ ＴＧＧＴＧＣ Ｃ ＧＣ ＧＴＧＧＴ ＡＧＣＣＡＣＡＴＧＡＧＣＣＴＧＡＧ
ＣＣＴＧＡＡＣＧＡＴＧＧＴＡＧＣＴＡＣＣＡＧＡＧＣＧＡＧＡＴＣＧＡＣＣＴＧ ＡＧ
ＣＧＧＣＧＧＴＧＣＣＡＡＣＴＴＣＣＧＴＧＡＡＡＡＡＴＴＣＣＧＣＡＡＣＴＴＴＧＣＴ
ＡＡＣＧＡＧＣＴＧＡＧＣ ＧＡＡＧＣ ＣＡＴＴＡＣ ＣＡＡＴＡＧＣ Ｃ ＣＡＡＡ
ＧＧＧＣ Ｃ ＴＧＧＡＴＣ ＧＴＣ Ｃ ＡＧＴＧＣ Ｃ ＧＡＡＡＡＣ Ｃ ＧＡＧ
ＡＴＣＡＧＣ ＧＧＣ Ｃ ＴＧＡＴＴＡＡＧＡＣ Ｃ ＧＧＴＧＡＣＡＡＣＴＴＴＡＴ
Ｃ ＡＣ Ｃ Ｃ Ｃ ＧＡＧＣＴＴＣＡＡＧＧＣ ＧＧ ＧＣ ＴＡＣＴＡＴＧＡＴＣ
ＡＣ ＧＴＧＧＣ ＴＧＡＧＧＡＣ ＧＧＴＡＧＣ Ｃ ＴＧＣ ＴＧＡＧＣＴＡＣＴＡ
ＴＣＡＧＡＧＣＡＣ Ｃ ＧＡＧＴＡＣ ＴＴＴＡＡＣＡＡＣ Ｃ ＧＴＧＴＧＣＴＧＡ
ＴＧＣ Ｃ ＧＡＴＴＣＴＧＣ ＡＧＡＣ Ｃ ＡＣ Ｃ ＡＡＣ ＧＧＣＡＣ Ｃ ＣＴ
ＧＡＴＧＧＣ ＣＡＡＣＡＡＣ Ｃ ＧＴＧＧＴＴＡＴＧＡＣ ＧＡＣ ＧＴＧＴＴＣ Ｃ
ＧＴＣＡＧＧＴＧＣ Ｃ ＧＣ ＧＴＴＴＣ Ｃ Ｃ ＧＧＧＣＴＧＧＡＧＣＡＡＣ ＡＣ
ＣＡＡＡＧＣ ＧＡＣ ＣＡＣ Ｃ ＧＴＧＡＧＣＡＣ Ｃ ＡＧＣ ＡＡＣＡＡＣ ＣＴ
ＧＡＣ ＣＴ ＡＣ ＧＡＣＡＡＧＴＧＧＡＣ ＣＴＡＴＴＴＣ ＧＣ Ｃ ＧＣ ＧＡＡ
ＡＧＧＴＡＧＣ Ｃ Ｃ ＧＣＴＧＴＡＣ ＧＡＴＣＡＧＴＡＴＣ Ｃ ＧＡＡＣＣＡＣ
ＡＣＣＴＴＴＧＡＧＧＡＣＧＴＧＡＡＡＡＣＣＣＴＧＧＣＴＡＴＣＧＡＴＧＣＣＡＡＧＧ
ＡＣＡＴＴＡＧ Ｃ ＧＣ ＧＣＴＧＡＡＡＡＣ Ｃ ＡＣ Ｃ ＡＴＣ ＧＡＴＡＧＣ
ＧＡＡＡＡＧＣ Ｃ ＧＡＣ ＣＴＡＣ Ｃ ＴＧＡＴＣＡＴＴＣ ＧＣ ＧＧ ＴＣＴＧ
ＡＧＣＧＧＣＡＡＣＧＧＴＡＧＣＣＡＧＣＴＧＡＡＣＧＡＧＣＴＧＣＡＧＣＴＧＣＣＧＧ
ＡＡＡＧＣＧＴＧＡＡ ＧＡＡＡＧＴＧＡＧＣＣＴＧＴＡＣＧＧＣＧＡＣＴＡＴＡＣＣＧ
ＧＴＧＴＧＡＡＣＧＴＧＧＣＣＡＡＡＣＡＧＡＴＴＴＴ ＴＧＣＧＡＡＣＧＴＧＧＴＧＧ
ＡＧＣＴＧＧＡＡＴＴＣＴＡＴＡＧＣＡＣＣＡＧＣＡＡＧＧＣＧＡＡＣＡＧＣＴＴＣＧＧ
ＣＴＴＴＡＡＣＣＣＧＣＴＧＧＴＧＣＴＧＧＧＴＡＧＣＡＡＡＡＣＣＡＡＣＧＴＧＡＴＣ
ＡＡＣＧＡＣＣＴＧＴＴＣＧＴＧ ＡＧＣ ＡＡＧＣ Ｃ ＧＴＴＣＡＣ Ｃ ＣＡＣＡ
ＴＴＧＡＣ ＣＴＧＡＣ Ｃ ＣＡＧＧＴＧＡＣ Ｃ ＣＴＧＣＡＧＡＡＣＡＧＣ ＧＡＴ
ＡＡＣ ＡＧＣ ＧＣ ＧＡＴＣ ＧＡＣ ＧＣＴＡＡＣＡＡＧＣＴＧＡＡＡＣＡＧＧＣ
ＴＧＴＧＧＧＣ ＧＡＴＡＴＣＴＡＣＡＡＣ ＴＡＴＣ ＧＴＣ ＧＣＴＴＣ ＧＡＧＣ
ＧＴＣＡＧＴＴＴＣＡＧＧＧＴＴＡＣ ＴＴＣ ＧＣ Ｃ ＧＧＣ ＧＧＴＴＡＣＡＴＣ
ＧＡＴＡ ＡＧＴＡＴＣＴＧＧＴＧＡＡＡＡＡＣ ＧＴＧＡＡＣ ＡＣ ＣＡＡＣＡＡＡ
ＧＡＣＡＧＣ ＧＡＣ ＧＡＴＧＡＣ ＣＴＧＧＴＧＴ ＡＣ Ｃ ＧＣＡＧＣ ＣＴＧＡ
ＡＧＧＡＡＣＴＧＡＡＣ ＣＴＧＣ ＡＣ Ｃ ＴＧＧＡＧＧＡＡＧＣ ＴＴＡＴＣ Ｇ
ＴＧＡＧＧＧＣ Ｇ ＡＣ ＡＡＣＡＣ ＣＴＡＣＴＡＴＣ ＧＣ ＧＴＧＡＡＣ ＧＡＡ
ＡＡＣＴＡＣＴＡＴＣ Ｃ ＧＧＧＴＧＣ Ｃ ＡＧＣＡＴＣＴＡＣ Ｇ ＡＧＡＡＣ Ｇ
ＡＡＣ ＧＴＧＣ ＧＡＧＣ Ｃ ＧＣ ＧＡＴＡＧＣ ＧＡＧＴＴＴＣＡＧＡＡＣ ＧＡ
ＡＡＴＴＣＴＧＡＡＧＣ ＧＴＧ ＣＧＧＡＧＣＡＧＡＡＣＧＧＣＧＴＧＡＣＣＴＴＣＧ
ＡＣＧＡＡＡＡＣＴＡＡＴＡＡ

配列番号２６：ヒト発現のためにコドン最適化されたＭ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍをコードするポリヌクレオチド

ＡＴＧＡＧＣＣＴＧＡＧＣＣＴＧＡＡＣＧＡＴＧＧＣＡＧＣＴＡＣＣＡＧＡＧＣＧＡＧＡ
ＴＣＧＡＣＣＴＧＴＣＴＧＧＣ ＧＧＡＧＣＣＡＡＣＴＴＣＡＧＡＧＡＧＡＡＧＴＴＣＡ
ＧＡＡＡＣＴＴＣＧＣＣＡＡＣＧＡＧＣＴＧＡＧＣＧＡＧＧＣＣ ＡＴＣＡＣＡＡＡＣＡ
ＧＣＣＣＣＡＡＡＧＧＣＣＴＧＧＡＣＡＧＡＣＣＣＧＴＧＣＣＴＡＡＧＡＣＡＧＡＧＡＴ
ＣＡＧＣ ＧＧＣＣＴＧＡＴＣＡＡＧＡＣＣＧＧＣＧＡＣＡＡＣＴＴＣＡＴＣＡＣＣＣＣ
ＴＡＧＣＴＴＣＡＡＧＧＣＣＧＧＣＴＡＣＴ ＡＣＧＡＴＣＡＣＧＴＧＧＣＣＴＣＴＧＡ
ＴＧＧＣＡＧＣＣＴＧＣＴＧＡＧＣＴＡＣＴＡＣＣＡＧＴＣＣＡＣＣＧＡＧＴＡ ＣＴＴ
ＣＡＡＣＡＡＣＣＧＧＧＴＧＣＴＧＡＴＧＣＣＣＡＴＣＣＴＣＣＡＧＡＣＣＡＣＣＡＡＴ
ＧＧＣＡＣＣＣＴＧＡＴＧ ＧＣＣＡＡＣＡＡＣＡＧＡＧＧＣＴＡＣＧＡＣＧＡＣＧＴＧ
ＴＴＣＡＧＡＣＡＧＧＴＧＣＣＣＡＧＣＴＴＴＡＧＣＧＧＣ ＴＧＧＴＣＣＡＡＴＡＣＣ
ＡＡＧＧＣＣＡＣＣＡＣＣＧＴＧＴＣＣＡＣＣＡＧＣＡＡＣＡＡＣＣＴＧＡＣＣＴＡＣＧ

ＡＣ ＡＡＧＴＧＧＡＣＣＴＡＣＴＴＣＧＣＣＧＣＣＡＡＧＧＧＣＡＧＣＣＣＴＣＴＧＴ
ＡＣＧＡＣＡＧＣＴＡＣＣＣＣＡＡＣ ＣＡＣＴＴＣＴＴＣＧＡＧＧＡＣＧＴＧＡＡＡＡ
ＣＣＣＴＧＧＣＣＡＴＣＧＡＣＧＣＣＡＡＧＧＡＴＡＴＣＡＧＣＧＣＣ ＣＴＧＡＡＡＡ
ＣＣＡＣＣＡＴＣＧＡＣＡＧＣＧＡＧＡＡＧＣＣＣＡＣＣＴＡＣＣＴＧＡＴＣＡＴＣＡＧ
ＡＧＧＡＣＴＧ ＡＧＣＧＧＣＡＡＣＧＧＣＡＧＣＣＡＧＣＴＧＡＡＴＧＡＡＣＴＣＣＡ
ＧＣＴＧＣＣＴＧＡＧＡＧＣＧＴＧＡＡＧＡＡＧ ＧＴＧＴＣＣＣＴＧＴＡＣＧＧＣＧＡ
ＴＴＡＣＡＣＣＧＧＣＧＴＧＡＡＣＧＴＧＧＣＣＡＡＧＣＡＧＡＴＣＴＴＣＧＣＣＡ Ａ
ＴＧＴＧＧＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＴＣＴＡＣＡＧＣＡＣＣＡＧＣＡＡＧＧＣＣＡＡＣ
ＡＧＣＴＴＣＧＧＣＴＴＣＡ ＡＣＣＣＴＣＴＧＧＴＧＣＴＧＧＧＣＡＧＣＡＡＧＡＣＣ
ＡＡＣＧＴＧＡＴＣＡＡＣＧＡＣＣＴＧＴＴＣＧＣＣＡＧＣＡ ＡＧＣＣＣＴＴＣＡＣＡ
ＣＡＣＡＴＣＧＡＴＣＴＧＡＣＣＣＡＡＧＴＧＡＣＣＣＴＣＣＡＧＡＡＣＡＧＣＧＡＣＡ
ＡＣＡ ＧＣ ＧＣＣＡＴＴＧＡＴＧＣＣＡＡＣＡＡＧＣＴＧＡＡＡＣＡＧＧＣＣＧＴＧ
ＧＧＣＧＡＣＡＴＣＴＡＣＡＡＣＴＡＣＡ ＧＡＡＧＡＴＴＣＧＡＧＣＧＧＣＡＧＴＴＣ
ＣＡＧＧＧＣＴＡＣＴＴＣＧＣＴＧＧＣＧＧＣＴＡＣＡＴＣＧＡＣＡＡＧＴ ＡＣＣＴＧ
ＧＴＣＡＡＧＡＡＣＧＴＧＡＡＣＡＣＣＡＡＣＡＡＧＧＡＣＡＧＣＧＡＣＧＡＣＧＡＣＣ
ＴＧＧＴＧＴＡＣＡ ＧＡＡＧＣＣＴＧＡＡＡＧＡＧＣＴＧＡＡＣＣＴＧＣＡＣＣＴＧＧ
ＡＡＧＡＧＧＣＣＴＡＣＡＧＡＧＡＧＧＧＣＧＡＣ ＡＡＣＡＣＣＴＡＣＴＡＣＡＧＡＧ
ＴＧＡＡＣＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＡＣＣＣＡＧＧＣＧＣＣＡＧＣＡＴＣＴＡＣＧＡＧ Ａ
ＡＣＧＡＧＡＧＡＧＣＣＡＧＣＡＧＡＧＡＣＡＧＣＧＡＧＴＴＣＣＡＧＡＡＣＧＡＧＡＴ
ＣＣＴＧＡＡＧＣＧＧＧＣ ＣＧＡＧＣＡＧＡＡＴＧＧＣＧＴＧＡＣＣＴＴＣＧＡＣＧＡ
ＧＡＡＣＴＧＡＴＧＡ

配列番号２７：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ４７

ＳＬＳＬＮＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰ
ＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧ ＤＮＦＩＴＰ Ｓ ＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＥ
Ｄ ＧＳ ＬＬ ＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬＭＡＮＮＲＧＹ
Ｄ ＤＶＦＲＱＶＰＲＦＰＧＷＳＮＴＫＡＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧ
ＳＰＬＹＤＱＹＰＮＨＴＦＥＤＶＫＴＬ ＡＩＤＡＫＤＩＳＡＬＫＴＴＩＤＳＥＫＰＴＹ
ＬＩＩＲＧＬＳＧＮＧＳＱＬＮＥＬＱＬＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧＤＹＴＧＶＮＶＡ ＫＱ
ＩＦＡＮＶＶＥＬＥＦＹ Ｓ Ｔ Ｓ ＫＡＮ Ｓ Ｆ ＧＦＮＰＬＶＬ ＧＳ ＫＴＮＶ
ＩＮＤＬＦＶ Ｓ ＫＰＦＴＨＩＤＬＴＱＶＴＬＱＮ Ｓ Ｄ ＮＳ ＡＩＤＡＮＫＬＫ
ＱＡＶ ＧＤＩＹＮＹＲＲＦＥＲＱＦ ＱＧＹＥＡＧＧＹＩＤＫＹＬＶＫＮＶＮＴＮＫＤ
ＳＤＤＤＬＶＹ ＲＳＬＫＥＬＮＬＨＬＥＥＡＹＲＥＧＤＮＴＹＹＲＶＮＥＮＹＫＰＧＡ
ＳＩＹＥＮＥＲＡＳＲＤＳＥＦＱＮＥＩＬＫＲＡＥＱＮ ＧＶＴＦＤＥＮ

配列番号２８：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ４８

ＳＬＳＬＮＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰ
ＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧ ＤＮＦＩＴＰ Ｓ ＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＥ
Ｄ ＧＳ ＬＬ ＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬＭＡＮＮＲＧＹ
Ｄ ＤＶＦＲＱＶＰＲＦＰＧＷＣＮＴＫＰＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＣＫＧ
ＳＰＬＹＤＱＹＰＮＨＴＦＥＤＶＫＴＬ ＡＩＤＡＫＤＩＳＡＬＫＴＴＩＤＳＥＫＰＴＹ
ＬＩＩＲＧＬＳＧＤＧＳＱＬＮＥＬＱＬＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧＤＹＴＧＶＮＶＡ ＫＱ
ＩＦＡＮＶＶＥＬＥＦＹＳＴＳＫＡＮＳＦＧＦＮＰＬＶＬＧＳＫＴＮＶＩＮＤＬＦＶＳＫ
ＰＦＴＨＩＤＬＴＱＶＰＬＱＮＳＤ ＮＳ ＡＩＤＡＮＫＬＫＱＡＶ ＧＤＩＹＮＹＲＲ
ＦＥＲＱＦ ＱＧＹＦＡＧＧＹＩＤＫＹＬＶＫＮＶＮＴＮＫＤＳＤＤＤＬＶＹ ＲＳＬＫ
ＥＬＮＬＨＬＥＥＡＹＲＥＧＤＮＴＹＹＲＶＮＥＮＹＹＰＧＡＳＩＹＥＮＥＲＡＳＲＤＳ
ＥＦＱＮＥＩＬＫＲＡＥＱＮ ＧＶＴＦＤＥＮ

配列番号２９：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ４９

ＳＬＳＬＮＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰ
ＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧ ＤＮＦＩＴＰＳＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＥＤＧ
ＳＬＬＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬＭＡＮＮＲＧＹＤ ＤＶＦ
ＲＱＶＰＲＦＰＧＷＳＮＴＫＡＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧＳＰＬＹＤ

QYPNHTFEDVKTL AIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRG
LSGNGSQLNELQLPESVKKVSLYGDYTGVNVA KQIFANV
VELEFYSTSKANSFGFNPLVLGSKTNVINDLFVSKPFTHI
DLTQVTLQNSD NSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQG
YFPGGYIDKYLVKNVNTNKDSDDDLVYR SLKELNLHLEE
AYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILK
RAEQNG VTFDEN
配列番号３０：修飾Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅタンパク質Ｍ ＭＰ２９
S I S LTD GGYRS EIDL GD GSNFREDF RNFANNL
SEAITDAPKDLLRPVPKVEVSGLIKTS STFITPNFKAGY
YDQVAEDGKTLKYYQSTEYFNNRVVMPILQTTNGTLTANN
RAYD DIFVDQGVPRFPGWFHDVDKAYYAGSNGQSEYLFK
EWNYYVANGSPLYNQYPNHT FKQIKTIAFDAP RIKQ G
NTD GINLNLKQRNPDYVIINGLTGD GS TLKDLELPES
VKKV S IYGDYHSINVAKQIFKNVLELEFYSTNQDNNFG
FNPLVLGDHTNIIYDLFVSKPFNYID LT S LELKDNQD
NIDAS KLKRAV S DIYIRRRFERQMQ GYWAGGYIDRY
LVKNTNEKN VNKDNDTVYAALKDINLHLEETYTHGGNTM
YRVNENYYP GAS AYEAERATRD S EF QKEIVQR
配列番号３１：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ６４（分泌ペプチド＋ＩｇＧ１からのＦｃ＋１５ｘＧＳリンカー＋ＭＧ２９ｄＧｌｙ１）：
MYRMQLL SCIAL SLALVTNSAPLEPKS SDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL YITREPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNVVYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI S KAKGQPR
EP QVYTLPP S REEMTKNQV S LTCLVKGFYP S DIA
VEWE SNGQPENNYKTTPPVLD S D GS FFLY S KLTV
DKS RWQ Q G NVFS CSVMHEALKFHYTQKSL SL SP
GAGGGS GGGS GGGS GGGMSL SLNDGSYQSEI DL S
GGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLI
KTGDNFITPSFKAGYY DHVAED GS LL SYYQ S TEY
FNNRVLMPIL QTTD GTLMANNRGYDDVFRQVPRFP GW
S NTKATTVSTSNNLYYDKWTYFAAKGSPLYDQYPNHTFE
DVKTLAIDAKDISALKTTI D S EKP TYLIIRGL S GD
GS QLNEL QLP ES VKKV S LYGDYTGVNVAKQIFAN
VVELEFY S TS KAN S F GFNPLVL GS KTNVINDLF
V S KPFTHIDLTQVTL QN S DN S AIDANKLKQAV G
DIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKDSDDDLV
YRSLKELNLHLEEAYR EGDNTYYRVNENYYP GAS IYE
NERAS RD S EF QNEILKRAEQNGVTFDEN＊ ＊
配列番号３２：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ８８（分泌ペプチド＋ＩｇＧ２からのＦｃ＋１５ｘＧＳリンカー＋ＭＧ２９ｄＧｌｙ１）：
MYRMQLL SCIAL SLALVTNSAPLERKS SVECPPCPAP
PAAAS SVFLFPPKPKDTLMI SR TPEVTCVVVDVSAED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLH
Q DWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKTKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYP S DIAVEWE SN
GQPENNYKTTPPMLD S D GS FF LY S KLTVDKS RW
Q Q GNVF S CSVMHEALHNHYTQKSL SL SP GAGGGS
GGGS GGGSGGGMSL SLND GSYQ SEIDL S G GANFR

ＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧＤＮＦ
ＩＴＰＳＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡ ＥＤ ＧＳ ＬＬ ＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰ
ＩＬＱＴＴＤＧＴＬＭＡＮＮＲＧＹＤＤＶＦＲＱＶＰＲＦＰ ＧＷＳＮＴＫＡ ＴＴＶＳ
ＴＳＮＮＬＹＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧＳＰＬＹＤＱＹＰＮＨＴＦＥＤＶＫＴＬＡＩＤＡＫ
ＤＩＳＡＬＫＴＴＩＤＳＥＫ ＰＴＹＬＩＩＲＧＬＳＧＤＧＳＱＬＮＥＬＱＬＰＥＳＶＫ
ＫＶＳＬＹＧＤＹＴＧＶＮＶＡＫＱＩＦＡＮＶＶＥＬＥＦＹＳＴＳＫＡ ＮＳＦＧＦＮＰ
ＬＶＬＧＳＫＴＮＶＩＮＤＬＦＶＳＫＰＦＴＨＩＤＬＴＱＶＴＬＱＮＳＤＮＳＡＩＤＡＮ
ＫＬＫＱＡＶＧＤＩＹＮ ＹＲＲＦＥＲＱＦＱＧＹＦＡＧＧＹＩＤＫＹＬＶＫＮＶＮＴＮ
ＫＤＳＤＤＤＬＶＹＲＳＬＫＥＬＮＬＨＬＥＥＡＹＲＥＧＤＮ ＴＹＹＲＶＮＥＮＹＹＰ
ＧＡＳＩＹＥＮＥＲＡＳＲＤＳＥＦＱＮＥＩＬＫＲＡＥＱＮＧＶＴＦＤＥＮ＊ ＊

配列番号３３：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ１１８（プロテインＡ（Ｚ－ドメイン）＋１０ｘＧＳリンカー＋ＭＧ２９）：

ＭＫＦＮＫＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＦＩＱ ＳＬＫＤＤＰＳＱＳ
ＡＮＬＬＡＥＡＫＫＬＮＤＡＱＡＰＧ ＧＳ ＧＧＳＧＧＳＧＳＬ ＳＬＮＤＧＳＹＱ
ＳＥＩＤＬ ＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬ ＳＥＡＩＴＮＳＰＫＧＬＤＲＰＶＰ
Ｋ ＴＥＩ Ｓ ＧＬＩＫＴＧＤＮＦＩＴＰ Ｓ ＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＥＤ ＧＳ ＬＬ
ＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬ ＭＡＮＮＲＧＹＤＤＶＦＲＱＶ
ＰＲＦＰＧＷＳＮＴＫＡＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧＳＰＬＹＤＱＹＰ
Ｎ ＨＴＦＥＤＶＫＴＬＡＩＤＡＫＤＩＳＡＬＫＴＴＩＤＳＥＫＰＴＹＬＩＩＲＧＬ Ｓ
ＧＮＧＳＱＬＮＥＬＱＬＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧ ＤＹＴＧＶＮＶＡＫＱＩＦＡＮＶＶＥ
ＬＥＦＹ Ｓ ＴＳ ＫＡＮＳ Ｆ ＧＦＮＰＬＶＬ ＧＳ ＫＴＮＶＩＮＤＬＦＶ Ｓ
ＫＰ ＦＴＨＩＤＬＴ ＱＶＴＬＱＮＳＤＮＳＡＩＤＡＮＫＬＫＱＡＶＧＤＩＹＮＹＲＲ
ＦＥＲＱＦＱＧＹＦＡＧＧＹＩＤＫＹＬＶＫＮＶＮＴＮＫＤ ＳＤＤＤＬＶＹＲＳＬＫＥ
ＬＮＬＨＬＥＥＡＹＲＥＧＤＮＴＹＹＲＶＮＥＮＹＹＰＧＡＳＩＹＥＮＥＲＡＳＲＤＳＥ
ＦＱＮＥＩ ＬＫＲＡＥＱＮＧＶＴＦＤＥＮ＊

配列番号３４：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ６６（以下の変異を有する：Ｓ１５０Ｅ、Ｓ１９６Ｒ、Ｓ１９８Ｐ、Ｆ２３７Ｔ、Ｓ２３２Ｑ、Ａ３４２Ｖ、Ｎ２７４Ｄ、Ａ２０５Ｐ、及びＴ３５５Ｐ）：

ＳＬＳＬＮＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰ
ＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧ ＤＮＦＩＴＰＳＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＥＤＧ
ＳＬＬＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬＭＡＮＮＲＧＹＤ ＤＶＦ
ＲＱＶＰＲＦＰＧＷＳＮＴＫＰＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧＳＰＬＹＤ
ＱＹＰＮＨＴＦＥＤＶＫＴＬ ＡＩＤＡＫＤＩＳＡＬＫＴＴＩＤＳＥＫＰＴＹＬＩＩＲＧ
ＬＳＧＤＧＳＱＬＮＥＬＱＬＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧＤＹＴＧＶＮＶＡ ＫＱＩＦＡＮＶ
ＶＥＬＥＦＹＳＴＳＫＡＮＳＦＧＦＮＰＬＶＬＧＳＫＴＮＶＩＮＤＬＦＶＳＫＰＦＴＨＩ
ＤＬＴＱＶＰＬＱＮＳＤ ＮＳ ＡＩＤＡＮＫＬ ＫＱ ＡＶ ＧＤＩＹＮＹＲＲＦ Ｅ
ＲＱＦ ＱＧＹＦＡＧＧＹＩＤＫＹＬＶＫＮＶＮＴＮＫＤＳＤＤＤＬＶＹ ＲＳＬＫＥＬ
ＮＬＨＬＥＥＡＹＲＥＧＤＮＴＹＹＲＶＮＥＮＹＹＰＧＡＳＩＹＥＮＥＲＡＳＲＤＳＥＦ
ＱＮＥＩＬＫＲＡＥＱＮ ＧＶＴＦＤＥＮ＊

配列番号３５：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ ＭＧ７１（プロテインＬＢ１ドメイン＋５ｘＧＳリンカー＋ＳＬＳＬＮＤのＮ末端欠失を有するＭＧ２９）：

ＭＥＥＶＴＩＫＡＮＬＩＬＰＧＣＣＴＱＴＡＥＦＫＧＴＦＥＫＡＴＳＥＡＹＡＹＡＤＴＬ
ＫＫＤＮＧＥＷＴＶＤＶＡＤＫＧＹ ＴＬＮＩＫＦＡＧＧＳ ＧＧＳ ＧＳＹＱ ＳＥＩ
ＤＬ ＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩ
ＳＧＬＩＫＴＧＤＮＦＩＴＰ Ｓ Ｆ ＫＡＧＹＹＤＨＶＡＥＤ ＧＳ ＬＬ ＳＹＹＱ
ＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴＬＭＡ ＮＮＲＧＹＤＤＶＦＲＱＶＰＲＦＰ
ＧＷＳＮＴＫＡＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫＷＴＹＦＡＡＫＧＳＰＬＹＤＱＹＰＮＨＴ
ＦＥＤＶＫＴＬＡＩＤＡＫＤＩＳＡＬＫＴＴＩＤ ＳＥＫＰＴＹＬＩＩＲＧＬ Ｓ ＧＮ
ＧＳ ＱＬＮＥＬＱＬＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧＤＹ ＴＧＶＮＶＡＫＱＩＦＡＮＶＶＥＬ
ＥＦＹＳＴＳＫＡＮＳＦＧＦＮＰＬＶＬＧＳＫＴＮＶＩＮＤＬＦＶＳＫＰＦＴＨＩＤＬＴ

ＱＶ　ＴＬＱＮＳＤＮＳＡＩＤＡＮＫＬＫＱＡＶＧＤＩＹＮＹＲＲＦＥＲＱＦ　ＱＧＹＦ
ＡＧＧＹＩＤＫＹＬＶＫＮＶＮＴＮＫＤＳＤ　ＤＤＬＶＹＲＳＬＫＥＬＮＬＨＬＥＥＡＹ
ＲＥＧＤＮＴＹＹＲＶＮＥＮＹＹＰＧＡＳＩＹＥＮＥＲＡＳＲＤＳＥＦＱＮＥＩＬＫ　Ｒ
ＡＥＱＮＧＶＴＦＤＥＮ＊

配列番号３６：修飾Ｍ．ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍタンパク質Ｍ　ＭＧ８６（ＧＣＮ４　ヘリックス＋１５ｘＧＳ＋ＭＧ６６を含む二量体）

ＧＧＣＧＧＭＫＱＬＥＤＫＩＥＥＬＬＳＫＩＹＨＬＥＮＥＩＡＲＬＫＫＬＩＧＥＧＧＧＳ
ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＭＳＬＳＬＮ　ＤＧＳＹＱＳＥＩＤＬＳＧＧＡＮＦＲＥＫＦＲＮ
ＦＡＮＥＬＳＥＡＩＴＮＳＰＫＧＬＤＲＰＶＰＫＴＥＩＳＧＬＩＫＴＧＤＮＦＩＴＰ　Ｓ
ＦＫＡＧＹＹＤＨＶＡＥＤＧＳＬＬＳＹＹＱＳＴＥＹＦＮＮＲＶＬＭＰＩＬＱＴＴＮＧＴ
ＬＭＡＮＮＲＧＹＤＤＶＦＲＱ　ＶＰＲＦＰＧＷＳＮＴＫＰＴＴＶＳＴＳＮＮＬＴＹＤＫ
ＷＴＹＦＡＡＫＧＳＰＬＹＤＱＹＰＮＨＴＦＥＤＶＫＴＬＡＩＤＡＫ　ＤＩＳＡＬＫＴＴ
ＩＤＳＥＫＰＴＹＬＩＩＲＧＬＳＧＤＧＳＱＬＮＥＬＱＬＰＥＳＶＫＫＶＳＬＹＧＤＹＴ
ＧＶＮＶＡＫＱＩＦＡＮ　ＶＶＥＬＥＦＹＳＴＳＫＡＮＳＦＧＦＮＰＬＶＬＧＳＫＴＮＶ
ＩＮＤＬＦＶＳＫＰＦＴＨＩＤＬＴＱＶＰＬＱＮＳＤＮＳＡＩＤＡ　ＮＫＬＫＱＡＶＧＤ
ＩＹＮＹＲＲＦＥＲＱＦＱＧＹＦＡＧＧＹＩＤＫＹＬＶＫＮＶＮＴＮＫＤＳＤＤＤＬＶＹ
ＲＳＬＫＥＬ　ＮＬＨＬＥＥＡＹＲＥＧＤＮＴＹＹＲＶＮＥＮＹＹＰＧＡＳＩＹＥＮＥＲ
ＡＳＲＤＳＥＦＱＮＥＩＬＫＲＡＥＱＮＧＶＴＦＤＥ　Ｎ＊

【図面】

【図１】

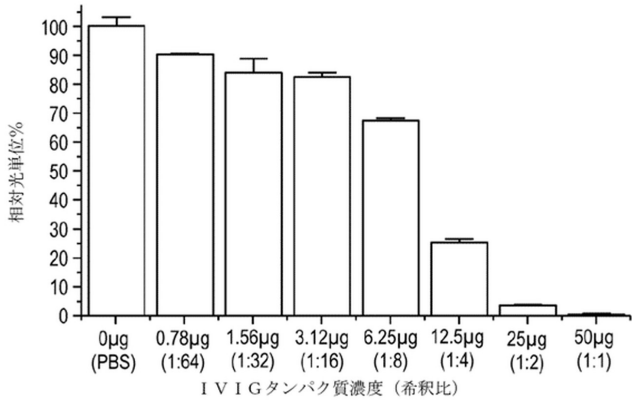


図１

【図２】

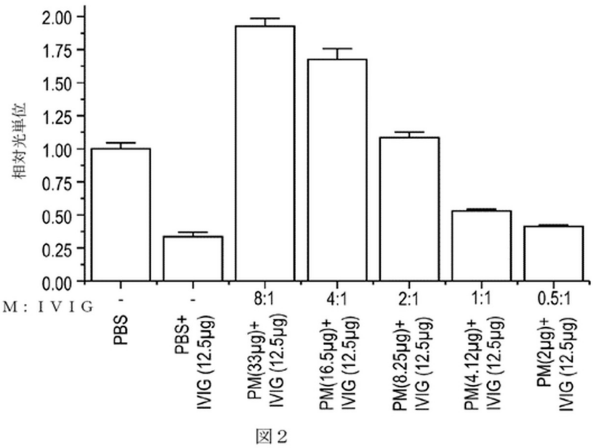


図２

【図３】

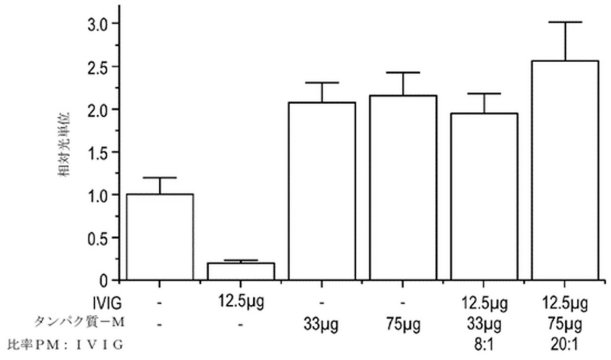


図３

【図４】

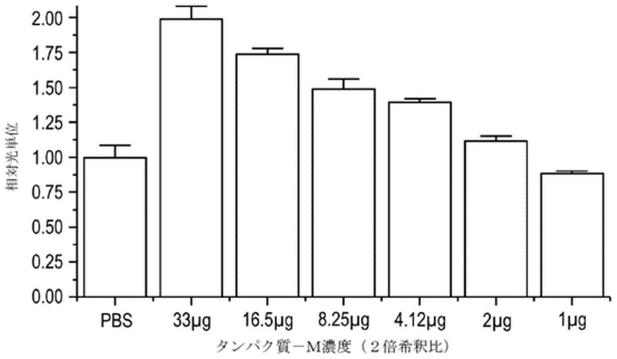


図４

【図５】

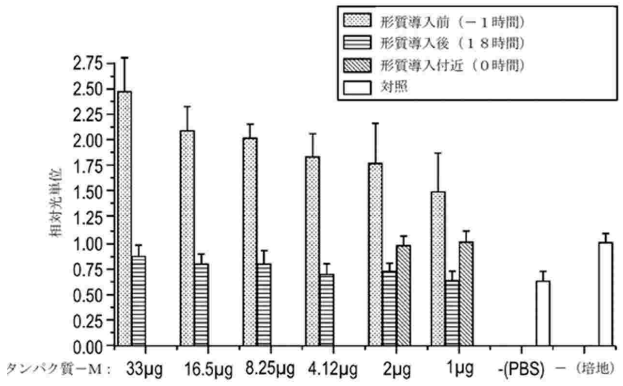


図５

【図６】

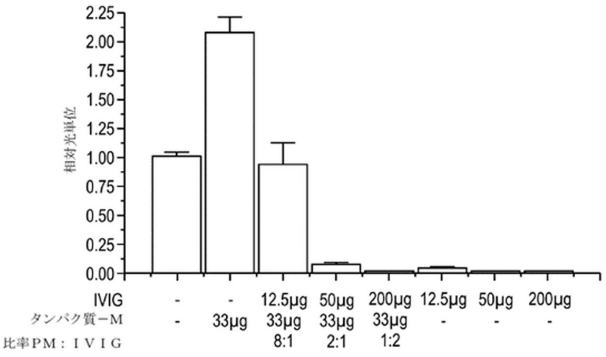


図６

【図７】

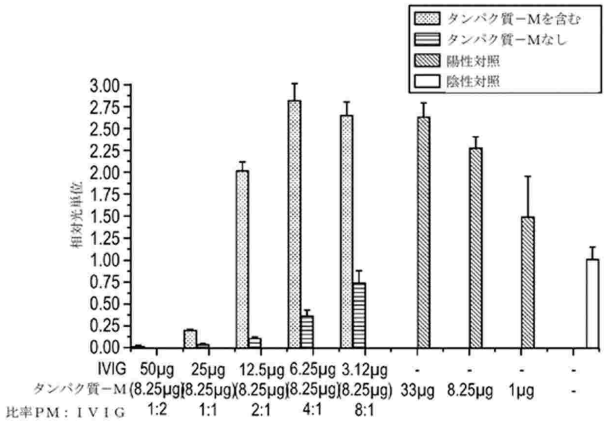


図７

【図８】

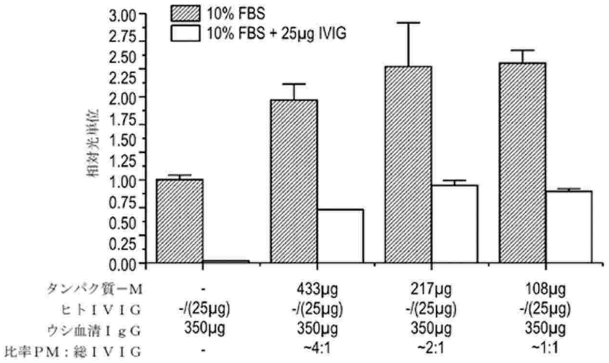


図８

【図９】

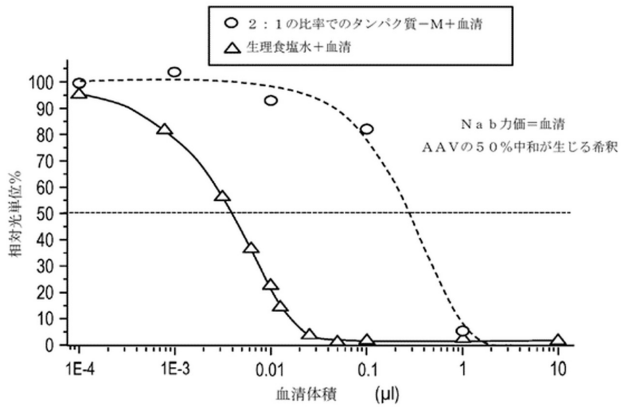


図９

【図１０】

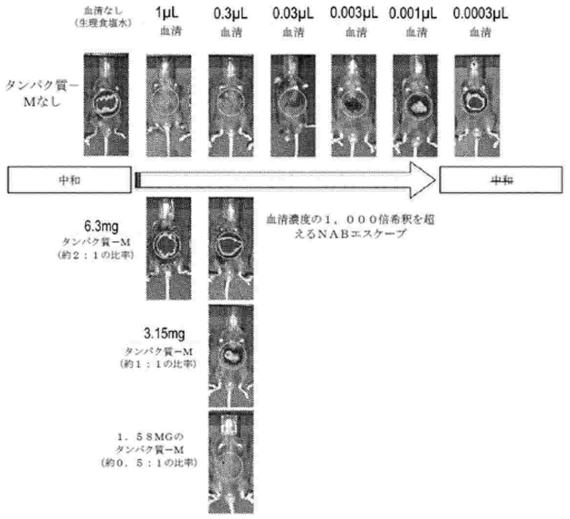


図１０

【図１１】

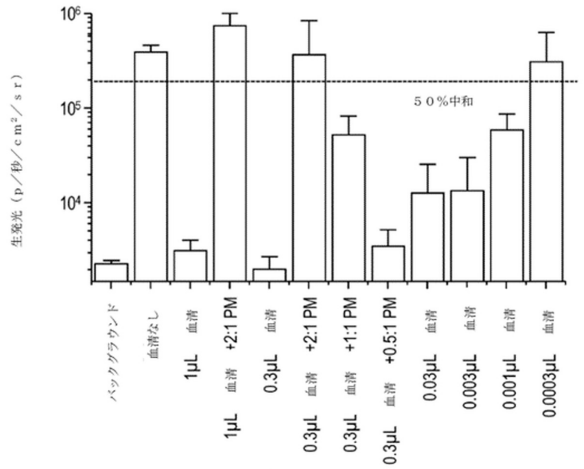


図１１

【図１２】

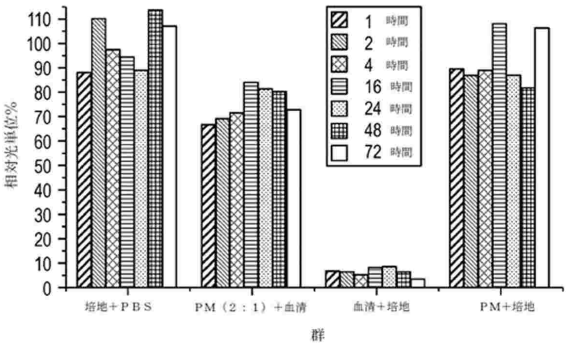


図１２

【図１３】

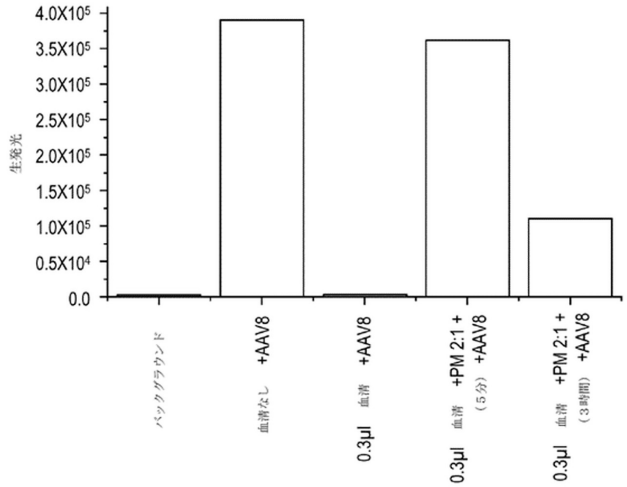


図１３

【図１４】

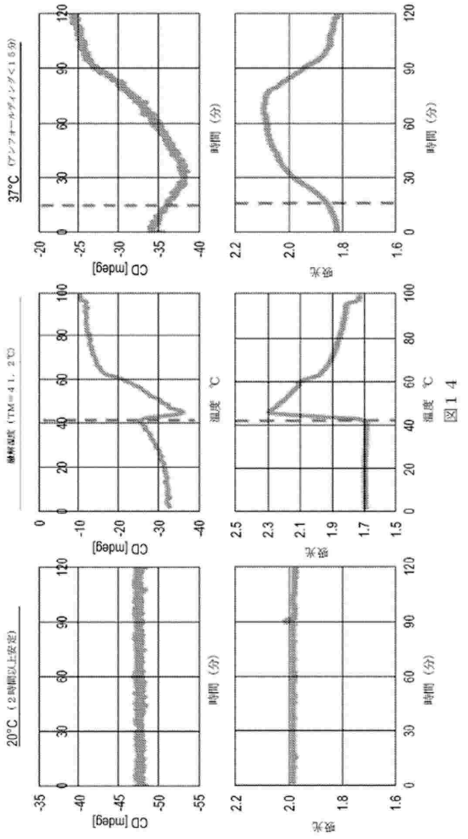


図１４

【図１５Ａ】

名称	Tm (°C)	変異の数	変異
MG WT	41.9	--	---
MG 1	43.6	1	F237T
MG 8	44.9	1	S232Q
MG 13	43	1	Q282D
MG 15	49.3	3	S150E, S196R, S198P
MG 21	44.7	6	V400I, N402I, K407P, S409V, L413I, T435I
MG 22	44.1	2	V373I, V400I
MG 23	43.2	4	N402L, K407P, S409V, L413I
MG 24	44.7	1	A342V
MG 27	58.3	14	MG 29+MG 31+MG 13
MG 28	43.9	1	N274D
MG 29	55.2	6	MG 15+MG 8+MG 1+MG 24
MG 31	45.2	7	MG21+V373I (FROM 22)
MG 33	44.2	1	A205P
MG 38	43.4	1	T355D
MG 40	43	1	T355P
MG 43	51.4	6	MG 15+MG 22+MG 24
MG 44	54.7	8	MG 22+MG 29
MG 45	43.1	2	S201C&A224C
MG 46	58.5	8	MG 29+MG 45
MG 47	56.9	8	MG 29+F390E+Y444K
MG 48	64.9	11	MG 46+MG 28+MG 33+MG 40
MG 49	55.8	7	MG 29+A391P
MPWT	44.1	--	---
MP29	45.6	5	A77E, K125R, H170T, V165Q, A280V

図１５Ａ

【図１５Ｂ】

名称	Tm (°C)	変異の数	変異
MG 2	42.1	1	R468Q
MG 4	42.7	1	S150E
MG 5	41.0	1	H147F
MG 10	41.5	1	S272G
MG 12	42.1	1	T355G
MG 17	41.6	3	S276E, Q277L, N279R
MG 18	42.3	1	N300Q
MG 20	41.0	1	N378Y
MG 32	42.3	1	S156K
MG 34	42.5	1	S232L
MG 35	41.0	1	A245Q
MG 36	41.7	1	S267D
MG 41	42.6	1	K225P
MG 42	41.2	1	V310E

図１５Ｂ

【図１６】

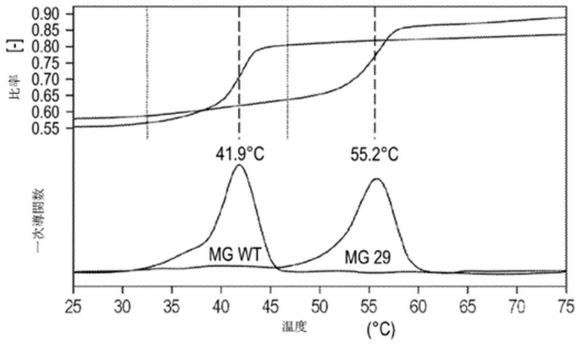


図１６

【図１７Ａ】

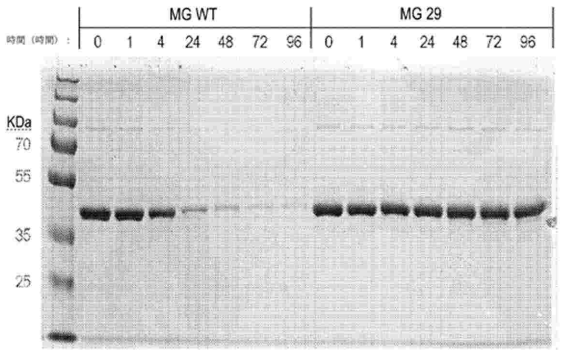


図１７Ａ

【図１７Ｂ】

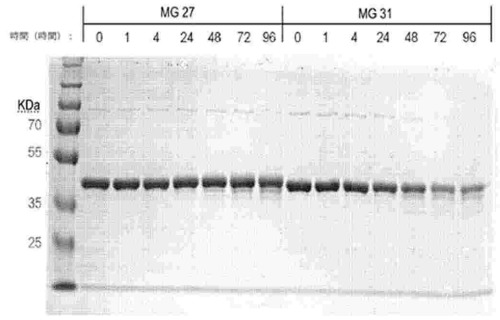


図１７Ｂ

【図１７Ｃ】

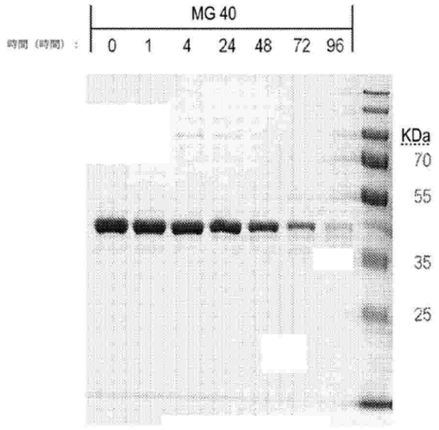


図１７Ｃ

【図１８Ａ】

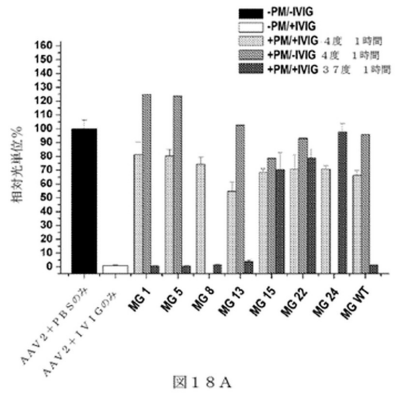


図１８Ａ

【図１８Ｂ】

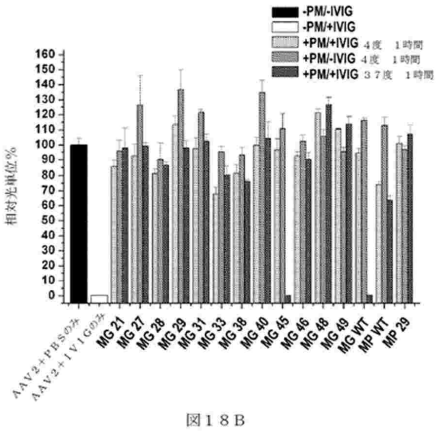


図１８Ｂ

【図１８Ｃ】

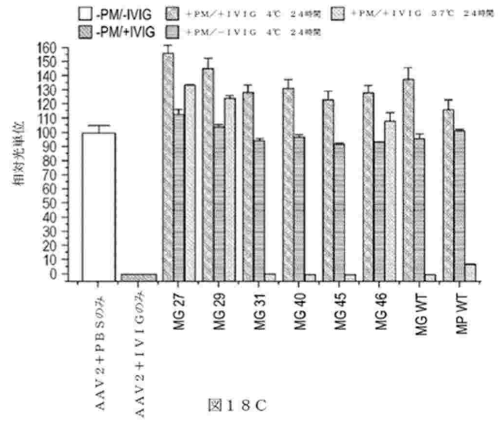


図１８Ｃ

【図１９】

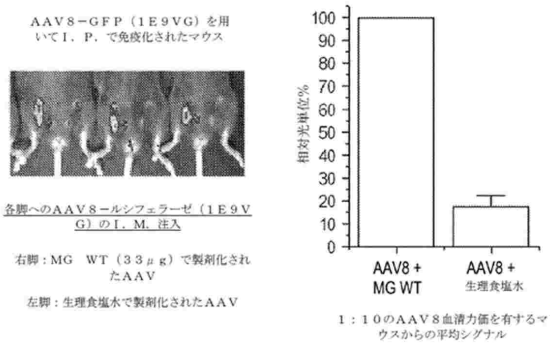


図１９

【図２０】

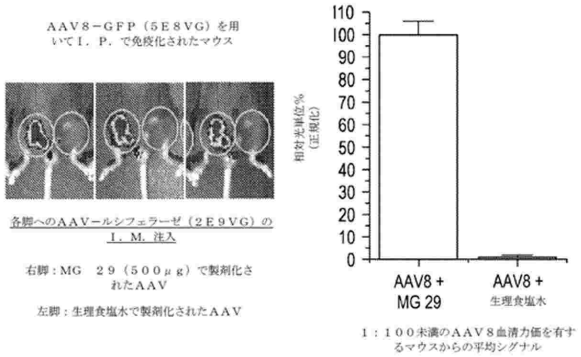


図２０

【図２１】

名称	K_D (nM)	K_D誤差（nM）	K_{ON} (1/Ms)	K_{OFF}（1／秒）	X^2	R^2
MG WT	11.9	0.2	2.8E+0.4	3.3E-0.4	2.5	1.00
MG 27	16.3	0.5	2.6E+0.4	4.3E-0.4	1.8	0.99
MG 29	7.9	0.1	4.3E+0.4	3.4E-0.4	1.7	1.00
MG 31	15.5	0.5	3.0E+0.4	4.7E-0.4	2.4	0.99
MG 40	10.1	0.2	3.1E+0.4	3.1E-0.4	1.9	1.00

図２１

【図２２】

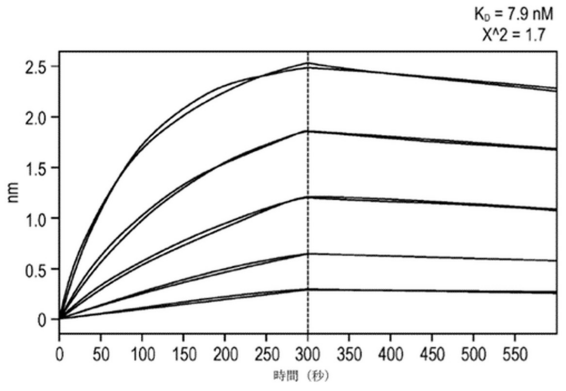


図２２

【図２３】

		安定化	中性	不安定化
点変異	(N=28)	29%	50%	21%
複数の変異	(N=8)	63%	25%	13%
組み合わせの変異	(N=6)	100%	0%	0%
合計	(N=42)	45%	38%	17%

図２３

【図２４】

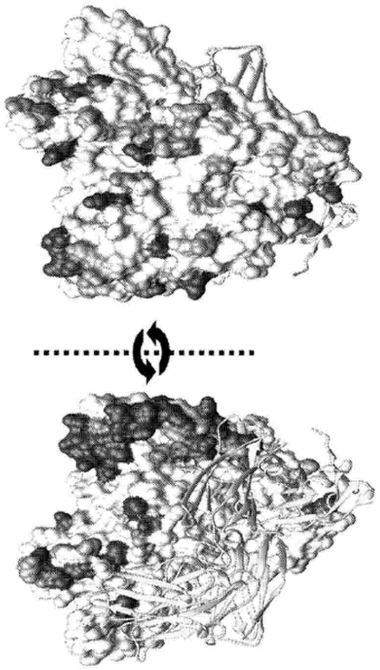


図２４

【図２５】

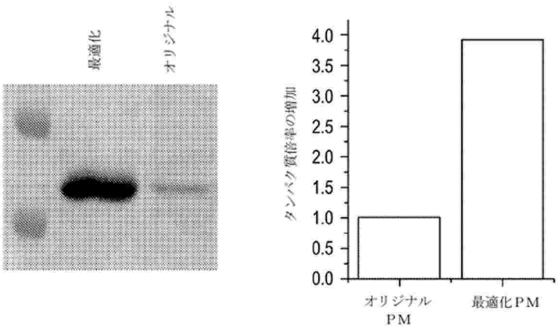


図２５

【図２６】

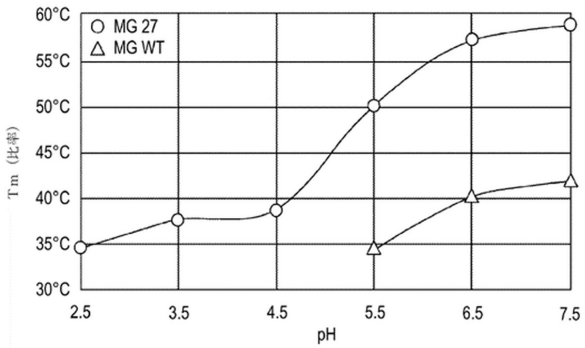


図２６

【図２７Ａ】

```
          74                                                  123
MG WT: SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG1:   SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG8:   SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG13:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG15:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG21:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG22:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG23:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG24:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG27:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG28:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG29:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG31:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG33:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG38:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG40:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG43:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG44:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG45:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT
MG46:  SLSLNDGSYQSEIDLSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT

          124                                                 173
MG WT: EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG1:   EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG8:   EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG13:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG15:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVA□DGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG21:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG22:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG23:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG24:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG27:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVA□DGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG28:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG29:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVA□DGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG31:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG33:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG38:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG40:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG43:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVA□DGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG44:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVA□DGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG45:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
MG46:  EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVA□DGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL
```

図２７Ａ

【図２７Ｂ】

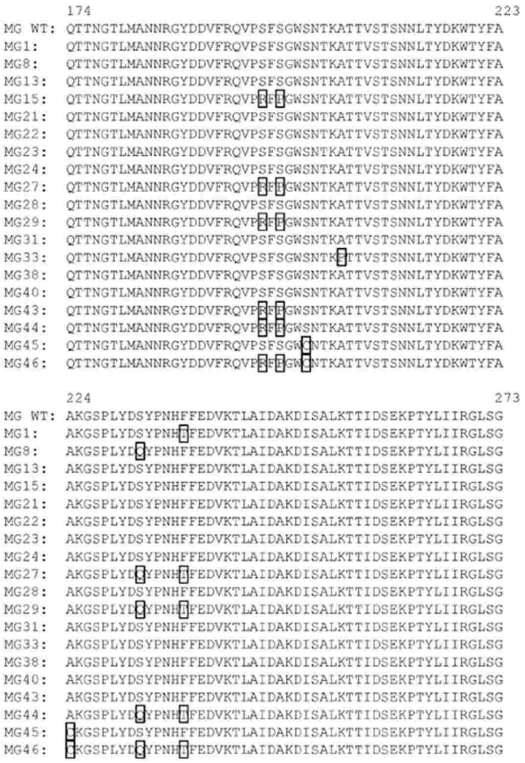


図２７Ｂ

【図２７Ｃ】



図２７Ｃ

【図２７Ｄ】

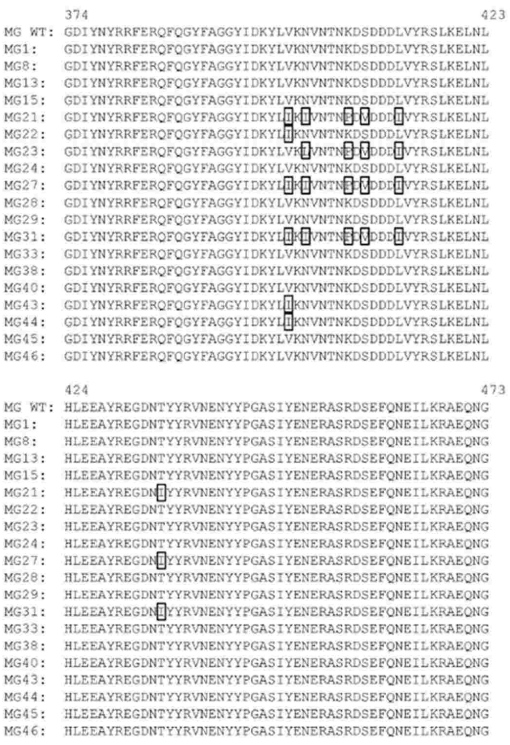


図２７Ｄ

【図２７Ｅ】

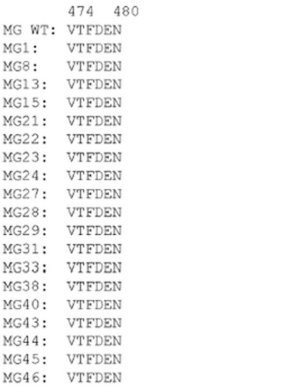


図２７Ｅ

【図２８】

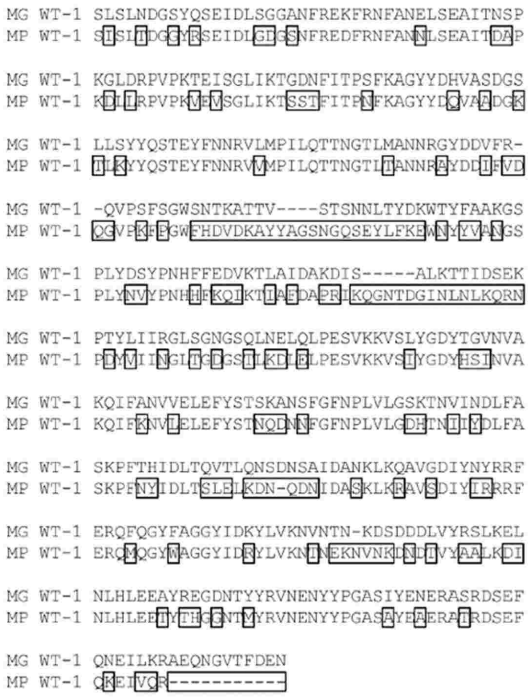


図２８

【図２９】

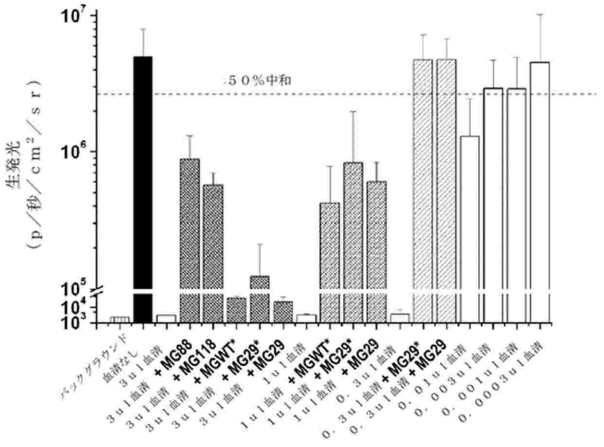


図２９

【図３０】

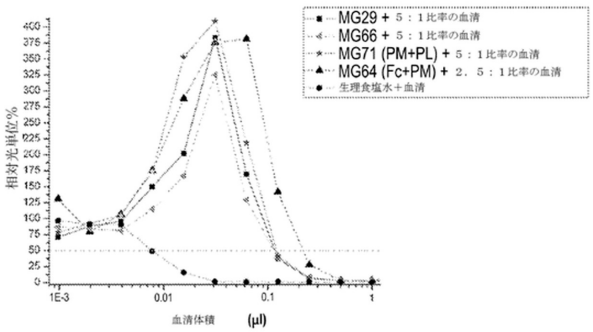


図３０

【配列表】

2024505948000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/015127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/30(2006.01)i; **C12N 15/70**(2006.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i; **C12N 15/90**(2006.01)i; **G01N 33/569**(2006.01)i; **A61P 37/00**(2006.01)i; **A61K 38/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/30(2006.01); A61K 38/16(2006.01); A61K 38/43(2006.01); A61K 38/46(2006.01); C07K 1/22(2006.01); C07K 16/12(2006.01)

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

Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: mycoplasma protein M, pH stability, thermostability, mutation, deletion

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2017-0320921 A1 (GROVER, R. et al.) 09 November 2017 (2017-11-09) claims 1, 3-9; paragraph [0081]	1-3
A		15-17
Y	US 2015-0246953 A1 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 03 September 2015 (2015-09-03) claim 1; paragraphs [0050], [0057]-[0058]	1-3
Y	US 5804183 A (FILPULA, D. R. et al.) 08 September 1998 (1998-09-08) abstract; column 5, lines 3-14	1-3
A	ASKEW, C. et al., 'A Vector Independent Method of Neutralizing Antibody Evasion Potently Protects AAV for Efficient Gene Delivery', Molecular Therapy, 28 April 2020, Vol. 28, No. 4S1, p. 22 the whole document	1-3,15-17
A	NCBI, GenBank accession no. WP_009885911.1 (31 May 2019) the whole document	1-3,15-17

☑ 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	Date of mailing of the international search report
23 May 2022	**23 May 2022**
Name and mailing address of the ISA/KR **Korean Intellectual Property Office** **189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon** **35208, Republic of Korea** Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Authorized officer **HEO, Joo Hyung** Telephone No. **+82-42-481-5373**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/015127

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2021-022187 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 04 February 2021 (2021-02-04) claims 1-3	1-3
PX	ASKEW, C. et al. 'Engineered Protein M Analogs Enhance the Ability to Suppress Vector Neutralizing Antibodies and Generate a Window for Successful Gene Delivery', Molecular Therapy, 27 April 2021, Vol. 29, No. 4S1, p. 91 page 91	1-3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/015127

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **54-96**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 54-96 pertain to a method for treatment of the human body by therapy or surgery, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. ☑ Claims Nos.: **8,10-12,20,23-27,29,35-36,41-43,48-49,51-52,55-65,70,72-73,77,91,98,104**
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:

Claims 8, 10-12, 20, 23-27, 29, 35-36, 41-43, 48-49, 51-52, 55-65, 70, 72-73, 77, 91, 98 and 104 are regarded to be unclear because they refer to claim which does not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. ☑ Claims Nos.: **4-7,9,13-14,18-19,21-22,28,30-34,37-40,44-47,50,53-54,66-69,71,74-76,78-90,92-97,99-103,105**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2022/015127

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2017-0320921	A1	09 November 2017	EP	3099320	A2	07 December 2016
				EP	3099320	A4	18 April 2018
				WO	2015-117057	A2	06 August 2015
				WO	2015-117057	A3	30 December 2015
US	2015-0246953	A1	03 September 2015	US	9593150	B2	14 March 2017
				WO	2014-014897	A2	23 January 2014
				WO	2014-014897	A3	13 March 2014
US	5804183	A	08 September 1998	EP	1011717	A1	28 June 2000
				EP	1011717	B1	28 December 2005
				JP	2001-512965	A	28 August 2001
				JP	4126097	B2	30 July 2008
				US	5916793	A	29 June 1999
				US	6132713	A	17 October 2000
				WO	98-33519	A1	06 August 1998
WO	2021-022187	A1	04 February 2021	AU	2020-319880	A1	04 February 2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		
C12N	*15/86 (2006.01)*	C12N	15/86	Z	
C12N	*15/88 (2006.01)*	C12N	15/88	Z	
C12N	*15/09 (2006.01)*	C12N	15/09	110	
C12N	*15/113 (2010.01)*	C12N	15/113	Z	
C12P	*21/02 (2006.01)*	C12P	21/02	C	
A61K	*39/00 (2006.01)*	A61K	39/00	Z	
A61K	*48/00 (2006.01)*	A61K	48/00		
A61P	*43/00 (2006.01)*	A61P	43/00	121	
A61P	*35/00 (2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*7/00 (2006.01)*	A61P	7/00		
A61P	*9/00 (2006.01)*	A61P	9/00		
A61P	*37/06 (2006.01)*	A61P	37/06		
A61K	*45/00 (2006.01)*	A61K	45/00		
G01N	*33/53 (2006.01)*	G01N	33/53	N	

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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国 ノース カロライナ ２７７０７ ダーラム ウェスト ピエモント アベニュー １１９
(72)発明者 リー チェンウェン
アメリカ合衆国 ノース カロライナ ２７５１６ チャペル ヒル ベリンジャー プレイス ２１０
(72)発明者 クールマン ブライアン
アメリカ合衆国 ノース カロライナ ２７５１６ チャペル ヒル タリーホ トレイル １００９
(72)発明者 シーカー デイビッド フォレスト
アメリカ合衆国 ノース カロライナ ２７７１３ ダーラム ウォルナット コーブ ドライブ ５８１１

Ｆターム（参考） 4B064 AG01 CA02 CC24 CE12 DA01
4B065 AA26X AA37Y AB01 AC13 BA02 CA24 CA44
4C084 AA13 AA22 MA02 MA52 MA55 MA63 MA66 NA05 ZA36 ZA51 ZB08 ZB26 ZC75
4C085 AA06 BA48 BB11 CC07 DD62 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA11 EA22 FA74 GA26