

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-502826

(P2018-502826A)

(43) 公表日 平成30年2月1日 (2018. 2. 1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 14/00 (2006.01)	C O 7 K 14/00 Z N A	2 G O 5 4
G O 1 N 21/77 (2006.01)	G O 1 N 21/77 A	4 H O 4 5
G O 1 N 27/416 (2006.01)	G O 1 N 27/416 3 2 1	
	G O 1 N 27/416 3 3 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 75 頁)

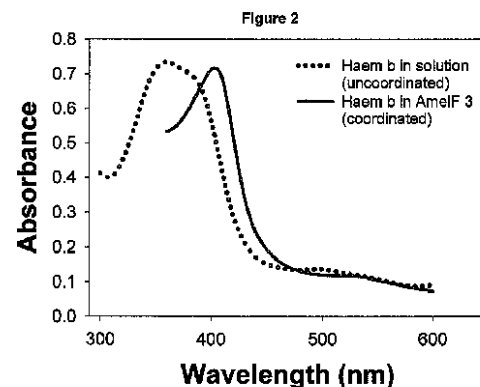
(21) 出願番号	特願2017-526540 (P2017-526540)	(71) 出願人	590003283
(86) (22) 出願日	平成27年11月16日 (2015. 11. 16)		コモンウェルス サイエントフィック
(85) 翻訳文提出日	平成29年6月14日 (2017. 6. 14)		アンド インダストリアル リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2015/050717		オーガナイゼーション
(87) 国際公開番号	W02016/077877		オーストラリア2601 オーストラリアン
(87) 国際公開日	平成28年5月26日 (2016. 5. 26)		・キャピタル・テリトリー、アクトン、ク
(31) 優先権主張番号	2014904612		ルーニーズ・ロス・ストリート (番地なし
(32) 優先日	平成26年11月17日 (2014. 11. 17)		)
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)	(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
		(74) 代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 金属タンパク質組成物

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも一部分にコイルドコイル構造を有するポリペプチドと、キレート剤及び金属イオンを含み、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に結合しているキレートとを含む組成物に関する。好ましい実施形態では、かかるポリペプチドはシルクフィブロインであり、ここで、前記シルクフィブロインの少なくとも一部分はコイルドコイル構造を有している。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも一部分にコイルドコイル構造を有するポリペプチドと、キレート剤及び金属イオンを含むキレートとを含み、ここで、該キレートは前記ポリペプチドの少なくとも 1 個のアミノ酸に結合している、組成物。

【請求項 2】

前記キレート剤は、前記ポリペプチドの少なくとも 1 個のアミノ酸に結合している、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記金属イオンは、前記ポリペプチドの少なくとも 1 個のアミノ酸に配位結合により結合している、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

コイルドコイル構造を有する前記ポリペプチドの一部分は、少なくとも 35 個のアミノ酸を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

コイルドコイル構造を有する前記ポリペプチドの一部分は、少なくとも 63 個のアミノ酸を含む、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記コイルドコイル構造内のアミノ酸の少なくとも 20% はアラニン残基である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記ポリペプチドは、約 9～約 30 の 7 アミノ酸繰り返しを含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記金属イオンに配位結合により結合している前記少なくとも 1 個のアミノ酸は、T y r、C y s、H i s、M e t、L y s、G l u または非天然型アミノ酸である、請求項 3～7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記キレート剤に結合しているアミノ酸残基の少なくとも 1 つは荷電したアミノ酸残基である、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記キレート剤は、原子環を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記キレート剤は、ポルフィリン (p o r p h r y i n)、コリン、クロリン、コルフィン、ポルフィン及びフタロシアニンからなる群から選択される、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記金属イオンは、遷移金属、アルカリ土類金属または p ブロック金属のイオンである、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記金属イオンは、F e、S n、C d、C r、M n、C o、C u、R u、Z n、M g、S c、R u、R h、O s、A g、P d、Z n、R e、P t、T i、V、N i、M o、T c、W 及び I r の各イオンからなる群から選択される、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記組成物は、標的化合物と結合することができる、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記組成物は、標的化合物に対する結合部位を含む、請求項 1～14 のいずれか一項に

10

20

30

40

50

記載の組成物。

【請求項 16】

前記標的化合物は、酸素、一酸化炭素、二酸化炭素、過酸化水素、化合物で P 原子、S 原子、または N 原子を有するもの、及びその混合物からなる群から選択される、請求項 14 または請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記標的化合物は NO である、請求項 14 ～ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記組成物は、1 つ以上のポリペプチドを含む、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 19】

請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の組成物を含む材料であって、前記ポリペプチドは、イオン結合、水素結合、共有結合またはその組み合わせにより架橋しており、前記材料は水不溶性である、前記材料。

【請求項 20】

前記材料は、シルクのファイバー、フィルム、粉末またはスポンジである、請求項 19 に記載の材料。

【請求項 21】

請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の組成物と、さらなるポリペプチドとを含み、ここで、前記さらなるポリペプチドの少なくとも一部分はコイルドコイル構造を有する、共重合体。

20

【請求項 22】

前記ポリペプチドの少なくともいくつかは架橋している、請求項 21 に記載の共重合体。

【請求項 23】

前記ポリペプチドの前記残基の少なくともいくつかは共有結合で架橋している、請求項 22 に記載の共重合体。

【請求項 24】

請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の組成物、及び／または請求項 19 もしくは請求項 20 に記載の材料、または請求項 21 ～ 23 のいずれか一項に記載の共重合体を含む、標的化合物を検出するためのセンサー。

30

【請求項 25】

前記組成物は、前記標的化合物に対する結合部位を含み、前記標的化合物が結合することにより検出可能な変化が生じる、請求項 24 に記載のセンサー。

【請求項 26】

前記検出可能な変化は、色、分光光度的变化、蛍光変化または電気化学的变化である、請求項 25 に記載のセンサー。

【請求項 27】

前記分光光度的变化は、ソーレー帯ピークの変化、または波長が 500 ～ 600 nm の間にある分光光度計によるピークの少なくとも 1 つにおける変化である、請求項 26 に記載のセンサー。

40

【請求項 28】

標的化合物を結合する方法であって、

(a) 請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の組成物及び／または請求項 19 もしくは請求項 20 に記載の材料を提供し、かつ

(b) 前記組成物と標的化合物とを、前記組成物に前記化合物が結合する条件下で接触させるステップを含む、前記方法。

【請求項 29】

前記組成物及び／または標的化合物における結合時の変化を検出することにより、前記標的化合物の結合を検出することをさらに含む、請求項 28 に記載の方法。

50

【請求項 30】

バイオセンサーを作製するための方法であって、
少なくとも一部分にコイルドコイル構造を有するポリペプチドを提供し、かつ
キレート剤及び金属イオンを含むキレートと前記ポリペプチドとを、前記キレートが前記
ポリペプチドの少なくとも 1 個のアミノ酸に結合する条件下で接触させることを含む、前
記方法。

【請求項 31】

前記金属イオンは、前記ポリペプチドの少なくとも 1 個のアミノ酸に配位結合によって
結合している、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記キレート剤は、前記ポリペプチドの少なくとも 1 個のアミノ酸に結合している、請
求項 30 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリペプチドとキレート剤及び金属イオンを含むキレートとを含む組成物、
及びその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

混合物中の検出対象の分子の存在、及びそのレベルの検出は商業上、非常に重要である
。

【0003】

その結果、対象分子と相互作用できる分子を使用して、その対象分子を検出し、かつそ
のレベルを監視する方法を開発する取り組みがなされている。これらの方法のうち最も有
望な方法には、バイオセンサーを使用するものがある。バイオセンサーは、生物
学的識別素子を用いて特定の定量的または半定量的な分析情報を提供することができる装
置である。バイオセンサーの生物学的識別素子は選択性を決定し、測定すべき分子がシ
グナルを発する。選択は、分子の化学構造が変化していない分子の生化学的識別、または
素子が分子の生化学反応を触媒する生体触媒作用に基づいてよい。トランスデューサー
は、生物学的識別素子の識別を半定量的または定量的な信号に変換する。可能なトラン
スデューサー技術は、光学技術、電気化学技術、音響／機械技術または比色技術である。
これまでに利用されている光特性には、吸光度、蛍光、生物発光／化学発光、反射率、光
散乱及び屈折率が挙げられる。蛍光化合物のような従来のレポーター基を使用してよいが
、別法として、標識をせずに済む、光を直接検出する機会がある。

【0004】

バイオセンサーの生物学的識別素子は特異性を決定するので、対象分子に対する結合が
高度に特異的で高感度であることが既知のタンパク質ドメインが多様にあることから
タンパク質をバイオセンサーで使用する事への関心は高く、例えば、モノクローナル抗
体及びそれに由来する一本鎖可変断片 (s c F v s)、酵素、ウイルスタンパク質、タン
パク質アプタマーなどがある。

【0005】

しかし、多くのタンパク質はその特性からバイオセンサーで使用するには感度が落ちる
。例えば、多くのタンパク質は精製すると不安定になり、非可逆なコンフォメーション変
化、変性、及び生化学的活性の損失が起こる。

【0006】

材料内部または材料上にタンパク質を固定化することにも問題が生じる。例えば、タン
パク質は、非特異的な共有結合によって表面に固定化されることが多く、そのため、可能
な配向が多数存在し得るが、例えば、その結合部位または活性部位が曝露されるよう配さ
れるタンパク質もあれば、活性部位が曝露されないよう配されるタンパク質もあるため、
対象分子との選択的結合反応はできない。配向に加え、タンパク質密度の制御も不良であ

10

20

30

40

50

り得る。タンパク質は、時間依存的な変性、固定化中の変性、及び固定化後の包括タンパク質の溶出も生じやすい。さらに、固定化により、タンパク質と対象診断分子との接触が制限されることがある。

【0007】

したがって、材料内に形成可能である、または材料内また材料上に組み込み可能な安定したタンパク質バイオセンサーが当該分野では求められている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】 Eisenberg (1984) Annual Review of Biochemistry 53:595-623. 10

【発明の概要】

【0009】

本願発明者らは、驚くべきことに、コイルドコイルシルクポリペプチドのようなコイルドコイル構造をした部分を含むポリペプチド、大環状化合物のようなキレート剤、及び金属イオンを使用して、例えばバイオセンサーとして使用するためなど、所望される特性を有する組成物及び材料を提供できることを見出した。

【0010】

したがって、一態様では、本発明は、少なくとも一部分にコイルドコイル構造を有するポリペプチドと、キレート剤及び金属イオンを含み、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に結合しているキレートとを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、キレート剤は、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に結合している。いくつかの実施形態では、キレート剤に結合しているアミノ酸残基の少なくとも1つは荷電したアミノ酸残基である。いくつかの実施形態では、金属イオンを、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に配位結合により結合させる。いくつかの実施形態では、金属イオンに配位結合により結合している少なくとも1個のアミノ酸は、Tyr、Cys、His、Met、Lys、Gluまたは非天然型アミノ酸である。 20

【0011】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドのコイルドコイル構造を有する一部分は、少なくとも35個のアミノ酸、または少なくとも63個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、コイルドコイル構造内のアミノ酸のうち少なくとも20%はアラニン残基である。 30

【0012】

いくつかの実施形態では、キレート剤は、原子環を含む。いくつかの実施形態では、キレート剤は、ポルフィリン (porphyrin)、コリン、クロリン、コルフィン、ポルフィン及びフタロシアニンからなる群から選択される。

【0013】

いくつかの実施形態では、金属イオンは、遷移金属、アルカリ土類金属またはpブロック金属のイオンである。例えば、金属イオンは、Fe、Sn、Cd、Cr、Mn、Co、Cu、Ru、Zn、Mg、Sc、Ru、Rh、Os、Ag、Pd、Zn、Re、Pt、Ti、V、Ni、Mo、Tc、W及びIrの各イオンからなる群から選択してよい。一実施形態では、アルカリ土類金属はMgである。 40

【0014】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、標的化合物と結合することができる。いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、標的化合物に対する結合部位を含む。標的化合物は、酸素、一酸化炭素、二酸化炭素、過酸化水素、化合物でP原子、S原子、またはN原子を有するもの、及びその混合物からなる群から選択してよい。いくつかの実施形態では、標的化合物はNOである。

【0015】

いくつかの実施形態では、組成物は、1つ以上のポリペプチドを含む。 50

【0016】

別の態様では、本発明は、本発明の組成物を含む材料を提供し、ここで、ポリペプチドは、イオン結合、水素結合、共有結合またはその組み合わせにより架橋しており、材料は水不溶性である。材料は、シルクのファイバー、フィルム、粉末またはスポンジの形態であってよい。

【0017】

さらに別の態様では、本発明は、本発明の組成物を含む共重合体及び少なくとも一部分がコイルドコイル構造を有するさらなるポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの少なくともいくつかは架橋している。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの残基の少なくともいくつかは共有結合で架橋している。

10

【0018】

さらに別の態様では、本発明は、本発明の組成物、材料または共重合体を含む標的化合物を検出するセンサーを提供する。いくつかの実施形態では、組成物、材料または共重合体は、標的化合物に対する結合部位を含み、ここで、かかる標的化合物が結合することにより検出可能な変化が生じる。検出可能な変化は、変色、分光光度的变化、蛍光変化または電気化学的变化であってよい。いくつかの実施形態では、分光光度的变化はソーレー帯ピークの変化である。他の実施形態では、分光光度的变化は、波長が500～600nmの分光光度計によるピークの少なくとも1つにおける変化である。

【0019】

さらに別の態様では、本発明は、標的化合物を結合させる方法であって、(a) 本発明の組成物、材料または共重合体を提供し、(b) 前記組成物、材料または共重合体と標的化合物とを、前記組成物に前記化合物が結合する条件下で接触させるステップを含む、前記方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法はさらに、結合時の組成物及び／または標的化合物における変化を検出することにより、標的化合物の結合を検出することを含む。

20

【0020】

さらに別の態様では、本発明はまた、バイオセンサーを製造するための方法であって、少なくとも一部分にコイルドコイル構造を有するポリペプチドを提供し、かつ、該ポリペプチドと、キレート剤及び金属イオンを含むキレートとを、前記ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に対して前記キレートが結合する条件下で接触させることを含む前記方法も提供する。いくつかの実施形態では、キレート剤は、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に結合している。いくつかの実施形態では、キレート剤に結合しているアミノ酸残基の少なくとも1つは荷電したアミノ酸残基である。いくつかの実施形態では、金属イオンを、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に配位結合により結合させる。いくつかの実施形態では、金属イオンに配位結合により結合している少なくとも1個のアミノ酸は、Tyr、Cys、His、Met、Lys、Gluまたは非天然型アミノ酸である。

30

【0021】

さらなる態様では、本発明は、一酸化窒素を検出する方法であって、(a) 試料を本発明の組成物または材料と接触させること、及び(b) ステップ(a)の結果、試料中に一酸化窒素があることを示す検出可能な変化が該組成物または材料に生じるか否かを判定することを含む前記方法を提供する。一実施形態では、キレートはヘムbである。

40

【0022】

本明細書のいかなる実施形態も、特に具体的に断らない限り、他のいかなる実施形態にも準用すると解釈されるべきである。

【0023】

本発明は、あくまで例示目的を意図する、本明細書に記載される特定の実施形態により範囲を限定されるものではない。機能的に同等な生成物、組成物及び方法は、本明細書に記載のように、本発明の範囲内であることは明確である。

【0024】

50

本明細書全体を通して、特に具体的に断りがある、または文脈により指示がある場合を除いては、単一のステップ、組成物、ステップ群または組成物群は、かかるステップ、組成物、ステップ群または組成物群を1つ及び複数（すなわち1つ以上）包含すると解釈されるべきである。

【0025】

本明細書で使用する場合、about（約）という用語は、特に断らない限り、指定値の+/-10%、より好ましくは+/-5%を指す。

【0026】

本明細書全体を通して、語「comprise（含む）」、または「comprise（含む）」もしくは「comprising（含む）」のような変形は、記述されている要素、整数もしくはステップ、または要素、整数もしくはステップの群を含むが、他の任意の要素、整数もしくはステップ、または要素、整数もしくはステップの群を除外するものではないことを意味すると理解されるであろう。

【0027】

本発明を、添付の図を参照しながら以下の非限定的実施例によって以下に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】ヘムbがミツバチのシルクスポンジ内に結合及び配位する証拠を示す。ヘム溶液（緑の呈色）をミツバチのシルクスポンジ（上パネルA）またはカイコのシルクスポンジ（下パネルB）に滴下した。ミツバチのシルクスポンジは赤に変色するが、カイコのシルクスポンジでは変色しない。ヘムで誘導されたミツバチスポンジの呈色は70%メタノールで洗浄した後もそのままであるが、ヘムbの緑色はカイコのシルクスポンジから洗い落とされている。この図から、本発明のポリペプチドに対するキレートの結合及び配位が示される。

【図2】ヘムbがミツバチのシルクフィルム内に結合及び配位する証拠を示す。ミツバチのシルクタンパク質AmelF3から作製したAmelF3-ヘムb複合体フィルムから得られたUV/Visspektrumは、410nmにおいて先鋭なソーレー帯ピークを示す（実線）。対照的に、水溶液中の配位していないヘムbから得たスペクトルは、400nmより下において幅広なソーレー帯ピークを示す（点線）。ソーレー帯ピークのシフトから、シルクタンパク質フィルムのAmelF3ポリペプチドの残基にヘム中心が配位していることを示している。この図から、本発明のポリペプチドに対するキレートの結合及び配位が示される。

【図3】ヘムbとAmelF3とのモル比を変えた場合のUV/Visspektrumの比較を示す。タンパク質に対するヘムbの濃度が高くなるにつれ、ソーレー帯ピークは幅広になり、かつ波長の低い方へシフトしたことから、配位していないヘム量の増加が示された。ヘム：AmelF3の比が1：1以下では、404nmでのソーレー帯ピークは、全ヘムが配位していることを示している。ヘム：AmelF3比が増加するにつれ、ソーレー帯ピークは拡大するとともに398（挿入）へシフトし、配位していないヘム量の増加を示している。この図で実証された化学量論から、本発明のポリペプチドに対するキレートの特異的な飽和性結合が示される。

【図4】本発明のポリペプチドは、チロシン残基を介してキレートの金属イオンを配位することを示す。AmelF3-ヘムbのラマンスペクトル（中央のトレース）は、594cm⁻¹に中心を持つ幅広の特徴を示す。AmelF3のラマンスペクトル（上トレース）及びヘムbのトレース（中央のトレース〔訳者注：「中央」ではなく「下」の誤記と思われる〕）は594cm⁻¹に中心を持つ幅広の特徴を示さない。これらのスペクトルは、ヘム中心に配位するチロシン残基と一致する。

【図5】溶液中及び材料中における、本発明のポリペプチドに対するキレートの結合及び配位を示す。図はまた、AmelF3のTy r76がヘムbの配位にとって重要であることも示す。A. ミツバチの組換えシルクタンパク質AmelF3から作製したシルクタンパク質フィルム及びチロシン76をアラニンに変異させたAmelF3（AmelF3.

10

20

30

40

50

Tyr76Ala)に、ヘムbを加えた場合に得られたUV/Visスペクトルの比較。395nmにおける幅広いソーレー帯ピークは、修飾ミツバチのシルクがヘムbに配位しないことを示している。B. チロシン76をヒスチジンに変異させたAmelF3水溶液(AmelF3.Tyr76His)とヘムb水溶液の比が1:1の場合。ソーレー帯ピークとして知られる400nm前後における先鋭なピークは、アミノ酸残基がヘム中心の鉄に配位していることを示す。データから、金属イオンは溶液にしても、またフィルム状にしても配位することがわかる。

【図6】ヘムb浸出後の、ツムギアリ(green ant)の組換えシルクタンパク質(GA1~4)から作製したシルクフィルムのUV/Visスペクトルを示す。このデータから、GA1及びGA3では400nm前後において強いシグナルが観察され、これらのタンパク質がヘムと強く結合したことを実証していることがわかる。このデータから、ミツバチのシルクポリペプチド以外のコイルドコイル構造を有する他のポリペプチドは、キレート剤及び金属イオンを含むキレートを結合できることがわかる。

【図7】ヘムb浸出後の、カマキリの組換えシルクタンパク質から作製したシルクフィルムのUV/Visスペクトルを示す。約400nmにおいて強いシグナルが観察され、これらのタンパク質がヘムと強く結合したことを実証している。このデータから、コイルドコイル構造を有する他のポリペプチドが、キレート剤及び金属イオンを含むキレートを結合できることがわかる。

【図8】キレートのキレート剤をさまざまに変えてよいことを示す。非ポルフィリン系キレート剤のコビルン酸(cobyrrnic acid)(ジシアノコビリルン酸ヘプタメチルエステル)を、ミツバチの組換えシルクタンパク質AmelF3から作製したシルクタンパク質フィルムに加えた。キレート剤にシルクフィルムを添加した際、先鋭なピークの最大吸収が370nmから360nmにシフトし、このことは、ジシアノコビリルン酸(dicyanocobyrrnic acid)ヘプタメチルエステルがAmelF3フィルム内に浸出すると、アミノ酸残基がコバルト中心に配位することを示している。

【図9】ミツバチの組換えシルクタンパク質AmelF3から作製したシルクタンパク質フィルムを還元し、その後再度再度酸化させた場合に得られたUV/Visスペクトルを示し、逆反応が可能であることを示す。ヘム中心の酸化状態は、UV/Visスペクトルのシフトから決定される。還元すると、ソーレー帯ピークは410nmから420nmへシフトし、550nmにおいてピーク上昇が観察された。このデータから、本発明の組成物は可逆的に還元され得ることがわかる。

【図10】標的化合物の結合及び結合時の該標的化合物における検出可能な変化を示す。A. ミツバチの組換えシルクタンパク質AmelF3から作製したシルクタンパク質フィルムを、NO濃度を上昇させて結合させた場合に得られたUV/Visスペクトル。B. NO濃度上昇に伴う420nmにおける吸光度変化の比変化。420nmにおける吸光度の低下または390nmにおける吸光度の上昇いずれでも使用できる。420nmにおける吸光度の低下は、NOにより占有された結合部位の画分に変換し、NO濃度に対してプロットし、ヒルの式をもとにして解離定数 $6.7 \mu\text{M}$ 及び検出限界約 $1 \mu\text{M}$ を用いた変形シグモイド曲線に当てはめることができる。このデータから、本発明の組成物は、標的分子(b)を結合でき、かつ、標的分子の結合により組成物に検出可能な変化が生じることがわかる。

【図11】ヘム-シルク材料のペルオキシダーゼ活性を示す。A. H_2O_2 、アミノアンチピリン及びフェノールの溶液にヘムb-AmelF3スポンジ(約1mg)を加えた場合のスペクトルの経時的变化を示す。510nmにおける吸光度の増加は、アミノアンチピリンとフェノールの間で酸化生成物が形成されたことによる。酸化生成物は赤である。B. 510nmにおける吸光度の経時的变化を監視するペルオキシダーゼ測定。対照シルクフィルム(ヘムなし;点線)に見られるように、ペルオキシダーゼ活性はフィルムへのヘム添加によるものである。C. ヘムb-AmelF3スポンジを回収可能かつ再使用可能な触媒として使用できることの実証。写真は、4-アミノアンチピリン、フェノール及び H_2O_2 の入った一連のウェルを示す。ヘム-シルクスポンジを加えると、色が赤変す

10

20

30

40

50

る。スポンジを各ウェルから取り出し、次のウェル内に置いた（左から右へ）。最終ウェルは、まだスポンジを加えていない無色溶液であり、右へ向かって2番目のウェルにはまだヘムb-AmelF3スポンジが入っている。

【図12】本発明の組成物を使用して、抗菌活性を有するZnPcを結合させることができることを示す。図左：光増感物質の亜鉛フタロシアニンテトラスルホン酸を浸出させて十分な洗浄を行った後のミツバチの組換えシルクタンパク質材料であり、亜鉛フタロシアニンが結合した特徴である濃青色を示している。図右：結合した亜鉛フタロシアニンのない、70%MeOHで洗浄した組換えシルクフィルム。

【図13】金属キレートの固有物質はさまざまに変えてよいが、本発明の特徴が維持されることを示す。各種の人工ポルフィリンをミツバチのシルクフィルムに導入した。人工ポルフィリン（銅プロトポルフィリンIX-CuPPIX）、コバルトプロトポルフィリンIX（CoPPIX）及びヘムb（FePPIX）を含有するミツバチのシルクフィルムのUV/Visspektrumである。金属イオンの種類を変えられることを利用して、組成物の機能を改変できる。例えば、CoPPIXは、一酸化窒素に対する感度が改善され、かつ分子の酸素に対する親和性が抑制された一酸化窒素センサーとして使用できるであろう。

【図14】本発明の組成物の安定性の一例を示す。ミツバチの組換えシルクタンパク質AmelF3及び結合ヘムbを含む、調製されたばかりの（新しいフィルム）複合体フィルム及び1年前の（調製後1年のフィルム）複合体フィルムを用いてUV/Visspektrumを測定したところ、ピークの位置、強度ともに変化しておらず、環境室温で長期保存されることが示された。新しいフィルムも1年前のフィルムもNOを結合することができた（点線）。

【図15】本発明の複合材料は、さまざまな異なる溶媒に曝露させた後も変化がないことを示す。A. 結合したヘムbを含有するミツバチの組換えシルクタンパク質AmelF3から作製したシルクタンパク質フィルムをさまざまな溶媒（左：酢酸エチル；中央：クロロホルム；右：エタノール）で処理した後に得られたUV/Visspektrum（未処理：点線；処理：実線）であり、かかる処理による、ソーレー帯ピークの位置または強度に対する有意な影響がないことを示す。B. スポンジは、溶媒に24時間曝露させた後も変化しない（シルクスポンジにも溶媒にもキレートを加えていない）。

【図16】電気化学測定におけるヘム-シルク材料使用の一例を示す。カーボンナノチューブを用いて修飾したグラッシ-カーボン電極上にAmelF3フィルム中のヘムbを投じた。Fe³⁺/Fe²⁺酸化還元対に起因し得る、明瞭な反転ピークが見られる。これらの酸化還元ピークは、ヘムが不在の場合（点線）またはAmelF3シルクがない場合（一点鎖線）は観察されない。

【図17】一酸化窒素を検出するための、実施例15に記載のように調製したヘム-シルク電極の使用を示す。一酸化窒素を加えると、著明な接触電流が認められる。この接触電流は、ヘム-シルク材料により一酸化窒素が酸化されたことに起因し、試料中の一酸化窒素濃度の測定が可能である。

【図18】酸素を検出するための、実施例15に記載のように調製したヘム-シルク電極の使用を示す。嫌気条件下（アルゴンガスを用いたバージによる）、電極の電位を一定に保った（-300mV対Ag/AgCl）。酸素をさまざまな濃度で導入するため、我々は通気した緩衝液の分注を加えた。接触電流の急激な上昇は、ヘム-シルク材料により酸素が還元されたためであり、これらの材料を酸素センサーとして使用できることを実証している。

【図19】AmelF3にさらなるヘム結合部位の導入が可能であることを示す。コイルドコイルのa位にY76Aを有するAmelF3に配位His残基を導入した。得られたタンパク質（Y76A-A97H）は、ヒスチジンの配位を示す先鋭なソーレー帯ピークを413nmにおいて示した。

【図20】AmelF3におけるヘムの結合は、さらなる配位残基の付加により増加し得ることを実証している。コイルドコイルのa位にY76H置換を有するAmelF3に配

10

20

30

40

50

位性His残基(His97)を導入した。Y76Hは、シルクタンパク質に対するヘムの結合比が1:1であることをはっきりと示しており、これは、ヘム比が1:1を超えるとソーレー帯ピークは幅広となり、また最大ピーク位置がシフトすることにより示される。Y76H A97Hではソーレー帯ピークの形状及び位置に変化は認められなかったことから、追加のヘム結合部位が導入され、修飾AmelF3が今度はヘム補因子2つを結合できたことを示している。

【0029】

配列表への鍵

配列番号1ーシグナル配列を有する、*Apis mellifera* (ミツバチ) のシルクフィブロイン1 (AmelF1またはXenospiralとも呼ばれる) のアミノ酸配列

10

【0030】

配列番号2ーシグナル配列を有する、*Apis mellifera* のシルクフィブロイン2 (AmelF2またはXenospira2とも呼ばれる) のアミノ酸配列

【0031】

配列番号3ーシグナル配列を有する、*Apis mellifera* のシルクフィブロイン3 (AmelF3またはXenospira3とも呼ばれる) のアミノ酸配列

【0032】

配列番号4ーシグナル配列を有する、*Apis mellifera* のシルクフィブロイン4 (AmelF4またはXenospira4とも呼ばれる) のアミノ酸配列

20

【0033】

配列番号5ー*Apis mellifera* のシルクフィブロイン1 (AmelF1またはXenospiralとも呼ばれる) の核酸配列

【0034】

配列番号6ー*Apis mellifera* のシルクフィブロイン2 (AmelF2またはXenospira2とも呼ばれる) の核酸配列

【0035】

配列番号7ー*Apis mellifera* のシルクフィブロイン3 (AmelF3またはXenospira3とも呼ばれる) の核酸配列

【0036】

配列番号8ー*Apis mellifera* のシルクフィブロイン4 (AmelF4またはXenospira4とも呼ばれる) の核酸配列

30

【0037】

配列番号9ーシグナル配列を有する、*Oecophylla smaragdina* (ツムギアリ (weaver ant)) のシルクフィブロイン1 (F1またはGAF1とも呼ばれる) のアミノ酸配列

【0038】

配列番号10ーシグナル配列を有する、*Oecophylla smaragdina* のシルクフィブロイン2 (F2またはGAF2とも呼ばれる) のアミノ酸配列

【0039】

配列番号11ーシグナル配列を有する、*Oecophylla smaragdina* のシルクフィブロイン3 (F3またはGAF3とも呼ばれる) のアミノ酸配列

40

【0040】

配列番号12ーシグナル配列を有する、*Oecophylla smaragdina* のシルクフィブロイン4 (F4またはGAF4とも呼ばれる) のアミノ酸配列

【0041】

配列番号13ー*Oecophylla smaragdina* のシルクフィブロイン1 (F1またはGAF1とも呼ばれる) の核酸配列

【0042】

配列番号14ー*Oecophylla smaragdina* のシルクフィブロイン2

50

(F 2 または G A F 2 と呼ばれる) の核酸配列

【0043】

配列番号 15 - *Oecophylla smaragdina* のシルクフィブロイン 3

(F 3 または G A F 3 と呼ばれる) の核酸配列

【0044】

配列番号 16 - *Oecophylla smaragdina* のシルクフィブロイン 4

(F 4 または G A F 4 と呼ばれる) の核酸配列

【0045】

配列番号 17 - *Apis cerana* (トウヨウミツバチ) のシルクフィブロイン 1
のアミノ酸配列

10

【0046】

配列番号 18 - *Apis cerana* のシルクフィブロイン 2 のアミノ酸配列

【0047】

配列番号 19 - *Apis cerana* のシルクフィブロイン 3 のアミノ酸配列

【0048】

配列番号 20 - *Apis cerana* のシルクフィブロイン 4 のアミノ酸配列

【0049】

配列番号 21 - *Oecophylla smaragdina* のシルクフィブロイン 1
のアミノ酸配列

【0050】

20

配列番号 22 - *Oecophylla smaragdina* のシルクフィブロイン 2
のアミノ酸配列

【0051】

配列番号 23 - *Oecophylla smaragdina* のシルクフィブロイン 3
のアミノ酸配列

【0052】

配列番号 24 - *Oecophylla smaragdina* のシルクフィブロイン 4
のアミノ酸配列

【0053】

配列番号 25 - *Polistes dominula* (ヨーロッパアシナガバチ) のシ
ルクフィブロイン 1 のアミノ酸配列

30

【0054】

配列番号 26 - *Polistes dominula* のシルクフィブロイン 2 のアミノ
酸配列

【0055】

配列番号 27 - *Polistes dominula* のシルクフィブロイン 3 のアミノ
酸配列

【0056】

配列番号 28 - *Polistes dominula* のシルクフィブロイン 4 のアミノ
酸配列

40

【0057】

配列番号 29 - *Apis dorsata* (オオミツバチ) のシルクフィブロイン 1 の
アミノ酸配列

【0058】

配列番号 30 - *Apis dorsata* のシルクフィブロイン 2 のアミノ酸配列

【0059】

配列番号 31 - *Apis dorsata* のシルクフィブロイン 3 のアミノ酸配列

【0060】

配列番号 32 - *Apis dorsata* のシルクフィブロイン 4 のアミノ酸配列

【0061】

50

- 配列番号 33 - *Apis florea* (コミツバチ) のシルクフィブロイン 1 のアミノ酸配列
【0062】
- 配列番号 34 - *Apis florea* のシルクフィブロイン 2 のアミノ酸配列
【0063】
- 配列番号 35 - *Apis florea* のシルクフィブロイン 3 のアミノ酸配列
【0064】
- 配列番号 36 - *Apis florea* のシルクフィブロイン 4 のアミノ酸配列
【0065】
- 配列番号 37 - *Apis mellifera* のシルクフィブロイン 1 のアミノ酸配列 10
【0066】
- 配列番号 38 - *Apis mellifera* のシルクフィブロイン 2 のアミノ酸配列
【0067】
- 配列番号 39 - *Apis mellifera* のシルクフィブロイン 3 のアミノ酸配列
【0068】
- 配列番号 40 - *Apis mellifera* のシルクフィブロイン 4 のアミノ酸配列
【0069】
- 配列番号 41 - *Bombus impatiens* (東洋で一般的なマルハナバチの一種) のシルクフィブロイン 2 のアミノ酸配列 20
【0070】
- 配列番号 42 - *Bombus terrestris* (セイヨウオオマルハナバチ) のシルクフィブロイン 1 のアミノ酸配列
【0071】
- 配列番号 43 - *Bombus terrestris* のシルクフィブロイン 2 のアミノ酸配列
【0072】
- 配列番号 44 - *Bombus terrestris* のシルクフィブロイン 3 のアミノ酸配列
【0073】
- 配列番号 45 - *Bombus terrestris* のシルクフィブロイン 4 のアミノ酸配列 30
【0074】
- 配列番号 46 - *Camponotus floridanus* (フロリダオオアリ (*florida carpenter ant*)) のシルクフィブロイン 2 のアミノ酸配列
【0075】
- 配列番号 47 - *Camponotus floridanus* のシルクフィブロイン 3 のアミノ酸配列
【0076】
- 配列番号 48 - *Camponotus floridanus* のシルクフィブロイン 4 のアミノ酸配列 40
【0077】
- 配列番号 49 - *Harpegnathos saltator* (インドクワガタアリ) (インドのジャンプするアリ及びまたは *Jerdon* のジャンプするアリ) のシルクフィブロイン 1 のアミノ酸配列
【0078】
- 配列番号 50 - *Harpegnathos saltator* のシルクフィブロイン 2 のアミノ酸配列
【0079】
- 配列番号 51 - *Harpegnathos saltator* のシルクフィブロイン 3 のアミノ酸配列 50

- 【0080】
配列番号52-Harpegnathos saltatorのシルクフィブロイン4
のアミノ酸配列
- 【0081】
配列番号53-Myrmecia forficata (ブルドッグアリ)のシルクフ
ィブロイン1のアミノ酸配列
- 【0082】
配列番号54-Myrmecia forficataのシルクフィブロイン2のアミ
ノ酸配列
- 【0083】 10
配列番号55-Myrmecia forficataのシルクフィブロイン3のアミ
ノ酸配列
- 【0084】
配列番号56-Myrmecia forficataのシルクフィブロイン4のアミ
ノ酸配列
- 【0085】
配列番号57-Megachile rotundata (アルファルファハキリバチ
)のシルクフィブロイン2のアミノ酸配列
- 【0086】 20
配列番号58-Megachile rotundataのシルクフィブロイン3のア
ミノ酸配列
- 【0087】
配列番号59-Megachile rotundataのシルクフィブロイン4のア
ミノ酸配列
- 【0088】
配列番号60-Osmia cornuta (ツツハナバチ (builder bee
))のシルクフィブロイン2のアミノ酸配列
- 【0089】
配列番号61-Osmia cornutaのシルクフィブロイン4のアミノ酸配列
- 【0090】 30
配列番号62-Vespa similima xanthoptera (キイロス
ズメバチ)のシルクフィブロイン1のアミノ酸配列
- 【0091】
配列番号63-Vespa similima xanthopteraのシルクフ
ィブロイン2のアミノ酸配列
- 【0092】
配列番号64-Vespa similima xanthopteraのシルクフ
ィブロイン3のアミノ酸配列
- 【0093】
配列番号65-Vespa similima xanthopteraのシルクフ 40
ィブロイン4のアミノ酸配列
- 【0094】
配列番号66-Vespa analis (コガタスズメバチ)のシルクフィブロイン
1のアミノ酸配列
- 【0095】
配列番号67-Vespa analisのシルクフィブロイン2のアミノ酸配列
- 【0096】
配列番号68-Vespa analisのシルクフィブロイン3のアミノ酸配列
- 【0097】
配列番号69-Vespa analisのシルクフィブロイン4のアミノ酸配列 50

【0098】

配列番号70-Vespa mandarinia (オオスズメバチ) のシルクフィブロイン1のアミノ酸配列

【0099】

配列番号71-Vespa mandarinia のシルクフィブロイン2のアミノ酸配列

【0100】

配列番号72-Vespa mandarinia のシルクフィブロイン3のアミノ酸配列

【0101】

配列番号73-Vespa mandarinia のシルクフィブロイン4のアミノ酸配列

【0102】

配列番号74-Tenodera australasiae のタンパク質、カマキリフィブロイン1のアミノ酸配列

【0103】

配列番号75-Tenodera australasiae のタンパク質、カマキリフィブロイン2のアミノ酸配列

【0104】

配列番号76-Archimantis monstrosa のシルクフィブロイン1のアミノ酸配列

【0105】

配列番号77-Archimantis monstrosa のシルクフィブロイン2のアミノ酸配列

【0106】

配列番号78-Pseudomantis albofimbriata のシルクフィブロイン1のアミノ酸配列

【0107】

配列番号79-Pseudomantis albofimbriata のシルクフィブロイン2のアミノ酸配列

【0108】

配列番号80～82-オリゴヌクレオチドのプライマー。

【発明を実施するための形態】

【0109】

本発明は、一部は、コイルドコイル構造を有するポリペプチドは、キレート剤及び金属イオンを含むキレートを結合することができるという特性評価に基づいている。例えば、本願発明者らは、コイルドコイル構造を有するシルクポリペプチドはキレートを結合して、そのキレートの金属イオンに配位することができることを実証した。さらに、本願発明者らは、キレートの金属イオンの配位により、UV可視スペクトルのピーク（例えば、ソーレー帯ピーク）の位置をシフトさせることができることを実証した。本願発明者らは、ポリペプチドに結合しているキレートを結合できる分子が結合すると、検出可能な変化が生じ、これを、対象分子の検出に使用され得るセンサー、例えばバイオセンサーの基盤として使用できることも示した。

【0110】

したがって、第1の態様では、本発明は、少なくとも一部分にコイルドコイル構造を有するポリペプチドと、キレート剤及び金属イオンを含み、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に結合しているキレートとを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、キレート剤は、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に結合している。いくつかの実施形態では、金属イオンを、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に配位結合により結合させる。いくつかの実施形態では、金属イオンは、ポリペプチドの少なくとも1個

10

20

30

40

50

のアミノ酸に配位結合で結合しており、キレート剤は、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に結合している。

【0111】

有利なことに、本発明の組成物は、材料、好ましくは水不溶性の材料を形成するために処理されてよく、また、長期間、室温で高度に安定している。いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び本発明の組成物で形成した材料は、対象分子に可逆的に結合できる。重要なことに、本発明の組成物、及びかかる組成物で形成した材料は、対象分子を結合及び／または検出する能力を長期間にわたり保持する。

【0112】

ポリペプチド

本明細書で使用する場合、用語「ポリペプチド」には、あらゆる長さのアミノ酸ポリマーが含まれる。タンパク質は直鎖または分岐であってよく、修飾アミノ酸を含んでよく、かつ、アミノ酸以外のもので中絶されてよい。かかる用語には、自然に、または介入によって修飾されたアミノ酸ポリマー、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、または標識成分との複合体形成のような他の任意の操作または修飾を受けたアミノ酸ポリマーも包含される。また、例えば、アミノ酸の類似体（例えば、非天然型（unnatural）または非天然型（non-natural）アミノ酸など）の1つ以上、及び当技術分野で公知の他の修飾を含有するタンパク質も含まれる。タンパク質は一本鎖として、または会合した鎖として生じ得る。会合した鎖は、非共有結合相互作用または共有結合相互作用により連結されていてよい。一実施形態では、ポリペプチドは天然に生じるアミノ酸の鎖である。

【0113】

本発明に有用なポリペプチドは、さまざまな手段（例えば、原料からの単離及び精製、組換え発現、細胞培養からの精製、化学合成など）、かつ、さまざまな形態（例えば、天然型、融合形態、非グリコシル化形態、脂質付加形態など）で調製することができる。好ましくは、それらを実質的に純粋な形（すなわち、実質的に宿主細胞のタンパク質を含まない）で調製する。典型的に、存在する総タンパク質の少なくとも60重量%である場合、そのポリペプチドは実質的に純粋である。例えば、調製物は、存在する総タンパク質の少なくとも75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、より好ましくは、少なくとも90重量%である。一実施形態では、組換え手段、例えば、酵母細胞または細菌細胞などの好適な宿主細胞に発現させることによりポリペプチドを作製する。

【0114】

本明細書で使用する場合、「部分」とは、ポリペプチドの一部を指し、該ポリペプチドの完全長に定義された特性または活性を維持するものと理解される。例えば、コイルドコイル構造を形成する能力を有し、かつ／またはシルクタンパク質の特性のいずれか1つ以上を再現する能力を有する。

【0115】

本明細書に開示するように、ポリペプチドの少なくとも一部分は、コイルドコイル構造を形成してよい。コイルドコイル構造は、ロープの撚り糸のように共に巻き付く少なくとも2つのアルファヘリックスを含む。コイルドコイル構造は、2つから7つのアルファヘリックス、例えば2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたは7つのアルファヘリックスを含んでよい。いくつかの実施形態では、コイルドコイル構造は、3つ、つ4または5つのアルファヘリックスを含む。コイルドコイル構造は、鎖内または鎖間の相互作用により形成してよい。

【0116】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドのコイルドコイル構造を有する一部分は、少なくとも35個のアミノ酸、少なくとも42個のアミノ酸、少なくとも49個のアミノ酸、

少なくとも56個のアミノ酸、少なくとも63個のアミノ酸、少なくとも70個のアミノ酸、少なくとも77個のアミノ酸、少なくとも84個のアミノ酸、少なくとも91個のアミノ酸、少なくとも98個のアミノ酸、少なくとも105個のアミノ酸、少なくとも112個のアミノ酸、少なくとも119個のアミノ酸、少なくとも126個のアミノ酸、少なくとも133個のアミノ酸、少なくとも140個のアミノ酸、少なくとも147個のアミノ酸、少なくとも154個のアミノ酸、少なくとも161個のアミノ酸、少なくとも168個のアミノ酸、少なくとも175個のアミノ酸、少なくとも182個のアミノ酸、少なくとも189個のアミノ酸、少なくとも196個のアミノ酸、少なくとも203個のアミノ酸、少なくとも210個のアミノ酸または少なくとも217個のアミノ酸を含む。一実施形態では、ポリペプチドのコイルドコイル構造を有する一部分は、約35～約500個のアミノ酸を含む。

10

【0117】

いくつかの実施形態では、コイルドコイル構造にあるアミノ酸のうち少なくとも16%はアラニン残基である。例えば、コイルドコイル構造にあるアミノ酸のうち少なくとも18%、少なくとも20%、少なくとも22%、少なくとも24%、少なくとも26%、少なくとも28%または少なくとも30%はアラニン残基である。

【0118】

典型的に、アルファヘリックスは、らせん一回転あたり約3.6個のアミノ酸残基を含む。コイルドコイル構造を形成できるアルファヘリックスの場合、ポリペプチドまたはポリペプチドの一部がアルファヘリックスのコンホメーションをとった時に、疎水性アミノ酸残基と親水性アミノ酸残基がそれぞれ、らせんの別々の面に隔離されて両親媒性構造を形成するよう、疎水性アミノ酸残基と親水性アミノ酸残基とがペプチドの直鎖配列に沿って配されている。アルファヘリックスにおける疎水性アミノ酸残基と親水性アミノ酸残基の隔離は、らせんの車輪投影図(helical wheel)にして見る事ができる。コイルドコイル構造を形成できるアルファヘリックスのペプチド構築には特定の疎水性アミノ酸残基及び親水性アミノ酸残基が好ましい。天然に生じる疎水性アミノ酸残基は、Leu、Ala、Ile、Val及びPheである。天然に生じる好ましい親水性アミノ酸残基は、Ser、Glu、Lys、Gln及びAspである。当業者には理解されるように、コイルドコイル構造を形成できるポリペプチド配列はさまざまに異なり得る。ポリペプチド配列の各種アミノ酸の多数の組み合わせ及び順列により、両親媒性アルファヘリックス作製の効果を達成できるため、別のポリペプチドと会合させてコイルドコイルを形成できる。例えば、いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドによって形成されるコイルドコイルのコアではセリンは一般的であり、他のコイルドコイルでは一般的ではない。

20

30

【0119】

コイルドコイル構造を形成できるポリペプチドは通常7アミノ酸配列a b c d e f gの繰り返しを含む。一実施形態では、ポリペプチドは、7アミノ酸配列a b c d e f gを少なくとも5コピー含む一部分を含む。本発明に有用なポリペプチドは、7アミノ酸繰り返しを4より大きい任意の数で含んでよい。例えば、ポリペプチドは、7アミノ酸配列a b c d e f gを少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、少なくとも38、少なくとも39、少なくとも40、少なくとも41、少なくとも42、少なくとも43、少なくとも44、少なくとも45、少なくとも46、少なくとも47、少なくとも48、少なくとも49、少なくとも50、またはそれ以上のコピー数を含むコイルドコイル構造を有する一部分を含んでよい。ある特定の例では、ポリペプチドは、7アミノ酸配列a b c d e f gの少な

40

50

くとも19、または少なくとも23のコピーを含むコイルドコイル構造を有する一部分を含む。

【0120】

一実施形態では、本発明に有用なポリペプチドは、約15～約25、または約19～約23のような約9～約30の7アミノ酸繰り返し、または約19～約23の繰り返しを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、22～28の繰り返しを含むコイルドコイル構造を有する一部分を含む。

【0121】

7アミノ酸繰り返しは、ポリペプチド配列において連続していてもよいし、ポリペプチド配列において連続していなくてもよい。したがって、ポリペプチドは、7アミノ酸配列を何回でも連続して含んでよいが、ポリペプチド中の7アミノ酸配列の総数は少なくとも5である。好ましくは、ポリペプチドは、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25またはそれ以上連続する7アミノ酸配列を含む。一例では、ポリペプチドは、少なくとも19、例えば、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、または少なくとも23の連続する7アミノ酸配列を含む。別の例では、ポリペプチドは約10～約30、例えば、約15～約25、または約19～約23の連続する7アミノ酸繰り返しを含む。好ましくは、ポリペプチドは、約19または約23の連続する7アミノ酸繰り返しを含む。

【0122】

7アミノ酸繰り返しは、本発明に有用なポリペプチドの任意の部分を含んでよい。例えば、複数の7アミノ酸繰り返しは、ポリペプチドの少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%の長さ、またはポリペプチド全体を含んでよい。

【0123】

別の例では、複数の7アミノ酸繰り返しは、ポリペプチドの約60%～約90%、例えば、約70%～約80%を含んでよい。したがって、ポリペプチドの約60%～約90%、例えば、約70%～約80%はコイルドコイル構造を含んでよい。

【0124】

古典的コイルドコイルでは、a位置及びd位置のアミノ酸は疎水性残基、例えば、限定されることなく、アラニン、イソロイシン、ロイシンまたはバリンである。これらのアミノ酸は概して、7アミノ酸配列の他の位置のアミノ酸より疎水性の傾向にある。これにより、疎水性相互作用及びファンデルワールス相互作用を介したコイルドコイル形成が安定化すると考えられる。アミノ酸残基の疎水性は、当技術分野で公知のいずれの方法でも決定することができる。例えば、疎水性は、アミノ酸側鎖の物理化学的特性に基づいて予測可能できるが、あるアミノ酸を非混和性の2液相間で分離させて決定してよい。これらの方法を使用して天然に生じるアミノ酸それぞれの相対的疎水性を決定した結果、いくつかの疎水性尺度が作成され公知である（あくまでも例として、Kallol et al., 2003; Kyte and Doolittle, 1982; Eisenberg, 1984; Rose and Wolfenden, 1993を参照されたい）。これら、または他の公知の任意の疎水性尺度を使用して、7アミノ酸配列a b c d e f gの各位置に存在するアミノ酸の疎水性（したがって、平均疎水性）を決定できる。一例では、Eisenbergスケールにしたがってアミノ酸疎水性を決定する。特定の例では、7アミノ酸配列の位置a及び／またはdにおけるアミノ酸の平均疎水性は、Eisenbergスケールにしたがうと正であり、7アミノ酸配列の残りの位置におけるアミノ酸の平均

疎水性はEisenbergスケールにしたがうと負である。一般に、アミノ酸のシステイン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン及びバリンは他のアミノ酸よりも疎水性であると考えられる。芳香族アミノ酸も、一般に、非芳香族アミノ酸よりも疎水性であると考えられる。

【0125】

e位置及びg位置のアミノ酸は、荷電した、例えば、限定されることなく、グルタマートまたはリシンであってよい。これは、コイルドコイル構造を安定させるヘリックス間の静電的相互作用形成を促進すると考えられる。b位置、c位置及びf位置のアミノ酸は、これらのアミノ酸が溶媒に曝露されることが多いことから親水性の傾向がある。ただし、上記はあくまでも指針に過ぎず、当業者であれば、特異性、新規機能、オリゴマー形成等を促進するために、a、b、c、d、e、f及びgのいずれの位置においても変更が生じ得ることを認識するであろう。

10

【0126】

本発明の一実施形態では、7アミノ酸配列の位置a及び／またはdのアミノ酸は、アラニン、セリン、イソロイシン、ロイシンまたはバリンから選択され、好ましくはセリンまたはアラニンである。

【0127】

一実施形態では、本発明に有用なポリペプチドにおける7アミノ酸繰り返しの位置aにあるアミノ酸のうち少なくとも15%はアラニン残基である。例えば、位置aにあるアミノ酸のうち少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれ以上がアラニン残基であってよい。好ましくは、本発明に有用なポリペプチドにおける7アミノ酸繰り返しの位置aにあるアミノ酸のうち少なくとも45%はアラニン残基である。

20

【0128】

別の例では、本発明に有用なポリペプチドにおける7アミノ酸繰り返しのa位置にあるアミノ酸のうち約30%～約70%、例えば、約40%～約60%、または約45%～約55%はアラニン残基である。一例では、本発明に有用なポリペプチドにおける7アミノ酸繰り返しの位置aにあるアミノ酸のうち約50%はアラニン残基である。

30

【0129】

7アミノ酸繰り返しの位置a及びd位置におけるアラニンの相対的割合はさまざまに異なり得るが、位置a及び位置dにあるアミノ酸のうち少なくとも15%はアラニン残基である。したがって、本発明に有用なポリペプチドは、位置aにあるアミノ酸のうち少なくとも25%がアラニン残基である7アミノ酸繰り返しを含むことができる。

【0130】

7アミノ酸繰り返しそれぞれを構成するアミノ酸の組成は、同一であってもよいし、7アミノ酸配列間で異なってもよい。当業者により理解されるように、7アミノ酸配列a b c d e f gの各種アミノ酸の多数の組み合わせ及び順列により、コイルドコイル構造を作製する同じ効果を達成できるため、別のポリペプチドと会合させてコイルドコイルを形成できる。本明細書に開示するポリペプチドに対して可能なアミノ酸置換に関する指針を、あくまでも例として表1に記載する。本明細書で提供する実験データに基づいて予測された有用なアミノ酸置換と、表1で提供する置換例とが矛盾する場合は、実験データに基づいた置換を使用することが好ましい。

40

【0131】

さらに、ポリペプチドは、コイルドコイル構造形成能を維持したままで、各7アミノ酸繰り返し内部及び／または各7アミノ酸繰り返し同士の間特定の破壊を含んでよい。例えば、なおもコイルドコイル構造を形成するようにしたままで、1個以上のアミノ酸により7アミノ酸配列を切断するか、または1個以上のアミノ酸により伸長させてよい。した

50

がって、上述のように、7アミノ酸配列 a b c d e f g の2コピーを1個以上のアミノ酸によって区切り、なおもコイルドコイル構造を形成するようにしてよい。

【0132】

ポリペプチドの任意の部分にコイルドコイル構造を含んでよい。例えば、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、またはポリペプチド全体が、コイルドコイル構造を含んでよい。一例では、ポリペプチドが少なくとも70%コイルドコイル構造を含む。

10

【0133】

それ以外のコイルドコイル構造を形成しないポリペプチド部分は、任意のタンパク質二次構造を形成できるか、または、構造化されなくてよい。例えば、ポリペプチドの残部は、ランダムコイル、アルファヘリックス、ベータ鎖、及び／またはベータシート等を形成してよい。

【0134】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドの少なくとも一部分はベータシートを形成してよい、またはベータシートを形成することができる。ベータシートは、主鎖水素結合により連結されているベータ鎖を含む。ベータシートは、少なくとも2つのベータ鎖を含んでよい。例えば、本明細書に記載する材料では、ポリペプチドの少なくとも一部分はベータシートを形成してよい。ベータシートは、ベータ鎖同士の鎖内または鎖間の相互作用により形成されてよい。

20

【0135】

本願発明者らは、シルクポリペプチドがキレート剤及び金属イオンを含むキレートに結合できることを実証した。したがって、一態様では、ポリペプチドはシルクポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、*aculeate Hymenoptera*（膜翅目有剣類）に由来するシルクタンパク質（組換えシルクタンパク質を含む）であるか、またはその変異体である。膜翅類の例には、細腰亜目（ハチ、アリ及びスズメバチ）の任意の種が含まれるが、これに限定されるものではなく、それらに含まれる昆虫の科として、*Chrysididae*（セイボウ）、*Formicidae*（アリ）、*Mutillidae*（アリバチ）、*Pompilidae*（ベッコウバチ）、*Scoliidae*、*Vespidae*（アシナガバチ、トクリバチ、スズメバチ）、*Aganidae*（イチジクコバチ）、*Chalcididae*（アシブトコバチ）、*Eucharitidae*（アリヤドリコバチ）、*Eupelmidae*（ナガコバチ）、*Pteromalidae*（コガネコバチ）、*Evaniidae*（ヤセバチ）、*Braconidae*、*Ichneumonidae*（ヒメバチ）、*Megachilidae*、*Apidae*、*Colletidae*、*Halictidae*、及び*Melittidae*（ケアシハナバチ（oil collecting bee））が挙げられる。例えば、膜翅目は、*Apis mellifera*（一般名にはミツバチが含まれる）、*Apis dorsata*、*Apis florea*、*Oecophylla smaragdina*（一般名にはツムギアリ（weaver ant）及びツムギアリ（green ant）が含まれる）、*Polistes dominula*、*Megachile rotundata*、*Myrmecia forficata*、*Camponotus floridanus*、*Harpegnathos saltator*、*Osmia cornuta*、*Vespa similima xanthoptera*、*Vespa analis*、*Vespa mandarina*、*Bombus impatiens*または*Bombus terrestris*であってよいが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、網翅目に由来するシルクタンパク質（組換えシルクタンパク質を含む）であるか、またはその変異体である。例えば、網翅目は、*Pseudomantis albobimbrata*、*Tenodera australasiae*

30

40

50

または *Archimantis monstrosa* であってよいが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、脈翅目に由来するシルクタンパク質（組換えシルクタンパク質を含む）であるか、またはその変異体である。脈翅類の例に含まれる昆虫科の種には、カマキリモドキ (*Walker et al.*, 2012 を参照されたい)、*Chrysopidae* (クサカゲロウ)、*Myrmeleontidae* (ウスバカゲロウ)、及び *Ascalaphidae* (ツノトンボ) が挙げられる。例えば、脈翅目は *Mallada signata* であってよいが、これに限定されない。このようなタンパク質の例は、WO2007/038837 及び WO2013/142901 に記載されている。これらのシルクポリペプチドには、発酵を利用して容易に高レベルで発現させることができるという利点がある（少なくとも 1 g / リットル）。

10

【0136】

好ましい実施形態では、本発明に有用なポリペプチドは、膜翅目もしくは脈翅目の種から精製され得るか、または膜翅目もしくは脈翅目の種から精製されたポリペプチドの変異体である。好ましくは、膜翅目の種は *Apis mellifera* である。

【0137】

いくつかの実施形態では、本発明に有用なポリペプチドは、ツムギアリの種から精製され得るか、またはツムギアリの種から精製されたポリペプチドの変異体である。好ましくは、ツムギアリの種は *Oecophylla smaragdina* である。

【0138】

本発明に有用なポリペプチドを、配列が以下の配列番号で提供される多数の特定タンパク質により例示する。例えば、本発明に有用なポリペプチドには、*Apis mellifera* (ミツバチ) シルクフィブロイン 1 (*AmelF1* または *Xenospiral* と呼ばれる) (配列番号 1)、*A. mellifera* シルクフィブロイン 2 (*AmelF2* または *Xenospira2* と呼ばれる) (配列番号 2)、*A. mellifera* シルクフィブロイン 3 (*AmelF3* または *Xenospira3* と呼ばれる) (配列番号 3)、*A. mellifera* シルクフィブロイン 4 (*AmelF4* または *Xenospira4* と呼ばれる) (配列番号 4)、*Oecophylla smaragdina* (ツムギアリ (*weaver ant*)) シルクフィブロイン 1 (*F1*、*GA1* または *GA F1* と呼ばれる) (配列番号 9)、*O. smaragdina* シルクフィブロイン 2 (*F2*、*GA2* または *GA F2* と呼ばれる) (配列番号 10)、*O. smaragdina* シルクフィブロイン 3 (*F3*、*GA3* または *GA F3* と呼ばれる) (配列番号 11) 及び *O. smaragdina* シルクフィブロイン 4 (*F4*、*GA4* または *GA F4* と呼ばれる) (配列番号 12)、ならびに、WO2013142901 A に記載のものが挙げられるが、これに限定されるものではない。

20

30

【0139】

好ましい実施形態では、ポリペプチドは *AmelF3* である。

【0140】

別の実施形態では、ポリペプチドは *GA1* または *GA3* である。

【0141】

本明細書で使用する場合、用語「シルクタンパク質」及び「シルクポリペプチド」は同義で使用され、シルクファイバー、シルクフィルム、シルクスポンジ、シルク粒子及び／または線維状タンパク質複合体といった材料の製造に使用することができる、線維状のタンパク質／ポリペプチドを意味する。典型的に、シルクタンパク質は、組換え発現により作製されるであろう。ただし、シルクタンパク質は、天然原料から精製するか、または人工的に、例えば、ペプチド固相合成法等などによって作製することができる。シルクタンパク質は、天然に生じるシルクタンパク質に対応する配列を有してよく、または人為的に作製したその変異型である。このような変異型は、小規模の置換、欠失及び付加を含むだけでなく、天然型配列の大幅な再構成も包含し、その場合、例えば、複数の 7 アミノ酸は並べ替えられ、天然型タンパク質のアミノ酸一次配列に対する類似性はまったくなく、その 7 アミノ酸構造ゆえに依然として機能するシルクタンパク質である。

40

50

【0142】

上述のように、本願発明者らは、本明細書に記載するポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸はキレートに結合できることを実証した。いくつかの実施形態では、本明細書に記載するポリペプチドは、本明細書に記載する少なくとも1つのキレートに結合することができる。他の実施形態では、本明細書に記載するポリペプチドは、本明細書に記載する2つ以上のキレートに結合することができる。

【0143】

したがって、本明細書に記載するポリペプチドは、少なくとも1つのキレート結合部位を含む。例えば、キレートがヘムである場合、キレート剤が結合する部位はヘムの結合部位である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載するポリペプチドは、2つ以上のキレート結合部位を含む。

10

【0144】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載するポリペプチドは、本明細書に記載する少なくとも1つのキレート剤に結合することができる。他の実施形態では、本明細書に記載するポリペプチドは、本明細書に記載する2つ以上のキレート剤に結合することができる。いくつかの実施形態では、本発明に有用なポリペプチドは、キレート剤に結合できる少なくとも1つの荷電した残基を含む。荷電した残基は、アルギニン、リシン、グルタマート及びアスパルタートを含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、キレート剤に結合しているアミノ酸残基の少なくとも1つは、アルギニンまたはリシンのような正に荷電したアミノ酸である。いくつかの実施形態では、キレート剤に結合しているアミノ酸残基の少なくとも1つはアルギニンである。いくつかの実施形態では、キレート剤に結合しているアミノ酸残基の少なくとも1つは、配位結合により金属イオンに結合している少なくとも1個のアミノ酸残基から最高で12 Åに位置する荷電した残基である。

20

【0145】

さらに、本願発明者らは、いくつかの実施形態において、金属イオンは、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に配位結合によって結合していることを実証した。本明細書で使用する用語「配位結合 (coordinate bond)」とは、2中心、2電子の一種の共有結合で、その2つの電子が同一原子に由来するものを指す。配位結合は、双極子結合 (dipolar bond) または付与共有結合 (dative covalent bond) とも呼ばれ得る。

30

【0146】

一実施形態では、コイルドコイル部分のコアは、コアにおける7アミノ酸のアミノ酸位置a及び/またはdにおいて少なくとも1つ、または2つ、または3つ、または4つまたはそれ以上の配位アミノ酸残基を含む。コイルドコイルタンパク質の「コア」は当技術分野において周知である (Lupas and Gruber, 2005)。コイルドコイル領域はアルファヘリックスを形成し、このようなヘリックスの2つ以上が疎水性残基を内側に互いに巻き付き、細く長い疎水性コアを形成している。したがって、コイルドコイルのコアはコアの外側よりも疎水性である。

【0147】

一実施形態では、ポリペプチドには、1個の配位アミノ酸残基が含まれる。一実施形態では、ポリペプチドには、2個の配位アミノ酸残基が含まれる。一実施形態では、ポリペプチドには、3個の配位アミノ酸残基が含まれる。一実施形態では、ポリペプチドには、4個の配位アミノ酸残基が含まれる。いくつかの実施形態では、配位アミノ酸は、ヒスチジン、システイン、メチオニン、チロシン、リシンまたはトリプトファンからなる群から選択される。

40

【0148】

ポリペプチド内に存在するアミノ酸残基で、かつ残基が、金属イオン-キレート剤錯体との配位性の接触を提供するアミノ酸残基を、本明細書では配位アミノ酸または配位残基という。ポリペプチドにおける配位アミノ酸としての使用に好適なアミノ酸には、金属タンパク質の金属陽イオンに対する配位子を提供することが当技術分野で公知の天然に生じ

50

るアミノ酸が含まれ、それらにはH i s、C y s、M e t、L y s、T r p、G l u及びT y rが挙げられる。ポリペプチドにおける配位アミノ酸残基としての使用に好適なアミノ酸には、金属陽イオンに対する配位子を提供することが当技術分野で公知の天然には生じないアミノ酸も含まれる。そのような天然には生じないアミノ酸には、(2, 2-ビピリジン-5-イル)アラニン(B p y-A l a)、(8-ヒドロキシキノリン-3-イル)アラニン、2-アミノ-3-[4-ヒドロキシ-3-(1H-ピラゾール-1-イル)フェニル]プロパン酸(p y T y r)及び2-アミノ-3-(8-ヒドロキシキノリン-5-イル)プロパン酸(H q A l a)を挙げてよいが、これに限定されるものではない。

【0149】

例えば、本願発明者らは、水メタノールに溶解させたヘムb(ヘモグロビン及びシトクロムP450に見られる)溶液をミツバチのシルクスポンジに加えた時、灰色がかった緑色のヘムb溶液が直ちにスポンジに吸収され、スポンジの色が数秒以内に赤変したことを実証する。ミツバチのシルクのこの赤色呈色はシルク-ヘム材料を徹底的に洗浄した後もそのままであった。ミツバチのシルクで観察された変色は、ヘム基内部の鉄金属中心の配位における変化を指し、赤いヘモグロビンと同様の配位をする材料が作製されたことを指す。さらには、ヘム基は、シルクタンパク質基質内部に結合したまま残り、洗い流せなかったことから、ヘム基がタンパク質基質内部に保持されたことが示された。やや意外なことに、ミツバチのシルクは、修飾せずともそのまま、天然に生じるヘムタンパク質と同様にヘム補因子と結合及び配位できた。

【0150】

鉄中心の配位を試験するため、ミツバチの透明なシルクフィルムを調製し、UV/V i s分光法を用いて材料のスペクトル特性を監視した。シルクタンパク質とヘムbの溶液の共乾燥を介して、または予備形成したフィルムをヘムbの溶液に一晩浸漬して該フィルムにヘムbを「溶出」させることによりヘムbを導入した。ヘムタンパク質は、そのUV/V i sスペクトル約400nmにおいて特徴的なソーレー帯ピークを有するが、これはヘムの鉄原子の配位変化に対して感度が極めて高い。ヘムbなど鉄ポルフィリンの場合、400nmより下の幅広いソーレー帯ピークは、鉄がポルフィリン環にのみ配位している4配位鉄中心を指す。ヘム基がアミノ酸に配位すると(5配位鉄中心)、ソーレー帯の赤は400nmより上にシフトし先鋭化する。ミツバチのシルク-ヘムbフィルムの紫外可視スペクトルは410nmで先鋭なソーレー帯ピークを示し、そのヘム中心鉄がミツバチのシルクタンパク質に配位されていることが確認される。

【0151】

したがって、本発明は、少なくとも一部分にコイルドコイル構造を有するポリペプチドと、キレート剤及び金属イオンを含むキレートとを含む組成物であって、キレートはポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に結合しており、金属イオンはポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に配位結合によって結合している組成物も提供する。

【0152】

シルクタンパク質はヒスチジン、メチオニンのシステインのような典型的な配位残基を含有していないので、ミツバチの非修飾シルクタンパク質へのヘムbの配位は予想外のことであった。配位アミノ残基の性質を決定するため、本願発明者らは、シルクタンパク質に加えるヘムb量をさまざまに変えてラマン分光法を使用してヘム結合の化学量論を検討した。ヘム低負荷では(ヘム:タンパク質のモル比が1:1及び1:2)、410nmで先鋭なソーレー帯ピークが観察され、全ヘムの配位が示された。タンパク質に対するヘムbの濃度が高くなるにつれ、ソーレー帯ピークは幅広になり、かつ波長の低い方へシフトしたことから、配位していないヘム量の増加が示された。ヘム:シルク比1:1で全ヘムが配位したという知見から、各シルク単量体内部の1個のアミノ酸が配位に関与することが示唆された。

【0153】

ポリペプチドの配位アミノ酸の同一性をラマン分光法を使用して検討した。ラマン分光法は、鉄中心と配位する配位子との間の伸縮振動数を測定するもので、これらの伸縮振動

数から配位子の性質が示される。励起波長 785 nm で励起したシルク-ヘムフィルムのラマンスペクトルは、 594 cm^{-1} に中心がある幅広いピークを示し、これはシルク-ヘムフィルムに特異的なものであった。配位性配位子チロシンを有するヘムタンパク質は、同様の Fe-Tyr 伸縮を示す。ミツバチの組換え成熟シルクタンパク質 3（配列番号 39）は、予測コイルドコイルのコア内に位置する 1 個のチロシン残基（ Tyr 76 ）を含有する。ラマンスペクトルから、 Tyr 76 は、ヘム中心に配位する可能性が最も高い候補であることが示された。

【0154】

Tyr 76 が実際に配位する配位子であるのか否かを試験するため、シルク遺伝子の部位特異的突然変異誘発を使用して Tyr 76 をアラニンで置換した。 Tyr 76 Ala 置換タンパク質の UV/Vis スペクトルが 395 nm において幅広いソーレー帯ピークを有していたことから、ミツバチの非修飾シルクで認められた配位はこの単一アミノ酸置換によって逆転したことが示された。 Tyr 76 Ala シルクタンパク質を使用して調製したスポンジにヘム b を加えたところ、著明な変色は観察されなかったが、ヘム b の緑色是水メタノールで洗浄しても消えないことから、ヘム b 補因子は水素結合を介してシルクタンパク質に結合しており、シルクに配位はしていないことが示される。したがって、ポリペプチドの少なくとも 1 個のアミノ酸に金属イオンが結合することが本発明の好ましい特徴である。

【0155】

本願発明者らは、少なくとも 1 つのポリペプチドが AmelF3 ポリペプチドを含む場合、 AmelF3 の位置 76 にあるチロシン（配列番号 39）は、キレートの金属イオンと配位結合を形成することを実証した。

【0156】

空間において配位アミノ酸を取り囲むアミノ酸は、キレートの金属イオンの配位に関与していることがある。いくつかの実施形態では、隣接する極性残基または荷電した残基は、配位残基が金属イオンに配位され得るように該残基に極性を与え、かつ／または活性化に関与することがある。例えば、発明者らは、 AmelF3 の Ser 80 をアラニンに変異させてもキレート剤に対するポリペプチドの結合に影響はないが金属イオンの配位を妨げることを実証した。別の例として、発明者らは、 AmelF3 の Ser 80 は金属イオンの配位に関与することを実証した。理論に束縛されることは望まないが、セリンは配位残基に極性を与えて金属イオンに配位結合させると考えられている。

【0157】

いくつかの実施形態では、配位アミノ酸残基は、少なくとも 1 つの荷電した残基、例えば、 Asp 、 Glu 、 Lys または Arg から $20\text{ \AA}$ 以下、 $18\text{ \AA}$ 以下、 $16\text{ \AA}$ 以下 $14\text{ \AA}$ 以下、 $12\text{ \AA}$ 以下、 $10\text{ \AA}$ 以下または $8\text{ \AA}$ 以下に位置する。いくつかの実施形態では、配位アミノ酸残基は、少なくとも 1 つの極性残基、例えば、 Ser 、 Thr 、 Gln 、 Asn 、 His 、 Tyr 、 Cys 、 Met または Trp から $20\text{ \AA}$ 以下、 $18\text{ \AA}$ 以下、 $16\text{ \AA}$ 以下 $14\text{ \AA}$ 以下、 $12\text{ \AA}$ 以下、 $10\text{ \AA}$ 以下または $8\text{ \AA}$ 以下に位置する。

【0158】

一実施形態では、金属イオン結合部位及び／またはキレート剤結合部位をポリペプチド内に工学的に操作する。例えば、ランダム変異誘発または部位特異的突然変異誘発を実施してタンパク質を操作し、キレートのタンパク質への結合及び／または金属イオンの配位を可能にするために必要な残基が含有されるようにする。したがって、本発明のポリペプチドをコードする単離された、またはベクターに組み込んだ DNA 配列を使用して、本発明に有用なポリペプチドを作製することができる。その後、この配列を細胞に発現させ、ポリペプチドを細胞から精製する。（あるいは、ペプチド固相合成法を使用してポリペプチドを作製することが可能である）。得られたポリペプチドはキレート結合能のあるポリペプチドであり、次いでそれを過剰のキレートとインキュベートして確実にポリペプチドと結合させる。

【0159】

一例では、成熟 A m e l F 3（配列番号 39）の位置 97にある A l a 残基を、配位アミノ酸残基、例えば、H i s、C y s、M e t、L y s、T r p、G l uまたはT y rに変異させる。ある特定の例では、A m e l F 3の位置 97にある A l a 残基をH i sに変異させる。

【0160】

別の例では、A m e l F 3の成熟形態（配列番号 39）の位置 76にあるT y r残基をH i sに変異させる。

【0161】

金属イオンは、すべてのタンパク質の3分の1に見られ、構造上及び機能上の重要な役割を果たす。金属イオン特性の調整にポリペプチドが果たす役割の解明に向けて多大な努力が払われてきている。デノボ合成の目的は、設計原理を利用して人工の機能性金属タンパク質を作製することにある。多くの研究は、天然タンパク質の足場の変異誘発を研究すること、または金属イオン部位を他のタンパク質足場に再構成すること（r e - e n g i n e e r i n g）に焦点を当ててきたが、こうした研究は天然の足場の複雑さに阻まれている。したがって、別の実施形態では、本発明の組成物の形成には、キレート剤を結合でき、かつ／または金属イオンに結合できるポリペプチドのデノボ設計（スクラッチから）が用いられる。

【0162】

一実施形態では、本発明に有用なポリペプチドは、大きさが約 29 k D a～約 45 k D aの範囲であってよい。例えば、ポリペプチドは、大きさが約 33 k D aであってよい。

【0163】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは天然ポリペプチド由来である。例えば、天然ポリペプチドを、天然または非天然型（n o n - n a t u r a l）アミノ酸の組み込みによって修飾し（本明細書において、u n n a t u r a l（非天然型）アミノ酸及びn o n - n a t u r a l（非天然型）アミノ酸という用語は同義で使用される）、キレート剤の結合及び／または金属イオンに対する結合を増強または修飾してよい。

【0164】

本願開示から理解されるように、ポリペプチドの正確なアミノ酸配列（したがって、ポリヌクレオチドの正確な核酸配列）はさまざまに異なり得るが、それでも依然として、自身または別のポリペプチドと会合してコイルドコイル形成が可能な構造を有するポリペプチドが提供される。したがって、例示される配列はあくまでも例にすぎないと考えべきであり、これらの特定の配列の有意な変形が許容されてよいことを認識されよう。

【0165】

特定の例では、ポリペプチドは、

- i) 配列番号 1～配列番号 4または配列番号 9～配列番号 12のいずれか1つに提供されるようなアミノ酸配列；及び
- i i) 配列番号 1～配列番号 4または配列番号 9～配列番号 12のうちいずれか1つ以上と少なくとも25%同一であるアミノ酸配列；及び
- i i i) i) または i i) の生物学的に活性な断片から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0166】

別の特定の例では、ポリペプチドは、

- i) 配列番号 1～配列番号 4または配列番号 9～配列番号 12または配列番号 17～配列番号 79のいずれか1つに提供されるようなアミノ酸配列；及び
- i i) 配列番号 1～配列番号 4または配列番号 9～配列番号 12または配列番号 17～配列番号 79のうちいずれか1つ以上と少なくとも25%同一であるアミノ酸配列；及び
- i i i) i) または i i) の生物学的に活性な断片から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0167】

別の特定の例では、ポリペプチドは、

10

20

30

40

50

i) 配列番号17～配列番号79のいずれか1つに提供されるようなアミノ酸配列；及び
i i) 配列番号17～配列番号79のうちいずれか1つ以上と少なくとも25%同一であるアミノ酸配列；及び
i i i) i) または i i) の生物学的に活性な断片から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0168】

ポリペプチドの%同一性は、ギャップ (Needleman and Wunsch, 1970) 分析 (GCG プログラム) を、ギャップ生成ペナルティ=5、ギャップ伸長ペナルティ=0.3 を用いて行うことにより決定する。問い合わせ配列は少なくとも50アミノ酸長であり、ギャップ分析により2つの配列の少なくとも50アミノ酸からなる領域に対してアラインメントを行う。より好ましくは、問い合わせ配列は少なくとも100アミノ酸長であり、ギャップ分析により2つの配列の少なくとも100アミノ酸からなる領域に対してアラインメントを行う。さらにより好ましくは、問い合わせ配列は少なくとも250アミノ酸長であり、ギャップ分析により2つの配列の少なくとも250アミノ酸からなる領域に対してアラインメントを行う。さらにより好ましくは、ギャップ分析により2つの配列の全長に対してアラインメントを行う。

【0169】

ポリペプチドに関して、本明細書で提供する%同一性よりも高く表されている%同一性は、好ましい実施形態に包含されることを認識されよう。したがって、適用可能な場合、最小%同一性が表されることに鑑み、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは関連する指定配列番号に対して少なくとも25%、より好ましくは少なくとも35%、より好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも45%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも55%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも91%、より好ましくは少なくとも92%、より好ましくは少なくとも93%、より好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.1%、より好ましくは少なくとも99.2%、より好ましくは少なくとも99.3%、より好ましくは少なくとも99.4%、より好ましくは少なくとも99.5%、より好ましくは少なくとも99.6%、より好ましくは少なくとも99.7%、より好ましくは少なくとも99.8%、さらにより好ましくは少なくとも99.9%同一であるアミノ酸配列を含むことが好ましい。

【0170】

本発明に有用なポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、ヌクレオチドの適切な変更を核酸内に導入すること、または所望のポリペプチドをインビトロ合成することにより調製できる。このような変異体は、例えば、アミノ酸配列内に残基の欠失、挿入または置換を含む。欠失、挿入及び置換の組み合わせを行って最終構成物に到達でき、その場合、得られた最終ポリペプチド生成物は所望の特性を有する。

【0171】

変異体 (改変型) ポリペプチドは、当技術分野で公知のいずれの手法を用いても調製可能である。例えば、本明細書に開示するポリヌクレオチドをインビトロ変異誘発に供することができる。このようなインビトロ変異誘発技術には、好適なベクター内へのポリヌクレオチドのサブクローニング、E. coli XL-1 red (ストラタジーン製) のような「変異誘発 (mutator)」株へのベクターの形質転換、及び形質転換された細菌の好適世代数での増殖が含まれる。別の例では、ポリヌクレオチドを、Harayama (1998) により概略されているDNAシャッフリング技術に供する。これらのDNAシャッフリング技術には、本明細書に記載するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでよく、本明細書に記載する遺伝子に関連する遺伝子も含まれ得る。本明細書に記載の

技術を使用して変異／改変DNA由来の生成物をすぐにスクリーニングし、それらがシルクタンパク質として使用可能か否かを決定することができる。

【0172】

アミノ酸配列変異体の設計では、変異部位の位置及び変異の性質は、修飾対象となる特性（複数可）に依存することになる。変異させる部位は、例えば、（１）最初に保守的な選択肢のアミノ酸で置換し、その後、達成された結果に応じ、より根本的な選択肢で置換する、（２）標的残基を欠失させる、または（３）位置している部位に隣接して他の残基を挿入することにより個別に、または連続して修飾可能である。

【0173】

アミノ酸配列の欠失はどの長さでもよいが、一般に、約１～１５残基の範囲、好ましくは約１～１０残基または約１～７残基、典型的には連続する約１～７残基である。

10

【0174】

置換変異体は、ポリペプチド分子内で、少なくとも１個のアミノ酸残基が除去され、かつその場所に異なる残基が挿入されている。置換による変異誘発の対象部位として可能性が高い部位には、機能上重要であると特定された部位が含まれる。他に対象となる部位は、各種の株または種から得た特定の残基が同一な部位である。これらの位置は、生物学的活性に重要な場合がある。これらの部位、特に、同一に保存された部位が他に少なくとも３つある配列内にある部位は、比較的保存的方法で置換するのが好ましい。このような保存的置換を、「例示的な置換」と題した表１に示す。

【表 1】

表 1. 例示的な置換

本来の残基	例示的な置換
Ala (A)	val ; leu ; ile ; gly ; cys ; ser ; thr
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln ; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser ; thr ; ala ; gly ; val
Gln (Q)	asn ; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro ; ala ; ser ; val ; thr
His (H)	asn ; gln
Ile (I)	leu ; val ; ala ; met
Leu (L)	ile ; val ; met ; ala ; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu ; phe ; ile
Phe (F)	leu ; val ; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr ; ala ; gly ; val ; gln ; cys
Thr (T)	ser ; gln ; ala ; cys
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp ; phe
Val (V)	ile ; leu ; met ; phe ; ala ; ser ; thr ; cys
配位しない残基 (例えば、Ala)	配位する残基 (his、cys、met、tyr、 lys、glu または trp)
配位する残基	別の配位する残基 (必要に応じ、his、 cys、met、tyr、lys、glu または trp から選択される)

【0175】

本明細書で使用する場合、ポリペプチドの「生物学的に活性な断片」は半結晶材料（すなわち、非晶質の基質内部に分子構造の規則正しい領域（微結晶）を有する材料）を形成することができるか、または形成してよい。あるいは、またはさらに、生物学的に活性な断片は、線維状分子を形成できるか、または形成してよい。したがって、生物学的に活性な断片は、シルクファイバー、シルクフィルム、シルク粉末、シルクスポンジ、シルクマット等の作製に使用され得るものであってよい。生物学的に活性な断片は、定義された活性を維持する限り、いかなる大きさのものでもあり得る。

【0176】

さらに、必要に応じ、非天然型（non-natural）アミノ酸、非天然型（unnatural）アミノ酸または化学アミノ酸類似体を、本発明に有用なポリペプチドへの置換体または付加体として導入することができる。そのようなアミノ酸には、一般的アミノ酸のD型異性体、2，4-ジアミノ酪酸、α-アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、2

ーアミノ酪酸、6ーアミノヘキサン酸、2ーアミノイソ酪酸、3ーアミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、 γ -アミノ酪酸、 γ -アミノアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸 (designer amino acid) β -メチルアミノ酸、 α -メチルアミノ酸、 N -メチルアミノ酸、及びアミノ酸類似体全般が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0177】

本発明に有用なポリペプチドは、例えば、ビオチン化、ベンジル化、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解による切断、抗体分子または他の細胞リガンドへの結合などにより、合成中または合成後、差別的に修飾することができる。これらの修正は、ポリペプチドの安定性及び／または生物活性を高めるために機能してよい。

【0178】

本発明に有用なポリペプチドは、シグナルペプチドを含んでも含まなくてもよい。したがって、これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、シグナルペプチドをコードしてもコードしなくてもよい。シグナル配列を持たない本発明に有用なポリペプチドの例を、配列番号の17～79として記載する。ポリペプチドを宿主細胞に発現中に特定の細胞位置へ向かわせる特異的シグナルペプチド (例えば、ポリペプチドが宿主細胞膜を通過して移行するのを促進する) の多くの例が当技術分野で公知である。シグナルペプチドの特定の例は、本明細書に開示する具体的な配列に提供される。ポリペプチド内のシグナルペプチド切断部位の存在及び位置を予測するために SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>にて利用可能) (Petersen et al., 2011) を使用してよい。ポリヌクレオチド及びポリペプチドに、これらの特異的シグナルペプチドを含めてもよいし、これらの特異的シグナルペプチドを含めなくてもよい。したがって、ポリペプチドは、配列番号1～配列番号4または配列番号9～配列番号12のうちいずれか1つ以上を含む配列；配列番号1～配列番号4または配列番号9～配列番号12のうちいずれか1つに対して少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、または少なくとも99.9%同一である配列を含むポリペプチド、及びその生物学的に活性な断片を含むポリペプチドを含んでよい。

【0179】

一例では、ポリペプチドは、内因性シグナルペプチドの代わりに代替的シグナルペプチドを含んでよい。

【0180】

本発明に有用なポリペプチドは、天然ポリペプチドの作製と回収、組換えポリペプチドの作製と回収、及びポリペプチドの化学合成などのさまざまな方法で作製することができる。一実施形態では、単離されたポリペプチドは、ポリペプチド発現能のある細胞をポリペプチド作製に有効な条件下で培養し、かかるポリペプチドを回収することにより作製される。培養に好ましい細胞は本明細書に開示するような組換え細胞である。有効な培養条件には、ポリペプチド生成が可能な、有効な培地、バイオリアクター、温度、pH及び酸素といった条件が挙げられるが、これに限定されるものではない。有効な培地とは、細胞を培養してポリペプチドが生成される任意の培地を指す。このような培地は、典型的に、同化し得る炭素源、窒素源及びリン酸塩源、ならびに適切な塩、ミネラル、金属及び他の栄養素、例えばビタミンを有する水性培地を含む。細胞は、従来の発酵バイオリアクター、振とうフラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュ、及びペトリ皿で培養可能である。培養は、組換え細胞に適した温度、pH及び酸素含有量で行うことができる。このよ

うな培養条件は、当業者の専門知識の範疇である。

【0181】

本発明のポリペプチドは、当業者に公知の方法によって、前記ポリペプチドを産生する組換え細胞、例えば、植物細胞、細菌細胞または酵母細胞から抽出し、精製してよい。一実施形態では、方法では、pHを下げて加熱し、その後、硫酸分画することにより、均質化した細胞／組織／植物などからの天然細胞タンパク質の除去を行う。簡単に言うと、細胞／組織／植物を均質化させることにより総可溶性タンパク質を抽出する。天然タンパク質を、pH4.7で沈殿させた後60℃で沈殿させて除去する。その後、得られた上清を40%飽和硫酸アンモニウムで分画する。得られたタンパク質は、少なくとも50%、または少なくとも75%、または少なくとも90%、または少なくとも95%程度純粋とい

10

【0182】

別の例では、細胞溶解液を高濃度の酸、例えば、HClまたはプロピオン酸を用いて処理し、1時間以上かけてpHを約1～2に下げ、これにより、シルクタンパク質は可溶化されるが他のタンパク質は沈殿することになる。

【0183】

コイルドコイル固有の超二次構造または超三次構造の性質により、脱水の際にポリペプチドが自然にコイルドコイル二次構造を形成するであろう。以下に記載するように、コイルドコイルの強度は、近接するリシン残基を酵素によるかまたは化学的に架橋させることにより増強され得る。例えば、WO2013/120143に開示される方法にしたがって架橋を促進させてよい。

20

【0184】

組換えベクター

本明細書で定義するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド／核酸を含む組換えベクターを、例えば本発明の組成物の作製に使用できる。ポリヌクレオチド／核酸は、ポリヌクレオチド分子を宿主細胞に送達できる任意のベクターに挿入することができる。このようなベクターは、非相同なポリヌクレオチド配列、すなわち、天然では本発明のポリヌクレオチド分子に隣接して見られないポリヌクレオチド配列であり、好ましくは、該ポリヌクレオチド分子（複数可）が由来する種以外の種に由来するポリヌクレオチド配列を含む。ベクターは、RNAまたはDNAであり得、原核生物または真核生物のものであり得、典型的には、(US5,792,294に記載のような)トランスポゾン、ウイルスまたはプラスミドである。

30

【0185】

組換えベクターの一種は、発現ベクターに機能的に連結されたポリヌクレオチド分子を含む。機能的に連結された、という語句は、宿主細胞に形質転換された場合にポリヌクレオチド分子が発現できるように該ポリヌクレオチド分子を発現ベクターに挿入することを指す。本明細書で使用する場合、発現ベクターとは、宿主細胞を形質転換することができ、指定ポリヌクレオチド分子の発現に影響を及ぼすことのできるDNAまたはRNAのベクターである。好ましくは、発現ベクターは、宿主細胞内での複製能もある。発現ベクターは、原核生物または真核生物のベクターであり得、典型的にはウイルスまたはプラスミドである。本発明の発現ベクターには、細菌細胞、真菌細胞、内部寄生虫細胞、節足動物細胞、動物細胞、及び植物細胞を含む、本発明の組換え細胞において機能する（すなわち、遺伝子発現を導く）任意のベクターが含まれる。本発明の特に好ましい発現ベクターは、細菌または酵母の細胞において遺伝子発現を導くことができる。また、ベクターを使用して、ポリペプチドを細胞を含まない発現系で作製することもでき、そのような系は、当技術分野において周知である。

40

【0186】

特に、本発明の発現ベクターは、調節配列、例えば、転写制御配列、翻訳制御配列、複製起点、及びそれ以外の、組換え細胞と適合性があり、かつポリヌクレオチドの発現を制

50

御する調節配列を含有する。特に、組換え分子には転写制御配列が含まれる。転写制御配列は、転写の開始、伸長、及び終結を制御する配列である。特に重要な転写制御配列は、プロモーター配列、エンハンサー配列、オペレーター配列及びリプレッサー配列のような、転写開始を制御する転写制御配列である。好適な転写制御配列には、少なくとも1つの組換え細胞、例えば組換え細菌細胞において機能できる任意の転写制御配列が含まれる。そのような転写制御配列の多種多様なものが当業者に公知である。好ましい転写制御配列には、細菌細胞、酵母細胞、節足動物細胞、植物細胞または哺乳類細胞において機能する転写制御配列、例えば、*tac*、*lac*、*trp*、*trc*、*oxy-pro*、*omp/lpp*、*rrnB*、ラムダバクテリオファージ、バクテリオファージT7、T7*lac*、バクテリオファージT3、バクテリオファージSP6、バクテリオファージSPO1、メタロチオネイン、アルファ接合因子、ピチア・アルコールオキシダーゼ、アルファウイルスのサブゲノムプロモーター（シンドビスウイルスのサブゲノムプロモーターなど）、抗生物質耐性遺伝子、バキュロウイルス、アメリカタバコガ（*Heliothis zea*）昆虫ウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、アライグマ（*raccoon*）ボックスウイルス、他のボックスウイルス、アデノウイルス、サイトメガロウイルス（中初期プロモーター）、シミアンウイルス40、レトロウイルス、アクチン、レトロウイルスの長い末端反復配列、ラウス肉腫ウイルス、熱ショック（応答）、リン酸及び硝酸転写制御配列、ならびに他の、原核生物または真核細胞における遺伝子発現を制御できる配列が挙げられるが、これに限定されない。

10

【0187】

20

本発明の組換え分子はまた、（a）発現した本発明のポリペプチドが、ポリペプチドを産生する細胞から分泌されるようにするための分泌シグナル（すなわち、シグナルセグメント核酸配列）を含有し、かつ／または（b）本発明の核酸分子を融合タンパク質として発現させる融合配列を含有してもよい。好適なシグナルセグメントの例には、本発明のポリペプチドの分泌を導くことができるあらゆるシグナルセグメントが含まれる。好ましいシグナルセグメントには、組織プラスミノゲン活性化因子（*t-PA*）、インターフェロン、インターロイキン、成長ホルモン、ウイルスエンベロープ糖タンパク質シグナルセグメント、ニコチアナ・ネクタリン（*Nicotiana nectarin*）シグナルペプチド（US 5, 939, 288）、タバコエクステンシンシグナル、大豆オレオシンオイルボディ結合タンパク質シグナル、*Arabidopsis thaliana*（シロイヌナズナ）液胞塩基性キチナーゼシグナルペプチド、及び本発明に有用なポリペプチドの天然のシグナル配列が挙げられるが、これに限定されるものではない。さらに、核酸分子を、コードされたポリペプチドをプロテオソーム、例えばユビキチン融合セグメントに導く融合セグメントにつなげることができる。組換え分子は、核酸配列の周囲及び／または内部に、介在配列及び／または非翻訳配列を含んでもよい。

30

【0188】

宿主細胞

本発明の別の実施形態には、1つ以上の組換え分子で形質転換された宿主細胞、またはその子孫細胞を含む組換え細胞の使用が含まれる。ポリヌクレオチド分子の細胞内への導入は、ポリヌクレオチド分子を細胞に挿入できる、いかなる方法でも実施可能である。形質転換技術には、トランスフェクション、電気穿孔法、マイクロインジェクション、リポフェクション法、吸着、及びプロトプラスト融合が挙げられるが、これに限定されるものではない。組換え細胞は、単細胞のままであっても、または、組織、臓器もしくは多細胞生物に増殖させてもよい。形質転換された本発明のポリヌクレオチド分子は、染色体外に留まることができるか、または発現能が保持されるよう、形質転換された（すなわち、組換え）細胞の染色体内の1つ以上の部位に取り込まれることができる。

40

【0189】

形質転換に好適な宿主細胞には、本発明に有用なポリヌクレオチドで形質転換され得る、いかなる細胞も含まれる。本発明に有用な宿主細胞は、本明細書で定義するポリペプチドを産生する内因的（すなわち、天然の）能力を有していても、またはこのようなポリペ

50

プチドを、該ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド分子で形質転換された後に産生する能力を有していてもよい。宿主細胞は、本明細書で定義するようなタンパク質を少なくとも1つ産生できる任意の細胞であり得、細菌細胞、真菌（酵母を含む）細胞、寄生虫細胞、節足動物細胞、動物細胞及び植物細胞が含まれる。宿主細胞の例には、*Salmonella*、*Escherichia*、*Bacillus*、*Listeria*、*Saccharomyces*、*Spodoptera*、*Mycobacterium*、*Trichoplusia*、BHK（ベビーハムスター腎臓）の各細胞、MDC K細胞、CRPK細胞、CV-1細胞、COS（例えば、COS-7）細胞、及びペロ細胞が挙げられる。宿主細胞のさらなる例は、*E. coli*（*E. coli* K-12誘導体を含む）；*Salmonella typhi*；*Salmonella typhimurium*（弱毒株を含む）；*Spodoptera frugiperda*；*Trichoplusia ni*及び非腫瘍形成性マウス筋芽G8細胞（例えば、ATCC CRL1246）である。さらなる哺乳類の適切な細胞宿主には、他の腎臓細胞株、他の線維芽細胞株（例えば、ヒト、マウスまたはニワトリ胚線維芽細胞株）、骨髓腫細胞株、チャイニーズハムスター卵巣細胞、マウスNIH/3T3細胞、LMTK細胞及び／またはHeLa細胞が挙げられる。他の宿主細胞は、植物細胞、例えば、*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*（German collection of Microorganisms and Cell cultures：ドイツ微生物・培養細胞回収）から利用可能な植物細胞である。

10

20

【0190】

組換えDNA技術を使用して、形質転換されたポリヌクレオチド分子の発現改善が可能であり、例えば、宿主細胞内のポリヌクレオチド分子のコピー数、それらのポリヌクレオチド分子が転写される効率、得られた転写産物が翻訳される効率、及び翻訳後修飾の効率を操作することにより可能である。本発明のポリヌクレオチド分子の発現を高めるために有用な組換え技術には、高コピー数プラスミドへのポリヌクレオチド分子の機能的連結、1つ以上の宿主細胞染色体へのポリヌクレオチド分子の組み込み、プラスミドへのベクター安定性配列の付加、転写制御シグナルの置換または修飾（例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー）、翻訳制御シグナルの置換または修飾（例えば、リボソーム結合部位、シャイン・ダルガノ配列）、本発明のポリヌクレオチド分子の修飾による宿主細胞のコドン使用頻度への対応、及び、転写産物を不安定化させる配列の欠失が挙げられるが、これに限定されるものではない。

30

【0191】

宿主細胞は、例えば、WO2007/038837及びWO2013/142901に記載のようなトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物に存在してよい。

【0192】

キレート

一態様では、本発明に有用なポリペプチドは、キレート剤及び金属イオンを含むキレートとの錯体を形成する。

40

【0193】

本明細書でキレートとポリペプチドに関連して使用する場合、用語「bound（結合している）」は、キレート剤がポリペプチドの残基と共有結合及び／または非共有結合を形成し、錯体を形成することを指す。本明細書で使用する場合、「bound（結合している）」、「bind（結合する）」等は、共有結合及び／または非共有結合による相互作用を包含すると解釈される。例えば、キレート剤は、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に共有結合または非共有結合のいずれで結合していてもよい。相互作用は特異的でなければならない、すなわち、ポリペプチドは、特異的手段を介してキレートを結合しなければならない。

【0194】

50

一実施形態では、キレート剤はポリペプチドではない。好ましい実施形態では、ポリペプチド及びキレート剤は、単一オープンリーディングフレームから発現するようなポリペプチド単鎖は形成しない。

【0195】

錯体は、キレート剤及び使用ポリペプチドの具体的な性質に応じて多少不安定であってよい。一実施形態では、キレート剤とポリペプチドの錯体は、本発明で求められる有用性のある錯体として十分に安定である。

【0196】

本明細書で使用する場合、用語「coordinates（配位する）」は、金属イオンがポリペプチドの残基の1つ以上と配位結合を形成することを指す。

10

【0197】

用語「キレート化」とは、多座配位子（複数結合）と1個の中心原子、典型的には金属イオンとの間で2つ以上の配位結合が別々に形成されることを指す。配位子は、典型的には、陰イオン形態で多く見られる有機化合物であり、それらは、chelant（キレート剤）、chelator（キレート剤）chelating agent（キレート剤）、または封鎖剤と呼ばれ得る。したがって、本明細書で使用する用語「キレート剤」とは、金属イオンとの錯体を生成できる化合物を指す。本明細書で使用する場合、キレート錯体を生成する配位子をキレート剤（chelator）とも言う。

【0198】

キレート錯体は典型的に多座配位子で生成されるが、本明細書で使用するキレートという用語は、単座配位子と中心原子とで生成される配位化合物（coordination complex）も指す。

20

【0199】

本明細書で使用する場合、用語「キレート」には、キレート剤と、1価、2価、3価、4価、5価、または6価の陽イオンとの錯体が含まれる。陽イオンは、金属であってよく、例えば、限定するわけではないが、ランタニドもしくは遷移金属の陽イオン、アルカリ土類金属またはpブロック金属であってよい。キレートは、非イオン結合、非共有結合性引力のみによる、陽イオンとの単純錯体でよく、または、イオン結合及び／または他の非共有結合性引力による錯体でもよい。後者の場合、キレート剤は、陽イオンとの反応及び／または溶媒、例えば、水との反応によりイオン化されてよい。例えば、（中性）キレート剤のオキソ酸型基、例えば、ホスホン酸基またはホスホン酸エステル基は、そのヒドロキシル基から水素を失うことがあり、得られた酸化物部分はその後、金属イオンとのイオン結合に関与する可能性がある。

30

【0200】

多くの異なる金属イオンが本発明での金属イオンとしての使用に好適である。好ましくは、金属イオンは多価であり、2～8の配位部位、例えば、2、3、4、5、6、7または8の配位部位を有する。

【0201】

重要なことには、本明細書に記載の組成物が所望の標的分子に結合できるよう金属イオンを選択する。例えば、金属イオンは、C、P、N、S、O等のようなヘテロ原子とキレート化できる任意のイオンであり得る。

40

【0202】

いくつかの実施形態では、キレート化した金属イオンは遷移金属のイオンである。

【0203】

いくつかの実施形態では、キレート化した金属イオンはpブロック金属のイオンである。

【0204】

いくつかの実施形態では、キレート化した金属イオンは、Fe、Sn、Cd、Cr、Mn、Co、Cu、Ru、Zn、Mg、Sc、Rh、Os、Ag、Pd、Zn、Re、Pt、Ti、V、Ni、Mo、Tc、W、及びIrの各イオンからなる群から選択される。

50

【0205】

いくつかの実施形態では、金属イオンはアルカリ土類金属イオンである。いくつかの実施形態では、アルカリ土類金属イオンは、Mg、Be、Ca、Sr、Ba及びRaからなる群から選択される。

【0206】

本発明に使用できる例示的な金属イオンには、亜鉛（Zn）、カドミウム（Cd）、銅（Cu）、ニッケル（Ni）、ルテニウム（Ru）、白金（Pt）、パラジウム（Pd）、コバルト（Co）、マグネシウム（Mg）、バリウム（Ba）、ストロンチウム（Sr）、鉄（Fe）、バナジウム（V）、クロミウム（Cr）、マンガン（Mn）、ロジウム（Rh）、銀（Ag）、水銀（Hg）、モリブデン（Mo）タングステン（W）、カルシウム（Ca）、鉛（Pb）、セリウム（Ce）、アルミニウム（Al）とトリウム（Th）、スズ（Sn）、ルテニウム（Ru）、スカンジウム（Sc）、ロジウム（Rh）、オスミウム（Os）、亜鉛（Zn）、レニウム（Re）、タリウム（Thallium）（Tl）、バナジウム（V）、テクネチウム（Tc）、及びイリジウム（Ir）が挙げられる。

10

【0207】

多価金属イオンのイオン状態は異なり得、周知されている。多価金属イオンの好ましい酸化状態またはイオン状態は、好ましくはZn（II）、Cd（II）、Cu（I）、Cu（II）、Ni（II）、Ru（II）、Ru（III）、Pt（II）、Pd（II）、Co（II）、Co（III）、Mg（II）、Ba（II）、Sr（II）、Fe（II）、Fe（III）、Fe（IV）、V（III）、Cr（II）、Cr（III）、Mn（II）、Rh（III）、Ag（I）、Hg（II）、（Mo（III）、Mo（IV）、Mo（V）、Mo（VI）、W（III）、W（IV）、W（V）、W（VI）、Ca（II）、Pb（II）、Ce（III）、Al（III）、またはTh（IV）であり、酸化状態を括弧内に示している。

20

【0208】

上記のように、キレート剤は、1個の中心原子との配位結合を2つ以上別々に形成できる配位子である。キレート剤は、本明細書に記載の組成物が所望の標的分子に結合できるよう選択される。例えば、キレート剤は、所望の金属イオンとキレート化することができ、かつポリペプチドを結合することができる任意のキレート剤であってよい。重要なことには、キレート剤は、本明細書に記載の組成物と所望の標的分子との結合を可能にするべく所望の金属イオンを結合するよう選択される。

30

【0209】

一実施形態では、キレート剤は、原子環を含む。好ましくは、キレート剤は大環状化合物である。語句「macrocycles（大環状化合物）」、「macrocyclic compounds（大環状化合物）」、及び「cyclic compounds（環状化合物）」は本明細書では同義で使用され、環が1つ以上の構造を有する単環式及び複素環式のいずれの化合物も意味する。そのような環構造それぞれにある原子総数は大きく異なってよく、例えば、3～約100またはそれ以上の範囲である。このような単環式または複素環式の化合物はさらに、直鎖官能基、分岐官能基、及び／または環構造により定義された平面を横切るように架橋する弓状官能基を1つ以上含有してよい。2つ以上の環構造を有する複素環式化合物の場合、このような環構造のいずれの対も非環式のスペーサー構造体により仕切られてよく、または環は、1つの化学結合もしくは1個の原子を共有する、互いに隣り合った関係であり得、または別法として、複数の環は部分的に重なり合っていてよく、または1つの環構造が、別の環に包囲されるか、もしくは別の環と絡み合っていてよい。このような化合物の3次元構造は、平面、円筒型、半球形、球形、卵形、らせん形、ピリミジルなどを含むがこれに限定されない、規則的または不規則的な任意の幾何学的形状により特徴づけることができる。

40

【0210】

いくつかの実施形態では、キレート剤は負荷電基を含む。いくつかの実施形態では、キレート剤は、少なくとも1つのカルボキシレート基を含む。理論に束縛されることは望ま

50

ないが、カルボキシラート基は、非共有結合的相互作用を生じさせることにより、例えば静電的相互作用を介して、キレート剤のポリペプチドへの結合を補助すると考えられている。

【0211】

いくつかの実施形態では、大環状化合物は、少なくとも1つのペンダント基を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのペンダント基は負電荷を有する。いくつかの実施形態では、大環状化合物は、カルボキシラート基である少なくとも1つのペンダント基を含む。理論に束縛されることは望まないが、陰性荷電ペンダント基は、ポリペプチドの陽性荷電基に結合してキレート（及びキレート剤）とポリペプチドとの結合を補助すると考えられている。

10

【0212】

このような大環状化合物には、天然に生じる大環状化合物及び人工大環状化合物を含んでよい。天然に生じる大環状化合物には、プロトポルフィリン（例えば、ヘムb）、フィトポルフィリン（phytoporphyrin）（例えば、クロロフィルc）及びポルフィリノーゲン（porphyrinogen）（例えば、生合成前駆物質のウロポルフィリノーゲン（uroporphyrinogen））などのポルフィリン（porphyrin）、コリン、クロリン、及びコルフィンが挙げられるが、これに限定されるものではない。人工大環状化合物には、ポルフィン及びフタロシアニンが挙げられるが、これに限定されない。

【0213】

ポルフィリンは、すべての生物に見られる化合物の一群であり、金属に結合することができるテトラピロール大環状化合物を含有する。ヘム、クロロフィル及びコリンは、この化合物群の例であり、それぞれ鉄、マグネシウム及びコバルトを含有している。

20

【0214】

本発明での使用に好適な金属ポルフィリンは、フロンティア・サイエンティフィック社（Frontier Scientific, Inc）より市販されている。

【0215】

本発明の大環状化合物には、ポルフィリノーゲン（porphyrinogen）、ポルフィリン、サフィリン（saphyrin）、テキサフィリン、バクテリオクロリン、クロリン、コプロポルフィリンI、コリン、コロール、シトポルフィリン、ジュウテロポルフィリン、エチオポルフィリンI、エチオポルフィリンIII、ヘマトポルフィリン、フェオホルビドa、フェオホルビドb、ホルビン、フタロシアニン、フィロクロリン、フィロポルフィリン、フィトクロリン、フィトポルフィリン、プロトポルフィリン、ピロクロリン、ピロポルフィリン、ロドクロリン、ロドポルフィリン、ウロポルフィリンI、カリックス[n]ピロール、カリックス[n]エリン（erine）、シクロアルカン、シクロアルケン、シクロアルキン、ペペリジン、モルホリン、ピロリジン、アジリジン、アニリン、チオフエン、キノリン、イソキノリン、ナフタレン、ピリミジン、プリン、ベンゾフラン、オキシラン、ピロール、チアジド、オザゾール（ozazole）、イミダゾール、インドール、フラン、ベンゾチオフエン、ポリアザ大環状化合物、炭水化物、アセタール、クラウンエーテル、環状無水物、ラクタム、ラクトン、環状ペプチド、フェニルチオヒダントイン、チアゾリノン、スクシンイミド、コロネン、マクロライド、炭素環化合物、シクロデキストリン、スクアレン酸化物、イオノフォア抗生物質、環状ビス-N, O-アセタール、環状ジスルフィド、テルペノイド、スピロ環、レゾルシナレン 大環状化合物、環状オリゴ（シロキサ）、スタンニル化環状オリゴ（エチレンオキシド）、環状ポリ（ジブチルスズジカルボキシラート（dibutyltin dicarboxylate））、環状ポリ（ピロール）、環状ポリ（チオフエン）、環状ポリ（アミド）、環状ポリ（エーテル）、環状ポリ（カーボネート）、環状ポリ（エーテルスルホン）、環状ポリ（エーテルケトン）、環状ポリ（ウレタン）、環状ポリ（イミド）、環状ポリ（デカメチレンフマレート（decamethylene fumarate））、環状ポリ（デカメチルエチレンマレアート（decamethylethylene maleate

30

40

50

))などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0216】

一実施形態では、キレート剤は、ポルフィリン (porphyrin)、コリン、クロリン、コルフィン、ポルフィン及びフタロシアニンからなる群から選択される。別の実施形態では、キレート剤は、プロトポルフィリン、フィトポルフィリン (phytoporphyrin)、及びポルフリノーゲン (porphyrinogen) からなる群から選択されるポルフィリンである。別の実施形態では、キレート剤は、ヘムb、クロロフィルcまたはウロポルフリノーゲン (uroporphyrinogen) からなる群から選択されるポルフィリンである。別の実施形態では、キレート剤はコリン、クロロフィルa、または補因子F430である。

10

【0217】

一実施形態では、キレート剤はヘムである。本明細書で使用する場合、用語「ヘム」とは、ポルフィリンと呼ばれる大型複素環式有機環の中心に鉄原子を含有して形成されるキレートまたは補欠分子族を指す。すべてのポルフィリンが鉄を含有するわけではないが、かなりの割合のポルフィリン含有金属タンパク質がその補欠分子サブユニット (prosthetic subunit) としてヘムを有しており、これらは、ヘムタンパク質 (hemoprotein) タンパク質またはヘムタンパク質 (haem protein) として知られる。ヘムの非限定的例は、ヘムA、ヘムB、ヘムC、ヘムO、メソヘム (mesohaem)、ジュウテロヘム (deuterohaem)、合成ジシアノポルフィリン及び対称型ポルフィリン (限定するわけではないが、プロトポルフィリンIIIなど) である。

20

【0218】

ヘムタンパク質は、生物系の至るところで見られ、電子移動、低分子輸送、触媒作用及び感知など、さまざまな機能を働かせている。ヘムタンパク質ファミリーとして含まれるものには、製薬及び農業業界が関心を寄せている、多様な働きを持つ各種シトクロムP450、ならびに一酸化窒素センサータンパク質である可溶性グアニル酸シクラーゼがあり、これは、酸素などの他のガスより一酸化窒素を選択的に結合し、一酸化窒素バイオセンサーでの使用が検討されている。

【0219】

ヘムタンパク質は、ポルフィリン環と、窒素原子4個に配位する鉄とからなるヘム補因子を含有する。ヘム補因子は、広範な二原子の気体、陰イオン及び塩基に対する反応性が高い。生物系では、この反応性はヘム補因子を取り囲むタンパク質環境により制御される。大半のヘムタンパク質では、ヘム基はタンパク質基質内に、ポルフィリン環と、アミノ酸残基、例えば、アルギニン、チロシン及びセリンなどとの水素結合を介して保持されている。さらに、アミノ酸残基は鉄中心と配位する (化学結合を形成する)。配位する配位子をさまざまに変えることは、ヘムタンパク質がヘム補因子の機能を調節する方法の1原則 (principle) である。例えば、ヘモグロビンのような酸素運搬タンパク質は、その金属補因子を保存ヒスチジンを使用して配位させ、触媒シトクロムP450は保存システインを使用する一方、シトクロムcのような電子伝達タンパク質は典型的にヒスチジン残基及びメチオニン残基と2か所で配位する鉄中心を有する。

30

40

【0220】

一般に、金属イオンへの結合に好ましいキレート剤の同定は、最初にポリペプチド骨格に結合させるべき所望のキレート剤を決定し、その後、そのキレート剤に強く結合する金属イオンを同定するか、または最初に所望の金属イオンを同定してから好ましいキレート剤を同定するか、いずれでも可能である。したがって、好ましいキレート剤を同定し、その後、そのキレート剤への結合の効率について金属イオン候補のスクリーニングを行う。別法として、好ましい金属イオンを同定してから、キレート剤のスクリーニングを行うことができる。そのようなスクリーニング方法は当業者に周知である。

【0221】

さらに別の態様では、本発明は、本発明の組成物を作製する方法であって、(a) 少な

50

くとも一部分はコイルドコイル構造を有する候補ポリペプチドと、候補キレート剤と、候補金属イオンとを合わせ、(b)かかるポリペプチド、キレート剤及び金属イオンが会合し、キレートがポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に結合しているか否かを判定することを含む前記方法を提供する。一実施形態では、方法は、シルクポリペプチドなどのポリペプチドの候補を修飾して、少なくとも1つ、可能であればさらなる配位アミノ酸を導入することを含む。一実施形態では、方法はさらに、組成物が標的化合物を結合し、かつ／または修飾する能力を試験することを含む。

【0222】

選択される陽イオン、例えば、金属または放射性核種は、感知、治療的または診断のために最も適している陽イオン、金属イオンまたは同位素子に依存することになる。例えば、本明細書に記載するポリペプチドに金属ポルフィリンを導入することである。ヘムタンパク質は、酸素運搬、電子移動／輸送及び触媒作用など広範囲にわたる機能を果たすことができる。したがって、この広範囲にわたる機能を本発明によるバイオセンサーに含めるために金属ポルフィリンを使用できる。例えば、二酸素を結合させるために鉄ポルフィリンを含むポリペプチドを使用できる。一実施形態では、標的化合物結合能で金属イオン及び／またはキレート剤を選択する。

10

【0223】

組成物

一態様では、本発明の組成物は、少なくとも一部分にコイルドコイル構造を有するポリペプチドと、キレート剤及び金属イオンを含み、ポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に結合しているキレートとを含む。

20

【0224】

一実施形態では、本明細書に記載する組成物には、本明細書に記載するようなポリペプチドを1つ以上が含まれる。例えば、組成物には、2つの異なった本明細書に記載するようなポリペプチドが含まれ得る。他の実施形態では、組成物には、本明細書に記載するポリペプチド、ならびに該組成物の安定性及び／または生物活性を高めるよう機能する、さらなるポリペプチドが含まれ得る。

【0225】

本発明の組成物には、「許容される担体」が含まれてよい。

【0226】

このような許容される担体の例には、水、食塩液、リンガー液、デキストロース溶液、ハックス溶液、及び他の生理平衡塩水溶液が挙げられる。不揮発性油、ゴマ油、オレイン酸エチル、またはトリグリセリドのような非水性ビヒクルを使用してもよい。

30

【0227】

本発明の組成物は、溶液で（例えば、His置換AmelF3）または材料形態で形成してよい。一実施形態では、組成物を材料形態で形成する。

【0228】

本明細書に記載のように、シルクポリペプチドは、ファイバー、スポンジまたはフィルムのような極めて安定な耐荷材料各種に製造可能である。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載するポリペプチドは固体材料形態で提供され、本発明の組成物は固体材料形態で提供される。

40

【0229】

一実施形態では、ポリペプチドを本明細書に記載する材料に形成し、かかる材料をキレートと接触させて本発明の組成物を形成する。例えば、本発明のポリペプチドをファイバー、フィルム、粉末、スポンジ等などの材料に形成した後、かかる材料とキレート含有溶液とを、ポリペプチドにキレートが結合するのに十分な条件及び期間で接触させて、材料に本発明の組成物が含まれるようにする。

【0230】

一実施形態では、ポリペプチドを本明細書に記載する材料に形成し、かかる材料とキレート剤とを、キレート剤がポリペプチドに結合するのに十分な条件及び期間で、金属イオ

50

ンを存在させずに接触させることにより、ポリペプチド-キレート剤錯体を含む材料が形成される。その後、ポリペプチド-キレート剤錯体を含む材料を金属イオンと接触させることによって本発明の組成物を形成してよい。

【0231】

一実施形態では、本明細書に記載する組成物を本明細書に記載のような材料に形成する。別の実施形態では、本発明の組成物は、ポリペプチドとキレートとを、ポリペプチドに対するキレートの結合が促進される条件下で接触させることにより形成される。例えば、本発明のポリペプチドを、上述の開示のようにキレートを含む溶液と接触させる。溶液には、錯体形成を支持する濃度でキレートが含有され、ポリペプチドとキレートとを、キレートがポリペプチドに結合して本発明の組成物を形成するのに十分な条件下で一定期間接触させる。

10

【0232】

別の実施形態では、本発明の組成物は、ポリペプチド-キレート剤錯体が形成されるよう、ポリペプチドに対するキレート剤の結合が促進される条件下でポリペプチドとキレート剤とを接触させることにより形成される。キレート剤は錯体形成を支持する濃度であり、ポリペプチドとキレート剤とを、キレート剤がポリペプチドに結合するのに十分な条件及び期間で接触させて、ポリペプチド-キレート剤錯体を形成する。その後、ポリペプチド-キレート剤錯体を金属イオンと接触させることによって本発明の組成物を形成してよい。金属イオンは、本発明の組成物の形成を支持する濃度であり、ポリペプチド-キレート剤錯体と金属イオンとを、本発明の組成物を形成するのに十分な条件及び期間で接触させる。任意選択で、本発明の組成物を本明細書に記載する材料に形成してよい。

20

【0233】

例えば、実施例3に例示されるように、AmelF3シルクタンパク質とヘキサフルオロイソプラノール(hexafluoroisopropanol)中で合わせることで本発明の組成物を形成した。次いで、組成物を室温で風乾しフィルムを形成した。乾燥させたフィルムは、材料を水不溶性にするために十分な時間、70%メタノールに一晩浸漬した。理論に束縛されることは望まないが、70%メタノールに浸漬することにより、βシート構造の形成が誘導されて、フィルムを水不溶性にさせると考えられている。他の有機溶媒、例えば、エタノール、酢酸エチル等を使用してキレートを導入することができる。

30

【0234】

いくつかの実施形態では、材料及び／または本発明のポリペプチドを、キレート及び溶媒を含む溶液と接触させる。キレートの量は、ポリペプチドの量より過剰であり得る。いくつかの実施形態では、キレートの濃度は約0.001~50mg/mLである。いくつかの実施形態では、キレートの濃度は約0.01~10mg/mLである。いくつかの実施形態では、キレートの濃度は約0.1mg/mL~5mg/mL、例えば0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL、2.0mg/mL、2.5mg/mL、3.0mg/mL、3.5mg/mL、4.0mg/mL、4.5mg/mLまたは5.0mg/mLである。

40

【0235】

いくつかの実施形態では、材料及び／または本発明のポリペプチドを、キレート剤及び溶媒を含む溶液と接触させる。キレート剤の量は、ポリペプチドの量より過剰であり得る。いくつかの実施形態では、キレート剤の濃度は約0.001~50mg/mLである。いくつかの実施形態では、キレート剤の濃度は約0.01~10mg/mLである。いくつかの実施形態では、キレート剤の濃度は約0.1mg/mL~5mg/mL、例えば0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL、2.0mg/mL、2.5mg/mL、3.0mg/mL、3.5mg/mL、4.0mg/mL、4.5mg/mLまたは5.0mg/mLである。

50

g/ml、3.5 mg/ml、4.0 mg/ml、4.5 mg/ml または 5.0 mg/ml である。

【0236】

溶媒は、その中でキレート及び／またはキレート剤が所望の濃度で可溶であり、材料及び／またはポリペプチドに悪影響を与えない溶媒である。いくつかの実施形態では、溶媒は、極性溶媒または非極性溶媒であってよい。例えば、溶媒は、水、アルコール、ハロゲン化アルコール、炭化水素、ハロゲン化炭化水素、スルホキシド、ニトリル、エーテル、エステル、カルボン酸、ケトン及びアルデヒドからなる群から選択されてよい。いくつかの実施形態では、溶媒は、水、ペンタン、シクロペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン、ベンゼン、トルエン、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、アセトン、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、炭酸プロピレン、ギ酸、n-ブタノール、イソプロパノール、n-プロパノール、エタノール、メタノール、酢酸、クロロホルム、2-ブタノン、ヘキサフルオロイソプロパノール及びその混合物からなる群から選択される。いくつかの好ましい実施形態では、溶媒は、水、メタノール、クロロホルム、2-ブタノン、ヘキサフルオロイソプロパノール及びその混合物からなる群から選択される。いくつかの、[より好ましい] 実施形態では、溶媒は、水、メタノール、ヘキサフルオロイソプロパノール及びその混合物からなる群から選択される。例えば、溶媒は、水に溶解させたメタノールを10～100% (v/v)、例えば10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100% (v/v) 含んでよい。好ましくは、溶媒は、水に溶解させたメタノールを50%超、100%未満 (v/v) 含む。

【0237】

上述のように、ポリペプチド及びキレートを、キレートがポリペプチドに結合して本発明の組成物を形成するのに十分な条件下で一定期間接触させる。当業者であれば、条件及び期間はキレート濃度、溶媒、所望の効果等に依って異なってくることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、キレート及びポリペプチドを、約1秒～7日の間のさまざまな期間で接触させる。いくつかの実施形態では、キレート及びポリペプチドを、少なくとも3秒、例えば、限定するわけではないが、3秒、6秒、9秒、12秒、18秒、24秒、30秒、36秒、42秒、28秒、54秒、60秒、66秒、または72秒という期間接触させる。いくつかの実施形態では、キレート及びポリペプチドを、少なくとも3分、例えば、限定するわけではないが、3分、6分、9分、12分、18分、24分、30分、36分、42分、28分、54分、60分、66分、または72分、という期間接触させる。いくつかの実施形態では、キレート及びポリペプチドを、少なくとも3時間、例えば、限定するわけではないが、3時間、6時間、9時間、12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、28時間、54時間、60時間、66時間、または72時間、という期間接触させる。いくつかの実施形態では、ポリペプチド及びキレートを、温度約10℃～30℃で、または約18℃～24℃で接触させる。

【0238】

上記のように、ポリペプチド及びキレート剤を、キレート剤がポリペプチドに結合してポリペプチド-キレート剤錯体を形成するのに十分な条件下で一定期間接触させる。当業者であれば、条件及び期間は、キレート剤の濃度、使用溶媒、所望の効果等に依って異なってくることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、キレート剤及びポリペプチドを、少なくとも3秒、例えば、限定するわけではないが、3秒、6秒、9秒、12秒、18秒、24秒、30秒、36秒、42秒、28秒、54秒、60秒、66秒、または72秒という期間接触させる。いくつかの実施形態では、キレート剤及びポリペプチドを、少なくとも3分、例えば、限定するわけではないが、3分、6分、9分、12分、18分、24分、30分、36分、42分、28分、54分、60分、66分、または72分という期間接触させる。いくつかの実施形態では、キレート剤及びポリペプチドを、少なくとも3時間、例えば、限定するわけではないが、3時間、6時間、9時間、12時間、1

8時間、24時間、30時間、36時間、42時間、28時間、54時間、60時間、66時間、または72時間という期間接触させる。いくつかの実施形態では、ポリペプチド及びキレート剤を、温度約10℃～30℃または約18℃～24℃で接触させる。

【0239】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド-キレート剤錯体またはポリペプチド-キレート剤錯体を含む材料を、金属イオン及び溶媒を含む溶液に接触させることによって本発明の組成物を形成してよい。いくつかの実施形態では、金属イオンの濃度は約0.001～50mg/mLである。いくつかの実施形態では、金属イオンの濃度は約0.01～10mg/mLである。いくつかの実施形態では、金属イオンの濃度は約0.1mg/mL～5mg/mL、例えば0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL、2.0mg/mL、2.5mg/mL、3.0mg/mL、3.5mg/mL、4.0mg/mL、4.5mg/mLまたは5.0mg/mLである。溶媒は、その中で金属イオンが所望の濃度で可溶であり、材料及び／またはポリペプチドに悪影響を与えない溶媒である。例えば、溶媒は、極性溶媒、または水、アルコール、アンモニア等のような極性溶媒の混合物であってよい。

10

【0240】

上述のように、ポリペプチド-キレート剤錯体と金属イオン、またはポリペプチド-キレート剤錯体を含む材料と金属イオンを、本発明の組成物または本発明の組成物を含む材料が形成されるのに十分な条件下で一定期間接触させる。当業者であれば、条件及び期間は、材料の表面と容積の比、金属イオンの濃度、使用溶媒、所望の効果等に依って異なってくることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、期間は約2秒～7日の間で異なる。いくつかの実施形態では、期間は少なくとも1分、例えば、限定するわけではないが、1分、2分、4分、6分、12分、18分、24分、30分、36分、42分、28分、54分、60分、66分、または72分である。いくつかの実施形態では、期間は少なくとも1時間、例えば、限定するわけではないが、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、28時間、54時間、60時間、66時間、または72時間である。いくつかの実施形態では、温度は約10℃～30℃または約18℃～24℃である。

20

30

【0241】

一実施形態では、組成物はヘムb及びAmelF3（配列番号3）を含むが、シグナル配列を含んでいない（配列番号39）。この実施形態では、キレートはヘムbであり、キレート剤はプロトポルフィリンIXであり、金属イオンは鉄であり、少なくとも1つのポリペプチドはAmelF3である。本願発明者らは、キレート剤がヘムbであり、金属イオンが鉄であり、かつ少なくとも1つのポリペプチドがAmelF3である場合に、AmelF3（配列番号39）の位置76のチロシンは鉄と配位結合を形成し、ヘムbはポリペプチドの正荷電残基の少なくとも1つ結合することを実証した。

【0242】

一実施形態では、組成物は、GA1及びヘムbを含む。一実施形態では、組成物は、GA3及びヘムbを含む。

40

【0243】

他の実施形態では、組成物は金属プロトポルフィリンIX含み、その場合、金属イオンはFe、Co及びCu、及びAmelF3から選択される。

【0244】

一実施形態では、組成物は、フタロシアニンテトラスルホン酸、及びAmelF3を含む。

【0245】

他の実施形態では、組成物は、ジシアノコビリル酸ヘプタメチルエステルから選択されるキレートまたはジシアノコビリル酸ヘプタメチルエステル、及びAmelF3を含む。

50

【0246】

ポリペプチドに結合している鉄ポルフィリンを使用する組成物のような本発明の組成物は、例えば、標的化合物の検出、標的化合物の定量化、触媒作用、電子移動といった用途及び抗菌薬として使用できる。

【0247】

金属または陽イオン及びキレート剤を、これら2つが錯体を生成できる任意の条件下で合わせてよい。

【0248】

材料

デノボ合成に関する多くの研究とは対照的に、本発明は、安定性が高く、ファイバー、ゲル、シート、フィルム、マット、スポンジ等のような材料への形成が容易なタンパク質足場を提供する。本願発明者らは、ポリペプチドであって、該ポリペプチドの少なくとも一部分がコイルドコイル構造を形成し、キレートはキレート剤及び金属イオンを含み、その場合に、かかるキレートがポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸に結合しているポリペプチドは、高度に安定であり、かつ各種材料に形成できることを実証した。したがって、本発明は、本発明の組成物を含む材料及びかかる材料を作製する方法に関する。あるいは、本発明の組成物は、ある材料の形態であってよい。

【0249】

本明細書で使用する場合、用語「安定である」とは、本発明の組成物及び／または材料が、経時的または異なる条件においてその機能特性を保持する能力を指す。例えば、ある期間、例えば、10か月、11か月またはそれ以上にわたって、検出可能な化合物を結合する能力を保持することである。

【0250】

本明細書に記載のように、本発明の組成物は、水中で安定な材料として形成され得る。好ましい実施形態では、材料は、対象分子を結合する能力を例えば、1週間、1か月、1年またはそれ以上の期間経過後も保持している。材料には、ファイバー、ゲル、シート、フィルム、マット、スポンジ、粉末等が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0251】

本明細書で使用する場合、用語「溶媒安定性」とは、材料が溶媒、例えば、水、SDS（例えば、2% SDS）、グアニジニウム（例えば、8 M グアニジニウム）または尿素（例えば、8 M 尿素）中で不溶性状態にある能力を指す。本明細書で使用する場合、「溶媒中で不溶性状態にある」とは、材料を溶媒中に室温で24時間溶解させた後、材料のタンパク質質量の損失が10%未満であることを意味する。

【0252】

本明細書で言及されているように、いくつかの本発明の実施形態では、ポリペプチドはシルクポリペプチドであってよい。シルクポリペプチドは、その靱性及び強度から、新たな材料の創製に特に有用である。

【0253】

ポリペプチドがシルクポリペプチドである場合、シルク材料はシルクドープから形成してよい。本明細書で使用する場合、用語「シルクドープ」とは、シルクタンパク質を含む水溶液を指す。好ましくは、シルクドープは、本明細書に定義するシルクタンパク質を少なくとも0.05 w/v%、より好ましくは少なくとも0.1 w/v%、さらにより好ましくは少なくとも0.5 w/v%含む。一実施形態では、シルクドープは、シルクタンパク質を約0.5%～約15%（wt%）含む方法により作製される。ただし、シルクドープ中のシルクタンパク質濃度を高めるステップをさらに実施しない場合は、より典型的な収率はシルクタンパク質約0.5%～約4%（wt%）である。シルクドープは、ファイバー及び／またはフィルム成型の形成の際、押出し成形に供し易い。

【0254】

シルクドープ及びシルクドープ等から延伸または押し出される材料の作製方法は、WO 2011/022771 及び WO 2013/120143 に開示されている。

10

20

30

40

50

【0255】

例えば、一実施形態では、シルクドープは、i) 1つ以上のシルクタンパク質を産生する細胞を溶解させること、ii) シルクタンパク質を、界面活性物質またはイオン液体と接触させることにより可溶化すること、及びiii) シルクタンパク質を濃縮してシルクドープを作製し、その場合、1つ以上のシルクタンパク質はコイルドコイル構造を含む三次構造を形成できることを含む方法により作製される。一実施形態では、界面活性物質はSDSである。

【0256】

一実施形態では、シルク材料、例えば、シルクファイバー、ナノファイバー、ゲル、シート、フィルム、マット、スポンジ等が作製され得るシルクドープを提供する。

10

【0257】

本明細書で使用する場合、「シルクファイバー」とは、繊維製品のようなさまざまな製品に織込み可能なシルクタンパク質を含む繊維を指す。シルクファイバーは、当業者に公知の技術で形成してよい。本発明に有用なシルクファイバーは、処理要求が低い。本発明に有用なシルクタンパク質は、それらが自発的に強いコイルドコイルを形成し、それをリシン架橋などの架橋を用いて補強することができるので、強いファイバーの形成には最低限の処理、例えば、紡糸しか必要としない。

【0258】

いくつかの実施形態では、シルクファイバーを溶液から紡糸する。本発明に有用なシルクタンパク質の濃度が臨界値を越えると、タンパク質の自発的な自己集合によって溶液から線維状凝集体が形成される。O'Brienら("Design, Synthesis and Fabrication of Novel Self-Assembling Fibrillar Proteins", in Silk Polymers: Materials Science and Biotechnology, pp. 104-117, Kaplan, Adams, Farmer and Viney, eds., c. 1994 by American Chemical Society, Washington, D. C.)の方法にしたがって、凝集体を集め、巨視的な繊維を機械的に紡糸してよい。

20

【0259】

いくつかの実施形態では、液晶相に特徴的な特性を有する溶液からファイバーを紡糸してよい。相転移が起こり得る線維濃度は、溶液中に存在するタンパク質またはタンパク質組み合わせの組成に依存する。しかし、相転移は、溶液の清澄度及び複屈折を監視することによって検出可能である。液晶相の発生は、溶液が半透明の外観を呈し、直交偏光フィルター(crossed polarizing filters)を通して見た時に複屈折が示される場合に検出可能である。

30

【0260】

ファイバー形成技術の一つでは、最初に、タンパク質溶液をオリフィスを通してメタノール内に押し出していき、機械的手段で取り出すのに十分な長さの繊維を得る。次いで、そのような機械的手段でメタノール溶液を通して線維を引き出し、回収して乾燥させることができる。繊維の延伸方法は、当技術分野で周知と考えられる。

40

【0261】

シルクファイバー及び／またはシルク共重合体の作製に使用され得る方法のさらなる例は、US2004/0170827及びUS2005/0054830に記載されている。

【0262】

シルクファイバーは、縫合糸、皮膚移植片、細胞増殖マトリックス、置換用靱帯、及び外科用メッシュといった医療用具、ならびに、例えば、ケーブル、ロープ、網製品、釣り糸、生地、防弾チョッキ裏地、生地コンテナ、バックパック、リュックサック、バッグまたは財布用紐、接着結合材、非接着結合材、ストラップ材料、テント生地、ターポリン素材、プールカバー、車両カバー、フェンシング材、封止剤、建築資材、耐候性材料、柔

50

軟性パーティション材料、スポーツ用品といった広範な工業用及び商用製品の製造に使用してよく、実際、高い抗張力と弾性が所望特性とされるファイバーまたは生地用途のほとんどすべてに使用され得る。

【0263】

本明細書で使用する場合、「ナノファイバー」とは、直径1000nm未満のファイバーを指す。ナノファイバーは、当業者に公知の技術、例えば、電界紡糸（例えば、Wittmer et al., 2011を参照されたい）によって製造してよい。いくつかの実施形態では、ナノファイバーを製品に織込みできない。ナノファイバーを、創傷被覆材、細胞培養等に使用され得る生体材料の製造に使用してよい。

【0264】

本明細書で使用する場合、「シルクフィルム」とは、シルクタンパク質を含むフィルムを指す。シルクフィルムは、当業者に公知の技術によって形成してよい。

【0265】

シルクフィルムは、創傷被覆材のような医療用具、一酸化窒素センサーのようなバイオセンサー用フィルムの製造に使用してよく、実際、安定性が所望特性とされるフィルム用途のほとんどすべてに使用され得る。

【0266】

本明細書で使用する場合、「シルクスポンジ」とは、シルクタンパク質を含むスポンジを指す。シルクスポンジは、当業者に公知の技術によって形成してよい。シルクスポンジは、組織／細胞培養の足場、触媒、創傷被覆材、センサーへの応用といった多様な用途に使用してよく、実際、安定性が所望特性とされるスポンジ用途のほとんどすべてに使用され得る。

【0267】

本明細書で使用する場合、「シルクマット」とは、シルクタンパク質を含むマットを指す。シルクマットは、当業者に公知の技術によって形成してよい。マットは、電界紡糸マットであってよい。シルクスポンジは、組織／細胞培養の足場、創傷被覆材、センサーへの応用といった多様な用途に使用してよく、実際、安定性が所望特性とされるマット用途のほとんどすべてに使用され得る。

【0268】

一実施形態では、組成物は粉末形態である。

【0269】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドはaculeate Hymenoptera（膜翅目有剣類）由来の組換えシルクタンパク質である。好ましくは、aculeate Hymenoptera（膜翅目有剣類）由来の組換えシルクタンパク質はミツバチの組換えシルク、例えば、限定するわけではないが、AmelF3である。ミツバチの組換えシルクは、多様な材料形態に製造可能であり、ファイバー及びフィルム（Weisman et al., 2010; Sutherland et al., 2011）、電界紡糸マット（Wittmer et al., 2011）及びスポンジ（WO2011/022771及びWO2013/120143）が挙げられる。

【0270】

好ましくは、材料を、いくつかの記載にある製造後処理に供して水に反応しないようにさせる。製造後処理の例には架橋、熱処理または化学処理が含まれるが、これに限定されない。

【0271】

本明細書で使用する場合、「共重合体」とは、2つ以上の異なる本発明に有用なポリペプチドを含む組成物である。例えば、2つ以上の異なる本発明に有用なシルクポリペプチド、またはWO2007/038837に記載の2つ以上のシルクポリペプチドである。一例として、本発明の共重合体（したがって、組成物）は、AmelF3とAmelF1、またはAmelF3、AmelF1とAmelF2、またはAmelF2、AmelF1とAmelF4、またはGAF3とAmelF3などを含んでよい。したがって、本発

10

20

30

40

50

明は、少なくとも2つの本発明に有用なポリペプチドを含む共重合体を含む組成物を提供する。

【0272】

本明細書で使用する場合、「架橋」は、1つのポリマー（ポリペプチドなど）鎖と別のポリマー鎖とを架橋する共有結合及び非共有結合の両方の意味に使用される。当業者は、ポリマーは、自鎖上で折り返し、それ故、自鎖に架橋し得ることを理解するであろう。非共有結合の架橋には、イオン結合及び水素結合が含まれてよい。ポリペプチドでは、架橋は、骨格原子間、側鎖原子間または骨格原子と側鎖原子の間に形成され得る。

【0273】

本明細書で使用する場合、「架橋」は、1つのポリマーと別のポリマー、またはポリマーの一部と別の一部が架橋により連結される過程の意味に使用される。

10

【0274】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチド、シルクファイバー、シルクフィルム、シルク粉末、シルクスポンジ及び／または共重合体などは架橋している。一実施形態では、かかるポリペプチド、シルクファイバー、シルクフィルム、シルク粉末、シルクスポンジ及び／または共重合体などを、対象とする表面／物品／製品などに、当技術分野で公知の技術を使用して架橋させる。別の実施形態では（または、前の実施形態との組み合わせでは）、シルクファイバー、シルクフィルム、シルク粉末、シルクスポンジ及び／または共重合体などにおける少なくともいくつかのシルクタンパク質を、互いに架橋させる。いくつかの実施形態では、シルクタンパク質を、該タンパク質のリシン残基を介して架橋させる。このような架橋は、当技術分野で公知の化学的及び／または酵素を用いた技術を使用して実施可能である。例えば、酵素による架橋は、リシルオキシダーゼで触媒でき、酵素を用いない架橋は、糖化リシン残基から生成され得る（Reiser et al., 1992）。いくつかの実施形態では、シルクタンパク質はベータシート構造を含み、ここで、ベータ鎖は、同一ポリペプチドのまたは別のポリペプチドの他のベータ鎖に架橋している。これらの実施形態では、架橋は非共有結合であり、好ましくは水素結合である。

20

【0275】

いくつかの実施形態では、材料を熱処理に供する。熱処理は、リシン、セリン、スレオニン・アスパラギン、アスパラギン酸及び／またはグルタミン酸の各残基を介して、リシノアラニン及び／またはメチルリシノアラニン（methyllysinoalanine）、イソペプチド及び／またはエステルの架橋形成が誘導される温度まで、材料を加熱することを含んでよい。処理には、真空下、約180℃超までの加熱、またはより低い温度（すなわち120℃）までの加熱が含まれてよい。

30

【0276】

一実施形態では、本発明は、本発明の組成物を含む材料を熱処理する過程によって形成された材料を含み、かかる過程は、i) 材料を固体状態で得、ii) かかる材料を、架橋が形成される温度まで十分な時間、乾熱することを含む。好ましくは、温度は少なくとも約120℃、少なくとも約120℃または少なくとも約180℃である。別の実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチドを含む材料を熱処理する過程によって形成された材料を含み、かかる過程は、i) 材料を固体状態で得、ii) かかる材料を、架橋が形成される温度まで十分な時間、乾熱し、iii) 乾熱した材料とキレート含有溶液とを、ポリペプチドにキレートが結合するのに十分な条件及び期間で接触させて、材料に本発明の組成物が含まれるようにすることを含む。好ましくは、温度は少なくとも約120℃、少なくとも約120℃または少なくとも約180℃である。溶液には、錯体形成を支持する濃度でキレートが含有される。

40

【0277】

非晶質またはらせん形の再生カイコシルク材料を T_g より高い温度まで乾熱処理することにより、熱誘導 β シート型結晶の形成が導かれる（Magoshi et al., 1977）。同様に、230℃まで加熱した再生タッサールシルクでは、ランダムコイル構造

50

はβシートに変化するが、αヘリックス含有量は極めて一定に保たれる（Kweon et al., 2001）。再生コラーゲンのスポンジ及びファイバーは、一般に、材料を真空下、温度100～120℃まで数日加熱する熱硬化の形で安定化させる（Yannas及びTobolsky、1967）。コラーゲンの熱硬化によりコラーゲンが分解され、温度上昇と共にタンパク質の切断化が高まる（Gorham et al., 1992）。コイルドコイルのシルク材料におけるβシート構造は、タンパク質のガラス転移温度をかなり上回る215℃まで乾熱することによって誘導されているが（Sutherland et al., 2011）、強い機械的強度が観察されなかったのは、後で分かったことだが、材料の加熱時間が十分に長くなかったために架橋を欠いたことが原因であった。対照的に、本願発明者らは、ミツバチのシルクタンパク質、及び／または関連するコイルドコイルのシルクタンパク質を含む材料を十分な時間で高度の乾熱に曝露すると、架橋の形成が促進され、加熱された材料に高い靱性及び／または溶媒安定性を付与することを見出した。当業者であれば理解するように、「乾熱」とは、必ずしも水分が全く存在しないことを意味するわけではない。例えば、乾熱は、通常の室内湿度条件下、例えば、湿度約20%～約80%、または湿度約30%～約50%で実施されることが多い。かかる処理は、熱処理、加熱前の材料の水分含有量、及び加熱ステップが乾燥条件下で実施されたか否か（及び乾燥条件の性質）に依存し得る。本明細書の教示に鑑み、これらのパラメータの好適な組み合わせは、標準的な手順を使用して容易に決定できる。何らかの疑念がある場合でも、材料を凍結乾燥して約180℃まで約30分加熱する、または材料を（標準的な実験設備で発生させるような）真空下で約120℃まで約48時間加熱するというような多数の手段によって利益を達成できる。

10

20

【0278】

加熱する材料は固体状態で水が過量にあり、シルクタンパク質の煮沸効果を有することになる。本明細書で使用する場合、「固体状態」とは、例えば、室温または凍結時に材料に水が全くないことを意味する。一実施形態では、出発原料は、H₂O含有量が約1%～約10%である。一実施形態では、出発原料は、H₂O含有量が約5%未満または約1%未満である。

【0279】

乾燥を促進する条件下で方法を実施すると上述の煮沸効果と逆になる。したがって、乾燥を促進する条件下で実施すると、加熱される（例えば、約100℃～約120℃まで加熱）材料の水分含有量は、180℃超で加熱される水含有量が低い材料よりも高くなり得る。例えば、真空（乾燥条件として使用する場合）が完全真空に近いほどH₂O含有量は高くなり得る。

30

【0280】

一実施形態では、真空存在下で加熱を実施する。大まかに言えば、真空は気体の圧力が大気圧よりはるかに低い領域である。部分的真空の質とは、完全真空にいかに近づいているかを指す。化学、物理学、及び工学においてはよく見られる超高真空チャンバーは、大気圧（100nPa）の1兆分の1を下回る（10）圧力で作動し、約100粒子/cmに達しうる。

【0281】

一実施形態では、真空で約100℃まで材料を加熱する。このような真空は、恐らく完全真空ではないであろう。真空が特に強力というわけではない、及び／または乾燥剤が存在していない場合は、熱を、例えば約120℃～約150℃に上げる必要があることがある。真空（圧力）及び温度の程度の具体的な組合せは、本願教示に鑑み、当業者により容易に決定され得る。

40

【0282】

別の実施形態では、乾燥剤の存在下で（可能であれば真空も存在させる）加熱を実施する。乾燥剤は、当業者に周知であり、市販されているが、それらには、シリカゲル、硫酸カルシウム、及び塩化カルシウムが挙げられるが、これに限定されるものではない。入手した材料の水分含有量が過量の場合は（例えばシルクタンパク質含有溶液）、限定するわ

50

けではないが、凍結乾燥または沈殿（凝固としても知られる）のような技術を使用して材料を乾燥させて減少させることができる。

【0283】

凍結乾燥は当技術分野では、例えば、凍結乾燥（*lyophilization*）または凍結乾燥（*cryodesiccation*）とも呼ばれる。凍結乾燥は、材料を凍結させ、次いで周囲圧力を低下させて、材料中の凍結水を固相から直接気相へ昇華させることにより達成される。材料の凍結乾燥に使用できる装置の例には、マニホール型凍結乾燥装置、ロータリー型凍結乾燥装置及びトレイ式凍結乾燥装置が含まれる。この装置は典型的に、材料の入っている容器内の雰囲気圧を低下させる真空ポンプと、冷却表面での凝縮により水分を除去する凝縮器とを含む。

10

【0284】

一実施形態では、材料または溶液を、約 -20°C 、約 -30°C 、約 -40°C 、約 -50°C または約 -60°C 以下で凍結させる。一実施形態では、凍結させた材料または溶液を約12～約48時間凍結乾燥させる。さらなる実施形態では、凍結させた材料または溶液を約24時間凍結乾燥させる。

【0285】

沈殿（凝固）に関しては、この用語は、出発原料（シルクタンパク質を含む組成物）を流体から固体状態に変換することを指す。材料は、多種多様な技術により沈殿させることができ、それらには、例えば限定するわけではないが、シルクタンパク質を含む溶液へのアルコールまたは塩の添加（例えば、を使用して、フッ化物、硫酸塩、リン酸水素塩、酢酸塩、塩化物、硝酸塩、臭化塩、塩素酸塩、過塩素塩、チオシアン酸塩、アンモニウム、カリウム、ナトリウム、リチウム、マグネシウム、カルシウムまたはグアニジニウムを用いた塩析）、または溶液pHの少なくとも約5.5、好ましくは少なくとも約4.5までの低減、またはその2つ以上の組み合わせが挙げられる。一実施形態では、アルコールを含む溶液中でシルクタンパク質を沈殿させ、沈殿物を回収、風乾し、ステップii)で使用する。どの好適なアルコールでも使用でき、好ましい例としてメタノール及びエタノールが含まれる。

20

【0286】

材料は、当技術分野で公知の任意の好適な手段を使用して乾熱できる。例には、オープン、加熱ランプまたはヒートブロックの使用が挙げられるが、これに限定されるものではない。当業者であれば理解するように、乾熱では、オートクレーブのような高湿で生じる過程が排除される。

30

【0287】

乾熱により、個々のシルクタンパク質などのタンパク質の鎖間でかなりの程度の架橋が得られる。シルクタンパク質では、コイルドコイル形態にある場合、架橋は、架橋形成の可能性のある多数のアミノ酸がタンパク質中に存在すること、及びこれらの残基がタンパク質表面上に存在すること、そのため架橋形成に利用可能であることによるものと考えられる。いくつかの実施形態では、架橋は、グルタミン、グルタミン酸及びアスパラギン酸の各残基の1つ以上の間のアミド架橋、及び／またはスレオニン及び／またはセリンと、グルタミン酸及び／またはアスパラギン酸とのエステル架橋である。一実施形態では、平均約2つのLys-Gluイソペプチド結合が個々のタンパク質分子間にある。

40

【0288】

熱処理する過程により材料の特性が改善され、例えば、熱処理で靱性及び／または溶媒安定性が高まった。改善の程度は、加熱前の材料の性質に依存する。例えば、「未処理」スポンジと比較すると、過程により、水に浸漬した場合の安定性が本質的に付与される。事前にメタノールで処理した材料に比べて水への溶解度はほとんど改善しないが、本明細書に記載のような熱処理では、SDS（例えば、2% SDS）、尿素（例えば、8 M尿素）またはグアニジニウム（*guanadinium*）（例えば、6 M グアニジニウム（*guanadinium*））を含む溶液中での安定性が本質的に付与され、一方、メタノール（例えば、60%メタノール）処理した材料は、SDS、尿素及びグアニジニウム（g

50

uanadinium) 中で可溶性である。またさらなる実施形態では、本明細書に記載のような熱処理により、メタノール（例えば、60%メタノール）で処理した材料と比較して靱性が少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%向上する。一実施形態では、改善された靱性及び／または溶媒安定性を、メタノール処理、水アニーリングまたはオートクレーブなしでもシルクタンパク質が会合できるようにされている未処理材料と比較して評価した。

【0289】

本明細書で使用する場合、用語「靱性」とは、材料を破壊するのに要するエネルギーを指す。靱性は、当技術分野で公知の好適な技術のどれを使用しても測定することができる。ある場合では、標準的な応力-ひずみ曲線下の面積を決定することにより靱性を測定する。一実施形態では、本発明の方法を使用して作製した材料は少なくとも約120MJ/m³、または最小約130MJ/m³、または最小約140MJ/m³、または最小約150MJ/m³、または最小約160MJ/m³の破壊エネルギーを要する。さらなる実施形態では、方法による結果は、メタノール（例えば、60%メタノール）で処理した材料と比較して靱性（破壊エネルギー）が少なくとも約1.5倍増加、または少なくとも約1.75倍増加、または少なくとも約2倍増加となる。

【0290】

いくつかの実施形態では、材料を化学的処理に供する。いくつかの実施形態では、材料を、水溶性C₁-C₄アルカノール、例えば水中メタノールまたは水中エタノールを用いた化学的処理に供する。好ましくは、C₁-C₄アルカノールはメタノールである。

【0291】

一実施形態では、本発明は、本発明の組成物を含む材料を化学的処理する過程によって形成された材料を含み、かかる過程は、i) 材料を固体状態で得、ii) かかる材料と、水溶性C₁-C₄アルカノール、例えば、水中メタノールまたは水中エタノールとを十分な時間接触させて処理した材料が不溶性になるようにすることを含む。別の実施形態では、本発明は、本明細書で定義するポリペプチドを含む材料を化学的処理する過程によって形成された材料を含み、かかる過程は、i) 材料を固体状態で得、ii) 材料と、キレート及び水溶性C₁-C₄アルカノールを含有する溶液とを、ポリペプチドにキレートが結合するのに十分な条件及び期間で接触させて、材料に本発明の組成物が含まれるようにすることを含む。

【0292】

水溶性C₁-C₄アルカノールは、キレートを、錯体形成を支持する濃度で含有し、例えばこの場合はキレート量は過剰量である。いくつかの実施形態では、水溶性C₁-C₄アルカノールは、キレートを、濃度約0.001~50mg/mLで含む。いくつかの実施形態では、キレートの濃度は約0.01~10mg/mLである。いくつかの実施形態では、キレートの濃度は約0.1mg/mL~5mg/mL、例えば0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL、2.0mg/mL、2.5mg/mL、3.0mg/mL、3.5mg/mL、4.0mg/mL、4.5mg/mLまたは5.0mg/mLである。

【0293】

いくつかの実施形態では、水メタノールは、処理した材料が未処理材料より可溶性が低くなるようにするために十分な量のC₁-C₄アルカノールを含む。一実施形態では、水溶性C₁-C₄アルカノールは、少なくとも約50%メタノール、少なくとも約60% C₁-C₄アルカノール、少なくとも約70% C₁-C₄アルカノール、少なくとも約80% C₁-C₄アルカノールまたは約90%未満のC₁-C₄アルカノールを含む。一実施形態では、水溶性C₁-C₄アルカノールは、容量で、50%を超えるが100%未満のC₁-C₄アルカノールを含む。

【0294】

理論に束縛されることは望まないが、材料及び／または組成物を、水溶性C₁-C₄ア

10

20

30

40

50

ルカノール（好ましくはメタノール）を用いて処理することによって、コイルドコイルのポリペプチド間にベータシートの架橋が発生すると考えられている。ベータシートの架橋の形成は、材料が水溶液中で安定化するのを支えていると考えられている。メタノールは、溶媒の疎水性を高め、それにより内部のタンパク質間疎水性相互作用を弱めることによってベータシートの形成を誘導すると考えられている。同時に、水素結合に利用可能な水が減少し、それによりタンパク質間の水素結合が誘導され则认为られている。

【0295】

好ましい実施形態では、水溶性 $C_1 - C_4$ アルカノールは、容量で、水中メタノール 50%~90%を含む。水は可塑剤として作用し、タンパク質のガラス転移温度を下げてタンパク質の移動度を高め、構造の再構成がより容易に起きやすいようにしていると考えられている。水はタンパク質にとっては溶媒でもあることから、材料の安定化には妥協点を見つける必要があり、すなわち、水が過量だと溶解過程が優勢となり、水がほとんどまたは全くなければ構造の再構成率は許容できないほど緩徐になる。本願発明者らは、50~90%メタノールで処理した材料は、タンパク質が構造を再構成できる十分な水を有し、なおかつタンパク質を沈殿状態、かつ固体形態に維持する十分なメタノールもある環境にあったことを見出した。

10

【0296】

溶解度は、当技術分野で公知の好適な技術のどれを使用しても測定することができる。ある場合では、水中での材料の性能を評価することにより溶解度を測定する。可溶性材料は膨張し、水中に完全浸漬後、最終的に24時間以内に溶解する。

20

【0297】

上記のように、材料と、水溶性 $C_1 - C_4$ アルカノールとを、十分な時間接触させて、処理した材料を未処理材料よりも不溶性にならせた。時間は、水溶液中の $C_1 - C_4$ アルカノール濃度に依存する。いくつかの実施形態では、材料と、水溶性 $C_1 - C_4$ アルカノールとを少なくとも約1時間、少なくとも約6時間、少なくとも約12時間、少なくとも約18時間、少なくとも約24時間、少なくとも約30時間、少なくとも約36時間、少なくとも約42時間、少なくとも約48時間、少なくとも約54時間または少なくとも約60時間接触させる。任意選択で、材料は、乾燥させてから使用する。一実施形態では、材料は、乾燥させてから使用する。

【0298】

本明細書に記載する化学的処理の過程の結果、材料特性が改善され、少なくとも韌性及び／または溶媒安定性が向上する。改善の程度は、加熱前の材料の性質に依存する。例えば、「未処理」スポンジと比較すると、過程により、水に浸漬した場合の安定性が本質的に付与される。「未処理」スポンジが水中で膨張し急速に溶解するのに対し、水メタノールで処理したスポンジは、水中での膨張及び／または溶解レベルが低いことを示した。

30

【0299】

驚くべきことに、本明細書に記載する組成物及び／または材料は、室温で乾燥保存した場合に著しい安定性を示す。例えば、本発明の組成物及び／または材料は、12か月にわたり室温で乾燥保存した場合に安定であり、スペクトルシグナルの低下が観察されなかったことが実証されている。

40

【0300】

固体材料形態は、多数の用途、例えば、回収可能な生体触媒スポンジ、再使用可能感知フィルム、または抗菌創傷被覆材等に使用してよい。

【0301】

標的化合物との結合

本願発明者らは、本発明の組成物、材料及び／または共重合体は標的化合物結合能があることを実証した。

【0302】

したがって、本発明は、標的化合物と結合することができる本明細書に記載の組成物を提供する。本発明はまた、標的化合物に対する結合部位を含む組成物も提供する。標的化

50

合物は、気相でも、または液相に溶解していてもよい。

【0303】

用語「標的化合物」は広く定義され、酸素、一酸化炭素、二酸化炭素、一酸化窒素及びシアン化水素等といった低分子、ならびにイソシアニド及びシアニド・ヒドロキシド (cyanide hydroxide) 等といったイオンまたは官能基が含まれるが、これに限定されない。例えば、本発明の組成物により結合される標的化合物には、酸素、一酸化炭素、二酸化炭素、化合物でP原子、S原子、またはN原子を有するもの、及びその混合物からなる群から選択される化合物が挙げられる。

【0304】

本発明は、NOと酸素の可逆的結合に特に有用である。本願発明者らは、NOを本発明の組成物と結合させると、組成物に検出可能な変化が生じるため、かかる組成物は、バイオセンサー技術における使用に好適であることを実証した。

10

【0305】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び／または材料は、特定の標的化合物について選択的である。選択性は、組成物及び／もしくは材料に存在するキレート剤及び／もしくは金属イオンならびに／または使用する形質導入方法（例えば、電気化学的か、光学的か）を変えることによって改変してよい。また、ポリペプチド配列中の1個以上のアミノ酸の置換によって選択性に影響を与えてもよい。

【0306】

本発明の組成物は、意図される特定の使用条件下で対象標的化合物に結合するよう設計され得る。より詳細には、組成物には、金属イオンとキレート剤とが含まれるキレートが含まれることになり、その場合、かかる組成物は標的化合物が含有されている環境において標的化合物を結合することができる。

20

【0307】

用語「標的化合物が含有されている環境」とは、上述の定義のように、1つ以上の標的化合物を含んでいる培地を指す。

【0308】

上述のように、キレートは、鉄、チタン、スズ、マンガン、クロミウム、コバルト、ニッケル、銅、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、オスミウム、イリジウム、バナジウム、亜鉛、及び白金という上述金属イオンなど、多種多様な遷移金属またはpブロック金属のいかなる配位錯体であってもよい。一実施形態では、金属イオンは錯体を生成し、キレートが所望の標的化合物を結合する第1の価電子状態を有する。一実施形態では、金属イオンは、キレートが標的化合物への結合に実質的に不活性である第2の価電子状態も有することになる。

30

【0309】

組成物中の金属イオン及び／またはキレート剤は、天然には生じない機能（例えば、標的化合物結合）を果たすために多様に変えることができる。例えば、本明細書に記載するポルフィリンのような人工ポルフィリンが多種多様にあり、市販されているものもあれば、容易に調製することもでき、それらを使用して、代替的機能を導入することができる。例えば、コバルトポルフィリンは、一酸化窒素親和性に優れているが酸素に対する親和性は低く、一方、ルテニウムポルフィリンは、蛍光酸素センサー及びMRI造影剤として使用できる。

40

【0310】

センサー

本願発明者らは、本明細書に定義するポリペプチドをキレートに結合させると、気体結合能のような新しい特性が導入されることを実証した。したがって、本発明の組成物は、バイオセンサーとして使用可能である。

【0311】

用語「バイオセンサー」を本明細書で使用する場合、化学種または生物学的種を分子の識別に基づいて選択的に検出するシステム、基質または装置を意味することを理解される

50

べきである。バイオセンサーは、生物学的識別素子を使用する。化学種または生物学的種は本明細書において標的化合物を指す。バイオセンサーは、本明細書に記載する組成物をセンサーとして使用する。バイオセンサーは、標的化合物が結合した時の組成物における検出可能な変化を使用し得る。バイオセンサーは、特定の生化学的反応を使用して、電気シグナル、熱シグナル、光シグナル等により分子を検出し得る。

【0312】

バイオセンサーは、典型的に、識別用生物学的素子を含む（例えば、標的化合物と結合することができる素子）。バイオセンサーは、識別用素子に対する標的化合物の結合を測定するシグナルトランスデューサーも含んでよい。いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び／または材料をバイオセンサーにおける識別用素子として使用してよい。

10

【0313】

例えば、ヘムタンパク質機能には、ヘム補因子の可逆的な還元及び再酸化を行う能力が要求される。還元及び酸化は、分光法を用いて監視することができるが、これは、還元によりソーレー帯ピークが約400nmからさらに高い波長（約420～430nm）へシフトするからである。ミツバチのシルク-ヘムフィルムを還元剤に曝露させると、ソーレー帯ピークは421nmにシフトし、527nmと558nmにおけるアルファ・ベータ両ピークの明確な分断が見られ、 Fe^{3+} が Fe^{2+} に還元されたことを示している。同様のシフトは、ヘモグロビンまたはミオグロビンのようなヘムタンパク質のスペクトルで観察される。本明細書で実証されたように、酸化剤を添加すると還元は逆に進んだ。

【0314】

したがって、本明細書に記載する組成物は、産業汚染物質の監視から生物医学の分野に至るまで多くの用途に好適な一酸化窒素バイオセンサーとして使用できるであろう（例えば、NOは血管拡張メッセンジャーであり、内皮由来弛緩因子でもあるが、細胞間コミュニケーションに主要な役割を果たしている。また、NOは炎症を起こした組織によっても産生されるので、診断ツール、例えば、呼気中NOから肺の炎症を診断するツールとしても使用できる）。

20

【0315】

本願発明者らは、ヘムb-シルク材料の一酸化窒素結合を検討した。NO曝露では、NO濃度の増加に伴いソーレー帯ピークの位置は421nmから395nmへシフトした。濃度の影響が著明に観察されたことから、本明細書に記載する組成物で形成された材料を一酸化窒素センサーで使用できることが実証された。フィルムは、顕著な安定性を示し、室温で乾燥保存した場合、少なくとも12か月にわたっては、スペクトルのシグナルの低下は観察されなかった。

30

【0316】

組成物に検出可能な変化を検出する能力があるため、複雑な検出系（例えば、明らかな分析検体を使用するものなど）または複雑な中間操作を回避できる。組成物により標的化合物の認識は、検出可能な変化によって直接検出され得る。例えば、シグナル変換で次々と起こるイベントがなくても検出可能な変化が検出され得る。

【0317】

本明細書で使用する「検出可能な変化」は、例えば、色、蛍光、生物発光、タンパク質活性、電気化学（コンダクタンスまたは電流など）等といった標的化合物及び組成物の結合または会合の状態に示すために使用できる、組成物の物理的または化学的特性におけるあらゆる変化であってよい。指標は、例えば、例えば、吸光分光光度計または蛍光分光光度計のような分光光度計、または電気化学測定用のルミノメーターまたはポテンシオスタットといった計測器を使用して、目視検出可能及び／または検出可能であってよい。一実施形態では、検出可能な変化は電気化学測定によって検出可能である。

40

【0318】

例えば、いくつかの実施形態では、特性は、酸化還元状態、電気伝導率／電気抵抗率、電気化学、電流、電位、容量、吸光度、光線透過率、インピーダンス、反射率、屈折率、蛍光、燐光、発光、重量測定または質量感受性共振法で決定した質量、熱量測定法で決定

50

した熱、前記組成物のコンホメーション及び生理的活性からなる群から選択されてよい。

【0319】

いくつかの実施形態では、前記物性は吸光度、光線透過率、反射率、屈折率、蛍光、燐光、または発光であり、トランスデューサーは前記変化を吸光度、光線透過率、反射率、屈折率、蛍光、燐光、または発光を電氣的シグナルに変し、例えば、フォトメーターもしくは分光光度計または光強度を測定する他の装置または前述の任意の光特性である。

【0320】

前記物性が吸光度または上述した他の任意の光特性である複数の実施形態では、組成物を、透明または反射電極上に固定化してもよいし、または、非導電性の透明または反射基質、例えばガラス上に固定化してもよい。

10

【0321】

検出可能な変化が電気化学である複数の実施形態では、検出可能な変化は、電位差法またはボルタンメトリー法のような電気化学法を使用して測定してよい。

【0322】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物または材料中のキレートは、1つ以上の電子を可逆的または半可逆的に移動させることができる金属含有基（例えば、遷移金属含有基、アルカリ土類金属またはpブロック金属を含有する基）であり得る。数多くある可能な遷移金属含有キレート、アルカリ土類金属またはpブロック金属を含有する基が使用可能である。

【0323】

キレートは、標的化合物との結合に応答して電流測定または電位差測定での変化を生じさせる能力があり得る。

20

【0324】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物を、組成物自身に載せて、または一連の電子運搬体にして電子運搬体として使用してよい。一連の電子運搬体は、電子伝達系であってもよく、または一連の電子運搬体が電極を含んでいてもよい。電子伝達鎖は、一連の電子運搬体分子に沿ってエネルギーレベルの高い方から低い方へ電子を運搬する。電子運搬体分子とは、電子を供与体分子から受容体分子に移動させる分子である。電子受容体は、電子を受け取りやすく、そのため電子を獲得して還元される分子であり、電子供与体は、反応過程で電子を容易に放出して、酸化される分子である。したがって、本発明の組成物は、電子運搬体に沿って電子を渡すことを利用する方法に使用することができ、その場合、各電子運搬体は、電子の移動によって還元されてから酸化され（またはその逆）、一連の電子運搬体として本発明のタンパク質を含む。電子伝達系は、天然または合成の電子運搬体を含んでよい。本発明の組成物は、電子運搬体に沿って電子を渡すことを利用する方法に使用することができ、その場合、各電子運搬体は、電子の移動によって還元されてから酸化されるかまたはその逆であり、本発明のタンパク質は電子運搬体の一部を形成する。このような方法では、電子は、一般に、酸化還元電位が引き続き低いまたは高い電子運搬体の勾配に沿って移動する。

30

【0325】

本発明の組成物の別の使用は、電子が次から次へと渡されるように電極と会合する組成物を含む装置の一部として使用することである。組成物は、電極上に結合または吸着されてよい。これにはサイクリックボルタンメトリーにおける本発明の組成物の使用が含まれ、錯体の中間電位（酸化還元電位）に関する情報を得るために使用される。

40

【0326】

使用

本願発明者らは、本発明の組成物が、Znフスロシアニン（*phthlocyanine*）テトラスルホン酸のような光感作薬を結合できることを実証した。したがって、本発明の組成物及び／または材料を光線力学的治療法に使用してよい。

【0327】

光線力学的治療法（PDT）は、ポルフィリン及びフタロシアニンのような光増感物質

50

を用いる悪性腫瘍の治療法である。簡単に言うと、ポルフィリン、金属ポルフィリン、及びフタロシアニンなど、特定の光増感物質により腫瘍細胞を選択的に特定するものである。組織の照射により、光増感物質を担持する細胞に選択的な細胞死をもたらす。治療上有用な600～1200nmの範囲の赤色光が使用される。スペクトルのこの領域の光は、生物組織内での透過率が高い。ポルフィリン及び構造的に類似したフタロシアニンはいずれも赤色光を吸収する。ポルフィリンの方が幅広く研究が行われているが、フタロシアニンは吸収特性が改善され、またスペクトルのこの領域の吸光係数が高い。ポルフィリン、金属ポルフィリン、及びフタロシアニンの光化学及び光物理学が詳細に研究されている。観察された過程には、基底への無放射崩壊、軸配位子の損失、エネルギー移動、電子移動、一重項酸素の形成、燐光及び蛍光が挙げられる。各系で観察された光過程は、通常は金属（ポルフィリンに対する2H）である中心配位子、金属の酸化状態及び金属に結合している軸配位子に大きく依存する。光物理的特性が大環状化合物の性質に依存することも観察された。光に曝露すると、光増感化合物は、毒性になるか、または一重項酸素または他の酸化基のような毒性物質を放出することがあり、これらは細胞の膜及び細胞構造など、細胞物質または生体分子に損傷を与え、このような細胞または膜の損傷により最終的に細胞を死滅させ得る。

10

【0328】

微生物感染の治療または予防にPDTを使用してもよい。上記のように、PDTは、一旦光で活性化されると活性酸素種（ROS：reactive oxygen species）を発生させる光増感分子の使用に基づいている。これらのROSは、細菌、マイ

20

【0329】

したがって、本発明はさらに、本明細書で記載する組成物を利用した、グラム陽性菌及び／またはグラム陰性細菌などの微生物（microbe）を殺傷する方法を含む。

【0330】

微生物（microbe）という用語の使用は、本明細書では、細菌、真菌類、藻類、及びウイルスのような微生物（microorganism）を含む。この方法の実施形態は、本明細書で記載する組成物を提供し、前記組成物をグラム陽性菌及び／またはグラム陰性細菌に曝露し、かつ、ある期間組成物に照射するというステップを含む。

30

【0331】

一態様では、本発明は、被検者の腫瘍を治療する方法を提供し、前記方法は、本明細書に記載する組成物を投与することを含む。

【0332】

被検者は、有効濃度を得るために薬理的に許容される担体または希釈剤を存在させた、薬理的有効量の本明細書に記載の組成物を患者に投与することにより治療され得る。

【0333】

本発明による組成物は、薬理的に許容される担体または希釈剤中に、十分な量で含まれる、生体内で治療的に有用な作用を示し、治療される患者に有害な毒性作用を示さない。

40

【0334】

組成物の一部として、薬理的に適合性のある結合剤、及び／またはアジュバント物質を含めてもよい。活性物質を、抗生物質、抗真菌薬、他の抗ウイルス薬及び免疫賦活薬など、所望の作用を損なわず、かつ／または所望の作用に補足しない他の活性物質と混合することもできる。本発明による活性物質は、任意の経路、例えば、経口経路、非経口経路、静脈内経路、皮内経路、皮下経路、または局所経路で、液体形態または固体形態で投与可能である。

50

【0335】

本発明の化合物の好ましい投与方法は経口投与である。経口組成物には一般に、不活性希釈剤または食用担体が含まれるであろう。それらは、ゼラチンカプセル内に封入しても圧縮して錠剤にしてもよい。経口治療的投与のために、前述の化合物を、添加物と共に組み込み、錠剤、トローチ剤、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウエハース、チューインガム等の形態で使用してよい。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ剤等は、以下の成分を含有してよく、すなわち、微結晶セルロース、トラガントガムまたはゼラチンのような結合剤；スターチまたは乳糖のような添加物、アルギン酸、プリモゲル（Primogel）、コーンスターチ等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはステロート（Sterotes）のような滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素のような滑剤；及びショ糖もしくはサッカリンのような甘味剤またはペパーミント、サリチル酸メチルのような香味剤、もしくはオレンジ香味剤を添加してよい。投与単位形態がカプセルの場合、そこには、上述タイプの材料に加え、脂肪油などの液状担体を含有してよい。他の投与単位形態は、投与単位の物理的形態を変更する、例えば、コーティング剤のような他のさまざまな材料を含有してよい。したがって、錠剤または丸剤を、糖、シェラック、または他の腸溶コーティング剤を用いてコーティングしてよい。シロップは、活性成分に加え、甘味剤としてのショ糖、ならびに特定の防腐剤、色素と着色剤及び香味剤を含有してよい。これらのさまざまな組成物を調製する際に使用される材料は、使用量において薬理的に純粋かつ非毒性でなければならない。

10

【0336】

20

溶液または懸濁液は以下の構成要素、すなわち、注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒のような滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗菌薬；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸のようなキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩のような緩衝剤及び塩化ナトリウムまたはデキストロースのような等張化剤を含んでもよい。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは多用量バイアル内に封入することができる。

【0337】

組成物自身の有効成分濃度は、薬物の生物学的利用能及び当業者に公知の他の因子に依存するであろう。

30

【0338】

用量値も、軽減すべき疾患状態の具体的な重篤度によりことになってくることが、ならびに、いかなる個々の被験者についても、特定の投与レジメンは、個々の必要性と、前述の組成物を投与するかまたは投与を監督する者の専門的判断とに従って調整するべきであることに留意するべきである。有効成分は、単回投与でよく、または、多数の小用量に分割して投与間隔をさまざまに変えて投与してもよい。

【0339】

本発明の組成物を、薬理的に許容される担体を共に製剤として調製する。体外に短時間で排出されないよう活性化合物を保護する担体が好ましいとされ、例えば、植込み及びマイクロカプセル化による送達システムなどの徐放製剤である。生分解性、生物的適合性ポリマーを使用でき、例えば、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、及びポリ乳酸がある。このような製剤の調製方法は、当業者に明らかとなるであろう。

40

【0340】

特定の一実施形態によると、本発明の組成物を使用して抗炎症反応を抑制できる。具体的には、このような抗炎症反応には、IL-2、IL-17、IL-23、IFN-ガンマ、IL-6のような炎症誘発性サイトカインの量または発現の抑制または低下を伴ってよい。本発明によるこのような抑制または低下は、未治療対照に比較して約5%~99%の低下、具体的には、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%の低下であってよい。さらに別の具体的な実施形態では、本発明

50

の組成物は、TGF- β 、IL-10、IL-4、IL-5、IL-9及びIL-13のような抗炎症サイトカインの量または発現を上昇及び増加させてよい。具体的には、抗炎症サイトカインの増加、誘導または上昇は、未治療対照と比較して約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%の増加であってよい。

【0341】

本発明の組成物は、RNA加水分解、及びfor DNA光切断のための核磁気共鳴画像法用薬剤、放射線増感剤としての使用を含むさまざまな用途において有用である。

【0342】

本願発明者らは、本発明の組成物が基質酸化の触媒として機能できることも実証した。特に、本願発明者らは、本発明の組成物がペルオキシダーゼとして機能できることを実証した。

【0343】

鉄(IV)オキソポルフィリン基の陽イオンを使用する多くの酵素が介在してさまざまな基質の酸化を触媒することが知られている。

【0344】

キレート、特に金属イオン及び／またはキレート剤は、触媒、例えばペルオキシダーゼとして機能させるために選択することができる。例えば、本発明のヘムbコイルドコイルシルクタンパク質組成物のペルオキシダーゼ活性は、フェノール廃水のバイオレメディエーションに使用することができる。

【0345】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、触媒過程のような過程に使用できる、その場合、酸化状態の循環が必要とされる。例えば、本願発明者らは、ヘムb及びAmelF3を含むフィルム中の金属イオンは、 Fe^{2+} から Fe^{3+} へ可逆的に酸化され得ることを実証した。キレート、特に金属イオン及び／またはキレート剤は、金属イオンの酸化還元電位に基づいて選択することができる。

【実施例】

【0346】

ここで、本発明を以下の実施例を参照しながら説明する。これらの実施例は、あくまで例示を目的として提供されるものであり、本発明はこれらの例に限定されるものではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかなあらゆる変形を包含するものである。

【0347】

材料及び方法

使用した標準的な化学薬品はすべてSigma Aldrich社より購入した。ヘムbは、Frontier Scientific社より購入した。UV/VIS吸光度測定は、SpectraMax M2マイクロプレートリーダーで実施した。

【0348】

ポリペプチド合成

アフィニティー精製タグのない、完全長のミツバチの組換えシルクタンパク質(AmelF3)を、Weisman et al. (2010)に記載のようにEscherichia coliでの発酵により作製した。アフィニティー精製タグのない、完全長、ツムギアリ(Weaver Ant)／ツムギアリ(Green Ant)(Oecophylla smaragdina)組換えシルクタンパク質(GA1、GA2、GA3、GA4)を、Weisman et al. (2010)に概略されている同一の手順にしたがいEscherichia coliでの発酵により作製した。

【0349】

ミツバチのシルクタンパク質の部位特異的突然変異誘発を当業者に公知の方法を使用して実施した。例えば、AmelF3 Tyr76Alaを作製するため、フォワード側ブ

10

20

30

40

50

ライマー 5' - C T C T T G C A G A G G C C G C G T T G C G A G C G T C C G - 3' (配列番号 80) を対応するリバーズ側プライマーと共に用い、部位特異的突然変異誘発を、Invitrogen 製 Pfx 50 DNA ポリメラーゼを使用して Pfx 50 製造者の指示書にしたがい実施した。すべての AmelF3 変異体を発現させ、非修飾 AmelF3 シルクタンパク質の場合と同様の手順を使用して精製した。AmelF3 Tyr76His を作製するため、フォワード側プライマー 5' - C T C T T G C A G A G G C C C A T T T G C G A G C G T C C G - 3' (配列番号 81) を対応するリバーズ側プライマーと共に用いた。AmelF3 Ala97His を作製するため、フォワード側プライマー 5' - C C T G A A A A T C A T C A A C A A G C G C A A T T A A A C G C C C A G G A A A A G T C - 3' (配列番号 82) を使用した。

10

【0350】

実施例 1：組換えシルク系材料の調製

先に記載の方法 (Weisman et al., 2010; Huson et al., 2012; Rapsom et al., 2014) を使用して、組換えシルクタンパク質をスポンジまたはフィルムに製造した。シルクポリペプチドで製造した材料、例えば、スポンジまたはフィルムを必要になるまで室温で保存した。

【0351】

実施例 2：コイルドコイル領域を有するポリペプチドはキレート剤及び金属イオンを含むキレートに強く結合する

AmelF3 スポンジを実施例 1 に記載のように調製した。70%メタノール ヘム b 中のヘム b の溶液 (0.5 mg/mL) をミツバチのシルクスポンジ (ヘム b 過剰) に加えると、灰色がかった緑色のヘム b 溶液は直ちにスポンジに吸収され、数秒以内にスポンジの色が赤変し、ヘムが、シルクタンパク質に結合したことを示す (図 1A)。ミツバチのシルクで観察された変色は、ヘム基内部の鉄金属中心の配位における変化を指し、赤いヘモグロビンと同様の配位をする材料が作製されたことを指す。70%メタノール、0.1 M HCl または 0.1 M NaCl を用いた十分な洗浄では色は除去されなかった。赤色が保持されたことは、ミツバチのシルクスポンジ内でヘムが強く結合していることを示す。

20

【0352】

図 1 は、本発明のポリペプチドに対するキレートの強い結合を実証している。

30

【0353】

実施例 3：コイルドコイル領域を含むポリペプチドは金属イオンとの配位結合を形成する
実施例 1 に記載のように AmelF3 から透明なシルクフィルムを調製し、UV/Vis 分光法を用いて材料のスペクトル特性を監視した。

【0354】

AmelF3 とヘム b の溶液を共乾燥させて本発明の組成物の実施形態を形成した。簡単に言うと、ヘム b 2 mg と AmelF3 20 mg のシルクスポンジを 1 mL の HFIP に一晩室温にて溶解させた。溶液をキュベットまたは 24 ウェルプレートに分注し、室温で乾燥させた。乾燥させたフィルムを 70%メタノールに一晩浸漬してフィルムを水不溶性にした。

40

【0355】

別法として、ヘム b を予め形成したフィルムに「浸出」させた。実施例 1 に記載のように AmelF3 材料を形成した。70%メタノール溶液に溶解させたヘム b 溶液 (0.5 mg/mL; ヘム b 過剰) にシルク材料を 1~48 時間浸漬し、その後、70%メタノールで洗浄して結合しなかったヘム b をすべて除去し室温で乾燥させた。

【0356】

ヘムタンパク質は、約 400 nm における UV/Vis スペクトルで特徴的なソーレー帯ピークを有し、そのピークはヘムの鉄原子の配位変化に対して極めて敏感である。ヘム b などの鉄ポルフィリンの場合、400 nm より下における幅広なソーレー帯ピークは鉄がポルフィリン環にのみ配位している 4 配位鉄中心を指す。ヘム基がアミノ酸に配位する

50

と（5配位鉄中心）、ソーレー帯の赤は400nmより上にシフトしピークが先鋭化する。

【0357】

300～600nmのUV/Vis吸光度測定値を収集した。図2は、水に溶解させたヘムbの溶液（0.05mg/mL）及びヘムbを含有するミツバチの組換えシルクタンパク質AmelF3から作製したシルクフィルムの両UV/Vis吸収スペクトルを示す。フィルムのUV/Visスペクトルは、400nm～410nmで先鋭なソーレー帯ピークを示している。これは、シルクポリペプチドの1個または2個のアミノ酸に対するFe配位の特徴である。対照的に、ヘムb溶液は、400nmより下で幅広なピークを示す。このピークはヘムb内の配位していないFeの特徴である。

10

【0358】

ミツバチシルクの場合、シルクタンパク質はヒスチジン、メチオニンのシステインのような典型的な配位残基を含有していないので、ヘムb内のFeが非修飾シルクタンパク質に配位するという事実は予想外のことであり、意外であった。

【0359】

配位アミノ残基の性質を決定するため、発明者らは、シルクタンパク質に加えるヘムb量をさまざまに変え、ラマン分光法を使用してヘムb結合の化学量論を検討した。

【0360】

ヘム及びAmelF3HFIP溶液を共乾燥させて、ヘムb対AmelF3の比が異なるAmelF3フィルムを調製した。ヘム低負荷では（ヘム：タンパク質のモル比が1：1及び1：2）、404nmにおける先鋭なソーレー帯ピークが観察され、全ヘムが配位したことを示している（図3）。タンパク質に対するヘムbの濃度が高くなるにつれ、ソーレー帯ピークは幅広になり、かつ波長の低い方へシフトしたことから、配位していないヘム量の増加が示された（図3）。ヘム：シルク比1：1で全ヘムが配位したという知見から、各シルク単量体内部の1個のアミノ酸が配位に関与することが示唆された。

20

【0361】

配位アミノ酸の同一性をラマン分光法を使用して検討した。ラマン分光法は、鉄中心と配位する配位子との間の伸縮振動数を測定するもので、これらの伸縮振動数から配位子の性質が示される。ラマンスペクトルは、inVia共焦点顕微鏡システム（Renishaw、Gloucestershire、イギリス）を使用して、Modu-Laser（アメリカ合衆国）Stellar-Pro ML/150 Arイオンレーザーの50倍（0.75na）対物レンズから754nmで励起して得た。Ophir（イスラエル）Novaパワーメーターを使用してPD300-3Wヘッドを合わせて測定した入射レーザーパワーは、シルクフィルムでは0.59mW、またミオグロビン粉末では0.32mWであった。フィルムは、鏡面裏板（mirrored backing）上に保持し、一方、粉末は2mMのキャビティーセル内に圧縮した。同軸後方散乱幾何学を用いた。100～3200cm⁻¹の範囲にわたるスペクトルを収集し、各蓄積時間が20秒のスキンを少なくとも20スキンのわたり平均を出した。シリコンウェハーの520cm⁻¹ラインを使用してラマンシフトを校正した。スペクトル分解能は約1cm⁻¹であった。Grams AIソフトウェアV9.1（Thermo Scientific、アメリカ合衆国）を使用してすべてのデータ操作を実施した。

30

40

【0362】

励起波長785nmで励起したシルク-ヘムフィルムのラマンスペクトルは、594cm⁻¹に中心がある幅広なピークを示し（図4）、これはシルク-ヘムフィルムに特異的なものであった。配位性配位子チロシンを有するヘムタンパク質は、同様のFe-Tyr伸縮を示す（Nagai et al., 1983及び1989）。成熟したミツバチの組換えシルクタンパク質3は、予測コイルドコイルのコア内に位置する1個のチロシン残基（Tyr76）を含有する（配列番号39）。ラマンスペクトルから、AmelF3のTyr76が、ヘム中心に配位する可能性が最も高い候補であることが示された。

【0363】

50

Tyr 76 が実際に配位する配位子であるか否かを試験するため、本願発明者らは、Amel F3 シルク遺伝子の部位特異的突然変異誘発を使用して Tyr 76 をアラニンで置き換えた。Tyr 76 Ala 置換タンパク質 (Amel F3 Tyr 76 Ala) の UV/Vis スペクトルは 395 nm において幅広なソーレー帯ピークを有していたことから、ミツバチの非修飾シルクで認められた配位はこの単一アミノ酸置換によって逆転したことが示された (図 5 A)。Tyr 76 Ala シルクタンパク質を使用して調製したスポンジにヘム b を加えたところ、著明な変色は観察されず、水メタノールで洗浄してもヘム b の緑色は消えなかったことから、ヘム b 補因子はシルクタンパク質に結合したが、金属イオンはポリペプチドに配位しなかったことが示された。

【0364】

このデータは、ミツバチの組換えシルクを、ヘムタンパク質工学の安定なタンパク質足場として使用できることを指している。ヘム中心鉄に配位させる、コイルドコイルのコア内のチロシン残基を決定した。部位特異的突然変異誘発から、ヘム中心の配位を制御することが可能であることが実証された。

【0365】

実施例 4：部位特異的突然変異誘発を使用したポリペプチドの修飾で金属イオン配位を制御できる

本願発明者らはまた、Tyr 76 からヒスチジンへの変異も行い、単一アミノ酸の置換がヘム b への結合に与える影響を検討した。Amel F3 の UV/Vis スペクトルで示されたように、Tyr 76 His は、溶液中でもフィルム形態でも配位結合を介してヘム b を結合した (図 5 B)。400 nm 前後で観察された先鋭なピークは、ヘム中心鉄に対するアミノ酸残基の配位を示している。このデータは、コイルドコイル領域を有するポリペプチドを、キレート剤に結合するための安定なタンパク質足場として使用できることを指している。部位特異的突然変異誘発から、キレート剤への結合が改変可能であることが実証された。

【0366】

実施例 5：コイルドコイル領域を有するポリペプチドに対するキレート剤及び金属イオンを含むキレートの結合はシルクポリペプチド固有ではない

ツムギアリ (Green Ant) (Oecophylla smaragdina) (GA1~4) シルクタンパク質由来の透明フィルムを上述のように調製した。70% メタノールに溶解させたヘム b を、実施例 3 に記載のように、予備形成したツムギアリ (Green Ant) シルクフィルムに浸出させた。ヘム b が浸出した後のツムギアリ (Green Ant) シルクフィルムについて UV/Vis スペクトルを収集した。GA1 及び GA3 では、400 nm 前後において強いシグナルが観察され、これらのタンパク質がヘムと強く結合したことを実証している (図 6)。このデータは、コイルドコイル構造を有する他のポリペプチドが、キレート剤及び金属イオンを含むキレートを結合することができることを示している。

【0367】

カマキリシルク由来の透明フィルムを上述のように調製した。実施例 3 に記載のように、予備形成したフィルムにヘム b を浸出させた。UV/Vis スペクトルを収集した。約 400 nm で強いシグナルが観察され、これらのタンパク質がヘムと強く結合したことを実証している (図 7)。このデータは、コイルドコイル構造を有する他のポリペプチドが、キレート剤及び金属イオンを含むキレートを結合することができることを示している。

【0368】

実施例 6：コイルドコイルシルクポリペプチドはヘム b に加えて他の大環状化合物も結合する

組換え Amel F3 から作製したスポンジがさまざまな大環状化合物を結合する能力を試験し、その際、試験対象の大環状化合物を過剰に含有している大環状化合物溶液を Amel F3 スポンジに加え、スポンジの色、及び洗浄後のスポンジの色が保持されるか否かについて観察することにより行った。洗浄後のスポンジに保持された色の強度を評価して

10

20

30

40

50

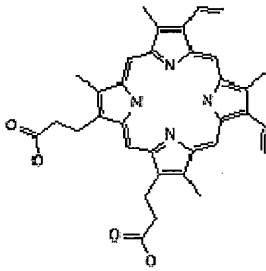
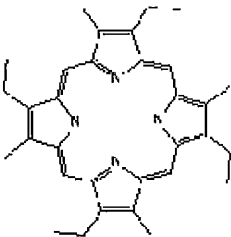
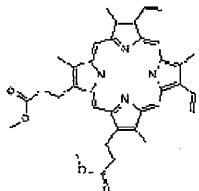
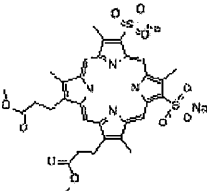
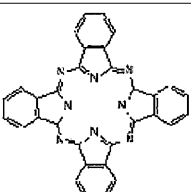
、大環状化合物の結合強度を定量的に評価した。スポンジに対する強い結合とは、大環状化合物を、水メタノール、有機溶媒、0.1 M HCl または 0.1 M NaOH を用いて洗い流すことができないという所見を指す。一部の大環状化合物は、大環状化合物と弱く結合することが認められたが、この場合、スポンジのかすかな呈色が観察され、UV-Vis スペクトルは弱い吸収ピークを示した。

【0369】

下記表 2 に概略されるように、スポンジは多数のポルフィリン及びフタロシアニンと結合できた。

【表 2 A】

表2. ミツバチの組換えシルクタンパク質から作製した材料に対する各種大環状化合物の結合特性

大環状化合物	結合特性
ポルフィリン	
プロトポルフィリン IX (PPIX) 	シルクに強く結合する
エチオポルフィリン I 	結合しない
プロトポルフィリン IX ジメチルエステル 	結合しない
ジュウテロポルフィリン IX 2, 4-ジスルホン酸ジメチルエステル 	弱い結合
Fe、Co及びCuいずれかを含有する 金属プロトポルフィリン IX	強く結合する
フタロシアニン	
フタロシアニン 	結合しない

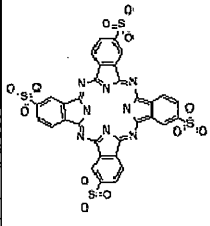
10

20

30

40

【表 2 B】

フタロシアニントラスルホン酸 	強く結合する
---	--------

10

【0370】

これらの結果は、大環状化合物に金属が存在しない場合、大環状化合物（カルボキシル基、例えば P P I X、またはスルホン基、例えばフタロシアニンなど）中の電荷が選択されて、シルクタンパク質にある反対電荷を持つ残基に大環状化合物を結合させることを示す。電荷が存在しない、例えば、フタロシアニンまたはエチオポルフリン（*etioporphyrin*）I の場合、結合は得られない。

【0371】

このデータから、ポリペプチドとキレート間の強い結合には金属イオンが必要なわけではないこともわかる。したがって、強く結合するためにはポリペプチドとキレート剤間の相互作用で十分である。

20

【0372】

これらの結果は、シルク内で適切な位置にある負荷電残基が、であろう、正電荷を持つ大環状化合物を結合すること、及びシルク内で適切な位置にある正荷電残基が、負電荷を持つ大環状化合物を結合することを示唆している。

【0373】

実施例 7：結合には、キレート剤内部に含有される金属イオンと、ポリペプチドの少なくとも 1 個のアミノ酸との配位で十分である

ジシアノコピリン酸ヘプタメチルエステルを含有する、ミツバチの組換えシルクタンパク質 *Ame1F3* から作製したフィルムを実施例 3 に記載のように調製した。ジシアノコピリン酸ヘプタメチルエステルを含有している組換え *Ame1F3* から作製したフィルム、及び *Ame1F3* を含まないジシアノコピリン酸ヘプタメチルエステル溶液について UV/Vis スペクトルを記録した（図 8）。

30

【0374】

ジシアノコピリン酸ヘプタメチルエステルはフィルム状 *Ame1F3* に強く結合することがわかった。ジシアノコピリン酸ヘプタメチル（*heptamethyl*）エステルがシルクタンパク質に結合した場合の 370 から 360 へのピーク位置のシフト及び 500 ～ 600 nm における変化から、チロシン残基がコバルト中心に配位していることが示唆される。ジシアノコピリン酸（*dicyanocobrynic acid*）ヘプタメチルエステル溶液を、*Ame1F3 Try76Ala* から調製したスポンジに加え、70% メタノールで徹底的に洗浄した場合、スポンジのピンク色が洗い流されたことから、*Ame1F3 Try76Ala* はジシアノコピリン酸ヘプタメチルエステルに結合しなかったことが示された。

40

【0375】

このことは、ジシアノコピリン酸ヘプタメチルエステルの結合が、コバルト金属中心単独に対するチロシン残基の配位を介して生じたことを指している。キレート剤とポリペプチドの間の結合の可能性は低い。したがって、結合には、ポリペプチドと金属イオン間の配位結合で十分である。ジシアノコピリン酸ヘプタメチル（*heptamethyl*）エステルは、予備形成フィルムにもスポンジにも導入されていた（データ示さず）。

【0376】

実施例 8：本発明による組成物は可逆的に還元及び酸化され得る

50

気体結合のようなヘムタンパク質の機能には、ヘム基が Fe^{3+} から Fe^{2+} に還元される必要があるが、触媒作用には還元と再酸化の循環が必要である。 Fe の還元と酸化は分光法を用いて監視することができるが、これは、還元によりソーレー帯ピークが約 400 nm からさらに高い波長へシフトすることからわかる（配位系によって、約 420 ~ 430 nm）。

【0377】

50 mM リン酸緩衝液（pH 7）内に調製したばかりの亜ジチオン酸ナトリウム（100 mM）を還元剤として使用した。10 ~ 100 μL を 50 mM リン酸緩衝液（pH 7）に加え、ポルフィリン-AmelF3 フィルムを覆った。亜ジチオン酸ナトリウムと同様の方法で酸化剤に過硫酸ナトリウムを使用した。

【0378】

AmelF3-ヘムフィルムを還元剤に曝露すると、ソーレー帯ピークは 421 nm にシフトしたことから、 Fe^{3+} が Fe^{2+} に還元されたことを示している（図 9）。酸化剤を添加すると還元は逆方向に進んだ（図 9）。このデータは、触媒過程、例えば、酸化状態の循環が必要とされる触媒過程にヘム-シルク材料を使用できることを実証している。

【0379】

実施例 9：本発明による組成物は一酸化窒素を結合できる

人工ヘム材料はさまざまな気体及び揮発性の有機化合物を感知する能力を保持している。例えば、人工ヘムタンパク質は、一酸化窒素（NO）感知用の優れた候補であり、産業汚染物質の監視から臨床診断及び生物医学研究に至るまで数多くの分野で求められている。したがって、発明者らは、シルク-ヘム b 材料の一酸化窒素（NO）結合能力を検討した。

【0380】

AmelF3-ヘム b フィルムをポルフィリン-シルクフィルムとして使用した。50 mM リン酸緩衝液（pH 7）内に調製したばかりの亜ジチオン酸ナトリウム（100 mM）を還元剤として使用した。10 ~ 100 μL を 50 mM リン酸緩衝液（pH 7）に加え、ポルフィリン-シルクフィルムを覆った。亜ジチオン酸ナトリウムの場合と同様の方法で過硫酸ナトリウムを酸化剤に使用した。ジエチルアミン 2-ニトロソヒドラジンナトリウム水和物（Diethylamine 2-nitrosohydrazine sodium hydrate）（NONOアート）を 50 mM リン酸塩（pH 7）に溶解させて 1.5 モル当量の溶解 NO を生成させた。ジエチルアミン NONO アート溶液の分注を、亜ジチオン酸塩還元フィルムに加えた。UV/VIS スペクトル変化を監視して酸化還元状態を決定し NO 結合を測定した（図 10A 及び 10B）。NO 曝露では、NO 濃度の増加に伴いソーレー帯ピークの位置は 421 nm から 395 nm へシフトした。

【0381】

NO 濃度を上昇させた曝露させると、421 nm から 395 nm へのソーレー帯ピークのシフトが生じた。0 ~ 7 μM では、421 nm における吸光度の低下と NO 濃度の間に直線関係が見られ、NO 検出限界は 1 μM であった。NO 結合は、可逆性であり及びシルク-ヘム b フィルムであることがわかった。

【0382】

このデータから、本発明の組成物は、標的分子（例えば、NO）を結合することができること、及び標的分子の結合により組成物に検出可能な変化が生じることがわかる。

【0383】

実施例 10：本発明による組成物は触媒として使用できる

本願発明者らは、結合ヘム b を含有しているミツバチの組換えシルクから作製したヘムシルク材料がペルオキシダーゼとして作用できるか否かを検討した。この活性は、Worthington アッセイ（www.worthington-biochem.com/hpo/assay.html）の変形を使用して実証された。かかるアッセイでは、水素供与体として 4-アミノアンチピリンを使用する。反応速度は、過酸化水素の分解に

10

20

30

40

50

伴うアミノアンチピリンとフェノールの酸化のカップリングにより生じた 510 nm における吸光度の増分を測定して決定する（図 11）。

【0384】

実施例 11：本発明による組成物を使用して、抗菌活性を有する Zn Pc を結合させることができる

光線力学的治療法は、選択的波長の光に曝露されると微生物（細菌、真菌類及びウイルス）、標的悪性細胞または他の疾患細胞にとって毒性となる、非毒性の感光性化合物を使用する。光線力学的治療法は、光増感物質、光源及び組織酸素を要する。光により光増感物質が励起され、毒性のある活性酸素種の生成を引き起こす。

【0385】

光増感物質として作用できる大環状化合物は、ミツバチの組換えシルクから作製したフィルムタンパク質内部に結合され得る（図 12）。これらの材料は光線力学的治療法に完全に適していることが予想され得る。

【0386】

実施例 12：本発明の組成物は異なる金属イオンを含み得る

図 13 は、キレート金属イオンはさまざまに異なってよいことを示す。銅（Cu PPIX）、コバルト（Co PPIX）及びヘム b（Fe PPIX）を含む各キレートを Amel F3 シルクフィルムに導入した。金属イオンをさまざまに変えられることを利用して、組成物の機能を改変でき、例えば、異なる標的化合物に結合させることができる。

【0387】

実施例 13：本発明による組成物は少なくとも 1 年間安定である

Amel F3-ヘム b フィルムは、顕著な安定性を示し、少なくとも 1 年間、室温での乾燥保存が可能であり、NO 結合能力の低下も見られなかった（図 14）。このデータは、材料が、10 か月にわたってスペクトルシグナルの低下を示さなかったことも実証している。

【0388】

実施例 14：本発明による組成物は有機溶媒中で安定である

本願発明者らは、シルクフィルム及びスポンジがさまざまな異なる有機溶媒中で安定であることを実証した。異なる溶媒中の Amel F3 シルクフィルムの UV/VIS スペクトルを記録した。図 15 は、シルク材料が、水、クロロホルム、酢酸エチル及びエタノールといった多種多様な水性溶媒及び非水性溶媒中で安定であることを示す。このデータは、非水性溶媒を要する触媒用途に本発明の組成物を使用できることを実証している。

【0389】

実施例 15：ヘム-シルク材料の組成物は電気化学シグナル伝達と適合性がある

カーボンナノチューブを用いてグラッシ-カーボン電極を改修し、その際、DMF 中に分散させたカーボンナノチューブ（単壁；1~5 μm）を乾燥させることにより行った。Amel F3 フィルムは、Amel F3 水溶液（10 mg/ml）を乾燥させることによってナノチューブ層上に成型した。70%メタノール溶液から、先に記載があるように Amel F3 内にヘム b を浸出させた。可逆性ボルタンメトリー応答がヘム b-Amel F3 試料に認められたが、これはヘム不在（点線）または Amel F3 シルクなし（一点鎖線）の場合には観察されず、Fe³⁺/Fe²⁺ 酸化還元対に起因する可能性がある。図 16）。この相違は、シルク-ヘム材料が、電気化学シグナル伝達法と適合性があることを実証している。

【0390】

実施例 16：ヘム-シルク材料の組成物を使用して一酸化窒素検出が可能である

実施例 15 に記載のように調製した電極を用い、一酸化窒素を加えると、著明な接触電流が認められる（図 17）。この接触電流は、ヘム-シルク材料による一酸化窒素の酸化に起因するものであり、これを使用して、試料中の一酸化窒素濃度を決定できる。

【0391】

実施例 17：ヘム-シルク材料の組成物を使用して酸素検出が可能である

ヘムシルク電極を実施例15のように調製した。嫌気条件下（アルゴンガスを用いたパージによる）で電極を定電位に保った（ -300 mV 対 Ag/AgCl ）。通気緩衝液の分注を加えて酸素をさまざまな濃度で導入した。接触電流の急激な上昇は、ヘムシルク材料により酸素が還元されたためであり、これらの材料を酸素センサーとして使用できることを実証している（図18）。

【0392】

実施例18：Ame1F3にさらなるヘム結合部位を導入可能である

コイルドコイルのa位にY76Aを有するAme1F3に配位性His残基を導入した。得られたタンパク質（Y76A A97H）は、 413 nm において先鋭なソーレー帯ピークを示し、ヒスチジンの配位を示している（図19）。このことは、コイルドコイルのポリペプチドにさらなる結合部位の導入が可能であることを実証している。

【0393】

実施例19：Ame1F3における高いヘム結合の実証

コイルドコイルのa位にY76H置換を有するAme1F3に配位性His残基（His97）を導入した。Y76Hは、シルクタンパク質に対するヘムの結合比が1：1であることをはっきりと示しており、これは、ヘム比が1：1を超えるとソーレー帯ピークは幅広となり、また最大ピーク位置がシフトすることにより示される（図20）。Y76H

A97Hではソーレー帯ピークの形状にも位置にも変化は認められなかったことから、追加のヘム結合部位が導入されており、そのため修飾Ame1F3が2つのヘム補因子を結合できるようになったことが示された。

【0394】

広く記載された本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本発明に対する多数の変形及び／または修正を、具体的な実施形態で示されるように行ってよいことは、当業者に理解されるであろう。したがって、本願実施形態は、あらゆる点において、限定的ではなく例示的であるものと見なされるべきである。

【0395】

本出願は、2015年11月17日に出願されたAU2014904612の優先権を主張するものであり、その記載内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0396】

本明細書で考察及び／または参照されたすべての刊行物は、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0397】

本明細書に含まれている文献、行為、材料、装置、論文などのいかなる考察も、本発明の文脈を提供することのみを目的とするものである。これらの事柄のいずれかまたはすべてが、先行技術基盤の一部を形成するか、または、この出願の各請求項の優先日前に存在していたために、本発明に関連する分野において共通の一般的な知識であったことの承認として解釈されるべきではない。

参考文献

Eisenberg (1984) Annual Review of Biochemistry 53:595-623.

Gorham et al (1992) Int. J. Biol. Macromol. 14:129-136.

Harayama (1998) Trends in Biotechnology 16:76-82.

Huson et al. (2012) PLoS One 7, e52308.

Kallol et al. (2003) Journal of Chromatography 1000, 637-655.

Kweon et al. (2001) J. App. Polym. Sci. 81:2271-2276.

Kyte and Doolittle (1982) Journal of Molec

10

20

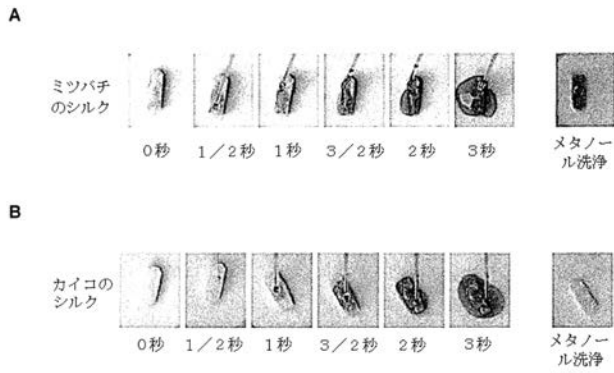
30

40

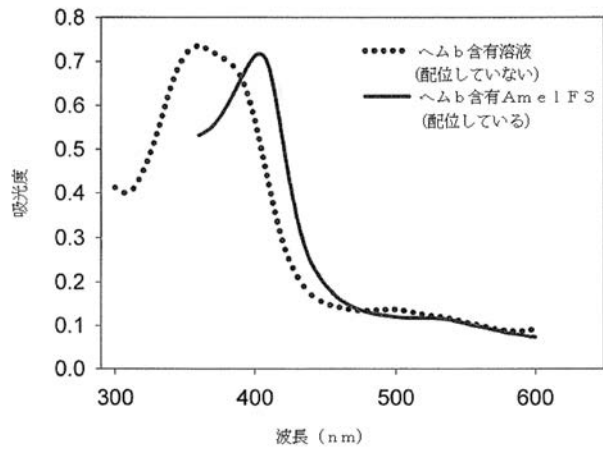
50

- ular Biology 157:105–132.
- Lupas and Gruber (2005) Ad. Protein Chem. 70:37–78.
- Magoshi et al. (1977) J. Polym. Sci. 15:1675–1683.
- Nagai et al. (1983) Biochemistry 22:1305–1311.
- Nagai et al. (1989) Biochemistry 28, 2418–2422.
- Needleman and Wunsch (1970) Journal of Molecular Biology 48:443–453. 10
- Petersen et al. (2011) Nature Methods 8:785–786.
- Rapson et al. (2014) Biosens. Bioelectron, doi:10.1016/j.bios.2014.06.045.
- Reiser et al. (1992) Nucleic Acids Research 32:W321–W326.
- Rose and Wolfenden (1993) Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 22:381–415. 20
- Sutherland et al. (2011) PLoS One 6:e16489.
- Walker et al. (2012) Biomacromolecules 10:4264–4272.
- Weisman et al. (2010) Biomaterials 31:2695–2700.
- Wittmer et al. (2011) Acta Biomaterialia 7:3789–3795.
- Yannas and Tobolsky (1967) Nature 215:509–510. 30

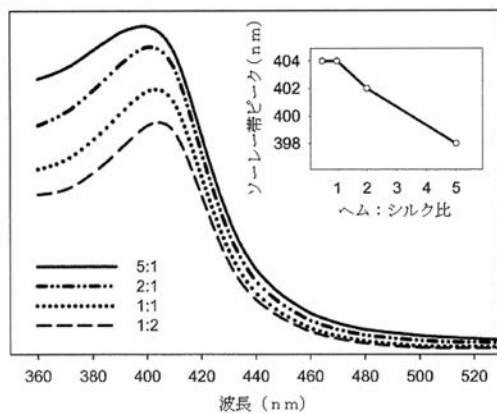
【図 1】



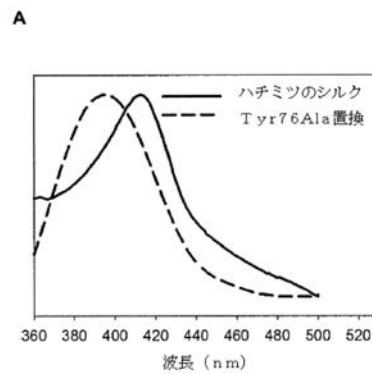
【図 2】



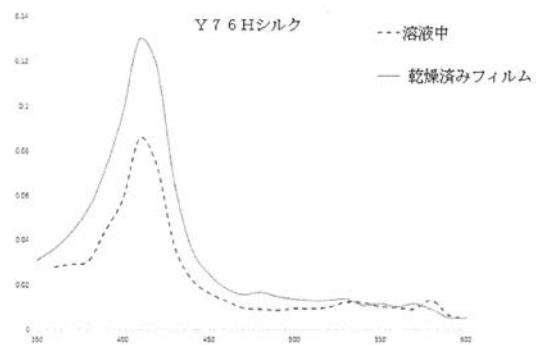
【図 3】



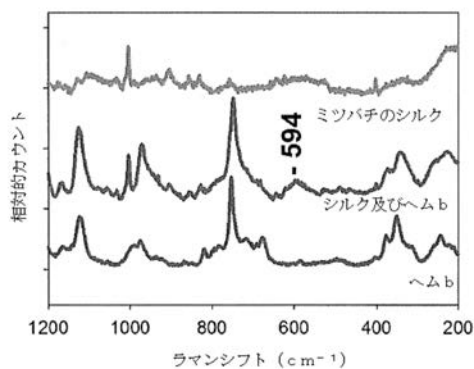
【図 5】



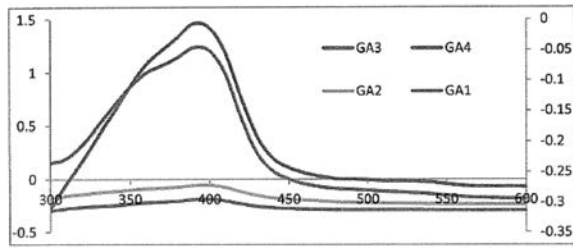
B



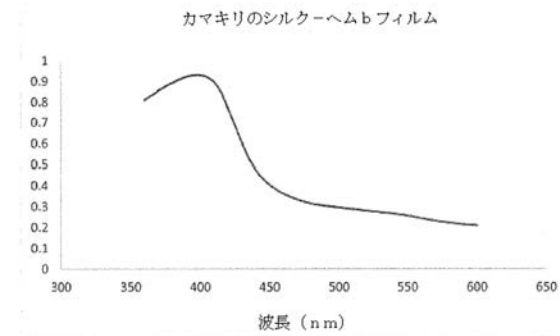
【図 4】



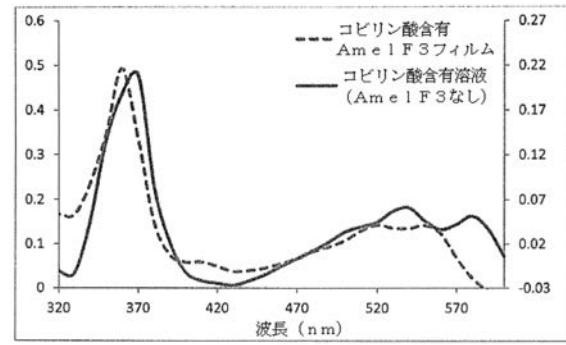
【図 6】



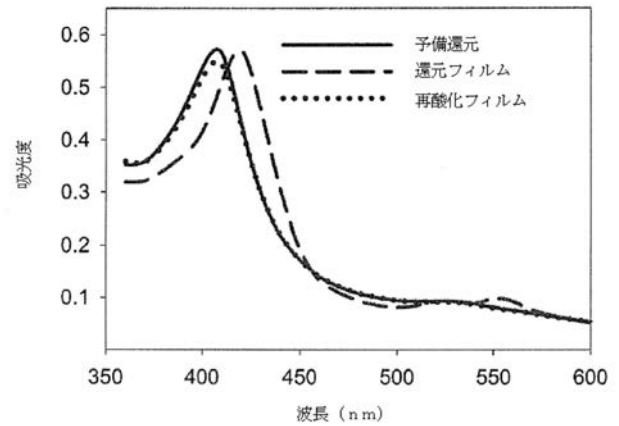
【図 7】



【図 8】

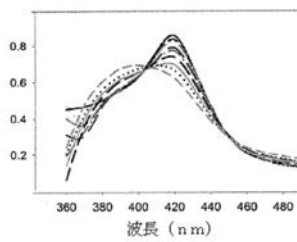


【図 9】

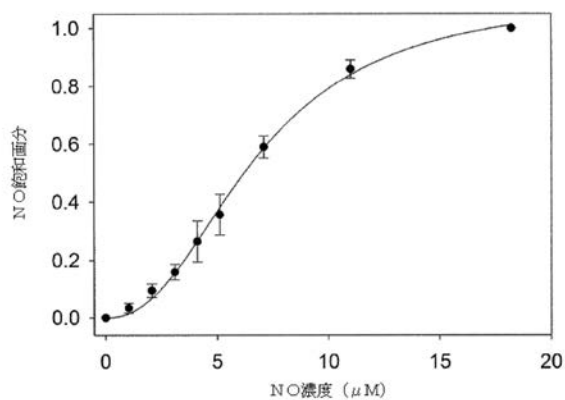


【図 10】

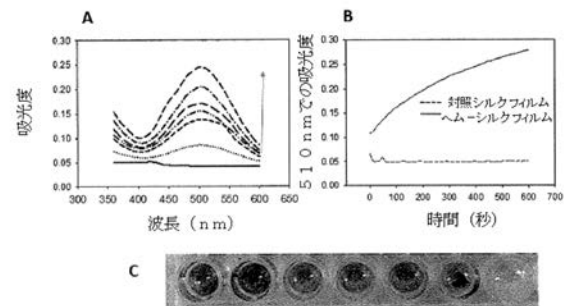
A



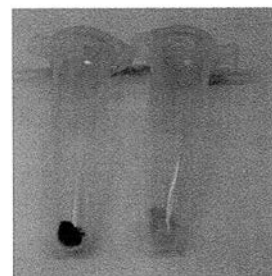
B



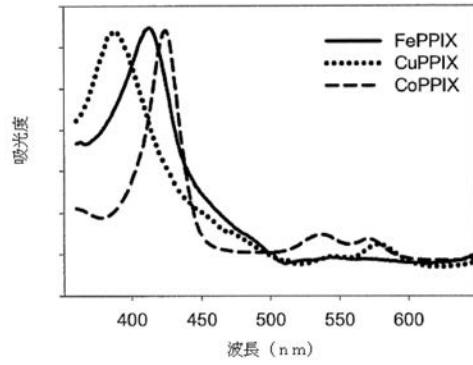
【図 11】



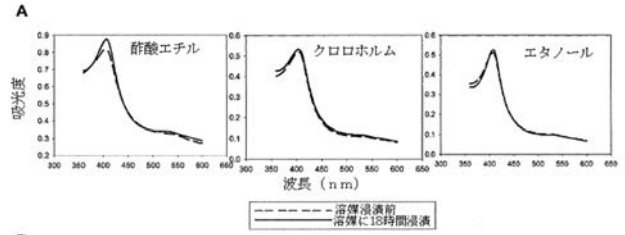
【図 12】



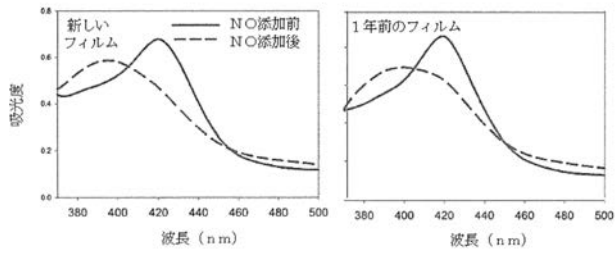
【図 1 3】



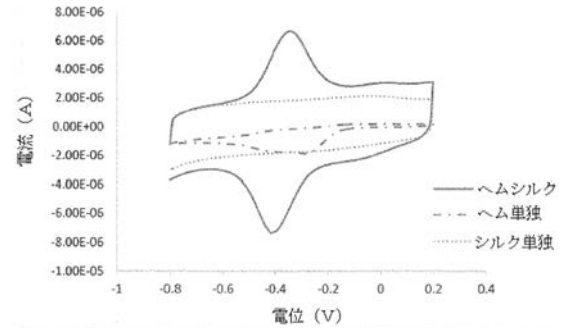
【図 1 5】



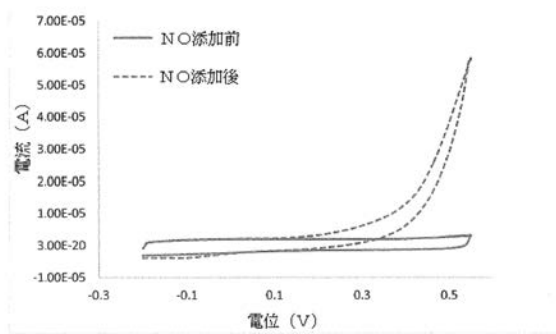
【図 1 4】



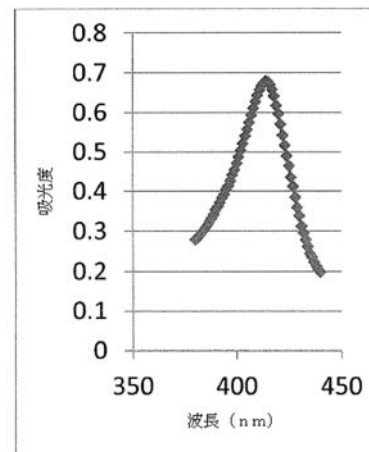
【図 1 6】



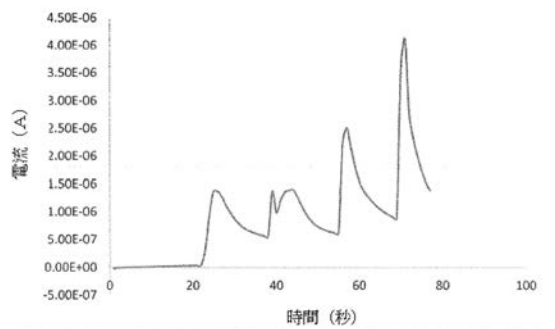
【図 1 7】



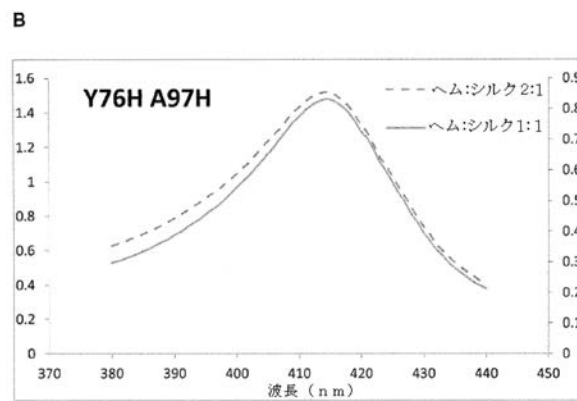
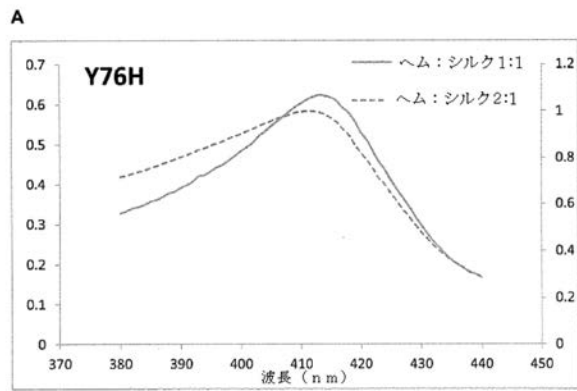
【図 1 9】



【図 1 8】



【図 20】



【配列表】

2018502826000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2015/050717
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 14/795 (2006.01) D01F 4/02 (2006.01) C12Q 1/25 (2006.01) G01N 31/10 (2006.01)		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPODOC, WPIAP, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPES, TXPEPEA, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA, MEDLINE, HCAPLUS, BIOSIS, BIOTECHABS, EMBASE, CAPLUS, GOOGLE SCHOLAR & Keywords: Coiled-coil, helix bundle, conformation, fibroin, insect, metalloprotein, metal chelate, chelant, cofactor, heme-silk, sensor, solid-state, G01N 31/00, G01N 33/00, and like terms; EPODOC, WPIAP, MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, Google Scholar, AusPat, INTESS, PAMS & Keywords: Applicant and Inventor names.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 18 February 2016		Date of mailing of the international search report 18 February 2016
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au		Authorised officer Alexander Theodossis AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 62832438

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation).		PCT/AU2015/050717
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RAPSON, T.D. <i>et al.</i>, 'Micromolar biosensing of nitric oxide using myoglobin immobilized in a synthetic silk film', <i>Biosensors and Bioelectronics</i>, 2014, Vol. 62, pages 214-220 (Available online 26 June 2014) & Appendix A. Supplementary materials [online], [retrieved from the internet 11 February 2016] <URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.045> Abstract; Sections 2.1, 2.2, 5; Figures 1, 2, 3; Scheme 1; Table 1; Suppl. Figure 1; para. bridging p.216-217; para.4 of col.2 on p.215; para.3 of col.1 on p.219	1-32
X	MCALLISTER, K.A. <i>et al.</i>, 'Using alpha-helical coiled-coils to design nanostructured metalloporphyrin arrays', <i>Journal of the American Chemical Society</i>, 2008, Vol. 130, pages 11921-11927 (pages 1-16 in viewed document retrieved from the internet) Abstract; Figures 1, 6; para.3 on p.6; para.3 on p.7; para.5 on p.8; Introduction; Conclusions	1-32
X	WO 2004/050693 A1 (NANOBIODESIGN LIMITED) 17 June 2004 Abstract; Figures 1, 3, 5; Tables 2, 3; lines 13, 14 on p.9; para.3 on p.3; para. bridging p.3-4; lines 12, 13 on p.10	1-32
X	MUTTER, A.C. <i>et al.</i>, 'Rational design of a zinc phthalocyanine binding protein', <i>Journal of Structural Biology</i>, February 2014, Vol. 185, pages 178-185 Abstract; Figures 1, 5; para.4 of col.2 on p.181; Conclusions	1-32
X	WANG, C. <i>et al.</i>, 'Hybrid hydrogels assembled from synthetic polymers and coiled-coil protein domains', <i>Nature</i>, 1999, Vol. 397, pages 417-420 Abstract; Figures 1-3; para.2 of col.2 on p.418; para.2 of col.1 on p.419; para.1 of col.1 on p.418; para.2 of col.2 on p.419	1-32
X	KRISHNA, O.D. <i>et al.</i>, 'Protein- and peptide-modified synthetic polymeric biomaterials', <i>Biopolymers</i>, 2010, Vol. 94, pages 32-48 (pages 1-27 in viewed document retrieved from the internet) Abstract; Figure 3; para.2 on p.9	1-32
X	PAZOS, E. <i>et al.</i>, 'Sensing coiled-coil proteins through conformational modulation of energy transfer processes—selective detection of the oncogenic transcription factor c-Jun', <i>Chemical Science</i>, 2011, Vol. 2, pages 1984-1987 Abstract; Schemes 1, 2; Figure 2	1-32
X	YIN, H. <i>et al.</i>, 'Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized onto multiwalled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine-silk fibroin film and its application to determine bisphenol A', <i>Analytica Chimica Acta</i>, 2010, Vol. 659, pages 144-150 Abstract; Section 2.1	1-32
X	WO 2008/127402 A2 (TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE) 23 October 2008 Abstract; para.46, 54, 55; Appendix II; Claims 1, 13	1-32
A	SUTHERLAND, T.D. <i>et al.</i>, 'Single honeybee silk protein mimics properties of multi-protein silk', <i>PLoS One</i>, 2011, Vol. 6, e16489 para.3 of col.2 on p.2; para. bridging col.1-2 on p.6	
	HUSON, M.G. <i>et al.</i>, 'Controlling the molecular structure and physical properties of artificial honeybee silk by heating or by immersion in solvents', <i>PLoS One</i>, 2012, Vol. 7, e52308 & NCBI Reference Sequence Accession NP_001129680 19 August 2013	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2015/050717
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
L	Supports Novelty Objection	
L	GLYKOS, N.M. <i>et al.</i> , 'Loopless Rop: structure and dynamics of an engineered homotetrameric variant of the repressor of primer protein', <i>Biochemistry</i> , 2006, Vol. 45, pages 10905-10919 Supports Novelty Objection	
P,X	RAPSON, T.D. <i>et al.</i> , 'De novo engineering of solid-state metalloproteins using recombinant coiled-coil silk', <i>ACS Biomaterials Science & Engineering</i> , 2015, Vol. 1, pages 1114-1120 Whole document	1-32
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2015/050717

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

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

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

See Supplemental Box for Details

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2015/050717
Supplemental Box	
Continuation of: Box III This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. This Authority has found that there are 6 different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups: Invention 1: Claims 1-32 (in part). The feature of a porphyrin chelating agent is specific to this group of claims. Invention 2: Claims 1-32 (in part). The feature of a corrin chelating agent is specific to this group of claims. Invention 3: Claims 1-32 (in part). The feature of a chlorin chelating agent is specific to this group of claims. Invention 4: Claims 1-32 (in part). The feature of a corphin chelating agent is specific to this group of claims. Invention 5: Claims 1-32 (in part). The feature of a porphine chelating agent is specific to this group of claims. Invention 6: Claims 1-32 (in part). The feature of a phthalocyanine chelating agent is specific to this group of claims. PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art. When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention. In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is a composition comprising a metal chelate (a complex of a chelating agent and a metal ion) bound to a polypeptide having at least a partial coiled-coil structure. However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in: D2: MCALLISTER, K.A. <i>et al.</i>, 'Using alpha-helical coiled-coils to design nanostructured metalloporphyrin arrays', <i>Journal of the American Chemical Society</i>, 2008, Vol. 130, pages 11921-11927 (pages 1-16 in viewed document retrieved from the internet) D7: PAZOS, E. <i>et al.</i>, 'Sensing coiled-coil proteins through conformational modulation of energy transfer processes-selective detection of the oncogenic transcription factor c-Jun', <i>Chemical Science</i>, 2011, Vol. 2, pages 1984-1987 D2 discloses a composition comprising a homotetrameric coiled-coil structure bound to iron-porphyrin cofactors (see Figures 1, 6). D7 discloses a composition comprising a heterodimeric coiled-coil between c-Jun and an a-Fos construct, wherein the Tb-chelating macrocycle, DOTA, is bound to a-Fos (see Figure 2). Therefore in light of these documents this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a posteriori</i>. Notwithstanding the lack of unity, and following consultation with the applicant, the search was carried out in respect of all inventions listed above, with a focus on: a) silk fibroins; b) the concept of solid-state compositions comprising coiled-coil-forming polypeptides. In establishing the International Opinion all identified art relevant to the claims across their full scope has been considered.	
Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2015/050717	
Information on patent family members			
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2004/050693 A1	17 June 2004	WO 2004050693 A1	17 Jun 2004
		AU 2003290221 A1	23 Jun 2004
		EP 1567548 A1	31 Aug 2005
		US 2006148026 A1	06 Jul 2006
WO 2008/127402 A2	23 October 2008	WO 2008127402 A2	23 Oct 2008
		CA 2704304 A1	23 Oct 2008
		CA 2704309 A1	20 Nov 2008
		CA 2704768 A1	23 Oct 2008
		CA 2704769 A1	23 Oct 2008
		EP 2086749 A2	12 Aug 2009
		EP 2086749 B1	08 May 2013
		EP 2101975 A2	23 Sep 2009
		EP 2107964 A2	14 Oct 2009
		EP 2109634 A2	21 Oct 2009
		EP 2612751 A2	10 Jul 2013
		EP 2650112 A2	16 Oct 2013
		JP 2010508852 A	25 Mar 2010
		JP 2010509593 A	25 Mar 2010
		JP 2010509644 A	25 Mar 2010
		JP 2010509645 A	25 Mar 2010
		JP 2013122462 A	20 Jun 2013
		JP 2014139684 A	31 Jul 2014
		US 2010063404 A1	11 Mar 2010
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2015/050717	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		US 8195021 B2	05 Jun 2012
		US 2010070068 A1	18 Mar 2010
		US 8529835 B2	10 Sep 2013
		US 2010065784 A1	18 Mar 2010
		US 8574461 B2	05 Nov 2013
		US 2010046902 A1	25 Feb 2010
		US 2010068740 A1	18 Mar 2010
		US 2010096763 A1	22 Apr 2010
		US 2010120116 A1	13 May 2010
		US 2013323811 A1	05 Dec 2013
		US 2014039159 A1	06 Feb 2014
		US 2014205797 A1	24 Jul 2014
		US 2014349380 A1	27 Nov 2014
		WO 2008118211 A2	02 Oct 2008
		WO 2008127401 A2	23 Oct 2008
		WO 2008127403 A2	23 Oct 2008
		WO 2008127404 A2	23 Oct 2008
		WO 2008127405 A2	23 Oct 2008
		WO 2008140562 A2	20 Nov 2008
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(81)指定国 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, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 タラ・サザーランド

オーストラリア・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・2602・ワトソン・バーンサイド・ストリート・26

(72)発明者 トレヴァー・ラブソン

オーストラリア・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・2913・パーマストーン・レッドクリフ・ストリート・8

Fターム(参考) 2G054 AA01 AA03 AA06 AB10 BA04 BB08 BB13 CA01 CA02 CA06
CA07 CA08 CA10 CB02 CB03 CD01 CD10 CE02 CE08 EA03
EA04 EA10 EB01 EB02 GA02 GA03 GA04 GB01 GB02 GE05
GE06
4H045 AA10 AA20 AA30 BA18 BA19 BA20 BA21 BA63 EA50 EA60