

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7027312号

(P7027312)

(45)発行日 令和4年3月1日(2022.3.1)

(24)登録日 令和4年2月18日(2022.2.18)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

Z N A

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 11 (全42頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-527035(P2018-527035)

(86)(22)出願日 平成28年8月10日(2016.8.10)

(65)公表番号 特表2018-531040(P2018-531040 A)

(43)公表日 平成30年10月25日(2018.10.25)

(86)国際出願番号 PCT/IL2016/050874

(87)国際公開番号 WO2017/025964

(87)国際公開日 平成29年2月16日(2017.2.16)

審査請求日 令和1年8月8日(2019.8.8)

(31)優先権主張番号 62/203,102

(32)優先日 平成27年8月10日(2015.8.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/293,880

(32)優先日 平成28年2月11日(2016.2.11)

最終頁に続く

(73)特許権者 518047506

シービックス マテリアル サイエンス
ズ リミテッドイスラエル国,エルサレム, 9 1 1 2 0
0 1 ハダッサ エン カレム キャンパス
,エルサレム バイオテクノロジー パー
ク, 4階, ミンラブ ビルディング

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 合成ドラグラインスパイダーシルクを製作するための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

異なる分子量の4～32タイプのタンパク質を含むタンパク質の混合物を含む組成物であって、前記混合物中の各タンパク質が、独立して、大瓶状腺スピドロイン(MaSP)タンパク質の反復領域のnリピートを含み、nが2～70の間の整数であり、前記反復領域が、配列番号35、36、38、40、42、および44からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、組成物。

【請求項2】

前記nが、前記混合物中のタンパク質の各タイプについて同一である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

各リピートが、2kDa～3.5kDaの範囲の分子量を有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

nが、4および32に等しい整数または4～32の間の整数である、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記リピートが、ADF-4の反復領域のものである、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

前記混合物の各タンパク質が、

配列番号5 (MSYYHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLV) ;

配列番号6 (MSYYHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLVRPLSNLDNA) ;

配列番号7 (MSYYHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLVDPPGCRNSARAGSS)

からなる群から選択される単一N末端領域をさらに含む、

請求項1に記載の組成物。

【請求項7】

(i) 前記混合物の1つまたは複数のタンパク質が、少なくとも1つのタグ配列をさらに含む、

(ii) タンパク質の前記混合物が、ニフオニグモに由来するADF-3またはADF-4タンパク質をさらに含む、

(iii) 250~330℃の範囲内に少なくとも1つの吸熱ピークを示すDSCパターンによって特徴づけられる、

(iv) 担体、希釈剤または賦形剤をさらに含む、

(v) (i)~(iv)の任意の組み合わせである、

請求項1に記載の組成物。

【請求項8】

請求項1~7のいずれか1項に記載の組成物を含む物品または繊維。

【請求項9】

請求項1に記載のタンパク質の前記混合物の2種以上のタンパク質を1つの核酸分子上にコードする単離された核酸分子。

【請求項10】

請求項9に記載の核酸分子を含む発現ベクターであって、前記核酸分子が、動作可能に連結されたプロモーターの発現制御下にある、発現ベクター。

【請求項11】

請求項10に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2015年8月10日出願の米国特許仮出願第62/203,102号、2016年2月11日出願の同第62/293,880号、および2016年4月3日出願の同第62/317,572号の優先権を主張するものである。上記文書の内容は、全てが本明細書に示されるかの如く、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、合成ドラグラインスパイダーシルクの調製のためのMaSP（大瓶状腺スピロロイン）タンパク質に由来するタンパク質の混合物を含む組成物を対象とする。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

ドラグラインスパイダーシルクは、クモの巣の枠および半径、ならびにクモが降下または危険回避する際の命綱を構築するために、巣をかけるクモによって用いられるシルクとして当該技術分野で知られている。これらの労作の実践を可能にするために、ドラグライン繊維は、高い弾性および強度の組み合わせにより著しく高い靱性を示し、そのことで天然または人工にかかわらずドラグライン繊維は靱性繊維と見なされている。例えばドラグラインは、その直径で高張力鋼の6倍強く、これまで作製された最強の合成繊維の1種であるKevlarよりも3倍強靱である。

【0004】

10

20

30

40

50

ドラグラインシルクは、大瓶状腺スピドロイン（MaSp）1および2と主に呼ばれ、ニワオニグモではADF-3およびADF-4とも呼ばれる2つの主なポリペプチドからなる。これらのタンパク質は、試料の年代および分析条件に応じて200～720kDaの範囲内の見かけ分子量を有する。公知のドラグラインシルクスピドロインは、繊維中で結晶性βシートを形成する高アラニンセグメントと、より可撓性で大部分は秩序構造を欠く高グリシンセグメントと、が交互になった高度に繰り返されるブロックで構成されている。C末端領域は、非反復性で、種の間で高度に保存されており、αらせんコンフォメーションを取る。ドラグラインシルクタンパク質のN末端領域もまた、異なるスピドロイン間で、そして異なるクモ種の間でも高度に保存されていることが見出された。

【0005】

スパイダーシルクを合成で生成する試みが、細菌、酵母、組織培養での植物および哺乳動物細胞ならびにトランスジェニックのヤギを用いる遺伝子操作によってなど、数多く行われてきた。

【0006】

中でも米国特許第8,461,301号は、半合成スパイダーシルクタンパク質ドメイン、またはそれらの任意の機能的相同体、変異体、誘導体、断片もしくは突然変異体のマルチプルリピートを含む単離されたアミノ酸配列に関する。この発行物は、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0007】

ドラグラインスパイダーシルクに関するさらなる発行物としては、Ittah, S., et al. Biopolymers, 93 (5), 458-468, 2010; Ittah, S., et al. Biomacromolecules, 8 (9), 2768-2773, 2007; Ittah, S., et al., Biomacromolecules, 7 (6), 1790-1795, 2006; および Huemmerich, D., Ittah, S., et al., Current Biology, 14, 2070-2074, 2004が挙げられるが、これらに限定されない。これらの発行物は、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0008】

天然スパイダーシルクと類似の機械的性質を備えた繊維を製造するための改善された組成物および方法へのアンメットニーズがある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

発明の概要

本発明は、合成ドラグラインスパイダーシルクの製作のためなどの、異なる分子量を有しMaSPタンパク質に由来するタンパク質の混合物を含む組成物を対象とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

幾つかの態様によれば、異なる分子量のmタイプのタンパク質を含むタンパク質の混合物を含む組成物であって、上記混合物中の各タンパク質が、独立して、MaSPタンパク質、またはその機能的相同体、変異体、誘導体もしくは断片に由来する反復領域のnリピートを含み、mおよびnが、独立して、2～70の間の整数である、組成物が提供される。

【0011】

幾つかの実施形態において、上記MaSPタンパク質は、MaSP-1、MaSP-2、ADF-4およびADF-3からなる群から選択されるタンパク質である。幾つかの実施形態において、上記MaSPタンパク質は、MaSP-1およびMaSP-4から選択されるタンパク質である。

【0012】

幾つかの実施形態において、上記nは、上記混合物中のタンパク質の各タイプについて同一である。別の実施形態において、nは、4および32に等しい整数、または4～32の

10

20

30

40

50

間の整数である。別の実施形態において、 m は、4および32に等しい整数、または4～32の間の整数である。別の実施形態において、「 n 」と「 m 」の比率は、2：1～1：2の範囲である。別の実施形態において、「 n 」と「 m 」は、等しい。

【0013】

別の実施形態において、各リピートは、2 kDa～3.5 kDaの範囲の分子量を有する。別の実施形態において、各リピートは、2.6 kDa～3 kDaの範囲の分子量を有する。

【0014】

別の実施形態において、組成物は、2 kDa～3.5 kDaの分子量増分を有する上記混合物の2種以上のタンパク質を含む。別の実施形態において、組成物は、2.6 kDa～3 kDaの分子量増分を有する上記混合物の2種以上のタンパク質を含む。

10

【0015】

幾つかの実施形態において、上記リピートは、MaSPタンパク質またはその断片の反復領域の相同体、変異体、誘導体のものである。幾つかの実施形態において、上記リピートは、MaSP1タンパク質またはその断片の反復領域の相同体、変異体、誘導体のものである。幾つかの実施形態において、上記リピートは、ADF-4タンパク質またはその断片の反復領域の相同体、変異体、誘導体のものである。

【0016】

幾つかの実施形態において、上記反復領域は、第一の部分と、それに連続する第二の部分と、を有し、第一の部分は、アラニン残基を少なくとも50%含む5～30アミノ酸のアミノ酸配列であり、第二の部分は、グリシン、セリン、プロリンおよびチロシンからなる群から選択される残基を少なくとも80%含む20～60アミノ酸のアミノ酸配列である。

20

【0017】

幾つかの実施形態において、上記反復領域の第二の部分は、多くとも2つのグルタミン残基を含む。

【0018】

幾つかの実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO：1

(X₁) Z X₂ G P G G Y G P X₃ X₄ X₅ G P X₆ G X₇ G G X₈ G P G G P G X₉ X₁₀

(ここでX₁は、独立して、各例でAまたはGであり(X₁) Zの少なくとも50%がAであり、Zが5～30の間の整数であり；X₂は、SまたはGであり；X₃は、GまたはEであり；X₄は、G、SまたはNであり；X₅は、QまたはYであり；X₆は、GまたはSであり；X₇は、PまたはRであり；X₈は、YまたはQであり；X₉は、GまたはSであり；X₁₀は、SまたはGである)で示されるアミノ酸配列を有する。

30

【0019】

幾つかの実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO：33

(X₁) Z X₂ S G P X₃ G G Y G X₄ P X₅ Q G P X₆ G G Y G P

(ここでX₁は、独立して、各例でAまたはGであり(X₁) Zの少なくとも50%がAであり、Zは5～30の間の整数であり；X₂は、S-Gまたは非存在であり；X₃は、G-Qまたは非存在であり；X₄は、Gまたは非存在であり；X₅は、SまたはGであり；X₆は、S-P、G-Rまたは非存在である)で示されるアミノ酸配列を含む。

40

【0020】

別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO：34 (P G G Y G P)で示されるアミノ酸配列を含む。

【0021】

別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO：2～4のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、上記相同体は、SEQ ID NO：1～3のいずれか1つと少なくとも70%の相同性を共有する。

【0022】

別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO：2～4および35～44の

50

いずれか1つで示されるアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、上記相同体は、SEQ ID NO: 1~3、33および35~44のいずれか1つと少なくとも70%の相同性を共有する。

【0023】

別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 2 (SGPGGYGPGSQGPSGPGGYGPGGPGSS) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 3 (AAAAAAAAASGPGGYGPGSQGPSGPGGYGPGGPGSS) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 35 (SGPGGYGPGSQGPSGPGGYGPGGPGSSAGAGAGAAA) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 36 (SGPGGYGPGSQGPSGPGGYGPGGPGSSAGAGAGAGA) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 35 (SGPGGYGPGSQGPSGPGGYGPGGPGSSAGAGAGAAA) とSEQ ID NO: 36 (SGPGGYGPGSQGPSGPGGYGPGGPGSSAGAGAGAGA) の間の1:2~1:16、1:2~1:8または1:4の比率を含む。

【0024】

別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 37 (SGSGPGGYGPGGQGPGGYGPGGQGPYPGP) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 38 (SGSGPGGYGPGGQGPGGYGPGGQGPYPGPAAAAAAA) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 39 (GGSGPGGYGPGGQGPGGYGPGGQGPYPGP) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 40 (GGSGPGGYGPGGQGPGGYGPGGQGPYPGPAAAAAAA) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 38 (SGSGPGGYGPGGQGPGGYGPGGQGPYPGPAAAAAAA) とSEQ ID NO: 40 (GGSGPGGYGPGGQGPGGYGPGGQGPYPGPAAAAAAA) の間の1:2~1:16、1:2~1:8または1:4の比率を含む。

【0025】

別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 41 (SGPGQGQGYGPGGQGPGRGGYGPGAGS) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 42 (SGPGQGQGYGGPGGQGPGRGGYGPGAGSAAAAAAAAA) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 43 (GGPGQGQGYGGPGGQGPGRGGYGPGAGS) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 44 (GGPGQGQGYGGPGGQGPGRGGYGPGAGSAAAAAAAAA) で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 42 (SGPGQGQGYGGPGGQGPGRGGYGPGAGSAAAAAAAAA) とSEQ ID NO: 44 (GGPGQGQGYGGPGGQGPGRGGYGPGAGSAAAAAAAAA) の間の1:2~1:16、1:2~1:8または1:4の比率を含む。

【0026】

別の実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO: 4 (AAAAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGPGSS) で示されるアミノ酸配列を含む。

【0027】

別の実施形態において、上記混合物の各タンパク質は、SEQ ID NO: 5 (MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLV); SEQ ID NO: 6 (MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLVRLSNLDNA); SEQ ID NO: 7 (MSYYHHHH

10

20

30

40

50

HHDYDIPTTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLVDPPGCRNSARAGSS) からなる群から選択される単一N末端領域、またはそれらの任意の機能的相同体、変異体、誘導体、もしくは断片をさらに含む。別の実施形態において、上記N末端領域の上記相同体は、SEQ ID NO: 5~7のいずれか1つと少なくとも70%の相同性を共有する。

【0028】

別の実施形態において、上記混合物の各タンパク質は、SEQ ID NO: 9 (GPSGPGAYGPSPSASASVAASRLSSPAASSRVSSAVSSSLVSSGPTNGAAVSGALNSLVSQISASNPGLSGCDALVQALLELVSA LVA I LSSASIGQVNVSSVSQSTQMISQALS) からなる群から選択される単一C末端領域、またはそれらの任意の機能的相同体、変異体、誘導体、断片もしくは突然変異体をさらに含む。別の実施形態において、上記C末端領域の上記相同体は、SEQ ID NO: 9のいずれか1つと少なくとも70%の相同性を共有する。

10

【0029】

幾つかの実施形態において、上記混合物の1つまたは複数のタンパク質は、少なくとも1つのタグ配列をさらに含む。

【0030】

幾つかの実施形態において、タンパク質の上記混合物は、ADF-3もしくはMASP-2タンパク質、それらの機能的相同体、変異体、誘導体もしくは断片をさらに含む。幾つかの実施形態において、上記ADF-3またはMASP-2タンパク質は、タンパク質の上記混合物の分子量の約1~50%、またはその間の任意整数を構成する。一実施形態において、上記ADF-3タンパク質は、GenBankアクセション番号AAC47010.1を有する。

20

【0031】

幾つかの実施形態において、組成物は、担体、希釈剤または賦形剤をさらに含む。

【0032】

幾つかの態様によれば、本発明は、本発明のタンパク質の上記混合物の2種以上のタンパク質をコードする単離された核酸配列を提供する。幾つかの態様によれば、本発明は、本発明の核酸配列を含む発現ベクターであって、上記核酸配列が、動作可能に連結されたプロモーターと、場合により調節配列と、の発現制御下にある、発現ベクターを提供する。幾つかの態様によれば、本発明は、本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

30

【0033】

幾つかの態様によれば、本発明は、本発明の組成物を含む繊維を提供する。幾つかの態様によれば、本発明は、本発明の組成物および／または繊維を含む物品を提供する。

【0034】

本発明のさらなる実施形態、および適用性の完全な範囲は、本明細書の以後に示される詳細な説明から明白となろう。しかし、その詳細な説明および具体的実施例が、本発明の好ましい実施形態を示し、例示に過ぎず、本発明の主旨および範囲内の様々な変更および修正が、この詳細な説明から当業者に明白となることが、理解されなければならない。

40

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】A~I。IMMUNO-TEM (透過電子顕微鏡測定) の特徴づけ (図1A~C)、3つの種々の構築物: C1、C2およびC3を用いて組織化された繊維の光学顕微鏡測定 (それぞれ図1D~F)、ならびに共焦点顕微鏡測定 (図1G~I) を用いて、本発明のナノ繊維を示す。

【図2】A~C。クーマシーブルー染色およびウェスタンブロット分析を利用してタンパク質反復単位のラダリングパターンを示す。

【図3A】電界紡糸繊維の高解像度走査電子顕微鏡測定 (HR-SEM) (3A) および示差走査熱量測定 (DSC) (3B) である。

50

【図 3 B】電界紡糸繊維の高解像度走査電子顕微鏡測定（H R - S E M）（3 A）および示差走査熱量測定（D S C）（3 B）である。

【図 4 A】透明な基盤の中に埋め込まれた凍結乾燥繊維（4 A）、および対応する D S C 曲線（4 B）を示す。

【図 4 B】透明な基盤の中に埋め込まれた凍結乾燥繊維（4 A）、および対応する D S C 曲線（4 B）を示す。

【図 5】A ~ C。本発明の繊維上での多層 H E K 2 9 3 細胞の成長を示す。

【図 6】本発明の繊維のフィンガープリントを表す D S C 曲線を示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

発明の詳細な説明

本発明は、幾つかの実施形態において、合成ドラグラインスパイダーシルクの調製に有用な、異なる分子量を有するタンパク質の混合物を含む組成物、このタンパク質をコードする核酸配列、発現ベクターおよび細胞を提供する。本発明はさらに、上記組成物を含む物品および繊維を提供する。

【0037】

本発明は一部には、異なる分子量のタンパク質の混合物を用いて合成され M a S P タンパク質に由来する、人工ドラグラインスパイダーシルクが、天然のドラグラインスパイダーシルクに類似の、および幾つかの特性において天然のドラグラインスパイダーシルクより好ましい非凡な機械的性質を有する、という予測されなかった知見に基づく。

【0038】

本明細書の以下に実証される通り、本発明の人工ドラグラインスパイダーシルクは、予測されなかった熱特性を示した（図 6 参照）。具体的には本発明の繊維は、約 26.5℃ ~ 32.0 ± 5℃ で D S C ピークを示し、ネイティブのドラグラインスパイダーシルクに比べて有益な熱特性を示した。

【0039】

幾つかの態様によれば、異なる分子量の m タイプのタンパク質を含むタンパク質の混合物を含む組成物であって、上記混合物中の各タンパク質が、独立して、M a S P タンパク質またはその機能的相同体、変異体、誘導体もしくは断片の反復領域の n リピートを含み、m および n が、独立して、2 ~ 70 の間の整数である、組成物が提供される。

【0040】

本明細書で用いられる用語「タンパク質の混合物」または「タンパク質混合物」は、少なくとも 2 タイプ、少なくとも 3 タイプ、少なくとも 4 タイプ、少なくとも 5 タイプ、少なくとも 6 タイプ、少なくとも 7 タイプ、少なくとも 8 タイプ、少なくとも 9 タイプまたは少なくとも 10 タイプのタンパク質など、複数のタンパク質を指し、ここでタンパク質の各タイプは相対的に特有で均一な分子量を有する。本明細書で用いられる用語「特有の」は、上記タンパク質混合物中のタンパク質の各タイプの分子量が上記混合物中の他のタイプのタンパク質と異なっていることを指す。本明細書で用いられる用語「均一な」は、上記タンパク質混合物中のタンパク質の各タイプの分子量が上記混合物中の同じタイプのタンパク質と少なくとも 95 % 同一であることを指す。本明細書で用いられる用語「相対的に」は、各タイプのタンパク質内の最高で 1 つのアミノ酸残基の変化を指す。

【0041】

用語「大瓶状腺スピドロインタンパク質」および「スピドロインタンパク質」は、本明細書全体で互換的に用いられ、全ての公知の大瓶状腺スピドロインタンパク質を包含し、典型的には「M a S P」と略され、またはニワオニグモの場合には「A D F」と略される。これらの大瓶状腺スピドロインタンパク質は、一般には 2 つのタイプ 1 および 2 のものである。これらの用語は、公知の大瓶状腺スピドロインタンパク質の少なくとも反復領域と高い度合いの同一性および／または類似性を有する、本明細書に開示されるような、非天然タンパク質をさらに包含する。さらなる適切なスパイダーシルクタンパク質としては、M a S P 2、M i S P、M i S p 2、A c S P、F L Y S、F L A S、および梨型（p i

10

20

30

40

50

reform) が挙げられる。

【0042】

本明細書で用いられる用語「反復領域」、「反復配列」または「リピート」は、スパイダーシルクアミノ酸配列中に（例えば、MaSP-1ペプチド中に）天然に複数回生じるリピート単位に由来する組換えタンパク質配列を指す。当業者は、スパイダーシルクタンパク質の一次構造が、単位リピートの小さな変形の一連から主になると見なされることを、当業者は理解するであろう。天然に起こるタンパク質中の単位リピートは多くの場合、互いに異なる。即ち、タンパク質の長さに沿って単位リピートの厳密な重複はほとんど、または全く存在しない。

【0043】

幾つかの実施形態において、タンパク質の一次構造が単一の単位リピートまたは直接のリピートの複数の厳密な反復を含む、本発明の合成スパイダーシルクが作製される。本明細書で用いられる用語「直接のリピート」は、類似のリピートを有するタンデムの（頭一尾配置）リピートである。別の実施形態において、本発明の合成スパイダーシルクを形成するために用いられる上記リピートは、直接のリピートである。幾つかの実施形態において、上記リピートは、天然に見出されない（即ち、天然に起こるアミノ酸配列ではない）。幾つかの実施形態において、上記単一の単位リピート（あるいは直接のリピート）は、そのアミノ酸配列内に最高で1つの変化を含む。

【0044】

追加の実施形態において、本発明の合成スパイダーシルクは、第二の単位リピートの多数の反復と共に1つの単位リピートの多数の反復を含む。そのような構造は、典型的なブロックコポリマーと類似している。複数の異なる配列の単位リピートは、個々の適用に適した特性を有する合成スパイダーシルクタンパク質を提供するように組み合わせられ得る。

【0045】

反復配列を含む模範的配列は、ADF-4: A A A A A A A S G S G G Y G P E N Q G P S G P V A Y G P G G P V S S A A A A A A A G S G P G G Y G P E N Q G P S G P G G Y G P G G S G S S A A A A A A A A S G P G G Y G P G S Q G P S G P G G S G G Y G P G S Q G P S G P G A S S A A A A A A A A S G P G G Y G P G S Q G P S G P G G S G G Y G P G S Q G P S G P G G P G S S A A A S G P G G Y G P G S Q G P S G P G G S G G Y G P G S Q G P S G P G G P G A S A A A A A A A A S G P G G Y G P G S Q G P S G P G A Y G P G G P G S S A A A A A A A A A S G P G G Y G P G N Q G P S G P G G Y G P G G P G S S A A A A A A A S G P G G Y G P G S Q G P S G P G V Y G P G G P G S S A A A A A A A G S G P G G Y G P G N Q G P S G P G G Y G P G G S G S S A A A A A A A A S G P G G Y G P G S Q G P S G P G G S G G Y G P G S Q G P S G P G A S S A A A A A A A A S G P G G Y G P G S Q G P S G P G A Y G P G G P G S S A A A S G P G G Y G P G S Q G P S G P G A Y G P G G P G S S A A A A A A A A S G P G G Y G P G S Q G P S G P G G S R G Y G P G S Q G P G G P G A S A A A A A A A A S G P G G Y G P G S Q G P S G P G Y Q G P S G P G A Y G P S P S A S A S (SEQ ID NO: 10) である。

【0046】

幾つかの実施形態において、本発明の合成反復配列は、ADF-4 (SEQ ID NO: 10) に由来する1つまたは複数の反復配列に基づく（例えば、本明細書の以下に定義される通り、高い割合%の同一性を有する）。幾つかの実施形態において、本発明の合成反復配列は、SEQ ID NO: 18~32の任意の1つに由来する1つまたは複数の反復配列に基づく（例えば、高い割合%の同一性を有する）。本明細書で用いられる用語「～に基づく」は、反復配列と高い割合%の相同性を有する配列を指す。本明細書で用いられる高い割合%の相同性は、ADF-4配列の特定の領域について、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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同

10

20

30

40

50

一性のいずれか1つを含む。

【0047】

幾つかの実施形態において、各反復配列は、60までのアミノ酸、55までのアミノ酸、50までのアミノ酸、49までのアミノ酸、48までのアミノ酸、47までのアミノ酸、46までのアミノ酸、45までのアミノ酸、44までのアミノ酸、43までのアミノ酸、42までのアミノ酸、41までのアミノ酸、40までのアミノ酸、39までのアミノ酸、38までのアミノ酸、37までのアミノ酸、36までのアミノ酸または35までのアミノ酸を含み、ここで可能性は、本発明の別の実施形態を表す。幾つかの実施形態において、各反復配列は、5～60のアミノ酸、10～55のアミノ酸、15～50のアミノ酸、20～45のアミノ酸、25～40のアミノ酸、25～39のアミノ酸、または28～36
10
のアミノ酸を含み、この場合の可能性は、本発明の別の実施形態を表す。幾つかの実施形態において、各反復配列は、30～40のアミノ酸、31～39のアミノ酸、32～38のアミノ酸、33～37のアミノ酸、34～36のアミノ酸を含み、ここで可能性は、本発明の別の実施形態を表す。追加的実施形態において、各反復配列は、35のアミノ酸を含む。

【0048】

幾つかの実施形態において、nは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、
20
54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69および70のいずれか1つに等しい整数である。

【0049】

幾つかの実施形態において、mは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69および70のいずれか1つに等しい整数である。

【0050】

別の実施形態において、「n」と「m」の比率は、2：1～1：2の範囲である。別の実施形態において、「n」と「m」は、等しい。

【0051】

幾つかの実施形態において、上記「n」は、上記混合物中の各タイプのタンパク質について同一である。本明細書で用いられる用語「nは上記混合物中の各タイプのタンパク質について同一である」は、各タイプのタンパク質についての、即ち同一分子量を有する1つまたは複数のタンパク質についての、反復配列の数に関する。非限定的例として、異なる分子量の16タイプのタンパク質を有するタンパク質の混合物について、タンパク質の各群は、異なる数の反復配列を有する。

【0052】

幾つかの実施形態において、上記混合物中のタンパク質の様々な群は、各タイプのタンパク質に関する反復配列の数と上記群のモル比との間に反比例を有する。幾つかの実施形態において、タンパク質の各群について（例えば、同一数のリピートを有する）、上記タンパク質の分子量が低い程、上記群のモル比が高くなる。

【0053】

別の実施形態において、各リピートは、2 kDa～3.5 kDaの範囲、2.1 kDa～3.4 kDaの範囲、2.2 kDa～3.3 kDaの範囲、2.4 kDa～3.2 kDaの範囲、2.5 kDa～3.1 kDaの範囲、2.6 kDa～3 kDaの範囲、または2.7 kDa～2.9 kDaの範囲の分子量を有し、ここで各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。別の実施形態において、各リピートは、約2.8 kDaの範囲の分子量を有
50

する。

【0054】

別の実施形態において、組成物は、2 kDa～3.5 kDaの、2.1 kDa～3.4 kDaの、2.2 kDa～3.3 kDaの、2.4 kDa～3.2 kDaの、2.5 kDa～3.1 kDaの、2.6 kDa～3 kDaの、または2.7 kDa～2.9 kDaの分子量増分を有する上記混合物の2種以上のタンパク質を含み、ここで各可能性は、本発明の別の実施形態を表す。別の実施形態において、組成物は、約2.8 kDaの分子量増分を有する上記混合物の2種以上のタンパク質を含む。

【0055】

幾つかの実施形態において、上記反復領域は、第一の部分および第二の部分を含み、第一の部分および第二の部分は連続している（即ち、互いに直接隣接する）。典型的には第一の部分および第二の部分は、ペプチド結合によって連結される。

10

【0056】

幾つかの実施形態において、上記反復領域の第一の部分は、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも60%、少なくとも55%、または少なくとも50%のアラニン残基を含む5～30のアミノ酸のアミノ酸配列である。

【0057】

幾つかの実施形態において、第一の部分は、1つまたは複数のグリシン残基を含み得る。幾つかの実施形態において、第一の部分は、5%まで、10%まで、15%まで、20%まで、25%まで、30%まで、45%まで、または50%までのグリシン残基を含む。

20

【0058】

幾つかの実施形態において、第一の部分は、(AG)₁₋₁₅の式のような、アラニン-グリシン・ジペプチドの1～15の間のリピートを含む。

【0059】

幾つかの実施形態において、第一の部分は、(GA)₁₋₁₅の式のような、グリシン-アラニン・ジペプチドの1～15の間のリピートを含む。

【0060】

幾つかの実施形態において、上記反復領域の第二の部分は、グリシン、セリン、プロリンおよびチロシンからなる群から選択される少なくとも80%の残基を含む20～60のアミノ酸のアミノ酸配列である。

30

【0061】

幾つかの実施形態において、上記反復領域の第二の部分は、グリシン、セリン、プロリンおよびチロシンからなる群から選択される少なくとも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%の残基を含む20～60のアミノ酸のアミノ酸配列である。幾つかの実施形態において、上記反復領域の第二の部分は、最高で1または2個のグルタミン残基を含む。配列が自己組織化繊維を形成する限りにおいて、反復領域中のグリシン、セリン、プロリンおよびチロシン残基の厳密な量および順序は異なり得ることを、当業者は認識するであろう。

40

【0062】

幾つかの実施形態において、上記反復領域は、

(i) 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%もしくは50%のアラニン残基、またはそれらの間の任意の範囲；

(ii) 20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、

50

49%もしくは50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%または60%のグリシン残基、またはそれらの間の任意の範囲；

(iii) 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%もしくは30%のセリン残基、またはそれらの間の任意の範囲；

(iv) 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%もしくは30%のプロリン残基、またはそれらの間の任意の範囲；

(v) 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%もしくは10%のチロシン残基、またはそれらの間の任意の範囲；

(vi) 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%もしくは10%のグルタミン残基、またはそれらの間の任意の範囲；および

(vii) 0%、1%、2%、3%、4%、5%のアルギニン残基、またはそれらの間の任意の範囲、を含む。

【0063】

幾つかの実施形態において、上記反復領域は、13～42%のアラニン残基、25～55%のグリシン残基、10～18%のセリン残基、12～21%のプロリン残基、4～7%のチロシン残基、4～7%のグルタミン残基、および0～3%のアルギニン残基を含む。

【0064】

幾つかの実施形態において、MaSP1タンパク質の上記反復領域は、SEQ ID NO：1

(X₁) Z X₂ G P G G Y G P X₃ X₄ X₅ G P X₆ G X₇ G G X₈ G P G G P G X₉ X₁₀

(ここでX₁は、独立して、各例でAまたはGであり(X₁) Zの少なくとも50%がAであり、Zが5～30の間の整数であり；X₂は、SまたはGであり；X₃は、GまたはEであり；X₄は、G、SまたはNであり；X₅は、QまたはYであり；X₆は、GまたはSであり；X₇は、PまたはRであり；X₈は、YまたはQであり；X₉は、GまたはSであり；X₁₀は、SまたはGである)で示されるアミノ酸配列を有する。

【0065】

幾つかの実施形態において、上記反復領域は、SEQ ID NO：8

(X₁) Z X₂ G P G G Y G P G X₃ X₄ G P X₅ G X₆ G G X₇ G P G G P G X₈ X₉

(ここでX₁は、独立して、各例でAまたはGであり(X₁) Zの少なくとも50%がAであり、Zが5～30の間の整数であり；X₂は、SまたはGであり；X₃は、GまたはSであり；X₄は、QまたはYであり；X₅は、GまたはSであり；X₆は、PまたはRであり；X₇は、YまたはQであり；X₈は、GまたはSであり；X₉は、SまたはGである)で示されるアミノ酸配列を有する。

【0066】

幾つかの実施形態において、Z (SEQ ID NO：1または8の)は、6～11の間の整数、6～10の間の整数または7～9の間の整数である。一実施形態において、Zは、5、6、7、8、9、10、11、および12から選択される整数である。別の実施形態において、Zは、8である。

【0067】

別の実施形態において、MaSP1タンパク質の上記反復領域は、SEQ ID NO：2

(S G P G G Y G P G S Q G P S G P G G Y G P G G P G S S)で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、MaSP1タンパク質の上記反復領域は、SEQ ID NO：3 (A A A A A A A A S G P G G Y G P G S Q G P S G P G G Y G P G G P G S S)で示されるアミノ酸配列を含む。

【0068】

別の実施形態において、上記相同体は、SEQ ID NO：1と少なくとも50%、少な

10

20

30

40

50

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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性を共有する。

【0069】

別の実施形態において、上記相同体は、SEQ ID NO: 2と少なくとも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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性を共有する。

10

【0070】

別の実施形態において、上記相同体は、SEQ ID NO: 3と少なくとも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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性を共有する。

【0071】

20

別の実施形態において、MaSP1タンパク質の上記反復領域は、SEQ ID NO: 4で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、MaSP1タンパク質の上記反復領域は、SEQ ID NO: 10で示されるアミノ酸配列を有する。

【0072】

別の実施形態において、上記混合物の各タンパク質は、SEQ ID NO: 5 (MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLV) ; SEQ ID NO: 6 (MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLVRPLSNLDNA) ; SEQ ID NO: 7 (MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLVDPPGCRNSARAGSS) からなる群から選択される単一N末端領域、またはそれらの任意の機能的相同体、変異体、誘導体、もしくは断片をさらに含む。別の実施形態において、上記C末端領域の上記相同体は、SEQ ID NO: 5~7のいずれか1つと少なくとも70%の同一性を共有する。

30

【0073】

別の実施形態において、上記混合物の各タンパク質は、単一C末端領域SEQ ID NO: 9 (GPSGPGAYGPSPSASASVAASRLSSPAASSRVSSAVSSLVSSSGPTNGAAVSGALNSLVSQISASNPGLSGCDALVQALLLELVSAALVAIILSSASIGQVNVSSVSQSTQMISQALS)、またはそれらの任意の機能的相同体、変異体、誘導体もしくは断片をさらに含む。別の実施形態において、上記N末端領域の上記相同体は、SEQ ID NO: 9と少なくとも70%の同一性を共有する。

40

【0074】

幾つかの実施形態において、上記混合物の1つまたは複数のタンパク質は、少なくとも1つのタグ配列をさらに含む。本発明で用いられ得るタグの非限定的例としては、Hisタグ、HAタグ、T7タグなどが挙げられる。模範的なHisタグは、SEQ ID NO: 11 (HHHHHH) で示されるような6つのHis残基を含む、または6つのHis残基からなる。別の実施形態において、タグは、SEQ ID NO: 12 (YPYDVPDYA) で示されるアミノ酸配列を含む、またはそれからなるHAタグである。別の実施形態において、タグは、SEQ ID NO: 13 (MASMTGGQQMG) で示されるアミノ酸配列を含む、またはそれからなるT7タグである。当業者は、代わりの適切なタグ

50

または他の融合パートナーを十分に認識している。

【0075】

本明細書で用いられる用語「アミノ酸」は、天然に起こるおよび合成のアミノ酸、ならびに天然に起こるアミノ酸に類似の様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然に起こるアミノ酸は、遺伝子コードによってコードされたもの、ならびに後で修飾されるアミノ酸、例えばヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタマート、およびO-ホスホセリンである。「アミノ酸類似体」は、天然に起こるアミノ酸と同じ基本的化学構造、即ち水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合するアルファ炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。そのような類似体は、修飾されたR基または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に起こるアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。「アミノ酸模倣体」は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に起こるアミノ酸に類似の様式で機能する化学物質を指す。アミノ酸は本明細書では、それらの一般に知られる三文字記号、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionによって推奨される一文字の記号のいずれかにより称され得る。

【0076】

「アミノ酸配列」または「ペプチド配列」は、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸残基がペプチドおよびタンパク質中の鎖において位置する順序である。配列は一般に、遊離アミノ基を含むN末端から遊離カルボキシル基を含むC末端へと報告される。アミノ酸配列は、それがタンパク質の一次構造を表す場合には多くの場合ペプチド、タンパク質配列と呼ばれるが、タンパク質は、特定の三次元構成へとフォールディングされ典型的にはリン酸化、アセチル化、グリコシル化、スルフヒドリル結合形成、切断などの翻訳後修飾を受けたアミノ酸配列と定義されるため、用語「アミノ酸配列」または「ペプチド配列」と「タンパク質」を区別しなければならない。

【0077】

本発明により示されるように、合成スパイダーシルクアミノ酸配列、またはそれをコードする核酸分子に関連して本明細書で用いられる「単離された」または「実質的に精製された」は、アミノ酸配列またはポリヌクレオチドが自然環境から取り出されていること、またはそれらの自然な状態から改変されていることを意味する。そのため「単離された」は、アミノ酸配列または核酸分子が精製されている程度を必ずしも反映しない。しかし、ある程度に精製されているそのような分子が「単離され」ていることは、理解されよう。上記分子が、自然環境に存在しない場合、即ちそれが天然に存在しない場合、その分子は、どこに存在するかにかかわらず「単離され」ている。例として、ヒト中に自然には存在しないアミノ酸配列またはポリヌクレオチドは、それらがヒト中に存在する場合であっても「単離され」ている。

【0078】

アミノ酸配列または核酸に適用される場合、用語「単離された」または「実質的に精製された」は、アミノ酸配列または核酸が、自然な状態でそれらが関連する他の細胞成分を本質的に含まないことを表す。それは、均質状態であり得、あるいはドライソリューションまたは水溶液のいずれかであり得る。純度および均質性は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学技術を利用して典型的に決定される。調製物中に存在する主な化学種であるアミノ酸配列または核酸は、実質的に精製されている。

【0079】

幾つかの実施形態において、上記リピートは、MaSP1タンパク質またはその断片の反復領域の相同体、変異体、誘導体のものである。幾つかの実施形態において、上記リピートは、ADF-4タンパク質またはその断片の反復領域の相同体、変異体、誘導体のものである。1つの模範的实施形態において、上記リピートは、SEQ ID NO: 45~47の任意の1つで示されるポリヌクレオチド配列を含む、またはそれからなる。

【0080】

本明細書で用いられる用語「機能的相同体、変異体、誘導体または断片」の中の「機能的」は、定義された機能的アッセイを通して同定される生物学的機能または活性を有するアミノ酸配列を指す。より具体的には、定義された機能的アッセイは、上記機能的相同体、変異体、誘導体または断片を発現する細胞における自己組織化繊維の形成である。

【0081】

アミノ酸配列または核酸配列は、相同性が少なくとも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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%であると決定される場合、対応するアミノ酸配列または核酸の相同体であると言われる。

【0082】

本明細書で用いられる同一性は、2つのアミノ酸（ペプチド）またはDNA配列の間の同一性%に基づいて決定され得る。一般に、比較される2つの配列は、配列間の最大相関を与えるように並べられる。2つの配列のアライメントを検査し、決定された2つの配列間の厳密なアミノ酸（またはヌクレオチド）一致を与える位置の数を、アライメントの全長で割り、100を掛けて、同一性%値を与える。この同一性%値は比較される配列の全長について決定されてよく、これは同じもしくは非常に類似した長さの配列であり高い同一性がある配列に特に適しており、またはより短い画定された長さについて決定されてよく、これは等しくない長さの配列もしくはより低レベルの同一性を有する配列により適する。2つ以上の配列の同一性を比較する方法は、当該技術分野で周知である。したがって、例えば、Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1で入手されるプログラム、例えばGAPおよびBESTFITプログラムを用いて、2つのアミノ酸配列間の同一性%、および2つのポリヌクレオチド配列間の同一性%を決定できる。BESTFITはSmithおよびWatermanの「ローカルホモロジー」アルゴリズムを用い、2つの配列間の類似性の最良な単一領域を見出す。BESTFITは、長さが類似していない2つのポリペプチドまたは2つのポリヌクレオチド配列を比較するのに適しており、このプログラムは、より短い方の配列がより長い配列の部分を表すと仮定している。比較の際、GAPは、2つの配列を並べて、NeedlemanおよびWunschのアルゴリズムに従って「最大類似性」を見出す。GAPは、ほぼ同じ長さである配列を比較するのに適しており、アライメントは、全長に対して予測される。好ましくは各プログラムで用いられるパラメータ「ギャップウェイト」および「レングスウェイト」は、それぞれポリヌクレオチド配列では50および3、ならびにポリペプチド配列では12および4である。好ましくは、同一性%および類似性%は、比較される2つの配列が最適に並べられる時に決定される。

【0083】

2つ以上のアミノ酸または核酸配列に関連する用語「同一の」、「実質的な同一性」、「実質的な相同性」または「同一性」%は、以下に記載されるデフォルトパラメータでのBLASTもしくはBLAST 2.0配列比較アルゴリズムを用いて、またはマニュアルアライメントおよび視覚的精査により測定される場合に、同じである2つ以上の配列もしくは部分配列を指すか、または同じであるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドの指定された割合%（即ち、比較ウィンドウまたは指定された領域で最大一致になるように比較して並べると、特定の領域（例えば、アミノ酸配列SEQ ID NO: 2または3）で約60%同一性、または少なくとも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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または99%の同一性）を有する2つ以上の配列もしくは部分配列を指す。そのような配列は、その場合、「実質的に同一」と言われる。この定義はまた、テスト配列のコンプリメント（complement）を指す、またはそれに適

用され得る。この定義は、欠失および／または付加を有する配列、ならびに置換を有する配列を包含する。好ましいアルゴリズムは、ギャップなどを説明できる。

【0084】

配列比較の場合、典型的には1つの配列が参照配列として働き、それに対してテスト配列が比較される。配列比較アルゴリズムを利用する場合、テストおよび参照配列がコンピュータに入力され、必要に応じて部分列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムのパラメータが指定される。好ましくは、デフォルトプログラムのパラメータが用いられ得る、または代わりのパラメータが指定され得る。その後、配列比較アルゴリズムが、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対するテスト配列の配列同一性%を計算する。

【0085】

本発明がSEQ ID NO: 1、2、または3のいずれか1つの変異体のnリピートを含むアミノ酸配列をさらに包含することが、理解されなければならない。本明細書で用いられる用語「変異体」または「実質的に類似の」は、1つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20または25）のアミノ酸残基またはヌクレオチドが欠失、置換または付加されている、具体的に同定された配列と異なるアミノ酸またはヌクレオチドの配列を含む。変異体は、天然に起こる対立遺伝子変異体または非天然起源の変異体であり得る。変異体または実質的に類似の配列は、最先端技術で用いられる一般的アルゴリズムによる決定されるような、それらのアミノ酸またはヌクレオチド配列と、本明細書に記載されたアミノ酸またはヌクレオチド配列との同一性の割合%により特徴づけられ得るアミノ酸配列または核酸の断片を指す。アミノ酸または核酸の好ましい断片は、参照の配列と比較した場合に、少なくともおよそ40または45%の配列同一性、優先的にはおよそ50%または55%の配列同一性、より優先的にはおよそ60%または65%の配列同一性、より優先的にはおよそ70%または75%の配列同一性、より優先的にはおよそ80%または85%の配列同一性、さらにより優先的にはおよそ90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するアミノ酸またはヌクレオチドの配列を有するものである。

【0086】

本明細書で用いられる誘導体および機能的誘導体という用語は、任意の挿入、欠失、置換および修飾を有する本発明のアミノ酸配列を意味する。

【0087】

本明細書で用いられる用語「挿入」は1～50の間のアミノ酸残基、具体的には20～1の間のアミノ酸残基、より具体的には1～10の間のアミノ酸残基の、本発明の配列へのアミノ酸残基の任意の付加を意味することが、理解されなければならない。最も具体的には1、2、3、4、5、6、7、8、9および10のアミノ酸残基。さらに、本発明のアミノ酸配列は、様々な同一のまたは異なるアミノ酸残基によりそのN末端および／またはC末端で伸長され得る。

【0088】

アミノ酸「置換」は、1つのアミノ酸を、類似の構造的および／または化学的性質を有する別のアミノ酸と置換した結果であり、即ち保存的アミノ酸置換である。アミノ酸置換は、含まれる残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および／または両親媒性における類似性に基づいて行われ得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが挙げられ；極性中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが挙げられ；正電荷の（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、リジン、およびヒスチジンが挙げられ；負電荷の（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。

【0089】

別の実施形態において、本発明のリピート配列は、SEQ ID NO: 2または3の任意の1つの配列への17以下、16以下、15以下、14以下、13以下、12以下、11以下、10以下、9以下、8以下、または7以下のアミノ酸置換を有する。一実施形態に

において、本発明のリピート配列は、SEQ ID NO：2または3の任意の1つの配列への少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、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、または少なくとも13のアミノ酸置換を有する。

【0090】

アミノ酸配列に関連して、コードされた配列中の単一アミノ酸またはごく一部のアミノ酸を改変、付加または欠失する、アミノ酸、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列への個々の置換、欠失または付加は、改変があるアミノ酸の、化学的に類似のアミノ酸での置換をもたらす「保存的に修飾された変異体」であることを、当業者は認識するであろう。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当該技術分野で周知である。そのような保存的に修飾された変異体は、本発明の多形変異体、種間相同体、および対立遺伝子に加えられ、それらを除外しない。

【0091】

例えば、脂肪族アミノ酸（G、A、I、L、またはV）がその群の別のメンバーで置換される置換、または1つの極性残基の別の残基での置換、例えばアルギニン（R）をリジン（K）で、グルタミン酸（D）をアスパラギン酸（N）で、またはグルタミン（Q）をアスパラギン（N）でなどの置換が行われ得る。以下の8群のそれぞれは、互いに保存的置換である他の模範的アミノ酸を含む：1）アラニン（A）、グリシン（G）；2）アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；3）アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；4）アルギニン（R）、リジン（K）；5）イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）；6）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）；7）セリン（S）、トレオニン（T）；および8）システイン（C）、メチオニン（M）。

【0092】

保存的核酸置換は、先に定義されたような保存的アミノ酸置換をもたらす核酸置換である。

【0093】

本発明のアミノ酸配列の変異体は、SEQ ID NO：2または3の任意の（a b y）1つにより表されるリピート単位を有し、アミノ酸レベルで少なくとも80%の配列類似性、少なくとも85%の配列類似性、少なくとも90%の配列類似性、または少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列類似性を有し得る。

【0094】

本発明のアミノ酸配列は、SEQ ID NO：1もしくはSEQ ID NO：3の、またはその任意の断片のnリピートを含み得る。「断片」は、特定の領域のアミノ酸またはDNA配列の小部分を構成する。ペプチド配列の断片は、特定の領域よりも短い少なくとも1つのアミノ酸であり、DNA配列の断片は、特定の領域よりも短い少なくとも1つの塩基対である。断片は、C末端側またはN末端側、またはその両方で切り詰められ得る。アミノ酸断片は、少なくとも3、少なくとも4、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24、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または少なくとも34の、SEQ ID NO：1または3のアミノ酸を含み得る。

【0095】

本発明のアミノ酸配列の突然変異体は、別のアミノ酸の1つまたは複数に対してそのアミノ酸の1つ（点突然変異体）または複数、約10までの交換において特徴づけられる。それらは、異なるコドンを導く、DNAレベルでの対応する突然変異の結果である。

【0096】

さらに本発明は、本発明のアミノ酸配列の誘導体に関係する。本発明のアミノ酸配列の誘導体は、例えば、アミノ基、ヒドロキシル基、メルカプト基またはカルボキシル基などの

10

20

30

40

50

官能基が誘導体化、例えばそれぞれグリコシル化、アシル化、アミド化またはエステル化されている。グリコシル化誘導体において、オリゴ糖は通常、アスパラギン、セリン、トレオニンおよび／またはリジンに連結される。アシル化誘導体は、特に天然に起こる有機酸または無機酸、例えば酢酸、リン酸または硫酸によってアシル化されており、それは通常、N末端アミノ基で、またはヒドロキシ基で生じ、特にチロシンまたはセリンのそれぞれアミノ基またはヒドロキシ基で生じる。エステルは、天然に起こるアルコール、例えばメタノールまたはエタノールのものである。さらなる誘導体は、塩、特に医薬的に許容し得る塩、例えばアルカリ金属塩およびアルカリ土類金属塩などの金属塩、例えばナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩もしくは亜鉛塩、またはアンモニウムもしくは低級アルキルアミンなどの適切な有機アミン、例えばトリエチルアミン、ヒドロキシ低級アルキルアミン、例えば2-ヒドロキシエチルアミンなどを用いて形成されるアンモニウム塩である。

10

【0097】

幾つかの態様によれば、本発明は、本発明のタンパク質の上記混合物の2種以上のタンパク質をコードする単離された核酸配列を提供する。幾つかの実施形態によれば、本発明は、本発明のタンパク質混合物をコードする単離された核酸配列を提供する。

【0098】

「核酸」は、糖、リン酸塩およびプリンまたはピリミジンのいずれかを含有するモノマー（ヌクレオチド）で構成された一本鎖または二本鎖であり得る分子を指す。細菌、下等真核生物、ならびに高等動物および植物において、「デオキシリボ核酸」（DNA）は、遺伝子材料を指すが、「リボ核酸」（RNA）は、DNAからタンパク質への情報の翻訳に関与する。

20

【0099】

遺伝子コードの縮重性（degenerative nature）により、複数の異なる核酸配列を用いて本発明のアミノ酸配列をコードし得ることが明らかである。本発明の核酸配列に含まれるコドンはSf9宿主細胞での発現のために最適化され得ることが、理解されなければならない。

【0100】

様々な宿主の形質転換のための核酸分子の遺伝子またはコード領域を指す場合の用語「コドン最適化された」は、DNAによりコードされるポリペプチドを改変せずに宿主生物体の典型的なコドン使用を反映するための、核酸分子の遺伝子またはコード領域でのコドンの改変を指す。本発明の関連において、遺伝子およびDNAコード領域は、宿主細胞、具体的な例ではSf9スポドプテラ・フルギペルダ昆虫細胞での最適な発現のためにコドン最適化される。

30

【0101】

本明細書で用いられる用語「発現」は、遺伝子産物の配列をコードする遺伝子から遺伝子産物への転写および翻訳を意味すると意図される。その発現において、遺伝子産物の配列をコードするDNA鎖は最初、メッセンジャーRNAであることが多い相補性RNAに転写され、その後、こうして転写されたメッセンジャーRNAは、遺伝子産物がタンパク質であれば、上述の遺伝子産物へと翻訳される。

40

【0102】

幾つかの実施形態において、本発明は、本発明のタンパク質混合物をコードする核酸配列を含む1つまたは複数の発現ベクターに関する。幾つかの実施形態において、本発明は、本発明のタンパク質混合物（例えば、異なる分子量を有するタンパク質の2つ以上の群）の少なくとも一部をコードする核酸配列を含む1つまたは複数の発現ベクターに関する。本発明の発現ベクター内に含まれる核酸配列によってコードされるアミノ酸配列は、場合によりC末端領域（例えば、SEQ ID NO: 9で示される）およびN末端領域（例えば、SEQ ID NO: 5~7から選択される）のうちの少なくとも1つをさらに含み得る。核酸配列は、動作可能に連結されたプロモーターと、場合により調節配列と、の発現制御下にあることが留意されなければならない。

50

【0103】

本明細書で用いられる通り、本明細書で称される「ベクター」、「発現ベクター」または「プラスミド」は、細胞の重要な代謝の一部ではない遺伝子を運搬することの多い染色体外要素であり、通常は環状の二本鎖DNA分子の形態である。それは、異なる遺伝子環境の間での運搬のために、または宿主での発現のために、制限およびライゲーションによって所望の配列が挿入され得る多数の核酸のいずれかであり得る。ベクターは典型的にはDNAで構成されるが、RNAベクターもまた利用可能である。ベクターとしては、プラスミドおよびファージミドが挙げられるが、これらに限定されない。クローニングベクターは、宿主細胞で複製できるものであり、新たな組換えベクターが宿主細胞中で複製する能力を保持するように、そこで特定できる方式でベクターが切断され得、所望のDNA配列がライゲートされ得る1つまたは複数のエンドヌクレアーゼ制限部位によって、さらに特徴づけることができる。プラスミドの場合、所望の配列の複製は、プラスミドが宿主細菌内でコピー数を増加させるにつれ何回も、または宿主が有糸分裂により複製される前に宿主あたり1回、起こり得る。ファージの場合、溶解相では能動的に、または溶原相では受動的に複製が起こり得る。発現ベクターは、所望のDNA配列が制限およびライゲーションによって挿入され得、それにより所望のDNA配列が調節配列に動作可能に結合されて、RNA転写産物として発現され得るものである。ベクターは、ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた細胞の同定および選択での使用に適した1つまたは複数のマーカー配列をさらに含有し得る。本明細書で用いられる「形質転換」または「トランスフェクション」は、核酸の取り込みによる細胞中の新しい遺伝子の獲得である。マーカーとしては、例えば、抗生物質または他の化合物への耐性または感受性のいずれかを増加または減少させるタンパク質をコードする遺伝子、その活性が当該技術分野で公知の標準的アッセイによって検出可能である酵素（例えば、 β -ガラクトシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）をコードする遺伝子、および形質転換またはトランスフェクトされた細胞、宿主、コロニーまたはプラークの表現型に可視的に影響を及ぼす遺伝子が挙げられる。好ましいベクターは、動作可能に結合されたDNAセグメントに存在する構造的遺伝子産物の自律複製および発現、即ち合成スパイダーシルクタンパク質の発現が可能なベクターである。

【0104】

具体的な実施形態において、ベクターは、ウイルスベクター、最も具体的にはバキュロウイルスベクター系またはワクシニアウイルスベクター系である。そのような市販されるバキュロウイルス系の例は、Baculo-Gold（登録商標）、Flash-Bac（登録商標）およびBac-to-Bac系である。さらなるウイルスベクター系もまた、本発明で用いられ得る。場合により、ベクターの修飾が必要になり得る。さらなるウイルスベクターの例は、アデノウイルスおよび全てのマイナス鎖RNAウイルス、例えば狂犬病ウイルス、はしかウイルス、RSVなどである。

【0105】

一実施形態において、本発明の合成シルクタンパク質を発現するのに用いられるバキュロウイルス系。バキュロウイルスは、2つの属：ヌクレオポリヘドロウイルスおよびグラニニューロウイルスに分別され得る大きな桿状ウイルスのファミリーである。それらは、影響を及ぼし得る宿主の限定された範囲を有し、その範囲は、典型的には限定的数の密接に関連する昆虫種に制限される。バキュロウイルスは、ヒトに有害でないため、研究および商業または工業用途での使用のための安全な選択肢である。昆虫細胞でのバキュロウイルス発現は、グリコシル化を欠き、その結果適当なタンパク質フォールディングを欠く原核生物発現よりも著しく有利である、組換え体糖タンパク質を生成するための安定な方法である。

【0106】

先に示された通り、本発明の発現ベクターは、プロモーターに動作可能に連結される。用語「プロモーター」および「プロモーター領域」は、通常は構造遺伝子のタンパク質コード配列の上流（5'側）にあるDNAの配列を指し、これは転写を正しい部位で開始するのに必要なRNAポリメラーゼおよび／または他の因子の認識を提供することによりコード

10

20

30

40

50

領域の発現を制御する。プロモーター配列は、遺伝子の発現を駆動するのに必須であるが、必ずしも十分ではない。用語「適切なプロモーター」は、合成スパイダーシルク変異体遺伝子の発現を駆動できる任意の真核生物または原核生物プロモーターを指すであろう。

【0107】

S f 9で異種のDNA断片の発現を駆動するのに有用なプロモーターは、数多くあり、当業者に熟知されている。シルク変異体タンパク質をコードする遺伝子を駆動できる事実上あらゆるプロモーターが、本発明に適する。例えば、ポリヘドリン、塩基性タンパク質、p10、OpIE2およびgp4プロモーターは、上記発現に適したプロモーターであり得る。

【0108】

コード配列および調節配列は、それらが調節配列の影響または制御下でコード配列の発現または転写を行うような方法で共有結合される場合に、「動作可能に連結され」ているまたは「動作可能に結合され」ていると言われる。調節配列が生成される遺伝子産物の量に及ぼす測定可能な影響を発揮し得るように、調節配列が遺伝子に相対的に位置する場合、この調節配列は遺伝子に動作可能に連結されている。コード配列が機能的タンパク質へと翻訳されることが望ましい場合、5'調節配列中のプロモーターの導入がコード配列の転写をもたらすならば、および2つのDNA配列の間の連結の性質が、(1)フレームシフト突然変異の誘導をもたらさない、(2)コード配列の転写を指揮するプロモーター領域の能力を妨害しない、または(3)タンパク質へと翻訳される対応するRNA転写産物の能力を妨害しないならば、2つのDNA配列は動作可能に結合されていると言われる。したがって、得られた転写産物が所望のタンパク質またはポリペプチドへと翻訳され得るように、プロモーター領域がそのDNA配列の転写に影響を及ぼすことができる場合に、プロモーター領域は、コード配列に動作可能に結合されている。

【0109】

遺伝子発現に必要とされる調節配列の正確な性質は、種または細胞型の間で様々であろうが、一般には必要に応じて、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列などの、それぞれ転写および翻訳の開始に関与する5'非転写および5'非翻訳配列を含み得る。特に、そのような5'非転写調節配列は、動作可能に結合された遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含むであろう。調節配列はまた、所望されるように、エンハンサー配列または上流の活性化配列を含み得る。

【0110】

「調節」および「調節する」は、排他的ではないが主に、遺伝子の転写開始点の上流(5'側)に位置するDNA配列エレメントによって制御される遺伝子発現の調整を指す。調節は、刺激への全か無かの応答を生じ得るか、または遺伝子発現のレベルの変動を生じ得る。

【0111】

さらなる態様において、本発明は、本発明による発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

【0112】

「細胞」、「宿主細胞」または「組換え宿主細胞」は、本明細書では互換的に用いられる用語である。そのような用語が、特定の対象細胞のみならず、そのような細胞の子孫または潜在的子孫も指すことを、理解されたい。特定の修飾は、突然変異または環境的影響のいずれかによって次の世代で起こり得るため、そのような子孫は、実際には親細胞と同一でない場合があるが、それでも本明細書で用いられるこの用語の範囲内に含まれる。

【0113】

本明細書で用いられる「宿主細胞」は、裸のDNAまたは組換えDNA技術を用いて構築された発現ベクターで組換え的に形質転換され得る細胞を指す。薬物耐性マーカーまたは他の選択マーカーは、一部には形質転換体の選択を促進することを意図される。加えて、薬物耐性マーカーなどの選択マーカーの存在は、混入した微生物が培地中で増幅しないようにするのに有用であり得る。形質転換された宿主細胞のそのような純粋培養は、誘導される表現型を生存のために必要とする条件下で細胞を培養することにより得られる。

【0114】

本発明の宿主細胞は、本発明の合成スパイダーシルクタンパク質を発現するために、本明細書に記載された発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされる。本明細書で用いられる「形質転換」は、外因性DNAまたはRNAの細胞内取込みの結果として細胞の遺伝子型が変化する過程を指し、例えば、形質転換された細胞は所望の合成スパイダーシルクタンパク質の組換え形態を発現する。用語「トランスフェクション」は、核酸、例えば裸のDNAまたは発現ベクターを、核酸介在性遺伝子移入によりレシピエント細胞内に誘導することを意味する。

【0115】

1つの具体的実施形態において、本発明により発現ベクターで形質転換される宿主細胞は、昆虫細胞である。昆虫細胞として、鱗翅目の昆虫細胞、より具体的にはスポドプテラ・フルギペルダおよびイラクサギンウワバ由来の細胞が用いられ得る。最も具体的には該昆虫細胞は、Sf9、Sf21またはHigh 5細胞である。

10

【0116】

幾つかの実施形態において、本発明のシルクタンパク質は、翻訳後修飾を有さない。

【0117】

幾つかの実施形態において、本発明のシルクタンパク質は、生分解性である。この特徴は、例えば医薬の分野で、生体分解が望まれるインビボ使用にシルクタンパク質が意図される場合には必ず、重要であり得る。この特徴は、特に縫合糸材料、ならびに創傷の閉合および被覆システムにおいて用途を見出し得る。

20

【0118】

幾つかの態様によれば、本発明は、本発明の核酸配列を含む発現ベクターであって、上記核酸配列が、動作可能に連結されたプロモーターと、場合により調節配列と、の発現制御下にある、発現ベクターを提供する。

【0119】

繊維

幾つかの態様によれば、本発明は、本発明の組成物を含む繊維を提供する。

【0120】

本明細書で用いられる「繊維」は、互いに撚られた2本以上の細糸で構成される繊維性材料の微細なひもを意味する。「細糸」は、微視的長さ～1マイル以上の長さの範囲の不確定な長さの細長い縫い糸状の物体または構造を意味する。具体的には、合成スパイダーシルク細糸は、微視的であり、タンパク質性である。「バイオフィラメント」は、組換え生成スパイダーシルクタンパク質を含む、タンパク質から生成された細糸を意味する。用語「繊維」は、構造化されていない凝集体または沈殿物を包含しない。

30

【0121】

幾つかの実施形態において、繊維は、少なくとも50nmの厚み径 (thickness diameter) を有する。幾つかの実施形態において、繊維は、最大で350nmの厚み径を有する。幾つかの実施形態において、繊維は、少なくとも50～350nm、またはそれらの間の任意数値の厚み径を有する。本明細書で実証される通り (図1参照)、微細繊維は、5～10nmの直径のナノ繊維で構成される。

40

【0122】

幾つかの実施形態において、繊維は、その厚さに比較して長さにおいてかなりの伸長を有し、好ましくは20μmを超える。

【0123】

「マイクロ繊維」は、1デニール未満の細さを有する細糸を意味する (デニールは9,000メートルあたりのグラム量と定義される)。

【0124】

幾つかの実施形態において、タンパク質の繊維は、その少なくとも1つの寸法 (例えば、直径、長さ) のサイズにより特徴づけられる。

【0125】

50

例であり限定ではないが、繊維の直径は、 $10\text{ nm} \sim 1\text{ }\mu\text{m}$ 、 $20 \sim 100\text{ nm}$ 、または $10 \sim 50\text{ nm}$ の間である。

【0126】

幾つかの実施形態において、繊維は、ナノフィブリルで構成される。幾つかの実施形態において、ナノフィブリルは、例えば 1 nm 、約 2 nm 、約 3 nm 、約 4 nm 、約 5 nm 、約 6 nm 、約 7 nm 、約 8 nm 、約 9 nm 、約 10 nm 、約 11 nm 、約 12 nm 、約 13 nm 、約 14 nm 、約 15 nm 、約 16 nm 、約 17 nm 、約 18 nm 、約 19 nm 、約 20 nm 、約 21 nm 、約 22 nm 、約 23 nm 、約 24 nm 、約 25 nm 、約 26 nm 、約 27 nm 、約 28 nm 、約 29 nm 、約 30 nm 、約 31 nm 、約 32 nm 、約 33 nm 、約 34 nm 、約 35 nm 、約 36 nm 、約 37 nm 、約 38 nm 、約 40 nm 、約 42 nm 、約 44 nm 、約 46 nm 、約 48 nm 、または 50 nm （それらの間の任意値または範囲を含む）の直径を有する。一実施形態において、ナノフィブリルは、 $3 \sim 7\text{ nm}$ の直径を有する。一実施形態において、ナノフィブリルは、 $4 \sim 6\text{ nm}$ の直径を有する。

10

【0127】

幾つかの実施形態において、開示される繊維の長さは、 $1 \sim 200\text{ }\mu\text{m}$ 、 $10 \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 、 $100 \sim 500\text{ }\mu\text{m}$ または $200 \sim 500\text{ }\mu\text{m}$ の間である。

【0128】

一実施形態において、本発明の繊維は、自己組織化によって組織化する。「自己組織化」は、上記繊維、即ち本発明の合成スパイダーシルクタンパク質のモノマーが、通常の生理学的条件、または室温で、エネルギー的に好適な様式で、互いに自然に結合して、本明細書に記載される特性を有する高分子繊維構造を作り出すことを意味する。さらに、本発明の繊維は、極めて弾力があり、組織化すると、 10% SDS中の可溶化および少なくとも1時間の煮沸などの極端な化学的攻撃に耐え得る。

20

【0129】

「強靱性」または「引張り強さ」は、細糸が破壊の前に耐え得る重量を指す。発生される最大比応力は通常、材料を破壊する引張り試験により細糸、紡績糸または布に存在する。具体的実施形態によれば、本発明の繊維は、約 $100 \sim 3000\text{ MPa}$ ($\text{MPa} = \text{N}/\text{m}^2$)、約 $300 \sim 3000\text{ MPa}$ 、約 $500 \sim 2700\text{ MPa}$ 、約 $700 \sim 2500\text{ MPa}$ 、約 $900 \sim 2300\text{ MPa}$ 、約 $1100 \sim 2000\text{ MPa}$ 、約 $1200 \sim 1800\text{ MPa}$ 、約 $1300 \sim 1700\text{ MPa}$ または約 $1400 \sim 1600\text{ MPa}$ の引張り強さを有する。より具体的には約 1500 MPa 。

30

【0130】

「靱性」は、繊維を破壊するのに必要とされるエネルギーを指す。これは応力ひずみ曲線下面積であり、時として「破壊エネルギー」または破断仕事と呼ばれる。特別な実施形態によれば、本発明の繊維は、約 $20 \sim 1000\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、約 $50 \sim 950\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、約 $100 \sim 900\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、約 $120 \sim 850\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、約 $150 \sim 800\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、約 $180 \sim 700\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、約 $180 \sim 750\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、約 $250 \sim 700\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、約 $280 \sim 600\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、約 $300 \sim 580\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、約 $310 \sim 560\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、約 $320 \sim 540\text{ MJ}/\text{m}^3$ または約 $350 \sim 520\text{ MJ}/\text{m}^3$ 、最も具体的には約 $350 \sim 520\text{ MJ}/\text{m}^3$ の靱性。

40

【0131】

「弾性」は、変形後にその本来のサイズおよび形状を回復する傾向がある本体の特性を指す。回復しない変形である可塑性は、弾性の反対である。繊維の分子構成では、回復可能なまたは弾性的な変形は、原子間および分子間の構造的結合の伸長（再配向）により可能である。逆に、破壊と、新たな安定化位置への分子間結合の再形成は、非回復性のまたは可塑性の変形を引き起こす。

【0132】

「伸長性」は、初期の長さに対する割合または分率として表される長さの増加を指す。

【0133】

50

「微細さ」は、繊維または細糸（例えば、バイオフィラメント）の平均径を意味し、通常はミクロン（マイクロメートル）で表される。

【0134】

幾つかの実施形態において、開示される組成物は、定義された示差走査熱量測定（DSC）パターンによって特徴づけられる。幾つかの実施形態において、「DSCパターン」は、ピークの位置を指すことを意味する。幾つかの実施形態において、「ピーク」は、発熱ピークを指すことを意味する。本明細書全体で、「ピークの位置」または「ピーク位置」は、サーモグラムパターンにおける温度軸に沿ったピークを指し、幾つかの実施形態において、任意のピーク強度でのピーク位置を指し得る。DSC測定で得られたデータが一部には、用いられる機器および測定が実施される時点の環境条件（例えば、湿度）に依存することを、当業者は認識するであろう。

10

【0135】

幾つかの実施形態において、開示される組成物は、250～330℃の範囲で少なくとも1つの吸熱ピークを示すDSCパターンによって特徴づけられる。幾つかの実施形態において、開示される組成物は、290～310℃の範囲で少なくとも1つの吸熱ピークを示すDSCパターンによって特徴づけられる。幾つかの実施形態において、開示される組成物は、295～305℃の範囲で少なくとも1つの吸熱ピークを示すDSCパターンによって特徴づけられる。

【0136】

幾つかの実施形態において、開示される組成物は、少なくとも260～320℃および220～250℃の範囲で吸熱ピークを示すDSCパターンによって特徴づけられる。幾つかの実施形態において、開示される組成物は、120～160℃の範囲での追加的DSC発熱ピークによってさらに特徴づけられる。

20

【0137】

幾つかの実施形態において、開示される組成物は、約-100～約220℃の範囲でDSCピークを有さない。幾つかの実施形態において、開示される組成物は、約-100～約25℃の範囲でDSCピークを有さない。幾つかの実施形態において、開示される組成物は、約40～約70℃の範囲で発熱ピークを有さないことを示す少なくとも1つのDSCパターンによって特徴づけられる。

【0138】

幾つかの実施形態において、開示される組成物は、約-100～約50℃の範囲でDSCピークを有さない。幾つかの実施形態において、開示される組成物は、約-50～約0℃の範囲でDSCピークを有さない。幾つかの実施形態において、開示される組成物は、約-0～約-25℃の範囲でDSCピークを有さない。

30

【0139】

組成物

特別な実施形態によれば、組成物は、ゲル、フォーム、もしくはステントおよびインプラントをコートするのに用いられるコーティングの形態で、または組織エンジニアリング目的のために有用な形態で提供され得る。別の実施形態において、本発明の組成物は、医薬組成物である。

40

【0140】

本発明の医薬組成物が、本発明のアミノ酸配列、組換えタンパク質および繊維の少なくとも1つを含み得、処置される対象に直接投与され得ることが、留意されなければならない。配合剤は、先に定義されたように、少なくとも1種の有効成分を、その1種または複数の許容し得る担体と共に典型的に含む。

【0141】

配合剤は、局所投与に、または侵襲性医療装置のコーティングとしての使用に、または組織エンジニアリングの足場として特に適するが、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内およびさらに経口、経直腸、経鼻、または非経口投与経路も見落としてはならない。

【0142】

50

局所投与用の医薬組成物および配合剤としては、経皮貼付剤、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴薬、坐剤、スプレー、液体および粉末が挙げられ得る。従来の医薬担体、水性、粉末、または油性ベース、増粘剤などが、必要であるか好ましいであろう。

【0143】

本発明の医薬組成物は一般に、当該技術分野で公知の緩衝剤、浸透圧を調整する薬剤、そして場合により1種または複数の医薬的に許容し得る担体、賦形剤および／または添加剤を含む。補助的有效成分もまた、組成物中に組み入れられ得る。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒体であり得る。適当な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散の場合には必要とされる粒子径の維持により、および界面活性剤の使用により、維持され得る。

10

【0144】

本明細書で用いられる「医薬的に許容し得る担体」は、あらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤などを包含する。医薬的活性物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野で周知である。任意の従来の媒体または薬剤が有効成分と不適合である場合を除き、治療組成物中でのその使用が企図される。

【0145】

本発明のアミノ酸配列、組換えタンパク質および繊維の少なくとも1つを含む本発明の医薬組成物は、弾力、弾性、強靭性を必要とし非毒性である経皮貼付剤、即ち経皮送達システム、弾性包帯、縫合糸、コーティングまたは医療用布の製造に特に適し得る。

20

【0146】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、化粧組成物であり得る。用語「化粧組成物」は、皮膚の色調および色、髪の色および輝きを改善もしくは増強すること、傷および瘢痕などの表層組織の欠陥を隠すこと、または日光による損傷および皮膚加齢などの将来の、もしくは蓄積性の損傷を予防することなど、有益な皮膚または他の表層組織の審美的特性を有する組成物に関する。

【0147】

本発明による処置のための皮膚科学的組成物または化粧組成物は、軟膏ポマード、ローション、クリームおよびゲルとして表皮へ、およびクリーム、ローションまたはゲルなどの水エマルジョンとして粘膜へ、局所塗布される。そのような組成物を用いて製造され得る化粧製品としては、髭剃りクリーム、ハンドクリーム、シャンプー、石鹸、コンディショナー、ボディークリーム、日焼け止め、フェースクリーム、またはボディーローションなどの製品が挙げられる。本発明による化粧組成物中の成分の比率は、化粧組成物の予定される適用により調整され得る。

30

【0148】

組織足場

別の態様において、本発明は、(i)細胞と、(ii)本発明の少なくとも1種の繊維を含む細胞足場材料と、を含む組成物を提供する。

【0149】

別の態様において、本発明は、

培養される細胞の試料を用意すること；

上記試料を、本発明の少なくとも1種の繊維を含む細胞足場材料に適用すること；および細胞培養に適した条件下で適用された細胞を有する上記細胞足場材料を維持すること、を含む、細胞の育成(cultivation)の方法を提供する。

40

【0150】

本発明の文脈において、細胞の「育成」、「細胞培養」という用語は、細胞が分化および／または増殖する状況、自然環境に存在する時の細胞型によって示される少なくとも1つの機能的特徴を保持しながら細胞が分化された状態で維持される状況、ならびに幹細胞が未分化状態で維持される状況を包含するように、広範囲に解釈されなければならない。

50

【0151】

幾つかの実施形態において、育成方法または細胞組成物は、細胞培養物および／または特異的な増殖因子もしくは細胞外マトリクス（ECM）成分を含有する培地を含む条件で実施され得る。他の実施形態において、育成または調製方法は、無血清培地中で適用される細胞を有する細胞足場材料を維持することを含む条件で実施され得る。無血清培地中で細胞を培養する可能性は、血清含有培地および／または特異的な増殖因子もしくは細胞外マトリクス（ECM）成分を含有する培地の使用に代わる、費用効率が高く制御された方法を提供する。

【0152】

本明細書に記載される方法および細胞組成物の幾つかの実施形態において、細胞は、真核生物細胞である。本明細書に記載される方法および細胞組成物の幾つかの実施形態において、真核生物細胞は、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞である。別の実施形態において、真核生物細胞は、昆虫または酵母細胞などの非哺乳動物細胞である。

10

【0153】

本発明による方法によって育成もしくは調製され得る、または本発明による細胞組成物中に含まれ得る、哺乳動物細胞の非限定的例。幾つかの実施形態において上記細胞は、肝細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト、および内皮細胞である。幾つかの実施形態において、上記細胞は、幹細胞およびベータ細胞を含むランゲルハンス島由来の細胞である。幾つかの実施形態において、上記細胞は、神経前駆細胞、間葉前駆細胞、および造血前駆細胞からなる群から選択される前駆細胞である。幾つかの実施形態において、上記細胞は、造血、神経、間葉、哺乳動物、内皮、上皮および嗅覚の幹細胞からなる群から選択される、特に造血、神経および間葉幹細胞からなる群から選択される成人幹細胞である。

20

【0154】

幾つかの実施形態において、本発明の組成物は、組織接着剤として用いられる。本明細書で用いられる「組織接着剤（組織シーラントまたは組織グルーとも称される）」は、組織層、例えば少なくとも2つの組織層を、互いに連結させる、特に再連結させる。特に、組織接着剤は、組織層の間の閉合、特にフォームフィット、連結を提供でき、または組織層が互いから離れている場合には、組織接着剤は組織層の間の間隙を充填し、失った組織層を置換しおよび／または失った組織層を埋めることができる。

【0155】

本発明による方法により、または本発明による細胞組成物を用いて、育成もしくは調製され得る組織の非限定的例としては、結合組織、筋肉組織、神経組織、上皮組織、およびそれらの組み合わせ、例えば複数の（異なる）組織、または任意の臓器、例えば胃、小腸、大腸、腸、直腸、食道、肺、脾臓、脳、心臓、腎臓、肝臓、皮膚、リンパおよび甲状腺などの腺、眼、または膵臓が挙げられる。

30

【0156】

幾つかの実施形態において、組成物は、細胞結合モチーフをさらに含む。特定の条件での特定の細胞の育成に関連して、細胞結合モチーフの存在は、細胞生存率を改善または維持し得る。幾つかの実施形態において、細胞結合モチーフは、少なくとも1つのペプチド結合を介して本発明の繊維にカップリングされたオリゴペプチドである。例えばそれは、本発明の繊維内のタンパク質のN末端またはC末端に、または本明細書に記載されるタンパク質の混合物の残りのアミノ酸配列内の任意の位置で、カップリングされ得る。オリゴペプチド細胞結合モチーフの選択に関して、当業者は、複数の代替法を知っている。上記オリゴペプチドは、例えばRGD、RGE、IKVAV、YIGSR、EPDIMおよびNKDILからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み得る。RGD、IKVAVおよびYIGSRは一般的な細胞結合モチーフであるが、EPDIMおよびNKDILは、ケラチノサイトの育成に関連して特に有用であり得るケラチノサイト特異性モチーフとして公知である。繊維内のタンパク質へのオリゴペプチド細胞結合モチーフのカップリングは、標準的な遺伝子操作または化学的カップリング技術を用いて当業者により容易に完遂される。したがって幾つかの実施形態において、細胞結合モチーフは、遺伝子操作を介して導

40

50

入され、即ち「野生型」タンパク質をコードする核酸と細胞結合モチーフとの間の遺伝子融合の部分形成する。

【0157】

幾つかの実施形態において、本発明の繊維と接触する細胞は、多層形態である。多層細胞培養または3D細胞培養は、少なくとも2層の細胞を含み、例えば1層中の細胞の少なくとも10%が、別の層中の細胞の少なくとも10%と接触している。幾つかの実施形態において、多層細胞培養または3D細胞培養は、少なくとも3層の細胞を含む。

【0158】

幾つかの実施形態において、多層細胞培養または3D細胞培養内の1層中の細胞の少なくとも10%が、同じ多層細胞培養または3D細胞培養内の別の層中の細胞の少なくとも10%と接触している。幾つかの実施形態において、多層細胞培養または3D細胞培養内の1層中の細胞の少なくとも20%が、同じ多層細胞培養または3D細胞培養内の別の層中の細胞の少なくとも20%と接触している。幾つかの実施形態において、多層細胞培養または3D細胞培養内の1層中の細胞の少なくとも30%が、同じ多層細胞培養または3D細胞培養内の別の層中の細胞の少なくとも30%と接触している。幾つかの実施形態において、多層細胞培養または3D細胞培養内の1層中の細胞の少なくとも40%が、同じ多層細胞培養または3D細胞培養内の別の層中の細胞の少なくとも40%と接触している。幾つかの実施形態において、多層細胞培養または3D細胞培養内の1層中の細胞の少なくとも50%が、同じ多層細胞培養または3D細胞培養内の別の層中の細胞の少なくとも50%と接触している。幾つかの実施形態において、多層細胞培養または3D細胞培養内の1層中の細胞の少なくとも60%が、同じ多層細胞培養または3D細胞培養内の別の層中の細胞の少なくとも60%と接触している。別の実施形態において、語句「接触している」は、物理的接触にてである。別の実施形態において、語句「接触している」は、細胞間相互作用にてである。

【0159】

別の実施形態において、語句「3D培養（三次元培養）」は、1相よりも多い層で細胞を成長させながら、細胞の成長に適合する条件に細胞を配置する培養を指す。

【0160】

物品

さらなる態様において、本発明は、本発明による組換えタンパク質で構成された少なくとも1種の繊維を含む物品を提供する。

【0161】

用語「物品」または「製造品」は、実体があり、可動性で独立した物体である製造物を包含する。より具体的には、本明細書で用いられる用語「物品」は、本発明のアミノ酸配列、組換えタンパク質および繊維の少なくとも1つを含む、または組み込んでいるそのような製造物を指す。そのような物品の非限定的例としては、合成スパイダーシルクがコートされたステントおよび縫合糸、皮膚貼付剤、組織足場材料、布、チョッキ、防弾チョッキ、ロープ、糸、化粧品などが挙げられる。

【0162】

そのような物品の例は、手術用縫合糸に用いられる糸、または衣類の製織に用いられる糸であり、または物品は様々な組織エンジニアリング態様に用いられる足場であり得る。

【0163】

本発明による物品の他の例としては、医療接着片、皮膚移植片、靱帯の代用材料、および手術用メッシュなどの医療装置；ならびに広範囲の工業および商業製品では、織布、防弾チョッキの裏地、布の容器、バッグもしくは財布のストラップ、ケーブル、ロープ、釣り糸、接着剤結合材料、非接着剤結合材料、ストラップ材料、自動車用カバーおよび部品、航空機構築材料、耐候性材料、可撓性仕切り材、運動器具など；そして実際には、高引張り強さおよび高弾性を所望の特徴とする繊維または布のほぼあらゆる使用が挙げられる。乾燥噴霧コーティング、ビーズ様粒子などの他の形態での安定な繊維製品の適応性および使用、または他の組成物との混合物中での使用もまた、本発明により企図される。

【0164】

本発明の組換えスパイダーシルクタンパク質は、セルロースおよびケラチンおよびコラーゲン製品に添加され得、そのため本発明は、セルロースおよび／またはケラチンおよび／またはコラーゲンと、本発明のスパイダーシルクタンパク質と、を含む紙製品またはスキンケアおよびヘアケア製品も対象とする。本発明のタンパク質が組み込まれる紙製品、ならびにスキンケアおよびヘアケア製品は、改善された特徴、特に改善された引張り強さまたは引裂き強さを示す。

【0165】

複合材料

本発明は、幾つかの実施形態において、(a) 合成ドラグラインスパイダーシルクの調製に有用な異なる分子量を有するタンパク質の混合物と、(b) ポリマーと、を含む複合材料を提供する。

10

【0166】

幾つかの実施形態において、用語「複合材料」は、異なる特徴を有する2つ以上の物質で構成されていて、各物質が所望の特性を全体に与えながらその同一性を保持している材料を指す。

【0167】

幾つかの実施形態において、用語「材料」は、固形材料を指す。幾つかの実施形態において、用語「材料」は、半固形材料（例えば、ゲル）を指す。

【0168】

幾つかの実施形態において、開示される複合材料は、優れた機械的性質を示す。

20

【0169】

幾つかの実施形態において、タンパク質の混合物を含む繊維が提供される。

【0170】

幾つかの実施形態において、複数の繊維が、リンカーを介して互いに付着される。

【0171】

幾つかの実施形態において、本明細書全体で用いられる用語「ポリマー」は、互いに共有結合されポリマーのポリマー骨格を形成する複数の反復構造単位（互換的に骨格単位またはモノマー単位と称される）で構成される物質、例えば有機物質、あるいは無機物質を説明する。本明細書で用いられる用語「ポリマー」は、有機および無機ポリマーを包含し、ホモポリマー、コポリマーまたはそれらの混合物（例えば、ブレンド）の1つまたは複数を含み、さらに包含する。本明細書で用いられる用語「ホモポリマー」は、1つのタイプのモノマー単位で仕上げられており、したがって同種の骨格単位で構成されるポリマーを説明する。本明細書で用いられる用語「コポリマー」は、1つより多いタイプのモノマー単位で仕上げられており、したがって異種の骨格単位で構成されるポリマーを説明する。異種の骨格単位は、その側鎖基によって互いに異なり得る。

30

【0172】

簡潔にするために、本明細書全体で互換的に用いられる用語「ポリマー」および「ポリマー骨格」は、ホモポリマー、コポリマーの両方およびそれらの混合物に関する。

【0173】

幾つかの実施形態において、ポリマーは、疎水性である。幾つかの実施形態において、ポリマーは、UV硬化されている。

40

【0174】

幾つかの実施形態において、開示される複合材料は、生物学的に安定である。幾つかの実施形態において、開示される複合材料は、生物学的に切断可能 (biocleavable) である。

【0175】

幾つかの実施形態において、用語「生物学的に安定な」は、生理学的条件下で無傷のままである（例えば、インピボで分解されない、つまり非生体分解性または非生物学的切断性である）化合物またはポリマーを説明する。

50

【0176】

幾つかの実施形態において、用語「生体分解性の」は、生理学的条件および／または環境条件（複数可）下で破壊産物へと分解し得る物質を説明する。そのような生理学的条件および／または環境条件としては、例えば、加水分解（加水分解切断を介した分解）、酵素的触媒（酵素的分解）、および機械的相互作用が挙げられる。この用語は、典型的には物質の50重量%が1年未満の期間内に分解するような、これらの条件下で分解する物質を指す。

【0177】

幾つかの実施形態において、本発明の実施形態に関連して用いられる用語「生体分解性の」は、生理学的条件下で破壊産物に分解し、それが宿主生物体中への生体吸収を受ける、即ち宿主生物体の生化学系の代謝産物になる物質を説明する用語「生体吸収性」も包含する。

10

【0178】

幾つかの実施形態において、ポリマーは、合成ポリマーである、またはそれを含む。幾つかの実施形態において、ポリマーは、天然ポリマーである、またはそれを含む。天然ポリマーは、非限定的に植物、動物および鉱物供給源などの天然供給源で作られるポリマー、または綿、リネン、ジュート、亜麻、ラミー、サイザル麻およびヘンプ、毛、および羊毛などの天然繊維から製織され得るポリマーを指し得る。

【0179】

さらなる模範的な天然ポリマーは、ポリラクチド、コラーゲンケラチン、セルロース、アクチン、ミオシン、キチン、家蚕絹を含む。

20

【0180】

幾つかの実施形態において、ポリマーは、熱可塑性ポリマーである。幾つかの実施形態において、ポリマーは、熱硬化性である。幾つかの実施形態において、ポリマーは、エポキシである。幾つかの実施形態において、ポリマーは、ポリエステル（例えば、脂肪族ポリエステル）である。幾つかの実施形態において、ポリマーは、ポリアミド、ポリウレタン、およびナイロンからなる群から選択される。幾つかの実施形態において、ポリマーは、架橋性ポリマーである。幾つかの実施形態において、ポリマーは、コポリマーである。幾つかの実施形態において、ポリマーは、ヒドロゲルの形態である。

【0181】

幾つかの実施形態において、ポリマー材料は、2種以上の成分の材料（例えば、コポリマー）である。以下の実施例の節で実証される通り、成分（部分とも称される）Aは、主な（基本の）ポリマーであり得、部分Bは、例えば硬化剤または触媒であり得る。

30

【0182】

硬化剤化学薬品の群は、ポリマーの基剤により異なるが、アミン、イソシアナート、ペルオキシドなどを含む。

【0183】

コポリマーは、ラジカル重合工程（例えば、アゾビスイソブチロニトリル（AIBNと略される）を用いる）、逐次重合および連鎖重合から選択されるメカニズムにより生成され得る。

40

【0184】

本明細書で用いられる用語「エポキシ」は、 $-C_2H_3O$ の分子式を有する、1つの酸素および2つのメチレン基を含む3員複素環分子である反応基を指す。

【0185】

生成方法

幾つかの実施形態において、本発明のタンパク質混合物を生成する方法が提供される。具体的な実施形態において、本発明の方法は、

a. 上記アミノ酸配列をコードする核酸配列を含む発現ベクターを用意するステップであって、上記核酸が、動作可能に連結されたプロモーターと、場合により調節配列と、の発現制御下にある、用意するステップと；

50

- b. 宿主細胞を (a) の発現ベクターで形質転換するステップと；
 - c. (b) の宿主細胞による異種タンパク質の発現のための条件を提供するステップと；
 - d. 発現されたタンパク質を単離し、それにより本発明の合成アミノ酸配列を得るステップと、
- を含む。

【0186】

本発明は概ね、ニワオニグモのドラグラインシルクに由来する合成スパイダーシルクタンパク質またはその任意の断片もしくは部分に関するが、多くの他のクモ種を用いて、類似の手法で合成スパイダーシルクを得られることが、理解されよう。より好ましくはドラグラインタンパク質は、以下のクモの1つまたは複数に由来する：アラチヌラ・ヒギンシ (Arachnura higginsii)、アラネウス・サークルスパルス (Araneus circuli sparsus)、ニワオニグモ、アルギオーブ・ピクタ (Argiope picta)、シマニワオニグモ (アルギオーブ・トリファシアタ (Argiope trifasciata))、マダラジョロウグモ (Batik Golden Web Spider) (ネフィラ・アンチポディアナ (Nephila antipodiana))、ベッカリズテントスパイダー (Beccari's Tent Spider) (シルトホラ・ベッカリ (Cyrtophora beccarii))、トリノフンダマシ (Bird-dropping Spider) (セラエニア・エクスカバタ (Celaenia excavata))、トゲグモ (Black-and-White Spiny Spider) (ガステラカンタ・クフリイ (Gasteracantha kuhlii))、キマダラコガネグモ (Black-and-yellow Garden Spider) (アルギオーブ・アウランチア (Argiope aurantia))、ナゲナワグモ (オルダリウス・フルカツス (Ordgarius furcatus))、イセキグモ (Bolas Spiders Magnificent Spider) (オルガリウス・マグニフィカス (Ordgarius magnificus))、イエオニグモ (Brown Sailor Spider) (ネオスコナ・ナウチカ (Neosconanautica))、チャアシグモ (Brown-Legged Spider) (ネオスコナ・ルホフェモラタ (Neoscona rufofemorata))、キャップドブラックヘッディドスパイダー (Capped Black-Headed Spider) (ジギエラ・カリプトラタ (Zygiella calyptrata))、ミツカドオニグモ (パラウィキア・デハアニ (Parawixia dehaani))、キタドヨウグモ (ネオスコナ・オキサンセンシス (Neoscona oxancensis))、クラブライクスパイニーオーブウェーバー (Crab-like Spiny Orb Weaver) (ガステラカンタ・カンクリホルミス (エリプソイデス) (Gasteracanthacancriformis (elipsoides)))、オオナガトゲグモ (ガステラカンタ・アルクアタ (Gasteracantha arcuata))、シルトホラ・モルセンシス (Cyrtophora moluccensis)、シルトホラ・パルナシア (Cyrtophora parnasia)、ドロホンス・コニフェラ (Dolophonesconifera)、ドロホンス・ツリゲラ (Dolophones turrigera)、ドリアズスパイニースパイダー (Doria's Spiny Spider) (ガステラカンタ・ドリアエ (Gasteracanthadoriae))、チブサトゲグモ (Double-Spotted Spiny Spider) (ガステラカンタ・マモサ (Gasteracantha mamosa))、キヌアミグモ (Double-Tailed Tent Spider) (シルトホラ・エキサンテマチカ (Cyrtophora exanthematica))、アクレペリア・セロベギア (Aculeperia ceropegia)、エリオホラ・プスツロサ (Eriophora pustulosa)、フラットアネプシオン (Flat Anepsion) (アネプシオン・デプレシウム (Anepsion depressum))、フォースパインドジュエルスパイダー (Four-spined Jewel Spider) (ガステラカンタ・クアドリスピノーサ (Gastera

10

20

30

40

50

cantha quadrispinosa))、ガーデンオーブウェブスパイダー (Garden OrbWeb Spider) (エリオホラ・トランスマリナ (Eriophora transmarina))、ジャイアントライケンオーブウェーバー (Giant Lichen Orbweaver) (アラネウス・ビセンテナリウス (Araneus bicentenarius))、ジョロウグモ (ネフィラ・マクラタ (Nephila maculata))、ハッセルツスパイニースパイダー (Hasselt's Spiny Spider) (ガステラカンタ・ハッセルティ (Gasteracantha hasseltii))、テゲナリア・アトリカ (Tegenaria atrica)、ヘウロデス・ツリタ (Heurodes turrिता)、アイランドサイクローサスパイダー (Island Cyclosa Spider) (サイクローサ・インスラナ (Cyclosa insulana))、ジュエルスパイダーまたはスパイニースパイダー (アストラカンタ・マイナックス (Astracantha minax))、キドニーガーデンスパイダー (Kidney Garden Spider) (アラネウス・ミチフィカス (Araneus mitificus))、ラグライズガーデンスパイダー (Laglaise's Garden Spider) (エリオビキシア・ラグライセイ (Eriovixia laglaisei))、ロングベリッドサイクローサスパイダー (Long-Bellied Cyclosa Spider) (サイクローサ・ビフィダ (Cyclosa bifida))、マラバルジョロウグモモドキ (ネフィレンギス・マラバレンシス (Nephilengysmalabarensis))、マルチカラードセントアンドリュースクロススパイダー (Multi-Coloured St. Andrew's Cross Spider) (アルギオーブ・ベルシカラー (Argiope versicolor))、ケハイグモ (Ornamental Tree-Trunk Spider) (ヘレンニア・オルナチシマ (Herennia ornatisima))、ナガマルコガネグモ (Oval St. Andrew's Cross Spider) (アルギオーブ・アエムラ (Argiope aemula))、ハラビロスズミグモ (Red Tent Spider) (シルトホラ・ユニカラー (Cyrtophora unicolor))、ロシアンテントスパイダー (Russian Tent Spider) (シルトホラ・ヒルタ (Cyrtophora hirta))、カラフトオニグモ (Saint Andrew's Cross Spider) (アルギオーブ・ケイセルリング (Argiope keyserlingi))、ハツリグモ (Scarlet Acusilas) (アクシラス・コシネウス (Acusilas coccineus))、ギンコガネグモ (Silver Argiope) (アルギオーブ・アルゲンタタ (Argiope argentata))、スパイニーバックドオーブウェーバー (Spinybacked Orbweaver) (ガステラカンタ・カンクリホルミス (Gasteracantha cancriformis))、スポッテドオーブウェーバー (Spotted Orbweaver) (ネオスコナ・ドミシリオルム (Neosconadomiciliorum))、セントアンドリュースクロス (St. Andrews Cross) (アルギオーブ・アエテリア (Argiope aetheria))、カラフトオニグモ (アルギオーブ・ケイセルリング)、ゲホウグモ (Tree-Stump Spider) (ポルチス・イレピツス (Poltyis illepidus))、サンカクグモ (Triangular Spider) (アルキス・クラバツス (Arkys clavatus))、サンカクグモ (アルキス・ランセアリウス (Arkys lancearius))、フタトゲグモ (Two-spined Spider) (ポエシロパキス・アウストララシア (Poecilopachys australasia))、ジョロウグモ種、例えばアメリカジョロウグモ、アフリカジョロウグモ (Nephila senegalensis) およびマダガスカルジョロウグモ (Nephila madagascariensis) など。

【0187】

さらに、合成スパイダーシルクは、由来する異なるクモ種の選択によってのみならず、タンパク質以外の様々な化合物の使用によっても強化され得る。ピロリドンは、吸湿性を有

10

20

30

40

50

し、糸の水分保持を支援する。それは、グルースレッド (glue threads) 中で特に高い濃度で存在する。リン酸水素カリウムは、水溶液中に陽イオンを放出し、pH を約 4 にしてシルクを酸性にし、これにより、さもなければタンパク質を消化する真菌および細菌からシルクを防御する。硝酸カリウムは、酸性環境でタンパク質が変性するのを防ぐと考えられている。

【0188】

本明細書で用いられる用語「約」は、±10%を指す。

【0189】

「模範的」という語は、「例、事例または例示として働くこと」を意味するために本明細書で用いられる。「模範的」と記載される任意の実施形態は、他の実施形態よりも好ましいもしくはは有利であると必ずしも解釈されず、および／または他の実施形態からの特色の取り込みを必ずしも除外しない。「場合により」という語は、「幾つかの実施形態において提供され、他の実施形態では提供されない」ことを意味するために本明細書で用いられる。本発明の任意の特別な実施形態は、そのような特色が矛盾しない限り、複数の「場合による」特色を含み得る。

【0190】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる単数形の「a」、「and」および「the」は、他に明確に示されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「MaSp」への言及は、複数のそのような遺伝子および変異体を含み、「ペプチド」への言及は、当業者に公知の1種または複数のペプチドへの言及を含むなどである。

【0191】

同じく「または」の使用は、他に断りがなければ、「および／または」を意味する。同様に「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、「含んでいる (comprising)」、「包含する (include)」、「包含する (includes)」および「包含している (including)」は、互換的であり、限定的であるとは意図されない。様々な実施形態の記載が用語「含んでいる」を使用する場合、幾つかの具体的事例において、実施形態は言語「から本質的になる」または「からなる」を用いて代わりに記載され得ると当業者が理解するであろうことが、さらに理解されなければならない。

【0192】

この出願全体を通して、本発明の様々な実施形態が、範囲形式で表され得る。範囲形式の記載は単に簡便さおよび明瞭さのためのもので、本発明の範囲の柔軟性のない限定であると解釈すべきでないことが、理解されなければならない。したがって、範囲の記載は、具体的に開示される全ての可能な部分範囲ならびに、その範囲内の個々の数値を有すると見なされなければならない。例えば、1～6などの範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの具体的に開示される部分範囲ならびに、その範囲内の個々の数値、例えば1、2、3、4、5、および6を有すると見なされなければならない。これは、範囲の幅にかかわらず適用される。

【0193】

「A、B、およびCなどの少なくとも1つ」と類似の慣例が用いられるそれらの事例において、一般にそのような構成は、当業者がその慣例を理解するであろう意味で意図される（例えば、「A、B、およびCの少なくとも1つを有するシステム」は、Aのみ、Bのみ、Cのみ、AとBと一緒に、AとCと一緒に、BとCと一緒に、および／またはAとBとCと一緒に、などを有するシステムを含むが、それに限定されない）。「A、B、またはCなどの少なくとも1つ」と類似の慣例が用いられるそれらの事例において、一般にそのような構成は、当業者がその慣例を理解するであろう意味で意図される（例えば、「A、B、またはCの少なくとも1つを有するシステム」は、Aのみ、Bのみ、Cのみ、AとBと一緒に、AとCと一緒に、BとCと一緒に、および／またはAとBとCと一緒に、などを有するシステムを含むが、それに限定されない）。本明細書、特許請求の範囲、または図面のいずれにしろ、2つ以上の代わりの用語を表す事実上あらゆる分離した語および／

10

20

30

40

50

または語句が、それらの用語の1つ、それらの用語のいずれか、または両方の用語を含む可能性を企図すると理解されなければならないことは、当業者にさらに理解されよう。例えば、語句「AまたはB」は、「A」または「B」または「AとB」の可能性を含むと理解されよう。

【0194】

他に定義されない限り、本明細書で用いられる技術的および科学的用語は全て、本開示が属する技術分野の当業者に一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同一の方法および材料が、開示される方法および組成物の実践において用いられ得るが、その模範的方法、装置および材料が、本明細書に開示される。

【0195】

実施例

材料と方法

プラスミド：Geneart（ドイツ、レゲンスブルグ）から得られたPCR-Script AmpSK（+）プラスミド中のDNA配列。Invitrogenから得られたpFastBachTa。

【0196】

制限酵素：（New England Biolabs、米国マサチューセッツ州所在）から得られたPstI、HindIII、NsiI。

【0197】

トランスフェクションおよび形質転換：バクミドおよびヘルパープラスミドを含有するコンピーテント大腸菌DH10BAC細胞は、Invitrogenから得た。ESCOR Tトランスフェクション試薬は、Sigma-Aldrichから得た。

【0198】

培地：Expression Systemsから得られたタンパク質不含ESF 921昆虫細胞培地。

【0199】

細胞：懸濁液中で成長させたSF9ースポドプテラ・フルギベルダ昆虫細胞(ATCC#: CRL-1711)。

【0200】

抗体：Rocheから得られたマウス抗His6モノクローナル抗体。Jackson Laboratoriesから得られたテキサスレッドコンジュゲート化抗マウス二次IgG。

【0201】

染色剤：NanoVan（Nanoprobes、米国ニューヨーク州所在）。

【0202】

画像：Olympus BX51蛍光顕微鏡。MagnaFire SPカメラは、Optronicsから得た。

【0203】

実験手順

ドラグラインシルクタンパク質のシングルリピート単位をコードする配列の合成：AD F-4（Genbank登録番号U47856）の反復領域を構成する15リピートの平均コンセンサス配列を表す35アミノ酸長配列を設計した。平均コンセンサス配列のペプチド配列は、105のDNA塩基対配列：5'-TCTGGTCTTGGAGGTTATGGCCAGGAAGCCAAGGACCATCTGGTCCAGGAGGATATGGTCCAGGCGGACCTGGCTCTAGTGCAGCAGCTGCCGCGAGCAGCTGCA-3'（SEQ ID NO:15）によってコードされるSGPGGYGPGSQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAAA（SEQ ID NO:14）である。上記の合成DNAは、PCR-Script AmpSK（+）プラスミドで得られた。この配列をスポドプテラ・フルギベルダのコドン使用に従って発現のために最適化し、その細胞をスパイダーシルクおよび繊維の合成に用いた。

10

20

30

40

50

【0204】

特定の実施形態において、種々のアミノ酸配列を有する3つの構築物を実施し、それぞれは、以下の特有のアミノ酸配列を有する：

C1 (SEQ ID NO: 35 および 36) : S G P G G Y G P G S Q G P S G P G G Y G P G G P G S S A G A G A G A X a a A (X a a は A l a または G l y のいずれかを表す)

C2 (SEQ ID NO: 38 および 40) : X a a G S G P G G Y G P G G Q G P G G Y G P G G Q G P Y G P G A A A A A A A (X a a は S e r または G l y のいずれかを表す)

C3 (SEQ ID NO: 42 および 44) : X a a G P G Q G G Y G G P G G Q G P G R G G Y G P G A G S A A A A A A A A A (X a a は S e r または G l y のいずれかを表す)。

この3つ (C1 ~ C3) の構築物のシングルリピートをコードするポリヌクレオチド配列を、それぞれ SEQ ID NO: 45 ~ 47 として示す。

【0205】

ドナープラスミドの構築：S c r i p t A m p S K (+) プラスミドを X b a I および X h o I で切断し、N s i I および P s t I 制限部位が隣接する基本のリピート配列を含む 136 b p の配列を単離して、バキュロウイルス系ドナープラスミド p F a s t B a c H T a のマルチクローニングサイト (MCS) 中にクローニングした。したがって、人工49アミノ酸N末端ドメインおよび35アミノ酸コアドメインをコードする基本のドナープラスミドを作製した。

【0206】

シングルリピートの多重体化：スパイダーシルクタンパク質の1リピート (モノマー) をコードする基本モジュールに、適合性のある制限酵素部位 N s i I および P s t I を隣接させる。最初のステップでは、モノマーを二重制限により放出させて、P s t I で切断した同じドナープラスミド中にインフレームで挿入する。挿入部が、正しいセンス方向でライゲートされる場合にのみ、ダブルカット (d o u b l e c u t) がダイマーを放出する (2つのリピートの間の制限部位をライゲーションにより消した)。第二のステップにおいて、ダイマーを放出し、その後、同じ方式で再挿入して、4つのリピートを有するベクターを得た。後のステップにおいて、この手順を繰り返し、複数の合成リピートを含むドナープラスミドを得た。用いた分子生物学的ツールおよび配列の反復性から生じた制約が、同一リピートの最大実現可能数を限定する。

【0207】

合成リピートの下流のネイティブC末端ドメインのライゲーション：A D F 114アミノ酸のC末端ドメインの挿入は、以下のプライマーでのPCRを利用して行った：P s t I 制限部位 (下線) を含む配列 5' - A T A T C T G C A G G C C C T A G T G G T C C T G G A - 3' (SEQ ID NO: 16) を有するセンスプライマー、および 3' H i n d I I I 制限部位 (下線) をコードする配列 5' - T C G A A A G C T T T G G T A C C G C A - 3' (SEQ ID NO: 17) を有するアンチセンスプライマー。異なる数のリピートを有するドナープラスミドベクターおよびPCR産物を、P s t I および H i n d I I I で切り出して、精製およびライゲートし、人工N末端ドメインの一部である H i s 6 タグと、それに続く様々な数の同一リピート (本発明者らは、核酸配列の1、2、4、8、12、16、20、24、32リピートを含む構築物を得た) およびネイティブC末端ドメインをコードする p F a s t B a c H T a ドナープラスミドを得た。

【0208】

細胞培養：S f 9細胞をE S F 921無血清昆虫細胞培地中にて、27℃で増殖させた。S f 9細胞を、6ウェルプレート中のカバースリップ上の単層として、または130 r p mで攪拌しながら振とうフラスコ中で、成長させた。

【0209】

組換えバキュロウイルスの生成：バクミド (バキュロウイルスシャトルベクタープラスミ

10

20

30

40

50

ド) およびヘルパープラスミドを含有するコンピテント大腸菌DH10BAC細胞を用いて、製造業者のプロトコル (Invitrogen) に従って組換えバクミドを作製した。バクミド中への遺伝子の挿入を、PCRによって検証した。6ウェルプレート中でESCORTトランスフェクション試薬を用いて、Sf9細胞を組換えバクミドDNAでトランスフェクトした。細胞を27℃で5時間インキュベートし、すすいで、さらに72時間インキュベートした。培地を回収し、遠心分離して、ウイルスを含む上清を2～3回の逐次感染に用いて、ウイルス粒子の力価を増幅させた。

【0210】

合成ADF-4を基にしたタンパク質の発現：Sf9細胞 (3×10^6 細胞/mL) を、0.1～10の範囲の様々なMOI (感染多重度) で組換えウイルスに感染させた。感染の4日後に、細胞を16000gで10分間の遠心分離により回収した。

10

【0211】

合成繊維の精製：感染細胞を感染の4日後に回収して、16000gで10分間遠心分離した。細胞ペレットを0.25% SDS溶液中に再懸濁させて、室温で30分間インキュベートし、タンパク質の集合体を先の通り沈降させた。精製された繊維の典型的収量は、Sf9昆虫細胞培養物1Lあたり約150mgであった。精製された繊維を、所望の溶液および容量で再懸濁させた。

【0212】

示差走査熱量測定 (DSC) 測定：熱分析を、不活性窒素雰囲気下にて、Mettler DSC 822eサーモアナライザーおよびアルミニウム試料パンを用いて3～6mgのフィブロイン試料で実施した。サーモグラムは、5℃/分の加熱速度で10℃～400℃の範囲であった。

20

【0213】

免疫細胞化学測定：カバースリップ上で50%コンフルエントに成長させた細胞を、MOI=10で組換えウイルスに感染させた。感染の3日後に、細胞を-20℃のメタノールで固定した。カバースリップを1:300希釈でマウス抗His6モノクローナル抗体と共に、その後、1:500希釈でテキサスレッドコンジュゲート化抗マウス二次IgGと共にインキュベートした。細胞をOlympus BX51蛍光顕微鏡で観察して、画像をMagnaFire SPカメラで撮影するか、または共焦点顕微鏡測定により分析した。

30

【0214】

走査電子顕微鏡 (TEM)：超微細構造解析では、精製された細糸をそのままの状態で300メッシュの銅製ホーリーカーボングリッドに吸着させるか、またはバナジウム (NanoVan1、Nanoprobes) で陰性染色し、120kVで操作されるTechnai T12顕微鏡で観察および撮像した。

【0215】

実施例1

マイクロ繊維を構成するナノ繊維の特徴づけ

1. 8ナノメートルの直径を有する金粒子 (Ni-NTA-Nanoprobes) を、本発明のモノマーそれぞれのN末端His6タグに結合させた。免疫TEMの観察により、モノマーが最初に頭-尾結合方式で互いに相互作用し、このように最初のステージとしておよそ5ナノメートルの直径のナノフィブリルを作り出す、二段階組立工程が明らかとなった (図1A)。結論として、ナノフィブリルは、非配向方式で互いに相互作用し (図1B)、このようにおよそ150ナノメートルの直径を有する繊維を作り出す (図1C)。

40

【0216】

さらに、3つの独立した構築物 (C1、C2およびC3) を基にした様々な組織化繊維の表現型を、光学顕微鏡を用いて検査し、蛍光標識繊維を、共焦点顕微鏡を用いて検査した。図1D～Iに示される通り、構築物C1のモノマーは自己組織化して、発現細胞の細胞質の内側でコイル状繊維を作り出した。この繊維の直径は、100～200nmの範囲であり、長さは、10～150μmの範囲であった。構築物C2のモノマーは、自己組織化

50

して、100～200 nmの範囲の直径を有する繊維を作り出したが、それらの長さは10～50 μmの範囲である。構築物C3のモノマーは、様々な表現型：(i) 平均直径1 μmの球状凝集体；(ii) 平均直径500 nmの凝集体で覆われた繊維；(iii) 構築物C1およびC2と類似の平滑面を有する繊維、に自己組織化した。

【0217】

実施例2

特有のラダリング現象が本発明の繊維を特徴づける

非反復性N末端およびC末端ドメインが隣接した様々な数のリピート(0、1、2、3、4、5、8、12、16、20、24、32)を含むモノマーは、自己組織化して不溶性になる傾向がある。それゆえ、モノマーの分子量(MW)を決定するために、繊維を精製して、6 MグアニジンSCNで分解した。引き続き、グアニジン溶液を8 M尿素に対し透析し(10 KDaのMWカットオフのPierce透析カセットを用いて)、試料緩衝液を添加し、試料を変性10%アクリルアミドゲルで分析した。

【0218】

クーマシーブルー染色を、3種の異なる供給源からの分解された繊維で実施した：

(1) N末端ドメイン、24の同一リピート(2.7 kDa)、C末端ドメインで構成された遺伝子からのバンドのラダー；

(2) N末端ドメイン、16の同一リピート(2.7 kDa)、C末端ドメインで構成された遺伝子からのバンドのラダー；および

(3) N末端ドメイン、15の非同ポリリピート(アラネウス・ジアデマタスのネイティブ配列から採取)、C末端ドメインで構成された遺伝子からのバンドのラダー。

【0219】

観察される通り(図2A)、人工構築物の場合(1、2)、異なるバンドのモル比に関する一定の勾配があり、これはより軽いバージョンのバンドを優先するが、ネイティブ配列(3)のラダーではそうではない。例えば、ネイティブ配列から生じたラダーの38 KDaに相関するバンドは、周囲のバンド(上および下)よりもかなり濃い。

【0220】

この観察から、異なる反復ゾーンの供給源の重要性が強く示される。人工配列の場合リピートは同一であるが、ネイティブ配列の場合、リピートは、少なくともそれらの全体のサイズおよびポリアラニンストレッチの長さが異なる。さらに、記載された差は、ネイティブ反復配列から生じた繊維と、本明細書に開示された人工反復配列から生じた繊維との間に存在する異なる会合特性、異なる熱安定性および異なる機械的性質と相関する。

【0221】

SDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析

先に記載された通り、Sf9細胞を、バクミドDNAの構築物でトランスフェクトし、トランスフェクションの72時間後に回収した。

【0222】

細胞ペレットを、10%ゲルを用いるSDS-PAGEにより分離して、セミドライブロットティングによりニトロセルロースに移した。ブロッキングを、PBS×1中の粉乳、0.5% Tween 20と共に1時間実施した。膜をマウス抗His6モノクローナル抗体(1:2000)および二次抗体としてコンジュゲートされた抗マウスHRP(1:5000)と共にインキュベートした。ECLを用いて、HISタグ構築物を直接検出した。

【0223】

N末端His6タグに対する一次抗体を用いたウェスタンブロットは、観察されたバンドそれぞれにおけるN末端ドメインの存在を検証した(図2B)。全ての3つのタンパク質(C1、C2およびC3として示す)が、ラダリング現象を起こした。全ての3つのタンパク質の最も強いバンド(矢印で示す)は、構築物1、2および3から生じたタンパク質の計算されたM.W.に対応する(それぞれ61.41、62.84、および62.16 KDa)。

【0224】

10

20

30

40

50

ジスルフィド結合によりシステイン（本発明者らのタンパク質中にはただ1つのシステインが存在し、C末端ドメインに位置する）に特異的に結合するフルオロフォアを用いて、ラダーの観察されたバンドの全てで、C末端ドメインの存在を検証した（図2C）。

【0225】

ポリヘドリンプロモーターの下で完全長タンパク質をコードするバキュロウイルスで感染されたSF9細胞から抽出されたmRNAのノーザンブロットは、完全長タンパク質サイズに相関するサイズのmRNAを明らかにした。抽出されたmRNAを次にRT-PCRのテンプレートとして用い、cDNAを得て、それを今度はPCRのテンプレートにしてDNAバンドのラダーを得た。上記のラダーから単離されたDNAバンドの配列決定を、完全長タンパク質の全配列の最初のおよび最後の18塩基に相補的な配列を有するプライマーを用いて実施した。配列決定は、全N末端およびC末端ドメイン配列が隣接する様々な数のリピートの存在を明らかにした。

【0226】

RNAの二次構造とまとめた上の知見は、mRNAのリピートエリアがヘアピン構造を取り、リボソームがこのヘアピンの上を滑る、新規なタンパク質合成制御の驚くべき発見を導いた。このヘアピンの代わりのサイズの結果として、タンパク質のアレイが1つのmRNAにより合成される。これらのタンパク質は、それらが含むリピートの数でのみ互いに異なり、したがって1つの遺伝子に基づくフィブロインモノマーのアレイを雌グモが発現することを可能にする。

【0227】

実施例3

溶解された精製繊維は連続繊維へと電界紡糸され得る

SF9感染細胞から単離された合成繊維を、脱水した（摂氏55度（℃）の条件下で一晩）。ヘキサフルオロ-2-プロパノール（HFIP）を、ドーブの最終濃度が23%w/vになるように乾燥繊維に添加した。電界紡糸のプロトコルを以下の通り実施した：注入速度：0.5ml/時間、電圧：18キロボルト、ノズルの先端とコレクターとの間の距離：16センチメートル、湿度：40%、温度：28℃。

【0228】

上記プロトコルは、平均径100ナノメートルの連続繊維のメッシュをもたらした（図3A）。この繊維のDSC検査は、289℃での吸熱ピークを明らかにし、合成繊維と同様にポリアラニストレッチに基づくナノ結晶の存在を示した（図3B）。

【0229】

実施例4

精製された繊維の凍結乾燥および直線状特徴の決定

精製された繊維を、二段蒸留水（DDW）中に0.5%w/vで懸濁させて、液体窒素により凍結させた後（-200℃の温度で）、およそ24時間、凍結乾燥させた。上記手順から、乾燥繊維を含む白色粉末が得られた。この繊維のより深い検査は、それらは、それらの直径を保ちつつ直線化され、直線構造を取り（図4A）かつそれらの機械的性質を保持しながら、種々のマトリクスで容易に分散されたことを明らかにした。

【0230】

特に、ネイティブドラグラインの融点（230℃）と比較して、本明細書に開示された合成繊維の融点は、約235℃の高さであると測定された（図4B）。

【0231】

実施例5

本発明の繊維上での多層細胞成長

本発明の繊維（PBS中に1:25）を滅菌96ウェル組織培養プレートのウェルに添加した。インキュベーション（4℃）および洗浄ステップに続いて、HEK293細胞を各繊維コーティングウェル中に入れた後、インキュベーションステップに供した（37℃、5%CO₂で72時間）。

【0232】

図5 A～Cで認められる通り、HEK293細胞は、組織培養プレートよりむしろ本発明の繊維に好ましく接着することが見出された。さらに、本発明の繊維は、細胞好適性を層成長から3D成長へ改変した。

【0233】

実施例6

本発明の繊維の熱フィンガープリント

本発明の繊維の熱フィンガープリントを特徴づけるために、複数のテストを実施した。

【0234】

繊維を、テストごとに5～10mg量り取った。各テストを、液体窒素冷却タンクを具備したMettler-Toledo DSC 2システムにて、容量40μLの穿通されたアルミニウムパンで実施した。テストを、100℃に加熱しその温度を5分間維持する水除去工程の後で、5℃/分の加熱速度にて25～350℃で実施した。

【0235】

結果は、予測に反して、熱フィンガープリントが265±5℃で始まる320±5℃までの1つのピークを示し、約300℃にピークがあることを示す。

【0236】

追加のテストは、3つのピーク：

1. -120℃～160℃での発熱ピーク
2. 230～260℃での吸熱ピーク
3. 265±5℃から320±5℃までの分解ピーク

を有する熱フィンガープリントを示した。

【0237】

本発明を具体的実施形態と共に記載したが、多くの改変、修正および変更が当業者に自明になることは、明らかである。したがって本発明は、添付の特許請求の範囲の主旨および広い範囲に含まれるそのような全ての改変、修正および変更を包含するものとする。

【0238】

本明細書で言及された全ての発行物、特許および特許出願は、各発行物、特許または特許出願が具体的かつ個別に参照により本明細書に組み入れられることを示すかの如く、全体として参照により本出願に組み入れられる。加えて、本出願内の任意の参考資料の引用または同認は、そのような参考資料が本発明の先行技術として入手可能であることの承認と解釈されるべきではない。節の見出しが用いられるという点で、それらは必ずしも限定と解釈されるべきではない。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 A】

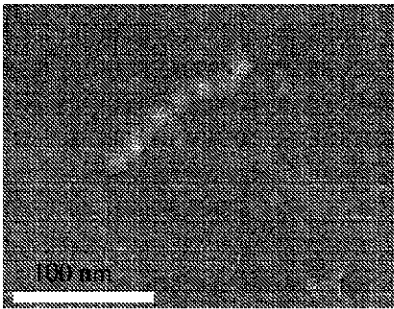


FIG. 1A

【図 1 B】

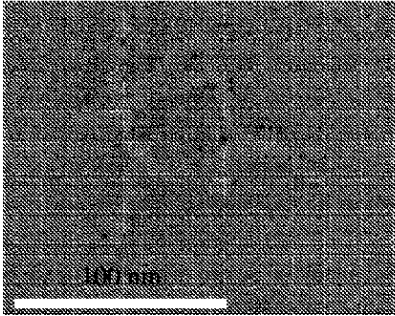


FIG. 1B

10

【図 1 C】

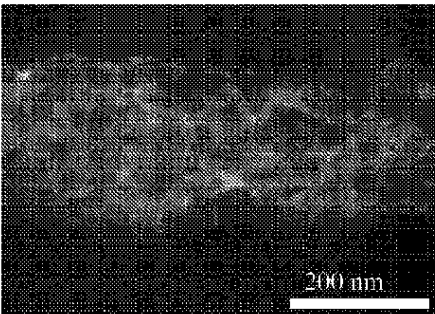


FIG. 1C

【図 1 D】

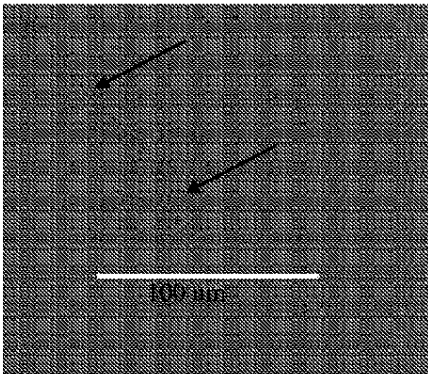


FIG. 1D

20

30

40

50

【図 1 E】

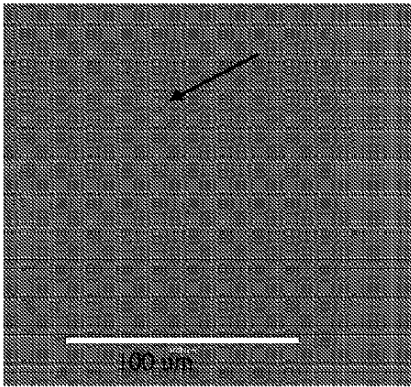


FIG. 1E

【図 1 F】

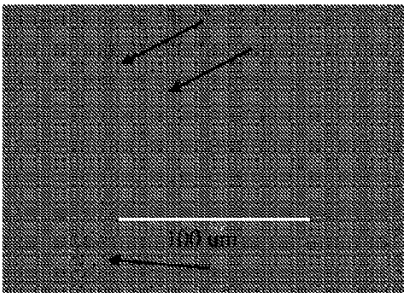


FIG. 1F

10

【図 1 G】

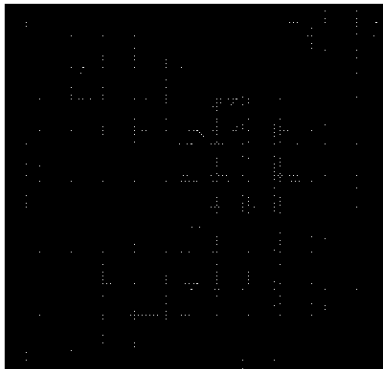


FIG. 1G

【図 1 H】



FIG. 1H

20

30

40

50

【図 1 I】

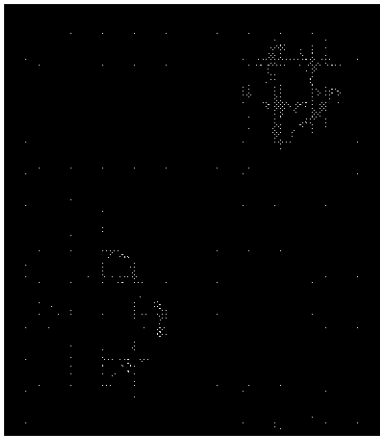
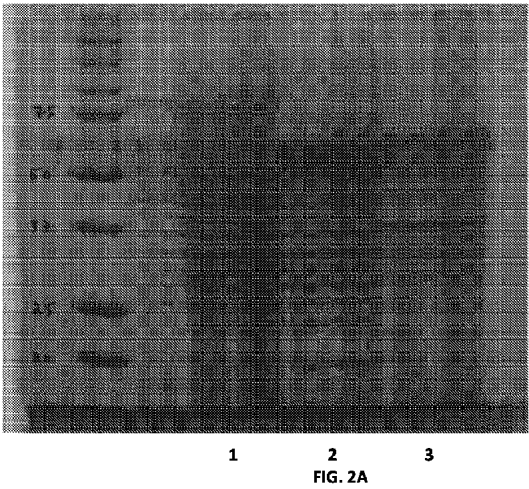


FIG. 1I

【図 2 A】



10

【図 2 B】

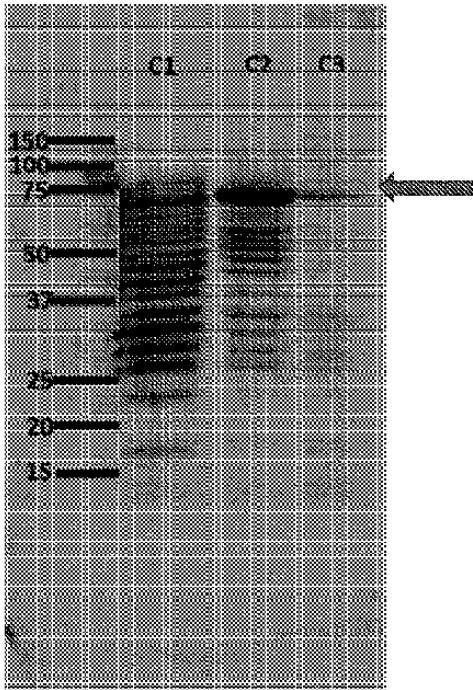


FIG. 2B

【図 2 C】

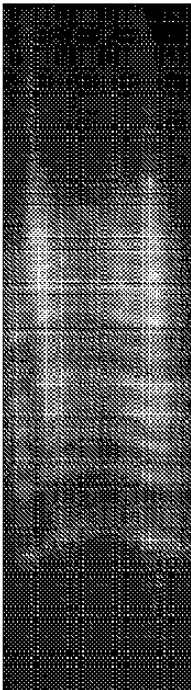


FIG. 2C

20

30

40

50

【図 3 A】

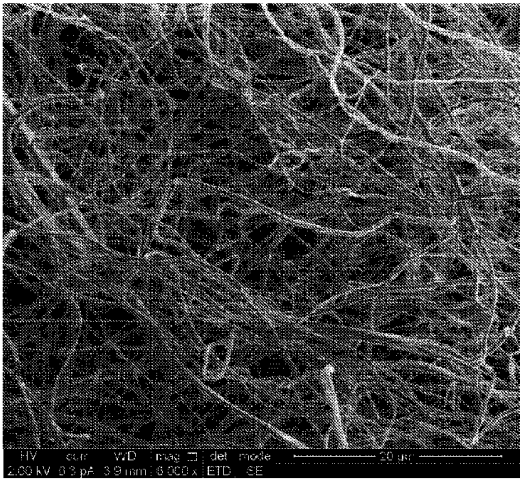
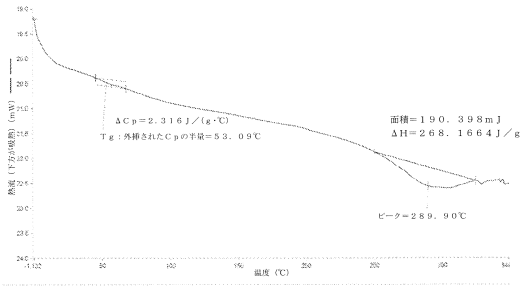


FIG. 3A

【図 3 B】



10

【図 4 A】

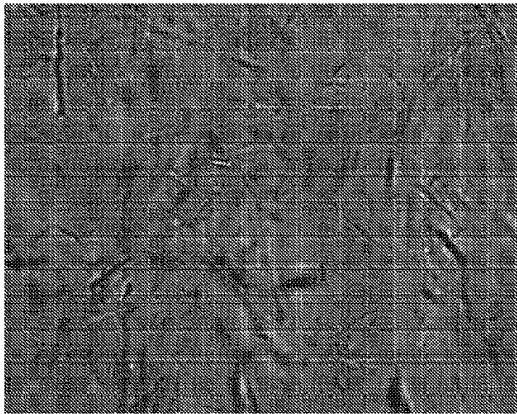
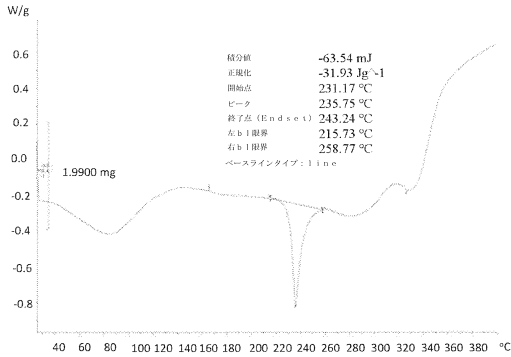


FIG. 4A

【図 4 B】



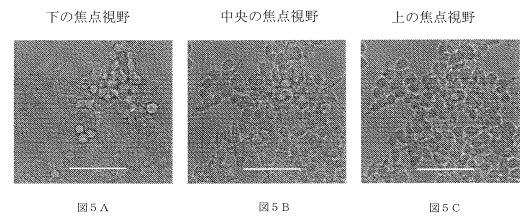
20

30

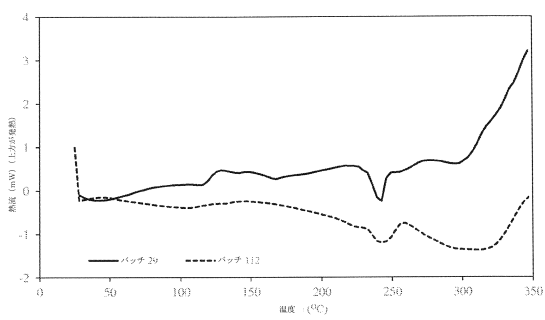
40

50

【図 5】



【図 6】



10

【配列表】

0007027312000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)**C 1 2 N** 5/10**C 0 7 K** 19/00 (2006.01)**C 0 7 K** 19/00**C 0 7 K** 14/435 (2006.01)**C 0 7 K** 14/435**D 0 1 F** 8/02 (2006.01)**D 0 1 F** 8/02

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/317,572

(32)優先日 平成28年4月3日(2016.4.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

(72)発明者 イッタ, シュムリク

イスラエル国, メバセレト ジオン 9 0 7 1 7 2 2 ハシャザブ ストリート 2 2

(72)発明者 シメル, メニ

イスラエル国, キリヤト オノ 5 5 6 5 4 1 8 シャウル ハメレシュ ストリート 1 0

(72)発明者 ガット, ウリ

イスラエル国, バイト ハケレム 9 6 2 6 2 ハガイ ストリート 1 0

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 特表2008-507260 (JP, A)

米国特許出願公開第2005/0054830 (US, A1)

米国特許出願公開第2012/0022005 (US, A1)

国際公開第2014/037453 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1/00-19/00**C 1 2 N 1 5**/00-15/90

Pubmed

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/EMBASE (STN)