

(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2015-515969  
(P2015-515969A)

(43) 公表日 平成27年6月4日(2015.6.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00 ZNA	4B024
<b>C07K 14/435 (2006.01)</b>	C07K 14/435	4B033
<b>C12P 21/02 (2006.01)</b>	C12P 21/02 C	4B064
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B065
<b>C12N 11/02 (2006.01)</b>	C12N 11/02	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-509441 (P2015-509441)  
 (86) (22) 出願日 平成25年5月2日 (2013.5.2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年12月19日 (2014.12.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/059146  
 (87) 国際公開番号 W02013/164405  
 (87) 国際公開日 平成25年11月7日 (2013.11.7)  
 (31) 優先権主張番号 12166393.4  
 (32) 優先日 平成24年5月2日 (2012.5.2)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 511250345  
 スパイバー テクノロジーズ アーバー  
 SPIBER TECHNOLOGIES  
 AB  
 スウェーデン国 ウプスラ エスー751  
 23, フーサガタン 3, ボック  
 ス 575  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教  
 (72) 発明者 ヘドハンマル, ミュー  
 スウェーデン国 ストックホルム エスー  
 113 51, オーデンガタン 40

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有機ターゲットに結合するための反復断片を持たないクモ糸融合タンパク質の構造

(57) 【要約】

B及びC Tの部分を含む組換え融合タンパク質が提供される。Bは有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を提供する非スピドロイン部分である。C Tは70から120アミノ酸残基からなる部分で、クモ糸タンパク質のC末端断片に由来する。融合タンパク質は、クモ糸タンパク質の反復断片に由来する任意の部分を含んでいない。

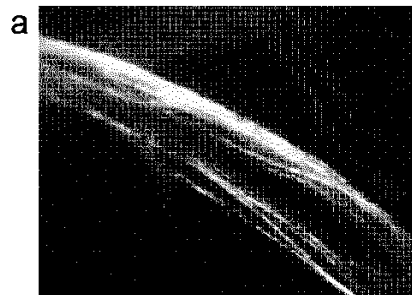


Fig 3

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

B 及び C T の部分を含む組換え融合タンパク質であって、融合タンパク質は、クモ系タンパク質の反復断片に由来する任意の部分を含んでいないという条件で、

B は有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を提供する非スピドロイン部分であり；及び

C T は 70 から 120 アミノ酸残基からなる部分で、クモ系タンパク質の C 末端断片に由来する、組換え融合タンパク質。

## 【請求項 2】

C T 部分が、配列番号 9 に少なくとも 50 % 同一性、又は配列番号 7 に少なくとも 80 % 同一性を有する、請求項 1 に記載の組換え融合タンパク質。

## 【請求項 3】

B 部分が、配列番号 6 から 10 の何れかに 30 % 未満の同一性を有する、請求項 1 又は 2 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質。

## 【請求項 4】

有機ターゲットが、免疫グロブリン及び免疫グロブリン又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質。

## 【請求項 5】

免疫グロブリンがヒト由来の免疫グロブリンのサブクラスの I g G 1、I g G 2、I g G 4、I g A 及び I G M から選択される、請求項 4 に記載の組換え融合タンパク質。

## 【請求項 6】

B 部分が、ブドウ球菌プロテイン A に由来する Z ドメイン、及びその E、D、A、B 及び C ドメイン、連鎖球菌プロテイン G、及びその C 1、C 2 及び C 3 ドメイン；及びこれらのアミノ酸配列の何れかに少なくとも 70 % 同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される、請求項 4 又は 5 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質。

## 【請求項 7】

B 部分が、ブドウ球菌プロテイン A に由来する Z ドメイン、ブドウ球菌プロテイン A の B ドメイン、及び連鎖球菌プロテイン G の C 2 ドメイン；及びこれらのアミノ酸配列の何れかに少なくとも 70 % 同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される、請求項 6 に記載の組換え融合タンパク質。

## 【請求項 8】

B 部分が、ブドウ球菌プロテイン A に由来する Z ドメイン、及び連鎖球菌プロテイン G の C 2 ドメインからなる群から選択される、請求項 7 に記載の組換え融合タンパク質。

## 【請求項 9】

有機ターゲットが、アルブミン及びアルブミン又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質。

## 【請求項 10】

B 部分が、連鎖球菌プロテイン G、連鎖球菌プロテイン G のアルブミン結合ドメイン、*Fingoldia magna* 由来の G A モジュール；及びこれらのアミノ酸配列の何れかに対して少なくとも 70 % 同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される、請求項 9 に記載の組換え融合タンパク質。

## 【請求項 11】

B 部分が、連鎖球菌プロテイン G のアルブミン結合ドメイン、及びこれに対して少なくとも 70 % 同一性を有するタンパク質断片を含む、請求項 9 又は 10 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質。

## 【請求項 12】

B 部分が、連鎖球菌プロテイン G のアルブミン結合ドメインである、請求項 11 に記載の組換え融合タンパク質。

## 【請求項 13】

10

20

30

40

50

有機ターゲットが、ビオチン及びビオチン又はその誘導体若しくは類似体を含む分子からなる群から選択される、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 14】

B 部分が、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン (M4) ; 及びこれらのアミノ酸配列の何れかに対して少なくとも 70% 同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される、請求項 13 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 15】

B 部分が、単量体ストレプトアビジン (M4) である、請求項 14 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 16】

式  $B_x - CT - B_z$  により定義され、 $x$  及び  $z$  は 0 から 5 の整数であり、及び  $x + z = 1$  である、タンパク質の群から選択される、請求項 1 から 15 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 17】

式  $B_x - CT$  及び  $CT - B_z$  により定義され、 $x$  及び  $z$  は 1 から 5 の整数である、タンパク質の群から選択される、請求項 16 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 18】

式  $B - CT$  及び  $CT - B$  により定義されるタンパク質の群から選択される、請求項 17 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 19】

配列番号 61 - 66 ; 及びこれらのタンパク質の何れかに対して少なくとも 80% 同一性を有するタンパク質からなる群から選択される、請求項 1 から 18 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 20】

請求項 1 から 19 の何れか一項に記載の融合タンパク質をコードする単離された核酸。

【請求項 21】

請求項 19 に記載の融合タンパク質をコードする核酸からなる群から選択される、請求項 20 に記載の単離された核酸。

【請求項 22】

有機ターゲットと選択的相互作用が可能なタンパク質構造であって、前記タンパク質構造が、請求項 1 から 19 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質を反復構造単位として含有するポリマーであり、B 部分が有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を提供する、タンパク質構造。

【請求項 23】

前記タンパク質構造が少なくとも 2 次元で少なくとも  $0.1 \mu m$  の大きさを有する、請求項 22 に記載のタンパク質構造。

【請求項 24】

前記タンパク質構造が、繊維、薄膜、発泡体、網、メッシュ、球及びカプセルからなる群から選択される物理的形態である、請求項 22 から 23 の何れか一項に記載のタンパク質構造。

【請求項 25】

タンパク質構造が、組換え融合タンパク質を反復構造単位として含有するポリマーであり、B 部分が有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を提供することを特徴とする、有機ターゲットと選択的相互作用が可能な前記タンパク質構造の産生のための、請求項 1 から 19 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質の使用。

【請求項 26】

サンプルからの有機ターゲットの分離における、請求項 22 から 24 の何れか一項に記載のタンパク質構造の使用。

【請求項 27】

細胞の培養における、請求項 22 から 24 の何れか一項に記載のタンパク質構造の使用

10

20

30

40

50

。

【請求項 28】

以下の工程：

a) 適切な宿主において、請求項 1 から 19 の何れか一項に記載の融合タンパク質を発現し；及び

b) 融合タンパク質を含む混合物を得て、任意で融合タンパク質を単離することを含む、融合タンパク質を生産する方法。

【請求項 29】

(a) 請求項 1 から 19 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質を提供し；

(b) 融合タンパク質を、組換え融合タンパク質を含むポリマーの形成を達成するための条件にさらす工程を含む、

有機ターゲットに対する結合活性を示す、請求項 22 から 24 の何れか一項に記載のタンパク質構造を提供する方法。

【請求項 30】

有機ターゲットの固定化のための親和性培地であって、前記親和性培地が請求項 1 から 19 の何れか一項に記載の融合タンパク質を含み、B 部分が有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、親和性培地。

【請求項 31】

前記親和性培地が請求項 22 から 24 の何れか一項に記載のタンパク質構造を含み、該タンパク質構造が組換え融合タンパク質を含むポリマーである、請求項 30 に記載の親和性培地。

【請求項 32】

前記有機ターゲットを更に含み、B 部分が前記有機ターゲットと選択的相互作用が可能であり該有機ターゲットに結合される、請求項 30 から 31 の何れか一項に記載の親和性培地。

【請求項 33】

前記有機ターゲットが第二有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、請求項 32 に記載の親和性培地。

【請求項 34】

細胞表面に存在する有機ターゲットを有する細胞の培養のための細胞足場材料であって、前記細胞足場材料が請求項 22 から 24 の何れか一項に記載のタンパク質構造を含む細胞足場材料。

【請求項 35】

B 部分が、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、請求項 34 に記載の細胞足場材料。

【請求項 36】

前記細胞足場材料が中間体有機ターゲットを更に含み、B 部分が、前記中間体有機ターゲットとの選択的相互作用が可能であり前記中間体有機ターゲットに結合され、前記中間体有機ターゲットが細胞表面に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、請求項 34 に記載の細胞足場材料。

【請求項 37】

請求項 34 から 36 の何れか一項に記載の細胞と細胞足場材料の組み合わせ。

【請求項 38】

有機ターゲットを含むサンプルを提供し；

親和性培地は有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、請求項 30 から 33 の何れか一項に記載の親和性培地を提供し；

前記親和性培地を、親和性培地と有機ターゲット間の結合を達成するために適した条件下で前記サンプルと接触させ；及び

非結合サンプルを除去する工程を含む、

サンプルからの有機ターゲットの分離のための方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 39】

第一有機ターゲットと第二有機ターゲット間の結合を達成するために適した条件下で、第一有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、第二有機ターゲットと、前記親和性培地及び固定化有機ターゲットを接触させる工程を更に含む、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 40】

親和性培地中の融合タンパク質は、親和性培地と有機ターゲット間の結合を達成するために前記親和性培地と前記サンプルを接触させると、請求項 22 から 24 の何れか一項に記載のタンパク質構造として存在する、請求項 38 又は 39 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 41】

親和性培地と有機ターゲットの間の結合を達成するために前記親和性培地を前記サンプルと接触させると、親和性培地中の融合タンパク質が溶液中に存在し、有機ターゲットに結合した融合タンパク質の複合体に、請求項 22 から 24 の何れか一項に記載の融合タンパク質構造を形成させる、請求項 38 又は 39 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 42】

前記親和性培地上で固定化ターゲットの存在を検出し、及び任意で定量化する工程を更に含む、請求項 38 から 41 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 43】

親和性培地から有機ターゲットを放出し、及び回収する工程を更に含む、請求項 38 から 42 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 44】

化学的処理及び / 又は滅菌加熱処理により親和性培地を再生する最終工程を更に含む、請求項 38 から 43 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 45】

化学的処理が NaOH 及び / 又は尿素による処理を含む、請求項 44 に記載の方法。

## 【請求項 46】

目的の細胞を含むサンプルを提供し；

前記サンプルを請求項 34 から 36 の何れか一項に記載の細胞足場材料に適用し、前記細胞足場材料が細胞表面に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能であり；及び

前記細胞を、細胞表面上の有機ターゲットと前記細胞足場材料との間の結合により、前記細胞足場材料に対して固定化させることを含む、細胞を固定化するための方法。

## 【請求項 47】

請求項 40 に記載の細胞足場材料に目的の細胞を固定化し；及びそれに適用された細胞を有する前記細胞足場材料を細胞培養に適した条件下で維持することを含む、細胞を培養するための方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明の技術分野

本発明は組換え融合タンパク質の分野、より具体的にはクモ系タンパク質（スピドロイン）に由来する部分を含む新規融合タンパク質に関する。本発明は、スピドロインに由来する部分を含む組換え融合タンパク質を含むポリマーであるタンパク質構造を提供する方法を与える。また、有機ターゲットに結合するための新規なタンパク質構造を与える。

## 【背景技術】

## 【0002】

発明の背景

応用タンパク質化学において、活性、典型的には生物活性ペプチドを、活性に関連する

10

20

30

40

50

部位、典型的には有機ターゲット、例えば、核酸、タンパク質、タンパク質の複合体、タンパク質及び/又は脂質及び/又は糖質及び/又は核酸などに対していかに調製又は提示するかは一般的な問題である。最も簡単な解決策は、生物活性ペプチド又はタンパク質の水溶液を提供することである。しかしながら、多くの適用が所望の目標を達成するために幾つかの更なる手段を要求する。例えば、ペプチド/タンパク質は、脂質混合物と会合するか又は支持構造体に化学的に固定化されてもよい。

#### 【0003】

支持構造体に固定化されたペプチド/タンパク質の適用は、バイオプロセス、クロマトグラフィー、細胞捕獲及び培養、アクティブ・フィルタ、及び診断などの調製用及び分析的分離操作が含まれる。細胞外マトリックスタンパク質に基づく構造体、例えばコーラゲンは、欧州特許第704532号及び欧州特許第985732号に開示されている。

10

#### 【0004】

また、支持する構造体にクモ系タンパク質を使用することが提案されている。クモ系タンパク質は、強度と弾性の組み合わせにより、並外れた靱性と伸展性を獲得している天然の高性能ポリマーである。クモは異なる機械的性質と機能を有する様々なタイプの糸を産生する最大7つの異なる腺を持っている。大瓶状腺(major ampullate gland)により生産されるしおり糸は最も強靱な繊維である。それは2つの主要なポリペプチドからなり、これらはほとんどの場合大瓶状腺スピドロイン(Masp)1及び2と称され、例えばニワオニグモ(Araneus diadematus)においてはADF-3及びADF-4と称される。これらのタンパク質は、200から720kDaの範囲の分子量を有する。クモのしおり糸タンパク質、又はMaspは3つの成分を有する;非反復N末端ドメイン、多くの反復型ポリ-Ala/Glyセグメントからなる中央反復領域、及び非反復C末端ドメイン。一般に、反復領域は糸の繊維で分子間接触を形成すると考えられているが、末端ドメインの正確な機能は良く分かっていない。繊維形成を伴う会合において、反復領域はランダムコイルとヘリックス構造からシート構造への構造変換を受ける。スピドロインのC末端領域はクモの種類と糸のタイプ間において一般的に保存されている。

20

#### 【0005】

国際公開第07/078239号とStark, M. et al., *Biomacromolecules* 8: 1695-1701, (2007)は、AlaとGlyの高含量を持つ反復性断片とタンパク質のC末端断片、並びにクモ系タンパク質を含む可溶性融合タンパク質からなる微小クモ系タンパク質を開示している。クモ系タンパク質の繊維はその融合パートナーからのクモ系タンパク質の遊離の際に自発的に得られる。

30

#### 【0006】

Rising, A. et al., *CMLS* 68(2): 169-184 (2010)はクモ系タンパク質の生産における進展を総説している。繊維は、クモ系タンパク質の繰り返し領域及び非反復C末端ドメインに由来するセグメントの4反復からなる小型化されたスピドロイン構築物から作成される。

#### 【0007】

米国特許出願公開第2009/0263430号は酵素 - ガラクトシダーゼの微小クモ系タンパク質の膜に対する化学的結合を開示している。しかし、化学的結合はタンパク質の安定性及び/又は機能において好ましくない条件を必要とし得る。クモ系タンパク質の反復領域に由来するセグメントの複数の反復は、RGD細胞結合セグメント(Bini, E et al., *Biomacromolecules* 7:3139-3145 (2006)); Morgan et al., *Biomaterials* 29(16): 2556-2563 (2008)及び/又はR5ペプチド(Wong Po Foo, C et al., *Proc Natl Acad Sci* 103 (25): 9428-9433 (2006))又はミネラル化(mineralization)に關与する別のタンパク質セグメント(Huang, J et al., *Biomaterials* 28: 2358-2367 (2007); 国際公開第2006/076711号)を含むように設計されている。これらの先行技術文献では、膜は、変性有機溶媒ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)中に融合タンパク質を可溶化し、乾燥することにより形成される。

40

#### 【0008】

50

米国特許出願公開第2005/261479号(A1)は、系タンパク質繊維又は他のポリマー構造を形成することなく、複合体混合物からの個々の系タンパク質の磁気親和性分離を含む、反復断片及び親和性タグからなる組換え系タンパク質の精製のための方法を開示している。

【0009】

既知の支持構造と関連技術は、例えば経済性、効率性、安定性、再生能力、生物活性及び生体適合性に関していくつかの欠点を持っている。

【発明の概要】

【0010】

本発明の目的は、新規な組換え融合タンパク質を提供することである。特に、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能な新規融合タンパク質を提供することを本発明の目的とする。

10

【0011】

有機ターゲットとの選択的相互作用が可能な新規なタンパク質構造を提供することを本発明の目的とする。

【0012】

有機ターゲットとの選択的相互作用が可能なタンパク質構造を提供することも本発明の目的であって、その構造は、タンパク質の2次構造又は活性への予測できない影響をもち及び/又はそのタンパク質構造に残り得るであろう過酷な溶媒(harsh solvents)を用いることなく形成されることを特徴とする。

20

【0013】

有機ターゲットとの選択的相互作用が可能な安定なタンパク質構造を提供することは本発明の一つの目的であって、そのタンパク質構造は、例えば化学的処理により、使用後に容易に再生可能である。

【0014】

生体適合性で細胞培養及び移植組織として適している安定なタンパク質構造を提供することは本発明の別の目的である。

【0015】

有機ターゲットとの選択的相互作用が可能な高密度の等間隔の機能性を持つタンパク質構造を提供することは本発明のさらに別の目的である。

30

【0016】

何ヶ月間も4 又は室温での貯蔵の際にその選択的結合能を維持するタンパク質構造を提供することは本発明の更なる目的である。

【0017】

オートクレーブ可能、即ち加熱処理後にその選択的結合能を維持するタンパク質構造を提供することも本発明の目的である。

【0018】

これらの目的及び以下の開示から自明であろう他の目的のために、本発明は第一態様に従って、融合タンパク質と、反復構造単位として本請求項に記載の融合タンパク質を含むポリマーからなるタンパク質構造を提供する。

40

【0019】

関連する態様に従って、本発明は、本請求項に記載される融合タンパク質をコードする単離された核酸及び融合タンパク質を生産する方法を提供する。

【0020】

別の態様に従って、本発明は本請求項に記載のタンパク質構造を提供するための方法を提供する。

【0021】

更なる態様に従って、本発明は本請求項に記載の親和性培地を提供する。

【0022】

一態様に従って、本発明は本請求項に記載の細胞足場材料を提供する。関連する態様に

50

従って、本発明はまた細胞と本請求項に記載の細胞足場材料の組み合わせを提供する。

【0023】

一態様に従って、本発明は本請求項に記載のタンパク質構造及び融合タンパク質の新規な使用を提供する。

【0024】

別の態様に従って、本発明は本請求項に記載のサンプルからの有機ターゲットの分離の方法を提供する。

【0025】

更なる態様に従って、本発明は本請求項に記載の細胞の固定化及び任意で培養の方法を提供する。

10

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1-1】図1-1は、スピドロインC末端ドメインの配列アラインメントを示す。

【図1-2】図1-2は、スピドロインC末端ドメインの配列アラインメントを示す。

【図2】図2は、スピドロインN末端ドメインの配列アラインメントを示す。

【図3】図3は、繊維形態の系融合型ABDの顕微鏡写真を示す。

【図4】図4は、ABD-NTCT膜及びABD-CT膜から溶出したヒト血漿の画分のSDS-PAGEゲルを示す。

【図5】図5は、繊維及び発泡体形態の系融合型M4断片の顕微鏡写真を示す。

【図6】図6は、M4-NTCT膜及びM4-CT膜に結合したAtto-565ビオチンの蛍光顕微鏡写真を示す。

20

【図7】図7は、発泡体形態の系融合型抗体断片の顕微鏡写真を示す。

【図8】図8は、純粋な系融合型抗体断片の抗原結合解析を示す。

【図9】図9は、系融合型キシラナーゼの巨視的発泡体を示す。

【0027】



添付配列のリスト配列番号

1	4Rep	
2	4RepCT	
3	NT4Rep	
4	NT5Rep	
5	NT4RepCTHis	10
6	NT	
7	CT	
8	コンセンサス NT 配列	
9	コンセンサス CT 配列	
10	ユープロステノプス オーストラリス ( <i>Euprosthénops australis</i> ) MaSp1 からの反復配列	
11	コンセンサス G セグメント配列 1	20
12	コンセンサス G セグメント配列 2	
13	コンセンサス G セグメント配列 3	
14	CT ユープロステノプス エスピー ( <i>Euprosthénops</i> sp) MaSp1	
15	CT ユープロステノプス オーストラリス ( <i>Euprosthénops australis</i> ) MaSp1	
16	CT コガネグモ属トリファスキアタ ( <i>Argiope trifasciata</i> ) MaSp1	30
17	CT スズミグモ ( <i>Cyrtophora moluccensis</i> ) Sp1	
18	CT ハイイロゴケグモ ( <i>Latrodectus geometricus</i> ) MaSp1	
19	CT クロゴケグモ ( <i>Latrodectus hesperus</i> ) MaSp1	
20	CT ホルストジョウゴグモ ( <i>Macrothele holsti</i> ) Sp1	
21	CT アメリカジョロウグモ ( <i>Nephila clavipes</i> ) MaSp1	
22	CT オオジョロウグモ ( <i>Nephila pilipes</i> ) MaSp1	
23	CT マダガスカルジョロウグモ ( <i>Nephila madagascariensis</i> ) MaSp1	40
24	CT セネガルジョロウグモ ( <i>Nephila senegalensis</i> ) MaSp1	
25	CT ウズグモ ( <i>Octonoba varians</i> ) Sp1	
26	CT ボロアミグモ属シネンシス ( <i>Psecchrus sinensis</i> ) Sp1	
27	CT アシナガグモ属カウアイエンシス ( <i>Tetragnatha kauaiensis</i> ) MaSp1	

配列番号

28	CT アシナガグモ属ベルシココル(Tetragnatha versicolor) MaSp1	
29	CT オニグモ属ビケンテナリウス(Araneus bicentenarius)	Sp2
30	CT コガネグモ(Argiope amoena)	MaSp2
31	CT キマダラコガネグモ(Argiope aurantia)	MaSp2
32	CT コガネグモ属トリファスキアタ(Argiope trifasciata)	MaSp2
33	CT チブサトゲグモ(Gasteracantha mammosa)	MaSp2
34	CT ハイイロゴケグモ(Latrodictus geometricus)	MaSp2
35	CT クロゴケグモ(Latrodictus hesperus)	MaSp2
36	CT アメリカジョロウグモ(Nephila clavipes)	MaSp2
37	CT マダガスカルジョロウグモ(Nephila madagascariensis) MaSp2	
38	CT セネガルジョロウグモ(Nephila senegalensis)	MaSp2
39	CT ドロメデス テネブロスス(Dolomedes tenebrosus)	Fb1
40	CT ドロメデス テネブロスス(Dolomedes tenebrosus)	Fb2
41	CT ニワオニグモ(Araneus diadematus)	ADF-1
42	CT ニワオニグモ(Araneus diadematus)	ADF-2
43	CT ニワオニグモ(Araneus diadematus)	ADF-3
44	CT ニワオニグモ(Araneus diadematus)	ADF-4
45	NT ユープロステノプス オーストラリス(Euprostenops australis)	MaSp1
46	NT ハイイロゴケグモ (Latrodectus geometricus)	MaSp1
47	NT クロゴケグモ(Latrodictus hesperus)	MaSp1
48	NT アメリカジョロウグモ (Nephila clavipes)	MaSp1
49	NT コガネグモ属トリファスキアタ(Argiope trifasciata)	MaSp2
50	NT ハイイロゴケグモ(Latrodictus geometricus)	MaSp2
51	NT クロゴケグモ(Latrodictus hesperus)	MaSp2
52	NT マダガスカルジョロウグモ(Nephila inaurata madagascariensis)	MaSp2
53	NT アメリカジョロウグモ(Nephila clavipes)	MaSp2
54	NT ナガコガネグモシリンダー状スピドロイン1 (Argiope bruennichi cylindriform spidroin 1)	

配列番号

55	NT ジョロウゲモシリンダー状スピドロイン1 ( <i>Nephila clavata</i> cylindriform spidroin 1)	
56	NT クロゴケグモ小管状スピドロイン ( <i>Latrodectus hesperus</i> tubuliform spidroin)	
57	NT ジョロウゲモ鞭毛状シルクタンパク質 ( <i>Nephila clavipes</i> flagelliform silk protein)	10
58	NT マダガスカルジョロウゲモ鞭毛状シルクタンパク質 ( <i>Nephila</i> <i>inaurata madagascariensis</i> flagelliform silk protein)	
59	His <sub>6</sub> NT-CT	
60	His <sub>6</sub> NTNT-CT	
61	His <sub>6</sub> Z-CT	
62	His <sub>6</sub> CT-Z	20
63	His <sub>6</sub> Z-NTCT	
64	His <sub>6</sub> NTCT-Z	
65	His <sub>6</sub> Z-NTNTCT	
66	His <sub>6</sub> NTNTCT-Z	
67	His <sub>6</sub> -ABD-NTCT (DNA)	
68	His <sub>6</sub> -ABD-NTCT	
69	His <sub>6</sub> -ABD-CT (DNA)	30
70	His <sub>6</sub> -ABD-CT	
71	His <sub>6</sub> -M4-NTCT (DNA)	
72	His <sub>6</sub> -M4-NTCT	
73	His <sub>6</sub> -M4-CT (DNA)	
74	His <sub>6</sub> -M4-CT	
75	His <sub>6</sub> -scFv1-NTCT (DNA)	
76	His <sub>6</sub> -scFv1-NTCT	40
77	His <sub>6</sub> -scFv1-CT (DNA)	
78	His <sub>6</sub> -scFv1-CT	
79	His <sub>6</sub> Xyl-NTCT (DNA)	
80	His <sub>6</sub> Xyl-NTCT	
81	His <sub>6</sub> Xyl-CT (DNA)	
82	His <sub>6</sub> Xyl-CT	

配列番号

83	His <sub>6</sub> EGF-NTCT (DNA)
84	His <sub>6</sub> EGF-NTCT
85	His <sub>6</sub> EGF-CT (DNA)
86	His <sub>6</sub> EGF-CT

## 【 0 0 2 8 】

10

## 発明の詳細な記述

本発明は、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能な固体タンパク質構造が、反復構造単位として組換え融合タンパク質のポリマーの形態で調製できるとする見識に一般的に基づいている。融合タンパク質は、有機ターゲットと選択的に相互作用することが可能である、好ましくは30以上のアミノ酸残基の、少なくとも一的非スピドロイン部分と、及び融合タンパク質はクモ糸タンパク質の反復断片に由来する任意の部分を含んでいないという条件でクモ糸タンパク質の少なくともC末端断片に対応する部分とを含有している。

## 【 0 0 2 9 】

驚くべきことに、クモ糸タンパク質に由来する部分は、構造的に再配置するために誘導することができ、その結果、ポリマー性の固体構造を形成するが、非スピドロイン部分は構造的に再配置されず、その所望の構造と機能、即ち、有機ターゲットと選択的相互作用する能力を維持する。タンパク質構造は、化学的結合工程又は変性法による工程無しで得ることができ、これは、特に機能がその部分の2次構造に依存しているときに、その部分の維持された機能性を持つ融合タンパク質を得る手順を促進し、及びその可能性を向上する。これらの融合タンパク質ポリマーの形成は厳しく制御され、この見識は、更なる新規タンパク質構造、タンパク質構造を作り出す方法、及び様々な応用と方法におけるタンパク質構造の用途へと発展している。

20

## 【 0 0 3 0 】

従って、本発明による融合タンパク質は、所望の選択的相互作用活性と、生理学的条件下でタンパク質構造に用いられる内部の固体支持体活性の両方を内部に持っている。スピドロイン部分がポリマー性の固体構造を形成するために構造的に再配置されるときに、非スピドロイン部分はスピドロイン部分に共有結合しているが、融合タンパク質の結合活性が維持されていることは驚くべきこととして考慮されねばならない。実際、選択的相互作用活性を与えるその部分の熱及び/又は化学的安定性及び/又は結合活性は、本発明の融合タンパク質構造に組み込まれるときに増大し得る。タンパク質構造はまた、有機ターゲットに対する選択的相互作用活性の予測可能な高い密度を提供する。全ての発現タンパク質部分は固体支持体に結合しているため、選択的相互作用活性を持つ有用なタンパク質部分の損失は最小化される。

30

## 【 0 0 3 1 】

本発明による融合タンパク質から形成されるポリマーは固体構造であり、それらの物理特性において、特に高強度、弾力性と軽量の有用な組み合わせにおいて有用である。特に有用な特徴は、融合タンパク質のスピドロイン由来部分は、生化学的に堅牢であり、例えば酸、塩基又はカオトロピック剤による再生に適しており、及び加熱滅菌、例えば120で20分のオートクレーブに適している。ポリマーはまた、細胞接着及び増殖を支援するその能力において有用である。ドラグラインシルク(dragline silk)に由来する特性は、医療又は技術的目的のための新しい材料の開発において魅力的である。特に、本発明によるタンパク質構造は、クロマトグラフィー、細胞捕獲、選択及び培養、アクティブ・フィルタ、及び診断などの調整的及び分析的分離操作において有用である。本発明によるタンパク質構造はまた、移植片などの医療機器、及び、創傷閉鎖システム、バンドエイド、縫合糸、創傷包帯などの医療用品、及び細胞固定化のための足場、細胞培養、組織工学及

40

50

び誘導細胞の再生において有用である。

【0032】

本発明は、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である組換え融合タンパク質を提供し、その融合タンパク質はB部分及びCT部分、及び任意でNT部分を含んでいる。本発明はまた、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能であるタンパク質構造を提供し、該タンパク質構造は、本発明による組換え融合タンパク質を含み、及び任意で該タンパク質からなり、即ち、B部分及びCT部分、及び任意でNT部分を含み、及び任意で該部分からなる。本発明による融合タンパク質は、クモ系タンパク質の反復(REP)断片に由来する任意の部分を含んでいない。

【0033】

実施例の融合タンパク質のCT部分及び任意でNT部分は必然的に特定のタンパク質、例えばユープロステノプス オーストラリス(*Euprosthonops australis*)に由来する主要スピドロイン1(Masp1)に関するが、本開示は本発明による融合タンパク質構造を生産する目的において任意の構造的に類似する部分に対して適用可能であると考えられる。更に、実施例の融合タンパク質の選択的相互作用活性を提供するB部分は必然的に特定のタンパク質部分、例えば、プロテインA、プロテインG及びストレプトアビジンに由来する部分に関するが、本開示は本発明による融合タンパク質構造を生産する目的において、有機ターゲットと選択的相互作用可能である、任意の構造的及び/又は機能的に類似するB部分に対して適用可能であると考えられる。

【0034】

本発明による特定の融合タンパク質は、式 $B_x - CT - B_z$ によって定義され、ここで $x$ 及び $z$ は0から5の整数；及び $x + z \geq 1$ であり、任意で1以上のNT部分、例えば、融合タンパク質の何れか末端で、又は任意の2つの融合タンパク質間で、1 - 2のNT部分、例えば、 $NT - B_x - CT - B_z$ 、 $B_x - NT - CT - B_z$ 、 $B_x - CT - NT - B_z$ 、 $B_x - CT - B_z - NT$ 、 $NT - NT - B_x - CT - B_z$ 又は $B_x - CT - B_z - NT - NT$ を更に含んでいる。もし、 $x + z > 1$ である場合、即ち、もし2つ以上のB部分がある場合、それらは同一であるか又は異なっても良い。2つ以上のB部分が同じ有機ターゲット又は異なる有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を有し得る。2つ以上のB部分が実質的に同一であり、各々が同一の有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を有するのが好ましい。あるいは、2つ以上のB部分が同一でなく、それらが有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を一緒に提供するのが好ましい。

【0035】

本発明による好ましい融合タンパク質において、 $x$ 及び $z$ は0から2の整数、好ましくは0から1の整数である。本発明による特定の好ましい融合タンパク質において、 $x$ 又は $z$ のどちらかは0であり、即ち、融合タンパク質は式 $B_x - CT$ 、及び $CT - B_z$ により定義され、ここで $x$ 又は $z$ のどちらかは1から5の整数であり、任意で1 - 2のNT部分を含む。本発明による好ましい融合タンパク質において、 $x$ 及び $z$ は0から1の整数であり；及び $x + z = 1$ である。従って、本発明による特定の好ましい融合タンパク質は、式 $B - CT$ 及び $CT - B$ により定義され、任意で1 - 2のNT部分を含む。本発明による特定の好ましい融合タンパク質は、任意的なNT部分を欠損している。

【0036】

用語「融合タンパク質」は、ここでは、組換え核酸、即ち、通常は一緒に生じるであろう二つ以上の核酸を組み合わせるにより人工的に創られる、DNA又はRNAからの発現により作成されるタンパク質を意味する(遺伝子操作)。本発明による融合タンパク質は、組換えタンパク質であり、従って、天然に生じるタンパク質に同一ではない。特に、野生型スピドロインは、上記に定めた組換え核酸から発現されないため、本発明による融合タンパク質ではない。結合された核酸配列は、特定の機能的特性を持つ異なるタンパク質、部分的なタンパク質又はポリペプチドをコードしている。得られる融合タンパク質、又は組換え融合タンパク質は、もとのタンパク質、部分的タンパク質又はポリペプチドの各々から生じた機能特性を持つ単一タンパク質である。更に、本発明及び対応する遺伝

10

20

30

40

50

子による融合タンパク質は、キメラであり、即ち、タンパク質ノ遺伝子部分は、少なくとも2つの異なる種に由来する。C T部分及び任意でN T部分は、クモ系タンパク質に由来する。誤解を避けるために、本発明によるB部分は非スピドロインタンパク質又はポリペプチドであり、即ちクモ系タンパク質から生じない。特に、本発明によるB部分は、クモ系タンパク質のC末端断片、反復性断片、又はN末端断片から生じない。

#### 【0037】

融合タンパク質は、典型的には170から2000アミノ酸残基、例えば170から1000アミノ酸残基、例えば170から600アミノ酸残基、好ましくは170から500アミノ酸残基、例えば170から400アミノ酸残基からなる。クモ系タンパク質断片を含む長いタンパク質が、可溶化及び重合のための過酷な溶剤の使用を必要とする非晶質の凝集体を形成する傾向があるので、小さいサイズが有利である。組換え融合タンパク質は、特にクモ系タンパク質が一以上のB部分である場合において及び/又はそれがN T部分、例えば1 - 2のN T部分を含むとき、2000残基以上を含み得る。

10

#### 【0038】

用語「スピドロイン」及び「クモ系タンパク質」は、本記述を通して同義に用いられ、全ての既知のクモ系タンパク質を包含し、典型的には「MaSp」、ニワオニグモ (*Aranus diadematus*) の場合「ADF」と略される大瓶状腺クモ系タンパク質を含む。これらの大瓶状腺クモ系タンパク質は一般に1と2の2つのタイプがある。これらの用語は、既知のクモ系タンパク質に対して高度の同一性及び/又は類似性を持つ非天然タンパク質を包含する。

20

#### 【0039】

その結果、用語「非スピドロイン」はクモ系タンパク質から由来しないタンパク質、即ちクモ系タンパク質に対して同一性及び/又は類似性の程度が低い(又は全くない)タンパク質を意味する。

#### 【0040】

本発明によるタンパク質構造は、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。この能力は本発明による融合タンパク質にあり、より具体的には融合タンパク質のB部分にある。C T部分及び任意でN T部分の、有機分子との任意の相互作用は、「有機ターゲットとの選択的相互作用が可能」なる語句により包含されない。誤解を避けるために、「有機ターゲットとの選択的相互作用が可能」なる語句は、C T部分及び/又は任意でN T部分の関与する相互作用に依存する本発明による融合タンパク質の二量体化、オリゴマー化又は重合を包含していない。

30

#### 【0041】

「有機ターゲット」なる用語は、当業者により無機分子と伝統的に考えられるもの、例えばカーボネート、炭素の単純酸化物、シアン化物、ダイヤモンド及びグラファイトの例外を除いて、炭素を含む全化学分子を包含する。誤解を避けるために、例えば、シリカ及び塩化カルシウムのような無機分子、塩及びイオンは、有機ではない。有機ターゲットは、有機分子、例えば細胞表面上の受容体複合体を含むか又はからなる複合体であり得る。有機ターゲットは、共有結合又は他の型の会合により結合され得る、一つ以上の有機分子の種類モノマー、ダイマー、オリゴマー又はポリマーであり得る。もちろん単に単一有機分子であっても良い。本発明による好ましい有機ターゲットは、限定されないが、核酸、タンパク質及びポリペプチド、脂質及び炭水化物、並びにこれらの組み合わせが挙げられる。本発明による好ましい有機ターゲットは、限定されないが、免疫グロブリン、免疫グロブリン分子又はその誘導体を含む分子、アルブミン、アルブミン又はその誘導体を含む分子、ビオチン、ビオチン又はその誘導体若しくは類似体を含む分子、及び生物学的な疾患マーカー、例えば体組織からの血液、血清、尿、唾液又は他の試料を包含する。

40

#### 【0042】

本発明の関連において、例えば本発明による融合タンパク質のB部分などのリガンドとそのターゲットとの「特異的」又は「選択的」相互作用とは、特異的及び非特異的相互作用間又は選択的及び非選択的相互作用間の違いが有意義になるようなものである相互作用

50

を意味する。2つのタンパク質間の相互作用はときには解離定数により測定される。解離定数は2つの分子間の結合（又は親和性）の強度を記述する。典型的には、抗体とその抗原の間の解離定数は $10^{-7}$ から $10^{-11}$  Mである。しかし、高い特異性は必ずしも高い親和性を必要としない。そのカウンターパートに対して低親和性（モルの範囲内で）を持つ分子は、はるかに高い親和性を有する分子と同程度に特異的であることが示されている。本発明の場合、特異的又は選択的相互作用とは、天然に生じるか又は処理された生物学的又は生化学的液体のサンプル中で他のタンパク質が存在する所定の条件下で、特定の方法が、特定のタンパク質、標的タンパク質又はその断片の存在及び/又は量を決定するために用いることができる範囲を指す。言い換えれば、特異性又は選択性は、関連するタンパク質を区別する能力である。特異的及び選択的とは時には本記述において同義的に用いられる。 10

#### 【0043】

本発明による融合タンパク質はまた、一以上のリンカーペプチドを含む。リンカーペプチドは、融合タンパク質の任意の部分間、例えばCT部分とNT部分間、2つのB部分間、B部分とCT部分間に配置され得るか又は融合タンパク質の何れかの末端に配置され得る。融合タンパク質が2つ以上のB部分を含む場合、リンカーペプチドはまた2つのB部分との間に配置され得る。リンカーは、融合タンパク質の機能単位の間スペースを提供することができるが、融合タンパク質の同定及び精製のためのハンドル、例えばHis及び/又はTrxタグを構成することもできる。融合タンパク質が、融合タンパク質の同定と精製のために2つ以上のリンカーペプチドを含む場合、それらはスペース配列、例えば、His<sub>6</sub>-スペース-His<sub>6</sub>-、などのスペース配列により隔てられているのが望まれる。リンカーはまた、シグナル認識粒子などのシグナルペプチドをも構成することができ、それは融合タンパク質を膜へと導き、及び/又は宿主細胞から周囲の培地への融合タンパク質の分泌を引き起こす。融合タンパク質はまた、そのアミノ酸配列中に、リンカー及び/又は他の関連部分、典型的にはB部分又は部分（複数）の切断及び除去を可能にする、開裂部位を含み得る。様々な開裂部位が、例えば、化学試薬、例えばCNBrによるMet残基の後ろの開裂部位、及びヒドロキシルアミンによるAsn-Gly残基間の開裂部位、トロンピン又はプロテアーゼ3Cなどのプロテアーゼの開裂部位、及びインティン自己スプライシング配列などの自己スプライシング配列が、当業者に知られている。 20 30

#### 【0044】

CT及びB部分は、互いに直接又は間接的に連結されている。直接的結合は、リンカーなどの介在配列の無い、部分間の直接共有結合を意味する。間接的な結合はまた、部分が共有結合で結合されているが、リンカー及び/又は一以上の更なる部分、例えば1-2のNT部分などの介在配列があることを意味する。

#### 【0045】

B部分又は部分（複数）は、融合タンパク質の内部に又は何れかの末端に配置され得、即ちC末端に配置されるか又はN末端に配置される。B部分又は部分（複数）は、融合タンパク質のN末端に配置されることが好まれる。仮に融合タンパク質が、融合タンパク質の同定と精製のために一つ以上のリンカー、例えばHis又はTrxタグを含む場合、融合タンパク質のN末端に配置されることが好まれる。 40

#### 【0046】

好ましい融合タンパク質は、N末端にB部分が配置された形態を有し、1から30アミノ酸残基、例えば1から10アミノ酸残基のリンカーペプチドによって、C末端に配置されたCT部分へ結合している。リンカーペプチドは開裂部位を含み得る。任意で、融合タンパク質はN末端又はC末端に、Hisタグ、及び開裂部位などの精製タグを含み得るリンカーペプチドを有する。

#### 【0047】

その他の好ましい融合タンパク質は、C末端に配置されたCT部分へ直接結合したB部分をN末端に配置した形態を有する。任意で、融合タンパク質はN末端又はC末端に、H 50

i s タグ、及び開裂部位などの精製タグを含み得るリンカーペプチドを有する。

【0048】

本発明によるタンパク質構造は、本発明による組換え融合タンパク質を反復構造単位として含むポリマーであり、それは整列した複数の融合タンパク質、典型的には100融合タンパク質単位を軽く超える、例えば1000融合タンパク質単位又はそれ以上を含むことを意味する。任意で、ポリマーは更なる反復構造単位として、B部分の無い相補性タンパク質、好ましくはクモ糸に由来するタンパク質を含み得る。このことは、融合タンパク質のB部分が、大きい及び/又は嵩高い場合に有利であり得る。これらの相補性タンパク質は、CT部分、及び任意で更にNT部分、例えば1-2のNT部分を典型的に含み、及びかなり得る。本発明による好ましい相補性タンパク質は、B部分が欠失した本明細書に記載の構造の何れかを有することができる。相補性融合タンパク質は、B部分が欠失した融合タンパク質に実質的に同一であることが望ましい。しかしながら、本発明によるタンパク質構造は、反復構造単位として本発明による組換え融合タンパク質からなるポリマーであること、即ち本発明によるタンパク質構造は本発明による組換え融合タンパク質のポリマーであることが望ましい。

10

【0049】

ポリマーの融合単位の規模は、タンパク質構造が有意な大きさを得たことを意味する。好ましい実施態様にて、タンパク質構造は少なくとも2次元で少なくとも0.1µmの大きさを有する。従って、本明細書で使用する「タンパク質構造」なる用語は、少なくとも0.1µmの厚さを持つ融合タンパク質ポリマー、好ましくはヒトの目に見える、即ち少なくとも1µmの厚さを持つ巨視的ポリマーを指す。「タンパク質構造」なる用語は、構造をとらない凝集体又は沈殿を包含しない。融合タンパク質のモノマーは水溶性であるが、本発明に係るタンパク質構造は、固体構造、即ち水に溶けない。タンパク質構造は、本発明に係る組換え融合タンパク質のモノマーを反復構造単位として含有するポリマーである。

20

【0050】

本発明に係るタンパク質構造は、繊維、薄膜、発泡体、網、メッシュ、球及びカプセルからなる群から選択される物理的形態であることが望ましい。

【0051】

本発明に係るタンパク質構造は、少なくとも1nm又は少なくとも0.1µm、好ましくは少なくとも1µmの厚さの繊維又は薄膜であることが望ましい。繊維又は薄膜は、1nm-400µm、例えば1-400µm、及び好ましくは60-120µmの範囲の厚さを持つことが望ましい。繊維は、0.5-300cm、好ましくは1-100cmの範囲の長さを有することが望ましい。他の好ましい範囲は0.5-30cm及び1-20cmである。繊維は物理的操作中に無傷のままである能力を有し、即ち、紡績、製織、撚糸、かぎ針編み及び同様の手順で用いることができる。薄膜は、可干渉性で、固体構造、例えばマイクロタイタープレートのプラスチックへ付着するという点で有利である。薄膜のこの特性は、洗浄と再生手順を容易にし、分離の目的に非常に有用である。特に有用なタンパク質構造は、薄膜又は繊維であり、B部分はブドウ球菌プロテインAに由来するZドメイン又はそれに対して少なくとも70%同一性を有するタンパク質断片である。

30

40

【0052】

また、本発明に係るタンパク質構造は、1MPaを超えた、好ましくは2MPaを超えた、より好ましくは10MPa以上の引張強度を有することが好ましい。本発明に係るタンパク質構造は、100MPaを超えた、より好ましくは200MPa以上の引張強度を有することが好ましい。

【0053】

用語「%同一性」は、本明細書と添付された特許請求の範囲の全体を通して使用されるように、以下のように計算される。クエリ配列は、CLUSTAL Wアルゴリズムを使用して、標的配列にアラインされる(Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680 (1994))。比較は、整列された配列の最短に対

50



応するウィンドウを介して行われる。各位置でアミノ酸配列が比較され、標的配列において同一対応を有するクエリ配列における位置の割合が、%同一性として報告される。

【0054】

「%類似性」は、本明細書と添付された特許請求の範囲の全体を通して使用されるように、疎水性残基のAla、Val、Phe、Pro、Leu、Ile、Trp、Met及びCysは類似し；塩基残基のLys、Arg及びHisは類似し、；酸性残基のGluとAspは類似し；親水性残基、無電荷残基のGln、Asn、Ser、Thr及びTyrは類似していることを例外として、「%同一性」について説明されるように計算される。残りの天然アミノ酸のGlyはこれに関連する他の何れのアミノ酸に対して類似していない。

10

【0055】

この説明全体を通して、本発明による他の代替の実施態様は、明記された同一性の割合の代わりに、対応する類似の割合を実行する。別の代替の実施態様は、明記された同一性の割合並びに、各配列について好ましい同一性の割合の群から選択された、その他のより高い割合の類似性を実行する。例えば、配列はその他の配列に70%類似している可能性があり；又はそれはその他の配列に70%同一であり得；又はそれはその他の配列に70%同一で90%類似であり得る。

【0056】

CT部分は70から120アミノ酸残基を含むタンパク質断片で、クモ系タンパク質のC末端断片から由来する。「に由来する」なる表現は、本発明によるCT部分の関連において、クモ系タンパク質のC末端アミノ酸配列に高度の類似性を有することを意味する。図1に示されるように、このアミノ酸配列はMas p 1及びMas p 2を含む、様々な種及びクモ系タンパク質の間で良く保存されている。Mas p 1及びMas p 2のC末端領域のコンセンサス配列は、配列番号9として提供される。図1において、以下のMas p タンパク質がアラインされ、必要に応じGenBankの受託エントリーで表示される（配列番号14 - 44）。

20

【0057】

表1- スピドロイン CT 部分

種及びスピドロインタンパク質	エントリー	
ユープロステノプス エスピー ( <i>Euprosthops sp</i> ) MaSp1	Cthyb_Esp	
(Pouchkina-Stantcheva, NN & McQueen-Mason, SJ,同書)		
ユープロステノプス オーストラリス ( <i>Euprosthops australis</i> ) MaSp1	CTnat_Eau	
コガネグモ属トリファスキアタ ( <i>Argiope trifasciata</i> ) MaSp1	AF350266_At1	10
スズミグモ ( <i>Cyrtophora moluccensis</i> ) Sp1	AY666062_Cm1	
ハイロゴケグモ ( <i>Latrodectus geometricus</i> ) MaSp1	AF350273_Lg1	
クロゴケグモ ( <i>Latrodectus hesperus</i> ) MaSp1	AY953074_Lh1	
ホルストジョウグモ ( <i>Macrothele holsti</i> ) Sp1	AY666068_Mh1	
アメリカジョロウグモ ( <i>Nephila clavipes</i> ) MaSp1	U20329_Nc1	
オオジョロウグモ ( <i>Nephila pilipes</i> ) MaSp1	AY666076_Np1	
マダガスカルジョロウグモ ( <i>Nephila madagascariensis</i> ) MaSp1	AF350277_Nm1	20
セネガルジョロウグモ ( <i>Nephila senegalensis</i> ) MaSp1	AF350279_Ns1	
ウズグモ ( <i>Octonoba varians</i> ) Sp1	AY666057_Ov1	
ボロアミグモ属シネンシス ( <i>Psechrus sinensis</i> ) Sp1	AY666064_Ps1	
カウアイアシナガグモ ( <i>Tetragnatha kauaiensis</i> ) MaSp1	AF350285_Tk1	
アシナガグモ属ベルシココル ( <i>Tetragnatha versicolor</i> ) MaSp1	AF350286_Tv1	30
オニグモ属ビケンテナリウス ( <i>Araneus bicentenarius</i> ) Sp2	ABU20328_Ab2	
コガネグモ ( <i>Argiope amoena</i> ) MaSp2	AY365016_Aam2	
キマダラコガネグモ ( <i>Argiope aurantia</i> ) MaSp2	AF350263_Aau2	
コガネグモ属トリファスキアタ ( <i>Argiope trifasciata</i> ) MaSp2	AF350267_At2	
チブサトゲグモ ( <i>Gasteracantha mammosa</i> ) MaSp2	AF350272_Gm2	
ハイロゴケグモ ( <i>Latrodectus geometricus</i> ) MaSp2	AF350275_Lg2	
クロゴケグモ ( <i>Latrodectus hesperus</i> ) MaSp2	AY953075_Lh2	
アメリカジョロウグモ ( <i>Nephila clavipes</i> ) MaSp2	AY654293_Nc2	40
マダガスカルジョロウグモ ( <i>Nephila madagascariensis</i> ) MaSp2	AF350278_Nm2	
セネガルジョロウグモ ( <i>Nephila senegalensis</i> ) MaSp2	AF350280_Ns2	
ドロメデス テネブロス ( <i>Dolomedes tenebrosus</i> ) Fb1	AF350269_DtFb1	

## 種及びスピドロインタンパク質

## エントリー

ドロメデス テネブロスス(Dolomedes tenebrosus) Fb2	AF350270_DtFb2	
ニワオニグモ(Araneus diadematus) ADF-1	U47853_ADF1	
ニワオニグモ(Araneus diadematus) ADF-2	U47854_ADF2	
ニワオニグモ(Araneus diadematus) ADF-3	U47855_ADF3	
ニワオニグモ(Araneus diadematus) ADF-4	U47856_ADF4	10

## 【 0 0 5 8 】

C T部分が完全には欠失していない限り、本発明によるクモ系タンパク質において、どの特異的C T部分が存在するかは重大ではない。従って、本発明によるC T部分は、図1及び表1に示されたアミノ酸配列(配列番号14 - 44)又は高度な類似性を持つ配列の何れかから選択することができる。様々なC末端配列が、本発明によるクモ系タンパク質に使用することができる。

## 【 0 0 5 9 】

本発明によるC T断片の配列は、図1のアミノ酸配列(配列番号14 - 44)に基づいて、コンセンサスアミノ酸配列の配列番号9に対して、少なくとも50%同一性、好ましくは少なくとも60%同一性、より好ましくは少なくとも65%同一性、又は実に少なくとも70%同一性を有する。

20

## 【 0 0 6 0 】

本発明による代表的なC T部分は、ユープロステノプス オーストラリス(Euprostheno-  
s australis)配列の配列番号7である。従って、本発明による好ましい態様によれば、C T部分は、配列番号7又は図1及び表1の個々の何れかのアミノ酸配列(配列番号14 - 44)に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%同一性を有する。本発明の好ましい実施態様において、C T部分は配列番号7又は図1及び表1の個々の何れかのアミノ酸配列に対して同一である。

## 【 0 0 6 1 】

C T部分は典型的には70から120アミノ酸残基からなる。C T部分は、少なくとも70、又は80を上回る、好ましくは90を上回るアミノ酸残基を含むことが望まれる。また、C T部分は、多くても120、又は110未満のアミノ酸残基を含むことが望まれる。典型的なC T部分は約100アミノ酸残基を含む。

30

## 【 0 0 6 2 】

任意のN T部分は100から160アミノ酸残基を含むタンパク質断片で、クモ系タンパク質のN末端断片に由来する。「に由来する」なる表現は、本発明によるN T部分の関連において、クモ系タンパク質のN末端アミノ酸配列に高度の類似性を有することを意味する。図2に示されるように、このアミノ酸配列はMaSp1及びMaSp2を含む、様々な種及びクモ系タンパク質の間で良く保存されている。図2において、該当するGenBankの受託エントリーが表示された以下のスピドロインN T部分がアラインされる(配列番号45 - 58)。

40

## 【 0 0 6 3 】

表2 - スピドロイン NT 部分

コード	種及びスピドロインタンパク質	GenBank 受託番号	
Ea MaSp1	ユープロステノプス オーストラリス ( <i>Euprosthops australis</i> ) MaSp 1	AM259067	
Lg MaSp1	ハイイロゴケグモ ( <i>Latrodectus geometricus</i> ) MaSp 1	ABY67420	10
Lh MaSp1	クロゴケグモ ( <i>Latrodectus hesperus</i> ) MaSp 1	ABY67414	
Nc MaSp1	アメリカジョロウグモ( <i>Nephila clavipes</i> ) MaSp 1	ACF19411	
At MaSp2	コガネグモ属トリファスキアタ ( <i>Argiope trifasciata</i> ) MaSp 2	AAZ15371	
Lg MaSp2	ハイイロゴケグモ ( <i>Latrodectus geometricus</i> ) MaSp 2	ABY67417	20
Lh MaSp2	クロゴケグモ ( <i>Latrodectus hesperus</i> ) MaSp 2	ABR68855	
Nim MaSp2	マダガスカルジョロウグモ ( <i>Nephila inaurata madagascariensis</i> ) MaSp 2	AAZ15322	
Nc MaSp2	アメリカジョロウグモ( <i>Nephila clavipes</i> ) MaSp 2	ACF19413	
Ab CySp1	ナガコガネグモシリンダー状スピドロイン1 ( <i>Argiope bruennichi</i> cylindriform spidroin 1)	BAE86855	30
Ncl CySp1	ジョロウグモシリンダー状スピドロイン1 ( <i>Nephila clavata</i> cylindriform spidroin 1)	BAE54451	
Lh TuSp1	クロゴケグモ小管状スピドロイン ( <i>Latrodectus hesperus</i> tubuliform spidroin)	ABD24296	
Nc Flag	ジョロウグモ鞭毛状シルクタンパク質 ( <i>Nephila clavipes</i> flagelliform silk protein)	AF027972	
Nim Flag	マダガスカルジョロウグモ鞭毛状シルクタンパク質 ( <i>Nephila inaurata</i> madagascariensis flagelliform silk protein)	AF218623 (翻訳された もの)	40

## 【 0 0 6 4 】

N 末端部分に対応する部分のみが、シグナルペプチドを除いて、各配列について示されている。N c フラグと N l m フラグが、Rising A. et al. *Biomacromolecules* 7, 31 20-3124 (2006) に従って翻訳され編集された。

## 【 0 0 6 5 】

本発明によるクモ糸タンパク質において、どの特定の NT 部分が存在しているかは重大

ではない。従って、本発明によるNT部分は、図2及び表2に示されたアミノ酸配列（配列番号45 - 58）又は高度な類似性を持つ配列の何れかから選択することができる。多種多様のN末端配列を、本発明によるクモ系タンパク質に使用することができる。図2の相同配列に基づいて、以下の配列が、コンセンサスNTアミノ酸配列を構成する：QAN  
TPWSSPNLADAFINSF(M/L)SA(A/I)SSSGAFSADQLD  
DMSTIG(D/N/Q)TLMsAMD(N/S/K)MGRSG(K/R)STK  
SKLQALNMAFASSMAEIAAAESGG(G/Q)SVGVKTNAISD  
ALSSAFYQTTGSVNPQFV(N/S)EIRSLI(G/N)M(F/L)  
(A/S)QASANEV(配列番号8)。

【0066】

本発明によるNT部分の配列は、図2のアミノ酸配列に基づいて、コンセンサスアミノ酸配列の配列番号8に対して、少なくとも50%同一性、好ましくは少なくとも60%同一性を有する。好ましい実施態様において、本発明によるNT部分の配列は、コンセンサスアミノ酸配列の配列番号8に対して、少なくとも65%同一性、好ましくは少なくとも70%同一性を有する。好ましい実施態様において、本発明によるNT部分は、コンセンサスアミノ酸配列の配列番号8に対して、更に70%、好ましくは80%の類似性を有する。

【0067】

本発明による代表的なNT部分は、ユープロステノプス オーストラリス(*Euprosthenops australis*)配列の配列番号6である。本発明の好ましい実施態様によれば、NT部分は、配列番号6又は図2の個々の何れかのアミノ酸配列（配列番号45 - 58）に対して、少なくとも80%同一性を有する。本発明の好ましい実施態様において、NT部分は、配列番号6又は図2の個々の何れかのアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、例えば少なくとも95%同一性を有する。本発明の好ましい実施態様において、NT部分は配列番号6又は図2の個々の何れかのアミノ酸配列に対して、特にEaMaSp1(配列番号45)に対して同一である。

【0068】

NT部分は100から160アミノ酸残基を含む。NT部分は、少なくとも100、又は110を上回る、好ましくは120を上回るアミノ酸残基を含むことが望まれる。また、NT部分は、多くても160、又は140未満のアミノ酸残基を含むことが望まれる。典型的なNT部分は約130から140アミノ酸残基を含む。

【0069】

融合タンパク質は、クモ系タンパク質の反復断片に由来する任意の部分を含んでいない。クモ系タンパク質の反復断片に由来し、従って本融合タンパク質に欠けている典型的な部分はREP部分、即ち、クモ系タンパク質の反復断片に由来する70から300アミノ酸残基を含んでなるタンパク質断片である。REP部分を欠いた融合タンパク質において、B部分の、その抗原ターゲットよりも他の分子に対する非特異的結合は、有利なことに更にもっと減少することが観察されている。また固体構造がREP部分を欠く融合タンパク質から自発的に形成されることは特に驚くべきことである。

【0070】

REP部分は、アラニンリッチストレッチとグリシンリッチストレッチの間で交互に反復特性を有する。REP部分は、一般に、70を上回る、例えば140を上回り、及び300未満、好ましくは240未満、例えば200未満のアミノ酸残基を含み、下記により詳細に説明されるように、それ自身を幾つかのL(リンカー)セグメント、A(アラニンリッチ)セグメント及びG(グリシンリッチ)セグメントに分割することができる。典型的には、前記リンカーセグメントは任意であって、REP部分の末端に位置しており、一方残りのセグメントは順にアラニンリッチ及びグリシンリッチである。従って、REP部分は一般的に以下の構造のどちらかを有することができ、ここでnは整数である。

L(AG)<sub>n</sub>L、例えばLA<sub>1</sub>G<sub>1</sub>A<sub>2</sub>G<sub>2</sub>A<sub>3</sub>G<sub>3</sub>A<sub>4</sub>G<sub>4</sub>A<sub>5</sub>G<sub>5</sub>L；

L(AG)<sub>n</sub>AL、例えばLA<sub>1</sub>G<sub>1</sub>A<sub>2</sub>G<sub>2</sub>A<sub>3</sub>G<sub>3</sub>A<sub>4</sub>G<sub>4</sub>A<sub>5</sub>G<sub>5</sub>A<sub>6</sub>L；

10

20

30

40

50

$L(GA)_nL$ 、例えば  $LG_1A_1G_2A_2G_3A_3G_4A_4G_5A_5L$ ；又は  
 $L(GA)_nGL$ 、例えば  $LG_1A_1G_2A_2G_3A_3G_4A_4G_5A_5G_6L$ 。  
アラニンリッチセグメント又はグリシンリッチセグメントは、N末端又はC末端のリンカーセグメントに隣接しているかどうかは重要ではないということになる。nは2から10の整数、好ましくは2から8、好ましくは4から8、より好まれるのは4から6であり、即ち、 $n=4$ 、 $n=5$ 、又は $n=6$ である。

【0071】

REP部分のアラニン含有量は、典型的には20%を超え、好ましくは25%を超え、より好ましくは30%を超え、及び50%未満、好ましくは40%未満、より好ましくは35%未満である。

10

【0072】

次に、REP部分を構成するセグメントに目を向けると、各々のセグメントは個別であり、即ち、特定のREP部分の任意の2つのAセグメント、任意の2つのGセグメント、又は任意の2つのLセグメントは同一であるか又は同一でない場合がある。従って、セグメントの各タイプが特定のREP部分内で同一であることは一般的特徴ではない。むしろ、以下の開示は、REP部分をどのように同定するかのガイドラインを当業者に提供し、そのことにより、それはクモ糸タンパク質の反復断片に由来すると考えられ、かつ、それは本発明に係る機能性融合タンパク質の一部を構成しない。

【0073】

各個々のA断片は、8から18アミノ酸残基を有するアミノ酸配列である。これらのアミノ酸残基の大部分はアラニン残基である。より具体的には、アミノ酸残基の0から3はアラニン残基ではなく、残りのアミノ酸残基がアラニン残基である。従って、各個別のAセグメントの全てのアミノ酸残基は、例外なく、又は1つ、2つ又は3つのアミノ酸残基が任意のアミノ酸であって良い例外を除き、アラニン残基である。アラニン置換アミノ酸は天然のアミノ酸であり、好ましくは、セリン、グルタミン酸、システイン、及びグリシン、より好ましくはセリンから個別に選択される。もちろん、一以上のAセグメントが全てアラニンセグメントであり、一方、残りのAセグメントが1から3の非アラニン残基、例えばセリン、グルタミン酸、システイン又はグリシンなどを含有することは可能である。

20

【0074】

各個々のAセグメントは、典型的には、配列番号10のアミノ酸残基7-19、43-56、71-83、107-120、135-147、171-183、198-211、235-248、266-279、294-306、330-342、357-370、394-406、421-434、458-470、489-502、517-529、553-566、581-594、618-630、648-661、676-688、712-725、740-752、776-789、804-816、840-853、868-880、904-917、932-945、969-981、999-1013、1028-1042及び1060-1073の群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは95%、最も好ましくは100%同一性を有する。この群の各配列は、ユープロステノプス オーストラリス(*Euprosthops australis*) Masp1タンパク質の天然に生じる配列のセグメントに対応し、これは対応するcDNAのクローニングから推定される。国際公開第2007/078239号を参照。あるいは、各個々のAセグメントは、配列番号3のアミノ酸残基143-152、174-186、204-218、233-247及び265-278の群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは95%、最も好ましくは100%同一性を有する。

30

40

【0075】

更に、実験データから、各個々のGセグメントは12から30アミノ酸残基のアミノ酸配列であることが結論付けられている。個々のGセグメントは14から23アミノ酸残基から成ることが好ましい。各Gセグメントの少なくとも40%のアミノ酸残基はグリシン

50

残基である。典型的には、各個々のGセグメントのグリシン含量は、40から60%の範囲にある。

【0076】

各個々のGセグメントは、典型的には、配列番号10のアミノ酸残基20-42、57-70、84-106、121-134、148-170、184-197、212-234、249-265、280-293、307-329、343-356、371-393、407-420、435-457、471-488、503-516、530-552、567-580、595-617、631-647、662-675、689-711、726-739、753-775、790-803、817-839、854-867、881-903、918-931、946-968、982-998、1014-1027、1043-1059及び1074-1092の群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは95%、最も好ましくは100%同一性を有する。この群の各配列は、ユープロステノプス オーストラリス(*Euprostenops australis*) M a S p 1タンパク質の天然に生じる配列のセグメントに対応し、これは対応するcDNAのクローニングから推定される。国際公開第2007/078239号を参照。あるいは、各個々のGセグメントは、配列番号3のアミノ酸残基153-173、187-203、219-232、248-264及び279-296の群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは95%、最も好ましくは100%同一性を有する。この群の各配列は、発現された、非天然クモ糸タンパク質のセグメントに対応し、そのタンパク質は適切な条件下で糸構造を形成する能力を有する。従って、各個々のGセグメントは、上述のアミノ酸セグメントから選択されたアミノ酸配列に対して同一とすることができる。

10

20

【0077】

本発明によれば、Gセグメントの3つのサブタイプがある。この分類は、ユープロステノプス オーストラリス(*Euprostenops australis*) M a S p 1タンパク質配列(国際公開第2007/078239号)の注意深い解析に基づいており、その情報は、新規な非天然クモ糸タンパク質の構築において用いられ検証されている。

【0078】

Gセグメントの第一のサブタイプは、アミノ酸の一文字コンセンサス配列GQGG(G/S)QGG(Q/Y)GG(L/Q)GQGGYGQGA GSS(配列番号11)により表わされる。この第一の、そして一般的に最長のGセグメントサブタイプは、典型的には、23アミノ酸残基を含むが、わずか17アミノ酸残基しか含まない場合もあり、荷電残基を欠損するか又は一つの荷電残基を含む。従って、この第一のGセグメントサブタイプは、典型的には17から23アミノ酸残基を含むが、わずか12又は30ものアミノ酸残基を含み得ることが意図されている。この第一のサブタイプの代表的なGセグメントは、アミノ酸配列10のアミノ酸残基20-42、84-106、148-170、212-234、307-329、371-393、435-457、530-552、595-617、689-711、753-775、817-839、881-903、946-968、1043-1059及び1074-1092である。所定の実施態様において、この第一のサブタイプの各Gセグメントの最初の2つのアミノ酸残基は、-Gln-Gln-ではない。

30

40

【0079】

本発明によるGセグメントの第二のサブタイプは、アミノ酸の一文字コンセンサス配列GQGGQGG(G/R)YGQG(A/S)G(S/G)S(配列番号12)により表わされる。この第二の、一般には中規模の、Gセグメントサブタイプは、典型的には17アミノ酸残基を含み、荷電残基を欠損するか又は一つの荷電残基を含む。この第二のGセグメントサブタイプは、典型的には14から20アミノ酸残基を含むが、わずか12又は30ものアミノ酸残基を含み得ることが意図されている。この第二のサブタイプの代表的なGセグメントは、配列番号10のアミノ酸残基249-265、471-488、631-647及び982-998、及び配列番号3のアミノ酸残基187-203である

50

。

## 【0080】

Gセグメントの第三のサブタイプは、アミノ酸の一文字コンセンサス配列G(R/Q)GQG(G/R)YGQG(A/S/V)GGN(配列番号13)により表わされる。この第三のGセグメントサブタイプは、典型的には14アミノ酸残基を含み、一般的にはGセグメントサブタイプの最短である。この第三のGセグメントサブタイプは、典型的には12から17アミノ酸残基を含むが、23ものアミノ酸残基を含み得ることが意図されている。この第一のサブタイプの代表的なGセグメントは、アミノ酸配列10のアミノ酸残基57-70、121-134、184-197、280-293、343-356、407-420、503-516、567-580、662-675、726-739、790-803、854-867、918-931、1014-1027；及び配列番号3のアミノ酸残基219-232である。

10

## 【0081】

従って、好ましい実施態様において、各個々のGセグメントは、配列番号11、配列番号12、及び配列番号13から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一性を有する。

## 【0082】

REP部分のAセグメントとGセグメントの交互配列の好ましい実施態様において、全ての第二のGセグメントは第一のサブタイプのものであり、一方残りのGセグメントは第三のサブタイプ、例えば、 $\dots A_1 G_{\text{短い}} A_2 G_{\text{長い}} A_3 G_{\text{短い}} A_4 G_{\text{長い}} A_5 G_{\text{短い}} \dots$ である。REP部分のその他の好ましい実施態様において、第二のサブタイプの一つのGセグメントが、挿入、例えば $\dots A_1 G_{\text{短い}} A_2 G_{\text{長い}} A_3 G_{\text{中程度}} A_4 G_{\text{短い}} A_5 G_{\text{長い}} \dots$ を介して規則的にGセグメントを中断する。

20

## 【0083】

各個々のLセグメントは、任意のリンカーアミノ酸配列を表わし、0から20アミノ酸残基、例えば0から10アミノ酸残基を包含しうる。また、ユープロステノプスオーストラリス(*Euprosthénops australis*)由来のMasp1タンパク質の推定アミノ酸配列の反復部分(配列番号10)に存在するリンカーアミノ酸配列もある。特に、リンカーセグメントのアミノ酸配列は、記載されたAセグメント又はGセグメントの何れかに似ている可能性があるが、一般的には、本明細書で定義されるような基準を満たすには十分でない

30

。

## 【0084】

代表的なLセグメントは、配列番号10のアミノ酸残基1-6及び1093-1110；配列番号3のアミノ酸残基138-142であるが、当業者は、これらのセグメントについて多くの適切な代替アミノ酸配列があることを容易に認識するであろう。REP部分の一実施態様において、Lセグメントの一つは0アミノ酸を含む、即ち、Lセグメントの一つを欠いている。REP部分のその他の実施態様において、両方のLセグメントが0アミノ酸を含む、即ち、両方のLセグメントを欠いている。従って、REP部分のこれらの実施態様は、以下のように模式的に表わすことができる； $(AG)_n L$ 、 $(AG)_n AL$ 、 $(GA)_n L$ 、 $(GA)_n GL$ ； $L(AG)_n$ 、 $L(AG)_n A$ 、 $L(GA)_n$ 、 $L(GA)_n G$ ；及び $(AG)_n$ 、 $(AG)_n A$ 、 $(GA)_n$ 、 $(GA)_n G$ 。

40

## 【0085】

融合タンパク質は、クモ系タンパク質の反復断片に由来する任意の部分を含んでいない、即ち、それは反復クモ系タンパク質に対して低程度の同一性及び/又は類似性を持つか、或いは全く同一性及び/又は類似性を持たない。本発明による融合タンパク質の配列は、ここで開示された反復スピドロインアミノ酸配列の何れか、特に配列番号10から13の何れかに対して、30%未満の同一性、例えば20%未満の同一性、好ましくは10%未満の同一性を有する。

## 【0086】

B部分は、30アミノ酸残基以上を含むタンパク質又はポリペプチド断片である。B部

50



分は、好ましくは50アミノ酸残基以上、例えば100アミノ酸残基以上を含んでいる。B部分は、好ましくは1000アミノ酸残基未満、例えば400アミノ酸残基未満、より好ましくは300アミノ酸残基未満を含んでいる。それは有機ターゲットと選択的相互作用することができ、有機ターゲットと選択的相互作用する能力を与えるのは融合タンパク質のB部分である。

【0087】

B部分は非スピドロイン部分である。このことは、それがクモ系タンパク質から由来しない、即ちクモ系タンパク質に対して低程度の同一性及び/又は類似性を持つか、或いは全く同一性及び/又は類似性を持たないことを意味する。本発明によるB部分の配列は、ここで開示されたスピドロインアミノ酸配列の何れか、特に配列番号6から10の何れかに対して、30%未満の同一性、例えば20%未満の同一性、好ましくは10%未満の同一性を有する。

10

【0088】

B部分を選択することは当業者の能力の範囲内と見なされる。にもかかわらず、B部分として有用であると証明され得る親和性リガンドの例、並びに検出及び/又は定量化のための形態と条件の例が説明の目的で下に与えられる。

【0089】

親和性リガンドの選択に必要とされる生物分子の多様性は、複数の可能性のある足場分子の一つの組み合わせ操作により生成することができ、次いで、特異的及び/又は選択的親和性リガンドが適切な選択プラットフォームを用いて選択される。有機ターゲットに対する親和性リガンドを生成するために有用なそのような構造の非限定的な例として、ブドウ球菌タンパク質及びそれらのドメイン及びZドメイン等のこれらのドメインの誘導体 (Nord K et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:772-777); リポカリン (Beste G et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:1898-1903); アンキリンリピートドメイン (Binz HK et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 332:489-503); セルロース結合ドメイン (CBD) (Smith GP et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 277:317-332; Lehtioe J et al. (2000) *Proteins* 41:316-322); クリスタリン (Fiedler U and Rudolph R、国際公開第01/04144号); 緑色蛍光タンパク質 (GFP) (Peelle B et al. (2001) *Chem. Biol.* 8:521-534); ヒトの細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4 (CTLA-4) (Hufton SE et al. (2000) *FEBS Lett.* 475:225-231; Irving RA et al. (2001) *J. Immunol. Meth.* 248:31-45); ノッティン (knottin) タンパク質などのプロテアーゼ阻害剤、(Wentzel A et al. (2001) *J. Bacteriol.* 183:7273-7284; Baggio R et al. (2002) *J. Mol. Recognit.* 15:126-134) 及びクニツドメイン (Roberts BL et al. (1992) *Gene* 121:9-15; Dennis MS and Lazarus RA (1994) *J. Biol. Chem.* 269:22137-22144); PDZドメイン (Schneider S et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:170-175); オレドキシニンなどペプチドアプタマー (Lu Z et al. (1995) *Biotechnology* 13:366-372; Klevenz B et al. (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1993-1998); ブドウ球菌ヌクレアーゼ (Norman TC et al. (1999) *Science* 285:591-595); テンダミスタット (tendamistats) (McConnell SJ and Hoess RH (1995) *J. Mol. Biol.* 250:460-479; Li R et al. (2003) *Protein Eng.* 16:65-72); フィブロネクチンIII型ドメインに基づくトリネクチン (Koide A et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 284:1141-1151; Xu L et al. (2002) *Chem. Biol.* 9:933-942); 及び垂鉛フィンガー (Bianchi E et al. (1995) *J. Mol. Biol.* 247:154-160; Klug A (1999) *J. Mol. Biol.* 293:215-218; Segal DJ et al. (2003) *Biochemistry* 42:2137-2148); アドネクチン (adnectin); アンチカリン (anticalin); DARPin; アフィリン (affilin) 及びアビマー (avimer) があげられる。

20

30

40

【0090】

上記の例は、新規の結合特異性の生成に使用される単一のランダム化されたループを提示する足場タンパク質、タンパク質表面から突出する側鎖が、新規の結合特異性を生成するためにランダム化されている強固な二次構造を有するタンパク質の足場、及び新規結合特異性の生成のために使用される非連続的な超可変ループ領域を示す足場を含む。

50

オリゴヌクレオチドはまた親和性リガンドとして使用することができる。アプタマーもしくはデコイと呼ばれる一本鎖核酸は、明確に定義された三次元構造にフォールドし、高い親和性と特異性でそれらのターゲットに結合する(Ellington AD and Szostak JW (1990) Nature 346:818-822; Brody EN and Gold L (2000) J. Biotechnol. 74:5-13; Mayer G and Jenne A (2004) BioDrugs 18:351-359)。オリゴヌクレオチドリガンドは、RNA又はDNAの何れかとすることができ、ターゲット分子のクラスの広い範囲に結合することができる。

#### 【0091】

上述の足場構造体の任意の変異体のプールからの所望の親和性リガンドの選択において、多くの選択プラットフォームが、選択した標的タンパク質に対する特異的新規リガンドの単離のために利用することができる。選択プラットフォームは、限定されないが、フェージディスプレイ(Smith GP (1985) Science 228:1315-1317)、リボソームディスプレイ(Hanes J and Plueckthun A(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:4937-4942)、酵母2-ハイブリッド系(Fields S and Song O (1989) Nature 340:245-246)、酵母ディスプレイ(Gai SA and Wittrup KD (2007) Curr Opin Struct Biol 17:467-473)、mRNAディスプレイ(Roberts RW and Szostak JW (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12297-12302)、細菌ディスプレイ(Daugherty PS (2007) Curr Opin Struct Biol 17:474-480, Kronqvist N et al. (2008) Protein Eng Des Sel 1-9, Harvey BR et al. (2004) PNAS 101(25):913-9198)、マイクロビーズディスプレイ(Nord O et al. (2003) J Biotechnol 106:1-13、国際公開第01/05808号)、SELEX(System Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk C and Gold L (1990) Science 249:505-510)及びタンパク質断片相補アッセイ(PCAA)(Remy I and Michnick SW (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:5394-5399)を含む。免疫グロブリン、アルブミン、又は他の有機ターゲットに対する親和性を持つB部分の好ましい群は、細菌レセプチンドメイン又はその誘導体である。

#### 【0092】

B部分の好ましい群は、免疫グロブリン及び免疫グロブリン又はその誘導体、例えばIgGの結晶化可能断片(Fc)領域を含む分子と選択的相互作用することができる。免疫グロブリンサブクラスの好ましい群は、ブドウ球菌プロテインAに由来するZドメインによって認識されるサブクラスである。即ち、ヒト由来のIgG1、IgG2、IgG4、IgA及びIgM、ウサギ及びウシ由来の全Igサブクラス、モルモット由来のIgG1とIgG2、及びマウス由来のIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3及びIgM(Hober, S. et al., J. Chromatogr B. 848:40-47 (2007)を参照)、より好ましくはヒト由来の免疫グロブリンサブクラスのIgG1、IgG2、IgG4、IgA及びIgMである。Zドメインは、ブドウ球菌タンパク質の免疫グロブリンG(IgG)結合ドメインBの改変版であり、IgGの結晶化(Fc)領域断片に結合する58アミノ酸長の三重らせんモチーフである。免疫グロブリンサブクラスの別の好ましい群は、C2ドメイン連鎖球菌プロテインGによって認識されるサブクラス、即ち、IgG3を含む全ヒトサブクラス、及びマウス、ウサギ及びヒツジを含む数種の動物由来のIgGである。

#### 【0093】

好ましいB部分の一群は、ブドウ球菌プロテインAに由来するZドメイン、ブドウ球菌タンパク質及びそのドメイン、好ましくはE、D、A、B及びCドメイン、連鎖球菌プロテインG及びそのドメイン、好ましくはC1、C2及びC3ドメイン；及びこれらのアミノ酸配列のいずれかに対して、少なくとも70%同一性、例えば少なくとも80%同一性、又は少なくとも90%同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される。好ましくは、B部分は、ブドウ球菌プロテインAに由来するZドメイン、ブドウ球菌タンパク質のBドメイン、及び連鎖球菌プロテインGのC2ドメイン；及びこれらのアミノ酸配列のいずれかに対して、少なくとも70%同一性、例えば少なくとも80%同一性、又は少なくとも90%同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される。好ましくは、B部分は、ブドウ球菌プロテインAに由来するZドメイン、及びこのアミノ酸配列に対し

10

20

30

40

50

て、少なくとも70%同一性、例えば少なくとも80%同一性、又は少なくとも90%同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される。B部分はブドウ球菌プロテインAに由来するZドメイン及び連鎖球菌プロテインGのC2ドメインからなる群から選択されるのが望ましい。免疫グロブリンに対する親和性を持つB部分の好ましい群は、細菌レセプチンドメイン又はその誘導体である。

**【0094】**

好ましいB部分の別の群は、アルブミン及びアルブミン又はその誘導体を含む分子と選択的相互作用することができる。アルブミンに対する親和性を持つB部分の好ましい群は、細菌レセプチンドメイン又はその誘導体である。好ましいB部分は、連鎖球菌プロテインG、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメイン、*Finnegoldia magna*由来のGAモジュール；及びこれらのアミノ酸配列のいずれかに対して、少なくとも70%同一性、例えば少なくとも80%同一性、又は少なくとも90%同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される。好ましくは、B部分は、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメイン、及びこのアミノ酸配列に対して、少なくとも70%同一性、例えば少なくとも80%同一性、又は少なくとも90%同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される。B部分は連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメインであることが望ましい。

10

**【0095】**

好ましいB部分の更なる群は、ビオチン及びビオチン又はその誘導体若しくは類似体を含む分子と選択的相互作用が可能である。好ましいB部分は、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン(M4)；及びこれらのアミノ酸配列のいずれかに対して、少なくとも70%同一性、例えば少なくとも80%同一性、又は少なくとも90%同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される。B部分は単量体ストレプトアビジン(M4)であることが望ましい。

20

**【0096】**

好ましいB部分の別の群は、酵素的触媒される反応において基質と選択的に相互作用することができる酵素である。好ましい酵素B部分は、キシラナーゼ及びリゾチームが含まれる。

**【0097】**

好ましいB部分の別の群は、細胞増殖を刺激し得る増殖因子である。好ましい増殖因子のB部分は、上皮成長因子(EGF)、特にヒトEGF、線維芽細胞増殖因子2(FGF2)、神経成長因子1(NGF1)及び間質細胞由来因子1(SDF1)が含まれる。

30

**【0098】**

本発明に係る具体的な融合タンパク質及びタンパク質構造は実施例に与えられる。これらの好ましい融合タンパク質は、配列番号61-66、68、70、72、74、76、80、82、84及び86からなる群を形成する。更なる好ましい融合タンパク質は、これらのアミノ酸配列の何れかに対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%同一性を有している。

**【0099】**

本発明は、本発明による融合タンパク質をコードする単離された核酸を更に提供する。具体的には、特定の核酸は、実施例及び添付配列表で提供される。更に好ましい核酸は、配列番号61-66、68、70、72、74、76、80、82、84及び86の何れかに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%同一性を有する融合タンパク質をコードする。

40

**【0100】**

本発明に係る核酸は、本発明の融合タンパク質を産生するのに有用である。本発明は、融合タンパク質の生産方法を提供する。第一の工程は、本発明に係る融合タンパク質を適切な宿主で発現することを含む。適切な宿主は、当業者に周知であり、例えば、細菌細胞及び真核細胞、例えば、酵母、昆虫細胞株及び哺乳動物細胞株などを含む。典型的には、この工程は、大腸菌中で融合タンパク質をコードする核酸分子の発現を含む。

50

## 【0101】

第二の方法の工程では、融合タンパク質を含有する混合物を得ることを含む。混合物は、例えば、宿主細胞を溶解又は機械的に破壊することによって得ることができる。融合タンパク質が宿主細胞によって分泌される場合に、混合物はまた、細胞培養培地を収集することによって得ることができる。このようにして得られたタンパク質は、標準的な手順を用いて単離することができる。必要であれば、この混合物を遠心分離にかけて、適切な画分（沈殿物又は上清）を収集することができる。融合タンパク質を含有する混合物はまた、分離させるために、ゲルろ過クロマトグラフィー、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー、透析法、相分離又は濾過に供することができる。任意で、リポ多糖及び他の発熱物質がこの段階で積極的に除去される。必要ならば、リンカーペプチドは、この工程で切断することによって除去することができる。

10

## 【0102】

本発明によるタンパク質構造又は形態は、適切な条件下で、本発明に係る融合タンパク質から自発的に構築され、ポリマーへの構築は剪断力の存在、及び/又は2つの異なる相の間、例えば固体と液体相との間、空気と液相との間の界面、又は疎水性/親水性界面、例えば、鉱物油-水界面によって促進される。得られた界面の存在は、界面において又は界面周囲の領域において重合を刺激し、その領域は前記重合が前記界面又は前記界面領域で開始するように、液体培地に広がっている。種々のタンパク質構造が、構築の最中に条件を適合させることにより生成することができる。例えば、その構築を軽く左右に振られる容器中で生じさせる場合、繊維が、空気-水界面に形成される。混合物を静置する場合、薄膜が空気-水界面に形成される。混合物を蒸発させる場合、薄膜は容器の底部に形成される。油が水性混合物に添加される場合、静置した場合又は振った場合に、薄膜が、油-水界面に形成される。この混合物を例えば空気のバブリング又は泡立てにより発泡させる場合、発泡体は安定し、乾燥させた場合に固化する。

20

## 【0103】

従って、本発明は、有機ターゲットに対する結合親和性を示すタンパク質構造を与えるための方法を提供する。第一の方法工程にて、本発明による組換え融合タンパク質が与えられる。融合タンパク質は、本発明による核酸から、適切な宿主中でそれを発現させることにより与えられ得る。第二の方法工程にて、融合タンパク質は組換え融合タンパク質を含むポリマーの形成を達成するための条件にさらされる。特に、自発的に構築されたタンパク質構造はヘキサフルオロイソプロパノールに可溶化することができるが、可溶化された融合タンパク質は、その後自発的に、例えば繊維に、再構築できない。

30

## 【0104】

タンパク質構造は、有機ターゲットの固定化用の親和性培地の一部として有用であり、ここでB部分は有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。サンプル、例えば生物学的サンプルは、生物学的サンプルに存在する有機ターゲットに結合することができる本発明による融合タンパク質又はタンパク質構造に適用することができ、その融合タンパク質又はタンパク質構造はその後サンプルからの有機ターゲットの分離に有用である。生物学的サンプル、例えば被験体から除去された血液、血清又は血漿などは、有機ターゲットの検出、分離及び/又は定量化を受ける。

40

## 【0105】

従って本発明はサンプルからの有機ターゲットの分離のための方法を与える。サンプル、例えば、有機ターゲットを含む血液、血清又は血漿が与えられる。生物学的サンプルは、前に得られた試料である場合がある。もし以前に得たサンプルを方法で用いる場合、本方法の工程はヒト又は動物の体で実施されない。

## 【0106】

本発明による親和性培地は、本発明による融合タンパク質又はタンパク質構造を含んで与えられる。所定の実施態様にて、親和性培地は、本発明による融合タンパク質又はタンパク質構造を含有している。親和性培地は、本発明による融合タンパク質のB部分を用いて、有機ターゲットと選択的相互作用することができる。親和性培地は、親和性培地と有

50

機ターゲット間の結合を達成するために適した条件下でサンプルと接触される。結合しないサンプルは、親和性培地と有機ターゲット間の選択的結合を維持するために適した条件下で除去される。本方法は親和性培地、特に本発明による融合タンパク質に固定化した有機ターゲットを生じる。

【0107】

本発明による好ましい方法にて、親和性培地中の融合タンパク質は、親和性培地と有機ターゲット間の結合を達成するために親和性培地とサンプルを接触させると、本発明によるタンパク質構造として存在する。

【0108】

この点において特に有用なタンパク質構造は、薄膜又は繊維であり、B部分はブドウ球菌プロテインAに由来するZドメイン又はそれに対して少なくとも70%同一性、例えば少なくとも80%同一性、又は少なくとも90%同一性を有するタンパク質断片である。薄膜は、固体支持体、例えばマイクロタイタープレートのプラスチックへ付着するという点で有利である。薄膜のこの特性は、洗浄と再生手順を容易にし、分離の目的に非常に有用である。

10

【0109】

Zドメインのアルカリ安定性は、本発明によるタンパク質構造中で本発明による融合タンパク質の部分であるときに更に拡張することができることが驚くべきことに観察されている。この特性は洗浄及び再生目的に非常に有用であり得、例えば高濃度のNaOH、例えば0.1M、0.5M、1M又は1M以上、例えば2Mを許容し、及び/又は高濃度の尿素、例えば6~8Mを許容する。この化学的安定性はまた、アフィニティー精製のためのZドメインの使用の反復サイクルを可能にするために有用であり得る。このアルカリ安定性は、Zドメインの安定化変異体を利用することによって更に増加させることができる。更に、Zドメインを含む本発明による融合タンパク質は熱に安定であることが有利に示されている。これは固体タンパク質形態/構造並びに結合能を維持しながら、熱による殺菌を可能にする。

20

【0110】

Zドメインを含む従来の親和性マトリックスの既知の問題は、親和性マトリックスからのZドメインの漏出である。ペプチド結合によるZドメインの本発明の融合タンパク質への安定した導入のため、本発明のタンパク質構造からのZドメインの望ましくない漏出は低い又は存在しないことが考慮される。本発明による融合タンパク質の別の利点は、得られたタンパク質構造が高密度のZドメイン(又は他のB部分)を有することである。この高密度が高い結合能を与えることが熟慮される。要するに、融合タンパク質のこれらの特性は様々なB部分に対して、特に生産に無駄のないタンパク質Zを用いるアフィニティー精製に非常に魅力的である。またこれらの特性は、従来のゲルビーズアフィニティーカラム、例えば濾過様形式よりも他の形式において有用である。

30

【0111】

固定化有機ターゲットは第二有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。本方法は次いで、第一有機ターゲットと第二有機ターゲット間の選択的相互作用を達成するために適した条件下で、第一有機ターゲットとの選択的相互作用を可能とする、前記親和性培地と固定化有機ターゲットを第二有機ターゲットと接触させる工程を更に含む。

40

【0112】

固定化有機ターゲットは検出可能であるか及び/又は定量可能である。有機ターゲットの検出及び/又は定量化は、様々な生物学的又は非生物学的相互作用に基づくアッセイにおける結合試薬の検出及び/又は定量的ための当業者に既知の任意の方法で達成され得る。有機ターゲットは様々なマーカーでそれ自身が標識され得るか、或いは、検出、可視化及び/又は定量化を可能にする2次標識親和性リガンドにより同様に検出され得る。これは、当業者に既知の多くの技術の任意の一以上を使用して、任意の過度の実験を包含せずに、有機ターゲット又は任意の2次親和性リガンドに結合され得る多数の標識の任意の一以上を用いて達成することができる。有機ターゲット及び/又は二次親和性リガンドに結合

50

させることができる標識の非限定的な例は、蛍光色素又は金属（例えば、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン、フルオレスカミン）、発色色素（例えば、ロドプシン）、化学発光化合物（例えば、管腔、イミダゾール）及び生物発光タンパク質（例えば、ルシフェリン、ルシフェラーゼ）、ハプテン（例えば、ビオチン）が挙げられる。様々な他の有用なフルオロフォアと発色が、Stryer L (1968) Science 162:526-533及びBrand L and Gohlke JR (1972) Annu. Rev. Biochem. 41:843-868に記載されている。有機ターゲット及び/又は二次親和性リガンドはまた、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ラクタマーゼ）、放射性同位元素（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 又は $^{125}\text{I}$ ）及び粒子（例えば金）で標識することができる。本開示の関連において、「粒子」とは分子の標識に適した金属粒子などの粒子を指す。更に、親和性リガンドは、蛍光半導体ナノ結晶（量子ドット）で標識することができる。量子ドットは、優れた量子収率を有し、有機蛍光色素に比べて光安定であり、従って、より容易に検出される (Chan et al. (2002) Curr Opin Biotech. 13: 40-46)。異なるタイプの標識が、様々な化学、例えばアミン反応又はチオール反応を用いて有機ターゲット又は二次親和性リガンドに結合することができる。しかし、アミンとチオール以外の他の反応基、例えば、アルデヒド、カルボン酸及びグルタミンを用いることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0113】

検出及び/又は定量化が二次有機ターゲット又は二次親和性リガンドへの曝露を含む場合には、親和性培地は非結合親和性リガンドを除去するためにバッファーでもう一度洗浄される。例として、二次親和性リガンドは抗体又は断片又はその誘導体であり得る。その後、有機ターゲットは従来の方法で検出及び/又は定量化することができる。二次親和性リガンドに対する結合特性は変わることがあるが、当業者は日常の実験による各々の決定について、操作的で最適なアッセイ条件を決定することができるべきである。

#### 【0114】

標識分子の検出、局在化及び/又は定量は、例えば光学顕微鏡又は免疫蛍光顕微鏡などの可視化技術を含んでも良い。他の方法は、フローサイトメトリー又は発光測定を介した検出を含むことができる。標識の可視化の方法としては、限定されるものではないが、蛍光、発光測定及び/又は酵素的技術を含むことができる。蛍光は、特定の波長の光に蛍光標識を露光し、その後、特定の波長領域で放射された光を検出及び/又は定量化することによって検出及び/又は定量化される。発光タグ付けされた分子の存在は、化学反応の最中に生じた発光により検出及び/又は定量化され得る。酵素反応の検出は、化学反応から生じるサンプル中の色ずれによるものである。当業者は、様々な異なるプロトコルが適切な検出及び/又は定量化するために変更可能であることを認識している。

#### 【0115】

有機ターゲットの検出及び/又は定量化のための一つの利用可能な方法は、それ或いは二次親和性リガンドを、後に酵素免疫測定法（例えば、EIA又はELISAなど）で検出及び/又は定量化可能である酵素に結合させることによる。そうした技術は十分に確立されており、その実現には当業者に不当な困難を提示しない。そうした方法において、生物学的サンプルは、有機標的に結合する本発明に係るタンパク質構造と接触させられ、その後酵素的に標識された二次親和性リガンドで検出及び/又は定量化される。この後、適切な基質を適切な緩衝液中で酵素標識と反応させ化学的部分を生成し、それは例えば分光光度計、蛍光光度計、ルミノメーターを使用するか又は視覚的な手段により検出及び/又は定量化される。

#### 【0116】

有機ターゲット又は二次親和性リガンドは、検出及び/又は定量化を可能にするために放射性同位体で標識することができる。本開示の適切な放射性標識の非限定的な例は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 又は $^{125}\text{I}$ である。標識した親和性リガンドの特異的活性は、放射性標識の半減期、同位体の純度、及びどのように標識が親和性リガンドに組み込まれているのかに依存する。親和性リガンドは、好ましくは、周知の技術を用いて標識される (Wensel TG and Meares CF (1983) in: Radioimmunoimaging and Radioimmunothera

py (Burchiel SW and Rhodes BA eds.) Elsevier, New York, pp 185-196)。このように放射性標識された親和性リガンドは、放射能の検出による有機ターゲットを視覚化するために使用することができる。放射性核種のスキャンニングは、例えばガンマカメラ、磁気共鳴分光法、放射トモグラフィ、ガンマ/ベータカウンター、シンチレーションカウンター及びラジオグラフ(radiographies)で行うことができる。

#### 【0117】

従って、サンプルは、有機ターゲットの検出、分離及び/又は定量化のためのタンパク質構造に適用することができる。この手順は有機ターゲットの検出を可能にするだけでなく、その分布とその発現の相対的水準を更に示し得る。任意で、有機ターゲットは親和性培地から遊離され回収することができる。従って、本用途は有機ターゲットが固定化されている親和性培地上でのアフィニティー精製を含んでも良い。タンパク質構造は、カラム又はウェルプレート(例えば、96ウェルプレートなど)中又は磁気ビーズ、アガロースビーズ又はセファロースビーズに例えば配置されても良い。更に、本用途は、例えばデキストラマトリックスを用いる水溶性マトリックス上でのタンパク質構造の使用、又は、Biacore<sup>TM</sup>機器などの表面プラズモン共鳴装置での使用を含んでも良く、その分析は、例えば固定化された有機ターゲット又は数多くの潜在的な親和性リガンドに対する親和性をモニタリングすることを含んでもよい。

#### 【0118】

本発明に係るタンパク質構造は、酸、塩基及びカオトロピック剤を含む様々な洗浄剤で洗浄し、再生することができる。特に有用な洗浄剤は、例えば、0.1、0.5又は1MのNaOHのような水酸化ナトリウム又は例えば6-8M尿素などの尿素を含む。本発明に係るタンパク質構造は、驚くべきことに、化学処理及び/又は滅菌加熱処理に対して耐性であるため、本タンパク質構造の使用を伴う本発明による方法は、タンパク質構造の再生の最終工程を含み得る。本方法は、好ましくは、化学的処理及び/又は滅菌熱処理による親和性培地の再生の最終工程を含む。化学的処理は例えば、0.1、0.5又は1MのNaOHのような水酸化ナトリウム又は例えば6-8M尿素などの尿素による処理を含む。

#### 【0119】

本発明に係る融合タンパク質はまた、融合タンパク質を重合させ、例えば、薄膜、発泡体又は繊維などのタンパク質構造を形成することができるようにする前に、溶液中の有機ターゲットに結合させることができる。そのようなスピドロイン由来部分(例えばCT)及びB部分を組み込んだ対応する融合タンパク質は両方とも、夾雑タンパク質の存在下においてさえも、材料中に感知できるほどの夾雑物が取り込まれることなく、固体構造に重合し、その機能性(B)部位はそれらの期待される結合特性を保持する。従って、B部分の結合特性は周囲の溶液由来の化合物又は細胞を捕捉し、その捕捉された化合物又は細胞を本発明によるタンパク質構造の中に組み込むために用いることができる。

#### 【0120】

従って、本発明による別の好ましい方法にて、親和性培地中の融合タンパク質は、親和性培地と有機ターゲット間の結合を達成するために親和性培地とサンプルを接触させると溶液中に存在する。有機ターゲットに結合した融合タンパク質の複合体は、その後、本発明による融合タンパク質を形成させられる。

#### 【0121】

この方法は、その目的が、溶液から特定の分子や細胞を「取り出す」こと、例えば標的タンパク質が分泌されるときに、大規模な真核細胞生産系の培地から標的分子を得ることであるときに特に有用である。スピドロイン由来部分による標的分子の結合と固体構造の形成を生理学的条件下で行うことができるため、及びスピドロイン由来部分が細胞適合性(cytocompatible)であるゆえ、本方法は、継続的な生産工程に対して繰り返し適用することができる。

#### 【0122】

本発明によるタンパク質構造はまた細胞の分離、固定化、及び/又は培養に有用である

。この点で特に有用なタンパク質構造は、薄膜、繊維又は発泡体である。薄膜は、固体構造、例えばマイクロタイプレートのプラスチックへ付着するという点で有利である。薄膜のこの特性は、洗浄と再生手順を容易にし、選択的検出と分離の目的に非常に有用である。

#### 【0123】

従って、本発明は、細胞表面上に存在する有機ターゲットを有する細胞の培養のための細胞足場材料を提供する。細胞足場材料は、本発明に係るタンパク質構造を含んでいる。所定の実施態様にて、細胞足場材料は、本発明によるタンパク質構造からなる。

#### 【0124】

本発明の融合タンパク質を含む、及び任意で該タンパク質からなるポリマーを含む細胞足場材料は、様々な異なる環境設定下で、細胞、好ましくは真核細胞のの培養のために有益な環境を提供することが本発明者らによって見いだされている。更に、この環境は、それ以外の場合には非常に難しい、実験室で培養するには非常に費用がかかるか又は不可能でさえある細胞の培養の確立及び、組織工学及び/又は移植に有用な材料を含有する細胞の樹立について可能としている。

10

#### 【0125】

本発明はまた、細胞、好ましくは真核細胞と本発明による細胞足場材料の組み合わせを提供する。本発明によるそうした組み合わせは、様々な異なる形態において提示され、及び特定の状況の必要性に合わせて調整され得る。例えば、本発明の組み合わせは、損傷又は疾患組織での細胞の置換のための細胞含有移植片として有用であり得ることを意図している。

20

#### 【0126】

細胞足場材料は、直接的又は間接的に細胞を捕捉するために利用することができる。直接捕捉において、B部分は、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。あるいは、B部分は、中間体有機ターゲットと選択的相互作用が可能で、中間体有機ターゲットに結合し、その中間体有機ターゲットは、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。従って、間接的な捕捉において、細胞足場材料は、中間体有機ターゲットを更に含んでおり、B部分は、選択的相互作用が可能であり、該中間体有機ターゲットに結合される。中間体有機ターゲットは、同様に、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。

30

#### 【0127】

本明細書に開示される細胞足場材料の一実施態様において、融合タンパク質は、さらに、オリゴペプチド細胞結合モチーフを含んでいる。特定の状況で特定の細胞の培養に関連して、オリゴペプチド細胞結合モチーフの存在は、細胞生存率を改善するか又は維持することが観察されており、クモ系タンパク質の一部として、細胞足場材料へのそのようなモチーフの包含は更なる利点を提供すると考えられる。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融合タンパク質の残りの部分に結合されたオリゴペプチドである。例えば、融合タンパク質の残りのN末端又はC末端、又はクモ系タンパク質の残りの部分のアミノ酸配列内の任意の位置に結合され得る。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、いくつかの選択肢を知っている。クモ系タンパク質の残りの部分へのオリゴペプチド細胞結合モチーフの結合は、標準的遺伝子工学又は化学結合技術を用いて当業者によって容易に達成される。従って、幾つかの実施態様において、細胞結合モチーフは、遺伝子工学、即ち、融合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一部を形成することを介して導入される。そうした実施態様のさらなる有益な特徴として、細胞結合モチーフは、細胞足場材料を構成するポリマー中で融合タンパク質の単量体に対して1:1の比率で存在するであろう。

40

#### 【0128】

本明細書に記載の方法又は組合せで使用される細胞足場材料中のポリマーは、様々な物理的形態をとることができ、特定の物理的形態の用途は、異なる特定の状況において更なる利点を供与することができる。例えば、本方法又は組合せの実施態様において、細胞足

50



場材料は、薄膜、発泡体、カプセル、繊維及び繊維メッシュからなる群から選択される物理的形態である。

【0129】

従って、本発明は、細胞の固定化のための方法を提供する。サンプル、例えば関心のある含む細胞を含有する血液などの生体試料が提供される。生物学的サンプルは、前に得られた試料である場合がある。もし以前に得たサンプルを方法で用いる場合、本方法の工程はヒト又は動物の体で実施されない。

【0130】

サンプルは、細胞足場材料及び目的の細胞の表面に存在する有機ターゲットとの間の選択的相互作用を可能にする適切な条件下で、本発明に係る細胞足場材料に対して適用される。細胞は、細胞表面の有機ターゲットと前記細胞足場材料との間の結合により、前記細胞足場材料に対して固定化される。結合しないサンプルは、細胞足場材料と有機ターゲット間の選択的結合を維持するために適した条件下で除去される。本方法は細胞足場材料、特に本発明によるタンパク質の構造に固定化されるた有機ターゲットを提示する細胞を生じる。

10

【0131】

前述に定められたように、細胞足場材料は、直接的又は間接的に細胞を捕捉するために利用することができる。直接捕捉において、B部分は、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。あるいは、B部分は、中間体有機ターゲットと選択的相互作用が可能で、中間体有機ターゲットに結合し、その中間体有機ターゲットは、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。従って、間接的な捕捉において、細胞足場材料は、中間体有機ターゲットを更に含んでおり、B部分は、選択的相互作用が可能であり、該中間体有機ターゲットに結合される。中間体有機ターゲットは、同様に、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。

20

【0132】

捕捉方法に関わらず、捕捉された細胞は、細胞足場材料から細胞捕獲に関与する部分を解放するために、融合タンパク質の切断により融合タンパク質から放出されてもよい。上述のように、融合タンパク質は、そのアミノ酸配列中に、関連部分、典型的にはB部分又は細胞結合モチーフの切断及び除去を可能にする、開裂部位を含み得る。様々な開裂部位が、例えば、化学試薬、例えばCNBrによるMet残基の後ろの開裂部位、及びヒドロキシルアミンによるAsn-Gly残基間の開裂部位、トロンピン又はプロテアーゼ3Cなどのプロテアーゼの開裂部位、及びインティン自己スプライシング配列などの自己スプライシング配列が、当業者に知られている。

30

【0133】

また、本発明は、細胞の培養の方法を提供する。目的の細胞は、上記に開示された方法を用いて細胞骨格材料に固定されている。細胞足場材料及び固定化細胞の組合せは、細胞培養に適した条件下で維持される。

【0134】

本発明の関連において、細胞の「培養」、「細胞培養」等の用語は、例えば、それらが、細胞が分裂及び/又は増殖した状況、細胞が、その自然環境に存在する場合、細胞型によって提示される少なくとも一つの機能特性を保持した分化状態に維持される状況、及び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、広義に解釈されるべきである。

40

【0135】

別の態様によれば、本発明は、タンパク質はクモ糸タンパク質の反復断片から由来する任意の部分を含んではいないという条件で、CT部分及び少なくとも一のNT部分を含む新規な組換えタンパク質を提供する。好ましい実施態様において、タンパク質は1-2のNT部分を含んでいる。

【0136】

好ましい実施態様において、組換えタンパク質は、CT部分及び少なくとも一のNT部

50

分、例えば 1 - 2 の NT 部分からなる。タンパク質は、模式的に、NT - CT、CT - NT、NTNT - CT、CT - NTNT 又は NT - CT - NT、及び好ましくは NT - CT 又は NTNT - CT として記載され得る。

【0137】

本発明による好ましい実施態様は、融合タンパク質は、配列番号 59 - 60、及びこれらの配列の何れかに対して少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95% 同一性を有するタンパク質からなる群から選択される。本発明は、本発明による組換えタンパク質をコードする単離された核酸を更に提供する。

【0138】

このタンパク質は、クモ糸タンパク質の反復断片を欠いており、従って、それが依然として、固体タンパク質構造、例えば繊維及び薄膜を形成することができることは驚くべきことである。本組換えタンパク質による利点は、それが、CT 単独あるいは NT 部分を欠くが REP を含有する対応するタンパク質よりも高収率で生産することができることである。例えば、実施例 1 - 2 を参照。

10

【0139】

本発明は、この態様による反復構造単位として、組換えタンパク質を含むポリマーであるタンパク質構造を提供する。タンパク質構造は好ましくは少なくとも 2 次元で少なくとも 0.1  $\mu\text{m}$  の大きさを有する。タンパク質構造は、好ましくは、繊維、薄膜、発泡体、網、メッシュ、球及びカプセルからなる群から選択される物理的形態である。

20

【0140】

この組換えタンパク質は、クモ糸タンパク質の反復断片に由来する任意の部分を含んでいないので、それは反復クモ糸タンパク質に対して低程度の同一性及び/又は類似性を持つか、或いは全く同一性及び/又は類似性を持たない。本発明によるタンパク質の配列は、ここで開示された反復スピドロインアミノ酸配列の何れか、特に配列番号 10 から 13 の何れかに対して、30% 未満の同一性、例えば 20% 未満の同一性、好ましくは 10% 未満の同一性を有する。

【0141】

本発明は、以下の非限定的実施例により、以下に更に説明されるであろう。

【実施例】

【0142】

実施例 1 NT - CT のクローニング、発現及び繊維形成

NT に共有結合した CT が繊維を形成することができるかを調べるため、NT - CT 融合タンパク質 (NT 部分と CT 部分) を生成し、精製した。

クローニング

His<sub>6</sub> NT - CT 融合タンパク質 (配列番号 59) をコードする遺伝子を構築した。ベクターは、カナマイシン (70  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を補充した寒天プレート上で増殖させたケモコンピテント (chemocompetent) 大腸菌 (E. coli) BL21 (DE3) 細胞に形質転換した。コロニーをその後採取し、正しい挿入のために PCR 検査をし、その後また DNA 配列を確認するために配列決定した。

30

40

【0143】

産生

pT7His<sub>6</sub>NTCT ベクターを有する大腸菌 BL21 (DE3) 細胞を、カナマイシン (70  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を補充したルリア - ベルターニ (Luria - Bertani) 培地 (全 6 リットル) で、30 で 1 - 1.5 の OD<sub>600</sub> 値まで増殖させ、次に、300  $\mu\text{M}$  の IPTG (イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド) で発現を誘導し、約 2 時間、20 でさらにインキュベートした。次に、細胞を 4700 rpm で 20 分間の遠心分離により回収し、得られた細胞ペレットを、20 mM トリス (pH 8.0) 中に溶解した。

【0144】

精製

50

20 mM トリス (pH 8.0) 中に溶解させた細胞ペレットは、細菌細胞を溶解するために、リゾチーム及び DNアーゼ I が補充され、細胞溶解物を 30 分間 15000 回転の遠心後に回収した。次に、回収した細胞溶解物を分割し、合計 4 つのキレートセファロースファーストフロー Zn<sup>2+</sup> カラムにロードし、タンパク質が His<sub>6</sub> タグを介してカラムマトリックスに結合するように保った。洗浄後、結合したタンパク質を 20 mM のトリス / 300 mM のイミダゾール (pH 8.0) で溶出した。NTCT の収率は、CT 又は Rep4CT よりも典型的に高かった。次に、プールされた溶出液を一晩、20 mM トリス (pH 8.0) の 5 リットルに対して透析し、1 mg/ml に濃縮し、最終的に繊維又は薄膜を形成させた。pH が 6.4 未満に減少した場合には、繊維はより速く形成された。

10

## 【0145】

His<sub>6</sub> NTCT の巨視的な繊維を得ることができたという事実は、CT は NT に融合されたときに繊維形成特性を保持することを実証する。

## 【0146】

実施例 2 NTNT-CT のクローニング、発現及び繊維形成

NTNT に共有結合されるものの、CT が繊維を形成することができるかを調べるため、NTNT-CT 融合タンパク質 (NTNT 部分と CT 部分) を生成し、精製した。

## クローニング

His<sub>6</sub> NTNT-CT 融合タンパク質 (配列番号 60) をコードする遺伝子を構築した。ベクターは、カナマイシン (70 µg/ml) を補充した寒天プレート上で増殖させたケモコンピテント (chemocompetent) 大腸菌 (E. coli) BL21 (DE3) 細胞に形質転換した。コロニーをその後採取し、正しい挿入のために PCR 検査をし、その後また DNA 配列を確認するために配列決定した。

20

## 【0147】

## 産生

pT7His<sub>6</sub> NTNTCT ベクターを有する大腸菌 BL21 (DE3) 細胞を、カナマイシン (70 µg/ml) を補充したルリア-ベルターニ (Luria-Bertani) 培地 (全 6 リットル) で、30 で 1-1.5 の OD<sub>600</sub> 値まで増殖させ、次に、300 µM の IPTG で発現を誘導し、約 2 時間、20 でさらにインキュベートした。次に、細胞を 4700 rpm で 20 分間の遠心分離により回収し、得られた細胞ペレット

30

## 【0148】

## 精製

20 mM トリス (pH 8.0) 中に溶解させた細胞ペレットは、細菌細胞を溶解するために、リゾチーム及び DNアーゼ I が補充され、細胞溶解物を 30 分間 15000 回転の遠心後に回収した。次に、回収した細胞溶解物を分割し、合計 4 つのキレートセファロースファーストフロー Zn<sup>2+</sup> カラムにロードし、タンパク質が His<sub>6</sub> タグを介してカラムマトリックスに結合するように保った。洗浄後、結合したタンパク質を 20 mM のトリス / 300 mM のイミダゾール (pH 8.0) で溶出した。NTNTCT の収率は、CT 又は Rep4CT よりも典型的に高かった。次に、プールされた溶出液を一晩、20 mM トリス (pH 8.0) の 5 リットルに対して透析し、1 mg/ml に濃縮し、最終的に繊維又は薄膜を形成させた。pH が 6.4 未満に減少した場合には、繊維はより速く形成された。

40

## 【0149】

His<sub>6</sub> NTNTCT の巨視的な繊維を得ることができたという事実は、CT は NTNT に融合されたときに繊維形成特性を保持することを実証する。

## 【0150】

実施例 3 IgG 結合 CT 融合タンパク質のクローニング、発現及び繊維形成

融合タンパク質の概念を証明するために、CT タンパク質 (CT 部分) は Z タンパク質ドメイン (B 部分) と融合して生成される。Z ドメインは、ブドウ球菌タンパク質の免疫

50

グロブリンG ( I g G ) 結合ドメインBの改変版であり、I g Gの結晶化 ( F c ) 領域断片に結合する58アミノ酸長の三重らせんモチーフである。目標は、CTに融合したZドメインからなる融合タンパク質から、例えば、繊維、薄膜及び膜などの構造体を生成し、及びドメインZのI g G結合能力、並びにCTの構造形成特性をなお保持することが可能であるかどうかを探索することである。そのために、CTのN末端又はC末端のZドメインからなる融合タンパク質をクローニングする。

#### 【0151】

##### クローニング

H i s<sub>6</sub> Z C T及びH i s<sub>6</sub> C T Z融合タンパク質 ( 配列番号61 - 62 ) をコードする遺伝子が構築され、カナマイシン ( 70 μ g / m l ) を補充した寒天プレート上で増殖させたケモコンピテント ( chemocompetent ) 大腸菌 ( E. coli ) B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞に形質転換する。コロニーをその後採取し、正しい挿入のためにP C R検査をし、その後また正しいD N A配列を確認するために配列決定する。

10

#### 【0152】

##### 産生

p T 7 H i s<sub>6</sub> Z C T又はp T 7 H i s<sub>6</sub> C T Zベクターを有する大腸菌B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞を、カナマイシン ( 70 μ g / m l ) を補充したルリア - ベルターニ培地 ( 全6リットル ) で、30で1 - 1.5のO D<sub>600</sub>値まで増殖させ、次に、300 μ MのI P T GでH i s<sub>6</sub> Z C T又はH i s<sub>6</sub> C T Z発現を誘導し、約2時間、20でさらにインキュベートする。次に、細胞を4700 r p mで20分間の遠心分離により回収し、得られた細胞ペレットを、20 m Mトリス ( p H 8.0 ) 中に溶解する。

20

#### 【0153】

##### 精製

20 m Mトリス ( p H 8.0 ) 中に溶解させた細胞ペレットは、細菌細胞を溶解するために、リゾチーム及びD NアーゼIが補充され、すぐに細胞溶解物を30分間15000回転の遠心後に回収する。次に、回収した細胞溶解物を分割し、合計4つのキレートセファロスファーストフローZ n<sup>2+</sup>カラムにロードし、H i s<sub>6</sub> Z C Tタンパク質がH i s<sub>6</sub> タグを介してカラムマトリックスに結合するように保つ。洗浄後、結合したタンパク質を20 m Mのトリス / 300 m Mのイミダゾール ( p H 8.0 ) で溶出した。プールされた溶出画分を一晩、20 m Mトリス ( p H 8.0 ) の5リットルに対して透析し、1 m g / m lに濃縮し、最終的に繊維を形成させた。

30

#### 【0154】

##### 分析

融合タンパク質構造のB部分の、有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を探索するために、融合タンパク質のZドメインのI g Gに結合する能力を試験した。この融合タンパク質の繊維と薄膜を、精製したI g G及び血清からのI g Gの結合のために用い、その後溶出し続いてS D S - P A G Eで分析し、ここでI g Gは非還元条件下で~ 146 k D aのバンドとして現れる。

#### 【0155】

##### 実施例4 I g G結合N T C T融合タンパク質のクローニング、発現及び繊維形成

40

融合タンパク質の概念を証明するために、N T - C Tタンパク質 ( N T部分とC T部分 ) はZタンパク質ドメイン ( B部分 ) と融合して生成される。目標は、N T C Tに融合したZドメインからなる融合タンパク質から、例えば、繊維、薄膜及び膜などの構造体を生成し、及びドメインZのI g G結合能力、並びにCTの構造形成特性をなお保持することが可能であるかどうかを探索することである。そのために、N T C TのN末端及びC末端のZドメインからなる融合タンパク質をクローニングする。

#### 【0156】

##### クローニング

H i s<sub>6</sub> Z N T C T及びH i s<sub>6</sub> N T C T Z融合タンパク質 ( 配列番号63 - 64 ) をコードする遺伝子が構築され、カナマイシン ( 70 μ g / m l ) を補充した寒天プレート

50

上で増殖させたケモコンピテント (chemocompetent) 大腸菌 (E. coli) B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞に形質転換する。コロニーをその後採取し、正しい挿入のために P C R 検査をし、その後また D N A 配列を確認するために配列決定する。

#### 【 0 1 5 7 】

産生

p T 7 H i s <sub>6</sub> Z N T C T 及び p T 7 H i s <sub>6</sub> N T C T Z ベクターを有する大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞を、カナマイシン ( 7 0 μ g / m l ) を補充したルリア - ベルターニ (Luria-Bertani) 培地 (全 6 リットル) で、3 0 で 1 - 1 . 5 の O D <sub>6 0 0</sub> 値まで増殖させ、次に、3 0 0 μ M の I P T G で発現を誘導し、約 2 時間、2 0 でさらにインキュベートする。次に、細胞を 4 7 0 0 r p m で 2 0 分間の遠心分離により回収し、得られた細胞ペレットを、2 0 m M トリス ( p H 8 . 0 ) 中に溶解する。

10

#### 【 0 1 5 8 】

精製

2 0 m M トリス ( p H 8 . 0 ) 中に溶解させた細胞ペレットは、細菌細胞を溶解するために、リゾチーム及び D N A ーゼ I が補充され、すぐに細胞溶解物を 3 0 分間 1 5 0 0 0 回転の遠心後に回収する。次に、回収した細胞溶解物を分割し、合計 4 つのキレートセファロースファーストフロー Z n <sup>2+</sup> カラムにロードし、H i s <sub>6</sub> Z N T C T 又は H i s <sub>6</sub> N T C T Z タンパク質が H i s <sub>6</sub> タグを介してカラムマトリックスに結合するように保つ。洗浄後、結合したタンパク質を 2 0 m M のトリス / 3 0 0 m M のイミダゾール ( p H 8 . 0 ) で溶出した。プールされた溶出画分を一晚、2 0 m M トリス ( p H 8 . 0 ) の 5 リットルに対して透析し、1 m g / m l に濃縮し、最終的に繊維を形成させた。

20

#### 【 0 1 5 9 】

分析

融合タンパク質構造の B 部分の、有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を探索するために、融合タンパク質の Z ドメインの I g G に結合する能力を試験した。この融合タンパク質の繊維と薄膜を、精製した I g G 及び血清からの I g G の結合のために用い、その後溶出し続いて S D S - P A G E で分析し、ここで I g G は非還元条件下で ~ 1 4 6 k D a のバンドとして現れる。

#### 【 0 1 6 0 】

実施例 5 I g G 結合 N T N T C T 融合タンパク質のクローニング、発現及び繊維形成

30

融合タンパク質の概念を証明するために、N T N T - C T タンパク質 ( N T N T 及び C T 部分 ) は Z タンパク質ドメイン ( B 部分 ) と融合して生成される。目標は、N T N T C T に融合した Z ドメインからなる融合タンパク質から、例えば、繊維、薄膜及び膜などの構造体を生成し、及びドメイン Z の I g G 結合能力、並びに C T の構造形成特性をなお保持することが可能であるかどうかを探索することである。そのために、N T N T C T の N 末端及び C 末端の Z ドメインからなる融合タンパク質をクローニングする。

#### 【 0 1 6 1 】

クローニング

H i s <sub>6</sub> Z N T C T 及び H i s <sub>6</sub> N T C T Z 融合タンパク質 ( 配列番号 6 5 - 6 6 ) をコードする遺伝子が構築され、カナマイシン ( 7 0 μ g / m l ) を補充した寒天プレート上で増殖させたケモコンピテント (chemocompetent) 大腸菌 (E. coli) B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞に形質転換する。コロニーをその後採取し、正しい挿入のために P C R 検査をし、その後また D N A 配列を確認するために配列決定する。

40

#### 【 0 1 6 2 】

産生

p T 7 H i s <sub>6</sub> Z N T N T C T 及び p T 7 H i s <sub>6</sub> N T N T C T Z ベクターを有する大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞を、カナマイシン ( 7 0 μ g / m l ) を補充したルリア - ベルターニ (Luria-Bertani) 培地 (全 6 リットル) で、3 0 で 1 - 1 . 5 の O D <sub>6 0 0</sub> 値まで増殖させ、次に、3 0 0 μ M の I P T G で発現を誘導し、約 2 時間、2 0 でさらにインキュベートする。次に、細胞を 4 7 0 0 r p m で 2 0 分間の遠心分離により回収し

50

、得られた細胞ペレットを、20 mM トリス (pH 8.0) 中に溶解する。

【0163】

精製

20 mM トリス (pH 8.0) 中に溶解させた細胞ペレットは、細菌細胞を溶解するために、リゾチーム及びDNアーゼIが補充され、すぐに細胞溶解物を30分間15000回転の遠心後に回収する。次に、回収した細胞溶解物を分割し、合計4つのキレートセファロースファーストフローZn<sup>2+</sup>カラムにロードし、His<sub>6</sub>ZNTNTCT又はHis<sub>6</sub>NNTNTCTZタンパク質がHis<sub>6</sub>タグを介してカラムマトリックスに結合するように保つ。洗浄後、結合したタンパク質を20 mMのトリス/300 mMのイミダゾール (pH 8.0) で溶出した。プールされた溶出画分を一晚、20 mM トリス (pH 8.0) の5リットルに対して透析し、1 mg/mlに濃縮し、最終的に繊維を形成させた。

10

【0164】

分析

融合タンパク質構造のB部分の、有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を探索するために、融合タンパク質のZドメインのIgGに結合する能力を試験した。この融合タンパク質の繊維と薄膜を、精製したIgG及び血清からのIgGの結合のために用い、その後溶出し続いてSDS-PAGEで分析し、ここでIgGは非還元条件下で~146 kDaのバンドとして現れる。

【0165】

実施例6 ABD-NCTCT及びABD-CT融合タンパク質のクローニング、発現及び固体構造の形成

20

NCTCT及びCTは、連鎖球菌プロテインG由来のアルブミン結合ドメイン(ABD)との融合で生成された。ABDはアルブミンと結合する5 kDaの三重らせんモチーフである。目標は、NCTCTに融合したABDドメイン(His<sub>6</sub>-ABD-NCTCTと表記; 配列番号68)及びCTに融合したABDドメイン(His<sub>6</sub>-ABD-CTと表記; 配列番号70)からそれぞれなる融合タンパク質から、例えば、繊維及び薄膜などの構造体を生成し、及びABDドメインのアルブミン結合能力、並びにNCTCT及びCTの構造形成特性をなお保持することが可能であるかどうかを探索することであった。そのために、NCTCT及びCTのN末端に融合したABDドメインからなる2つの融合タンパク質がクローニングされた。

30

【0166】

クローニング

His<sub>6</sub>-ABD-CT融合タンパク質(配列番号70)をコードする遺伝子(配列番号69)は以下のように構築した。プライマーは、そのようなABD配列を含むベクターからドメインABDのPCR断片を生成するために設計された。また、プライマーは、制限エンドヌクレアーゼNdeI及びEcoRIの認識部位を含有していた。得られたPCR生成物は、その後、標的ベクター(カナマイシン耐性遺伝子を有するpAff8His<sub>6</sub>TrxHis<sub>6</sub>CTを示す)のように、制限エンドヌクレアーゼNdeI及びEcoRIで処理した。ターゲットベクターの制限切断に際し、His<sub>6</sub>TrxHis<sub>6</sub>部分が切断された。切断されたPCR断片と目標ベクターを、T4 DNAリガーゼを用いて互いに連結し、そして、得られた正しく連結されたベクター(pT7His<sub>6</sub>-ABD-CT)は、カナマイシン(50 µg/ml)を補充した寒天プレート上に増殖させたケモコンピテント(chemocompetent)大腸菌(E. coli) BL21(DE3)細胞に形質転換された。コロニーをその後採取し、正しい挿入のためにスクリーニングし、続いて、標的ベクター中にABDが挿入されたDNA配列を確認するために配列決定した。

40

【0167】

His<sub>6</sub>-ABD-NCTCT融合タンパク質(配列番号68)をコードする遺伝子(配列番号67)のクローニングは、His<sub>6</sub>-ABD-CTについて説明されるのと同様に構築されたが、標的ベクターは、pT7His<sub>6</sub>scFv1-NCTCTと示され、pT7His<sub>6</sub>scFv1部分はNdeIとEcoRIでの処理により切断された。正確に連結

50

されたベクターは、pT7His<sub>6</sub>ABD-NTCTと示される。

【0168】

産生

pT7His<sub>6</sub>-ABD-CTベクターを有する大腸菌BL21(DE3)細胞を、カナマイシン(50 μg/ml)を補充したルリア-ベルターニ(Luria-Bertani)培地(全3リットル)で、30℃で1-1.5のOD<sub>600</sub>値まで増殖させ、次に、300 μMのIPTGでpT7His<sub>6</sub>-ABD-CTの発現を誘導し、約17時間、14℃でさらにインキュベートした。次に、細胞を4700 rpmで20分間の遠心分離により回収し、得られた細胞ペレットを、20 mMトリス(pH 8.0)中に溶解した。

【0169】

His<sub>6</sub>ABD-NTCTの産生は、His<sub>6</sub>ABD-CTについて記載したのと同様に行われた。

【0170】

精製

20 mMのトリス(pH 8.0)中に溶解した細胞ペレットは、細菌細胞を溶解するために、リゾチーム及びDNアーゼIを補充され、その後、NaClとイミダゾールをそれぞれ200 mM及び10 mMの最終濃度まで添加した。30分間の遠心分離(15000 rpm)後、細胞溶解物を回収した。次に、回収した細胞溶解物をキレートセファロースファストフローZN<sup>2</sup>+カラムにロードし、His<sub>6</sub>タグを介してHis<sub>6</sub>-ABD-CTタンパク質がマトリックスに結合するように保った。洗浄後、結合したタンパク質を20 mMのトリス/200 mMのイミダゾール(pH 8.0)/300 mMのNaClで溶出した。溶出物は、A<sub>280</sub>の測定によると28.8 mgのHis<sub>6</sub>-ABD-CTタンパク質を含んでいた。次に、溶出したタンパク質を、一晚、20 mMのトリス(pH 8.0)を3リットルに対して透析し、その後、1.48 mg/mlに濃縮し、6.216 mgのHis<sub>6</sub>-ABD-CT融合タンパク質の最終量を得た。

【0171】

同じ精製手順を、His<sub>6</sub>-ABD-NTCTについて行った。His<sub>6</sub>-ABD-NTCTの溶出濃度は1.76 mg/mlで、融合タンパク質の35.2 mgの最終量を得た。

【0172】

薄膜及び繊維の形成

His<sub>6</sub>-ABD-CTの薄膜は、薄膜あたり1 mg/mlの可溶性融合タンパク質の15 μlから、96ウェルプレート(組織培養プレート、浮遊細胞、83.1835.500、ザルスタット)中で成型された。次いで、薄膜を一晚凝固させた(20%、35%相対湿度)。1 mg/mlのタンパク質溶液の15 μlからHis<sub>6</sub>-ABD-NTCTの薄膜を成型するために同じ手順が続けられた。

【0173】

繊維はまた、His<sub>6</sub>ABD-CT及びHis<sub>6</sub>ABD-NTCTの両方に関して、可溶性融合タンパク質の1.76及び1.06 mg/mlからそれぞれ作られた。図3aは、His<sub>6</sub>-ABD-NTCT融合タンパク質(配列番号68)の顕微鏡繊維写真を示し、図3bは、His<sub>6</sub>-ABD-CT融合タンパク質(配列番号70)の顕微鏡繊維写真を示す。CT又はNTCTは別のタンパク質、即ち46アミノ酸長のABDドメインに融合されているが、His<sub>6</sub>ABD-CT及びHis<sub>6</sub>ABD-NTCTの両方の巨視的な繊維を得ることができたという事実は、CT及びNTCTはABDドメインに融合されているにもかかわらず、それらの構造形成特性を保持していることを示している。

【0174】

分析

アルブミンに結合するABD-NTCTの薄膜の能力を評価するために、アルブミンの源としてヒト血漿を使用した。ABD-NTCT及びABD-CTの4つの薄膜は、1 × PBSの150 μlで予め湿らせ、続いて室温で30分間、ヒト血漿(1:5希釈)の1

10

20

30

40

50

00  $\mu$ lでのインキュベーションを行った。200  $\mu$ lの1xPBSで3回洗浄した後、結合したアルブミンを、溶出緩衝液（即ち、0.5M酢酸、1M尿素、100mMのNaCl）によりpHを約2.7まで下げることによって50  $\mu$ lで溶出し、その後溶出画分を非還元SDS-PAGEにより分析した。NTCT及びCTの薄膜がコントロール材料として使用され、同じ方法で処理された。

#### 【0175】

図4は、ヒト血漿からのアルブミンのABD-NTCT薄膜及びABD-CT薄膜への結合後に溶出した画分の非還元SDS-PAGEゲルを示す。ゲルは以下に従ってロードされた：

- (1-4) ABD-NTCT薄膜の四連、14  $\mu$ lロードされた；
- (5-8) ABD-CT薄膜の四連、14  $\mu$ lロードされた；
- (9) タンパク質のラダー；
- (10-13) NTCT（コントロール）薄膜の四連；
- (14-16) CT（コントロール）薄膜の三連；
- (17) ヒト血漿（1：50）、8  $\mu$ lロードされた。

10

#### 【0176】

ABD-NTCT及びABD-CTの全ての薄膜はヒト血漿からのアルブミンに結合している（図4、レーン1-8）。ABD-NTCT薄膜及びABD-CT薄膜の溶出画分においては単一のアルブミンのバンド（ $\sim 65$  kDa）のみが現れるため、それらはヒト血漿からの他のいかなるものにも非特異的には結合しないように見える。NTCT及びCTのコントロール薄膜は、溶出画分で少しもアルブミンを示していない（図4、レーン10-16）。このことは、ABDドメインはNTCTとCTとの融合タンパク質の巨視的固体構造で機能的であると結論される。

20

#### 【0177】

実施例7 M4-NTCT及びM4-CT融合タンパク質のクローニング、発現及び固体構造の形成

単量体ストレプトアビジン（M4）ドメインは、NTCT及びCTタンパク質との融合でそれぞれ産生された。M4ドメインは、四量体ストレプトアビジンの変異型バージョンであり、ピオチンに非共有結合する159アミノ酸長のタンパク質ドメインである。我々の目標は、NTCTに融合したM4ドメイン（His<sub>6</sub>-M4-NTCTと表記；配列番号72）及びCTに融合したM4ドメイン（His<sub>6</sub>-M4-CTと表記；配列番号74）からそれぞれなる融合タンパク質から、例えば、薄膜、発泡体及び繊維などの構造体を生成し、及びM4ドメインのピオチン結合能力、並びにNTCT及びCTの構造形成特性をなお保持することが可能であるかどうかを探索することであった。そのために、NTCT及びCTのN末端に融合したM4ドメインからなる2つの融合タンパク質がクローニングされた。

30

#### 【0178】

クローニング

His<sub>6</sub>-M4-CT融合タンパク質（配列番号74）をコードする遺伝子（配列番号73）が実施例6に記載されるように構築されたが、プライマーは、M4配列などを含むベクターからドメインM4のPCR断片を生成するために設計された。標的ベクターは、pAff8His<sub>6</sub>TrxHis<sub>6</sub>CTと記され、His<sub>6</sub>TrxHis<sub>6</sub>部分はNdeI及びEcoRIによる処理により切断された。正確に連結されたベクターは、pT7His<sub>6</sub>M4-CTと示される。

40

#### 【0179】

His<sub>6</sub>-M4-NTCT融合タンパク質（配列番号72）をコードする遺伝子（配列番号71）のクローニングは、His<sub>6</sub>-M4-CTについて説明されるのと同様に構築されたが、標的ベクターは、pT7His<sub>6</sub>scFv1-NTCTと示され、pT7His<sub>6</sub>scFv1部分はNdeIとEcoRIでの処理により切断された。正確に連結されたベクターは、pT7His<sub>6</sub>M4-NTCTと示される。

50



## 【0180】

## 産生

H i s<sub>6</sub> M 4 - C T 及び H i s<sub>6</sub> M 4 - N T C T の産生は、実施例 6 に記載したのと同様に行われた。

## 【0181】

## 精製

H i s<sub>6</sub> M 4 - C T 及び H i s<sub>6</sub> M 4 - N T C T の精製は、実施例 6 に記載したのと同様に行われた。

## 【0182】

溶出物は、3.6 mg の H i s<sub>6</sub> M 4 - C T タンパク質を含んでいた。タンパク質の濃度が 1.39 mg/ml に到達後、0.834 mg の H i s<sub>6</sub> M 4 - C T 融合タンパク質の最終量が得られた。

10

## 【0183】

H i s<sub>6</sub> M 4 - N T C T の溶出物含量は 3.2 mg であった。タンパク質の濃度が 1.14 mg/ml に到達後、1.368 mg の H i s<sub>6</sub> M 4 - N T C T 融合タンパク質の最終量が得られた。

## 【0184】

## 薄膜、発泡体及び繊維の形成

H i s<sub>6</sub> M 4 - C T 及び H i s<sub>6</sub> M 4 - N T C T の薄膜は、実施例 6 に記載したように成型された。繊維は、可溶性融合タンパク質の 1.14 mg/ml から H i s<sub>6</sub> - M 4 - N T C T で作られた (図 5 a)。発泡体は、1.39 mg/ml の可溶性融合タンパク質の 30 µl から H i s<sub>6</sub> - M 4 - C T で作られた (図 5 b)。N T C T 又は C T は別のタンパク質、即ち 159 アミノ酸長の M 4 ドメインに融合されているが、H i s<sub>6</sub> - M 4 - N T C T 及び H i s<sub>6</sub> - M 4 - C T の薄膜、繊維、及び発泡体を得ることができたという事実は、N T C T 及び C T は M 4 ドメインに融合されているにもかかわらず、それらの構造形成特性を保持していることを示している。

20

## 【0185】

## 分析

スポットされた H i s<sub>6</sub> - M 4 - N T C T 及び H i s<sub>6</sub> - M 4 - C T の薄膜は、標的タンパク質分子をそれぞれ 0.34 ナノモル及び 0.5 ナノモル含有する。2つの系が融合した M 4 構築物のビオチン結合能を評価するために、各構築物において2つの薄膜を選択し、A t t o - 565 ビオチンの等量でインキュベートすることにより、薄膜中に存在する標的タンパク質分子の量と比較して分析した。その後、標識されたビオチンを除去し、薄膜を 1 × P B S 100 µl で3回洗浄した。最終的に、100 µl の 1 × P B S が薄膜に添加され、その後倒立ニコンエク립ス T i 機器 (563 nm で励起、592 nm で発光) を用いて蛍光顕微鏡分析を行った。N T C T (0.55 ナノモル) 及び C T (1.28 ナノモル) の薄膜がコントロール材料として使用され、同じ方法で処理された。

30

## 【0186】

M 4 - N T C T 及び M 4 - C T の薄膜は、ビオチンに結合する固有の親和性を有する単量体ストレプトアビジン (M 4) を含む。標識されたビオチンが分析に使用されるため、薄膜へのビオチンの結合は、上記で示した波長で蛍光顕微鏡によって検出することができた。図 6 は、M 4 - N T C T 膜及び M 4 - C T 膜に結合した A t t o - 565 ビオチンの、検出のための2倍の倍率の蛍光顕微鏡写真を示す。A : M 4 - N T C T ; B : N T C T ; C : M 4 - C T 及び D : C T。図 6 (A、C) において、蛍光は M 4 - N T C T 及び M 4 - C T の薄膜からのみ見ることができ、コントロールの薄膜 (B、D) からは見えない。このことは、M 4 のビオチン結合能は N T C T と C T に融合されているにもかかわらず保持されていることを確認する。

40

## 【0187】

実施例 8 s c F v 1 - N T C T 及び s c F v 1 - C T 融合タンパク質のクローニング、発現及び固体構造の形成

50

NTCT及びCTは、単一鎖断片変異体(s c F v 1)と命名される操作された抗体断片との融合体として産生された。s c F v 1は、自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス(SLE)に特異的な抗原を認識する、27kDaの一価、操作された抗体断片である。我々の目標は、NTCTに融合したs c F v 1タンパク質ドメイン(H i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - NTCTと表記; 配列番号76)及びCTに融合したs c F v 1タンパク質ドメイン(H i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - CTと表記; 配列番号78)からそれぞれなる融合タンパク質から、例えば、繊維、発泡体及び薄膜などの構造体を生成し、及びs c F v 1タンパク質ドメインの抗原結合能力、並びにNTCT及びCTの構造形成特性をなお保持することが可能であるかどうかを探索することであった。そのために、NTCT及びCTのN末端に融合したs c F v 1ドメインからなる2つの融合タンパク質がクローニングされた。

10

## 【0188】

## クローニング

H i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - CT融合タンパク質(配列番号78)をコードする遺伝子(配列番号77)が実施例6に記載されるように構築されたが、プライマーは、s c F v 1配列などを含むベクターからドメインs c F v 1のPCR断片を生成するために設計された。標的ベクターは、p A f f 8 H i s<sub>6</sub> T r x H i s<sub>6</sub> C Tと記され、H i s<sub>6</sub> T r x H i s<sub>6</sub>部分はN d e I及びE c o R Iによる処理により切断された。正確に連結されたベクターは、p T 7 H i s<sub>6</sub> s c F v 1 - CTと示される。

## 【0189】

H i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - NTCT融合タンパク質(配列番号76)をコードする遺伝子(配列番号75)のクローニングはH i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - CTのために記載されているのと同様に構築されたが、NTCTの増幅に用いたプライマーは、制限エンドヌクレアーゼのE c o R I及びH i n d I I Iの部位を含んでおり、ここでの標的ベクターはT 7 H i s<sub>6</sub> s c F v 1 - R e p C Tで示され、このR e p C T部分はE c o R IとH i n d I I Iでの処理により切断された。正確に連結されたベクターは、p T 7 H i s<sub>6</sub> s c F v 1 - NTCTと示される。

20

## 【0190】

## 産生

H i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - CT及びH i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - NTCTの産生は、p T 7 H i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - NTCTの産生が、6リットルの培養培地の総容量で行ったことを除いて、実施例6に記載したのと同様に行われた。

30

## 【0191】

## 精製

H i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - CT及びp H i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - NTCTの精製は、実施例6に記載したのと同様に行われた。

## 【0192】

溶出物は、0.93mgのH i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - CTタンパク質を含んでいた。タンパク質の濃度が0.87mg/mlに到達後、0.348mgのH i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - CT融合タンパク質の最終量が得られた。

H i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - NTCTの溶出物含量は4.86mgであった。タンパク質の濃度が2.14mg/mlに到達後、2.57mgのH i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - NTCT融合タンパク質の最終量が得られた。

40

## 【0193】

## 薄膜、発泡体及び繊維の形成

H i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - CTの薄膜は、薄膜あたり5µMの可溶性融合タンパク質の1µlからマイクロアレイスライド(プラスチックM a x i S o r p、N u n c)上にスポットされた。次いで、温度と湿度が調節された部屋で、薄膜を一晚凝固させた。5µMのタンパク質溶液の1µlからH i s<sub>6</sub> - s c F v 1 - NTCTの薄膜を成型するために同じ手順が続けられた。

## 【0194】

50

繊維は、可溶性融合タンパク質の0.49 mg/mlからHis<sub>6</sub>-scFv1-NTCTで作成され(データ非表示)、及び発泡体は、可溶性融合タンパク質の0.22 mg/ml及び0.38 mg/mlの30 µlからそれぞれHis<sub>6</sub>-scFv1-NTCT及びHis<sub>6</sub>-scFv1-CTの両方で作成された(図7a及び7b)。NTCT又はCTは別のタンパク質、即ち263アミノ酸長のscFv1ドメインに融合されているが、His<sub>6</sub>-scFv1-NTCT及びHis<sub>6</sub>-scFv1-CTの巨視的な繊維及び発泡体を得ることができたという事実は、NTCT及びCTはscFv1ドメインに融合されているにもかかわらず、そこで構造形成特性をなお保持していることを示している。

【0195】

分析

純粋な抗体(scFv1、コントロール)及び系が融合した抗体(scFv1-NTCT)は、透明及び黒のポリマーマキシソープマイクロアレイスライド(NUNC、25 x 76 mm)上に5 µMのタンパク質溶液の1 µLを手動で添加することでマイクロアレイ形式にスポットされ、135ピコモルの純粋な抗体(scFv1)及び274ピコモルの融合した抗体(scFv1-NTCT)をそのスポットされた薄膜中に得た。薄膜形態中にタンパク質をスポットした後、薄膜を、温度と湿度が調節された部屋で一晩乾燥させた。次いで、アレイは、200 µlのサンプルバッファー(PBS中に1% (w/v)の無脂肪粉乳及び1% (v/v)のTween-20を含む)を90分間適用することによりブロックし、その後、200~300 µlの洗浄緩衝液(PBS中に0.05% (v/v)のTween-20を含む)を適用することによって3回洗浄した。全てのインキュベーションは、室温で穏やかに攪拌して行った。次に、100~200 µlのサンプルバッファー中で希釈されたビオチン化抗原サンプル(10 nM)が適用され、1時間インキュベートした。アレイは、その後、200~300 µlの洗浄緩衝液を適用することによって3回洗浄し、結合した抗原を検出するために、試料緩衝液中に希釈されたアレクサ647標識ストレプトアビジン(1 µg/ml)の100~200 µlを、アレイ上に適用し、1時間インキュベートした。最後に、アレイを200~300 µlの洗浄緩衝液で3回洗浄し、窒素気流下で乾燥した。アレイは、共焦点マイクロアレイ蛍光スキャナー(Scan Array Express, Perkin-Elmer Life & Analytical Sciences)を用いてスキャンした。スキャンアレイエクスプレス(ScanArray Express)ソフトウェアV2.0(Perkin-Elmer Life & Analytical Sciences)を用いて各スポットの強度を定量した。同じ分析手順を、His<sub>6</sub>-scFv1-CT融合タンパク質を分析するために行った。

【0196】

潜在的なバイオマーカーとなり得る低含量の血清タンパク質を検出するために、scFv1はNTCT又はCTのN末端に融合され、それぞれ、His<sub>6</sub>-scFv1-NTCT及びHis<sub>6</sub>-scFv1-Cを生じさせた。純粋な抗体(コントロール)及び系融合型抗体断片をマイクロアレイスライド上にスポットし、それらの抗原結合能力をビオチン化抗原サンプルを用いて分析した。次いで、アレクサ647標識ストレプトアビジンが結合した抗原を検出するために使用された。図8は、純粋な(コントロール)系融合型抗体断片の抗原結合解析を示す。スポットの強度は、5090検出強度で測定した。分析では、系融合型抗体(His<sub>6</sub>-scFv1-NTCT)断片の抗原認識は、scFv1コントロール単独と比較して25倍に増加し、他の抗原との交差反応の兆候はHis<sub>6</sub>-scFv1-NTCTにおいては認められないことを示した。

【0197】

実施例9 キシラナーゼ-NTCT及びキシラナーゼ-CT融合タンパク質のクローニング、発現及び固体構造の形成

酵素活性を有するタンパク質をNTCT及びCTと融合させる概念を証明するために、枯草菌由来の酵素のキシラナーゼAはNTCT及びCTのそれぞれとの融合体で産生された。キシラナーゼA(エンド-1,4-キシラナーゼA)は185アミノ酸長であり(シグナルペプチドなし)、グリコシルヒドロラーゼ11(セルロースG)ファミリーに属する。キシラナーゼAの酵素機能は、植物細胞壁中のヘミセルロースの主要成分である

10

20

30

40

50

キシランの - 1, 4 グリコシド結合を切断することである。我々の目標は、NTCTに融合したキシラナーゼA (Xyl - NTCTと表記; 配列番号80) 及びCTに融合したキシラナーゼA (Xyl - CTと表記; 配列番号82) からそれぞれなる融合タンパク質から、例えば、繊維、発泡体及び薄膜などの構造体を生成し、及びキシラナーゼの酵素活性、並びにCTの構造形成特性をなお保持することが可能であるかどうかを探索することであった。そうするために、1) NTCT及び2) CTのN末端側のキシラナーゼからなる2つの融合タンパク質がクローニングされた。

#### 【0198】

##### クローニング

His<sub>6</sub>Xyl - CT融合タンパク質 (配列番号82) をコードする遺伝子 (配列番号81) が実施例6に記載されるように構築されたが、プライマーは、キシラナーゼ配列などを含むベクターからキシラナーゼドメインのPCR断片を生成するために設計された。標的ベクターは、pAff8His<sub>6</sub>TrxHis<sub>6</sub>CTと記され、His<sub>6</sub>TrxHis<sub>6</sub>部分はNdeI及びEcoRIによる処理により切断された。正確に連結されたベクターは、pT7His<sub>6</sub>Xyl - CTと示される。

10

#### 【0199】

His<sub>6</sub>Xyl - NTCT融合タンパク質 (配列番号80) をコードする遺伝子 (配列番号79) のクローニングは、His<sub>6</sub>Xyl - CTについて説明されるのと同様に構築されたが、標的ベクターは、pT7His<sub>6</sub>scFv1 - NTCTと示され、pT7His<sub>6</sub>scFv1部分はNdeIとEcoRIでの処理により切断された。正確に連結されたベクターは、pT7His<sub>6</sub>Xyl - NTCTと示される。

20

#### 【0200】

##### 産生

His<sub>6</sub>Xyl - CT及びHis<sub>6</sub>Xyl - NTCTの産生は、実施例6に記載したのと同様に行われた。

#### 【0201】

##### 精製

His<sub>6</sub>Xyl - CT及びHis<sub>6</sub>Xyl - NTCTの精製は、実施例6に記載したのと同様に行われた。

#### 【0202】

溶出物は、3.6mgのHis<sub>6</sub>Xyl - CTタンパク質を含んでいた。タンパク質の濃度が2.1mg/mlに到達後、2mgのHis<sub>6</sub>Xyl - CT融合タンパク質の最終量が得られた。

30

#### 【0203】

His<sub>6</sub>Xyl - NTCTタンパク質の溶出物含量は4.3mgであった。タンパク質の濃度が0.65mg/mlに到達後、0.3mgのHis<sub>6</sub>Xyl - NTCT融合タンパク質の最終量が得られた。

#### 【0204】

##### 薄膜、発泡体及び繊維の形成

His<sub>6</sub>Xyl - CTの薄膜は96ウェルプレート (組織培養プレート、浮遊細胞、83.1835.500、ザルスタット) 中で成型された。各薄膜は、1.0mg/mlの可溶性のHis<sub>6</sub>Xyl - CTの15µlから、pH8とpH6の両方で作成された。次いで、薄膜を一晚凝固させた (20、35%相対湿度)。同じ手順がHis<sub>6</sub>Xyl - NTCTの薄膜の成型のために行われ、各薄膜は0.41mg/mlの可溶性His<sub>6</sub>Xyl - NTCTの15µlから (pH8とpH6の両方で) 成型された。

40

#### 【0205】

発泡体は、可溶性His<sub>6</sub>Xyl - CT (1 - 2mg/ml) から、タンパク質溶液40µlに (ピペティングすることによって) 空気を導入することにより作成され、室温で一晩乾燥した。His<sub>6</sub>Xyl - CTの成型された発泡体 (図9) の出現は、CTはXylドメインに融合されているにもかかわらず、その構造形成特性を保持していることを

50

示している。

【0206】

図9は、可溶性融合タンパク質から作られた、融合タンパク質His<sub>6</sub>Xyl-CT(配列番号82)の巨視的な発泡体を示している。発泡体の出現は、クモ系のCTドメインは、酵素キシラーゼ(Xyl)との融合で生産されたにもかかわらず、その構造形成特性を保持していることを示している。

【0207】

NTCT又はCTに融合したキシラーゼの酵素活性の分析

キシラーゼは、2つのキシロース残基の間の-1,4グリコシド結合を切断する酵素である。NTCT又はCTに融合したキシラーゼ(Xyl)の酵素の能力を試験するため、His<sub>6</sub>Xyl-CT及びHis<sub>6</sub>Xyl-NTCTの各薄膜は、90µlのMcIlvaine緩衝液(pH6.0)によりインキュベートする。全ての薄膜について50で10分間のプレインキュベーション後、40mMのPNX(p-ニトロフェニルキシロピラノシド)基質10µlが添加され、少なくとも10分間、50でさらにインキュベートした。次いで、停止溶液(0.5MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)100µlが各薄膜に添加され、酵素反応からの生成物を同定するために410nmで吸光度測定を行った。前述したのと同じ手順により成型されたNTCT及びCTの薄膜がコントロールとしてインキュベートされた。

10

【0208】

実施例10 キシラーゼ-NTCT及びキシラーゼ-CT融合タンパク質のクローニング、発現及び固体構造の形成

20

細胞刺激作用を有するペプチドをNTCT及びCTと融合させる概念を証明するために、ヒト上皮成長因子(EGF)がNTCT及びCTのそれぞれとの融合体で産生された。EGFは、多くの細胞型、例えばケラチノサイトの細胞表面に見られる上皮成長因子受容体(EGFR)に対して高い親和性を有する53アミノ酸残基長の成長因子である。EGFRに結合すると、タンパク質-チロシンキナーゼ活性が刺激され、細胞内で様々な生化学的变化を生じ、細胞成長及び増殖を誘発する。我々の目標は、NTCTに融合したEGF(EGF-NTCTと表記;配列番号84)及びCTに融合したEGF(EGF-CTと表記;配列番号86)からそれぞれなる融合タンパク質から、例えば、繊維及び薄膜などの構造体を生成し、及びEGFの細胞刺激作用、並びにCTの構造形成特性をなお保持することが可能であるかどうかを探索することであった。そうするために、1)NTCT及び2)CTのN末端側のEGFからなる2つの融合タンパク質がクローニングされた。

30

【0209】

クローニング

His<sub>6</sub>EGF-CT(配列番号86)融合タンパク質をコードする遺伝子(配列番号85)が実施例6に記載されるように構築されたが、プライマーは、EGF配列などを含むベクターからEGFのPCR断片を生成するために設計された。標的ベクターは、pAff8His<sub>6</sub>TrxHis<sub>6</sub>CTと記され、His<sub>6</sub>TrxHis<sub>6</sub>部分はNdeI及びEcoRIによる処理により切断された。正確に連結されたベクターは、pT7His<sub>6</sub>EGF-CTと示される。

40

【0210】

His<sub>6</sub>-M4-NTCT融合タンパク質(配列番号84)をコードする遺伝子(配列番号83)のクローニングは、His<sub>6</sub>EGF-CTについて説明されるのと同様に構築されたが、標的ベクターはここではpT7His<sub>6</sub>scFv1-NTCTと示され、pT7His<sub>6</sub>scFv1部分はNdeIとEcoRIでの処理により切断された。正確に連結されたベクターは、pT7His<sub>6</sub>EGF-NTCTと示される。

【0211】

産生

His<sub>6</sub>EGF-CT及びHis<sub>6</sub>EGF-NTCTの産生は、実施例6に記載したのと同様に行われた。

50

【 0 2 1 2 】

精製

H i s<sub>6</sub> E G F - C T 及び H i s<sub>6</sub> E G F - N T C T の精製は、実施例 6 に記載したのと同様に行われた。

【 0 2 1 3 】

薄膜及び繊維の形成

薄膜及び繊維は、H i s<sub>6</sub> E G F - C T 及び H i s<sub>6</sub> E G F - N T C T の両方から、実施例 6 に記載したように作成される。

【 0 2 1 4 】

N T C T 又は C T に融合した E G F の細胞刺激能力の分析

C T に融合した場合 ( H i s<sub>6</sub> E G F - C T と表記 ) 又は N T C T に融合した場合 ( H i s<sub>6</sub> E G F - N T C T と表記 ) 、 E G F のケラチノサイトに対する細胞刺激能力が調べられた。この目的のために、融合タンパク質 H i s<sub>6</sub> E G F - C T 及び H i s<sub>6</sub> E G F - N T C T の薄膜がそれぞれ使用される。正常ヒト表皮ケラチノサイト ( 初代細胞 ) は、細胞培養培地 ( K G M - G O L D 、 L o n z a ) 中に 3 5 0 0 又は 7 0 0 0 細胞 / c m<sup>2</sup> の密度でマトリックス上に組換えヒト E G F 含み又は含まずに播種される。培地は一日おきに交換される。生存細胞及び死細胞を、2 4 、 4 8 、 7 2 及び 9 6 時間後に生 / 死アッセイ ( Molecular Probes ) で染色する。顕微鏡写真は 1 0 倍の倍率で倒立蛍光顕微鏡 ( ニコン エクリプス T i ) の中で行われる。

【 図 1 - 1 】

CThyb_Esp	SRLSSPEASS RVSSAVSNLV SSG-PTNSAA LSSTISNVVS QIGASNPGLS
CTnat_Eau	SRLSSPSAVS RVSSAVSSLV SNG-QVNMAA LPMIISHISS SVSASAPGAS
AF350266_At1	SRLSSPGAAS RVSSAVTSLV SSGGPTNSAA LSHITISHVVS QISSSNPGLS
AY666062_Cm1	SHLSSPEASS RVSSAVSNLV SSG-STNSAA LPMITISHVVS QISSSNPGLS
AF350273_Lg1	SALAAPATSA RISSHASTLL SNG-PTNPAS ISHVISHAVS QISSSNPGAS
AY953074_Lh1	SALSAPATSA RISSHASALL SSG-PTNPAS ISHVISHAVS QISSSNPGAS
AY666068_Mh1	SHLSSPEASS RVSSAVSNLV SSG-STNSAA LPMITISHVVS QISSSNPGLS
U20329_Nc1	SRLSSPQASS RVSSAVSNLV ASG-PTNSAA LSSTISNVVS QIGASNPGLS
AY666076_Np1	SRLSSPEASS RVSSAVSNLV SSG-PTNSAA LSHITISHVVS QISSSNPGLS
AF350277_Nm1	SRLSSPQASS RVSSAVSNLV ASG-PTNSAA LSSTISHAVS QIGASNPGLS
AF350279_Ns1	SRLSSPEASS RVSSAVSNLV SSG-PTNSAA LSSTISHVVS QIGASNPGLS
AY666057_Ov1	SRLSSPEASS RVSSAVSNLV SSG-PTNSAA LSHITISHVVS QISSSNPGLS
AY666064_Ps1	SRLSSPEASS RVSSAVSNLV SSG-PTNSAA LPMITISHVVS QISSSNPGLS
AF350285_Tk1	SLLSSPASHA RISSAVSALA SGA-ASSPGY LSSVISNVVS QVSSNSGGIV
AF350286_Tv1	SRLSSPASHA RISSAVSALA SSG-ASSPGY LSSITISHVVS QVSSNMDGLS
ABU20328_Ab2	SRLSSSAASS RVSSAVSSLV SSG-PTTPAA LSHNTISSAVS QISASNPGLS
AY365016_Aam2	-RLSSPQASS RVSSAVSTLV SSG-PTNPAS LSHALIGSVVS QVSASNPGLP
AF350263_Aau2	SRLSSPQASS RVSSAVSTLV SSG-PTNPAA LSHALISSVVS QVSASNPGLS
AF350267_At2	SRLSSPQASS RVSSAVSTLV SSG-PTNPAS LSHALISSVVS QVSSSNPGLS
AF350272_Gm2	SRLSSPQAGA RVSSAVSALV ASG-PTSPAA VSSAISHWAS QISASNPGLS
AF350275_Lg2	SALSPTTHA RISSHASTLL SSG-PTNSAA ISHVISHAVS QVSASNPGSS
AY953075_Lh2	SALSPTTHA RISSHASTLL SSG-PTNAAA LSHVISHAVS QVSASNPGSS
AY654293_Nc2	SRLASPDSGA RVASAVSNLV SSG-PTSSAA LSSVISNVVS QIGASNPGLS
AF350278_Nm2	SRLASPDSGA RVASAVSNLV SSG-PTSSAA LSSVISNVVS QIGASNPGLS
AF350280_Ns2	SRLASPDSGA RVASAVSNLV SSG-PTSSAA LSSVIXHWAS QIGASNPGLS
AF350269_DtFb1	SRLSSPEAAS RVSSAVSSLV SNG-QVNVA A LPSIISHLSS SISASACTAS
AF350270_DtFb2	SRLSSPQAAS RVSSAVSSLV SNG-QVNVA A LPSIISHLSS SISASCTAAS
U47853_ADF1	NRLSSAGAAS RVSSNVAATA SAG----AAA LPMVISHIYS GVSS--GVS
U47854_ADF2	SRLSSPSAAA RVSSAVS-LV SNGGPTSPAA LSSSISNVVS QISASNPGLS
U47855_ADF3	SRLSSPAASS RVSSAVSSLV SSG-PTKHAA LSHITISSVVS QVSASNPGLS
U47856_ADF4	SVYLRQLPRL EVSSAVSSLV SSG-PTNGAA VSGALNSLVS QISASNPGLS
Consensus	SRLSSPQASS RVSSAVSNLV SSG-PTNSAA LSNTISNVVS QISASNPGLS

【 図 1 - 2 】

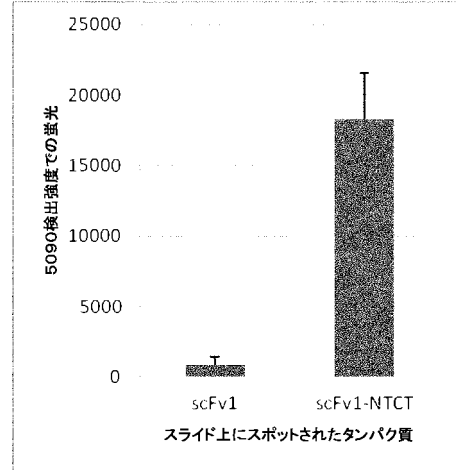
CThyb_Esp	GCDVLVQALL EVVSALIHIL GSSSIGQVNY GSAGQATQIV GQSVYQALGE F
CTnat_Eau	GCEVLVQALL EVITLVQIV SSSSVGYINP SAVNQTINVV ANAMAQVMG-
AF350266_At1	GCDVLVQALL EIVSALVHIL GSANIGQVNS SVGVRASIV GQSSINQAPS-
AY666062_Cm1	GCDVLVQALL EIVSALIHIL GSSSIGQVNY GSAGQATQIV -----
AF350273_Lg1	SCDVLVQALL ELVPTALLTII GSSNIGVNY DSSGQYQVW SQSVQNAFV-
AY953074_Lh1	ACDVLVQALL ELVPTALLTII GSSNIGVNY DSSGQYQVW TQSVQVVF-
AY666068_Mh1	GCDVLVQALL EVVSALIHIL GSSSIGQVNY GSAGQATQIV GQSA-----
U20329_Nc1	GCDVLVQALL EIVSALIHIL GSSSIGQVNY GSAGQATQIV GQSVYQALG-
AY666076_Np1	GCDVLVQALL EVVSALIHIL GSSSIGQVNY GSAGQATQIV -----
AF350277_Nm1	GCDVLVQALL EIVSALIHIL GSSSIGQVNY GSAGQATQIV -----
AF350279_Ns1	GCDVLVQALL EIVSALVHIL GSSSIGQVNY GSAGQATQIV -----
AY666057_Ov1	GCDVLVQALL EIVSALIHIL GSSSIGQVNY GSAGQATQIV -----
AY666064_Ps1	GCDVLVQALL EIVSALIHIL GSSSIGQVNY GSAGQATQIV -----
AF350285_Tk1	GCDVLVQALL EIVSALVHIL ASSSGQVNL NTAGYTSQL-----
AF350286_Tv1	GCDVLVQALL EVVAVLVHIL ASSHIGVNL NTAGYTSQL-----
ABU20328_Ab2	GCDVLVQALL EIVSALVHIL GSSSVQVNY GASQYQVM-----
AY365016_Aam2	SCDVLVQALL EIVSALVHIL GSSSIGQVNY SASQYARLV GQSIQALG-
AF350263_Aau2	GCDVLVQALL EIVSALVHIL GSSSIGQVNY AAS-----
AF350267_At2	GCDVLVQALL EIVSALVHIL GSSSIGQVNY AASSQYQVW GQSLTQALG-
AF350272_Gm2	GCDVLVQALL EIVSALVHIL SSASIGQVNY GASQYQVMI-----
AF350275_Lg2	SCDVLVQALL ELITALISIV DSSHIGQVNY GSSGQYQVW G-----
AY953075_Lh2	SCDVLVQALL EIITALISIL DSSSVQVNY GSSGQYQVW GQSSQVQMG-
AY654293_Nc2	GCDVLVQALL EIVSACVTIL SSSSIGQVNY GAASQYQVW GQSVLSAF--
AF350278_Nm2	GCDVLVQALL EIVSACVTIL SSSSIGQVNY GAA-----
AF350280_Ns2	GCDVLVQALL EIVSACVTIL SSSSIGQVNY GAA-----
AF350269_DtFb1	DCEVLVQVLL EIVSALVQIV CS-----
AF350270_DtFb2	DCEVLVQVLL EIVSALVQIV SNAVGYINP EASGSLM-AV GSALAAAMG-
U47853_ADF1	SSEALVQALL EIVSALVHIL GSASIGVNS VGVNSALNAV QNAVQYAG-
U47854_ADF2	GCDVLVQALL EIVSALVHIL GSANIGVNS SRSAGQASIV GQSVYRAL-
U47855_ADF3	GCDVLVQALL EIVSALVHIL GSSSIGQVNY GASQYQVW GQSVQALA-
U47856_ADF4	GCDVLVQALL EIVSALVHIL SSASIGQVNY SSVSQSTQMI SQALS-----
Consensus	GCDVLVQALL EVVSALVHIL GSSSIGQVNY GSAGQATQIV GQSVYQALGE F

【 図 2 】

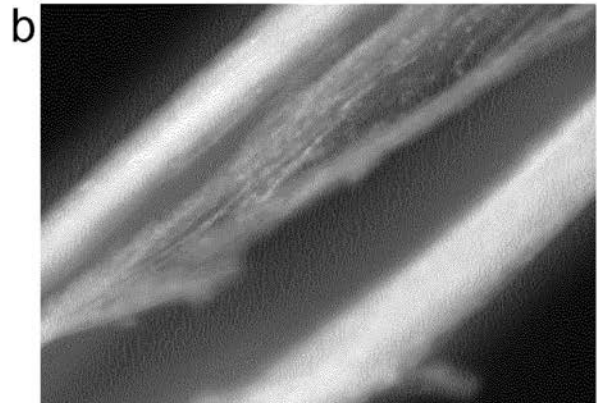
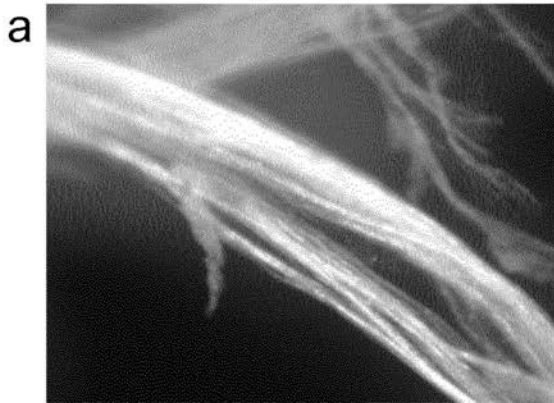
Ea MaSp1 SHTFWTFNPGIAENTMNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMSTIAQSMVSIQSLAAQCRSTSPNKIQALNNMFA  
 Lq MaSp1 QANTPWSKANADAFINSFTSSAONTGFSQDQMDMSLIQNTLMTAMDNG--GRITPESKIQALDMFA  
 Lh MaSp1 QANTPWSKANADAFINSFTSSAONTGFSQDQMDMSLIQNTLMTAMDNG--GRITPESKIQALDMFA  
 Nc MaSp1 -QNTPWSSELADAFINAFNWEAGRTGAFADQLDDMSITIGDTIKTAMDKARSNKSXKGIQALNNMFA  
 At MaSp2 QCATPWSNQLAESFIRFRFFIGQSGAFSPNQLDDMSIIGDTIKTAEKMAQSRKSKSIQALNNMFA  
 Lg MaSp2 ---LFWSSKDNADRFINAFIQAAINSQAFSSDQDDMSVIQNTLMTAMDNG--GRITPESKIQALDMFA  
 Lh MaSp2 QANTPWSKENADAFIQAFNNAASQSGAFSSDQDDMSVIQNTLMTAMDNG--GRITPESKIQALDMFA  
 N1m MaSp2 QANTPWSDTATADAFIQNFIQNLGAVSGSGAFTPDQLDDMSITIGDTIKTAMDKARSNKSXKGIQALNNMFA  
 Nc MaSp2 QARSFSDTATADAFIQNFIQNLGAVSGSGAFTPDQLDDMSITIGDTIKTAMDKARSNKSXKGIQALNNMFA  
 Ab Cysp1 AVPSVFSNPLASGFLQCLTFIGLGNPAFPTEQQDLDAIQVILNAVSSNTGATASAR--AQAALSTALA  
 N1 Cysp1 FVPSVFSNPLASGFLQCLTFIGLGNPAFPTEQQDLDAIQVILNAVSSNTGATASAR--AQAALSTALA  
 Lh TuSp1 ASVNIFFSNPAATSEFLNLRNTESSPAFPFQEQDLDLSIAEVLSDVSS--VNTASSAT--SLALSTALA  
 Nc flag IANSPFNPTAEAFARSFVSNIVSSGFEFGAQAEDFDDIIQSLIQAQ--SMKGRHDTKAKAKAMQVALA  
 N1m flag IVNSPFSNPTAEAFARSFVSNIVSSGFEFGAQAEDFDDIIQSLIQAQ--SMKGRHDTKAKAKAMQVALA

Ea MaSp1 SSMAEIAASEGGGSLTKTSTIASAMSNAPLQTTGVVNFINEITQIVSNPFAQAQANDV  
 Lg MaSp1 SSVAEIAASEG--GDLGVTNAIADALTSAPYQTTGVVNFIRSEIRSLISMPFAQASANDV  
 Lh MaSp1 SSVAEIAASEG--GDLGVTNAIADALTSAPYQTTGVVNFIRSEIRSLISMPFAQASANDV  
 Nc MaSp1 SSMAEIAAVEQGLSVDAKTNAIADLSNSAFYQTTGAANPQVNEIRSLINNEFAQSANEV  
 At MaSp2 SSMAEIAAVEQGLSLEAKTNAIASALSAAFLFTTGVVNFQVNEIKTLIFMIAQASSNEI  
 Lg MaSp2 SSVAEIAVADG--QNVGGAATNAISNALSAPYQTTGVVNFQVNEISNLIINNEFAQV/SANEV  
 Lh MaSp2 SSVAEIAVADG--QNVGGAATNAISNALSAPYQTTGVVNFQVNEITGSLIIGMPFAQVSGNEV  
 N1m MaSp2 SSMAEIAAVEQGGQMDVKNTNAIANDLSAPYQTTGVVNFQVNEIRSLINNEFAQV/SANEV  
 Nc MaSp2 SSMAEIAAVEQGGQMDVKNTNAIANDLSAPYQTTGVVNFQVNEIRSLINNEFAQV/SANEV  
 Ab Cysp1 SSLTDLIIAESAEVSNQSLSELTGILSDCFIQTGSDNPAFYRQSLISVLSAASANEV  
 Nc1 Cysp1 SSLADLLIIESSSGSSYQVQISALTNILSDCFVTTTGSNPAFYRQVTLIGVLSQSSNAI  
 Lh TuSp1 SSLAELLYTESAEEDIDNQVVALSILSDCFVETTGSNPAFYRQVTLIGVLSQSSNYE  
 Nc flag SSIAPLVIAESGGGVQRKNTVINSNLRNLMSTTGSNPEEFVHEVQDIIQMLISQEQINEV  
 N1m flag SSIAPLVIAESGGGVQRKNTVINSNLRNLMSTTGSNPEEFVHEVQDIIQMLISQEQINEV

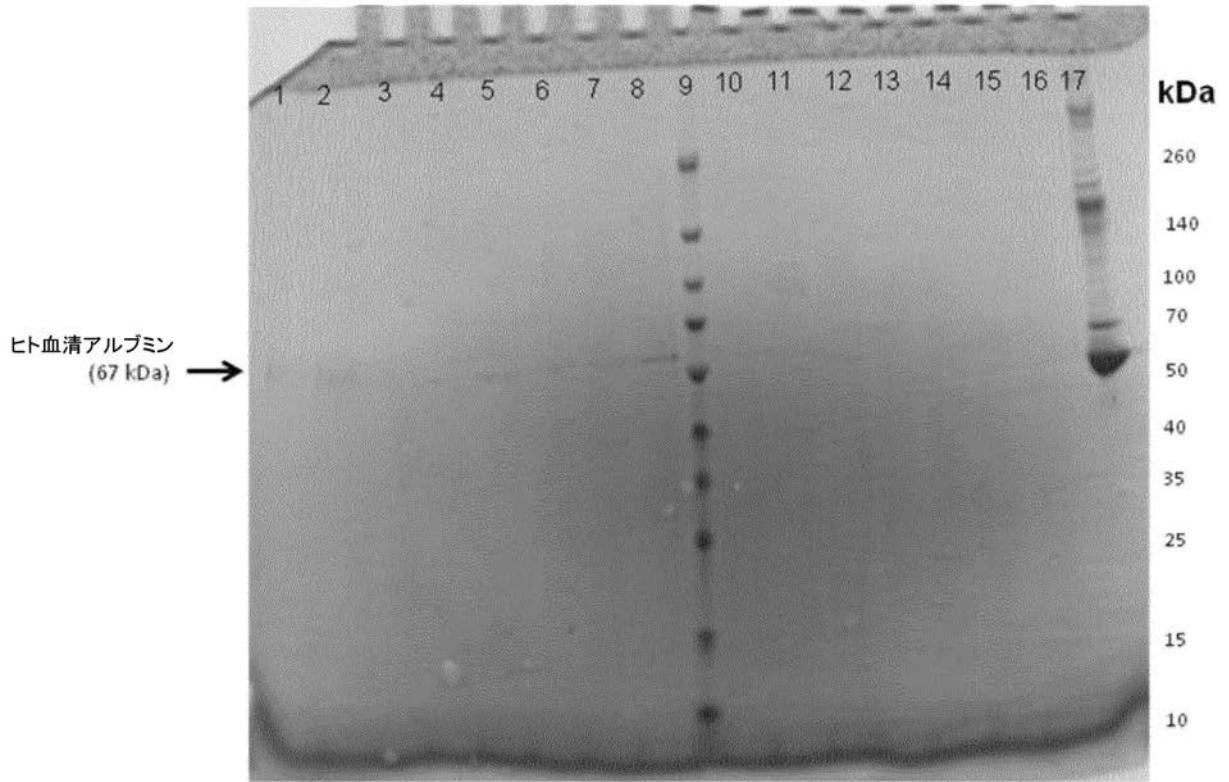
【 図 8 】



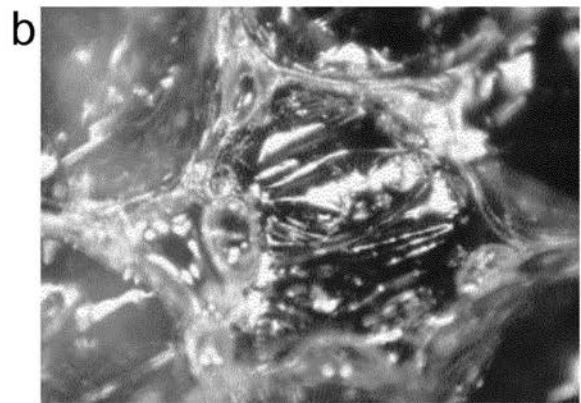
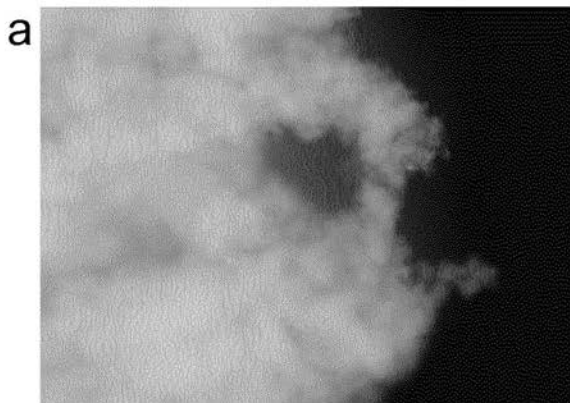
【 図 3 】



【 図 4 】

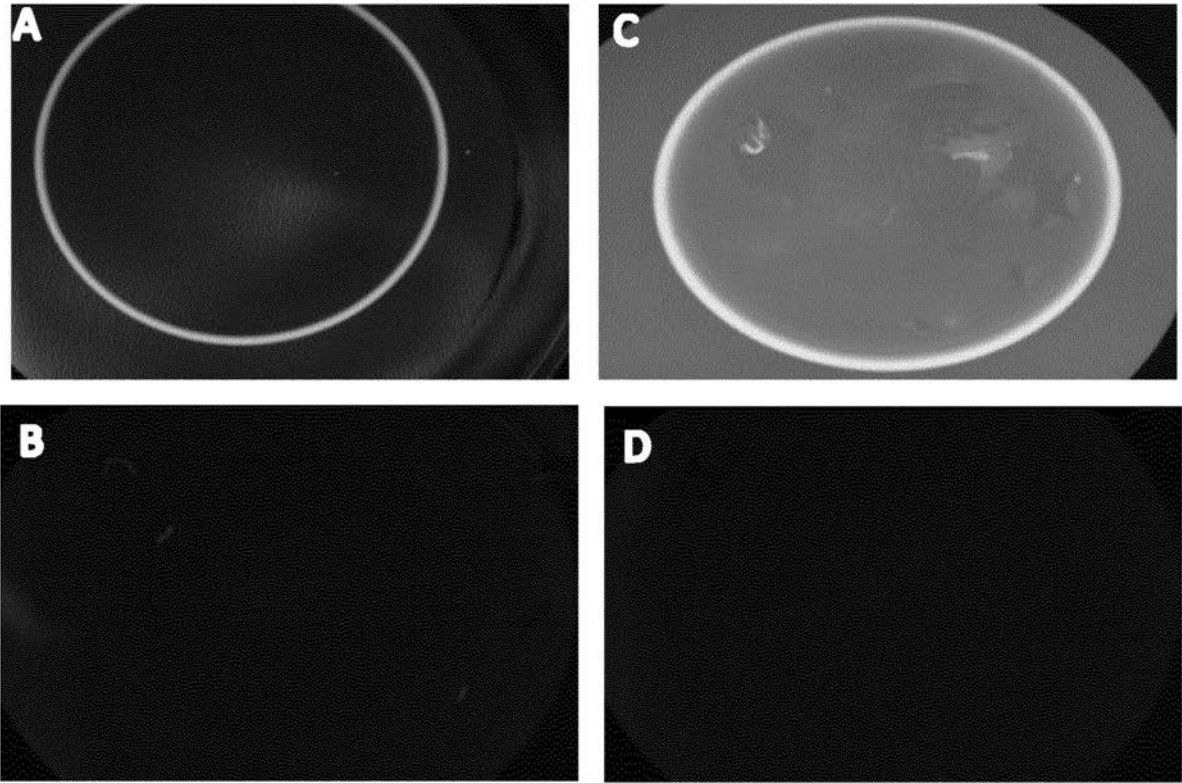


【 図 5 】

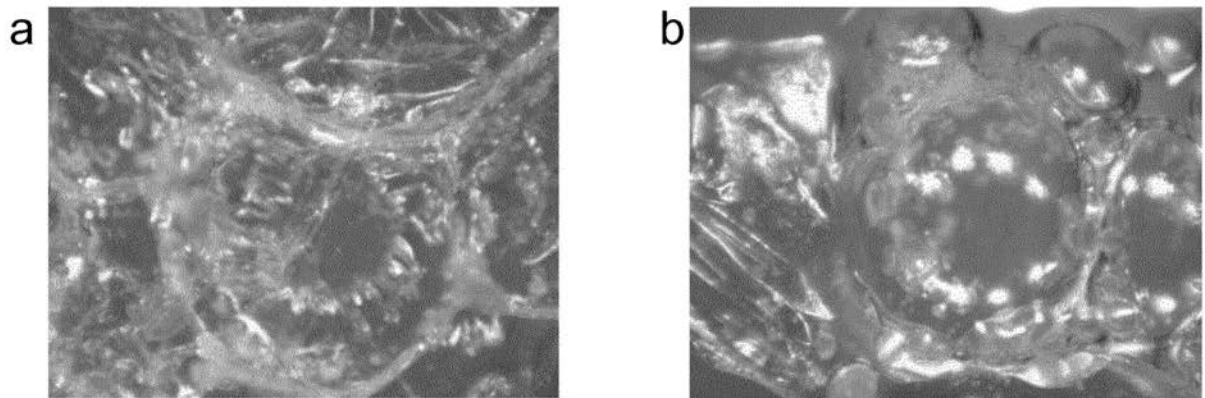




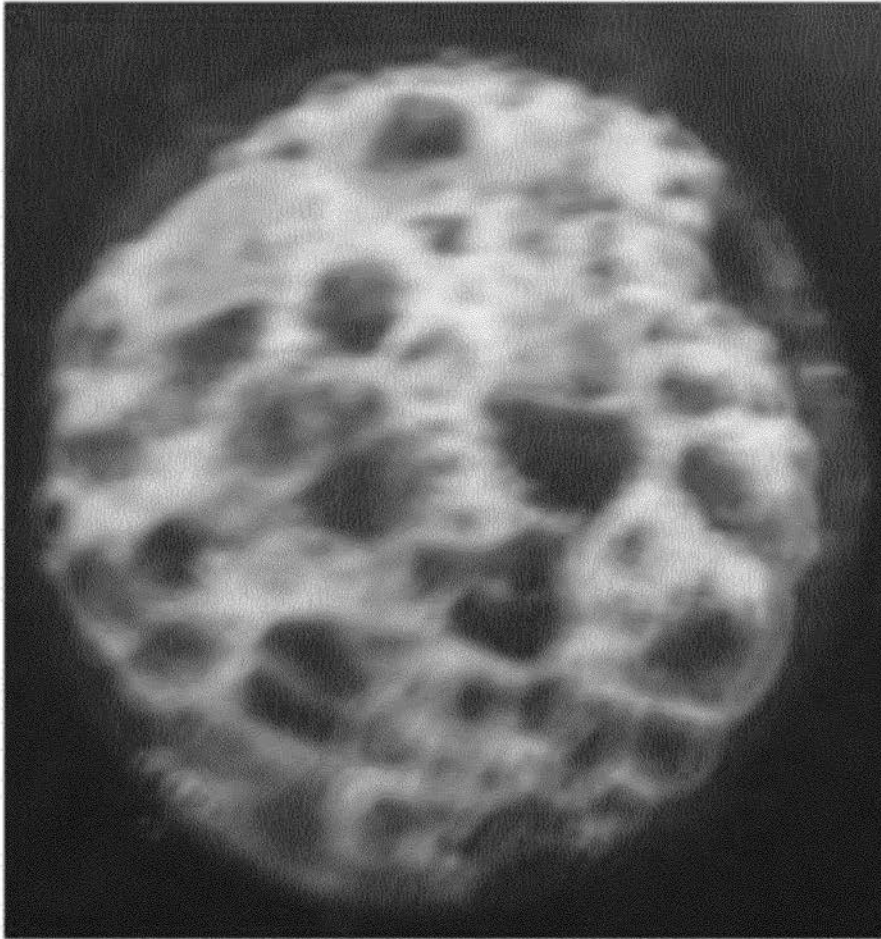
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 9 】



【 配列表 】

2015515969000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/059146

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>	
INV. B01D15/38 C07K14/435 C12N15/62 ADD.	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) B01D C07K C12N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
	Relevant to claim No.
X	MORGAN ET AL: "Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 29, no. 16, 5 March 2008 (2008-03-05), pages 2556-2563, XP022559053, ISSN: 0142-9612
Y	the whole document
	----- -/--
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.
<input checked="" type="checkbox"/>	See patent family annex.
* Special categories of cited documents :	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"B" 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	Date of mailing of the international search report
12 June 2013	21/06/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Voigt-Ritzer, Heike

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/059146

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ANNA RISING ET AL: "Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structureâ function relationships and biomedical applications",            CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHÄUSER-VERLAG, BA,            vol. 68, no. 2, 29 July 2010 (2010-07-29), pages 169-184, XP019871087,            ISSN: 1420-9071, DOI: 10.1007/S00018-010-0462-Z            page 175, column 2, paragraph 2 - page 179, column 1, paragraph 1; table 3            page 180, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>22-27,            29,31,            34-37,            40,41,            46,47</p>
A	<p>HEDHAMMAR MY ET AL: "Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from Euprosthénops australis: Implications for fiber formation",            BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US,            vol. 47, no. 11, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 3407-3417, XP002547535,            ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/B1702432Y            [retrieved on 2008-02-23]            the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-47</p>
A	<p>WO 2007/078239 A2 (JOHANSSON JAN [SE]; HJAEELM GOERAN [SE]; STARK MARGARETA [SE]; RISING A) 12 July 2007 (2007-07-12)            figure 2; example 6</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-47</p>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/059146

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007078239 A2	12-07-2007	AU 2006333611 A1	12-07-2007
		CA 2635660 A1	12-07-2007
		CN 101395178 A	25-03-2009
		EP 1976868 A2	08-10-2008
		JP 5192391 B2	08-05-2013
		JP 2009521921 A	11-06-2009
		US 8278416 B1	02-10-2012
		US 2009226969 A1	10-09-2009
		US 2012329992 A1	27-12-2012
		WO 2007078239 A2	12-07-2007

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/00		F
<b>C 0 7 K</b>	<b>1/22</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K	1/22		
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/20</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/20		A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA40 BA61 BA80 CA07 DA05 EA04 GA11 HA03  
 4B033 NA16 NA42 NA43 NB57  
 4B064 AG01 CA02 CA19 CC24 DA20  
 4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 BC41 CA24  
 4H045 AA20 AA30 BA10 BA41 CA50 DA70 DA75 EA60 FA74