

(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2020-500020
(P2020-500020A)

(43) 公表日 令和2年1月9日(2020.1.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z N A Z	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86 Z	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 146 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-524896 (P2019-524896)
 (86) (22) 出願日 平成29年11月10日 (2017.11.10)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年5月31日 (2019.5.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2017/057060
 (87) 国際公開番号 WO2018/087720
 (87) 国際公開日 平成30年5月17日 (2018.5.17)
 (31) 優先権主張番号 62/421,514
 (32) 優先日 平成28年11月14日 (2016.11.14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
 35
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100141195
 弁理士 西澤 恵美子
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

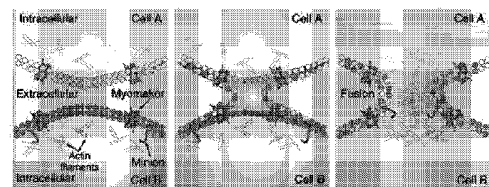
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 融合誘導性タンパク質MINIONに関する組成物、方法、および治療上の使用

(57) 【要約】

本発明は、融合誘導性タンパク質であるMINION (微小タンパク質融合誘導因子) に関連する新規な組成物、方法、および治療上の使用を提供する。

FIG. 30C



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1、3、9、11、13、15、またはその変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクター。

【請求項 2】

前記核酸が、1～4個の変異を有する配列番号 1 を含むポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 3】

前記核酸が、配列番号 1 からなるポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 4】

前記核酸が、1～4個の変異を有する配列番号 3 を含むポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 5】

前記核酸が、配列番号 3 からなるポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 6】

前記核酸が、タグと融合した配列番号 1 もしくは配列番号 3 またはその変異体を含むポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 7】

前記タグが、HA タグ (Y P Y D V P D Y A、配列番号 3 2)、Myc タグ (E Q K L I S E E D L、配列番号 3 3)、FLAG タグ (D Y K D D D D K、配列番号 3 4)、His タグ (H H H H H H、配列番号 3 5)、E タグ (G A P V P Y P D P L E P R、配列番号 3 6)、V5 タグ (G K P I P N P L L G L D S T、配列番号 3 7)、VSV タグ (Y T D I E M N R L G K、配列番号 3 8)、ポリグルタミン酸タグ (E E E E E E、配列番号 3 9)、Avi Tag (G L N D I F E A Q K I E W H E、配列番号 4 0)、SBP タグ (M D E K T T G W R G G H V V E G L A G E L E Q L R A R L E H H P Q G Q R E P、配列番号 4 1)、Streptag (W S H P Q F E K、配列番号 4 2)、Xpress タグ (D L Y D D D D K、配列番号 4 3)、S タグ (K E T A A A K F E R Q H M D S、配列番号 4 4)、Softag 1 (S L A E L L N A G L G G S、配列番号 4 5)、Softag 3 (T Q D P S R V G、配列番号 4 6)、カルモジュリンタグ (K R R W K K N F I A V S A A N R F K K I S S S G A L、配列番号 4 7)、TC タグ (C C P G C C、配列番号 4 8)、Isopeptag (T D K D M T I T F T N K K D A E、配列番号 4 9)、Spy Tag (A H I V M V D A Y K P T K、配列番号 5 0)、Snoop Tag (K L G D I E F I K V N K、配列番号 5 1)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) タグ、蛍光タンパク質タグ (例えば、GFP タグ)、マルトース結合タンパク質 (MBP) タグ、Halotag、またはチオレドキシントグから選択される、請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 8】

前記核酸が、配列番号 2 または配列番号 4 を含む、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 9】

前記核酸が、配列番号 2 または配列番号 4 からなる、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 10】

プロモーターをさらに含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 11】

前記プロモーターが、構成的プロモーターである、請求項 10 に記載のベクター。

【請求項 12】

前記プロモーターが、誘導性プロモーターである、請求項 10 に記載のベクター。

【請求項 13】

ポリアデニル化シグナルをさらに含む、請求項 1～12 のいずれか一項に記載のベクター

10

20

30

40

50

一。

【請求項 14】

選択マーカ-をさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 15】

Myomaker ポリペプチドまたはその変異体をコードする第 2 の核酸をさらに含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 16】

前記第 2 の核酸が、配列番号 16、18、20、22、24、26、28、もしくは 30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む Myomaker ポリペプチドをコードする、請求項 15 に記載のベクター。

10

【請求項 17】

前記第 2 の核酸が、配列番号 16、18、20、22、24、26、28、もしくは 30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる Myomaker ポリペプチドをコードする、請求項 15 に記載のベクター。

【請求項 18】

前記第 2 の核酸が、配列番号 16 を含む Myomaker ポリペプチドをコードする、請求項 15 に記載のベクター。

【請求項 19】

前記第 2 の核酸が、配列番号 16 からなる Myomaker ポリペプチドをコードする、請求項 15 に記載のベクター。

20

【請求項 20】

前記第 2 の核酸が、配列番号 17 を含む、請求項 15 に記載のベクター。

【請求項 21】

前記第 2 の核酸が、配列番号 17 からなる、請求項 15 に記載のベクター。

【請求項 22】

前記ベクターがさらに、前記第 2 の核酸の上流に配列内リボソ-ム進入部位または 2A 配列を含む、請求項 15 ~ 21 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 23】

前記ベクターが、配列番号 52 ~ 66 のいずれか 1 つから選択される 2A オリゴペプチドをコードする 2A 配列を含む、請求項 22 に記載のベクター。

30

【請求項 24】

前記ベクターがさらに、前記第 2 の核酸の上流に第 2 のプロモ-ターを含む、請求項 15 ~ 23 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 25】

前記ベクターが、プラスミド、コスミド、RNA、またはウイルスベクターから選択される、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 26】

前記ウイルスベクターが、次のウイルス：アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス (HSV)、パルボウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、シンドビスウイルス、インフルエンザウイルス、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス (NDV)、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、ポリオウイルス、ポックスウイルス、セネカパレーウイルス、コクサッキーウイルス、エンテロウイルス、粘液腫ウイルス、またはマラバウイルスのいずれかをベースにしたベクターから選択される、請求項 25 に記載のベクター。

40

【請求項 27】

請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の前記ベクターを含む細胞。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の前記ベクターおよび Myomaker ポリペプチドまたはその変異体をコードする第 2 の核酸を含む第 2 のベクターを含む細胞。

【請求項 29】

50

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 27 または 28 に記載の細胞。

【請求項 30】

前記細胞が、筋細胞、線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、または腫瘍細胞から選択される、請求項 27 ~ 29 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 31】

前記細胞が、検出可能なマーカーを発現する、請求項 27 ~ 30 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 32】

配列番号 1、3、5、7、9、11、13、もしくは 15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むリポソーム。 10

【請求項 33】

前記ポリペプチドが、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、もしくは 15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 32 に記載のリポソーム。

【請求項 34】

前記ポリペプチドが、配列番号 1 またはその変異体からなる、請求項 32 に記載のリポソーム。

【請求項 35】

前記ポリペプチドが、配列番号 3 またはその変異体からなる、請求項 32 に記載のリポソーム。 20

【請求項 36】

Myomaker ポリペプチドをさらに含む、請求項 32 ~ 35 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 37】

前記 Myomaker ポリペプチドが、配列番号 16、18、20、22、24、26、28、もしくは 30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 36 に記載のリポソーム。

【請求項 38】

前記 Myomaker ポリペプチドが、配列番号 16、18、20、22、24、26、28、もしくは 30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 36 に記載のリポソーム。 30

【請求項 39】

前記 Myomaker ポリペプチドが、配列番号 16 またはその変異体を含む、請求項 36 に記載のリポソーム。

【請求項 40】

前記 Myomaker ポリペプチドが、配列番号 16 またはその変異体からなる、請求項 36 に記載のリポソーム。

【請求項 41】

治療薬をさらに含み、前記治療薬が前記リポソーム中に被包される、請求項 32 ~ 40 のいずれか一項に記載のリポソーム。 40

【請求項 42】

前記治療薬が、核酸、タンパク質、低分子化合物、またはペプチド核酸から選択される、請求項 41 に記載のリポソーム。

【請求項 43】

治療薬を細胞に送達する方法であって、前記方法が、請求項 41 または 42 に記載の前記リポソームを前記細胞と接触させる工程を含み、前記リポソームが前記細胞と融合し、それにより前記治療薬を前記細胞に送達する、方法。

【請求項 44】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】 50

前記細胞が、腫瘍細胞または機能障害性細胞である、請求項 4 3 または 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記方法がインビトロで実施される、請求項 4 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記方法がインビボで実施される、請求項 4 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

第 1 の細胞を第 2 の細胞に融合する方法であって、前記方法が：

(a) M I N I O N ポリペプチドおよび M y o m a k e r ポリペプチドを発現する第 1 の細胞をもたらす工程と；

(b) 前記第 1 の細胞を、M y o m a k e r ポリペプチドを発現する第 2 の細胞と接触させる工程とを含み、

前記第 1 の細胞が前記第 2 の細胞と融合する、方法。

【請求項 4 9】

第 1 の細胞を第 2 の細胞に融合する方法であって、前記方法が：

(a) M I N I O N ポリペプチドを発現する第 1 の細胞、および同型相互作用を媒介する受容体をもたらす工程と；

(b) 前記第 1 の細胞を、前記第 1 の細胞によって発現されるものと同じの前記受容体を発現する第 2 の細胞と接触させる工程とを含み、

前記第 1 の細胞が前記第 2 の細胞と融合する、方法。

【請求項 5 0】

前記 M I N I O N ポリペプチドが、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、もしくは 15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 8 または 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記 M I N I O N ポリペプチドが、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、もしくは 15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 4 8 または 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記 M I N I O N ポリペプチドが、配列番号 1 またはその変異体を含む、請求項 4 8 または 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記 M I N I O N ポリペプチドが、配列番号 3 またはその変異体を含む、請求項 4 8 または 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記 M I N I O N ポリペプチドが、配列番号 1 またはその変異体からなる、請求項 4 8 または 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記 M I N I O N ポリペプチドが、配列番号 3 またはその変異体からなる、請求項 4 8 または 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記 M y o m a k e r ポリペプチドが、配列番号 16、18、20、22、24、26、28、もしくは 30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 8 および 5 0 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記 M y o m a k e r ポリペプチドが、配列番号 16、18、20、22、24、26、28、もしくは 30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 4 8 および 5 0 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記 M y o m a k e r ポリペプチドが、配列番号 16 またはその変異体を含む、請求項

10

20

30

40

50

48および50～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項59】

前記Myomakerポリペプチドが、配列番号16またはその変異体からなる、請求項48および50～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項60】

同型相互作用を媒介する前記受容体が、カドヘリン、セレクチン、クローディン、オクルーディン、接合部接着分子、またはトリセルリンから選択される、請求項49～59のいずれか一項に記載の方法。

【請求項61】

同型相互作用を媒介する前記受容体が、N-カドヘリン、P-カドヘリン、E-カドヘリン、またはM-カドヘリンから選択されるカドヘリンである、請求項49～59のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項62】

前記第1の細胞および前記第2の細胞が、ヒト細胞である、請求項48～61のいずれか一項に記載の方法。

【請求項63】

前記第1の細胞および前記第2の細胞が、筋細胞、線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、樹状細胞、または腫瘍細胞から選択される、請求項48～62のいずれか一項に記載の方法。

【請求項64】

前記第1の細胞が、筋細胞、線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、または樹状細胞から選択され、前記第2の細胞が、腫瘍細胞または機能障害性細胞である、請求項48～62のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項65】

前記第1の細胞が、検出可能なマーカーを発現する、請求項48～64のいずれか一項に記載の方法。

【請求項66】

工程(b)がインビトロで実施される、請求項48～65のいずれか一項に記載の方法。

【請求項67】

工程(b)がインビボで実施される、請求項48～65のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項68】

前記第1の細胞がさらに、目的の遺伝子を含み、前記細胞の前記融合により、前記目的の遺伝子を前記第2の細胞に送達する、請求項48～67のいずれか一項に記載の方法。

【請求項69】

前記目的の遺伝子が、前記第2の細胞の病理学的表現型を矯正する、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

前記第2の細胞がさらに、目的の遺伝子を含み、前記細胞の前記融合により、前記目的の遺伝子を前記第1の細胞に送達する、請求項48～69のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項71】

前記目的の遺伝子が、前記第1の細胞の病理学的表現型を矯正する、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記目的の遺伝子が、ミトコンドリアDNAの遺伝子である、請求項68～71のいずれか一項に記載の方法。

【請求項73】

前記病理学的表現型が、ミトコンドリアDNA欠乏；ミトコンドリア心筋症；赤色ぼろ線維を伴うミオクロオヌス性てんかん(MERRF)；ミトコンドリア心筋症、脳筋症、乳酸性アシドーシス、脳卒中様症状(MELAS)；カーズ-セイアー症候群(KSS

50

);リー症候群(亜急性壊死性脳筋症)および母性遺伝のリー症候群(MILS);ミトコンドリア神経性胃腸管系脳筋症(MNGIE);赤色ぼろ線維を伴うミオクロオヌス性てんかん(MERRF);ニューロパチー、運動失調および網膜色素変性(NARP);またはピアソン症候群から選択される、請求項69または71に記載の方法。

【請求項74】

対象における癌を治療する方法であって、前記方法が、MINIONポリペプチドをコードする核酸およびMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む有効量の腫瘍溶解性ウイルスを前記対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項75】

対象における癌を治療する方法であって、前記方法が、MINIONポリペプチドをコードする核酸および同型相互作用を媒介する受容体をコードする核酸を含む有効量の腫瘍溶解性ウイルスを前記対象に投与する工程を含む、方法。

10

【請求項76】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項74または75に記載の方法。

【請求項77】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項74または75に記載の方法。

20

【請求項78】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号1またはその変異体を含む、請求項74または75に記載の方法。

【請求項79】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号3またはその変異体を含む、請求項74または75に記載の方法。

【請求項80】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号1またはその変異体からなる、請求項74または75に記載の方法。

【請求項81】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号3またはその変異体からなる、請求項74または75に記載の方法。

30

【請求項82】

前記Myomakerポリペプチドが、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項74および76~81のいずれか一項に記載の方法。

【請求項83】

前記Myomakerポリペプチドが、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項74および76~81のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項84】

前記Myomakerポリペプチドが、配列番号16またはその変異体を含む、請求項74および76~81のいずれか一項に記載の方法。

【請求項85】

前記Myomakerポリペプチドが、配列番号16またはその変異体からなる、請求項74および76~81のいずれか一項に記載の方法。

【請求項86】

同型相互作用を媒介する前記受容体が、カドヘリン、セレクチン、クローディン、オクルーディン、接合部接着分子、またはトリセルリンから選択される、請求項75~81のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 87】

同型相互作用を媒介する前記受容体が、N - カドヘリン、P - カドヘリン、E - カドヘリン、またはM - カドヘリンから選択されるカドヘリンである、請求項75～81のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 88】

前記腫瘍溶解性ウイルスが、次のウイルス：腫瘍溶解性アデノウイルス、腫瘍溶解性アデノ随伴ウイルス、腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス(HSV)、腫瘍溶解性バルボウイルス、腫瘍溶解性レトロウイルス、腫瘍溶解性レンチウイルス、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、腫瘍溶解性シンドビスウイルス、腫瘍溶解性インフルエンザウイルス、腫瘍溶解性レオウイルス、腫瘍溶解性ニューカッスル病ウイルス(NDV)、腫瘍溶解性麻疹ウイルス、腫瘍溶解性水疱性口内炎ウイルス(VSV)、腫瘍溶解性ポリオウイルス、腫瘍溶解性ポックスウイルス、腫瘍溶解性セネカバレーウイルス、腫瘍溶解性コクサッキーウイルス、腫瘍溶解性エンテロウイルス、腫瘍溶解性粘液腫ウイルス、または腫瘍溶解性マラバウイルスのいずれかから選択される、請求項74～87のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 89】

前記腫瘍溶解性ウイルスが癌細胞を特異的に標的化する、請求項74～88のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 90】

前記腫瘍溶解性ウイルスが癌細胞において選択的に複製する、請求項74～89のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 91】

前記腫瘍溶解性ウイルスが、検出可能なマーカーを発現する、請求項74～90のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 92】

前記腫瘍溶解性ウイルスが、腫瘍内、経皮的、経粘膜的、経口的、鼻腔内、皮下、動脈内、静脈内、筋肉内、髄腔内、もしくは腹腔内、または経肺投与を介して前記対象に投与される、請求項74～91のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 93】

前記癌が、頭頸部癌、皮膚癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、脳癌、神経芽細胞腫、神経膠腫、肉腫、リンパ腫、または白血病から選択される、請求項74～92のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 94】

前記癌が、血管肉腫、皮膚線維肉腫、類上皮肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、消化管間質腫瘍(GIST)、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫、未分化多形肉腫、または滑膜肉腫から選択される肉腫である、請求項74～92のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 95】

ヒトMINIONタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 96】

前記ヒトMINIONタンパク質が、配列番号1または3の前記アミノ酸配列を含む、請求項95に記載の抗体。

【請求項 97】

前記モノクローナル抗体が、キメラ抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体である、請求項95または96に記載の抗体。

【請求項 98】

対象における癌を治療する方法であって、前記方法が、MINIONポリペプチドをコードする核酸およびMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む有効量の癌ワクチンを前記対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項 99】

10

20

30

40

50

対象における癌を治療する方法であって、前記方法が、MINIONポリペプチドをコードする核酸および同型相互作用を媒介する受容体をコードする核酸を含む有効量の癌ワクチンを前記対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項100】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項98または99に記載の方法。

【請求項101】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項98または99に記載の方法。

10

【請求項102】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号1またはその変異体を含む、請求項98または99に記載の方法。

【請求項103】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号3またはその変異体を含む、請求項98または99に記載の方法。

【請求項104】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号1またはその変異体からなる、請求項98または99に記載の方法。

20

【請求項105】

前記MINIONポリペプチドが、配列番号3またはその変異体からなる、請求項98または99に記載の方法。

【請求項106】

前記Myomakerポリペプチドが、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項98および99～105のいずれか一項に記載の方法。

【請求項107】

前記Myomakerポリペプチドが、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項98および99～105のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項108】

前記Myomakerポリペプチドが、配列番号16またはその変異体を含む、請求項98および99～105のいずれか一項に記載の方法。

【請求項109】

前記Myomakerポリペプチドが、配列番号16またはその変異体からなる、請求項98および99～105のいずれか一項に記載の方法。

【請求項110】

同型相互作用を媒介する前記受容体が、カドヘリン、セレクチン、クローディン、オクルーディン、接合部接着分子、またはトリセルリンから選択される、請求項99～105のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項111】

同型相互作用を媒介する前記受容体が、N-カドヘリン、P-カドヘリン、E-カドヘリン、またはM-カドヘリンから選択されるカドヘリンである、請求項99～105のいずれか一項に記載の方法。

【請求項112】

前記癌ワクチンが、樹状細胞および腫瘍細胞に由来する樹状-腫瘍融合細胞を含む、請求項98～111のいずれか一項に記載の方法。

【請求項113】

前記癌ワクチンが、CD4⁺またはCD8⁺T細胞の活性化をシミュレートする、請求

50

項 9 8 ~ 1 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

前記癌ワクチンが、1種以上の腫瘍関連抗原を提示する、請求項 9 8 ~ 1 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

前記癌ワクチンが、主要組織適合抗原複合体 (M H C) クラス I または I I 経路を介して 1 種以上の前記腫瘍関連抗原を提示する、請求項 1 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

前記癌ワクチンが、検出可能なマーカーを発現する、請求項 9 8 ~ 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 1 7】

前記樹状細胞が、自己の樹状細胞である、請求項 1 1 2 ~ 1 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記樹状細胞が、同種の樹状細胞である、請求項 1 1 2 ~ 1 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記腫瘍細胞が、自己の腫瘍細胞である、請求項 1 1 2 ~ 1 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記腫瘍細胞が、同種の腫瘍細胞である、請求項 1 1 2 ~ 1 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 2 1】

前記樹状細胞が、活性化された樹状細胞である、請求項 1 1 2 ~ 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記腫瘍細胞が、免疫原性の腫瘍細胞である、請求項 1 1 2 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記腫瘍細胞が、癌幹細胞である、請求項 1 1 2 ~ 1 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 1 2 4】

前記癌ワクチンが、腫瘍内、経皮的、経粘膜的、経口的、鼻腔内、皮下、動脈内、静脈内、筋肉内、髄腔内、もしくは腹腔内、または経肺投与を介して前記対象に投与される、請求項 9 8 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記癌が、頭頸部癌、皮膚癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、脳癌、神経芽細胞腫、神経膠腫、肉腫、リンパ腫、または白血病から選択される、請求項 9 8 ~ 1 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記癌が、血管肉腫、皮膚線維肉腫、類上皮肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、消化管間質腫瘍 (G I S T)、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫、未分化多形肉腫、または滑膜肉腫から選択される肉腫である、請求項 9 8 ~ 1 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 2 7】

筋ジストロフィーの治療を必要とする対象において筋ジストロフィーを治療する方法であって、請求項 2 7 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の細胞を含む医薬組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 1 2 8】

前記筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D)、ベッカー型筋

50

ジストロフィー（BMD）、先天性筋ジストロフィー（CMD）、遠位型筋ジストロフィー、エメリ・ドレフュス型筋ジストロフィー（EDMD）、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FMD）、肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）、筋強直性筋ジストロフィー（MMD）、眼咽頭型筋ジストロフィー（Oculopharyngeal muscular dystrophy）（OMD）、三好ミオパチー（MM）、肢帯型筋ジストロフィー2B型（LGMD2B）、および遠位型ミオパチー（DM）からなる群から選択される、請求項127に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年11月14日に提出された米国仮特許出願第62/421,514号の利益を主張するものであり、その内容は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、融合誘導性タンパク質であるMINION（微小タンパク質融合誘導因子）に関連する組成物、方法、および治療上の使用を提供する。

【0003】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的手段により提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2017年11月8日に作成された前記ASCIIの複製は、PAT057279-WO-PCT__SL__2017__11__08.txtと命名され、サイズは73,445バイトである。

【背景技術】

【0004】

マウスのMINION（微小タンパク質融合誘導因子）タンパク質もまた、胚性幹細胞および生殖細胞特異的タンパク質（ESGP）として知られており、幹細胞の多能性の維持において重要な役割を果たす転写因子Oct-4によって調節される下流遺伝子として最初に同定された（Chen Y et al., Acta Biochimica et Biophysica Sinica 2005, 37(12):789-796）。マウスのMINIONは、性交後日数3.5(dpc)の胚盤胞から17.5dpcの胚の受精卵母細胞、ならびに成体マウスの精巣および卵巣組織において検出されたが、マウス胚性幹細胞の自己再生および分化にとって必ずしも必要ではない。（Chen Y et al., 2005）。したがって、マウスのMINIONタンパク質の機能は未知である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、微小タンパク質MINIONが、筋前駆細胞の融合および骨格筋の発生に必要であり、かつMINIONおよびMyomakerの異種共発現が、非筋細胞においてさえ迅速かつ均質な細胞融合を誘導するのに十分であるという知見に少なくとも部分的に基づく。マウスMINIONのヒトオルソログは、以前に報告されていない。本明細書に記載のように、本発明者らは、MINIONのヒトオルソログのアミノ酸およびcDNA配列を同定し、ヒトMINIONタンパク質もまた、融合誘導性活性を有することを見出したが、このことは、細胞融合におけるMINIONタンパク質の進化的に保存された役割を示唆している。したがって、本明細書では、融合誘導性タンパク質MINIONに関連する組成物、方法、および治療上の使用が提供される。

【0006】

一態様では、本明細書では、MINIONポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1、3、9

10

20

30

40

50

、11、13、15、またはその変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、1～4個の変異を有する配列番号1を含むポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、1～4個の変異を有する配列番号3を含むポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号1からなるポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号3からなるポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号2または配列番号4を含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号2または配列番号4からなる核酸を含む。

10

【0007】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、タグと融合した配列番号1もしくは配列番号3またはその変異体を含むポリペプチドをコードする核酸を含む。タグは、HA-タグ (YPYDVPDYA 配列番号32)、Myc-タグ (EQKLISEEDL 配列番号33)、FLAG-タグ (DYKDDDDK 配列番号34)、His-タグ (HHHHHH 配列番号35)、E-タグ (GAPVYPDPLEPR 配列番号36)、V5-タグ (GKPIPNPLLGLDST 配列番号37)、VSVタグ (YTDIEMNRLGK 配列番号38)、ポリグルタミン酸タグ (EEEEEE 配列番号39)、AviTag (GLNDIFEAQKIEWHE 配列番号40)、SBPタグ (MDEKTTGWRGGHVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP 配列番号41)、Strept-タグ (WSHPQFEK 配列番号42)、Xpressタグ (DLYDDDDK 配列番号43)、S-タグ (KETAAAKFERQHMD 配列番号44)、Softag 1 (SLAELLNAGLGG 配列番号45)、Softag 3 (TQDPSRVG 配列番号46)、カルモジュリン-タグ (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL 配列番号47)、TCタグ (CCPGCC 配列番号48)、Isopeptag (TDKDMTITFTNKKDAE 配列番号49)、SpyTag (AHIVMVDAYKPTK 配列番号50)、SnoopTag (KLGDIKFNK 配列番号51)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)-タグ、蛍光タンパク質-タグ (例えば、GFPタグ)、マルトース結合タンパク質 (MBP)-タグ、Halotag、またはチオレドキシン-タグから選択することができる。

20

30

【0008】

いくつかの実施形態では、発現ベクターはさらに、MINIONポリペプチドの発現を調節するプロモーター、例えば、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または組織特異的プロモーターを含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、発現ベクターはまた、ポリアデニル化シグナルを含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターはまた、選択マーカを含む。

【0010】

本明細書ではまた、MINIONポリペプチドまたはその変異体およびMyomakerポリペプチドまたはその変異体の両方を発現するための発現ベクターが提供される。したがって、発現ベクターは、MINIONポリペプチドまたはその変異体をコードする第1の核酸、およびMyomakerポリペプチドまたはその変異体をコードする第2の核酸を含む。

40

【0011】

いくつかの実施形態では、第2の核酸は、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含むMyomakerポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなるMyomakerポリペプチドをコードする。いくつかの実

50

施形態では、第2の核酸は、配列番号16を含むMyomakerポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、配列番号16からなるMyomakerポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、配列番号17を含む。いくつかの実施形態では、第2の核酸は、配列番号17からなる。

【0012】

いくつかの実施形態では、発現ベクターはさらに、第2の核酸の上流に配列内リボソーム進入部位または2A配列を含む。例えば、発現ベクターは、配列番号52～66のいずれか1つから選択される2Aオリゴペプチドをコードする2A配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、発現ベクターはさらに、第2のプロモーター（例えば、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または組織特異的プロモーター）を第2の核酸の上流に含み、第2の核酸の発現を調節する。

10

【0013】

発現ベクターは、プラスミド、コスミド、RNA、またはウイルスベクターであってもよい。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、次のウイルス：アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、パルボウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、シンドビスウイルス、インフルエンザウイルス、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、ポリオウイルス、ポックスウイルス、セネカバレーウイルス、コクサッキーウイルス、エンテロウイルス、粘液腫ウイルス、またはマラバウイルスのいずれかをベースにしたウイルスベクターである。

20

【0014】

別の態様において、本明細書では、本明細書に記載の発現ベクターのいずれかを含む細胞が提供される。いくつかの実施形態では、このような細胞は、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）を発現するための発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、このような細胞は、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）およびMyomakerポリペプチド（例えば、ヒトMyomakerポリペプチド）の両方を発現するための発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、このような細胞は、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）を発現するための発現ベクター、およびMyomakerポリペプチド（例えば、ヒトMyomakerポリペプチド）を発現するための第2の発現ベクターを含む。このような細胞は、宿主細胞または治療用細胞であり得る。いくつかの実施形態では、このような細胞は、ヒト細胞、例えば、筋細胞、線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、または腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、このような細胞は、検出可能なマーカーを発現する。

30

【0015】

別の態様において、本明細書では、MINIONタンパク質、例えば、本明細書に記載のMINIONタンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含むMINIONタンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15のいずれかから選択されるアミノ酸配列からなるMINIONタンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が提供される。

40

【0016】

いくつかの実施形態において、本明細書では、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1もしくは3、またはその変異体を含むタンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1もしくは3、またはその変異体を含むタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態では、ヒトMINIONタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗

50

体またはその抗原結合断片は、キメラ抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体である。

【0017】

別の態様において、本明細書では、MINIONポリペプチドを含むリボソームが提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むリボソームが提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むリボソームが提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1、またはその変異体からなるポリペプチドを含むリボソームが提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号3、またはその変異体からなるポリペプチドを含むリボソームが提供される。

10

【0018】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、Myomakerポリペプチドも含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含むMyomakerポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなるMyomakerポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号16、またはその変異体からなるMyomakerポリペプチドを含む。

20

【0019】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームはさらに、治療薬を含み、治療薬は、リボソームに被包される。治療薬は、核酸、タンパク質、低分子化合物、またはペプチド核酸から選択され得る。

【0020】

別の態様において、本明細書では、本明細書に記載のリボソームのいずれかを用いて治療薬を細胞に送達する方法が提供される。いくつかの実施形態では、このような方法は、細胞を、MINIONポリペプチドおよび治療薬を含むリボソームと接触させる工程を含み、リボソームが細胞と融合し、それにより治療薬を細胞に送達する。本方法は、インビトロまたはインビボで実施することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍細胞または機能障害性細胞である。

30

【0021】

別の態様において、本明細書では、第1の細胞を第2の細胞に融合する方法が提供される。このような方法は、次の工程：(a) MINIONポリペプチドおよびMyomakerポリペプチドを発現する第1の細胞をもたらす工程と；(b) 第1の細胞を、Myomakerポリペプチドを発現する第2の細胞と接触させる工程であって、第1の細胞が第2の細胞と融合する工程とを含み得る。本方法の工程(b)は、インビトロまたはインビボで実施することができる。

【0022】

また、第1の細胞を第2の細胞に融合する方法が提供され、これは、(a) MINIONポリペプチド、および同型相互作用を媒介する受容体を発現する第1の細胞をもたらす工程と；(b) 第1の細胞を、第1の細胞によって発現されるものと同じ受容体を発現する第2の細胞と接触させる工程であって、第1の細胞が第2の細胞と融合する工程とを含む。本方法の工程(b)は、インビトロまたはインビボで実施することができる。同型相互作用を媒介する受容体は、カドヘリン、セレクトリン、クローディン、オクルーディン、接合部接着分子、またはトリセルリンから選択され得る。いくつかの実施形態では、同型相互作用を媒介する受容体は、N-カドヘリン、P-カドヘリン、E-カドヘリン、またはM-カドヘリンから選択されるカドヘリンである。

40

【0023】

いくつかの実施形態では、第1および第2の細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施

50

形態では、第1および第2の細胞は、筋細胞、線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、樹状細胞、または腫瘍細胞から選択される。いくつかの実施形態では、第1の細胞は、筋細胞、線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、または樹状細胞から選択され、第2の細胞は、腫瘍細胞または機能障害性細胞である。いくつかの実施形態では、第1の細胞は、検出可能なマーカーを発現する。

【0024】

いくつかの実施形態では、第1の細胞はさらに、目的の遺伝子を含み、細胞の融合により、目的の遺伝子を第2の細胞に送達する。いくつかの実施形態では、目的の遺伝子は、第2の細胞の病理学的表現型を矯正する。いくつかの実施形態では、第2の細胞はさらに、目的の遺伝子を含み、細胞の融合により、目的の遺伝子を第1の細胞に送達する。いくつかの実施形態では、目的の遺伝子は、第1の細胞の病理学的表現型を矯正する。

10

【0025】

いくつかの実施形態では、目的の遺伝子は、ミトコンドリアDNAの遺伝子であり、病理学的表現型は、ミトコンドリアDNA欠乏；ミトコンドリア心筋症；赤色ぼろ線維を伴うミオクローヌス性てんかん（MERRF）；ミトコンドリア心筋症、脳筋症、乳酸性アシドーシス、脳卒中様症状（MELAS）；カーズ-セイアー症候群（KSS）；リー症候群（亜急性壊死性脳筋症）および母性遺伝のリー症候群（MILS）；ミトコンドリア神経性胃腸管系脳筋症（MNGIE）；赤色ぼろ線維を伴うミオクローヌス性てんかん（MERRF）；ニューロパチー、運動失調および網膜色素変性（NARP）；またはピアソン症候群から選択される。

20

【0026】

さらなる態様において、本明細書では、MINIONポリペプチドをコードする核酸を含む有効量の腫瘍溶解性ウイルスを対象に投与することによって、対象における癌を治療する方法が提供される。あるいは、本明細書では、癌の治療において使用するためのMINIONポリペプチドをコードする核酸を含む腫瘍溶解性ウイルスが提供される。癌は、頭頸部癌、皮膚癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、脳癌、神経芽細胞腫、神経膠腫、肉腫、リンパ腫、または白血病であり得る。いくつかの実施形態では、癌は、血管肉腫、皮膚線維肉腫、類上皮肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、消化管間質腫瘍（GIST）、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫、未分化多形肉腫、または滑膜肉腫から選択される肉腫である。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍内、経皮的、経粘膜的、経口的、鼻腔内、皮下、動脈内、静脈内、筋肉内、髄腔内、もしくは腹腔内、または経肺投与を介して対象に投与され得る。

30

【0027】

いくつかの実施形態では、このような方法は、MINIONポリペプチドをコードする核酸およびMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む有効量の腫瘍溶解性ウイルスを対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、このような方法は、MINIONポリペプチドをコードする核酸および同型相互作用を媒介する受容体をコードする核酸を含む有効量の腫瘍溶解性ウイルスを対象に投与する工程を含む。同型相互作用を媒介する受容体は、カドヘリン、セレクチン、クローディン、オクルーディン、接合部接着分子、またはトリセルリンから選択され得る。いくつかの実施形態では、同型相互作用を媒介する受容体は、N-カドヘリン、P-カドヘリン、E-カドヘリン、またはM-カドヘリンから選択されるカドヘリンである。

40

【0028】

腫瘍溶解性ウイルスは、次のウイルス：腫瘍溶解性アデノウイルス、腫瘍溶解性アデノ随伴ウイルス、腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス（HSV）、腫瘍溶解性バルボウイルス、腫瘍溶解性レトロウイルス、腫瘍溶解性レンチウイルス、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、腫瘍溶解性シンドビスウイルス、腫瘍溶解性インフルエンザウイルス、腫瘍溶解性レオウイルス、腫瘍溶解性ニューカッスル病ウイルス（NDV）、腫瘍溶解性麻疹ウイルス

50

、腫瘍溶解性水疱性口内炎ウイルス（VSV）、腫瘍溶解性ポリオウイルス、腫瘍溶解性ポックスウイルス、腫瘍溶解性セネカバレーウイルス、腫瘍溶解性コクサッキーウイルス、腫瘍溶解性エンテロウイルス、腫瘍溶解性粘液腫ウイルス、または腫瘍溶解性マラバウイルスのいずれかから選択され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞を特異的に標的化する。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞において選択的に複製する。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、検出可能なマーカーを発現する。

【0029】

いくつかの実施形態では、上記方法のいずれかにおいて記載されるMINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体からなる。

10

【0030】

いくつかの実施形態では、上記方法のいずれかにおいて記載されるMyomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体からなる。

20

【0031】

いくつかの態様において、本明細書では、対象において癌を治療する方法であって、MINIONポリペプチドをコードする核酸およびMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む有効量の癌ワクチンを対象に投与する工程を含む方法が提供される。さらに本明細書では、対象において癌を治療する方法であって、MINIONポリペプチドをコードする核酸および同型相互作用を媒介する受容体をコードする核酸を含む有効量の癌ワクチンを対象に投与する工程を含む方法が提供される。

30

【0032】

いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体からなる。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体からなる。いくつかの実施形態では、同型相互作用を媒介する受容体は、カドヘリン、セレクチン、クローデ

40

50

イン、オクルーディン、接合部接着分子、またはトリセルリンから選択される。いくつかの実施形態では、同型相互作用を媒介する受容体は、N - カドヘリン、P - カドヘリン、E - カドヘリン、またはM - カドヘリンから選択されるカドヘリンである。

【0033】

いくつかの実施形態では、癌ワクチンは、樹状細胞および腫瘍細胞に由来する樹状 - 腫瘍融合細胞を含む。いくつかの実施形態では、癌ワクチンは、CD4⁺またはCD8⁺T細胞の活性化をシミュレートする。いくつかの実施形態では、癌ワクチンは、1種以上の腫瘍関連抗原を提示する。いくつかの実施形態では、癌ワクチンは、主要組織適合抗原複合体(MHC)クラスIまたはII経路を介して1種以上の腫瘍関連抗原を提示する。いくつかの実施形態では、癌ワクチンは、検出可能なマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、自己の樹状細胞である。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、同種の樹状細胞である。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、自己の腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、同種の腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、活性化樹状細胞である。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、免疫原性腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、癌幹細胞である。

10

【0034】

いくつかの実施形態では、癌ワクチンは、腫瘍内、経皮的、経粘膜的、経口的、鼻腔内、皮下、動脈内、静脈内、筋肉内、髄腔内、もしくは腹腔内、または経肺投与を介して対象に投与される。いくつかの実施形態では、癌は、頭頸部癌、皮膚癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、脳癌、神経芽細胞腫、神経膠腫、肉腫、リンパ腫、または白血病から選択される。いくつかの実施形態では、癌は、血管肉腫、皮膚線維肉腫、類上皮肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、消化管間質腫瘍(GIST)、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫、未分化多形肉腫、または滑膜肉腫から選択される肉腫である。

20

【0035】

別の態様において、本明細書では、筋ジストロフィーの治療を必要とする対象において筋ジストロフィーを治療する方法であって、本明細書に記載の細胞を含む医薬組成物を投与する工程を含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に開示されるベクターを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に開示されるベクター、およびMyomakerポリペプチドまたはその変異体をコードする第2の核酸を含む第2のベクターを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、筋細胞、線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、または腫瘍細胞から選択される。いくつかの実施形態では、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)、ベッカー型筋ジストロフィー(BMD)、先天性筋ジストロフィー(CMD)、遠位型筋ジストロフィー、エメリ・ドレフュス型筋ジストロフィー(EDMD)、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FMD)、肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)、筋強直性筋ジストロフィー(MMD)、眼咽頭型筋ジストロフィー(Oculopharyngeal muscular dystrophy)(OMD)、三好ミオパチー(MM)、肢帯型筋ジストロフィー2B型(LGMD2B)、および遠位型ミオパチー(DM)からなる群から選択される。

30

40

【0036】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、添付図面および以下の明細書に記載されている。本発明の他の特徴、対象、および利点は、明細書および図面ならびに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1-1】図1:MINIONが、筋発生および筋再生中に高度に発現される骨格筋特異的微小タンパク質であることを示す。図1Aは、再生している成体マウスの前脛骨(TA)筋、および分化しているC2C12筋芽細胞(MB)における微小タンパク質発現のRNA-seqの重複を示すベン図である。CTX、心臓毒;FC:未損傷の筋肉(左下

50

）または未分化の筋芽細胞（右下）と比較した倍率変化。図1Bは、CTX損傷後に上方制御される選択された遺伝子に関する100万のマッピングされたリード当たりのキロベース当たりのリード（RPKM）の倍率変化を示す折れ線グラフである。値を未損傷の筋肉に対して正規化した。倍率変化の平均±SD、各時点につきn=3。図1Cは、対照の未損傷（Ctl）およびCTX損傷した再生している成体TA筋におけるMINION発現を検出するための代表的なウェスタンブロットを示す。GAPDH（グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素）は、ローディングコントロールの役割を果たした。図1Dは、胚性筋肉試料におけるMINION発現を検出するための代表的なウェスタンブロットを示す。成体TA筋におけるCTX処理から4日後を陽性対照として使用し、一方で、生理食塩水（NS）注射を陰性対照として使用した。E、胎生期；P：出生後。GAPDHは、ローディングコントロールの役割を果たした。図1Eは、指定の日数に関して、分化条件（DM）下でのC2C12筋芽細胞におけるMINION、ミオゲニン、またはミオシン重鎖（MHC）の発現を検出するための代表的なウェスタンブロットを示す。MHC、ミオシン重鎖。チューブリンは、ローディングコントロールの役割を果たした。図1Fは、マウスMINIONタンパク質（ハツカネズミ（*M. musculus*）、配列番号5）と、他の哺乳動物種の推定上のオルソログ、例えば、ラットMINION（ドブネズミ（*R. norvegicus*）、配列番号9）、ヒトMINION（ヒト（*H. sapiens*）、配列番号1）、サルMINION（アカゲザル（*M. mulatta*）、配列番号15）、ネコMINION（ネコ（*F. catus*）、配列番号11）、およびブタMINION（イノシシ（*S. scrofa*）、配列番号13）のアミノ酸配列アライ

10

20

【図1-2】上記のとおり。

【図1-3】上記のとおり。

【図1-4】上記のとおり。

【図1-5】上記のとおり。

【図1-6】上記のとおり。

【図2-1】図2：MINIONが、心筋ではなく再生している成体骨格筋において特異的に発現されることを示す。図2Aは、未損傷（左）または再生している（右、CTX注射後3~4日）TA筋から調製した横断切片におけるMINIONの免疫蛍光染色を示す。DAPIを使用して核を対比染色した。スケールバー：20μm。図2Bは、様々な成体骨格筋群および心筋におけるMINION発現を検出するための、指定の抗体を用いた代表的なウェスタンブロットを示す。6~8週齢のC57BL/6Jマウスを使用した。Ctl：未損傷のTA筋；CTX：CTX注射後4日目の再生しているTA筋；TA：前脛骨筋；Gastr：腓腹筋；Quad：大腿四頭筋；Diaphr：横隔膜。図2Cは、様々な成体組織におけるMINION発現を検出するための、指定の抗体を用いた代表的なウェスタンブロットを示す。6~8週齢のC57BL/6Jマウスを使用した。図2Dは、RNA-seqによって検出された胚発生中のマウスMinionの発現を示す（EMBL-EBI Expression Atlas；<http://www.ebi.ac.uk/gxa>）（Mohun et al. Deciphering the Mechanisms of Developmental Disorders (DMDD)：a new programme for phenotyping embryonic lethal mice. Disease models & mechanisms 6, 562-566, 2013；Petryszak et al. Expression Atlas update - a database of gene and transcript expression from microarray and sequencing-based functional genomics experiments. Nucleic acids research 42, D926-932, 2014）。数値はRNA発現レベル（FPKM）を示す。図2Eは、E14.5におけるインサイチュウハイブリダイゼーションによって検出された非体節筋におけるマウスmyod1（左）およびMinion（右）の発現を示す（Eu

30

40

50

repress; <http://www.eurepress.org/ee/intro.html>) (Diez-Roux et al. A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS biology* 9, e1000582, 2011)。矢印は外眼筋および顔面筋において重複している発現を示す。

【図2-2】上記のとおり。

【図2-3】上記のとおり。

【図2-4】上記のとおり。

【図2-5】上記のとおり。

【図3-1】図3：MINIONが発生している筋細胞において高度に発現し、膜結合性であることを示す。図3Aは、増殖(GM)条件または分化(DM)条件下のC2C12筋芽細胞におけるMINIONのmRNAレベルのRT-qPCRによる定量化を示す棒グラフである。マウス胚性幹細胞(ESC)は、陽性対照の役割を果たした。図3Bは、分化しているC2C12筋芽細胞(DMにける1、3、5日目)および胚性幹細胞(ESC)におけるMINION発現を検出するための、指定の抗体を用いた代表的なウェスタンブロットを示す。チューブリンは、ローディングコントロールの役割を果たした。図3Cは、増殖(GM)条件または分化条件(DM; 3日目)下のC2C12筋芽細胞におけるMINION発現を検出するための、示された抗体を用いた代表的なウェスタンブロットを示す。Pax7は未分化細胞において豊富な転写因子であり、一方、デスミンは分化した筋細胞において豊富な中間径フィラメントタンパク質である。チューブリンは、ローディングコントロールの役割を果たした。図3Dは、対照ベクターまたはC末端3xFLAG-1xHATag Minionを発現する3日目の分化しているC2C12筋芽細胞由来の濃縮された細胞培養上清(Sup)の代表的なウェスタンブロット分析を示す。タグされたMinion(*)および内在性Minion(**)の両方が、全細胞抽出物(WCE)において検出される。TGF および切断されたN-カドヘリン(++)は陽性対照であり、他方で、GapdhおよびインタクトなN-カドヘリン(+)は非分泌陰性対照である。n=3。図3Eは、MINIONの細胞内位置を検出するための代表的なウェスタンブロットを示す。ウェスタンブロット分析は、指定の抗体を用いて実施された。4種の画分が試験された：Cytosol、細胞質ゾル；Membr、膜；Nuc、核；Cytosk、細胞骨格。膜画分は、原形質膜およびER、ゴルジ体、ミトコンドリア、エンドソーム、リソソームなどの細胞内膜の両方を含有する。GAPDH：細胞質ゾル画分マーカー；N-カドヘリン：原形質膜マーカー；カルネキシン：ER膜マーカー；ヒストンH2B：核画分マーカー；ビメンチン：細胞骨格画分マーカー。

【図3-2】上記のとおり。

【図3-3】上記のとおり。

【図3-4】上記のとおり。

【図3-5】上記のとおり。

【図4-1】図4：MINIONプロモーター構造が、筋調節因子MyoDおよびミオゲニンによる調節と一致することを示す。図4Aは、マウスgm7325/MINION遺伝子(配列番号96)およびそのヒトオルソログRP1-302G2.5(配列番号97)周辺のゲノム領域の配列アラインメントを示す。MINIONのORFが黒で強調されている。プロモーターおよび5'UTR領域内の7つの保存されたEボックスモチーフ(CANNNTGおよびCANNNTT)が灰色で強調されている。図4Bは、MINIONゲノム遺伝子座周辺において増殖条件(GM)および3つの時点の分化条件(DM)下で試験されたC2C12筋芽細胞からのMyoDおよびミオゲニンChIP-seqのENCODEデータを示す。黒色の棒は、図4Aにおけるプロモーター領域内の最初の4つの保存されたEボックスモチーフを示す。

【図4-2】上記のとおり。

【図5-1】図5：MINION微小タンパク質が骨格筋発生に必要であることを示す。図5Aは、二重sgRNA法を用いたMINION遺伝子座のCRISPR/Cas9媒

10

20

30

40

50

介性の変異誘発のための戦略を示す図である。灰色のボックス、MINIONのORF；白色のボックス、非コードエクソン；sgRNA、一本鎖ガイドRNA；FwdおよびRev、フォワードおよびリバースジェノタイピングプライマー。図5Bは、MINIONの野生型(+/+)および図5Aに示される135bp欠失を保有するヘテロ接合体(+ / +)マウスの代表的なジェノタイピングPCR結果を示す。図5Cは、野生型(WT)アレル(配列番号98)および135bpの欠失を保有するノックアウト(KO)アレル(配列番号99)からの代表的な配列トレースを示す。黒色の線は、欠失区間の5'境界を示す。図5Dは、皮をはがれたMINION^{+/+}およびMINION^{-/-} P0マウスの写真のセットである。矢印およびアスタリスクは、それぞれ前肢および肋間筋系を示す。スケールバー：1mm。図5Eは、胚性舌骨格筋の組織学的分析および免疫蛍光分析を示す。上段：舌の矢状切片のヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)染色。挿入図は、示された切片の領域および向きを示す。下段：筋マーカーであるMHCに対する免疫蛍光染色およびDAPI(4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)による対比染色。スケールバー：100μm。図5Fは、筋マーカーであるデスミンを染色し、DAPIで対比染色した横隔膜筋の矢状切片の免疫蛍光画像のセットである。スケールバー：200μm。図5Gは、室内気に1時間暴露した後のE18.5マウス胚を用いる肺浮遊試験の定量化(棒グラフ、左)および代表的な画像(右)を示す。

【図5-2】上記のとおり。

【図5-3】上記のとおり。

【図5-4】上記のとおり。

【図5-5】上記のとおり。

【図5-6】上記のとおり。

【図5-7】上記のとおり。

【図6-1】図6：MINION欠損ノックアウトマウスの周産期致死性を示す。図6Aは、CRISPR/Cas9に媒介されるゲノム編集によるMINION欠損動物の生成のための戦略を示す図である。MINIONのORF(暗灰色)内の(明灰色で印を付けられた)135bpのインフレーム欠失を、二重sgRNA法を用いて誘導した。gRNAのゲノム上の標的配列を直線で示す。Fwd：フォワードPCRジェノタイピングプライマー；Rev：リバースPCRジェノタイピングプライマー。図6Aは、掲載の順にそれぞれ配列番号100~101を開示する。図6Bは、84AAの全長マウスMINION(配列番号102)および予測される39AAのトランケートされた形態(MINION^{-/-})(配列番号103)のタンパク質配列アラインメントを示す。トランケートされた形態は、本来の微小タンパク質のN末端の26アミノ酸およびC末端の12アミノ酸のみを含有すると予測される。図6Cは、MINION^{-/-} × MINION^{-/-}交雑(ヘテロ × ヘテロ)に由来するE18.5胚の典型的なジェノタイピングPCR結果の代表的なアガロースゲル画像を示す。+/+：野生型(MINION^{+/+})；+/-：ヘテロ接合体(MINION^{+/-})；-/-：MINIONノックアウトホモ接合体(MINION^{-/-})。図6Dは、MINION^{-/-} × MINION^{-/-}交雑に由来する後期胚および成体マウスの両方のジェノタイピングをまとめている表である。

【図6-2】上記のとおり。

【図6-3】上記のとおり。

【図6-4】上記のとおり。

【図7-1】図7：MINION欠損動物におけるMINIONタンパク質発現の消失を示す。図7Aは、指定の遺伝子型を有するE16.5/E17.5胚およびP0マウス由来の肢および舌におけるMINION発現を検出するための代表的なウェスタンブロットを示す。心臓毒注射(CTX 4dpi)後4日目の成体TA筋を陽性対照として使用した。同じリター由来の胚を各々についての比較のために使用した。全長MINIONは、MINION^{-/-}胚においては観察されず、予測される39AAのトランケートされたタンパク質も、同じ抗MINION抗体を用いて観察されなかった。図7Bは、同じリターのMINION^{+/+}およびMINION^{-/-} E18.5胚由来の前肢におけるMI

MINION発現を検出するための、指定の抗体を用いた代表的なウェスタンブロットを示す。

【図7-2】上記のとおり。

【図8-1】図8：MINION欠損動物における発生異常を示す。図8Aは、MINION^{+/+}およびMINION^{-/-}E16胚の写真である。矢印は、脊椎の癒着および頂部皮下の浮腫を示す。スケールバー：1mm。図8Bは、皮をはがれていない（上段）かまたは皮をはがれた（下段）MINION^{+/+}（左）およびMINION^{-/-}（右）E17.5の写真のセットである。矢印は、予想される前肢筋系の位置を示す。スケールバー：1mm。図8Cは、帝王切開による出産後の空気呼吸後における指定の遺伝子型のE18.5胚の写真のセットである。MINION^{-/-}胚はアトニー性であり、異常な脊柱弯曲を呈し、チアノーゼになり出産後すぐに死亡した。図8Dは、帝王切開による出産後のE18.5胚の体重の定量化を示す棒グラフである。二重アスタリスク：p < 0.001；ns = 有意ではない。

10

【図8-2】上記のとおり。

【図8-3】上記のとおり。

【図8-4】上記のとおり。

【図9-1】図9：MINION欠損が骨格筋形成の後期に影響を及ぼし、筋群のサイズの縮小をもたらすことを示す。図9Aは、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）により染色された、指定の遺伝子型を有するE14.5胚の前肢横断切片の組織学的画像のセットである。筋群の数、位置またはサイズに関して各遺伝子型間で著しい相違は観察されなかった。スケールバー：100μm。図9Bは、H&Eにより染色された指定の遺伝子型のE16.5前肢横断切片の組織学的画像のセットである。挿入図は、点線で印を付けた領域の拡大図を示す。メインパネルのスケールバー：100μm；挿入図のスケールバー：10μm。図9Cは、H&Eにより染色された、指定の遺伝子型を有するE19.5胚由来の前肢横断切片の組織学的画像のセットである。挿入図は、点線で印を付けた領域の拡大図を示す。メインパネルのスケールバー：100μm；挿入図のスケールバー：10μm。図9Dは、指定の遺伝子型を有するE19.5胚由来の前肢横断切片のデスミン免疫蛍光画像のセットである。挿入図は、点線で印を付けた領域の拡大図を示す。デスミンは、胚における分化中の全ての筋芽細胞ならびに筋管および筋線維を標識する。核はDAPIにより標識された。メインパネルのスケールバー：100μm；挿入図のスケールバー：10μm。

20

30

【図9-2】上記のとおり。

【図9-3】上記のとおり。

【図9-4】上記のとおり。

【図10-1】図10：MINION欠損が、肢および肋間の骨格筋形成の欠陥を引き起こすことを示す。図10Aは、H&Eにより染色された指定の遺伝子型のE19.5前肢縦断切片の組織学的画像のセットである。スケールバー：100μm。図10Bは、指定の遺伝子型を有するE19.5胚についての前肢縦断切片におけるMHC発現を示す免疫蛍光画像のセットである。核はDAPIにより染色された。スケールバー：100μm。図10Cは、指定の遺伝子型を有するE19.5胚由来の肋間筋の矢状切片におけるデスミン発現を示す免疫蛍光画像のセットである。核はDAPIにより対比染色された。スケールバー：100μm。

40

【図10-2】上記のとおり。

【図10-3】上記のとおり。

【図11-1】図11は、MINIONの消失は、インビボにおいて骨格筋前駆細胞の分化に影響を及ぼさないが、多核線維の形成を阻止することを示す。図11Aは、指定の遺伝子型のE16.5舌横断切片の舌切片のデスミン免疫蛍光画像のセットである。左の組織学的画像の黒色のボックスは、右の蛍光画像で示される領域を示す。核はDAPIにより対比染色された。スケールバー：200μm。図11Bは、指定の遺伝子型のE19.5舌横断切片のデスミン免疫蛍光画像のセットである。左の組織学的画像の黒色のボック

50

スは、右の蛍光画像で示される領域を示す。核はD A P Iにより対比染色された。スケールバー：200 μ m。図11Cは、図11Bに示される白色のボックスの領域の拡大図である。E19.5 MINION^{-/-}の舌は、長い筋管の大幅な縮小を呈した。スケールバー：200 μ m。

【図11-2】上記のとおり。

【図11-3】上記のとおり。

【図12-1】図12：MINIONが筋前駆細胞の融合に関して特に必要であることを示す。図12Aは、分化培地中で3日後のE18.5 MINION^{+/+}、MINION^{-/-}およびMINION^{-/-}胚から単離された初代胚性筋芽細胞のデスミン免疫蛍光画像のセットである。白色の矢じり：筋管；白色の矢印：伸長している筋芽細胞。図12Bは、デスミン⁺細胞における全ての核のうちデスミン⁺筋管（3個以上の核）における核の%として算出された、図12Aにおける筋芽細胞の融合指数を示す棒グラフである。アスタリスク：P < 0.05。図12Cは、対照のルシフェラーゼを標的化するshRNA（Ctrl）とともにレンチウイルスで感染したか、またはMINIONの3'UTRを標的化する2つのshRNAを連続的にレンチウイルスで感染し（MINION^{KD}）、かつ増殖培地（GM）または分化培地（DM）において指定の日数培養したC2C12筋芽細胞におけるMINION、ミオゲニンおよびMHCの発現を検出するための代表的なウェスタンプロットを示す。チューブリンを、ローディングコントロールとして使用した。図12Dは、分化培地で5日後の対照（Ctrl）およびMINION^{KD}筋線維のMHC免疫蛍光画像のセットである。核はD A P Iにより対比染色された。スケールバー：100 μ m。図12Eは、全ての核のうちのMHC⁺細胞の核の%として算出された、図12Dの分化指数を示す棒グラフである。NS = 有意ではない。図12Fは、IXMイメージングによって撮影された20倍の各画像内の全ての核の数と比較して、2個以上の核を有したMHC⁺筋管内に含有された核の割合として算出された、図12Dの融合指数を示す棒グラフである。二重アスタリスク：p < 0.001。図12Gは、図12Dに関する筋管毎の核の定量化を示す棒グラフである。筋管を、指定の総核数によってサブグループにビンニングした。図12Hは、分化培地において5日後、対照タンパク質（NanoLuc）またはヒトMinionオルソログのいずれかを発現するMINION^{KD}細胞のMHC免疫蛍光画像のセットである。核はD A P Iにより対比染色された。スケールバー：100 μ m。

10

20

30

【図12-2】上記のとおり。

【図12-3】上記のとおり。

【図12-4】上記のとおり。

【図12-5】上記のとおり。

【図12-6】上記のとおり。

【図12-7】上記のとおり。

【図12-8】上記のとおり。

【図13】MINIONの遺伝的消失がインビトロでの胚性筋芽細胞の融合を阻止することを示す、分化培地において3日後の指定の遺伝子型のE17.5初代胚性筋芽細胞のMHC免疫蛍光画像のセットである。核はD A P Iにより対比染色された。スケールバー：100 μ m。

40

【図14-1】図14：マウスMINIONを標的化するレンチウイルスのshRNAコンストラクトの作製および検証を示す。図14Aは、下線の4つのshRNAコンストラクトの標的領域を有するマウスMINIONのゲノム遺伝子座を示す概略図である。黒塗りの棒はMINIONのORFを示し、白色の棒は非翻訳領域（UTR）を示した。C1およびC2：コード配列を標的化するshRNAコンストラクト；U1およびU2：3'UTRを標的化するshRNAコンストラクト。図14Bは、指定のレンチウイルスのshRNAコンストラクトで形質導入されたC2C12筋芽細胞におけるMINION発現を検出するための代表的なウェスタンプロットを示す。ホタル（Photinus pyralis）ルシフェラーゼ遺伝子を標的化するshRNAコンストラクトを、陽性対照

50

(Ctrl)として使用した。レンチウイルスの感染およびGFPの局在化後、細胞を増殖させ、分化培地に5日間保持した。MINIONの3'UTRを標的化する2つのshRNAコンストラクト(U1/U2)は、最も効率的にMINION発現を減少させることが見出された。図14Cは、指定の日数増殖培地(GM)または分化培地(DM)のいずれかで培養された対照(Ctrl)またはMINION^{K^D}C2C12細胞におけるMyoD1およびデスミン発現を検出するための、指定の抗体を用いる代表的なウェスタンブロットを示す。

【図14-2】上記のとおり。

【図14-3】上記のとおり。

【図15-1】図15：初代筋芽細胞におけるMINIONのノックダウンが、筋芽細胞の融合および多核筋管の形成を阻止することを示す。図15Aは、分化培地で4日後に形成される、対照(Ctrl)およびMINION^{K^D}初代筋芽細胞由来の筋線維のMHC免疫蛍光画像のセットである。核はDAPIにより対比染色された。スケールバー：100μm。図15Bは、各領域における全ての核のうちのMHC⁺細胞内の核の割合として算出される、図15Aに関する分化指数の定量化を示す棒グラフである。ns = 有意ではない。図15Cは、各領域における全ての核のうちの2個以上の核を含有するMHC⁺筋管内の核の割合として算出される、図15Aに関する融合指数の定量化を示す棒グラフである。二重アスタリスク：p < 0.001。図15Dは、図15Aにおいてなされた実験に関する筋管の数の割合の定量化を示す棒グラフである。筋管を、示されるとおりの核の数によってビンゲし、各サブグループ内の筋管の割合を算出した。

10

20

【図15-2】上記のとおり。

【図15-3】上記のとおり。

【図15-4】上記のとおり。

【図16-1】図16：マウスMINIONまたはそのヒトオルソログの外因性の発現によって、MINION^{K^D}筋芽細胞の融合欠損がレスキューされることを示す。図16Aおよび16Bは、タグがないまたはC末端タグされたMINIONのレトロウイルスによる発現および分化培地での5日間の培養後のMINION^{K^D}細胞においてMINIONの発現を検出するための代表的なウェスタンブロットである。全長マウスMINIONのCDS(コード配列)、C末端3×FLAG-1×HAタグされたマウスMINIONのCDSおよびC末端3×FLAG-1×HAタグされたヒトMINIONオルソログのCDSを保有するレトロウイルスベクターを再構成のために使用した。C末端1×FLAGタグされたNanolucレトロウイルスベクターを陰性対照として使用した。抗FLAG抗体は、3つのタグされたタンパク質を正しいサイズで認識するが(図16A)、抗MINION抗体は、マウスMINIONタンパク質(タグありおよびタグなし)を認識するだけでなく、ヒトMINIONオルソログもまたわずかに認識する(図16B)。注記：タグされたヒトおよびマウスMINIONのCDSを保有するpCI-GARゲートウェイレトロウイルスベクターは、本来の開始コドンの5'末端にインフレームで追加の開始コドンを遺伝的に持っており、これによりわずかに大きなサイズの追加のバンド(アスタリスク)が生じる。図16Cは、分化培地で5日後のタグされたNanoluc、タグのないマウスMINION、タグされたマウスMINIONおよびタグされたヒトMINIONオルソログの外因性の発現を有するMINION^{K^D}C2C12細胞のMHC免疫蛍光画像のセットである。核はDAPIにより対比染色された。スケールバー：100μm。

30

40

【図16-2】上記のとおり。

【図16-3】上記のとおり。

【図17-1】図17：マウスおよびヒトMINION転写物はlncRNA(長鎖非コードRNA)として機能しないことを示す。図17Aは、インタクトなマウス/ヒトMINIONのCDS、または開始コドン内で1bpのフレームシフト(FS)変異を有するそれらのいずれかを含有する4つのレトロウイルスベクターを示す概略図である。これらの一塩基対変異は、RNA配列を大幅に変えることなく全長マウス/ヒトMINIONタ

50

ンパク質の発現を阻害すると予測される。図17Bは、図17Aに示されるコンストラクトの外因性の発現を有し、かつ分化培地で5日後のMINION^{K^DC2C12}細胞のMHC免疫蛍光画像のセットである。核はDAPIにより対比染色された。スケールバー：100μm。

【図17-2】上記のとおり。

【図18】空ベクター（陰性対照）、NanoLuc（陰性対照）、全長マウスMINION、またはトランケートされた39AAのMINION変異体（135bpのインフレーム欠失を含有するMINIONノックアウトアレルから予測される）のいずれかをコードするレトロウイルスのコンストラクトで形質導入されたMINION^{K^DC2C12}細胞のMHC免疫蛍光画像のセットであり、これは、MINIONノックアウトアレルから予測されるMINIONのトランケーション変異体が、MINION^{K^DC2C12}細胞で観察される融合欠損をレスキューしないことを示す。細胞は分化培地で5日間培養された。核はDAPIにより対比染色された。スケールバー：100μm。

10

【図19-1】図19：非筋原性の細胞-細胞融合の2つのモデルにおいてMINIONが検出不能であることを示す。図19Aは、MINIONが、MINION⁺およびMINION⁻胚由来の胎盤ならびに胎盤周囲組織において検出不能であることを示す代表的なウェスタンブロットである。生理食塩水注射（NS；4日目）および心臓毒注射（CTX；4日目）を伴うTA筋を、それぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。図19Bは、マクロファージ系統Raw264.7における可溶性RANKLリガンド誘導性の細胞-細胞融合および破骨細胞形成においてMINIONが検出不能であることを示す代表的なウェスタンブロットである。増殖培地（GM）または5日間の分化培地（DM）のいずれかで培養されたC2C12細胞を、それぞれ陽性対照および陰性対照として使用した。

20

【図19-2】上記のとおり。

【図20】抗ヒトMyomaker抗体が内在性マウスMyomakerを認識することを示す代表的なウェスタンブロットである。増殖条件（GM）、または3日間の分化条件（DM）のいずれかのもとで培養されたC2C12筋芽細胞におけるMyomakerの発現；および未損傷または心臓毒で損傷されて再生している様々な時点（2日目、4日目、10日目）でのTA筋（CTX）のMyomakerの発現を調べた。

【図21-1】図21：MINIONとMyomakerの共発現が異種系において細胞融合を誘導するのに十分であることを示す。図21Aは、GM中の野生型C2C12筋芽細胞、または分化条件（DM）下で3日間培養された対照（Ctrl）もしくはMINION^{K^DC2C12}筋芽細胞におけるMyomakerの発現を検出するための代表的なウェスタンブロットを示す。図21Bは、分化培地で5日後の、ルシフェラーゼ（Ctrl）、MINION、またはMyomakerを発現する対照（Ctrl）およびMINION^{K^DC2C12}筋芽細胞のMHC免疫蛍光画像のセットである。核はDAPIにより対比染色された。スケールバー：100μm。図21Cは、図21Bに示される細胞株におけるMyomakerおよびMINIONの発現を検出するための代表的なウェスタンブロットを示す。図21Dは、ルシフェラーゼ（Ctrl）、MyomakerまたはMINIONを発現する10T1/2線維芽細胞におけるMyomakerおよびMINIONの発現を検出するための代表的なウェスタンブロットを示す。図21Eは、示されるとおりの様々な組合わせのタンパク質を発現する線維芽細胞におけるGFP⁺融合細胞（4個以上の核を含有するものとして定義される）の定量化を示す棒グラフである。融合細胞の形成は、播種後24時間でスコア化された。図21Fは、特異的に標識された10T1/2線維芽細胞を用いる細胞混合実験からの蛍光画像のセットである。細胞に、MINION、Myomaker、または対照の指定の組合わせ（簡単にするために、標識は省略される）をコードするレトロウイルスを連続的に感染させた。標識のためにCellTrace VioletおよびCellTracker Deep Red色素を使用した。矢じりは、Deep Red⁺細胞およびViolet⁺核の両方を含有する融合細胞を示す。矢印は、Deep Red⁺細胞のみに由来する融合細胞を示す。スケール

30

40

50

バー：50 μm。図21Gは、1個以上のViolet⁺核を含有するDeep Red⁺融合細胞（4個以上の核）の%として測定される、図21F（下段のパネル）における融合の定量化を示す棒グラフである。

【図21-2】上記のとおり。

【図21-3】上記のとおり。

【図21-4】上記のとおり。

【図21-5】上記のとおり。

【図21-6】上記のとおり。

【図21-7】上記のとおり。

【図22】示されるとおりのルシフェラーゼ、Myomaker、またはMINIONをコードするレトロウイルスベクターに感染した10T1/2線維芽細胞の免疫蛍光画像のセットであり、これは、MINIONおよびMyomakerを合わせると10T1/2線維芽細胞における多核融合細胞の形成を誘導するのに十分であることを示す。全てのレトロウイルスベクターは、目的の遺伝子の下流にIRES-GFPを含有し、これにより感染細胞がGFPを均一に発現する。GFPおよびDNAに関するスプリットチャンネルによるグレースケール画像が含まれる。データの定量化は図21Eに示された。融合指数は、4個以上の核を含有するGFP陽性融合細胞内で見出される核の割合として算出された。スケールバー：100 μm。

【図23-1】図23：図21Fにおいて示される細胞混合実験のスプリットチャンネルによる蛍光画像のセットであり、これは、MINIONおよびMyomakerが線維芽細胞において細胞-細胞融合を誘導するのに十分であり、MINIONは融合対の片側にのみ必要であることを示す。蛍光画像は、指定の組み合わせのタンパク質を発現し、かつCellTrace VioletおよびCellTracker Deep Red色素の両方で標識した線維芽細胞を使用する細胞混合実験から示される。10T1/2線維芽細胞に、MINION、myomakerまたは対照ベクターのいずれか（簡単にするために、標識については省略される）をコードするレトロウイルスを連続的に感染させた。全てのベクターは、目的の遺伝子の下流にIRES-GFPを含有し、これにより感染細胞がGFPを発現する。関連した細胞の色および発現されるタンパク質が上の各画像で示される。矢じりは、Myomakerのみ発現するか、またはMINIONおよびMyomakerを合わせて発現する第2の細胞型由来のViolet⁺核も含有するMINIONおよびMyomakerを共発現するDeep Red⁺細胞に由来する融合細胞を示す。矢印は、MINIONのみ発現する第2の細胞型由来のViolet⁺核を含有しないMINIONおよびMyomakerを共発現するDeep Red⁺細胞に由来する融合細胞を示す。スケールバー：50 μm。

【図23-2】上記のとおり。

【図23-3】上記のとおり。

【図23-4】上記のとおり。

【図23-5】上記のとおり。

【図24-1】図24：図24A-24Bは、CtrlおよびMinion^{KD}筋芽細胞の同定およびソーティングのためのゲーティング戦略を示す。

【図24-2】上記のとおり。

【図25-1】図25：CRISPR/Cas9遺伝子編集による第2のMinionノックアウトアレルの作製を示す。図25Aは、2つの異なるsgRNA（gRNA3（配列番号104）およびgRNA4（配列番号105））を用いる二重sgRNA法を用いるgm7325/Minion遺伝子座のCRISPR/Cas9変異誘発のための戦略を示す。灰色のボックス、MINIONのORF；白色のボックス、非コードエクソン；gRNA、一本鎖ガイドRNA；明灰色のボックス、155bp欠失後の新たなコード領域；Fwd-2（配列番号106）およびRev-2（配列番号107）、155bp欠失を検出するためのフォワードおよびリバースジェノタイピングプライマー。図25Bは、Minion^{+/+} × Minion^{+/+}交雑由来のE16.5~E18.5胚を用い

10

20

30

40

50

た典型的なジェノタイピングPCR結果の代表的なアガロースゲル写真である。+/+ : 野生型 (Minion^{+/+}) ; +/- : ヘテロ接合体 (Minion^{+/-}) ; -/- : Minionノックアウトホモ接合体 (Minion^{-/-})。n = 5 (合計で26個のE16.5~E18.5胚)。図25Cは、皮をはがれていないMinion^{+/-}およびMinion^{-/-}E18.5胚の代表的な写真を示す。n = 3。スケールバー: 1 mm。図25Dは、84aaの全長マウスMinion (Minion-FL) (配列番号102) および予測される74アミノ酸のトランケートされた形態 (Minion-155KO) (配列番号108) のタンパク質配列アラインメントを示す。トランケートされた形態は、本来のタンパク質のN末端の18アミノ酸 (太字) のみを含有すると予測される。図25Eは、Minion^{+/-} x Minion^{+/-}交雑由来の後期胚 (E16.5~E18.5) および成体マウスの両方のジェノタイピング結果の要約を示す。

10

【図25-2】上記のとおり。

【図25-3】上記のとおり。

【図25-4】上記のとおり。

【図25-5】上記のとおり。

【図26-1】図26: Minionの欠損が非体節の骨格筋形成を阻止することを示す。図26Aは、指定の遺伝子型を有するE18.5胚の矢状切片由来の非体節の顔面筋系の代表的な免疫蛍光画像を示す。デスミン染色が示される。左の組織学的画像の黒色のボックスは、右の蛍光画像で示される領域を示す。図26Bは、指定の遺伝子型を有するE19.5胚由来の横断切片の非体節の顎および顔面筋系の代表的な免疫蛍光画像を示す。MHCおよびDAPI染色が示される。2つのリターの胚が試験され、各遺伝子型の同じリターの中の1~2胚が実験の繰り返し毎に比較された。スケールバー、H&E画像については1 mm、および免疫蛍光画像については500 μm。

20

【図26-2】上記のとおり。

【図27-1】図27: Minionが、分化している筋芽細胞および発生期の筋管において発現されることを示す。図27Aは、DM中で3.5日後のCtrlならびにMinion^{KD}C2C12筋芽細胞および筋管の代表的な免疫蛍光画像を示す。左: Minion、MHCおよびDAPIが示される; 中央: Minionのみのグレースケール画像; 右: 対照IgGについてのグレースケール画像。白色の点線によって印を付けた挿入図は、図27Bにおいて拡大される。n = 2。図27Bは、図27Aの挿入図の拡大画像を示す。白色の矢じりは、融合した多核筋管を示し、黄色の矢印は、融合していない分化し、伸長している筋芽細胞を示し、これらの両方がMinionタンパク質を発現する。図27Cは、CTX注射後3日の再生している成体 (10週齢) TA筋の縦断切片の代表的な免疫蛍光染色を示す。左: Minion、ラミニンおよびDAPI; 中央: Minionのみ (グレースケール); 右: DAPI (グレースケール)。白色の矢じりは、発生期の筋管を示し、黄色の矢印は、融合していない分化し、伸長している筋芽細胞を示し、これらの両方がMinionタンパク質を発現する。n = 3。スケールバー: (図27A~27B) 100 μmおよび (図27C) 30 μm。

30

【図27-2】上記のとおり。

【図27-3】上記のとおり。

40

【図28-1】図28: MinionがMyomaker媒介性の融合に必要であることを示す。図28Aは、分化培地で3日後の10T1/2線維芽細胞と野生型C2C12筋芽細胞 (1:2比) の間での細胞混合の代表的な免疫蛍光画像を示す。分化している筋芽細胞および筋管がMHCによって標識される。10T1/2線維芽細胞に、GFPおよび目的のタンパク質 (左、NanoLuc対照; 中央、マウスMyomaker; 右、マウスMinion) を発現するレトロウイルスを感染させた。DAPIは核を標識する。Myomakerを発現する線維芽細胞は、野生型の分化している筋芽細胞および筋管と融合して、大型で厚い筋管 (白色の矢じり) になったが、Minionを発現する線維芽細胞はそのようにならなかった。白色の矢印は線維芽細胞に融合しないMHC陽性の筋管を示す。n = 2 (それぞれ8回の技術的反復)。0.7 mm x 0.7 mmの領域が示される

50

。図28Bは、DMで3日後のMyomakerを発現する10T1/2線維芽細胞とC2C12筋芽細胞の間での細胞混合の代表的な免疫蛍光画像を示す。0.7mm×0.7mmの領域が20倍の倍率で示される。対照およびMinion^{KD}筋芽細胞が使用された。分化している筋芽細胞および筋管がMHCによって標識される。Myomakerを発現する10T1/2線維芽細胞が、混合前にCellTrace Violet色素で標識された。Myomakerを発現する線維芽細胞は分化している対照の筋芽細胞（白色の矢じり）と融合したが、Minion^{KD}筋芽細胞には融合しなかった。n=2（それぞれ8回の技術的反復）。

【図28-2】上記のとおり。

【図29-1】図29：Minionと相互作用するタンパク質の同定に関する結果を示す。図29Aは、Minionと結合するタンパク質は、FLAGタグされたMinionを発現する3.5日目の分化しているC2C12筋芽細胞（表5を参照のこと）からアフィニティー精製-MS分析により同定され、Panther (Mietal. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. Nucleic acids research 45, D183-D189, 2017)を用いてタンパク質クラスに分けられた。各クラスにおいて有意に濃縮されたタンパク質の数が示される。n=3。図29Bは、ヒットした実例の代表的なウェスタンブロットによる確認を示す。MinionおよびGapdhは、それぞれ陽性対照および陰性対照としての役割を果たした。

【図29-2】上記のとおり。

【図30-1】図30：MinionおよびMyomaker誘導性の融合には、細胞骨格の再構築が必要であることを示す。図30Aは、MinionおよびMyomakerを共過剰発現する10T1/2線維芽細胞の代表的な蛍光画像を示す。F-アクチン（Alexa546-ファロイジン）およびDAPI染色が示される。白色の矢じりは、多核細胞の境界を指す。n=2（それぞれ6回の技術的反復、それぞれ5つの領域）。図30Bは、MinionおよびMyomakerを共過剰発現し、DMSO対照、アクチン重合阻害剤ラトランクリンB（0.1μM）またはサイトカラシンD（0.3μM）（Bothe & Baylies Drosophila myogenesis. Curr. Biol. 26, R786-R791, 2016）で24時間処理した10T1/2線維芽細胞の代表的な蛍光画像を示す。n=2（それぞれ6回の技術的反復、それぞれ5つの領域）。スケールバー、100μm（図30A~30B）。図30Cは、MinionおよびMyomaker誘導性の細胞-細胞融合について提案されるモデルを示す。本発明者らは、MinionおよびMyomakerが融合プロセスにおいて分離可能な役割を有することを提案する；Myomakerは、細胞-細胞認識および/または膜の付着などの融合前のポアに関するイベントを媒介する一方で、Minionは、少なくとも部分的に細胞骨格の再編成の誘導を介して後期の融合ポア形成を媒介する。

【図30-2】上記のとおり。

【図30-3】上記のとおり。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明は、微小タンパク質MINIONが、筋前駆細胞の融合および骨格筋の発生に必要であり、かつMINIONおよびMyomakerの異種共発現が、非筋細胞においてさえ迅速かつ均質な細胞融合を誘導するのに十分であるという知見に少なくとも部分的に基づく。マウスMINIONのヒトオルソログは、以前に報告されていない。本明細書に記載のように、本発明者らは、MINIONのヒトオルソログのアミノ酸およびcDNA配列を同定し、ヒトMINIONタンパク質もまた、融合誘導性活性を有することを見出したが、このことは、細胞融合におけるMINIONタンパク質の進化的に保存された役割を示唆している。したがって、本明細書では、融合誘導性タンパク質MINIONに関

10

20

30

40

50

連する組成物、方法、および治療上の使用が提供される。

【0039】

定義

用語「ヒトMINIONタンパク質」および「ヒトMINION微小タンパク質」は本明細書において互換的に使用され（微小タンパク質融合誘導因子、Gm7325、ESGP、胚性幹細胞および生殖細胞特異的タンパク質、またはEG653016としても知られる）、配列番号1（アイソフォーム1）または配列番号3（アイソフォーム2）のアミノ酸配列を有するタンパク質を指す。「ヒトMINIONポリペプチド」は、天然に存在するヒトMINION微小タンパク質（例えば、配列番号1もしくは配列番号3のタンパク質）またはその変異体を指す。ヒトMINIONアイソフォーム1またはアイソフォーム2のタンパク質およびcDNA配列が、下の表1において提供される。

【0040】

【表 1 - 1】

表 1 MINION のアミノ酸およびヌクレオチド配列

種	アイソフォーム	配列番号	配列
ヒト (Homo sapiens)	MINION アイソフォーム 1 アミノ酸	1	MPTPLLPLLLRLLLSRLLLPAAARLARQYLLPL LRRLARRLGSQDMREALLGCLLFILSQRHSP DAGEASRVDRLEERRERLGPQK
ヒト (Homo sapiens)	MINION アイソフォーム 1 cDNA	2	gagactgattctgagcagcagttctgccggcactgactactggccc tgcATGCCACGCCACTGCTCCCGCTGCTG CTTCGATTGCTGCTGTCCCGCCTGCTGCTG CCTGCTGCCCGCCTGGCCCGCCAATACCTC CTGCCCTGCTGCGCCGATTGGCCCGCCGC CTGGGCTCCCAGGACATGCGAGAGGCTTT GCTGGGCTGTCTGCTGTTCAATTCTCAGCCA GCGACTCGCCAGACGCTGGGGAGGCCT CAAGAGTGGACCGCCTGGAGAGGAGGGA GAGGTTAGGCCCCCAAAAGTGAaggcacaagtc ctggcagcagctgatccacaaaatgctttctttggagtaggataaG Actggcaccagcactgaccgaagcctgccagtgacagaagatag agtggggttgcatgagaggatctgccacagacatgcctctcca ctcccaacagaaatgctttctggaagaatgcctgcatctagcacaaa actgattattgccctctgtctccagcagttctccaaagaccactcc taatcacctctggcctcaggcgggagggaactaacaccaccac ccctgccctccctgcaaatgggaacatcaaggtccagtgcttaact gagggacaagtgacaatttagcagagaggcaagattgaatccagac tgcttcagactcaggacctacctaataataatctgagttgcCtatg gaggcagacctgcctgcaagcccagcactcagcaagtgctcaata aatatttgattgaattcttc (大文字は ORF)
ヒト (Homo sapiens)	MINION アイソフォーム 2 アミノ酸	3	MPTPLLPLLLRLLLSCLLLPAARLARQYLLPL LRRLARRLGSQDMREALLGCLLFILSQRHSP DAGEASRVDRLEERRERLGPQK
ヒト (Homo sapiens)	MINION アイソフォーム 2 cDNA	4	gagactgattctgagcagcagttctgccggcactgactactggccc tgcATGCCACGCCACTGCTCCCGCTGCTG CTTCGATTGCTGCTGTCTGCTGCTGCTG CCTGCTGCCCGCCTGGCCCGCCAATACCTC CTGCCCTGCTGCGCCGATTGGCCCGCCGC CTGGGCTCCCAGGACATGCGAGAGGCTTT GCTGGGCTGTCTGCTGTTCAATTCTCAGCCA GCGACTCGCCAGACGCTGGGGAGGCCT CAAGAGTGGACCGCCTGGAGAGGAGGGA GAGGTTAGGCCCCCAAAAGTGAaggcacaagtc ctggcagcagctgatccacaaaatgctttctttggagtaggataatcc tggcaccagcactgaccgaagcctgccagtgacagaagatag tgagggttgcatgagaggatctgccacagacatgcctctccactc ccaacagaaatgctttctggaagaatgcctgcatctagcacaaaact gattattgccctctgtctccagcagttctccaaagaccactcctaa tcacctctggcctcaggcgggagggaactaacaccaccaccacc tgcctccctgcaaatgggaacatcaaggtccagtgcttaactgag ggacaagtgacaatttagcagagaggcaagattgaatccagactgtc ttccagactcaggacctacctaataataatctgagttgcttatggagg cagacctgcctgcaagcccagcactcagcaagtgctcaataaatatt tgattgaattcttc (GenBank アクセション番号 NM_001315494.1; 大文字は ORF)

10

20

30

40

【表 1 - 2】

ハツカネズミ (Mus musculus)	MINION アイソフォーム 1 アミノ酸	5	MPVPLLPMVLRSLLSRLLLPVARLARQHLLP LLRRLARRLSSQDMREALLSCLLFVLSQQQP PDSGEASRVDHSQRKERLGPQK (GenBank アクセッション番号 NP_001170939.1)
ハツカネズミ (Mus musculus)	MINION アイソフォーム 1 cDNA	6	gaaattgattctgagcagttctgactggtagagagctgccactggccgg ttagaactggtagcagggaggcaagaagttcaggcttcaggtgca ggtcctgccATGCCCGTTCCATTGCTCCCCGATG GTGCTTCGATCGCTGCTGTCCCGCCTGCTG CTGCCTGTTGCCCGCCTGGCCCGGCAGCAC CTCCTGCCCTTGCTGCGCCGGCTGGCCCGC CGACTGAGCTCCCAAGACATGAG AGAGGCTCTGCTGAGCTGTCTGCTCTTTGT CCTCAGCCAGCAACAGCCACCGGATTCTG GAGAGGCCTCCAGAGTGGACCACTCCAG AGGAAGGAGAGATTGGGCCCCAGAAAGTG Aggccacgggtcctggaacagcaacgccatcaaagtactttgg agccggttagtcaggcgtcggcgcacgcacggcatggacgg cagactgccagtgaggcaagacagtcgggctgagtcaagagg gctctgacctgaacagttccactcccctagctctagcaggctacag attgtgtgattgaccttctctctgacgtccctctgcttatctctggc ctccagggtagacctgcaaatgcccgtatcaaggcagttaaagat gatgttcaactagactcaagacaatttagtaagaggtggtattaaat caactgtcccgtctaccttaaaattataagccctgcttcccgttaaag aatgagtacttcaagccttggtacgcagcaggtagtaataaacgag gacagtgtgtgtattgg (GenBank アクセッション番号 NM_001177468.1; 大文字は ORF)
ハツカネズミ (Mus musculus)	MINION アイソフォーム 2 アミノ酸	7	MPEESCTVKLIQLKTGEYRGAGPAMPVPLL MVLRSLLSRLLLPVARLARQHLLPLLRLRLAR RLSSQDMREALLSCLLFVLSQQQPPDSGEAS RVDHSQRKERLGPQK (GenBank アクセッション番号 NP_001170941.1)
ハツカネズミ (Mus musculus)	MINION アイソフォーム 2 cDNA	8	agtccccaccacttccagccctgggctccctcccactgtgataaca gtgagtgaactccttaaccagcttcATGCCAGAAGAAA GCTGCACTGTAATAACTAATCCAGTTGAAA ACTGGGGAGTACAGAGGTGCAGGTCCTGC CATGCCCGTTCCATTGCTCCCGATGGTGCT TCGATCGCTGCTGTCCCGCCTGCTGCTGCC TGTTGCCCGCCTGGCCCGGCAGCACCTCCT GCCCTTGCTGCGCCGGCTGGCCCGCCGACT GAGCTCCCAAGACATGAGAGAGGCTCTGC TGAGCTGTCTGCTCTTTGTCTCAGCCAGC AACAGCCACCGGATTCTGGAGAGGCTCC AGAGTGGACCACTCCCAGAGGAAGGAGA GATTGGGCCCCAGAAAGTGAaggccacgggtcctg gaaacagcaacgccatcaaagtactttggagccggttagtcagg cgtcgggtccgcacgcacggcatggacggcagactgccagtgagg cgaagacagtcgggctgagtcaagaggctctgacctgaacagt tccactcccctagctcctagcaggctacagattgtgtgattgacctt ctctctgacgtccctctgcttatctctgacctccaggggtggacctg caaatgcgggtatcaaggtcagttaaagatgatgttcaactagactc aagacaatttagctaagaggtggtattaaatccaaactgtcccgtctac cttaaaattataagccctgctcccgttaaagaatgagtacttcaaagc ttgtagcgcagcaggtagtaataaacgaggacagtggtgtgtattgg (GenBank アクセッション番号 NM_001177470.1; 大文字は ORF)

10

20

30

40

【表 1 - 3】

ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	MINION アミノ酸	9	MPVPLPLMLRSLLSRLLLPVARLARQHLLP LLRRLARRLSSQDVREALLSCLLFVLSQQQP PDSGETSRVDHSQRKERLGRK
ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	MINION cDNA	10	ggtcctggctcctgccATGCCCGTTCCACTGCTCCCG TTGATGCTTCGATCGCTGCTATCACGCCTG CTGCTGCCTGTTGCCCGCCTGGCCCGTCAG CACCTCCTGCCCTTGCTGCGCCGTCTGGCC CGCCGACTGAGCTCCCAAGACGTGAGAGA GGCTTTGCTGAGCTGTCTGCTGTTTGTCT CAGCCAACAACAGCCACCGGATTCTGGAG AGACCTCTAGAGTGGACCACTCCAGAGG AAGGAGAGATTGGGTCCCCGGAAGTGA (大文字は ORF)
ネコ (<i>Felis catus</i>)	MINION アミノ酸	11	MPAPLLPLLRLTMSRLLLPATRLARRHLLP LLRRLARRLGSQDVREALLGCLLFILSQRPP DAEEVSRVAGQERRERLAPPK
ネコ (<i>Felis catus</i>)	MINION cDNA	12	ATGCCCGCTCCACTGCTCCCACTGCTGCTT CGAACCTGATGTCCCGCTTGCTGCTGCCT GCCACCCGCTGGCCCGCCGGCACCTCCT GCCCCTCCTGCGCCGACTGGCCCGCCGCCT GGGCTCGCAGGATGTTTCGAGAAGCTTTGC TGGGCTGTCTGTTGTTTCATCCTCAGCCAGA GCCGCCCGCCGACGCTGAGGAGGTCTCC AGAGTGGCTGGCCAGGAGAGGGGAGA GGCTAGCTCCCCAAAATGA (大文字は ORF)
イノシシ (<i>Sus scrofa</i>)	MINION アミノ酸	13	MPAPLLPLLRLTLLARLLLPAARLARRHLLP LLRRLARRLGSQDMREALLGCLVFLSQRH PPDDAAAAGEASRVARLERRERIVSQK
イノシシ (<i>Sus scrofa</i>)	MINION cDNA	14	ATGCCCGCTCCGCTGCTCCCGCTGCTGCTG CGAACGCTGCTGGCCCGCCTGCTGCTGCC GCTGCCCGCCTGGCCCGTCGGCACCTCCTG CCTCTGCTGCGCCGGCTGGCCCGCCGCCTG GGCTCCCAGGATATGCGAGAGGCTTTACT GGGCTGTCTGGTGTTCCTCCTCAGCCAGAG ACACCCGCCAGATGATGCCGCTGCTGCCG GGGAGGCCTCCAGAGTGGCCCGCCTGGAG AGGAGGGAGAGGATAGTTTCTCAAAAA (大文字は ORF)
アカゲザル (<i>Macaca mulatta</i>)	MINION アミノ酸	15	MPAPLFPLLRLLLSRLLLPVARLARQYLLPL LRLARRLGSQDMREALLGCLLFILSQRHSP DAGEASRVDRLEERRERLGPQK

10

20

30

40

50

【0043】

「マウスMINIONポリペプチド」は、天然に存在するマウスMINIONタンパク質またはその変異体を指す。2種の天然に存在するマウスMINIONタンパク質のアイソフォーム（配列番号5および配列番号7）が報告されている。マウスMINIONアイソフォームのアミノ酸およびヌクレオチド配列が、表1において示される。表1はまた、他の種、例えば、ラット（ドブネズミ（*R. norvegicus*））、サル（アカゲザル（*M. mulatta*））、ネコ（ネコ（*F. catus*））、およびブタ（イノシシ（*S. scrofa*））のMINION配列を提供する。

【0044】

用語「MINIONポリペプチド」は、任意の種のMINIONタンパク質、またはその変異体の天然に存在する全てのアイソフォームを一括して指すために使用される。例え

ば、「MINIONポリペプチド」は、表1に列記される任意のMINIONポリペプチドまたはその変異体であり得る。

【0045】

Myomaker (Tmem8cまたはTmem226としても知られる)は、筋細胞において特異的に発現される膜貫通タンパク質である。「ヒトMyomakerポリペプチド」は、天然に存在するヒトMyomakerタンパク質(例えば、配列番号16のタンパク質)またはその変異体を指す。ヒトMyomakerのタンパク質およびmRNA配列が、表2において提供される。

【0046】

【表2 - 1】

10

表2 Myomakerのアミノ酸およびヌクレオチド配列

種	アイソフォーム	配列番号	配列
ヒト (Homo sapiens)	Myomaker アミノ酸	16	MGTLVAKLLLPTLSSLAFLLPTVSIAAKRRFHMEA MVYLFYTLFFVALHHACNGPGLSVLCFMRHDILEY FSVYGTALSMWVSLMALADFDEPKRSTFVMFGV LTIAVRIYHDRWGYGVYSGPIGTAILIIAAKWLQK MKEKKGLYPDKSVYTQQIGPGLCFGALALMLRFF FEDWDYTYVHSFYHCALAMSFVLLLPKVNKKAG SPGTPAKLDCSTLCCACV (GenBankアクセッション番号 NP_001073952.1)
ヒト (Homo sapiens)	Myomaker cDNA	17	gccttgcaca aaggagctg gccttccac ttcgtctcc tctctggg acctgggaca ccagcacct cccacccca gccagtctt tctctggc ccatggggac gctggtgcc aagctctcc tcccacct cagcagctg gcctctcc cactgtcag cctcggcc aagagcgg tccatgga ggccatggtc taccctca cctgttct cgtggcctc caccatgct gcaatggacc cggcttct gtctgtct tcatcgtca cgacatctg gagatattca gtgtctagg gacagcctg agcatgtgg tctctgat ggcactggc gactcgaag aaccaagag gcaacatt gtgatgtcg gcgtctgac cattgtgtg cggatctacc atgaccgat gggctacggg gtgtacteg gcccacgg cacagcctc ccatcctg cggcaagt gctacagaag atgaaggaga agaaggcct gtaccagac aagagcgtc acaccagca gataggccc gcctctgt tggggcgt ggcctgatg ctacgtct tcttgagga ctggactac acttatgct acagcttca cactgtgcc ctggtatgt ccttgtct gctctgcc aaggtcaaca agaaggtgg atccccggg acccggcca agetggactg ctccacctg tctgtgct gtgtgatg ctgcgccag ccggctctg agccctgct cccccagct cacactg (GenBank アクセッション番号NM_001080483.2)

20

30

【0047】

40

【表 2 - 2】

ハツカネズミ (Mus musculus)	Myomaker アイソフォーム1 アミノ酸	18	MGTVVAKLLLPTLSSLAFLPTVSIATKRRFYMEA MVYLFMFFVAFSHACDGPGLSVLCFMRRDILEY FSIYGTALSMWVSLMALADFDEPQRSTFTMLGVL TIAVRTFHDRWGYGVYSGPIGTATLIIAVKWLKK MKEKKGLYPDKSIYTQQIGPGLCFGALALMLRFF FEEWDYTYVHSFYHCALAMSFVLLLPKVNKKAG NAGAPAKLTFSTLCCTCV (GenBankアクセッション番号 NP_079652.1)	
ハツカネズミ (Mus musculus)	Myomaker アイソフォーム1 cDNA	19	gagcacttaa gccctccttg tgggtgctgc cacagctgcg gtcagggctg ctggagaagc aaagaagtgg gctcttttc ttctgccct ggagaccagg ggggcctta ccacctctc cccagtcagt gccctctcc tggccatgg ggacagttgt agccaaactg ctctgccta cctcagcag cctggcctc ctccgacag tgagcctgc taccaagagg cgtttctaca tggagccat ggtctacctc tcaccatgt tctttgtgce gtctcccat gccctgcatg ggcctggtt gtctgtgctg tcttcatgc gccgtgacat tetggagtac tcagcatct atggaacagc cctgagcatg tgggtctccc tgatggcact ggccgacttt gatgaacccc agagatgac ctcacaatg cttggcgtcc ttaccatgc tgtgggact ttcatgacc gctgggggta cgggggtatac tccggtecca taggcacggc caccctcacc attgctgtaa agtggctgaa gaagatgaaa gagaagaagg gccctgaccc cgacaagagc atctacaccc agcagatagg ccccggcctg tgccttgggg ccttggccct gatgcttga ttctctttg aggaatggga ttacacctac gtccacagct tetaccactg tgcctggcc atgtccttg tctgtctgt gcccaggctc aacaagaagg ctgggaacgc aggggcccc gccaagctga ccttctccac cctctgctgc acttgtgtct gactataccc ccccacac acacacacac caggccccctg ccttctgccc tggcagctct gctgtctc ccaaggtact tctatactt tgtatgccc cctgtacatg agaaatggte ttctctacac ccaagagac cagcaggcct gctgcattct gctgagctg gcttagggac cactggttc tgtgttacc agttgctca ctctgtcag gaaaaaaaaa aactttatcc ccaaggcct cacaaccata ggtgtcctg gcagagaacc ctagaccagt aaataaccag cagcatgcag ggttatctat tcccaggctc ctgctgtca gaatgctctg cttccctag gaaatggga ttgccctttt aaccctgccc caggctctga aagctctcca cttaggaagc tggagccagc gaacctgca taccctgccc tgagteccat ccttctgca ggtttctgat caagccatc acagtaaac ctgtacagc cactagctat tagcttccc taacatacat tctagttct ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a (GenBank アクセッション番号 NM_025376.3)	10 20 30
ハツカネズミ (Mus musculus)	Myomaker アイソフォーム2 アミノ酸	20	MGKGFHSHACDGPGLSVLCFMRRDILEYFSIYGTA LSMWVSLMALADFDEPQRSTFTMLGVLTIAVRTF HDRWGYGVYSGPIGTATLIIAVKWLKKMKEKKG LYPDKSIYTQQIGPGLCFGALALMLRFFFEWDY YVHSFYHCALAMSFVLLLPKVNKKAGNAGAPAK LTFSTLCCTCV (GenBank アクセッション番号 NP_001153074.1)	40
ハツカネズミ (Mus musculus)	Myomaker アイソフォーム2 cDNA	21	atcagcactt ccttgggggg aatctaaggc ctctctttt tatggagaga caggggtcca ggataaaagg ctctatgca aagactggca taggaatgtg tacacttca gtcagtcag ggcaaaggtt tetcccatgc ctgtgatggg cctggtttgt ctgtgctgtg ctctatgccc cgtgacatc tggagtactt cagcatctat ggaacagccc tgagcatgtg ggtctccctg atggcactgg ccgacttga tgaaccccag agatcgacct tcacaatgct tggcgtctt accatcgctg tgggacttt tcatgaccgc tggggttacc ggggtactc	40

【表 2 - 3】

			<p>cggtcacata ggcacggcca cccicalcat tgcgtgaaag tggctgaaga agatgaaaga gaagaagggc ctgtaccccg acaagagcat ctacaccag cagataggcc cggcctgtg ctttggggcc ctggcctga tgcttcgatt ctctttgag gaatgggatt acacctacgt ccacagcttc taccactgtg ccctggccat gtctttgtc ctgctgctgc ccaaggtcaa caagaaggct gggaacgcag gggccccgc caagctgacc ttctccacc totgctgcac ttgtgtga ctatacccc ccacacacac acacacacca gggccctgcc ttctgctg gcagtcctgc tgcctcccc aaggtacttc ctatacttg ttatgcggcc tgtacatgag aaatggtctt ctctacacc caagagacca gcaggcctgc tgcattctgc tgagtctgc ttagggacc actggttctg tgtcaccag ttgcttact ctgtcagga aaaaaagaa cttatcccc caaggcctca caacatagg tgtgctggc agagaacct agaccagtaa ataccagca gcatgcaggg ttatctatt cccaggctct gcctgtcaga atcgtctgct ttcctagga aactgggatt gccctttaa cccctgcca ggctctgaaa gctctccact taggaagctg gagccagcga accttgata cccctgctg agteccatcc ctctgcagg tttcgatca agccattcac agtaactct tgcagacca ctagtcat gcttcgcta acatacatc tagttctgg aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa (GenBank アクセション番号 NM_001159602.1)</p>	10
ドブネズミ (Rattus norvegicus)	Myomaker アミノ酸	22	<p>MGLHLRSQLLPLRPGHVLRPAAAQGGQEGWERR GPRQADLLHSLHLCLTVAPLLQAPAFSLGSPAVS PGILPTLSQWNVHEEWPLHPERPAQLLSAKCCL GTHEFCVHQLLSIQEKKERELYPPRLHNHRAL QSPRPVSIKPKSQSSVHNSSIRVIYFPGPACQDCLP FLGNWDCPFYPCGPPESSQFRELDVSPVPVWTQ AWCPCLSPIPSAVFRSSHSQ (GenBank アクセション番号NP_001127989.1)</p>	20
ドブネズミ (Rattus norvegicus)	Myomaker cDNA	23	<p>gcatacagctg ttggaccttc tccatgtgct actgggcaca tgcctgcctca gagcacttaa gccctctctg tgggcgctgc cacagctgcg gcaaggggtg ctgaagaaga gaagtgggct ctattttcc ctgccctgga gaccaaggag gccttacta ccttctccc tggcagtgcc ttcttctgg cccatgggga cagttgtage caaactgctc ctgctaccc ttagcagcct ggccttctc cccacagtga gcattgctac caagcggcgt ttatcatgg aggccatgat ctatctcttc accatgttct ttgtggcgtt ctcccatgcc tgcgacgggc ctggcttgc cgtgctatgc ttcatgcgcc gtgatattct ggagacttc agcatctatg ggacagccct gagcatgtgg gtctccctga tggcactggc cgactttgat gaaccacaga gatcaacct cagatgttt ggtgtctta ccattgccgt gggacttac catgacct ggggctacgg ggtgtactct ggtcccatag gcaccgccac cctcatcatt gcagtaaagt ggctgaagaa gatgaaagag aagaagggtc tgtaccctga caagagcacc tacaccage agataggtcc cggcctctgc tttggggccc tggcctgat gcttcgcttc ttctttgagg aatgggatta cacctacgtt cacagcttc accactgcgc cctggccatg tctctctcc tgcctgctgc caaggtcaac aagaaggctg ggaacgcagg ggacccgcc aagctgacct tctccactct ctgctgact tgtgtctgac agtagcccc ctgctccagg cccctgctt cctgtctggc agccctgctg tctctccgg gatactct</p>	30 40

【表 2 - 4】

			<p>acacttccc agtggaatgt ccatgaggaa tggcctcctc tgcaccccga gagaccagca gggctgctgc agtcggcgaa gtgctgclta gggacccacg aattctgtgt tcaccagtgt ctactacteta ttcaggaaaa aaaagagaga gaactttate ccccaaggct gcataacat aggtgtgcct tgcagagccc taggccagtc agtattggcc ccaagtcaca acccagcagt gtacacaaca gcagcatacg ggttatctat tcccaggcc ctgctgcca ggattgtctg cctttctag gaaactggga ttgcccttc taccctgcc caggecctga aagctcccag ttccgggagc tggaccagc gagcccagtt ccagtctgga cccaggcttg gtgccctgc ctgagtecca tccctcagc agttttcgg tggagccact cacagtaaac tcttgatcag tcaactagt (GenBank アクセション番号NM_001134517.1)</p>	10
ネコ (Felis catus)	Myomaker アイソフォーム1 アミノ酸	24	<p>MGTLVAKLLLPTLSSLAFLLPTVSIKRRRFHMEA MVYLFMFFVAFHHACNGPGLSVLCFMRHVDLE YFSVYGTALSMWVSLMALADFDEPKRSTFVMFG VLTIAVRIYHDRWGYGVYSGPIGVAVLVIATKWL QLMKEKKGLYPDKSVYTQQIGPLCFGALALML RFFFEDWDYTYVHSFYHCALAMSFVLLLPKVNK KAGSAGPPAKLNCPALCCACV (GenBank アクセション番号XP_006939684.1)</p>	20
ネコ (Felis catus)	Myomaker アイソフォーム1 cDNA	25	<p>tggagcccc caccgaacgg agcaggcctc gtccctccg tgtctctgc cctggggacc cggggggccc gcacctccc ctctcccaca accggcgccc tctccctgg cccatgggga cgtcgtggc aaagctgctc ctccccacc tcagcagcct ggcttctc cccacggtea gcacgctgc caagcgccgc tccacatgg aggcctatgt ctacctgtc accatgtct tctgtggcgt ccaccaagc tgcacgggc cggcctgctc agtctctgc ttcatgcgc acgacgtct ggagtactc agcgtctac ggacagcgt gagcatgtgg gtctactga tggcgtggc cgactcgac gaaccaaga ggtcgacct tgtgatgtt ggcgtcctga ccatcgcggt cggatctac cacgaccgt ggggctatgg cgtgtactc ggccccattg gcgtggctgt cctgtcacc gccaccaagt ggctgcagct catgaaggag aagaagggtc tgtacccca caagagcgtc tacaccagc agataggccc cggcctctgt ttcggggcgc tggcctcat gttacgattc ttcttgagg attgggatta cacctacgtg cacagttct accactgcgc gctggccatg tctttgtcc tctgtctgc caaggtcaac aagaaggccc gaagcgggg gcccccgcc aagctgaact gccccgct ctgctgtgt tgcgtctgac cgcgcgccgc gcccgcccc tccccctgc cagcccctgc cctgcgcct ccccgcctg cggagagacc cccatggccc cccccccggt ctctgagcac ccaggagaaa tctctcccct cagagggatt tggggagcat cctgccaagg gctgctggga gcccactac taggttcta cggagcaca accaccgtgc tggaggaaa aggacttct gccccgctc tctccccca cagtcagtc cagtctcgt ccgcaggacc ccacagccaa catgggtccc cccaccctg ccccttcc tctcaccaca gccaaaagg gactctgccc atgccccct cacaacccc gtctctct ggaccctgt tctaccgct tctgtctgt gccctcgggc tctgagcaga</p>	30 40

【表 2 - 5】

		<p>cccgttagg aagccaaggc cagtggggac cggctctgtc caggcctgct ggccgtcctt ccagccgggt cctgaatca agccctgtca gttacggcag cccacaggaa gctcctcagc ccttgacctt cccgtgtgcc agaggccgta tgalcatcgc tcatctaata tcgtgaacaa agtctgcatt aaaggatgat cactcccttc tacagacaga agcccagggc gcaggggtcca tgggggtccc gaggcctcga gcagggcagt gcagaccggg gccaggcccg ccgccaccaa gcccgcctcc tcgtgtgca gccgccacg ggctgggggc gaggacctgt gttggcctt cgagcggctc caccctgggc taacggccag cgtgggaagg gggtctgggc ccagggacac ccgcgaggag gccagcgggc ccggagccgg gcgcacgggg caggcttgcg gcagcgtga gggaggggcg ccggtcccg cctacagccc gtctgtctg ggccccgca ggggtggggc cggcctcca gacatcacct cacaacctg agcctccca gcagcccag cccaccag ctcccgaac gatgtggga catctgtcag gcaggaagt acctacact gtctggggcc cgttttgtt tccagacgg tgcacccca ccccaccg acggggcggc ccttattg tctgaagtc acctcttct cccctcagg ggccgggaga gagctgggga caaggctggc cctcggcga ggcaccctcg gtctgtggc ctccctgact gtcagaggt cccacgctg gggcccggac gccacagtc tcaacttggc tcagcccctt cctgagccta cagactgat gacagagcag cctctgggca gctcgcagg gctcggagtc ctggccgggc cccggggagc aggcctcagc ctcgtctgc tcccagtg aggaagctga gccacagct tcggggtct cctcccagac ggacatgccc ccgcatccc cggccggcgc agggacgggc agaagccct tccgttggt tctggtccgg ttgaggggtg tgcacacaca ggtgccctc cacacctga agagatagg ccccctggaa acagcatct cctgtccggc ctgttcca gctccggag gggagacacc gggcaggaag gaaagcgaag gctgtggggg ccacgcgggg ggcccgggg cactactctg gaagcaggcc ctgccaagtc gctcctcc ccgtacctc cctccatcc cctcccctg gccccccca cacacacacc cgacgagcac atcccagct ccagctccgc ggcagcagat ggaaagtgg aggcggggg atctcctga gcagggagga ggtgaggggc cggccaagag cgtlaaggac catactaaca ggctactcac tgcggccacg ctgattatg aggccgtctg ggagcccagc caagtctgta agtcatggac aatagggag ctcgtccag cctcagccc cgtccgcctc tggggctta ggcccaccg gcccctctc agcagggtca gcaccgtgga gaccccagg tgcagatagg gacacggagg gccgggaggc cggcggccgg ccccggtgac ttggacactg ggtgctgagc ggtggctgtg cccagggtct gactcctaac ctagcggca tctctctg ctccaaggc ccactttgac atctggggg ctccagccaa gggccgggtg ggggagtgcc cgggaggggg acagaaagag aagaggacac ttggaacct cagccctaca ctagagact aacaaggaag aaaagaagtc tcatggcct cagaccaaac acctctgagt cccagtgtcc tcgagcccgg ggcctctgtg</p>
--	--	--

10

20

30

40

【表 2 - 6】

			ccctacaatc cagcagtcac ggcatccggg gccaggaggg acctccgagg cccccccag acccccctgg ggctctggac gggactcacc tccagccaga tctgatgagg gaagcctggg tcccgactcc agcgtgcgcc tggagccga gcccgagatg atggcagccc cagagcagcc tgtgcagtag aacttgcttt aatgatggag gcgaggcggg ggcggccggg gggct (GenBank アクセション番号 XM_006939622.2)	
ネコ (Felis catus)	Myomaker アイソフォーム2 アミノ酸	26	MGTLVAKLLLPTLSSLAFLLPTVSIKRRRFHMEA MVYLFMTMFFVAFHHACNGPGLSVLCFMRHDVLE YFSVYGTALSMWVSLMALADFDEPKRSTFVMFG VLTIAVRIYHDRWGYGVYSGPIGVAVLVIATKWD WDYTYVHSFYHCALAMSFVLLLPKVNKKAGSAG PPAKLNCPALCCACV (GenBank アクセション番号 XP_011287016.1)	10
ネコ (Felis catus)	Myomaker アイソフォーム2 cDNA	27	tccggagccc caccgaacgg agcaggcctc gtccttccg tgttctctgc ctgggggacc cgggcggccc gcaccctccc ctctcccca accggcggcc tctccctgg cccatgggga gcctcgtggc aaagctgctc ctcccaccc tcagcagcct ggtttctc cccacggtea gcatcgctgc caagcggccc tccacatgg aggccatggt ctactgttc accatgttct tcgtggcgtt ccaccagcc tgcacgggc ccggcctgct agtcctctgc ttcatgcgcc acgactcct ggagtacttc agcgtctacg ggacagcgt gagcatgtgg gtctcaatga tggcgtggc cgactcgac gaaccaaga ggtcgacctt tgtgatgtt ggcgtctga ccatecgggt ceggatctac cacgaccgt ggggctatgg cgtgtactg ggccccattg gcgtggctgt ccttgcate gccaccaagt gggattggga ttacacctac gtgcacagt tctaccactg cgcgctggcc atgtccttg tctcctgct gcccaaggtc aacaagaagg ccggaagcgc gggggccccc gccaagctga actgccccgc cctctgctgt gcttgcgtct gaccgcgcgc cgcgccccgc ccctgcccc tgcagcccc tgcctgccc catctcccgc ctcgggagag accccatgg cccccccc cggctctgag caccaggag aaatgtctcc cctcagaggg atttggggag catcctgcca agggctctg ggagcccact tactaggttt ctacggagca caaacaccg tgctggaagg aaaaggactt cctgccccgc tctgtctcc ccacagtcac ggccagtctg cgtccgcagg accccacagc caacatgggt cccccaccc cgtccccctt tctctctac ccagccaaa agggactctg cccatgcccc cctcacaaca cccgtctct cctggacct ggttgacc gcttctgccc tgtcccctg ggtctgagc agaccctgt aggaaagcaa ggccagtggg gaccggctct gtcaggcct gctggccgct cctccagccg ggtccctgaa tcaagccctg tcagttacgg cagcccacag gaagctctc agccctgac ctcccctgt gccagaggcc glatgatcat cgttcatct aatcgtgaa acaagtctgc attaaaggat gatactccc ttctacagac agaagcccga ggcgcagggt	20 30 40

【表 2 - 7】

		<p>ccatgggggtg cccgaggcct cgagcaggcg agtgcagacc cgggccaggc ccgccgccac caagcccgcc cctcgtgt gcagccgcc acgggctggg cgcgagcacc tgtgtggcc cttcgagcgg ctccacctg ggctaaccgc cagcgtggga agggggtctg ggcccaggga caccgcgcg gaggccagc ggcccggagc cgggcgcacg gggcaggctt gcggcagcgc tgaggggagg cggccggctc ccgcctacag cccgtctgt ctgggccccg cgagggtggg ggccggcctc ccagacatca cctcacaac ctgagcctcc ccagcagccc cagcccacc cagctcccg aacgatgtgg gcacatctgt caggcaggaa gttacctaca cctgtctggg gcccgtttt tgtttccaga cggtcaccc ccacccccac cgcacggggc ggccccttat ttgtctgaa gtcacctctt gctcccctca gggggcccgg agagagctgg ggacaaggct ggcccctcgg cgaggcacc ccggtctgtc ggctccctg actgtccaga ggtcccagc gtggggcccg gacgccaca gctcactct ggctcagccc ctctctgagc ctacagactg gatgacagag cagcctctgg gcagctcga cgggctcggg gtcttgccg ggccccgggg agcaggcctc agcctcctc tcttccag ttgaggaagc tgagcccaca gcttcggggt cgtctccca gacggacatg tccccgcatc ccccggccgg cgcagggagc ggccagaagc gcttccgtt gcttctgtc cgggtgaggg gtgtgcacac acaggtgccc gctcacacc tgaagagata gggccccctg gaaacagcat cgtctgtcc ggctgtctc ccagctccgc gaggggagac accgggcagg aaggaaagc aaggctgtgg ggccacgcg gggggcccgc gggcatcact ctggaagcag gcctctgcca gtgcctccc tcccgtcac ctcccctca teccctccc cgtgcccc ccaacacac acccgacgag cacatcccag ctcccagctc cgcggcagca gatggaagt tggaggccc gggatgctc tgagcaggga ggaggtgagg ggccggccaa gagcgttaag gaccatacta acaggctact cactgcggcc acgtgattt atgaggcct ctgggagccc agccaagtct gtaagtcatg gacaattagg aggtcgtctc cagcccctag ccccgtccgc ctctggggct ctaggccac cgcgcccctc ctacagaggg tcagcacctg ggagaccca cggtcagat agggacacgg agggccggga ggccggcggc cggccccgt gacttgaca ctgggtctg agcgtggct gtcccaggg tctgactct aacctagcg gcatctct ctctccaa ggcccactt gacatcttg gggtccagc caaggccgg tggggggagt gccgggagg gggacagaaa gagaagagga cacttggaac ctccagcct acacctagag actaacaagg aagaaaagaa gtctcatggc ctccagacca aacctctg agtcccagtg tctcagacc cggggcctc gtgcccata atccagcagt catggcatcc ggtgccagga gggacctcc aggcccccc cagaccccc tggggtctg gacgggactc acctccagcc agatctgatg agggaagcct gggctccgac tccagcgtgc gctggaagc</p>
--	--	--

10

20

30

40

【表 2 - 8】

			cgagcccag atgatggcag cccagagca gcctgtgcag tagaacttgc ttaaatgatg gaggcgagc gggggcgccc ggggggct (GenBank アクセション番号 XM_011288714.1)
イノシン (Sus scrofa)	Myomaker アミノ酸	28	MGTVMAKLLLPTLSSLAFPTVSIAAKRRFHMEA MVYLFTHFFVAFYHACHGPGGLAMICFLRLDILEYF SVYGTALSMWVSLMALADFDEPKRSTFVMFGVL TIAVRIYHDRWGYGVYSGPIGTAALIIAAKWLQQ MKDQRRLYPDKSVYTQQIGPGLCFGALALMLRFF FEEWDYTYVHSFYHCALAMSFVLLLPKANKKAG SAGPPAKLDCSTLCCACI (GenBank アクセション番号 XP_003353750.1)
イノシン (Sus scrofa)	Myomaker cDNA	29	gatgagacaa gacaagaaaa aagaaaagga agagctctc ccaccgtacg tttaaatcc gtgccttta tcgtggcgcc catcattcga tcacgatgaa aaacacaacg ggagaaatgc tgttcttta ctgacaacaa tcaagggatg aactcatgaa gccagcatga ttccgtcagt gcctgtaggg agagagggtc gcctgcgcag ctacacagcc cggatcgtc cttggccaga ggatgatggg ggggggggagc atctgccag gtgctccct cgagacctgt ttagcaagag aaggaatgc tccagggcca aggaaggccg agagccctag catccgctt gccttgggga cactgataga ggtgctctg gcttgttcc ttcaggtca aagctatgt accgcagaga aaagacagtg agttctgtg gttcaggcac caaggaagcc tgctggagc aggagcaggt gagcaagaag ggcattggcg ctggtaggtt ggtctctt ggtgaccgga acgggctcag ccttggctc tctcgcgc ccaccccg gcctgtgca cacgtgactc cagcagcagg gtctgttct ctctctgtt ctggctcct gagcgcctg gagagggcg aggatggaga gtggctgac atcgggggtg cggatgggga ctccgctcca tcgaagtgt ggctccaaa aacaaggggg gactcctga atcaactgct ctgatcctc caaaacaaag gagagagaga gggtgaggca agggccgacc agcgggatca gctgttggc ctctccccg ggcggtggac atgtgcgcgc cctccccgc ctcgcagggt attaaaccg cagctgcat cggagcccc gctggcagga gegaccctc tccctgctc tccctgccc tggggaccg ggagggccg acctccct cctccccgc ccatggggac cgtcatggc aaactgctc taccacgct gacagcctg gccttctcc ccacggtag catcgtgcc aagcggcgg tccacatgga ggccatggtc tctcttca ccacttct cgtggcgtc taccacgct gccacgggccc gggcctggct atgatctgt ttctgcgct tgatcctg gagtattca gctctacgg aaccgcctg agcatgtggg tctcgtgat ggcgtggct gacttcgac agccaagag gtcgaacttc gtgatgttg gcgtctgac catcgcctg cggatctacc acgaccgctg gggctacggc gtgtactcg gccccatcg cacggccc ctcacatcg cggccaagt gctgcagcag atgaaggacc aacggcct gtatccagac aagagcgtg acacacagca gataggcccc ggctctgct tcggggcgt ggcctcatg

10

20

30

40

【表 2 - 9】

			<p>ctgcgctttt tcttcgagga gtgggattat acctacgtcc acagctteta cactgcgcc ctggccatgt ccttcgtcct gctgctgccc aaggccaaca agaaggetgg aagcgcaggg ccaccgcga agctggactg ctccacctc tgcgtgctt gtatctgacc gcgtggccca aagetcccag ccccccccc gccctgctg gtccttcgg actgcagaaa cggccctct cagagcctgc gggctctctg gggctctggg agcatcccgc caagtgttt ttgagaacc acttctctg tgtccccgg gtgccaagga ggggtctgga aagaacaaa catcctgatg gacaggtgtg tctgcagaag cccggagcca gacctgccc ccctccacg tcccctccc gtttccccg acagcccat ccagccacc aaggggcct gcctgccacc ctggcccac acgtcccaca caccctctg ttctgctct gacctatg cctcaggte ggcgagccag ggcagcagg gccacttgt cctgcccga ggctggctg cccctggct gtcccccag ccaggtcgt aatcaaac attccactc ac (GenBank アクセション番号 XM_003353702.3)</p>	10
アカゲザル (Macaca mulatta)	Myomaker アミノ酸	30	<p>MGTLVAKLLLPTLSSLAFLLPTVSIAAKRRFHMEA MVYLFRLFV ALHHACNGPGLSVLCFMRHDILEY FSVYGTALSMWVSLMALADFDKPRSTFVMFGV LTIAVRIYHDRWGYGVYSGPIGTAILIAAKWLQK MKEKKGLYPDKSVYTQQIGPLCFGALALMLRFF FEDWDYTYVHSFYHCALAMSFVLLLPKVNKKAG APGAPAKLDCSTLCCACV (GenBank アクセション番号 XP_014971917.1)</p>	20
アカゲザル (Macaca mulatta)	Myomaker cDNA	31	<p>tccgtcctaaa aaaaagaaaa gagaaaatca gagacaagtg ctggtcacgt ggcgcgtcag ctgtcggccc tcccattgtg ttgcttgaca tgtgatgta catccccgcc tccgtccagg gcatttaaac cctctctggt gcgtcccgc cagctgcat cagagccctg ctcaaaggga gctggcctc cccctctgtg ctctgtgct ggggaccag ggcgccagea cccacccgc cccagccagt gttcccctc aggctatgg ggacgctgtt ggccaagcta ctctgccc cctcagcag cctggcctc ctcccactg tcagcagtc ggccaagagg cggttccaca tggaggccat ggtctacctc taccctgt tctctgtggc gctccacct gctgcaacg gaccggctt gctgtgctg tgctcatgc gacagacat cctggaatac tcagcgtct acggaacage cctgagcatg tgggtctcgc tgatggcact ggccgactc gatgagcca agaggtcaac atttgtgatg ttcggcgtcc tgaccattgc tgtgaggatc taccagacc gctggggcta cggggtgtac tcaggccca tcggcacagc cactctcact attgcggcaa agtggctgca gaagatgaag gagaagaagg gcctgtacc agacaagagc gtctacacc agcagatagg ccccggctc tgcctgggg cgctggcct gatgctacgc ttctctctc aggactggga ctacacctat tccacagct tctaccactg tgccctggcc atgtccttg ttctgctgt gcccaaggc aacaagaagg ctggagcccc gggggcccc gccaagctgg actgctccac cctgtgctg gcttgtgt gatgctgcgc ccagcccggc tctgagccc tgccctccc agctcagct tggccagagt ccagacagt ttctctct gcagctctc ctgtcctcc ctgcccaga gcattgcagga gaaacatct ttgcataccc taagaggccc cgggggtct gtaaggccc catcacactg</p>	30 40

【表 2 - 10】

			cactaaatgc ttcttaagaa cccgcttatt ccgttgtagc ggggtgcaca gcagcaggac caagctggaa agataagaat gttctctcc caggcctgt cacgacccat tggcgtgtct ggtggagccc taggtctggtc gtctgccac cccactgctg gccagcggcc caggagtccc agccgtgtgc cagccatgac gggggggctc ccatgtcttc agtttctcc tgggaactgc taccaccatc tctgtctgt gtctcagge tccgagcaac cccatttagg aagctgaggc cagcggggcc agctggatcc ctggcccagg ccagtctggtc cccaccctt ccgtgggtc cctgaatcaa gccgtttca taattataac caataagaag tgctcaatg tatcaacctc a (GenBank アクセッション番号 XM_015116431.1)
--	--	--	---

10

【0056】

「マウス Myomaker ポリペプチド」は、天然に存在するマウス Myomaker タンパク質（例えば、配列番号 18 または 20 のタンパク質）またはその変異体を指す。マウス Myomaker アイソフォームのアミノ酸および cDNA 配列は、表 2 において見出すことができる。表 2 はまた、他の種、例えば、ラット（ドブネズミ（*R. norvegicus*））、サル（アカゲザル（*M. mulatta*））、ネコ（ネコ（*F. catus*））、およびブタ（イノシシ（*S. scrofa*））の Myomaker 配列を含む。

20

【0057】

用語「Myomaker ポリペプチド」は、任意の種の Myomaker タンパク質、またはその変異体の天然に存在する全てのアイソフォームを一括して指すために使用される。例えば、「Myomaker ポリペプチド」は、表 2 に列記される任意の Myomaker ポリペプチドまたはその変異体であり得る。

【0058】

本明細書および特許請求の範囲で用いられる単数形の「a」、「an」および「the」は、他に明確な断りがなければ、複数の対象を含む。例えば、用語「細胞」は、その混合物を含む複数の細胞を含む。

30

【0059】

全ての数の指定、例えば、範囲を含む pH、温度、時間、濃度、および分子量は、0.1 単位で（+）または（-）変化する近似値とする。いつも明確に提示されるとは限らないが、全ての数の指定に「約」という用語が付けられることを理解されたい。またいつも明確に述べられるとは限らないが、本明細書に記載される試薬は単に例であり、その等価物が当技術分野において知られていることも理解されたい。

【0060】

用語「cDNA」は、相補的 DNA、例えば、逆転写酵素などの酵素で cDNA にされる、細胞または生物体に存在する mRNA 分子を指す。「cDNA ライブラリー」は、細胞または生物体に存在する mRNA 分子の全てのコレクションであり、全ては酵素逆転写酵素で cDNA 分子に変えられ、その後「ベクター」（外来 DNA の添加の後に複製し続けることができる他の DNA 分子）に挿入される。ライブラリーのための例となるベクターとしては、バクテリオファージ（「ファージ」としても知られる）、細菌に感染するウイルス、例えば、ラムダファージが挙げられる。次に、ライブラリーは、目的とする特定の cDNA（したがって、mRNA）について探索され得る。

40

【0061】

用語「併用」は、1つの単位剤形での固定された併用、または組合わせ投与を指し、本発明の化合物および併用パートナー（例えば、後に説明するような、「治療薬」または「補助薬」とも呼ばれるもう1つの薬物）は、同時に独立して、または時間間隔内に個別に投与してもよく、特にこれらの時間間隔は、併用パートナーが、協同的効果、例えば相乗

50

効果を示すことを可能にする。単一の成分は、キットにパッケージ化してもよく、または別々であってもよい。成分の一方または両方（例えば、粉末または液体）を再構成または希釈して、投与の前に所望の用量にしてもよい。本明細書で利用される場合、用語「同時投与」または「組合わせ投与」などは、選択された併用パートナーの、それを必要とする単一の対象（例えば、患者）への投与を包含することを意味し、薬剤が必ずしも同じ投与経路で、または同時に投与されない治療レジメンを含むことが意図される。本明細書で使用する場合、用語「薬学的併用」は、2種以上の活性成分を混合するか、または組合わせて得られる製品を意味しており、活性成分の固定された組合わせおよび固定されていない組合わせを含む。用語「固定された組合わせ」とは、活性成分、例えば、本発明の化合物と併用パートナーの両方が、単一の実体または投与量の形態で、患者に同時に投与されることを意味する。用語「固定されていない組合わせ」とは、活性成分、例えば、本発明の化合物と併用パートナーの両方が、個別の実体として、同時に、並行して、または特定の時間制限なく逐次的に患者に投与されることを意味しており、こうした投与は患者の体内で2種の化合物の治療上有効なレベルをもたらす。後者はまた、カクテル療法、例えば、3種以上の活性成分の投与にも当てはまる。

10

20

30

40

50

【0062】

「有効量」は、有利なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量を指す。例えば、治療量は、所望の治療効果を達成するものである。この量は、疾患または疾患症状の発症を予防するのに必要な量である予防有効量と同じであっても、異なってもよい。有効量を1回以上の投与、適用または投薬において投与することができる。治療用化合物の「治療有効量」（すなわち、有効な投与量）は、選択される治療用化合物に依存する。組成物は、1日当たり1回以上から、1日おきに1回を含む1週間当たり1回以上投与することができる。当業者は、疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の全体的な健康状態および/または年齢、ならびに存在する他の疾患を含むがこれらに限定されない、一定の因子が対象を効果的に治療するのに必要な投与量および時機に影響し得ることを理解するであろう。さらに、治療有効量の明細書に記載の治療用化合物による対象の治療は、1回の治療または一連の治療を含み得る。

【0063】

用語「変異体」は、基準ポリペプチドと実質的に同一なアミノ酸配列を有するか、または実質的に同一なヌクレオチド配列によってコードされ、かつ基準ポリペプチドの1つ以上の活性を有することができるポリペプチドを指す。例えば、変異体は、基準ポリペプチドに対して約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有することができ、一方、基準ポリペプチドの1つ以上の活性を保持することができる。

【0064】

「遺伝子」は、転写および翻訳された後で、特定のポリペプチドまたはタンパク質をコードすることが可能な、少なくとも1つのオープンリーディングフレーム（ORF）を含むポリヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチド配列を使用して、それらが関連する遺伝子のより大型の断片または全長コード配列を同定することができる。大型の断片配列を単離する方法は、当業者に知られている。

【0065】

用語「単離されている」は、自然状態から変更されたか、または取り出された状態を指す。例えば、生きている動物内に自然に存在する核酸またはペプチドは、「単離されていない」が、その自然状態の共存物質から部分的にまたは完全に分離された同じ核酸またはペプチドは、「単離されている」。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができ、または、例えば、宿主細胞などの非天然環境において存在することができる。

【0066】

用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）および一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のそのポリマーを指す。特に

限定しない限り、本用語は、基準核酸と同様の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で代謝される、天然ヌクレオチドの既知のアナログを含む核酸を包含する。別段の指示がない限り、特定の核酸配列はまた、明示的に示される配列だけでなく、保存的に改変されたその変異体（例えば、縮重コドン置換）、アレル、オルソログ、SNP、および相補的配列も暗示的に包含する。とりわけ、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された（または全ての）コドンの第3位が、混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作製することによって実現してもよい（Batzler et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); および Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)）。

10

【0067】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」は、互換的に使用され、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質またはペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含まなければならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成し得るアミノ酸数の最大数に制限はない。ポリペプチドは、互いにペプチド結合により連結した2つ以上のアミノ酸を含むあらゆるペプチドまたはタンパク質を含む。本明細書で使用する場合、本用語は、例えば、当技術分野で一般にペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーと呼ばれる短鎖、ならびに当技術分野で一般にタンパク質と呼ばれ、多くの種類が存在する長鎖の両方を指す。「ポリペプチド」は、とりわけ、例えば、生物学的に活性な断片、実質的に相同のポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのパリアント、修飾ポリペプチド、誘導體、アナログ、融合タンパク質を含む。ポリペプチドは天然ペプチド、組換えペプチドまたはこれらの組み合わせを含む。「微小タンパク質」または「微小ペプチド」は、100アミノ酸長未満のタンパク質またはポリペプチドを指す。

20

【0068】

用語「相同」または「同一性」は、2つのポリマー分子間、例えば、2つの核酸分子間、例えば、2つのDNA分子または2つのRNA分子間または2つのポリペプチド分子間のサブユニット配列の同一性を指す。2つの分子の両方におけるサブユニットの位置が同じモノマーのサブユニットで占められている場合、例えば、2つのDNA分子それぞれにおける位置がアデニンで占められている場合、それらは、その位置において相同または同一である。2つの配列間の相同性は、マッチした位置または相同な位置の数の一次関数であり、例えば、2つの配列中の位置の半分（例えば、ポリマーの長さが10個のサブユニット中の5個の位置）が相同である場合、2つの配列は50%相同であり、位置の90%（例えば、10個のうち9個）がマッチしているかまたは相同である場合、2つの配列は90%相同である。「配列同一性」のパーセンテージは、比較ウィンドウにわたって2つの最適に整列された配列を比較することによって決定され得るが、このとき比較ウィンドウ内のアミノ酸配列の断片は、2つの配列の最適なアラインメントのための基準配列（付加または欠失を含まない）と比較して付加または欠失（例えば、ギャップまたはオーバーハング）を含む場合がある。パーセンテージは、両配列内で同一の酸残基が存在する位置の数を決定して、マッチした位置の数を得、そのマッチした位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で除算し、その結果に100を乗じて配列同一性のパーセンテージを得ることによって算出することができる。結果は、クエリー配列に対する対象配列の同一性パーセントである。

30

40

【0069】

用語「対象」は、本発明の方法に従う治療が提供される動物、ヒトまたは非ヒトを指す。獣医学および非獣医学用途が考えられる。本用語は、哺乳動物、例えば、ヒト、他の霊長類、ブタ、マウスおよびラットなどの齧歯類、ウサギ、モルモット、ハムスター、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ヒツジおよびヤギを含むがこれらに限定されない。典型的な対象としては、ヒト、家畜、ならびにネコおよびイヌなどの愛玩動物が挙げられる。

50

【0070】

用語「治療する」または「治療」は、治療的処置および予防的または防止手段の両方を指し、その目的は、望ましくない生理学的変化または障害を予防または遅らせることである。本発明の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果は、検出可能または検出不可能のいずれにせよ、症状の軽減、疾患の程度の低減、疾患の安定化した（すなわち、悪化しない）状態、疾患進行の遅延または減速、病態の緩和または一時的軽減、および寛解（不完全かまたは完全のいずれにせよ）を含むが、これらに限定されない。「治療」はまた、治療を受けない場合に予想される生存期間と比較して延びた生存期間を意味することができる。

【0071】

統計的有意性は、当技術分野における任意の既知の方法によって判定され得る。例示的な統計検定としては、スチューデントのt検定、ノンパラメトリックなマン・ホイットニーのU検定、およびウィルコクソンのノンパラメトリック統計検定が挙げられる。一部の統計的に有意な関係は、0.05未満または0.02未満のP値を有する。特定の結合タンパク質は、例えば、特異性または結合性において統計的に有意（例えば、P値<0.05または0.02）である差異を示し得る。例えば、2つの状態の間の識別可能な定性的または定量的な差異を表す用語「誘導する」、「阻害する」、「増強する」、「高める」、「増加させる」、「減少させる」などは、差異、例えば2つの状態の間の統計的に有意な差異を指す場合がある。

【0072】

MINIONポリペプチドおよびその断片または変異体

マウスMINION (ESGP) タンパク質は、単一のオープンリーディングフレーム (ORF) によってコードされた (Chen Y et al., *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2005, 37 (12): 789-796)。Chen et al. に記載される84アミノ酸のタンパク質は、配列番号5 (アイソフォーム1) のアミノ酸配列を有する。マウスMINION (アイソフォーム2) のより長いアイソフォームもまた記載され、配列番号7のアミノ酸配列、およびアイソフォーム1と比較して異なるN末端を有する。マウスのMINIONアイソフォームの機能は未知である。

【0073】

本発明者らは、マウスMINIONが筋発生および再生中に高度に発現される骨格筋特異的微小タンパク質であり（実施例2を参照のこと）、筋前駆細胞の融合および骨格筋発生に必要である（実施例3および4を参照のこと）ことを見出した。さらに、もう1つのタンパク質であるMyomakerとのMINIONの強制的な異種発現が、非筋細胞（例えば、線維芽細胞）においてさえ細胞融合を誘導するのに十分であることが見出された（実施例5を参照のこと）。このことは驚くべきことであり、というのもMyomaker単独では、筋芽細胞に対する線維芽細胞の融合を促進することが可能であったが、線維芽細胞-線維芽細胞融合を促進することができなかつたためである (Millay et al., *Nature*, 2013; 499 (7458): 301-5)。

【0074】

マウスMINIONのヒトオルソログは、以前に報告されていない。本明細書に記載されるように、本発明者らは、MINIONのヒトオルソログが、配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列、および配列番号2または配列番号4のcDNA配列を有することを見出した。本発明者らは、ヒトMINIONタンパク質もまた融合誘導性活性を有することを見出したが、このことは、細胞融合においてMINIONタンパク質に関する進化的に保存された役割を示唆している。他の種、例えば、ラット (ドブネズミ (R. norvegicus))、サル (アカゲザル (M. mulatta))、ネコ (ネコ (F. catus))、およびブタ (イノシシ (S. scrofa)) のMINIONのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列もまた、表1において提供される。

【0075】

MINIONポリペプチドは、天然に存在するMINIONタンパク質（例えば、表1に列記される任意のMINIONタンパク質）の変異体であってもよい。例えば、ヒトMINIONポリペプチドは、天然に存在するヒトMINIONタンパク質（例えば、配列番号1もしくは配列番号3のタンパク質、またはその天然に存在する別のアイソフォーム）の変異体であり得る。マウスMINIONポリペプチドは、天然に存在するマウスMINIONタンパク質（例えば、配列番号5もしくは配列番号7のタンパク質、またはその天然に存在する別のアイソフォーム）の変異体であり得る。

【0076】

MINION変異体は、例えば、天然に存在するMINIONタンパク質における1つ以上のアミノ酸残基の改変（例えば、置換、欠失、または挿入）によって、天然に存在するMINIONタンパク質と異なり得るが、MINIONの生物学的活性、例えば、融合誘導性活性を保持している。MINION変異体は、1つ以上の保存的または非保存的アミノ酸置換を有し得る。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置換される置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。

10

20

【0077】

いくつかの実施形態では、MINION変異体は、天然に存在するMINIONタンパク質に対して、非必須アミノ酸の1つ以上の変異（例えば、置換（例えば、保存的置換もしくは置換）、挿入、または欠失）を含む。「非必須」アミノ酸残基は、融合誘導性活性などの生物学的活性を無効にすることなく、またはより好ましくは、実質的に変えることなくMINIONタンパク質の野生型配列から変化され得る残基であるが、一方で、「必須」アミノ酸残基の変更は、生物学的活性の実質的な消失をもたらす。

【0078】

MINION変異体は、天然に存在するMINIONタンパク質に対して、少なくとも1、2、3、または4、および10、9、8、7、6、または5箇所以下の変異（例えば、置換（例えば、保存的置換もしくは非必須アミノ酸の置換）、挿入、または欠失）を有し得る。特定の置換が許容されることになるか否か、すなわち、融合誘導性活性などの生物学的特性に悪影響を与えることにならないかは、例えば、変異が保存的であるかどうかを評価すること、または活性アッセイによって予測することができる。

30

【0079】

いくつかの実施形態では、MINION変異体は、天然に存在するMINIONタンパク質に対して、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有し得る。例えば、ヒトMINION変異体は、配列番号1または配列番号3に対して、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有し得る。マウスMINION変異体は、配列番号5または配列番号7に対して、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有し得る。

40

【0080】

2つの配列間の「相同性」または「配列同一性」（本用語は、本明細書において互換的に使用される）の計算は以下のように実施され得る。最適な比較目的のために2つの配列を整列させる（例えば、最適なアラインメントのために第1および第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、非相同配列は比較目的のた

50

めに無視することができる)。最適なアラインメントを、12のギャップペナルティ、4のギャップ伸長ペナルティ、および5のフレームシフトギャップペナルティを伴うBlossum 62スコア行列を用いて、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを使用した最良のスコアとして決定する。次に、対応するアミノ酸の位置またはヌクレオチドの位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列におけるある位置が、第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められている場合、分子は、当該位置で同一である(本明細書で使用されるように、アミノ酸または核酸の「同一性」はアミノ酸または核酸の「相同性」と同等である)。2つの配列間のパーセント同一性は、配列により共有される同一の位置の数の関数である。

【0081】

さらに、核酸セグメントが、選択的なハイブリダイゼーション条件(例えば、極めてストリンジентなハイブリダイゼーション条件)下で鎖の相補体にハイブリダイズする場合に、実質的な同一性が存在する。核酸は、細胞全体、細胞溶解物中、または部分的に精製された形態もしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。

【0082】

いくつかの実施形態では、MINION変異体は、少なくとも1つの天然ではコードされないアミノ酸を含むことができる。「天然ではコードされないアミノ酸」は、一般的なアミノ酸またはピロリジンまたはセレノシステインのうちの一つではないアミノ酸を指す。用語「天然ではコードされないアミノ酸」と同義に使用され得る他の用語は、「非天然アミノ酸」、「非天然のアミノ酸」、「天然に存在しないアミノ酸」ならびに、それらの様々な位置にハイフンを挿入した、およびハイフン挿入のないバージョンである。用語「天然ではコードされないアミノ酸」はまた、天然でコードされるアミノ酸(20種の一般的なアミノ酸またはピロリジンおよびセレノシステインを含むがこれらに限定されない)の修飾(例えば、翻訳後修飾)により発生するアミノ酸であるが、それら自体は翻訳複合体により伸びるポリペプチド鎖中に自然に組み込まれるものではないアミノ酸を含むが、これらに限定されない。このような天然に存在しないアミノ酸の例としては、N-アセチルグルコサミニル-L-セリン、N-アセチルグルコサミニル-L-トレオニン、およびO-ホスホチロシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0083】

天然ではコードされないアミノ酸は、通常、20種の天然アミノ酸で使用されるもの以外の任意の置換基側鎖を有する任意の構造である。天然ではコードされないアミノ酸は、通常、天然アミノ酸とは側鎖の構造においてのみ異なるため、天然ではコードされないアミノ酸は、限定されないが、天然でコードされる、または天然でコードされないものを含む他のアミノ酸と、天然に存在するポリペプチド中で形成されるのと同じ様式で、アミド結合を形成する。しかし、天然ではコードされないアミノ酸は、天然アミノ酸とは区別される側鎖基を有する。例えば、Rは、任意選択により、アルキル、アリール、アシル、ケト、アジド、ヒドロキシル、ヒドラジン、シアノ、ハロ、ヒドラジド、アルケニル、アルキニル(alkynyl)、エーテル、チオール、セレノ、スルホニル、ボラート、ポロナート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、ヘテロ環式、エノン、イミン、アルデヒド、エステル、チオ酸、ヒドロキシルアミン、アミノ基など、またはこれらの任意の組合わせを含む。本発明での使用に好適であり得る他の天然に存在しないアミノ酸としては、光活性化可能な架橋剤を含むアミノ酸、スピン標識アミノ酸、蛍光アミノ酸、金属結合アミノ酸、金属含有アミノ酸、放射性アミノ酸、新規官能基を有するアミノ酸、共有結合でまたは非共有結合で他の分子と相互作用するアミノ酸、光ケージされたおよび/または光異性化可能なアミノ酸、ピオチンまたはピオチン類似体を含むアミノ酸、グリコシル化されたアミノ酸、例えば、糖置換セリン、他の炭水化物改変アミノ酸、ケト含有アミノ酸、ポリエチレングリコールまたはポリエーテルを含むアミノ酸、重原子置換アミノ酸、化学的に切断可能なおよび/または光切断可能なアミノ酸、限定されないが、ポリエーテルまたは限定されないが、約5または約10炭素より長い炭素を含む長鎖炭化水素などの天然アミノ酸に比べて伸長した側鎖を有するアミノ酸、炭素結合型糖含有アミノ酸、酸化還元活性のあ

10

20

30

40

50

るアミノ酸、アミノチオ酸含有アミノ酸、ならびに1つ以上の毒性部分を含むアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

本発明での使用に好適であり得、水溶性ポリマーとの反応に有用である例示的な天然ではコードされないアミノ酸としては、カルボニル、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジド、セミカルバジド、アジドおよびアルキン反応性基を有するものが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、サッカライド部分を含む。このようなアミノ酸の例としては、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-セリン、N-アセチル-L-ガラクトサミニル-L-セリン、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-トレオニン、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-アスパラギンおよびO-マンノサミニル-L-セリンが挙げられる。このようなアミノ酸の例としては、また、アミノ酸とサッカライドの間の天然に存在するN-またはO-結合が、限定されないが、アルケン、オキシム、チオエーテル、アミドなどを含む通常は天然には見られない共有結合による連結によって置換されている例が挙げられる。このようなアミノ酸の例としては、また、天然に存在するタンパク質には通常見られない糖類、例えば、2-デオキシグルコース、2-デオキシガラクトースなどが挙げられる。

10

【0085】

天然に存在しないアミノ酸を製造する方法および天然に存在しないアミノ酸をタンパク質に導入する方法は、知られている。例えば、米国特許第7,083,970号明細書、および同第7,524,647号明細書を参照されたい。1つ以上の所望の非天然アミノ酸を含むタンパク質を作製するのに好適な直交翻訳系の生成についての一般原理は、直交翻訳系を生成するための一般的な方法であるため、当技術分野において知られている。例えば、各々の全体が本明細書に参照として組み込まれる、国際公開第2002/086075号パンフレット；国際公開第2002/085923号パンフレット；国際公開第2004/094593号パンフレット；国際公開第2005/007870号パンフレット；国際公開第2005/007624号パンフレット；国際公開第2006/110182号パンフレット；および国際公開第2007/103490号パンフレットを参照されたい。非天然アミノ酸を組み込む直交翻訳系、およびそれらの産生および使用のための方法の議論のために、各々の内容全体が参照として組み込まれる、Wang and Schultz, (2005) 「Expanding the Genetic Code .」 *Angewandte Chemie Int Ed* 44:34-66; Xie and Schultz, (2005) 「An Expanding Genetic Code .」 *Methods* 36:227-238; Xie and Schultz, (2005) 「Adding Amino Acids to the Genetic Repertoire .」 *Curr Opin in Chemical Biology* 9:548-554; および Wang, et al., (2006) 「Expanding the Genetic Code .」 *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:225-249; Deiters, et al., (2005) 「In vivo incorporation of an alkyl into proteins in *Escherichia coli*.」 *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15:1521-1524; Chin, et al., (2002) 「Addition of p-Azido-L-phenylalanine to the Genetic Code of *Escherichia coli*.」 *J Am Chem Soc* 124:9026-9027; ならびに国際公開第2006/034332号パンフレット(2005年9月20日出願)も参照されたい。さらなる詳細は、米国特許第7,045,337号明細書；同第7,083,970号明細書；同第7,238,510号明細書；同第7,129,333号明細書；同第7,262,040号明細書；同第7,183,082号明細書；同第7,199,222号明細書；および同第7,217,809号明細書において見出される。

20

30

40

50

【0086】

例えば、インビボ半減期の延長するために、任意選択によりMINIONポリペプチド（例えば、ポリペプチド鎖内部またはNもしくはC末端のいずれか）に導入され得る別の種類の修飾は、ペグ化または長鎖ポリエチレングリコールポリマー（PEG）の組み込みである。PEGまたはPEGの長鎖ポリマーの組み込みにより、本ポリペプチドの有効分子量が増大して、例えば、尿への迅速な濾過を防ぐ。いくつかの実施形態では、MINION配列中のリジン残基が、直接またはリンカーを介してPEGにコンジュゲートされる。このようなリンカーは、例えば、Glu残基または適切に修飾されたPEG鎖への結合のためのチオール官能基を含有するアシル残基であり得る。PEG鎖を導入するための代替の方法は、まずC末端に、または溶媒露出残基に、ArgまたはLys残基の代用などのCys残基を導入することである。このCys残基は、次に、例えば、マレイミド官能基を含有するPEG鎖に部位特異的に結合される。PEGまたはPEGの長鎖ポリマーを組み込むための方法は、当技術分野においてよく知られており（例えば、Veronesi, F. M., et al., *Drug Disc. Today* 10:1451-8 (2005); Greenwald, R. B., et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:217-50 (2003); Roberts, M. J., et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:459-76 (2002)などに記載されている）、この内容は参照により本明細書に組み込まれる。当技術分野において知られているポリマーコンジュゲーションの他の方法も、本発明において使用することができる（例えば、国際公開第2008/098930号パンフレット; Lewis, et al., *Bioconj. Chem.*, 19:2144-55 (2008); Deiters, A, et al. (2004). *Bio-org. Med. Chem. Lett.* 14, 5743-5)。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドを伴うホスホリルコリン含有ポリマーコンジュゲートを使用することができる。いくつかの実施形態では、p-アジドフェニルアラニンを、MINIONポリペプチドに組み込み、そして、還元剤および銅イオンの存在下で、アセチレン部分を有するPEGポリマーと反応させて、「ヒュスゲン[3+2]付加環化」として知られる有機反応を促進することができる。当業者は、他の生体適合性ポリマーコンジュゲートを利用することができることを容易に理解するであろう。

10

20

【0087】

いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドの変異体は、タグまたは融合ドメインなどの異種ペプチドに融合したMINIONを含み得る。融合物は、異種ペプチド（例えば、タグまたは融合ドメイン）がMINIONポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端で融合するように構築され得る。タグまたは融合ドメインの例としては、HATAG (YPYDVPDYA、配列番号32)、Myctag (EQKLISEEDL、配列番号33)、FLAGタグ (DYKDDDDK、配列番号34)、Histag (HHHHHH、配列番号35)、ETAG (GAPVPPYDPLEPR、配列番号36)、V5タグ (GKPIPNPLLLGLDST、配列番号37)、VSVタグ (YTDIEMNRLGK、配列番号38)、ポリグルタミン酸タグ (EEEEEE、配列番号39)、Avitag (GLNDIFEAQKIEWHE、配列番号40)、SBPタグ (MDEKTTGWRGGHVV EGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP、配列番号41)、Streptag (WSHPQFEK、配列番号42)、Xpressタグ (DLYDDDDK、配列番号43)、Sタグ (KETAAAKFERQHMD S、配列番号44)、Softag 1 (SLAELLNAGLGG S、配列番号45)、Softag 3 (TQDPSRVG、配列番号46)、カルモジュリンタグ (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL、配列番号47)、TCタグ (CCPGCC、配列番号48)、Isopeptag (TDKDMTITFTNKKDAE、配列番号49)、SpyTag (AHIVMVDAYKPTK、配列番号50)、Snooptag (KLGDI EFKV NK、配列番号51)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) タグ、蛍光タンパク質タグ（例えば、GFPタグ）、マルトース結合タンパク質 (MBP)

30

40

50

タグ、Haloタグ、またはチオレドキシントグが挙げられるが、これらに限定されない。

【0088】

融合ドメインまたはタグは、所望の特性を付与するように選択され得る。例えば、一部の融合ドメインは、アフィニティークロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離に特に有用である。アフィニティー精製の目的のために、グルタチオン、アミラーゼ、およびニッケルまたはコバルトコンジュゲートレジンなどのアフィニティークロマトグラフィー用の適切なマトリクスが使用される。このようなマトリクスの多くは、Pharmacia GST精製システムおよびHis6タグと用いて有用なQLAexpress（商標）システム（Qiagen）などの「キット」の形態で入手可能である。別の例として、融合ドメインは、MINIONタンパク質の検出を容易にするように選択され得る。このような検出ドメインの例としては、様々な蛍光タンパク質（例えば、GFP）、および通常、特定の抗体が利用可能である短いペプチド配列である「エピトープタグ」が挙げられる。特定のモノクローナル抗体が容易に利用可能であるよく知られるエピトープタグとしては、HAタグ、Mycタグ、FLAGタグが挙げられる。他の既知のタグとしては、上記のとおりEタグ、V5タグ、VSVタグ、ポリグルタミン酸タグ、AviTag、SBPタグ、Strepタグ、Xpressタグ、Sタグ、Softag 1、Softag 3、カルモジュリンタグ、TCタグ、Isopeptag、SpyTag、SnoopTagが挙げられる。

10

【0089】

いくつかの場合において、タグまたは融合ドメインは、適切なプロテアーゼが融合タンパク質を部分的に消化して、それにより融合タンパク質からMINIONポリペプチドを遊離させる、プロテアーゼ切断部位を有し得る。ある種の実施形態では、MINIONポリペプチドは、インビボでタンパク質を安定化するドメイン（例えば、「安定化」ドメイン）と融合され得る。「安定化させること」とは、それが、分解の低減、腎臓による除去の低減またはその他の薬物動態的效果によるか否かにかかわらず血清半減期を増大させるものを意味する。免疫グロブリンのFcドメインとの融合物は、広範囲のタンパク質に所望の薬物動態的特性を付与することが知られている。同様に、ヒト血清アルブミン（HSA）との融合物は、所望の特性を付与することができる。選択され得る他の種類の融合ドメインとしては、多量体化（例えば、二量体化、四量体化）ドメインおよび（所望の付加的な生物学的機能を付与する）機能ドメインが挙げられる。

20

30

【0090】

さらに本明細書では、融合誘導性活性、Myomakerとの相互作用などの天然のMINIONポリペプチドの生物学的機能を保持するMINIONポリペプチドの断片が提供される。例えば、本開示のいくつかの実施形態は、MINIONの融合誘導性活性に必要であることが示された「AxLyCxL」ドメイン（Shi et al., Requirement of the fusogenic micropeptide myomixer for muscle formation in zebrafish. PNAS 114, 11950 (2017)、この内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）を含有するMINIONポリペプチドの断片を提供する。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドの断片は、配列番号1のアミノ酸48~54を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドの断片は、配列番号3のアミノ酸48~54を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドの断片は、配列番号5のアミノ酸48~54を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドの断片は、配列番号7のアミノ酸72~78を含む。本開示のいくつかの実施形態は、N末端の疎水性領域（ヒトMINIONのアミノ酸5~25）、およびN末端の疎水性領域の後の最初の α -ヘリックス内の正に荷電したArg残基（その破壊により融合誘導性活性の消失がもたらされ、Myomakerとの相互作用が不安定化した）（Bi P, Ramirez-Martinez A, Li H, Cannavino J, McAnally JR, Shelton JM, Sanchez-Ortiz E, B

40

50

assel - Duby R , Olson EN : Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer . Science 356 , 323 (2017) 、 この内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる) を含有するMINIONポリペプチドの断片を提供する。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドの断片は、配列番号1のアミノ酸5 ~ 46を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドの断片は、配列番号3のアミノ酸5 ~ 46を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドの断片は、配列番号5のアミノ酸5 ~ 46を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドの断片は、配列番号7のアミノ酸29 ~ 70を含む。MINIONポリペプチドの断片は、様々な長さを有することができる。例えば、MINIONポリペプチドの断片は、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、16アミノ酸、17アミノ酸、18アミノ酸、19アミノ酸、20アミノ酸、25アミノ酸、30アミノ酸、35アミノ酸、40アミノ酸、45アミノ酸、50アミノ酸、もしくは上記の値のいずれか2つの間の範囲であるか、その近似値であるか、少なくともその値であるか、その値を超える長さを有し得る。

10

【0091】

いくつかの実施形態では、MINIONペプチド、その変異体またはその断片は、1つ以上の翻訳後修飾、例えば、脂質修飾、糖鎖修飾、リン酸化などを含んでもよい。例は、以下のとおりである。GPS (<http://gps.biocuckoo.org/>) を用いて予測されるようなハツカネズミ (*Mus musculus*) のMINIONにおけるリン酸化部位としては、セリン12、セリン15、セリン41、セリン42、セリン51、セリン58、セリン65、セリン69、およびセリン74が挙げられる。GPS - Lipid (<http://gps.biocuckoo.org/>) を用いて、ハツカネズミ (*Mus musculus*) のMINIONにおけるシステイン52のパルミトイル化が予測される。NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) を用いて、ハツカネズミ (*Mus musculus*) のMINIONにおけるセリン69とセリン74のO-グリコシル化が予測される。

20

【0092】

Myomakerポリペプチドおよび変異体

Myomaker (Tmem8cまたはTmem226としても知られる) は、胚形成および成体の筋再生中の骨格筋において特異的に発現される膜タンパク質である (Millay et al. , Nature . 2013 Jul 18 ; 499 (7458) : 301 - 5) 。 Myomaker は、インビボおよびインビトロにおいて筋芽細胞の融合を促進するのに必要であり、かつ十分であると報告されている (Millay et al . , 2013) 。 Millayらはまた、Myomakerは線維芽細胞の筋芽細胞への融合を促進できるが、線維芽細胞 - 線維芽細胞融合は促進できないことを報告した。非筋細胞において外因性のMyomakerタンパク質を発現することによって非筋細胞を筋細胞に融合する方法は、国際公開第2014/210448号パンフレットに記載されている。

30

40

【0093】

Myomakerポリペプチドは、天然に存在するMyomakerタンパク質 (例えば、表2に列記される任意のMyomakerタンパク質) の変異体であってもよい。例えば、ヒトMyomakerポリペプチドは、天然に存在するヒトMyomakerタンパク質 (例えば、配列番号16のタンパク質、またはその天然に存在するアイソフォーム) の変異体であり得る。マウスMyomakerポリペプチドは、天然に存在するマウスMyomakerタンパク質 (例えば、配列番号18もしくは配列番号20のタンパク質、またはその天然に存在する別のアイソフォーム) の変異体であり得る。表2は、ヒト、マウス、ラット、サル、ネコ、およびブタのMyomakerのアミノ酸およびヌクレオ

50

チド配列を提供する。

【0094】

Myomaker 変異体は、例えば、天然に存在する Myomaker タンパク質における1つ以上のアミノ酸残基の改変（例えば、置換、欠失、または挿入）によって、天然に存在する Myomaker タンパク質と異なり得るが、Myomaker の生物学的活性、例えば、融合誘導性活性を保持している。Myomaker 変異体は、1つ以上の保存的または非保存的アミノ酸置換を有し得る。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置換される置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。

10

【0095】

いくつかの実施形態では、Myomaker 変異体は、天然に存在する Myomaker タンパク質に対して、非必須アミノ酸の1つ以上の変異（例えば、置換（例えば、保存的置換もしくは置換）、挿入、または欠失）を含む。「非必須」アミノ酸残基は、融合誘導性活性などの生物学的活性を無効にすることなく、またはより好ましくは、実質的に変えることなく Myomaker タンパク質の野生型配列から変化され得る残基であるが、一方で、「必須」アミノ酸残基の変更は、生物学的活性の実質的な消失をもたらす。

20

【0096】

Myomaker 変異体は、天然に存在する Myomaker タンパク質に対して、少なくとも1、2、3、または4、および10、9、8、7、6、または5箇所以下の変異（例えば、置換（例えば、保存的置換もしくは非必須アミノ酸の置換）、挿入、または欠失）を有し得る。特定の置換が許容されることになるか否か、すなわち、融合誘導性活性などの生物学的特性に悪影響を与えることにならないかは、例えば、変異が保存的であるかどうかを評価すること、または活性アッセイによって予測することができる。

30

【0097】

いくつかの実施形態では、Myomaker 変異体は、天然に存在する Myomaker タンパク質に対して、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有し得る。例えば、ヒト Myomaker 変異体は、配列番号16に対して、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有し得る。マウス Myomaker 変異体は、配列番号18または配列番号20に対して、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有し得る。

40

【0098】

2つの配列間の「相同性」または「配列同一性」（本用語は、本明細書において互換的に使用される）の計算は以下のように実施され得る。最適な比較目的のために2つの配列を整列させる（例えば、最適なアラインメントのために第1および第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、非相同配列は比較目的のために無視することができる）。最適なアラインメントを、12のギャップペナルティ、4のギャップ伸長ペナルティ、および5のフレームシフトギャップペナルティを伴う Bl ossum 62 スコア行列を用いて、GC Gソフトウェアパッケージの G A P プログラムを使用した最良のスコアとして決定する。次に、対応するアミノ酸の位置またはヌクレオチドの位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列におけるある位置

50

が、第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められている場合、分子は、当該位置で同一である（本明細書で使用されるように、アミノ酸または核酸の「同一性」はアミノ酸または核酸の「相同性」と同等である）。2つの配列間のパーセント同一性は、配列により共有される同一の位置の数の関数である。

【0099】

さらに、核酸セグメントが、選択的なハイブリダイゼーション条件（例えば、極めてストリンジентなハイブリダイゼーション条件）下で鎖の相補体にハイブリダイズする場合に、実質的な同一性が存在する。核酸は、細胞全体、細胞溶解物中、または部分的に精製された形態もしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。

【0100】

いくつかの実施形態では、Myomaker変異体は、少なくとも1つの天然ではコードされないアミノ酸を含むことができる。いくつかの実施形態では、Myomaker変異体は、インビボ半減期が延長されたペグ化されたMyomakerであり得る。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドの変異体は、タグまたは融合ドメインに融合したMyomakerを含み得る。MINION変異体に関して上に記載された例示的な天然ではコードされないアミノ酸、ペグ化方法、および融合パートナーはまた、Myomaker変異体に適用可能である。

【0101】

MINIONポリペプチドをコードする核酸、発現ベクター、および細胞

本発明はまた、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）をコードする核酸、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）の発現のための発現ベクター、およびこのような発現ベクターを含有する細胞を提供する。他の態様では、本発明は、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）をコードするポリヌクレオチド、ならびにこのようなポリヌクレオチドを含む発現ベクターおよび宿主細胞を提供する。

【0102】

本明細書では、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）を発現するために使用され得る発現ベクターが提供される。用語「発現ベクター」は、所望のコード配列が、それが発現され得る細胞への導入のために挿入され得るキャリア核酸分子を指す。発現ベクターは、プラスミド、コスミド、RNA、ウイルスベクター、または人工染色体（例えば、Harrington et al., Nat Genet 15:345, 1997を参照のこと）であり得る。例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）細胞におけるポリペプチドの発現に有用な非ウイルスベクターとしては、pThioHis A、BおよびC、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、BおよびC (Invitrogen, San Diego, CA)、MPSVベクターならびに他のタンパク質を発現するための、当技術分野において知られる多数のその他のベクターが挙げられる。有用なウイルスベクターとしては、次のウイルス：アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、バルボウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、シンドビスウイルス、インフルエンザウイルス、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、ポリオウイルス、ポックスウイルス、セネカバレーウイルス、コクサッキーウイルス、エンテロウイルス、粘液腫ウイルス、またはマラバウイルスのいずれかをベースにしたウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、自律複製が可能であり得るか、または宿主DNAに組み込むことができる。

【0103】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、MINIONポリペプチドコード配列（例えば、ヒトMINIONポリペプチドコード配列）を含有する組換えDNA分子であり得る。組換え発現ベクターは通常、発現される核酸配列に作動可能に連結された1つ以上の調節配列を含む。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御

10

20

30

40

50

エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含む。調節配列は、ヌクレオチド配列の構成的な発現、ならびに組織特異的調節および/または誘導性配列を指示するものを含む。発現ベクターはまた、宿主細胞におけるメッセンジャーRNAの安定性および翻訳可能性を最適化するように設計されたエレメント、および/またはヒトMINIONポリペプチドを発現する持続的な安定的細胞クローンを確立するための薬剤選択マーカを含む。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞、所望のタンパク質発現レベルなどの選択のような要素に依存し得る。このような組換え発現ベクターを作製するための一般的な方法は、とりわけ当技術分野で知られる Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; 叢書 Ausubel et al. eds. (2007 with updated through 2010) *Current Protocols in Molecular Biology*に見出すことができる。

10

20

30

40

50

【0104】

「プロモーター」は、転写の開始および速度が制御される核酸配列の領域である制御配列である。それは、調節タンパク質および分子が、例えばRNAポリメラーゼおよび他の転写因子として結合し得る遺伝的エレメントを含有し得る。語句「作動可能に位置付けられる」、「作動可能に連結される」、「制御下」、および「転写制御下」は、プロモーターが、当該配列の転写開始および/または発現を制御するための核酸配列に対して、適切な機能的な位置および/または向きにあることを意味する。プロモーターは、核酸配列の転写活性化に関するシス作用性調節配列を指す「エンハンサー」と共に使用されてもよいし、または使用されなくてもよい。

【0105】

プロモーターは、コードセグメントおよび/またはエクソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得られ得るような、遺伝子または配列に自然に関連するものであってもよい。このようなプロモーターは、「内因性」と呼ぶことができる。同様に、エンハンサーは、当該配列の下流または上流のいずれかに位置する核酸配列に自然に関連するものであってもよい。あるいは、天然の環境において核酸配列と通常は関連しないプロモーターを指す組換えまたは異種プロモーターの制御下にコード核酸セグメントを位置付けることによって、一定の利点を得られることになる。組換えまたは異種エンハンサーはまた、その天然の環境において核酸配列と通常は関連しないエンハンサーを指す。このようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、ならびに任意の他の原核生物、ウイルス、または真核生物細胞から単離されるプロモーターまたはエンハンサー、ならびに「天然に存在」しない、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメントおよび/または発現を変化させる変異を含有するプロモーターまたはエンハンサーが含まれてもよい。プロモーターまたはエンハンサーの核酸配列を合成的に生成することに加えて、配列は、本明細書に開示される組成物と関連させて組換えクローニングおよび/またはPCR（商標）を含む核酸増幅技術を用いて生成されてもよい（米国特許第4683202号明細書、米国特許第5928906号明細書を参照のこと、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる）。さらに、ミトコンドリア、葉緑体などの非核オルガネラ内の配列の転写および/または発現を指示する制御配列も同様に使用できることが企図される。

【0106】

使用されるプロモーターは、構成的、誘導性、組織特異的、かつ/または組換え体タンパク質および/またはペプチドの大規模生産に有利であるような、導入されたDNAセグメントの高レベルの発現を導く適切な条件下で有用であり得る。いくつかの実施形態では、構成的プロモーターを使用して、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）の恒常的な発現をもたらす。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターを使用して、誘導条件下以外でのMINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）の発現を妨げる。誘導性プロモーターとしては、例えば、アラビノー

ス、lacZ、メタロチオネインプロモーター、糖質コルチコイドプロモーターまたは熱ショックプロモーターが挙げられる。加えて、他の調節エレメントもまた、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）をコードする核酸の発現を向上させるために組み込まれる場合があり、例えば、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終結配列などがある。いくつかの実施形態では、組織特異的プロモーターを使用して、特定の組織においてのみMINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）の発現をもたらす。組織特異的プロモーターまたはエレメントの性質、およびそれらの活性を特徴付けるためのアッセイは、当業者によく知られている。このような領域の例としては、ヒトLIMK2遺伝子 (Nomoto et al., 1999, Gene, 236(2): 259-271)、ソマトスタチン受容体2遺伝子 (Kraus et al., 1998, FEES Lett., 428(3): 165-170)、マウスの精巢上体レチノイン酸結合遺伝子 (Lareyre et al., 1999, J. Biol. Chem., 274(12): 8282-8290)、ヒトCD4 (Zhao-Emonet et al., 1998, Biochim. Biophys. Acta, 1442(2-3): 109-119)、マウスの(XI型)コラーゲン2 (Tsumaki, et al., 1998, J. Biol. Chem., 273(36): 22861-22864)、D1Aドーパミン受容体遺伝子 (Lee, et al., 1997, J. Auton. Nerv. Syst., 74(2-3): 86-90)、インスリン様増殖因子II (Wu et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun., 233(1): 221-226)、ヒト血小板内皮細胞接着分子-1 (Almendro et al., 1996, J. Immunol., 157(12): 5411-5421)、筋クレアチンキナーゼ(MCK)プロモーター (Wang et al., Gene Ther. 2008 Nov; 15(22): 1489-99)が挙げられる。

【0107】

特定の開始シグナルもまた、コード配列の効率的な翻訳に必要とされ得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンまたは隣接配列を含む。ATG開始コドンを含む外因性の翻訳制御シグナルが提供されることが必要であり得る。当業者は容易にこれを決定し、必要なシグナルを提供することができるであろう。開始コドンは、インサート全体の翻訳を確実にするために望ましいコード配列の読み枠と「インフレーム」でなければならないことはよく知られている。外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは天然または合成のいずれかであり得る。発現効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含めることによって増強されてもよい。

【0108】

発現には、当技術分野において知られる任意の適切な宿主細胞を利用することができ、例えば、哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母菌宿主細胞、昆虫宿主細胞などである。原核生物および真核生物の両方の発現系が広く利用可能である。いくつかの実施形態では、発現系は、CHO細胞発現系などの哺乳動物細胞発現である。いくつかの実施形態では、核酸は、所望の宿主細胞における発現を容易にするためにコドンが最適化されてもよい。発現のために選択した細胞型、オルガネラ、および生物体においてDNAセグメントの発現を効率よく導くプロモーターおよび/またはエンハンサーを使用することは重要であろう。分子生物学の当業者は通常、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサー、および細胞型の組み合わせの使用を知っており、例えば、参照により本明細書に組み込まれるSambrook et al., (2001)を参照されたい。

【0109】

大部分の転写された真核生物のRNA分子は、RNAスプライシングを受けて、一次転写物からイントロンが除去されることになる。真核生物のゲノム配列を含有するベクターは、タンパク質発現のための転写物の適切なプロセッシングを確実にするためにドナーおよび/またはアクセプタースプライシング部位を必要とし得る (Chandler et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(8): 35

96 - 601を参照のこと)。

【0110】

本開示のベクターまたはコンストラクトは通常、少なくとも1つの終結シグナルを含むことになる。「終結シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写物の特異的な終結に關与するDNA配列で構成されている。このように、ある種の態様において、RNA転写物の産生を終了させる終結シグナルが企図される。ターミネーターは、所望のメッセージレベルを達成するためにインピボにおいて必要である場合がある。真核細胞系において、ターミネーター領域はまた、ポリアデニル化部位を露出するように新しい転写物の部位特異的切断を許容する特異的DNA配列を含んでもよい。これは、一続きの約200個のA残基(ポリA)を転写物の3'末端に付加するために、特殊化された内因性のポリメラーゼにシグナルを伝える。このポリAテールによって修飾されたRNA分子は、より安定であるように見え、より効率的に翻訳される。このように、真核生物が關与する他の態様において、ターミネーターは、RNAの切断のためのシグナルを含むことが好ましく、ターミネーターシグナルは、メッセージのポリアデニル化を促進することがより好ましい。ターミネーターおよび/またはポリアデニル化部位エレメントは、メッセージレベルを増強するために、および/またはカセットから他の配列へのリードスルーを最小限にするために役立ち得る。本開示における使用が企図されるターミネーターには、例えば、ウシ成長ホルモンターミネーターなどの遺伝子の終結配列、または例えばSV40ターミネーターなどのウイルスの終結配列が含まれるがこれらに限定されない、本明細書に記載される、または当業者に知られる任意の既知の転写ターミネーターが含まれる。ある種の実施形態では、終結シグナルは、配列のトランケーションによるなど、転写可能な配列または翻訳可能な配列の欠如であってもよい。

10

20

【0111】

発現、特に真核細胞の発現においては、通常、転写物の適切なポリアデニル化をもたらすポリアデニル化シグナルが含まれることになる。ポリアデニル化シグナルの性質は、本開示の実施の成功にとって重大ではないと考えられ、かつ/または任意のそのような配列を使用してもよい。好ましい実施形態には、簡便で、かつ/または様々な標的細胞において十分に機能することが知られる、SV40ポリアデニル化シグナルおよび/またはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルが含まれる。ポリアデニル化は、転写物の安定性を増大させる可能性があり、または細胞質輸送を促進する可能性がある。

30

【0112】

宿主細胞においてベクターを増やすために、それは、複製が開始される特異的核酸配列である1つ以上の複製開始点(しばしば、「オリ」と呼ばれる)を含有してもよい。あるいは、宿主細胞が酵母である場合、自律複製配列(ARS)を使用することができる。

【0113】

本開示のある種の実施形態では、発現ベクターにマーカーを含めることによって、本開示の核酸コンストラクトを含有する細胞をインピトロまたはインピボにおいて同定してもよい。このようなマーカーは、細胞に対して同定可能な変化を付与し、発現ベクターを含有する細胞の容易な同定を可能にするであろう。一般に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するものである。陽性選択マーカーは、マーカーの存在がその選択を可能にするものであり、陰性選択マーカーはその存在がその選択を防止するものである。陽性選択マーカーの例は、薬剤耐性マーカーである。

40

【0114】

通常、薬剤選択マーカーを含めることは、形質転換体のクローニングおよび同定において役立ち、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は有用な選択マーカーである。条件の実行に基づく形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーの他に、基盤が比色分析であるGFPなどのスクリーニング可能なマーカーを含む他の種類のマーカーもまた企図される。あるいは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(tk)またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)などのスクリ

50

ーニング可能な酵素を利用してよい。当業者はまた、場合によってはFACS分析とともに免疫マーカーを使用する方法を知っていると考えられる。用いられるマーカーは、それが遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現され得る限り、重要ではないと考えられる。選択およびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例は当業者によく知られている。

【0115】

いくつかの実施形態において、本明細書では、MINIONポリペプチドまたはその変異体をコードする核酸を含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、表1のMINIONポリペプチドまたはその変異体をコードする核酸を含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含むMINIONポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列からなるMINIONポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号2、4、6、8、10、12、または14のいずれかから選択される核酸を含む発現ベクターが提供される。

10

【0116】

いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1もしくは配列番号3またはその変異体を含むポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、1~4個の変異を有する配列番号1を含むポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号1からなるポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、1~4個の変異を有する配列番号3を含むポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号1からなるポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号3からなるポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号2を含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号4を含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号2からなる核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号4からなる核酸を含む。

20

【0117】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、プロモーター、例えば、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または組織特異的プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、ポリアデニル化シグナルを含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、選択マーカーを含む。

30

【0118】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、タグと融合した配列番号1または配列番号3を含むポリペプチドをコードする核酸を含む。タグは、HAタグ(YPYDVPDYA、配列番号32)、Mycタグ(EQKLISEEDL、配列番号33)、FLAGタグ(DYKDDDDK、配列番号34)、Hisタグ(HHHHHH、配列番号35)、Eタグ(GAPVYPDPLEPR、配列番号36)、V5タグ(GKPIPNPLLLGLDST、配列番号37)、VSVタグ(YTDIEMNRLGK、配列番号38)、ポリグルタミン酸タグ(EEEEE、配列番号39)、AviTag(GLNDIFEAQKIEWHE、配列番号40)、SBPタグ(MDEKTTGWRGGHVV EGLA GELEQLRARLEHHPQGQREP、配列番号41)、Streptag(WSH PQFEK、配列番号42)、Xpressタグ(DLYDDDDK、配列番号43)、Sタグ(KETAAAKFERQHMD S、配列番号44)、Softag 1(SLA ELLNAGLGG S、配列番号45)、Softag 3(TQDPSRVG、配列番号46)、カルモジュリンタグ(KRRWKKNFIAVSAANRFKKISS SGA L、配列番号47)、TCタグ(CCPGCC、配列番号48)、Isopeptag(TDKDMTITFTNKKDAE、配列番号49)、SpyTag(AHIVMVDA

40

50

Y K P T K、配列番号50)、SnooP Tag (K L G D I E F I K V N K、配列番号51)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)タグ、蛍光タンパク質タグ(例えば、GFPタグ)、マルトース結合タンパク質(MBP)タグ、Halotag、またはチオレドキシントグから選択され得る。

【0119】

いくつかの実施形態では、発現ベクターはさらに、Myomakerポリペプチドまたはその変異体をコードする第2の核酸を含む。したがって、本明細書では、MINIONポリペプチドおよびMyomakerポリペプチドの両方を発現するための発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、表2のMyomakerポリペプチドまたはその変異体をコードする第2の核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする第2の核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする第2の核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号17、19、21、23、25、27、29、もしくは31、またはその変異体のいずれかから選択される第2の核酸を含む。

10

【0120】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号16を含むポリペプチドをコードする第2の核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号16からなるポリペプチドをコードする第2の核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号17を含む第2の核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号17からなる第2の核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターはさらに、第2の核酸の上流に第2のプロモーターを含む。第2のプロモーターは、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または組織特異的プロモーターであり得る。

20

【0121】

いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドおよびMyomakerポリペプチドの両方を発現するための発現ベクターは、Myomakerコード配列の上流に配列内リボソーム進入部位(IRES)を含む。IRESエレメントは、5'メチル化Cap依存的翻訳のリボソームスキニングモデルをバイパスし、内部部位での翻訳を開始することができる(Pelletier and Sonenberg, 1988, Nature, 334:320-325)。ピコルナウイルスファミリーのうちの2つのメンバー(ポリオおよび脳心筋炎)由来のIRESエレメント(Pelletier and Sonenberg, 1988)、および哺乳動物メッセージ由来のIRES(Macejak and Sarnow, 1991, Nature, 353:90-94, 1991)が記載されている。IRESエレメントは、異種オープンリーディングフレームに連結させることができる。それぞれIRESによって離れている多数のオープンリーディングフレームをともに転写して、ポリシストロニックメッセージを産生することができる。IRESエレメントによって、それぞれのオープンリーディングフレームは、効率的な翻訳のためにリボソームに接近することができる。1つのメッセージを転写するための1つのプロモーター/エンハンサーを用いて、多数の遺伝子を効率よく発現させることができる(参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5925565号明細書および第5935819号明細書を参照されたい)。

30

40

【0122】

いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドおよびMyomakerポリペプチドの両方を発現するための発現ベクターは、Myomakerコード配列の上流に2A配列を含む。2Aオリゴペプチド配列は、プラス鎖RNAピコルナウイルス口蹄疫ウイルス(FMDV)から最初に特徴付けられ;かつFMDV 2AまたはF2Aが、FMDVポリタンパク質の上流(キャプシドタンパク質)ドメインと下流(RNA複製タンパク質)ドメインの間で翻訳共役的「切断」を媒介することが示された(Ryan MD, EM

50

BO J 1994 ; 134 : 928 - 933 ; Ryan MD , J Gen Virol 1991 ; 72 : 2727 - 2732 ; Donnelly MLL , J Gen Virol 1997 ; 78 : 13 - 21 ; Donnelly MLL , J Gen Virol 2001 ; 82 : 1013 - 1025) 。 活性の2A配列は、他の属のピコルナウイルス由来のウイルスのゲノムにおいて特徴付けられ、さらに「2A様」配列が、様々な異なるRNAウイルスおよび非LTRレトロトランスポゾンのゲノム内で見出された (Donnelly MLL , J Gen Virol 2001 ; 82 : 1027 - 1041 ; Heras SR , Cell Mol Life Sci 2006 ; 63 : 1449 - 1460 ; Luke GA , J Gen Virol 2008 ; 89 : 1036 - 1042 ; Odon V , Mol Biol Evol 2013 ; 30 : 1955 - 1965 ; Luke GA , Mob Gen Elements 2014 ; 3 : e27525) 。 これらの2Aまたは「2A様」オリゴペプチド配列は、「リボソームスキッピング」、「ストップ・キャリーオン (stop carry - on) 」または「ストップ・ゴー (stop - go) 」翻訳と呼ばれる翻訳「リコーディング」イベントを媒介することが示された (Atkins JF , RNA 2007 ; 13 : 1 - 8) 。

【0123】

本明細書で使用される場合、「2A配列」は、2つのタンパク質間のリンカーとして機能する2Aまたは「2A様」オリゴペプチドをコードする任意の核酸配列を指し、ポリタンパク質の自律的リボソーム内自己プロセッシングを可能にする (例えば、de Felipe . Genetic Vaccines and Ther . 2 : 13 (2004) ; de Felipe et al . Traffic 5 : 616 - 626 (2004) を参照のこと) 。 これらのオリゴペプチドにより、単一ベクターからの複数のタンパク質の共発現が可能になる。多くの2Aエレメントが、当技術分野において知られている。例えば、ウイルスの2A配列は、全てが参照として本明細書に組み込まれる米国特許第9175311号明細書、同第8865881号明細書、同第7939059号明細書、同第7947493号明細書において記載されている。例えば、ウイルスの2A配列は、ピコルナウイルス、テトラウイルスの2A配列、またはこれらの組み合わせであり得る。ピコルナウイルスの2A配列は、エンテロウイルスの2A配列、ライノウイルスの2A配列、カルジオウイルスの2A配列、アフトウイルスの2A配列、ヘパトウイルスの2A配列、エルボウイルスの2A配列、コブウイルスの2A配列、テッショウウイルスの2A配列、およびパレコウイルスの2A配列のいずれか1つから選択され得る。テトラウイルスの2A配列は、ベータテトラウイルスの2A配列またはオメガテトラウイルスの2A配列のいずれかから選択され得る。本明細書に開示される方法およびシステムにおいて使用することができる2A配列の例としては、口蹄疫ウイルス (F2A) 、ウマ鼻炎ウイルスA型 (E2A) 、 Thosea asignaウイルス (T2A) 、およびブタのテッショウウイルス - 1 (P2A) からの2A配列が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、2A配列は、T2A (EGRGSLLTCTGDVEENPGP (配列番号 : 52)) もしくはGSGEGRGSLLTCTGDVEENPGP (配列番号 : 53)) 、 P2A (ATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番号 : 54)) もしくはGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番号 : 55)) 、 E2A (QCTNYALLKLAGDVESNPGP (配列番号 : 56)) もしくはGSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (配列番号 : 57)) 、 またはF2A (VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 : 58)) もしくはGSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 : 59)) から選択されるウイルスの2Aオリゴペプチドをコードする。

【0124】

非ウイルスの2A配列は、本明細書に参照により組み込まれる米国特許第8945876号明細書に記載されている。例えば、非ウイルスの2A配列は、ウニ (ムラサキウニ (Strongylocentrotus purpuratus)) の2A配列 (DGF C I L Y L L L I L L M R S G D V E T N P G P) (配列番号60) ; 海綿 (Amph i

medon queenslandica) の 2A 配列 (LLCFM L L L L S G D V E L N P G P (配列番号 61) もしくは H H F M F L L L L L A G D I E L N P G P (配列番号 62)) ; ギボシムシ (Saccoglossus kowalevskii) の 2A 配列 (W F L V L L S F I L S G D I E V N P G P (配列番号 63)) ; またはナメクジウオ (Branchiostoma floridae) の 2A 配列 (K N C A M Y M L L L S G D V E T N P G P (配列番号 64) もしくは M V I S Q L M L K L A G D V E E N P G P (配列番号 65)) であり得る。いくつかの実施形態では、2A 配列は、2A コンセンサス配列 D - X - E - X - N P G P (配列番号 66) (X は任意のアミノ酸残基) を含む天然に存在するか、または合成の配列である。

【0125】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号 52 ~ 66 のいずれか 1 つから選択される 2A オリゴペプチドをコードする 2A 配列を含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、ヒト M I N I O N ポリペプチドをコードする核酸はまた、ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように分泌シグナル配列をコードする配列を含んでもよい。このような配列は、ベクターによって、またはベクター中に存在する M I N I O N 核酸の一部としてもたらされ得る。

【0127】

発現ベクターの作製には、ベクターを消化するために標準的な組換え技術とともにいずれかを用いることができる多数の制限酵素部位を含有する核酸領域であるマルチクロニングサイト (M C S) を含むベクターを利用することができる。参照により本明細書に組み込まれる Carbonelli et al., 1999、Levenson et al., 1998、および Cocea, 1997 を参照されたい。「制限酵素消化」は、核酸分子中の特定の部位でのみ機能する酵素による核酸分子の触媒的切断を指す。これらの制限酵素の多くは市販されている。このような酵素の使用は、当業者に広く理解されている。多くの場合、ベクターは、外因性配列をベクターにライゲートすることが可能な M C S 内で切断する制限酵素を用いて線状化または断片化される。「ライゲーション」は、互いに隣接しても、隣接していなくてもよい 2 つの核酸断片間のホスホジエステル結合を形成するプロセスを指す。制限酵素およびライゲーション反応を含む手法は、組換え技術の当業者によく知られている。

【0128】

目的のポリヌクレオチド配列を含有する発現ベクターを導入するための方法は、細胞宿主の種類に応じて変わる。例えば、塩化カルシウムによるトランスフェクションは、一般的に原核生物の細胞に対して利用される一方で、その他の細胞宿主に対してはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用され得る (一般に、前出の Sambrook et al. を参照のこと)。その他の方法としては、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム処理、リポソーム媒介性形質転換、注入および微量注入、遺伝子銃法、ピロソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン：核酸コンジュゲート、ネイキッド DNA、人工ウイルス粒子、ヘルペスウイルス構造タンパク質 VP22 への融合、薬剤による DNA の取り込みの増強ならびにエクスピボ形質導入が挙げられる。組換えタンパク質の長期にわたる高収率生産のためには、安定的な発現が所望されることが多い。例えば、本発明のポリペプチドを安定的に発現させる細胞株は、ウイルスの複製開始点または内因性発現エレメント、および選択マーカー遺伝子を含有する本発明の発現ベクターを使用して作製することができる。

【0129】

また、本明細書では、本明細書に記載の発現ベクターのいずれかを含む細胞が提供される。いくつかの実施形態では、このような細胞は、M I N I O N ポリペプチド (例えば、ヒト M I N I O N ポリペプチド) を発現するための発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、このような細胞は、M I N I O N ポリペプチド (例えば、ヒト M I N I O N ポリペプチド) および M y o m a k e r ポリペプチド (例えば、ヒト M y o m a k e r ポリ

10

20

30

40

50

ペプチド)の両方を発現するための発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、このような細胞は、MINIONポリペプチド(例えば、ヒトMINIONポリペプチド)を発現するための発現ベクター、およびMyomakerポリペプチド(例えば、ヒトMyomakerポリペプチド)を発現するための第2の発現ベクターを含む。このような細胞は、宿主細胞または治療用細胞であり得る。

【0130】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の核酸分子を含む宿主細胞を特徴とする。宿主細胞を使用して、本明細書に記載のヒトMINIONポリペプチドを産生または発現することができる。用語「宿主細胞」および「組換え体宿主細胞」は、本明細書において互換的に使用され、これらは、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫または潜在的な子孫も指す。一定の改変が変異または環境的影響のいずれかに起因して後続世代において生じ得るため、そのような子孫は、事実上、親細胞と同一であり得ないが、依然として本明細書において使用される用語の範囲内に含まれる。宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞であり得る。例えば、タンパク質は、細菌細胞(大腸菌(E. coli)など)、昆虫細胞、酵母細胞、または哺乳動物細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)もしくはCOS細胞、例えば、COS-7細胞、CV-1 origin SV40細胞など; Gluzman(1981) Cell 23:175-182)において発現され得る。他の好適な宿主細胞は、当業者に知られている。

10

【0131】

宿主細胞を使用して、本明細書に記載のヒトMINIONポリペプチドを産生または発現することができる。したがって、本開示はまた、宿主細胞を用いてヒトMINIONポリペプチドを産生するための方法の特徴とする。一実施形態では、方法は、ヒトMINIONポリペプチドが産生されるように、好適な培地中で宿主細胞(内部にタンパク質を発現する組換え発現ベクターが導入されている)を培養する工程を含む。別の実施形態では、方法はさらに、培地または宿主細胞からヒトMINIONポリペプチドを単離する工程を含む。

20

【0132】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の核酸分子を含む治療用細胞を特徴とする。本明細書で使用する場合、用語「治療用細胞」は、機能障害性細胞または腫瘍細胞に融合可能なポリペプチド、例えば、MINIONポリペプチド、例えば、ヒトMINIONポリペプチドを発現するように遺伝子改変された細胞を指す。このような治療用細胞は、ヒト細胞、例えば、筋芽細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、もしくは平滑筋細胞などのヒト筋細胞; または線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、樹状細胞、もしくは腫瘍細胞などのヒト非筋細胞であり得る。いくつかの実施形態では、治療用細胞は、本明細書に開示されるMINIONポリペプチド、その変異体または断片を発現する発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、治療用細胞は、本明細書に開示されるMyomakerポリペプチド、その変異体または断片を発現する発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、このような治療用細胞は、検出可能なマーカー、例えば、蛍光分子(例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など)、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)、発光分子(例えば、ルシフェラーゼ)、放射性分子(例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、もしくは ^{32}P)、またはコロイド金もしくは着色ビーズなどの熱量測定ラベルを発現する。検出可能なマーカーを発現する細胞は、顕微鏡法、オートラジオグラフィ、および/または当技術分野で知られる他の画像化方法などの適切な検出方法によって追跡または可視化され得る。

30

40

【0133】

いくつかの実施形態では、治療用細胞は、機能障害性細胞に融合することによって機能障害性細胞の機能を回復させることができる場合がある。本明細書で使用する場合、「機能障害性細胞」は、その正常な機能を、例えば、遺伝的異常、例えば、遺伝的変異のために部分的にまたは完全に失った細胞を指す。機能障害性細胞の非限定的な例としては、デ

50

ユシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）およびベッカー型筋ジストロフィー（BMD）の根底にある原因である細胞死を引き起こすジストロフィン遺伝子における変異を有する筋細胞；三好ミオパチー（MM）、肢帯型筋ジストロフィー2B型（LGMD2B）、および遠位型ミオパチー（DM）を引き起こすジスフェリン遺伝子における変異を有する筋細胞、遺伝性高チロシン血症I型を引き起こすフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ（Fah）をコードする遺伝子における変異を有する細胞などが挙げられる。

【0134】

いくつかの実施形態では、治療用細胞は、目的の遺伝子、例えば、機能障害性細胞において変異した遺伝子の正常なバージョンを、機能障害性細胞に導入し、それにより、機能障害性細胞における遺伝的異常を矯正することによって、機能障害性細胞の機能を回復させる場合がある。例えば、治療用細胞は、ジストロフィン遺伝子の正常なバージョン、Fahをコードする遺伝子の正常なバージョンなどを含有し得る。治療用細胞は、自己または同種であり得る。治療用細胞が自己である実施形態では、治療用細胞の遺伝的異常は、当技術分野で知られる様々な遺伝子編集システムによって矯正され得る。本明細書で使用する場合、用語「遺伝子編集システム」は、1つ以上のDNA結合ドメインもしくは成分および1つ以上のDNA改変ドメインもしくは成分、または単離核酸、例えば、前記DNA結合およびDNA改変ドメインもしくは成分をコードする1つ以上のベクターを含むシステムを指す。遺伝子編集システムは、標的遺伝子の核酸を改変するため、および/または標的遺伝子の発現を調節するために使用される。既知の遺伝子編集システムにおいて、例えば、1つ以上のDNA結合ドメインまたは成分は、1つ以上のDNA改変ドメインまたは成分と関連付けられており、その結果、1つ以上のDNA結合ドメインが、1つ以上のDNA改変ドメインまたは成分を特定の核酸部位に標的化する。

10

20

【0135】

遺伝子編集システムは当技術分野で知られており、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）；規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列（CRISPR）/Casシステム、およびメガヌクレアーゼシステムを含むが、これらに限定されない。理論に束縛されるものではないが、既知の遺伝子編集システムは、治療的適用においてそれらの有用性にとって有害な望まれないDNA改変活性を示す場合があると考えられる。これらの懸念は、例えば、細胞をレンチウイルスまたはアデノウイルスベクタートランスフェクションを介するなどして遺伝子操作して、遺伝子編集システムの成分を構成的に発現する場合など、遺伝子または遺伝子発現のインビボ改変のための遺伝子編集システムの使用において特に明白である。

30

【0136】

本明細書で使用する場合、「CRISPR」は、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列のセット、またはこのような反復配列のセットを含むシステムを指す。本明細書で使用する場合、「Cas」は、CRISPRに関連付けられたタンパク質を指す。多様なCRISPR-Casシステムを、それらのエフェクターモジュールの構成に従って2つのクラスに分けることができる：クラス1 CRISPRシステムは、いくつかのCasタンパク質およびcrRNAを利用して、エフェクター複合体を形成する一方で、クラス2 CRISPRシステムは、干渉を媒介するcrRNAと組合わせた大きな単一成分のCasタンパク質を使用する。クラス2 CRISPR-Casシステムの一例は、Cpf1（プレボテラ（Prevotella）およびフランシセラ（Francisella）由来のCRISPR）を使用する。例えば、その内容が全体として参照により本明細書に組み込まれるZetsche et al., Cell 163: 759-771 (2015)を参照されたい。本明細書で使用する場合、用語「Cpf1」は全てのオルソログ、およびCRISPRシステムにおいて使用できる変異体を含む。

40

【0137】

治療用細胞は、機能障害性細胞または腫瘍細胞と同じまたは異なる細胞型であり得ると考えられる。例えば、機能障害性細胞が筋細胞である実施形態において、治療用細胞は、筋芽細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、もしくは平滑筋細胞などの筋細胞；または線維芽細胞

50

、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、樹状細胞などの非筋細胞などであり得る。

【0138】

MINIONに結合する抗体

本明細書では、MINIONタンパク質、例えば、表1のMINIONタンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含むMINIONタンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15のいずれかから選択されるアミノ酸配列からなるMINIONタンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が提供される。

10

【0139】

いくつかの実施形態において、本明細書では、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1もしくは3、またはその変異体を含むタンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号1のヒトMINIONタンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態において、本明細書では、配列番号3のヒトMINIONタンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が提供される。

【0140】

MINIONタンパク質（例えば、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1または3のタンパク質）に特異的に結合する抗体は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体であり得る。いくつかの実施形態では、MINIONタンパク質（例えば、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1または3のタンパク質）に特異的に結合する抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、MINIONタンパク質（例えば、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1または3のタンパク質）に特異的に結合する抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。

20

【0141】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、全長抗体の重鎖配列および全長抗体の軽鎖配列を有する。天然に存在する抗体は通常、ジスルフィド結合により相互連結された少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を含む。各重鎖は重鎖可変領域（本明細書中でVHと略記される）および重鎖定常領域で構成されている。重鎖定常領域は、CH1、CH2およびCH3という3つのドメインで構成されている。各軽鎖は軽鎖可変領域（本明細書中でVLと略記される）および軽鎖定常領域で構成されている。軽鎖定常領域はCLという1つのドメインで構成されている。VHおよびVL領域は、フレームワーク領域（FR）と称される、より保存されている領域が挿入された、相補性決定領域（CDR）と称される超可変領域にさらに細分することができる。VHおよびVLはそれぞれ、次の順でアミノ末端からカルボキシ末端に整列した、3つのCDRおよび4つのFRから構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの宿主組織への結合、または免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）および古典的補体系の第1成分を含む因子への結合を媒介し得る。

30

40

【0142】

抗体は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、またはキメラ抗体であり得る。抗体は、任意のアイソタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスであり得る。

【0143】

軽鎖および重鎖は両方ともに、構造的および機能的相同性の領域に分けられる。用語「定常」および「可変」は、機能的に使用される。この点に関し、軽鎖（VL）および重鎖

50

(VH)部分の両方の可変ドメインが抗原認識および特異性を決定することが理解される。逆に、軽鎖(CL)および重鎖(CH1、CH2またはCH3)の定常ドメインは、分泌、経胎盤移行性、Fc受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。慣例により、定常領域ドメインの番号付けは、それらが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端からより遠く離れるにつれて大きくなる。N末端は可変領域であり、C末端は定常領域である；CH3およびCLドメインは、それぞれ重鎖および軽鎖のカルボキシ末端を実際に含む。特に、用語「抗体」は、具体的にはIgG-scFv形態を含む。

【0144】

用語「抗原結合断片」は、標的エピトープ、例えば、MINIONエピトープの結合部位と(例えば、結合、立体障害、安定化/不安定化、空間分布によって)特異的に相互作用する結合分子(例えば、抗体またはその抗原結合断片もしくは誘導体)の部分を目指す。抗体断片の例としては、scFv、Fab断片、VLドメイン、VHドメイン、CLドメイン、およびCH1ドメインからなる一価断片；ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab)2断片；VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片；抗体の単一のアームのVLドメインおよびVHドメインからなるFv断片；VHドメインからなるdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546)；ならびに単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0145】

用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合可能なタンパク質決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖などの、分子の化学的に活性な表面群からなり、かつ通常、特定の三次元構造特性および特定の電荷特性を有する。立体構造的なエピトープおよび非立体構造的なエピトープは、後者ではなく前者への結合が変性溶媒の存在下において失われるという点で区別される。

20

【0146】

さらに、Fv断片の2つのドメインのVLおよびVHは別々の遺伝子でコードされるが、それらにVLおよびVH領域が一価分子(一本鎖Fv(scFv))として知られる；例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423-426；およびHouston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883を参照のこと)を形成するように対をなす単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって、組換え法を用いて連結され得る。

30

【0147】

このような一本鎖抗体はまた、用語「断片」、「エピトープ結合断片」または「抗体断片」の範囲内に包含されるものとする。これらの断片は、当業者に知られている従来の技術を使用して得られ、断片は、完全抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。

【0148】

抗体断片は、相補的な軽鎖ポリペプチドとともに抗原結合領域の対を形成するタンデムFvセグメント(VH-CH1-VH-CH1)の対を含む一本鎖分子に組み込むことができ(Zapata et al., (1995) Protein Eng. 8(10): 1057-1062；および米国特許第5,641,870号明細書)、また、抗体断片は、Fab断片、F(ab')断片および抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む)、ならびに上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片を含むことができる。

40

【0149】

抗原結合断片はまた、当技術分野で知られるとおり、単一ドメイン抗体、マキシボディ(maxibody)、ユニボディ(unibody)、ミニボディ(minibody)、トリアボディ(triabody)、テトラボディ(tetrabody)、v-NARおよびビス-scFv(例えば、Hollinger and Hudson, (2

50

005) Nature Biotechnology 23:1126-1136を参照のこと)、二重特異性一本鎖ダイアボディ、または2つの異なるエピトープに結合するように設計された一本鎖ダイアボディを含む。抗原結合断片はまた、抗体様分子または抗体模倣体を含み、これらは、本発明の範囲内である、エピトープに特異的に結合するミニボディ(minibody)、マキシボディ(maxybody)、Fn3系タンパク質足場、アンキリンリピート(DARPinとしても知られる)、VASPポリペプチド、トリ隣臓ポリペプチド(aPP)、テトラネクチン、アフィリリン(Affililin)、ノッチン、SH3ドメイン、PDZドメイン、テンダミスタット、ネオカルチノスタチン、プロテインAドメイン、リポカリン、トランスフェリン、およびクニツドメインを含むが、これらに限定されない。抗体断片は、III型フィブロネクチン(Fn3)などのポリペプチドに基づく足場に移植することができる(フィブロネクチンポリペプチドモノボディについて記載する米国特許第6,703,199号明細書を参照のこと)。

10

【0150】

単離抗体は、一価抗体、二価抗体、多価抗体、二価抗体、バイパラトピック抗体、二重特異性抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、組換えヒト抗体、または任意の他の種類の抗体もしくはそのエピトープ結合断片もしくは誘導體であり得る。

【0151】

本明細書で使用する場合、語句「単離抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す(例えば、MINIONタンパク質(例えば、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1または3のタンパク質)に特異的に結合する単離抗体は、MINIONタンパク質(例えば、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1または3のタンパク質)以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない。しかし、標的分子に特異的に結合する単離抗体は、他の種由来の同じ抗原に対して交差反応性を有し得る。例えば、MINIONタンパク質(例えば、ヒトMINIONタンパク質、例えば配列番号1または3)に特異的に結合する単離抗体は、他の種由来のMINION分子に結合する場合がある。さらに、単離抗体は、他の細胞物質および/または化学物質を実質的に含まない場合がある。

20

【0152】

本明細書で使用する場合、用語「一価抗体」は、標的分子上の単一のエピトープに結合する抗体を指す。

30

【0153】

本明細書で使用する場合、用語「二価抗体」は、少なくとも2つの同一の標的分子上の2つのエピトープに結合する抗体を指す。二価抗体はまた、標的分子を互いに架橋し得る。「二価抗体」はまた、少なくとも2つの同一の標的分子上の2つの異なるエピトープに結合する抗体を指す。

【0154】

用語「多価抗体」は、2以上の価数を有する単一の結合分子を指し、「価数」は、抗体コンストラクト1分子当たり存在する抗原結合部分の数として説明される。そのため、単一の結合分子が、標的分子上の2つ以上の結合部位に結合することができる。多価抗体の例としては、二価抗体、三価抗体、四価抗体、五価抗体など、および二重特異性抗体およびバイパラトピック抗体が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、MINIONタンパク質(例えば、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1または3のタンパク質)については、多価抗体は、MINIONタンパク質(例えば、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1または3のタンパク質)の2つのドメインに対する結合部分をそれぞれ有する。

40

【0155】

用語「多価抗体」はまた、2つの別個の標的分子に対して2つ以上の抗原結合部分を有する単一の結合分子を指す。例えば、MINIONタンパク質(例えば、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1または3のタンパク質)およびMINIONではない第2の標的分子に結合する抗体がある。一実施形態では、多価抗体は、4つのエピトープ

50

結合ドメインを有する四価抗体である。四価分子は、当該標的分子上の各結合部位に対して二重特異性であり、かつ二価であり得る。

【0156】

本明細書で使用する場合、用語「バイパラトピック抗体」は、単一の標的分子上の2つの異なるエピトープに結合する抗体を指す。本用語はまた、少なくとも2つの標的分子の2つのドメインに結合する抗体、例えば、四価のバイパラトピック抗体を含む。

【0157】

本明細書で使用する場合、用語「二重特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる標的（例えば、MINIONおよびMINIONではない標的）上の2つ以上の異なるエピトープに結合する抗体を指す。

10

【0158】

本明細書で使用する場合、語句「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、実質的に同一なアミノ酸配列を有するか、または同じ遺伝源に由来する抗体、二重特異性抗体などを含むポリペプチドを指す。本用語はまた、単一分子組成物の抗体分子の製剤を含む。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。

【0159】

本明細書で使用する場合、語句「ヒト抗体」は、フレームワーク領域およびCDR領域の両方がヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体を含む。さらに、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域もまた、このようなヒト配列、例えばヒト生殖細胞系列の配列もしくはヒト生殖細胞系列の配列の変異型、または例えばKnappik, et al. (2000, J Mol Biol 296, 57-86)において記載されるヒトフレームワーク配列分析から導出されたコンセンサスフレームワーク配列を含有する抗体に由来する。免疫グロブリン可変ドメイン、例えば、CDRの構造および位置は、よく知られたナンバリングスキーム、例えば、Kabatsナンバリングスキーム、Chothiaナンバリングスキーム、またはKabatsおよびChothiaの組合わせを使用して定義してもよい（例えば、Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al.; Al Lazikani et al., (1997) J. Mol. Bio 273:927-948を参照のこと）；Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; およびAl-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948。

20

30

【0160】

本発明のヒト抗体は、ヒト配列によりコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的な変異誘発、もしくはインビボでの体細胞変異により導入される変異、または安定性もしくは製造を促進するための保存的置換）を含んでもよい。しかし、本明細書で使用する場合、用語「ヒト抗体」は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上に移植された抗体を含むように意図されていない。

40

【0161】

本明細書で使用する場合、語句「組換えヒト抗体」は、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてのトランスジェニックもしくは染色体を移入した動物（例えば、マウス）から単離される抗体またはそれから調製されるハイブリドーマから単離される抗体、ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えばトランスフェクターマから単離される抗

50

体、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離される抗体、およびヒト免疫グロブリン遺伝子の全てまたは一部の配列を他のDNA配列にスプライスすることを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製、または単離される抗体など、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離される全てのヒト抗体を含む。そのような組換えヒト抗体は、フレームワーク領域およびCDR領域がヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、ある種の実施形態では、そのような組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（またはヒトIg配列についてトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボ体細胞変異誘発）にかけることができ、したがって、組換え抗体のVH領域およびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列VH配列およびVL配列に由来し、それらと関係するが、インビボにおいてヒト抗体生殖細胞系列レパートリー内に天然に存在しない場合がある配列である。

10

【0162】

本明細書において使用される場合、用語「Fc領域」は、CH3、CH2、および抗体の定常ドメインにおけるヒンジ領域の少なくとも一部分を含むポリペプチドを指す。任意選択により、Fc領域は、一部の抗体クラスに存在するCH4ドメインを含んでもよい。Fc領域は、抗体の定常ドメインのヒンジ領域全体を含んでもよい。一実施形態では、本発明は、抗体のFc領域およびCH1領域を含む。一実施形態では、本発明は、抗体のFc領域CH3領域を含む。別の実施形態では、本発明は、Fc領域、CH1領域、および抗体の定常領域由来のカッパ/ラムダ領域を含む。一実施形態では、本発明の結合分子は、定常領域、例えば、重鎖定常領域を含む。一実施形態では、このような定常領域は、野生型定常領域と比較して修飾されている。すなわち、本明細書で開示される本発明のポリペプチドは、3つの重鎖定常ドメイン(CH1、CH2、もしくはCH3)および/または軽鎖定常領域ドメイン(CL)のうち1つ以上に改変または修飾を含み得る。修飾の例としては、1つ以上のドメインにおける1つ以上のアミノ酸の、付加、欠失、または置換が挙げられる。このような変化は、エフェクター機能、半減期などを最適化するように含まれ得る。

20

【0163】

本明細書で使用する場合、用語「結合部位」は、抗体または抗原結合断片が選択的に結合する標的分子上の領域を含む。

【0164】

本明細書で使用する場合、用語「エピトープ」は、免疫グロブリンに高い親和性を有して結合可能な任意の決定基を指す。エピトープは、当該抗原を特異的に標的化する抗体によって結合される抗原の領域であり、抗原がタンパク質である場合、抗体が直接接触する特定のアミノ酸を含む。ほとんどの場合、エピトープはタンパク質上に存在するが、一部の例において、核酸などの他の種類の分子上に存在することがある。エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基またはスルホニル基などの分子の化学的に活性な表面基を含み得、かつ特定の三次元構造特性および/または特定の電荷特性を有し得る。

30

【0165】

一般に、特定の標的抗原に特異的な抗体は、タンパク質および/または高分子の複雑な混合物中で標的抗原上のエピトープに結合することになる。

40

【0166】

本明細書で使用する場合、用語「親和性」は、単一の抗原性部位における抗体と抗原との間の相互作用の強度を指す。各抗原性部位内では、抗体「アーム」の可変領域が、多数の部位において、弱い非共有結合性の力を介して抗原と相互作用し、相互作用が大きいほど、親和性は強くなる。本明細書で使用する場合、IgG抗体またはその断片（例えば、Fab断片）についての用語「高親和性」は、標的抗原に関して 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、 10^{-10} M、 10^{-11} M以下、 10^{-12} M以下、または 10^{-13} M以下のロックダウンを有する抗体を指す。しかし、高親和性結合は他の抗体アイソタイプに応じて変化し得る。例えば、IgMアイソタイプに対する高親和性結合は、 10^{-7} M以下、または 10^{-8} M以下のロックダウンを有する抗体を指す。

50

【0167】

本明細書で使用する場合、用語「アビディティー」は、抗体-抗原複合体の全体の安定性または強度の参考になる指標を指す。それは、3つの主要な要因：抗体エピトープ親和性；抗原と抗体の両方の価数；および相互作用部分の構造的配置によって制御される。最終的に、これらの要因が抗体の特異性、すなわち、特定の抗体が的確な抗原エピトープに結合している可能性を定義する。

【0168】

エピトープを含む所与のポリペプチドの領域は、当技術分野でよく知られる任意の数のエピトープマッピング技術を用いて同定することができる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N. J.を参照されたい。例えば、線状エピトープは、例えばタンパク質分子の部分に相当する多数のペプチドを固体支持体上で同時に合成し、そのペプチドが支持体に付着している間にペプチドを抗体と反応させることによって決定され得る。このような手法は当技術分野で知られており、例えば、米国特許第4,708,871号明細書；Geysen et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002；Geysen et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:78-182；Geysen et al., (1986) Mol. Immunol. 23:709-715に記載されている。同様に、立体構造的エピトープは、例えば、X線結晶解析および二次元核磁気共鳴によってアミノ酸の空間的高次構造を決定することにより、容易に同定される。例えば、前出のEpitope Mapping Protocolsを参照されたい。タンパク質の抗原性領域も、標準的な抗原性およびヒドロパシープロット、例えばOxford Molecular Groupから入手可能なOmega version 1.0ソフトウェアプログラムを使用して計算されるプロットを用いて同定することができる。このコンピュータプログラムは、抗原性プロファイルの決定のためにHopp/Woods法(Hopp et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828)を採用し；ヒドロパシープロットのためにKyte-Doolittle法(Kyte et al., (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132)を採用している。

【0169】

モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体(mAb)は、従来のモノクローナル抗体の方法論、例えば、KohlerおよびMilstein, 1975 Nature 256:495の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む種々の手法により作製可能である。例えば、Bリンパ球のウイルス性形質転換または癌発生の形質転換など、モノクローナル抗体を作製するための多くの手法を採用することができる。

【0170】

ハイブリドーマを調製するための動物系はマウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ作製は、十分に確立された方法である。融合のために免疫された脾細胞を単離するための免疫プロトコルおよび手法は当技術分野で知られている。融合パートナー(例えば、マウス骨髄腫細胞)および融合方法についても知られている。

【0171】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体はヒト化モノクローナル抗体である。本発明のキメラ抗体またはヒト化抗体およびその抗原結合断片は、上記のように作製されるマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて作製され得る。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、目的のマウスハイブリドーマから得られ、標準的な分子生物学的手法を用いて非マウス(例えばヒト)免疫グロブリン配列を含有するように遺伝子操作され得る。例えば、キメラ抗体を作製するために、マウス可変領域を当技術分野で知られる方法を用いてヒト定常領域に連結することができる(例えば、Cabillyらに交付された

米国特許第4,816,567号明細書を参照のこと)。ヒト化抗体を作製するために、当技術分野で知られる方法を使用して、マウスCDR領域を、ヒトフレームワークへと挿入することができる。例えば、Winterによる米国特許第5,225,539号明細書；ならびにQueenらによる米国特許第5,530,101号明細書；同第5,585,089号明細書；同第5,693,762号明細書；および同第6,180,370号明細書を参照されたい。

【0172】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体はヒトモノクローナル抗体である。MINIONタンパク質（例えば、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1または3のタンパク質）に対するこのようなヒトモノクローナル抗体は、マウス系の代わりにヒト免疫系の一部を保有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソミックマウスを使用して作製することができる。これらのトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソミックマウスは、本明細書中でそれぞれHuMAbマウスおよびKMマウスと称されるマウスを含み、本明細書中では「ヒトIgマウス」と一括して総称される。

【0173】

HuMAb Mouse（登録商標）（Medarex, Inc.）は、内在性 μ および鎖遺伝子座を不活性化する標的化された変異とともに、再編成されていないヒト重鎖（ μ および）ならびに軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリンの小さな遺伝子座を含有する（例えば、Lonberg, et al., 1994 Nature 368(6474):856-859を参照のこと）。したがって、マウスは、マウスIgMまたはKの発現の低下を示し、免疫に应答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子がクラススイッチおよび体細胞変異を経て、高親和性のヒトIgG-モノクローナルを産生する（Lonberg, N. et al., 1994前出；Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101において概説される；Lonberg, N.およびHuszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13:65-93、ならびにHarding, F.およびLonberg, N., 1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546）。HuMAbマウスの作製および使用ならびにこのようなマウスにより保有されるゲノム改変は、Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295；Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5:647-656；Tuailon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724；Choi et al., 1993 Nature Genetics 4:117-123；Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12:821-830；Tuailon et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920；Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591；およびFishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14:845-851においてさらに記載されており、それらの全ての内容が、参照によりそれらの全体において本明細書に具体的に組み込まれる。さらに、米国特許第5,545,806号明細書；同第5,569,825号明細書；同第5,625,126号明細書；同第5,633,425号明細書；同第5,789,650号明細書；同第5,877,397号明細書；同第5,661,016号明細書；同第5,814,318号明細書；同第5,874,299号明細書；および同第5,770,429号明細書（全てはLonbergおよびKayに交付）、米国特許第5,545,807号明細書（Suraniらに交付）；PCT公開国際公開第92103918号パンフレット、国際公開第93/12227号パンフレット、国際公開第94/25585号パンフレット、国際公開第97113852号パンフレット、国際公開第98/24884号パンフレットおよび国際公開第99/45962号パンフレット（全てはLonbergおよびKayに交付）；ならびにPCT公開国際公

10

20

30

40

50

開第01/14424号パンフレット(Kormanらに交付)を参照されたい。

【0174】

いくつかの実施形態では、ヒト抗体は、導入遺伝子およびトランスクロモソーム上にヒト免疫グロブリン配列を保有するマウス、例えばヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖トランスクロモソームを保有するマウスを用いて産生され得る。本明細書中で「KMマウス」と称されるこのようなマウスは、石田らによるPCT公開国際公開第02/43478号パンフレットに詳述されている。

【0175】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替のトランスジェニック動物系は、当技術分野で利用可能であり、MINION結合抗体およびその抗原結合断片を産生するために使用することができる。例えば、Xenomouse (Abgenix, Inc.) と呼ばれる代替のトランスジェニック系を使用することができる。このようなマウスは、例えば、Kucherlapatiらによる、米国特許第5,939,598号明細書；同第6,075,181号明細書；同第6,114,598号明細書；同第6,150,584号明細書、および同第6,162,963号明細書に記載されている。

10

【0176】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替のトランスクロモソミック動物系は当技術分野で利用可能であり、その使用により、本発明のMINION結合抗体を産生することができる。例えば、「TCマウス」と呼ばれる、ヒト重鎖トランスクロモソームおよびヒト軽鎖トランスクロモソームの両方を保有するマウスを使用することができ、このようなマウスは、Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727に記載されている。さらに、当技術分野では、ヒト重鎖および軽鎖トランスクロモソームを保有する雌ウシも記載されており(Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20:889-894)、本発明のMINION結合抗体を産生するために使用することができる。

20

【0177】

ヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を用いても作製可能である。ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ法は、当技術分野で確立されているか、または下記実施例において記載される。例えば、Ladnerらに交付された米国特許第5,223,409号明細書；同第5,403,484号明細書；および同第5,571,698号明細書；Dowerらに交付された米国特許第5,427,908号明細書および同第5,580,717号明細書；McCaffertyらに交付された米国特許第5,969,108号明細書および同第6,172,197号明細書；ならびにGriffithsらに交付された米国特許第5,885,793号明細書；同第6,521,404号明細書；同第6,544,731号明細書；同第6,555,313号明細書；同第6,582,915号明細書および同第6,593,081号明細書を参照されたい。

30

【0178】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、免疫時にヒト抗体反応が生成され得るようにヒト免疫細胞が再構成されているSCIDマウスを用いて作製され得る。このようなマウスは、例えば、Wilsonらに交付された米国特許第5,476,996号明細書および同第5,698,767号明細書に記載されている。

40

【0179】

フレームワークまたはFcの遺伝子操作

本発明の遺伝子操作された抗体およびその抗原結合断片は、例えば抗体の特性を向上させるために、VHおよび/またはVL内のフレームワーク残基に改変が施されている場合の抗体を含む。通常は、このようなフレームワーク改変を施すことで抗体の免疫原性が低下する。例えば、1つのアプローチは、1つ以上のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系列の配列に「復帰変異する」ことである。より詳細には、体細胞変異を経ている抗体

50

は、その抗体が由来する生殖細胞系列の配列とは異なるフレームワーク残基を含有し得る。このような残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体が由来する生殖細胞系列の配列と比較することにより同定され得る。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系列の構成に戻すために、体細胞変異は、例えば部位特異的変異誘発による生殖細胞系列の配列への「復帰変異」であり得る。このような「復帰変異した」抗体も、本発明に包含されるものとする。

【0180】

フレームワーク改変の別の様式は、フレームワーク領域内またはさらに1つ以上のCDR領域内で1つ以上の残基を変異させ、T細胞エピトープを除去し、それにより抗体の潜在的な免疫原性を低下させることを含む。このアプローチは、「脱免疫原性化」とも称され、Carraによる米国特許出願公開第20030153043号明細書にさらに詳述されている。

10

【0181】

フレームワークまたはCDR領域内に施された改変に加えてまたはこれに代えて、本発明の抗体は、Fc領域内において通常は抗体の1つ以上の機能特性、例えば、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合および/または抗原依存性細胞障害を変化させる改変を含むように遺伝子操作され得る。さらに、本発明の抗体は、化学的に修飾され得るか(例えば、1つ以上の化学的成分が抗体に結合され得る)、またはその糖鎖修飾を変化させ、さらに抗体の1つ以上の機能特性を変化させるために修飾され得る。これらの各実施形態は下記にさらに詳述されている。Fc領域内の残基のナンバリングはKabattのEUインデックスのものである。

20

【0182】

一実施形態では、CH1のヒンジ領域が、ヒンジ領域内のシステイン残基の数が増加する、例えば増加または減少するように改変される。このアプローチは、Bodmerらによる米国特許第5,677,425号明細書にさらに記載されている。CH1のヒンジ領域内のシステイン残基の数が増加することで、例えば軽鎖および重鎖の集合が促進されるかあるいは抗体の安定性が増大または低下する。

【0183】

別の実施形態では、抗体のFcヒンジ領域の変異により抗体の生物学的半減期が減少する。より詳細には、抗体のブドウ球菌(*Staphylococcus*)プロテインA(SpA)への結合が天然型FcヒンジドメインのSpA結合と比較して低下するように、1つ以上のアミノ酸変異がFcヒンジ断片のCH2-CH3ドメイン界面領域に導入される。このアプローチは、Wardらによる米国特許第6,165,745号明細書にさらに詳述されている。

30

【0184】

別の実施形態では、抗体は改変されてその生物学的半減期が増大する。様々なアプローチが可能である。例えば、Wardに交付された米国特許第6,277,375号明細書に記載のように、1つ以上の下記の変異、すなわちT252L、T254S、T256Fを導入することができる。あるいは、Prestaらによる米国特許第5,869,046号明細書および同第6,121,022号明細書に記載のように、生物学的半減期を増大させるために、抗体は、CH1またはCL領域内にIgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから得られるサルベージ受容体結合エピトープを含有するように改変され得る。

40

【0185】

一実施形態では、Fc領域を、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基と置換することにより改変して、抗体のエフェクター機能を変化させる。例えば、抗体がエフェクターリガンドに対して親和性の変化を有するが、親抗体の抗原結合能を保持するように、1つ以上のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置換することができる。親和性が変化したエフェクターリガンドは、例えばFc受容体または補体のC1成分であり得る。このアプローチは、いずれもWinterらによる米国特許第5,624,821号明細書お

50

よび同第5, 648, 260号明細書にさらに詳述されている。

【0186】

別の実施形態では、抗体の、C1qへの結合が改変されかつ/または補体依存性細胞傷害(CDC)が低減または消失するように、アミノ酸残基から選択される1つ以上のアミノ酸が、異なるアミノ酸残基と置換され得る。このアプローチは、Idusogieらによる米国特許第6,194,551号明細書にさらに詳述されている。

【0187】

別の実施形態では、1つ以上のアミノ酸残基が改変されることにより、抗体の補体結合能が改変される。このアプローチは、BodmerらによるPCT公開国際公開第94/29351号パンフレットにさらに記載されている。

10

【0188】

いくつかの実施形態では、MINION結合分子は、ヒトIgG1定常領域を含有する。いくつかの実施形態では、ヒトIgG1定常領域は、Fc領域を含む。

【0189】

いくつかの実施形態では、MINION結合分子のFc領域は、抗体依存性細胞障害(ADCC)もしくは補体依存性細胞傷害(CDC)の低減または消失を媒介する1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、IgG1の定常領域のアミノ酸残基L234およびL235は、A234およびA235に置換される。いくつかの実施形態では、IgG1の定常領域のアミノ酸残基N267は、A267に置換される。いくつかの実施形態では、IgG1の定常領域のアミノ酸残基D265およびP329は、A265およびA329に置換される。ある種の実施形態では、Fc領域は、任意選択により、D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234/L235A、P329A/L234A/L235A、およびP329G/L234A/L235Aのいずれかから選択されるエフェクター機能の低減を付与する変異または変異の組合わせを含む。いくつかの実施形態では、Fc領域は、D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234/L235A、P329A/L234A/L235A、およびP329G/L234A/L235A(全ての位置はEUNンパリングによる)のいずれかから選択されるエフェクター機能の低減を付与する変異または変異の組合わせを含む。

20

【0190】

さらに別の実施形態では、1つ以上のアミノ酸の改変によるFc領域の改変により、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を媒介する抗体の能力が増大し、かつ/または抗体のFc受容体に対する親和性が増大する。このアプローチは、PrestaによるPCT公開国際公開第00/42072号パンフレットにさらに記載されている。さらに、ヒトIgG1上のFcRI、FcRII、FcRIIIおよびFcRnに対する結合部位がマッピングされており、かつ結合が向上した変異体についての記載がなされている(Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照のこと)。例えば、Fc領域は、S239D、I332E、A330L、S298A、E333A、E333S、K334A、K236A、K236W、F243L、P247I、D280H、K290S、R292P、S298D、S298V、Y300L、V305I、A339D、A339Q、A339T、P396L(全ての位置はEUNンパリングによる)のいずれかから選択されるエフェクター機能の増大を付与する変異または変異の組合わせを含み得る。

30

40

【0191】

さらに別の実施形態では、抗体の糖鎖修飾が改変される。例えば、糖鎖修飾が失われた抗体が作製され得る(すなわち抗体が糖鎖修飾を欠く)。糖鎖修飾が改変されて、例えば抗体の抗原に対する親和性が増大し得る。このような糖質修飾は、例えば抗体配列内の1つ以上の糖鎖修飾部位を改変することにより達成され得る。例えば、1つ以上のアミノ酸置換がなされ得る結果、1つ以上の可変領域フレームワークの糖鎖修飾部位が消失し、それによりその部位での糖鎖修飾が失われる。このような糖鎖修飾の消失により、抗原に対

50

する抗体の親和性が増大する場合がある。このようなアプローチは、C oらによる米国特許第5,714,350号明細書および同第6,350,861号明細書にさらに詳述されている。

【0192】

これに加えてまたはこれに代えて、糖鎖修飾の様式が改変された抗体、例えばフコシル残基を減らした低フコシル化抗体またはバイセクティングGlcNacが増加した構造を有する抗体が作製され得る。このような糖鎖修飾パターンの変更により、抗体のADCC能が増強することが実証されている。このような糖質修飾は、例えばグリコシル化機構が改変された宿主細胞内で抗体を発現させることにより達成され得る。グリコシル化機構が改変された細胞は、当技術分野で記載がなされており、本発明の組換え抗体を発現し、それにより糖鎖修飾が改変された抗体を産生する宿主細胞として用いられ得る。例えば、H a n gらによる欧州特許第1,176,195号明細書は、機能的に破壊されたフコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子を有する細胞株について記載しており、このような細胞株内で発現した抗体は低フコシル化を示す。P r e s t aによるPCT公開国際公開第03/035835号パンフレットには、フコースをAsn(297)に連結した糖質に結合する能力が低下した変異CHO細胞株、L e c I 3細胞について記載されており、それらはまた、その宿主細胞内で発現される抗体の低フコシル化をもたらす(S h i e l d s , R . L . e t a l . , 2002 J . B i o l . C h e m . 277 : 26733 - 26740もまた参照のこと)。U m a n aらによるPCT公開国際公開第99/54342号パンフレットには、遺伝子操作された細胞株内で発現した抗体が、抗体のADCC活性の増大をもたらすバイセクティングGlcNac構造の増加を示すように、糖タンパク質を修飾するグリコシルトランスフェラーゼ(例えば、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するように遺伝子操作された細胞株について記載されている(U m a n a e t a l . , 1999 N a t . B i o t e c h . 17 : 176 - 180も参照のこと)。

10

20

【0193】

いくつかの実施形態では、MINION結合分子は抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、(例えば、同じアイソタイプの野生型Fc領域と比べて)1つ以上の変異を有するIgG1アイソタイプを有する。いくつかの実施形態では、1つ以上の変異は、N297A、N297Q(B o l t s e t a l . (1993) E u r J I m m u n o l 23 : 403 - 411)、D265A、L234A、L235A(M c E a r c h e r n e t a l . , (2007) B l o o d , 109 : 1185 - 1192)、C226S、C229S(M c E a r c h e r n e t a l . , (2007) B l o o d , 109 : 1185 - 1192)、P238S(D a v i s e t a l . , (2007) J R h e u m a t o l , 34 : 2204 - 2210)、E233P、L234V(M c E a r c h e r n e t a l . , (2007) B l o o d , 109 : 1185 - 1192)、P238A、A327Q、A327G、P329A(S h i e l d s R L . e t a l . , (2001) J B i o i C h e r n . 276(9) : 6591 - 604)、K322A、L234F、L235E(H e z a r e h , e t a l . , (2001) J V i r a l 75 , 12161 - 12168 ; O g a n e s y a n e t a l . , (2008) . A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a 64 , 700 - 704)、P331S(O g a n e s y a n e t a l . , (2008) A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a 64 , 700 - 704)、T394D(W i l k i n s o n e t a l . (2013) M A b s 5 (3) : 406 - 417)、A330L、M252Y、S254T、および/またはT256Eから選択され、ここで、アミノ酸位置は、EUまたはK a b a tナンバリングの方法に従う。ある種の実施形態では、Fc領域はさらに、EUまたはK a b a tナンバリングの方法に従うグリシン236に相当する位置でのアミノ酸欠失を含む。

30

40

【0194】

いくつかの実施形態では、抗体は、EUまたはK a b a tナンバリングの方法に従うC

50

220S変異を含有する重鎖定常領域を有するIgG1アイソタイプを有する。

【0195】

いくつかの実施形態では、Fc領域はさらに、EUまたはKabataナンバリングの方法に従うA330L、L234F；L235E、および/またはP331Sから選択される1つ以上の追加の変異を含有する。

【0196】

ある種の実施形態では、抗体は、IgG2アイソタイプを有する。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトIgG2定常領域を含有する。いくつかの実施形態では、ヒトIgG2定常領域は、Fc領域を含む。いくつかの実施形態では、Fc領域は、1つ以上の改変を含有する。例えば、いくつかの実施形態では、Fc領域は、(例えば、同じアイソタイプの野生型Fc領域と比べて)1つ以上の変異を含有する。いくつかの実施形態では、1つ以上の変異は、V234A、G237A、H268E、V309L、N297A、N297Q、A330S、P331S、C232S、C233S、M252Y、S254T、および/またはT256Eから選択され、ここで、アミノ酸位置は、EUまたはKabataナンバリングの方法に従う。

10

【0197】

ある種の実施形態では、抗体は、IgG4アイソタイプを有する。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトIgG4定常領域を含有する。いくつかの実施形態では、ヒトIgG4定常領域は、Fc領域を含む。いくつかの実施形態では、Fc領域は、1つ以上の改変を含有する。例えば、いくつかの実施形態では、Fc領域は、(例えば、同じアイソタイプの野生型Fc領域と比べて)1つ以上の変異を含有する。いくつかの実施形態では、1つ以上の変異は、E233P、F234V、L235A、G237A、E318A(Hutchins et al., (1995) Proc Natl Acad Sci USA, 92:11980-11984)、S228P、L236E、S241P、L248E(Reddy et al., (2000) J Immunol, 164:1925-1933; Angal et al., (1993) Mol Immunol, 30(1):105-8; 米国特許第8614299B2号明細書)、T394D、M252Y、S254T、T256E、N297A、および/またはN297Qから選択され、ここで、アミノ酸位置は、EUまたはKabataナンバリングの方法に従う。

20

【0198】

いくつかの実施形態では、Fc領域はさらに、M252Y、S254T、および/またはT256Eから選択される1つ以上の追加の変異を含有し、ここで、アミノ酸位置は、EUまたはKabataナンバリングの方法に従う。

30

【0199】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される1つ以上のIgG1変異体は、アミノ酸位置がEUまたはKabataナンバリングの方法に従うA330L変異(Lazaret al., (2006) Proc Natl Acad Sci USA, 103:4005-4010)、またはL234F、L235E、および/またはP331S変異の1つ以上(Sazinsky et al., (2008) Proc Natl Acad Sci USA, 105:20167-20172)と組み合わせられて、補体活性化を排除し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるIgG変異体は、1つ以上の変異と組み合わせられて、抗体のヒト血清における半減期(half-life)を高め得る(例えば、EUまたはKabataナンバリングの方法に従うM252Y、S254T、T256E変異)(Dall'Acqua et al., (2006) J Biol Chem, 281:23514-23524; およびStrohle et al., (2009) Current Opinion in Biotechnology, 20:685-691)。

40

【0200】

いくつかの実施形態では、本開示のIgG4変異体は、EUまたはKabataナンバリングの方法に従うS228P変異(Angal et al., (1993) Mol I

50

mmunol, 30:105-108) および/または Peters et al., (2012) J Biol Chem. 13; 287(29): 24525-33) に記載される1つ以上の変異と組合わされて、抗体の安定化を高め得る。

【0201】

いくつかの実施形態では、抗体は、IgG2のFc領域、IgG4のFc領域、またはIgG2/IgG4の複合型Fc領域から選択されるFc領域を有する。

【0202】

改変抗体を遺伝子操作する方法

上述のように、本明細書で示されるVHおよびVL配列または全長重鎖および軽鎖配列を有するMINION結合抗体を使用して、全長重鎖および/もしくは軽鎖配列、VHおよび/もしくはVL配列、またはそれに結合する定常領域を改変することによって新たなMINION結合抗体を作製することができる。したがって、本発明の別の態様では、本発明のMINION結合抗体の構造的特徴を使用して、本発明の抗体およびその抗原結合断片の、MINIONに結合するなどの少なくとも1つの機能的特性を保持する構造的に関連するMINION結合抗体を作製する。

10

【0203】

例えば、本発明の抗体およびその抗原結合断片の1つ以上のCDR領域、またはその変異を、既知のフレームワーク領域および/または他のCDRと組換えにより組合わせて、上述のように、組換えにより遺伝子操作された追加の本発明のMINION結合抗体およびその抗原結合断片を作製することができる。他の種類の改変として、前段落に記載のものが挙げられる。遺伝子操作方法のための出発材料は、本明細書で提供される1つ以上のVHおよび/もしくはVL配列またはその1つ以上のCDR領域である。遺伝子操作された抗体を作製するために、本明細書で提供される1つ以上のVHおよび/もしくはVL配列またはその1つ以上のCDR領域を有する抗体を実際に調製する(すなわちタンパク質として発現させる)必要はない。むしろ、配列内に含まれる情報を出発材料として使用し、元の配列に由来する「第二世代」配列が作製され、次に、「第二世代」配列が調製され、タンパク質として発現される。

20

【0204】

改変された抗体配列はまた、固定されたCDR3配列または米国特許出願公開第2005025552号明細書に記載の最小の必須な結合決定基およびCDR1およびCDR2配列の多様性を有する抗体ライブラリーをスクリーニングすることによっても作製することができる。スクリーニングは、ファージディスプレイ技術などの、抗体ライブラリーから抗体をスクリーニングするのに適した任意のスクリーニング技術に従って実施することができる。

30

【0205】

標準的な分子生物学的手法を用いて改変抗体配列の調製および発現が可能である。改変抗体配列によりコードされる抗体は、本明細書に記載されるMINION結合抗体の機能特性のうちの一つ、いくつかまたは全てを保持する抗体であり、ここで、機能特性はMINIONタンパク質に特異的に結合することを含むがこれに限定されない。

【0206】

改変抗体の機能特性は、当技術分野で利用可能であり、かつ/または本明細書に記載される標準アッセイ、例えば実施例で示されるもの(例えば、ELISA)を用いて評価可能である。

40

【0207】

本発明の抗体およびその抗原結合断片を遺伝子操作する方法のいくつかの実施形態では、変異を、MINION結合抗体のコード配列の全部または一部にわたって、ランダムに、または選択的に導入することができ、結果として得られる改変MINION結合抗体を、本明細書に記載される結合活性および/または他の機能特性についてスクリーニングすることができる。変異方法については当技術分野で記載がなされている。例えば、ShortによるPCT公開国際公開02/092780号パンフレットは、飽和変異法、合成

50

ライゲーションアセンブリー、またはこれらの組合わせを使用して、抗体の変異を作製し、スクリーニングするための方法について記載している。あるいは、LazarらによるPCT公開国際公開第03/074679号パンフレットは、コンピュータによるスクリーニング法を使用して、抗体の生理化学的特性を最適化する方法について記載している。

【0208】

本発明の抗体の特徴付け

本発明の抗体およびその抗原結合断片は、様々な機能アッセイにより特徴付けることができる。例えば、それらは、MINIONタンパク質（例えば、ヒトMINIONタンパク質、例えば、配列番号1または3のタンパク質）に結合するそれらの能力により特徴付けることができる。

【0209】

MINIONに結合する抗体の能力は、目的の抗体を標識することにより直接的に検出することができ、または抗体を標識せずに、当技術分野で知られる様々なサンドイッチアッセイフォーマットを使用して、結合を間接的に検出してもよい。

【0210】

いくつかの実施形態では、本発明のMINION結合抗体およびその抗原結合断片は、基準MINION結合抗体の、MINIONタンパク質への結合を遮断するか、またはこれと競合する。これらは、上に記載した、MINIONに特異的に結合する完全ヒト抗体またはヒト化抗体であり得る。それらはまた、基準抗体と同じMINION上のエピトープに結合する、他のヒト抗体、マウス抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体であり得る。基準抗体の結合を遮断するか、またはこれと競合する能力は、被験下のMINION結合抗体が、基準抗体により規定されるエピトープと同じであるかもしくは類似のエピトープ、または基準MINION結合抗体が結合するエピトープと十分に近位のエピトープに結合することを示す。このような抗体は、特に、基準抗体について同定される有利な特性を共有する可能性が高い。基準抗体を遮断するか、またはこれと競合する能力は、例えば、競合的結合アッセイにより決定され得る。競合的結合アッセイでは、被験下の抗体を、MINIONタンパク質などの共通の抗原への基準抗体の特異的結合を阻害する能力について試験する。過剰量の試験抗体が基準抗体の結合を実質的に阻害する場合、試験抗体は、抗原への特異的結合について基準抗体と競合する。実質的な阻害とは、試験抗体が、基準抗体の特異的結合を、通常、少なくとも10%、25%、50%、75%、または90%低減することを意味する。

【0211】

抗体の、特定のタンパク質、この場合、MINIONへの結合についての、基準抗体との競合について評価するのに使用することができる、いくつかの既知の競合的結合アッセイが存在する。これらは、例えば、直接的固相ラジオイムノアッセイまたは間接的固相ラジオイムノアッセイ(RIA)、直接的固相酵素イムノアッセイまたは間接的固相酵素イムノアッセイ(EIA)、サンドイッチ競合アッセイ(Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9:242-253, 1983を参照のこと);直接的固相ビオチン-アビジンEIA(Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614-3619, 1986を参照のこと);直接的固相標識アッセイ、直接的固相標識サンドイッチアッセイ(Harlow & Lane、前出を参照のこと);I-125標識を使用する直接的固相標識RIA(Morel et al., *Molec. Immunol.* 25:7-15, 1988を参照のこと);直接的固相ビオチン-アビジンEIA(Cheung et al., *Virology* 176:546-552, 1990);および直接的標識RIA(Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77-82, 1990)を含む。通常、このようなアッセイは、非標識試験MINION結合抗体および標識基準抗体のいずれかを保有する固体表面または細胞に結合させた精製抗原の使用を伴う。競合的阻害は、試験抗体の存在下で、固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することにより測定される。通常、試験抗体は、過剰に存在する。競合アッセイにより同定される抗体(

10

20

30

40

50

競合抗体)は、基準抗体と同じエピトープに結合する抗体と、基準抗体が結合するエピトープと、立体障害が生じる程度に十分に近位の隣接エピトープに結合する抗体とを含む。

【0212】

選択されたMINION結合モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかどうかを決定するために、市販の試薬(例えば、Pierce、Rockford、Ill製の試薬)を使用して、各抗体がビオチン化され得る。非標識モノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を使用する競合試験は、MINIONタンパク質でコーティングしたELISAプレートを使用して実施することができる。ビオチン化MAbの結合は、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼプローブにより検出することができる。精製MINION結合抗体のアイソタイプを決定するために、アイソタイプELISAが実施され得る。例えば、マイクロ滴定プレートのウェルは、4で一晩、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ヒトIgGによりコーティングされ得る。1%のBSAによるブロッキングの後、プレートを、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のMINION結合モノクローナル抗体または精製アイソタイプ対照と周囲温度で1~2時間反応させる。次に、ウェルが、ヒトIgG1またはヒトIgM特異的アルカリホスファターゼコンジュゲートプローブのいずれかと反応させられ得る。次に、プレートを現像および解析し、その結果、精製抗体のアイソタイプを決定することができる。

10

【0213】

MINIONタンパク質を発現する生細胞へのMINION結合モノクローナル抗体の結合を実証するために、フローサイトメトリーが使用され得る。略述すると、MINIONを発現する細胞株(標準的な増殖条件下で増殖させた)は、0.1%のBSAおよび10%のウシ胎仔血清を含有するPBS中に様々な濃度のMINION結合抗体とともに混合され、37で1時間インキュベートされ得る。洗浄後、細胞を、一次抗体染色と同じ条件下で、フルオレセイン標識抗ヒトIgG抗体と反応させる。試料を、光特性および側方散乱特性を使用するFACSscan装置により解析して、一種類の細胞にゲートをかけることができる。蛍光顕微鏡法を使用する代替的なアッセイを、フローサイトメトリーアッセイ(に加えて、またはこれの代わりに)使用してもよい。細胞は、上で記載したとおりに正確に染色し、蛍光顕微鏡法により試験することができる。この方法は、個々の細胞の視覚化を可能とするが、抗原の密度に依存して感度が低下する場合がある。

20

【0214】

本発明のMINION結合抗体およびその抗原結合断片は、ウエスタンブロッティングにより、MINIONタンパク質またはMINION抗原性断片との反応性についてさらに試験することができる。略述すると、精製MINIONタンパク質もしくは融合タンパク質、またはMINIONを発現する細胞からの細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけることができる。電気泳動の後、分離された抗原を、ニトロセルロース膜へと転写し、10%のウシ胎仔血清でブロッキングし、被験モノクローナル抗体でプローブする。抗ヒトIgGアルカリホスファターゼを使用してヒトIgG結合を検出し、BCIP/NBT基質タブレット(Sigma Chem. Co.、St. Louis、Mo.)で現像することができる。

30

【0215】

MINIONポリペプチドを含むリポソームおよび治療薬を送達する方法

本明細書ではまた、本明細書に記載されるMINIONポリペプチド、例えば、表1のMINIONポリペプチドを含むリポソームが提供される。リポソームは、水性コアを被包する脂質二重層を特徴とする閉じた脂質キャリアである。リポソームは、治療薬用のキャリアとして使用することができる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドはリポソームの表面上で発現する。MINIONポリペプチドの融合誘導性活性は、リポソーム脂質と細胞膜の融合を誘導し、それにより、分解性のエンドサイトーシス移行経路をバイパスしてリポソームの内容物を細胞質に直接的に送達することができる。MINIONポリペプチドを含むリポソームは、広範囲の細胞型に融合し、それらを核酸(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プラスミド、siRNA、shRNA、アプタマ

40

50

ー)、タンパク質もしくはポリペプチド(例えば、抗体、抗原、酵素、もしくは治療用ポリペプチド)、ペプチド核酸(PNA)、または低分子化合物などの多くの治療薬と適合させることができる。

【0216】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含むMINIONポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなるMINIONポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号1からなるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号3からなるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号5からなるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号7からなるポリペプチドを含む。

10

【0217】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームはまた、Myomakerポリペプチド、例えば、表2のMyomakerポリペプチドも含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含むMyomakerポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなるMyomakerポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号16からなるMyomakerポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号18からなるMyomakerポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、配列番号20からなるMyomakerポリペプチドを含む。

20

【0218】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリボソームは、MINIONポリペプチドおよびリボソームに被包された治療薬を含む。治療薬は、核酸(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プラスミド、siRNA、shRNA、アプタマー)、タンパク質もしくはポリペプチド(例えば、抗体、抗原、酵素、もしくは治療用ポリペプチド)、ペプチド核酸(PNA)、または低分子化合物であり得る。このようなりボソームは融合誘導性であり、リボソーム脂質の細胞膜への融合を介して治療薬を標的細胞、例えばヒト細胞、例えば機能障害性細胞または腫瘍細胞に送達するために使用することができる。

30

【0219】

融合誘導性タンパク質を含むリボソームを作製する方法は、米国特許出願公開公報、例えば米国特許出願公開第20140314831号明細書、米国特許出願公開第20140134232号明細書、米国特許出願公開第20090280163号明細書、米国特許出願公開第20090142267号明細書に記載されており、これらの各々が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、MINIONポリペプチドは、内容が参照により本明細書に組み込まれるRigaud et al., 1995, Biochim Biophys Acta 1231(3): 223-46; Rigaud and Levy, 2003, Methods Enzymol., 372: 65-86; およびTop et al., 2005, EMBO J, 24(17): 2980-8などの出版物に概説される発想から導かれる界面活性剤除去法によってリボソーム膜に挿入される。略述すると、精製MINIONポリペプチドは、界面活性剤で懸濁されたMINIONポリペプチドを界面活性剤であらかじめ飽和したりボソームと混合した後、界面活性剤を除去することによって、リボソーム中に再構成され得る。MINIONポリペプチドをリボソーム膜に挿入するプロセスを助けるために、n-オクチル-D-グルコピラノシド(OG)が界面活性剤中で使用され得る。使用されるリボソームのサイズおよび種類に基づ

40

50

いて、0～2.0%の最終体積濃度範囲にわたってリポソーム脂質の溶液にOGを徐々に添加することによってOGの最適な濃度が決定されるべきである。吸光度を 600nm で検出することができ、吸光度対OG%からプロットが導かれる。最適な濃度は、リポソームの溶解をもたらす臨界OG濃度の直前である。

【0220】

いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、静電相互作用または疎水性相互作用を介してリポソームと会合することができる。例えば、MINIONポリペプチドの正に荷電したアミノ酸(GluまたはAsp)とリポソームの負に荷電したリン脂質膜との間の静電相互作用により、それらの間で会合をもたらすことができる。

【0221】

中性またはアニオン性リポソーム、およびカチオン性脂質は、内容物の宿主細胞への送達を促進することが知られている。これらの化合物は当業者が容易に利用可能であり；例えば、Liposomes: A Practical Approach, RCP New Ed, IRL press (1990)を参照されたい。リポソーム脂質は、カチオン性脂質、合成脂質、糖脂質、リン脂質、コレステロールまたはその誘導体、および当業者に知られる等価な分子を含み得る。アニオン性および中性リポソームは、当技術分野で知られており(例えば、リポソームを作製する方法の詳細な説明についてはLiposomes: A Practical Approach, RPC New Ed, IRL press (1990)を参照のこと)、広範囲の治療薬を送達するのに有用である。リン脂質は、好ましくは、様々な脂肪性アシル組成を有するホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、カルジオリピンおよびホスファチジルイノシトールを含み得る。

【0222】

カチオン性脂質もまた当技術分野で知られており、薬剤および遺伝子送達のために一般的に使用される。このような脂質としては、DOTMA(N-[(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)としても知られるLipofectin(商標)、DOTAP(1,2-ビス(オレイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)、DDAB(ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド)、DOGS(ジオクタデシルアミドログリシルスペルミン)、およびDC-Chol(3-(N-(N',N'-ジメチルアミノメタン)-カルバモイル)コレステロール)などのコレステロール誘導体が挙げられる。これらのカチオン性脂質の記載は、欧州特許第187,702号明細書、国際公開第90/11092号パンフレット、米国特許第5,283,185号明細書、国際公開第91/15501号パンフレット、国際公開第95/26356号パンフレット、および米国特許第5,527,928号明細書に見出すことができる。ポリヌクレオチドの送達のためのカチオン性脂質は、好ましくは、例として国際公開第90/11092号パンフレットに記載されるDOPE(ジオレイルホスファチジルエタノールアミン)などの中性脂質と連携して使用される。カチオン性リポソームを含有する製剤は、任意選択により、他のトランスフェクション促進化合物を含有してもよい。それらのいくつかは、国際公開第93/18759号パンフレット、国際公開第93/19768号パンフレット、国際公開第94/25608号パンフレット、および国際公開第95/02397号パンフレットに記載される。それらは、核膜を介してDNAの輸送を促進するのに有用なスペルミン誘導体(例えば、国際公開第93/18759号パンフレットを参照のこと)ならびにGALA、グラミシジンS、およびカチオン性胆汁酸塩などの膜透過性化合物(例えば、国際公開第93/19768号パンフレットを参照のこと)を含む。

【0223】

単層リポソームは、多層脂質小胞から調製することができる。例えば、DOPC:COPE:コレステロール:DC-コレステロールの60:30:4:6のモル比の混合物を使用して、多層脂質小胞懸濁液を調製することができる。しかし、一定の状況において、

10

20

30

40

50

PE - PEG2000および/またはDOTAPを含有する脂質小胞が必要となることがある。多層脂質小胞は、FenskeおよびCullis, 2005, Methods Enzymol. 391: 7 - 40によって記載される薄膜法など、当業者に知られているであろういくつかの異なる方法によって調製することができる。

【0224】

単層リポソームは、LiposoFast - Basic (Avestin Inc. Ottawa, ON, Canada)などの気密性のガラスシリンジを用いる既定のポアサイズのポリカーボネート膜を通す手動の押し出しによって多層脂質小胞から押し出すことができる。この方法では、試料は、2つのシリンジ間で前後に試料を押し出すことによって膜を通過する。リポソームの特定の直径を得るために、多層脂質小胞懸濁液を、特定の直径のポアサイズを有するフィルターに通過させる。

10

【0225】

リポソームまたはリポソーム組成物の例としては、米国特許第4789633号明細書；同第4902512号明細書；同第4925661号明細書；同第4983397号明細書；同第5013556号明細書；同第5292524号明細書；同第5534241号明細書；同第5593622号明細書；同第5648478号明細書；同第5676971号明細書；同第5756069号明細書；同第5834012号明細書；同第5846458号明細書；同第5891468号明細書；同第5945122号明細書；同第6046225号明細書；同第6057299号明細書；同第6056973号明細書；同第6077834号明細書；同第6126966号明細書；同第6153596号明細書；同第6197333号明細書；同第6228391号明細書；同第6316024号明細書；同第6387397号明細書；同第6417326号明細書；同第6476068号明細書；同第6586559号明細書；同第6627218号明細書；同第6723338号明細書；同第6897196号明細書；同第6936272号明細書；同第7384923号明細書；米国特許出願公開第2001/0033860号明細書；同第2001/0038851号明細書；同第2002/0136707号明細書；同第2002/0034537号明細書；同第2003/0224037号明細書；同第2003/0113262号明細書；同第2003/0072794号明細書；同第2003/0082228号明細書；同第2003/0212031号明細書；同第2003/0203865号明細書；同第2003/0175205号明細書；同第2003/0162748号明細書；同第2003/0130190号明細書；同第2003/0059461号明細書；同第2003/0215490号明細書；同第2003/0166601号明細書；同第2004/0022842号明細書；同第2004/0142025号明細書；同第2004/0071768号明細書；同第2004/0234588号明細書；同第2004/0213833号明細書；同第2004/0029210号明細書；同第2005/0271588号明細書；同第2005/0136064号明細書；および国際特許出願国際公開第99/30686号パンフレット；国際公開第02/41870号パンフレット；国際公開第00/74646号パンフレット；国際公開第96/13250号パンフレット；国際公開第98/33481号パンフレット；Aliminana et al., Prep. Biochem. Biotech. (2004) 34(1): 77 - 96；Papahadjopolulos D, Allen T M, Gbizon A, et al. 「Spherically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and anti tumor therapeutic efficacy」Proc Natl Acad Sci U.S.A. (1991) 88: 11460 - 11464；Allen T M, Martin F J. 「Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines」Semin Oncol (2004) 31: 5 - 15 (suppl 13)；Weissig et al. Pharm. Res. (1998) 15: 1552 - 1556に記載されるものが挙げられる。

20

30

40

50

【0226】

リポソームの循環半減期を延長し、細網内皮系による取り込みを回避するために、研究者らは、ポリエチレングリコールまたは他の親水性ポリマーの組み込みによって修飾されたリポソーム（例えば、成分脂質の1つ以上がPEGの結合によって修飾されたPEGリポソーム）を開発した。PEG修飾リポソームはまた、「遮蔽された」リポソームと呼ばれることも多い。Doxil.TM.（ドキシソルビシンHClリポソーム注射剤）は、細網内皮系（RES）を回避し、かつ薬物循環時間を延長するために利用される補助的なポリエチレングリコール（PEG）を伴う、リポソームに被包されたドキシソルビシンである。Vail D M, Amantea M A, Colbern G T, et al., 「Pegylated Liposomal Doxorubicin: Proof of Principle Using Preclinical Animal Models and Pharmacokinetic Studies.」 *Semin Oncol.* (2004) 31 (Suppl 13): 16-35を参照されたい。しかしながら、問題として認められた遅延性の血液貯溜（例えば、手足症候群、末梢系におけるDoxil.RTMの有害作用など）によって有害作用もまた引き起こされる。

10

【0227】

PEG修飾リポソームに加えて、研究者らは、様々な他の脂質を開発した。これらの誘導体化された脂質はまた、リポソームに組み込むことができた。例えば、国際特許出願国際公開第93/01828号パンフレット；Park Y S, Maruyama K, Huang L. 「Some negatively charged phospholipids derivatives prolong the liposome circulation in vivo.」 *Biochimica et Biophysica Acta* (1992) 1108: 257-260；Ahl et al., *Biochimica Biophys. Acta* (1997) 1329: 370-382を参照されたい。

20

【0228】

PEGおよび他の親水性ポリマーによるリポソーム修飾に加えて、研究者らはまた、特定の細胞のための標的化因子（標的化リガンドとも呼ばれる）を組み込むことによって、特定の細胞型を特異的に標的化することを目的とするリポソームを開発した。標的化因子/リガンドの例としては、アシアロ糖タンパク質、葉酸塩、トランスフェリン、抗体などが挙げられる。一部の場合において、成分脂質の1つ以上が標的化因子の結合によって修飾され得る。

30

【0229】

標的化因子を含む脂質組成物の例としては、米国特許第5049390号明細書；同第5780052号明細書；同第5786214号明細書；同第6316024号明細書；同第6056973号明細書；同第6245427号明細書；同第6524613号明細書；同第6749, 863号明細書；同第6177059号明細書；同第6530944号明細書；同第7829113号明細書；同第8758810号明細書；米国特許出願国際公開第2004/0022842号明細書；同第2003/0224037号明細書；同第2003/143742号明細書；同第2003/0228285号明細書；同第2002/0198164号明細書；同第2003/0220284号明細書；同第2003/0165934号明細書；同第2003/0027779号明細書；国際特許出願国際公開第95/33841号パンフレット；国際公開第95/19434号パンフレット；国際公開第2001037807号パンフレット；国際公開第96/33698号パンフレット；国際公開第2001/49266号パンフレット；国際公開第9940789号パンフレット；国際公開第9925320号パンフレット；国際公開第9104014号パンフレット；国際公開第92/07959号パンフレット；欧州特許第1369132号明細書；特開2001002592号公報；Iinuma H, Maruyama K, et al., 「Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferring-p

40

50

olyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer」Int J Cancer (2002) 99 130 - 137; Ishida O, Maruyama K, Tanahashi H, Iwatsuru M, Sasaki K, et al., 「Liposomes bearing polyethylene glycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo.」Pharmaceutical Research (2001) 18: 1042 - 1048; Holmberg et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1989) 165 (3): 1272 - 1278; Name et al., J. Biochem. Mol. Biol. (1998) 31 (1): 95 - 100; Nag et al., J. Drug Target. (1999) 6 (6): 427 - 438 が挙げられる。

10

【0230】

また、本明細書では、本明細書に記載されるMINIONポリペプチドを含むリボソームを細胞と接触させることによって治療薬を細胞（例えば、ヒト細胞、例えば、機能障害性細胞または腫瘍細胞）に送達する方法であって、リボソームが細胞と融合し、それにより治療薬を細胞に送達する方法が提供される。本方法は、インビトロまたはインビボで実施することができる。

20

【0231】

細胞を融合する方法および治療上の使用

本明細書では、MINIONポリペプチド、例えば、表1のMINIONポリペプチドを使用して第1の細胞を第2の細胞に融合する方法が提供される。いくつかの実施形態では、このような方法は、(a) MINIONポリペプチドおよびMyomakerポリペプチドを発現する第1の細胞をもたす工程と；(b) 第1の細胞を、Myomakerを発現する第2の細胞と接触させる工程であって、第1の細胞が第2の細胞と融合する工程とを含み得る。本方法の工程(b)は、インビトロまたはインビボで実施することができる。

【0232】

いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体からなる。

30

【0233】

いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体からなる。

40

【0234】

いくつかの実施形態では、第1の細胞を第2の細胞に融合する方法は、(a) MINIONポリペプチド、および同型相互作用を媒介する受容体を発現する第1の細胞をもたす工程と；(b) 第1の細胞を、第1の細胞によって発現されるものと同じ受容体を発現

50

する第2の細胞と接触させる工程であって、第1の細胞が第2の細胞と融合する工程とを含み得る。同型相互作用を媒介する受容体としては、例えば、カドヘリン（例えば、N - カドヘリン、P - カドヘリン、E - カドヘリン、またはM - カドヘリン）、セレクチン、クローディン、オクルーディン、接合部接着分子、またはトリセルリンが挙げられるが、これらに限定されない。本方法の工程（b）は、インビトロまたはインビボで実施することができる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体からなる。

10

20

30

40

50

【0235】

これらの方法を使用して、任意の種類筋細胞、例えば、ヒト筋細胞；または非筋細胞、例えば、ヒト非筋細胞を融合することができる。したがって、第1および第2の細胞は、筋細胞、線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、樹状細胞、または腫瘍細胞から選択され得る。いくつかの実施形態では、本方法を使用して、筋細胞または非筋細胞（例えば、線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、もしくは樹状細胞）を腫瘍細胞または機能障害性細胞と融合する。

【0236】

いくつかの実施形態では、第1の細胞は、検出可能なマーカー、例えば、蛍光分子（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など）、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）、発光分子（例えば、ルシフェラーゼ）、放射性分子（例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、もしくは³²P）、またはコロイド金もしくは着色ビーズなどの熱量測定ラベルを発現することができる。検出可能なマーカーを発現する細胞は、顕微鏡法、オートラジオグラフィ、および/または他の画像化方法などの適切な検出方法によって追跡または可視化され得る。

【0237】

いくつかの実施形態では、第1の細胞は、目的の遺伝子を含むことができ、第1および第2の細胞の融合により、目的の遺伝子を第2の細胞に送達する。いくつかの実施形態では、目的の遺伝子は、第2の細胞の病理学的表現型を矯正する。いくつかの実施形態では、第2の細胞は、目的の遺伝子を含むことができ、第1および第2の細胞の融合により、目的の遺伝子を第1の細胞に送達する。いくつかの実施形態では、目的の遺伝子は、第1の細胞の病理学的表現型を矯正する。

【0238】

いくつかの実施形態では、目的の遺伝子は、ミトコンドリアDNAの遺伝子であり、本明細書に記載される方法を使用して、ミトコンドリア性疾患を治療することができる。例えば、病理学的表現型は、ミトコンドリアDNA欠乏；ミトコンドリア心筋症；赤色ぼろ線維を伴うミオクローヌス性てんかん（MERRF）；ミトコンドリア心筋症、脳筋症、乳酸性アシドーシス、脳卒中様症状（MELAS）；カーズ-セイアー症候群（KSS）；リー症候群（亜急性壊死性脳筋症）および母性遺伝のリー症候群（MILS）；ミトコンドリア神経性胃腸管系脳筋症（MNGIE）；赤色ぼろ線維を伴うミオクローヌス性てんかん（MERRF）；ニューロパチー、運動失調および網膜色素変性（NARP）；またはピアソン症候群から選択され得る。

【0239】

いくつかの実施形態では、目的の遺伝子は、フマリルアセト酢酸ヒドラーゼ（Fah）をコードする遺伝子であり、本明細書に記載される方法を使用して、遺伝性高チロシン血症I型を治療することができる。いくつかの実施形態では、目的の遺伝子は、ジストロフ

インをコードする遺伝子であり、本明細書に記載される方法を使用して、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）またはベッカー型筋ジストロフィー（BMD）を治療することができる。いくつかの実施形態では、目的の遺伝子は、ジスフェリンをコードする遺伝子であり、本明細書に記載される方法を使用して、三好ミオパチー（MM）、肢帯型筋ジストロフィー 2 B 型（LGMD 2 B）、および遠位型ミオパチー（DM）を治療することができる。

【0240】

本明細書に記載される組成物および方法を使用して、癌、例えば、頭頸部癌、皮膚癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、脳癌、神経芽細胞腫、神経膠腫、肉腫、リンパ腫、または白血病を治療することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法を使用して、血管肉腫、皮膚線維肉腫、類上皮肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、消化管間質腫瘍（GIST）、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫、未分化多形肉腫、または滑膜肉腫から選択される肉腫を治療することができる。

10

【0241】

腫瘍溶解性ウイルスを使用して癌を治療する方法

本明細書では、MINIONポリペプチドをコードする核酸を含むウイルス、例えば、腫瘍溶解性ウイルスを対象に投与することによって、対象における癌を治療する方法が提供される。代替的な実施形態において、本明細書では、癌の治療において使用するためのMINIONポリペプチドをコードする核酸を含むウイルス、例えば、腫瘍溶解性ウイルスが提供される。融合誘導性タンパク質をコードするウイルスによる細胞の感染は、広範囲の多核シンシチウム形成を引き起こし、ウイルスによって形質導入された細胞の面積および数を効率的に増加させることができる（Wong, PLOS ONE, DOI: 10.1371/journal.pone.0151516, March 17, 2016）。融合している細胞の細胞質内容物の混合は、ベクター内にコードされた任意の遺伝子産物が、融合細胞に融合される全ての細胞に効率的に移行することを意味する。さらに、融合誘導性タンパク質は、融合のプロセスが最終的に細胞機能を損ない、細胞死を誘導するため、効果的な単剤療法として作用することができる。腫瘍溶解性ウイルスとの関係においては、ウイルスの放出をもたらす通常の腫瘍細胞溶解に加えて、感染細胞は、直接的な細胞-細胞融合を介してその感染性のペイロードを広めることができる（Wong, PLOS ONE, DOI: 10.1371/journal.pone.0151516, March 17, 2016）。

20

30

【0242】

いくつかの実施形態では、対象において癌を治療する方法は、MINIONポリペプチドをコードする核酸およびMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む有効量の腫瘍溶解性ウイルスを対象に投与する工程を含み得る。代替的な実施形態において、本明細書では、対象における癌の治療で使用するためのMINIONポリペプチドをコードする核酸およびMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む腫瘍溶解性ウイルスが提供され、ここで、有効量の腫瘍溶解性ウイルスが対象に投与される。

40

【0243】

いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体からなる。

【0244】

50

いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体からなる。

【0245】

いくつかの実施形態では、対象において癌を治療する方法は、MINIONポリペプチドをコードする核酸および同型相互作用を媒介する受容体をコードする核酸を含む有効量の腫瘍溶解性ウイルスを対象に投与する工程を含み得る。代替的な実施形態において、本明細書では、対象における癌の治療で使用するためのMINIONポリペプチドをコードする核酸および同型相互作用を媒介する受容体をコードする核酸を含む腫瘍溶解性ウイルスが提供され、ここで、有効量の腫瘍溶解性ウイルスが対象に投与される。同型相互作用を媒介する受容体としては、例えば、カドヘリン（例えば、N-カドヘリン、P-カドヘリン、E-カドヘリン、またはM-カドヘリン）、セレクチン、クローディン、オクルーディン、接合部接着分子、またはトリセルリンが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体からなる。

【0246】

好適な腫瘍溶解性ウイルスは当技術分野で知られており、例えば、全体として参照により本明細書に組み込まれるKaufman, Nat Rev Drug Discov. 2015; 14(9): 642-662に記載されるものがある。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは癌細胞を特異的に標的化し、例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、非癌細胞に影響を及ぼさないか、または最小限の影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞において選択的に複製する。実施形態において、腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞において選択的に複製することができ、かつ選択的に癌細胞の死を誘発するか、または選択的に癌細胞の増殖を遅くすることができる。腫瘍溶解性ウイルスとしては、腫瘍溶解性アデノウイルス、腫瘍溶解性アデノ随伴ウイルス、腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス(HSV)、腫瘍溶解性パルボウイルス、腫瘍溶解性レトロウイルス、腫瘍溶解性レンチウイルス、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、腫瘍溶解性シンドビスウイルス、腫瘍溶解性インフルエンザウイルス、腫瘍溶解性レオウイルス、腫瘍溶解性ニューカッスル病ウイルス(NDV)、腫瘍溶解性麻疹ウイルス、腫瘍溶解性水疱性口内炎ウイルス(VSV)、腫瘍溶解性ポリオウイルス、腫瘍溶解性ポックスウイルス、腫瘍溶解性セネカパレーウイルス、腫瘍溶解性コクサッキーウイルス、腫瘍溶解性エンテロウイルス、腫瘍溶解性粘液腫ウイルス、または腫瘍溶解性マラバウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0247】

いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、全体として参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2010/0178684号明細書に記載のものなどの組換え体腫瘍溶解性ウイルスである。いくつかの実施形態では、組換え体腫瘍溶解性ウイルスは、例えば、全体として参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2010/0178684号明細書に記載されるとおりの、免疫反応または炎症反応の阻害因子

10

20

30

40

50

をコードする核酸配列（例えば、異種核酸配列）を含む。実施形態において、組換え体腫瘍溶解性ウイルス、例えば、腫瘍溶解NDVは、アポトーシス促進タンパク質（例えば、アポブチン）、サイトカイン（例えば、GM-CSF、CSF、インターフェロン、インターロイキン-2（IL-2）、腫瘍壊死因子）、免疫グロブリン（例えば、ED-Bフィブロネクチン（*firbonectin*）に対する抗体）、腫瘍関連抗原、二特異性アダプタータンパク質（例えば、NDV HNタンパク質およびCD3もしくはCD28などのT細胞共刺激性受容体に対する二特異性抗体または抗体断片；またはヒトIL-2およびNDV HNタンパク質に対する一本鎖抗体の融合タンパク質）を含む。例えば、全体として参照により本明細書に組み込まれるZamarin et al. Future Microbiol. 7.3 (2012): 347-67を参照されたい。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、各々が全体として参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8591881B2号明細書、米国特許出願公開第2012/0122185A1号明細書または米国特許出願公開第2014/0271677A1号明細書に記載のキメラ腫瘍溶解性NDVである。

10

【0248】

いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞において排他的に複製するように設計される、条件的複製アデノウイルス（CRAV）を含む。例えば、Alemany et al. Nature Biotechnol. 18 (2000): 723-27を参照されたい。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性アデノウイルスは、全体として参照により本明細書に組み込まれるAlemany et al. の725頁の表1に記載されるものを含む。

20

【0249】

例示的な腫瘍溶解性ウイルスは、以下の：

B群腫瘍溶解性アデノウイルス（ColoAd1）（PsiOxus Therapeutics Ltd.）（例えば、臨床試験識別番号：NCT02053220を参照のこと）；

顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を含むアデノウイルスであるONCOS-102（旧称：CGTG-102）（Oncos Therapeutics）（例えば、臨床試験識別番号：NCT01598129を参照のこと）；

ヒトPH20ヒアルロニダーゼをコードする遺伝的に改変された腫瘍溶解性ヒトアデノウイルスであるVCN-01（VCN Biosciences, S.L.）（例えば、臨床試験識別番号：NCT02045602およびNCT02045589を参照のこと）；

30

網膜芽細胞腫/E2F経路が調節異常である癌細胞において選択的に複製されるように改変された、野生型ヒトアデノウイルス血清型5（Had5）に由来するウイルスである、条件的複製型アデノウイルスであるICOVIR-5（Institut Catalana d'Oncologia）（例えば、臨床試験識別子：NCT01864759を参照のこと）；

腫瘍溶解性アデノウイルスであるICOVIR5を感染させた骨髄由来の自己間葉系幹細胞（MSC）を含むCelyvir（Hospital Infantil Universitario Nino Jesus, Madrid, Spain / Ramon Alemany）（例えば、臨床試験識別子：NCT01844661を参照のこと）；

40

ヒトE2F-1プロモーターが、必須のE1aウイルス遺伝子の発現を駆動し、それにより、ウイルスの複製および細胞毒性をRb経路欠損腫瘍細胞に制限する、条件的複製型腫瘍溶解性血清型5アデノウイルス（Ad5）である、CG0070（Cold Genesis, Inc.）（例えば、臨床試験識別子：NCT02143804を参照のこと）；

または

網膜芽細胞腫（Rb）経路欠損細胞において選択的に複製され、ある種のRGD結合インテグリンを発現する細胞により効率的に感染するように遺伝子操作されたアデノウイルス

50

である、DNX-2401 (旧称: Delta-24-RGD) (Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/DNAtrix, Inc.) (例えば、臨床試験識別子: NCT01956734を参照されたい)を含むが、これらに限定されない。

【0250】

いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、検出可能なマーカー、例えば、蛍光分子 (例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など)、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)、発光分子 (例えば、ルシフェラーゼ)、放射性分子 (例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、もしくは ^{32}P)、またはコロイド金もしくは着色ビーズなどの熱量測定ラベルを発現することができる。

10

【0251】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される腫瘍溶解性ウイルスは、注射、例えば、皮下、動脈内、静脈内、筋肉内、髄腔内、または腹腔内注射によって投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍内、経皮的、経粘膜的、経口的、鼻腔内、皮下、動脈内、静脈内、筋肉内、髄腔内、もしくは腹腔内、または経肺投与を介して投与される。

【0252】

癌ワクチンおよび治療上の使用

腫瘍-樹状細胞ヘテロカリオンに基づく癌ワクチンは、クラスIとクラスIIのMHCの両方を介する腫瘍抗原の提示が亢進することによって強力に免疫を誘導することができる (Gong et al., Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. Nat Med 1997, 3: 558-561、この内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる)、Minion/MyomergersとMyomakersの共発現により、これらの複合型を形成する効率を劇的に向上させることができた。

20

【0253】

したがって、いくつかの実施形態において、本明細書では、MINIONポリペプチドをコードする核酸およびMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む樹状-腫瘍融合細胞を含む癌ワクチンが提供される。代替的な実施形態において、本明細書では、対象における癌の治療で使用するためのMINIONポリペプチドをコードする核酸およびMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む樹状-腫瘍融合細胞を含む癌ワクチンが提供され、ここで、有効量の癌ワクチンが対象に投与される。いくつかの実施形態において、本明細書では、MINIONポリペプチドをコードする核酸および同型相互作用を媒介する受容体をコードする核酸を含む樹状-腫瘍融合細胞を含む癌ワクチンが提供される。代替的な実施形態において、本明細書では、対象における癌の治療で使用するためのMINIONポリペプチドをコードする核酸および同型相互作用を媒介する受容体をコードする核酸を含む樹状-腫瘍融合細胞を含む癌ワクチンが提供され、ここで、有効量の癌ワクチンが対象に投与される。

30

40

【0254】

いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体からなる。

50

【0255】

いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体からなる。

【0256】

同型相互作用を媒介する受容体としては、例えば、カドヘリン（例えば、N-カドヘリン、P-カドヘリン、E-カドヘリン、またはM-カドヘリン）、セレクトイン、クロードイン、オクルーディン、接合部接着分子、またはトリセルリンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0257】

癌ワクチンとしての樹状-腫瘍融合細胞を作製する方法は、当技術分野で知られている。例えば、樹状細胞（DC）および全腫瘍細胞を、化学的、物理的または生物学的手段によって融合することにより、樹状細胞に由来するMHCクラスI、MHCクラスII、および共刺激性分子ならびに全腫瘍に由来する腫瘍関連抗原を含むヘテロカリオンを作製する。例えば、内容が全体として参照により本明細書に組み込まれるKoido, S.; Ohana, M.; Liu, C.; Nikrui, N.; Durfee, J.; Lerner, A.; Gong, J. Dendritic cells fused with human cancer cells: Morphology, antigen expression, and T cell stimulation. Clin. Immunol. 2004, 113, 261-269; Gong, J.; Koido, S.; Calderwood, S. K. Cell fusion: From hybridoma to dendritic cell-based vaccine. Expert Rev. Vaccines 2008, 7, 1055-1068; Kajihara, M.; Takakura, K.; Ohkusa, T.; Koido, S. The impact of dendritic cell-tumor fusion cells on cancer vaccines - Past progress and future strategies. Immunotherapy 2015, 7, 1111-1122; Takakura, K.; Kajihara, M.; Ito, Z.; Ohkusa, T.; Gong, J.; Koido, S. Dendritic-tumor fusion cells in cancer immunotherapy. Discov. Med. 2015, 19, 169-174を参照されたい。DC-腫瘍融合アプローチは、抗腫瘍免疫反応を誘導するために以下の利点を提供する：（1）DC-腫瘍FCは、全腫瘍に由来する抗原性ペプチドを提示し、個々の患者に対する抗原性ペプチドを同定する必要性を回避し；（2）広範な既知および未同定の腫瘍関連抗原（TAA）をDC-腫瘍FCの表面上に同時に提示することができ、ポリクローナルな抗原特異的CD4+およびCD8+細胞の発生頻度を増大させ、長期の効率的な抗腫瘍免疫をもたらし；（3）多数のTAAが共刺激分子との関係において提示され、耐性誘導を防ぎ、効率的な抗腫瘍免疫反応をもたらし；かつ（4）DC-腫瘍FCが流入領域リンパ節に移動し、リンパ節のT細胞領域においてCD4+およびCD8+T細胞とクラスターを形成し、その結果DC-腫瘍FCは、CD4+およびCD8+T細胞を活性化するために外因性のTAAを取り入れる必要がない。内容が全体として参照により本明細書に組み込まれるKoido S., Dendritic-Tumor Fusion Cell-Based Cancer Vaccines. Int'l J. Mol. Sci. 2016, 17, 828を参照されたい。

20

30

40

【0258】

いくつかの実施形態では、樹状-腫瘍融合細胞は、樹状細胞と腫瘍細胞を融合させるこ

50

とによって作製されるが、一方で、樹状細胞と腫瘍細胞の融合は、MINIONポリペプチドおよびMyomakerポリペプチドの発現によって促進される。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、MINIONポリペプチドをコードする核酸およびMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、MINIONポリペプチドをコードする核酸およびMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、樹状細胞が、MINIONポリペプチドをコードする核酸を含み、かつ腫瘍細胞が、Myomakerポリペプチドをコードする核酸を含むか、または逆もまた同様である。

【0259】

樹状細胞および/または腫瘍細胞は、自己または同種であり得る。例えば、同種のDC - 腫瘍FCワクチンを作製するための同種のDCの入手先としての健常ドナー由来のDCの使用が調査された。例えば、内容が全体として参照により本明細書に組み込まれるKoido, S.; Hara, E.; Homma, S.; Ohkusa, T.; Gong, J.; Tajiri, H. *Cancer immunotherapy by fusions of dendritic cells and tumor cells. Immunotherapy* 2009, 1, 49 - 62を参照されたい。あるいは、同種の腫瘍細胞株が、自己腫瘍細胞の代わりに使用されて、自己の腫瘍特異的な抗腫瘍免疫反応が誘導された。例えば、内容が全体として参照により本明細書に組み込まれるKoido, S.; Hara, E.; Homma, S.; Torii, A.; Toyama, Y.; Kawahara, H.; Watanabe, M.; Yanaga, K.; Fujise, K.; Tajiri, H.; et al. *Dendritic cells fused with allogeneic colorectal cancer cell line present multiple colorectal cancer - specific antigens and induce antitumor immunity against autologous tumor cells. Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 7891 - 7900; Koido, S.; Tanaka, Y.; Tajiri, H.; Gong, J. *Generation and functional assessment of antigen - specific T cells stimulated by fusions of dendritic cells and allogeneic breast cancer cells. Vaccine* 2007, 25, 2610 - 2619; Koido, S.; Hara, E.; Homma, S.; Namiki, Y.; Komita, H.; Takahara, A.; Nagasaki, E.; Ito, M.; Sagawa, Y.; Mitsunaga, M.; et al. *Dendritic/pancreatic carcinoma fusions for clinical use: Comparative functional analysis of healthy - versus patient - derived fusions. Clin. Immunol.* 2010, 135, 384 - 400を参照されたい。さらに、同種のDC株および同種の腫瘍細胞株を自己の細胞の代わりに使用してもよい。細胞株は十分に特徴付けがなされており、GMP基準下でインビトロにおいて十分に増殖させることができる。十分な同種成分を有するDC - 腫瘍FCワクチンは、臨床効果を誘導することが実証されている。内容が全体として参照により本明細書に組み込まれるMaerten, A.; Renoth, S.; Heinicke, T.; Albers, P.; Pauli, A.; Mey, U.; Caspari, R.; Flieger, D.; Hanfland, P.; von Ruecker, A.; et al. *Allogeneic dendritic cells fused with tumor cells: Preclinical results and outcome of a clinical phase I/II trial in patients with metastatic renal cell carcinoma. Hum. Gene Ther.* 2003, 14, 483 - 494を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0260】

いくつかの実施形態では、DCは免疫調節され得るが、例えば、腫瘍細胞に融合される前にトール様受容体(TLR)に対するアゴニストによって処理される。いくつかの実施形態では、DCは、免疫原性の腫瘍細胞、例えば、加熱またはエタノールにより処理された腫瘍細胞に融合され得る。いくつかの実施形態では、DCと免疫原性の全腫瘍細胞の融合が、高レベルのIFN- γ を産生する抗原特異的なCD4 $^{+}$ およびCD8 $^{+}$ T細胞を活性化する。

【0261】

いくつかの実施形態では、DCは、癌幹細胞(CSC)に融合され得る。例えば、DCは、OCT3/4、ABCG2、ネスチン、SOX2、Bmi-1、ノッチ-1、CD44、CD133、およびCD177を含む1つ以上の幹細胞マーカーを発現するCSCに融合され得る。いくつかの実施形態では、DCは、サバイピン、MUC1、hTERT、HER2、CERP55、COA-1、またはWT1を過剰発現するCSCに融合され得る。

10

【0262】

いくつかの実施形態では、樹状-腫瘍融合細胞は、1つ以上の腫瘍関連抗原(TAA)を含む。例示的な腫瘍関連抗原としては、フェトプロテイン(AFP)、癌胎児性抗原(CEA)、未成熟ラミニン受容体、TAG-72、HPV E6、HPV E7、BING-4、カルシウム活性化クロライドチャンネル2、サイクリン-B1、9D7、EpcAM、EphA3、Her2/neu、テロメラゼ、メソセリン、SAP-1、サバイピン、CT9、CT10、NY-ESO-1/LAGE-1、PRAME、SSX-2、Melan-A/MART-1、Gp100/pmel17、TRP-1、TRP-2、P.ポリペプチド、MC1R、前立腺特異的抗原(PSA)、 α -カテニン、BRCA1、BRCA2、CDK4、CML66、フィブロネクチン、MART-2、TGF-RII、CA-125、MUC-1、上皮性腫瘍抗原(ETA)、チロシナーゼ、メラノーマ抗原(BAGE)、CAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-6、メラノーマ関連抗原(MAGE)、肉腫抗原1(SAGE-1)、XAGE-1、XAGE-2、XAGE-3、Ras、p53などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0263】

さらに、本明細書に開示される癌ワクチンを用いて対象における癌を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される癌ワクチンは、注射、例えば、皮下、動脈内、静脈内、筋肉内、髄腔内、または腹腔内注射によって投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される癌ワクチンは、腫瘍内、経皮的、経粘膜的、経口的、鼻腔内、皮下、動脈内、静脈内、筋肉内、髄腔内、もしくは腹腔内、または経肺投与を介して投与される。

30

【0264】

筋ジストロフィーを治療する方法

本明細書で開示される組成物および方法は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)、ベッカー型筋ジストロフィー(BMD)、先天性筋ジストロフィー(CMD)、遠位型筋ジストロフィー、エメリ・ドレフュス型筋ジストロフィー(EDMD)、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FMD)、肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)、筋強直性筋ジストロフィー(MMD)、眼咽頭型筋ジストロフィー(Oculopharyngeal muscular dystrophy)(OMD)、三好ミオパチー(MM)、肢帯型筋ジストロフィー2B型(LGMD2B)、遠位型ミオパチー(DM)などの筋ジストロフィーを治療するために使用され得る。DMDのmdxマウスモデルにおける初期の研究は、筋系列または造血系列のいずれかから生じる外因的に送達された細胞が、細胞融合を介する筋線維形成に寄与できたことを示唆した(Gussoni et al., Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. Natu

40

50

re 1999, 401:390-394; Gibson et al., Dermal fibroblasts convert to a myogenic lineage in mdx mouse muscle. J Cell Sci 1995, 108 (Pt 1): 207-214). Myomakerの同定が細胞ベースの療法における融合誘導性の可能性を増大させる契機となり、それによって、それらの療法の補完の可能性が増大した。線維芽細胞および間葉系幹細胞など非筋由来細胞を利用する研究は、Myomakerの過剰発現が、インビボにおいてこれらの細胞の筋への融合を促進できたことを実際に実証した (Mitani et al., In vivo myomaker-mediated heterologous fusion and nuclear reprogramming. FASEB J 2017, 31:400-411)。

10

【0265】

したがって、本明細書では、本明細書で開示される組成物を用いて対象における筋ジストロフィーを治療する方法が提供される。いくつかの実施形態では、対象において筋ジストロフィーを治療する方法は、MINIONポリペプチドをコードする核酸を含む有効量の治療用細胞を対象に投与する工程を含み得る。いくつかの実施形態では、対象において筋ジストロフィーを治療する方法は、MINIONポリペプチドをコードする核酸およびMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む有効量の治療用細胞を対象に投与する工程を含み得る。代替的な実施形態において、本明細書では、対象における筋ジストロフィーの治療で使用するためのMINIONポリペプチドをコードする核酸および/またはMyomakerポリペプチドをコードする核酸を含む治療用細胞が提供され、ここで、有効量の治療用細胞が対象に投与される。

20

【0266】

いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体からなる。

30

【0267】

いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16、18、20、22、24、26、28、もしくは30、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、Myomakerポリペプチドは、配列番号16またはその変異体からなる。

40

【0268】

いくつかの実施形態では、対象において筋ジストロフィーを治療する方法は、MINIONポリペプチドをコードする核酸および同型相互作用を媒介する受容体をコードする核酸を含む有効量の治療用細胞を対象に投与する工程を含み得る。代替的な実施形態において、本明細書では、対象における筋ジストロフィーの治療で使用するためのMINIONポリペプチドをコードする核酸および同型相互作用を媒介する受容体をコードする核酸を含む治療用細胞が提供され、ここで、有効量の治療用細胞が対象に投与される。同型相互作用を媒介する受容体としては、例えば、カドヘリン (例えば、N-カドヘリン、P-カドヘリン、E-カドヘリン、またはM-カドヘリン)、セレクチン、クローディン、オクルーディン、接合部接着分子、またはトリセルリンが挙げられるが、これらに限定されな

50

い。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、またはその変異体から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号1またはその変異体からなる。いくつかの実施形態では、MINIONポリペプチドは、配列番号3またはその変異体からなる。

【0269】

いくつかの実施形態では、治療用細胞は、目的の遺伝子、例えば、機能障害性細胞において変異した遺伝子の正常なバージョンを、機能障害性細胞に導入し、それにより、機能障害性細胞における遺伝的異常を矯正することによって、機能障害性細胞の機能を回復させる場合がある。例えば、治療用細胞は、ジストロフィン遺伝子の正常なバージョンを含有し得る。治療用細胞は、自己または同種であり得る。治療用細胞が自己である実施形態では、治療用細胞の遺伝的異常は、当技術分野で知られる様々な遺伝子編集システムによって矯正され得る。本明細書で使用する場合、用語「遺伝子編集システム」は、1つ以上のDNA結合ドメインもしくは成分および1つ以上のDNA改変ドメインもしくは成分、または単離核酸、例えば、前記DNA結合およびDNA改変ドメインもしくは成分をコードする1つ以上のベクターを含むシステムを指す。遺伝子編集システムは、標的遺伝子の核酸を改変するため、および/または標的遺伝子の発現を調節するために使用される。既知の遺伝子編集システムにおいて、例えば、1つ以上のDNA結合ドメインまたは成分は、1つ以上のDNA改変ドメインまたは成分と関連付けられており、その結果、1つ以上のDNA結合ドメインが、1つ以上のDNA改変ドメインまたは成分を特定の核酸部位に標的化する。

【0270】

遺伝子編集システムは当技術分野で知られており、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN);規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列(CRISPR)/Casシステム、およびメガヌクレアーゼシステムを含むが、これらに限定されない。理論に束縛されるものではないが、既知の遺伝子編集システムは、治療的適用においてそれらの有用性にとって有害な望まれないDNA改変活性を示す場合があると考えられる。これらの懸念は、例えば、細胞をレンチウイルスまたはアデノウイルスベクタートランスフェクションを介するなどして遺伝子操作して、遺伝子編集システムの成分を構成的に発現する場合など、遺伝子または遺伝子発現のインビボ改変のための遺伝子編集システムの使用において特に明白である。

【0271】

本明細書で使用する場合、「CRISPR」は、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列のセット、またはこのような反復配列のセットを含むシステムを指す。本明細書で使用する場合、「Cas」は、CRISPRに関連付けられたタンパク質を指す。多様なCRISPR-Casシステムを、それらのエフェクターモジュールの構成に従って2つのクラスに分けることができる：クラス1 CRISPRシステムは、いくつかのCasタンパク質およびcrRNAを利用して、エフェクター複合体を形成する一方で、クラス2 CRISPRシステムは、干渉を媒介するcrRNAと組合わせた大きな単一成分のCasタンパク質を使用する。クラス2 CRISPR-Casシステムの一例は、Cpf1(プレボテラ(Prevotella)およびフランシセラ(Francisella)由来のCRISPR)を使用する。例えば、その全体が参照として本明細書に組み込まれるZetsche et al., Cell 163:759-771(2015)を参照されたい。本明細書で使用する場合、用語「Cpf1」は全てのオルソログ、およびCRISPRシステムにおいて使用できる変異体を含む。

【0272】

10

20

30

40

50

治療用細胞は、機能障害性細胞と同じまたは異なる細胞型であり得ると考えられる。例えば、治療用細胞は、筋芽細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、もしくは平滑筋細胞などの筋細胞；または線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、樹状細胞などの非筋細胞などであり得る。

【0273】

細胞運命およびリプログラミングを研究する方法

本明細書で開示される方法および組成物はさらに、細胞運命およびリプログラミングを研究、例えば、細胞分化中に発現されるか、または阻害される遺伝子を同定するために使用され得る。体細胞核リプログラミングの初期の研究は、ヘテロカリオン形成を誘導するためのPEG処理などの化学的方法に依存した（内容が全体として参照により本明細書に組み込まれるBlau et al., *Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons*. *Cell* 1983, 32: 1171-1180）。条件的/誘導型の系を介するMyomakerおよびMINIONの一過性の発現は、はるかに高度な融合の制御を可能にすることになり、核リプログラミングの経時的な動態に洞察をもたらすと考えられる。

10

【0274】

したがって、本明細書で開示される方法および組成物は、第1の細胞と第2の細胞を融合して安定したヘテロカリオン作製するために使用され得、ここで、第1の細胞は第2の細胞によってリプログラミングされるが、例えば、第1の細胞における1つ以上の遺伝子の発現が第2の細胞によって調節される。いくつかの実施形態では、第1および第2の細胞は、筋細胞、線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、樹状細胞、または腫瘍細胞から選択され得る。いくつかの実施形態では、第1の細胞および第2の細胞は、ヒト、サル、マウス、ラット、ブタなどの様々な種に由来する。いくつかの実施形態では、本方法は、例えば、融合前の第1の細胞の遺伝子発現プロファイルを安定したヘテロカリオンのものと比較することによって、調節される1つ以上の遺伝子を同定する工程を含み得る。

20

【0275】

医薬組成物

また、本明細書では、組成物、例えば、本明細書に記載される1種以上のMINIONポリペプチド（例えば、1種以上のヒトMINIONポリペプチド）、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）をコードする1種以上の核酸、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）を含む1種以上のリソソーム、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）を含む1種以上の治療用細胞、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）を含む1種以上の腫瘍溶解性ウイルス、またはMINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）を含む1種以上の癌ワクチンを含む医薬組成物が提供される。医薬組成物は通常、薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用する場合、用語「薬学的に許容される担体」は、薬剤の投与に適合する生理食塩水、溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などを含む。医薬組成物は通常、その目的の投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例としては、非経口（例えば、静脈内、動脈内、腹腔内）、経口、頭蓋内、髄腔内、鼻腔内（例えば、吸入）、皮内、皮下、または経粘膜の投与が挙げられる。

30

40

【0276】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、例えば、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウムなどの緩衝物質、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウムなどの塩または電解質、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシチル

50

セルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン - ポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリエチレングリコール、および羊毛脂を含む 1 種以上の薬学的に許容される担体を含む。

【0277】

好適な医薬組成物を製剤化する方法は当技術分野で知られており、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005; および the books in the series Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY) を参照されたい。例えば、非経口、皮内、髄腔内、または皮下用途に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分：注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート化剤；酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩などの緩衝液および塩化ナトリウムまたはブドウ糖などの浸透圧の調整用薬剤を含み得る。pH は、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整され得る。非経口製剤は、アンプル、ディスポーザブルシリンジまたはガラスもしくはプラスチック製の複数回投与バイアル内に封入され得る。

10

【0278】

注射用途に好適な医薬組成物は、例えば、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散体、および注射用滅菌溶液または分散体の即時調製のための滅菌粉末を含み得る。静脈内投与のために、好適な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。全ての場合について、組成物は無菌でなければならず、また容易に注射できる程度の流体でなければならない。それは、製造および貯蔵の条件下で安定であるべきであり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されているべきである。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状ポリエチレングリコール（polyethylene glycol）など）およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用、分散体の場合に必要とされる粒径の維持および界面活性剤の使用により維持することができる。微生物作用の予防は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、組成物中に、等張化剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射可能な組成物の持続的吸収は、組成物中に吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによりもたらされ得る。

20

30

【0279】

注射用滅菌溶液は、必要に応じて上掲の成分の 1 つまたは組み合わせによる適切な溶媒中に必要量の活性化化合物を組み込み、その後滅菌濾過を施すことにより調製することができる。

40

【0280】

一般に、分散体は、塩基性分散媒体および上掲の成分由来の必要な他の成分を含有する無菌溶媒に活性化化合物を組み込むことにより調製される。注射用滅菌溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、有効成分と任意の追加の所望成分の粉末を、予め滅菌濾過されたそれらの溶液から生成する真空乾燥およびフリーズドライである。

【0281】

非経口製剤は、単回ボラス用量、注入または負荷ボラス用量に続いて維持用量であり得る。これらの組成物は特定の固定または可変的な間隔、例えば 1 日に 1 回、または「必要に応じた」原則で投与することができる。

50

【0282】

注射用の好適な医薬組成物は、緩衝液（例えば、酢酸塩、リン酸塩またはクエン酸塩緩衝液）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート）、任意選択により安定剤（例えば、ヒトアルブミン）などを含み得る。抹消投与用の製剤は、滅菌水性溶液または滅菌非水性溶液、懸濁液、および乳剤を含む。非水性溶液の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水性担体は、例えば、水、アルコール性/水性溶液、乳剤または懸濁液を含み、生理食塩水および緩衝媒体を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、0.01 ~ 0.1 Mのリン酸緩衝液または0.8%の生理食塩水を含む。他の一般的な非経口溶媒としては、リン酸ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲル、または固定油が挙げられる。静脈内溶媒は、流体および栄養素補充液、電解質補充液、例えば、リンゲルデキストロースに基づくものなどを含む。保存剤および他の添加剤、例えば抗菌薬、抗酸化剤、キレート化剤および不活性ガスなどもまた、存在してもよい。

10

【0283】

経口組成物は通常、不活性希釈剤または可食性の担体を含む。経口治療投与の目的のために、活性化合物を賦形剤とともに組み込むことができ、錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤、例えば、ゼラチンカプセル剤の形態で使用することができる。経口組成物は、うがい薬として使用するために、流体担体を使用して調製することもできる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント物質は、組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分のいずれか、または同様な性質の化合物：結合剤、例えば、微結晶性セルロース、トラガカントゴムもしくはゼラチン；賦形剤、例えば、デンプンもしくはラクトース、崩壊剤、例えばアルギン酸、Primogel、もしくはトウモロコシデンプン；潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくはSterotes；流動促進剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、例えば、スクロースもしくはサッカリン；または着香剤、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ着香料を含有することができる。

20

【0284】

吸入による投与のために、化合物を、好適な噴射剤、例えば、二酸化炭素などのガスを含有する加圧された容器またはディスペンサーまたはネブライザーから、エアロゾルスプレーの形態で送達することができる。このような方法は、米国特許第6,468,798号明細書に記載されるものを含む。本明細書に記載される治療用化合物の全身投与は、経粘膜または経皮的な手段によることもできる。経粘膜または経皮投与のために、バリアを透過するために適切な浸透剤が製剤中で使用される。このような浸透剤は、当技術分野において一般的に知られており、例えば、経粘膜投与のためには、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻腔スプレー剤または坐剤の使用により遂行することができる。経皮投与のためには、活性化合物が、当技術分野で一般的に知られている軟膏剤、膏薬、ゲル剤、またはクリーム剤に製剤化される。

30

【0285】

一実施形態では、治療用化合物は、埋め込みおよびマイクロカプセル化された送達システムを含む制御放出製剤などの、身体からの急速な排出に対して治療用化合物を保護することになる担体を用いて調製される。

40

【0286】

医薬組成物は、容器、パック、またはディスペンサー中に、投与のための指示書と合わせて含まれ得る。

【0287】

非限定的な例において、少なくとも1種の医薬品を含有する医薬組成物が、液剤（例えば、熱硬化性液剤）として、固体の構成要素（例えば、粉末または生分解性生体適合性ポリマー（例えば、カチオン性生分解性生体適合性ポリマー））として、またはゲルの構成要素（例えば、生分解性生体適合性ポリマー）として製剤化される。いくつかの実施形態

50

では、少なくとも1種の医薬品を含有する少なくとも組成物が、アルギン酸塩ゲル（例えば、アルギン酸ナトリウム）、セルロース系ゲル（例えば、カルボキシメチルセルロースまたはカルボキシエチルセルロース）、またはキトサン系ゲル（例えば、キトサングリセロホスフェート）の群から選択されるゲルとして製剤化される。本明細書に記載される医薬組成物のいずれかを製剤化するために使用され得る薬物溶出性ポリマーの追加の非限定的な例としては、カラゲニン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコールと組み合わせられたデキストラン、ポリアクリル酸と組み合わせられたデキストラン、ポリガラクトロン酸、ガラクトロン多糖、ポリ乳酸（polylactide）、ポリグリコール酸、タマリンドガム、キサンタムガム、セルロースガム、グアーガム（カルボキシメチルグアー）、ペクチン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、N-イソプロピルポリアクリルアミド、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン、プルロン酸、ポリ乳酸、シクロデキストリン、シクロアミロース、レジリン、ポリブタジエン、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド（HPMA）コポリマー、無水マレイン酸-アルキルビニルエーテル、ポリデブシペプチド、ポリヒドロキシブチレート、ポリカプロラクトン、ポリジオキサノン、ポリエチレングリコール、ポリオルガノホスファゼン、ポリオルトエステル、ポリビニルピロリドン、乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA）、ポリ酸無水物、ポリサイラミン、ポリN-ビニルカプロラクタム、およびジェランが挙げられる。

10

【0288】

「有効量」は、有利なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量である。例えば、治療量は、所望の治療効果を達成するものである。この量は、疾患または疾患症状の発症を予防するのに必要な量である予防有効量と同じであっても、異なってもよい。有効量を1回以上の投与、適用または投薬において投与することができる。治療用化合物の治療有効量（すなわち、有効な投与量）は、選択される治療用化合物に依存する。組成物は、1日当たり1回以上から、1日おきに1回を含む1週間当たり1回以上投与することができる。当業者は、疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の全体的な健康状態および/または年齢、ならびに存在する他の疾患を含むがこれらに限定されない、一定の因子が対象を効果的に治療するのに必要な投与量および時機に影響し得ることを理解するであろう。さらに、治療有効量の明細書に記載の治療用化合物による対象の治療は、1回の治療または一連の治療を含み得る。

20

30

【0289】

治療用化合物の投与量、毒性および治療有効性は、細胞培養または実験動物における、例えば、LD50（集団の50%において致死的な用量）、およびED50（集団の50%において治療上有効な用量）を決定するための標準的な薬学的手順により決定することができる。毒性と治療効果の間の用量比が治療指数であり、それはLD50/ED50の比率として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物が使用されることもあるが、感染されていない細胞を損傷する可能性を最小化して、それにより、副作用を低減するために、このような化合物を罹患した組織の部位に標的化する送達システムを設計するように注意が払われるべきである。

【0290】

細胞培養アッセイおよび動物試験から得られるデータを使用して、ヒトで使用するための投与量の範囲を製剤化することができる。そのような化合物の投与量は、毒性がほとんどまたは全くなく、ED50を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で変化してもよい。本発明の方法で使用される任意の化合物のために、治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから概算することができる。用量は、細胞培養で決定されたIC50（すなわち、症状の最大半量の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環する血漿中の濃度範囲を達成するように、動物モデルで製剤化され得る。このような情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定され得る。

40

50

【0291】

キット

また、本明細書に記載される1種以上のMINIONポリペプチド（例えば、1種以上のヒトMINIONポリペプチド）、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）をコードする1種以上の核酸、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）を含む1種以上のリボソーム、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）を含む1種以上の細胞、MINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）を含む1種以上の腫瘍溶解性ウイルス、またはMINIONポリペプチド（例えば、ヒトMINIONポリペプチド）を含む1種以上の癌ワクチン、および使用のための指示書を含むキットが提供される。使用のための指示書は、疾患の診断または治療のための指示書を含み得る。本明細書で提供されるキットは、本明細書に記載される方法のいずれかに従って使用され得る。当業者は、本明細書で提供されるキットについて他の好適な用途を知っており、キットをそのような用途に用いることができるであろう。本明細書で提供されるキットはまた、分析用試料を、例えば研究室に返送するため使用することができる郵送用容器（例えば、郵便料金支払い済みの封筒または郵送パック）を含むことができる。キットは、試料のための1つ以上の容器を含むことができ、すなわち、試料は、標準的な血液収集バイアル中にあり得る。キットは、1つ以上のインフォームド Consent 用紙、試験要求用紙、および本明細書に記載される方法においてキットをどのように使用するかに関する指示書を含むことができる。このようなキットを使用するための方法も本明細書に含まれる。1つ以上の用紙（例えば、試験要求用紙）および試料を保存する容器を、例えば、試料を提供した対象を同定するためのバーコードでコード化することができる。

10

20

【0292】

当業者は、本明細書に記載されるものと同様のまたは等価の多くの方法および材料を認識し、それらを本発明の実施で使用することができるであろう。実際に、本発明は、記載された方法および材料に一切限定されることはない。

【実施例】

【0293】

本発明を以下の実施例でさらに説明するが、これらの実施例は請求項に記載される本発明の範囲を限定しない。

30

【0294】

実施例1：材料および方法

以下の材料および方法は、実施例2～6において使用される。

【0295】

動物

全ての動物実験はGNF IACUCによって承認されており、承認されたガイドラインに従って実施された。C57BL/6Jマウスを自社での飼育により入手した。自社内で作製された遺伝子操作されたマウスに関する詳細については、後の「CRISPR/Cas9 媒介性遺伝子編集によるMINIONノックアウトマウスの作製」の項を参照されたい。

40

【0296】

心臓毒（CTX）損傷モデル

心臓毒（CTX）損傷モデルは、マウス骨格筋再生を研究するための十分に確立されたモデルである。ナジャ・モザンビカ・モザンビカ（*Naja mossambica mossambica*）由来のCTX（Sigma C9759）を生理食塩水（0.9% w/vのNaCl）中に溶解させて、10 μMの標準溶液を作製し、これを等分し、-20℃で保存した。イソフルラン（酸素中1.5%～2%）によるマウスの麻酔後、成体マウスの後肢（8～10週のC57BL/6）の前側面を70%エタノールで滅菌し、剪毛して肌を暴露させ、約50 μLのCTX溶液を前脛骨（TA）の筋腹中央部に0.3 ml U100 BDインスリンシリンジを用いて注射した。TA筋を採取し、CTX後の

50

様々な時点で調べた。CTX注射をしていないか、または同量の生理食塩水を注射した同様の週齢の成体マウスを対照として使用した。

【0297】

マウス骨格筋のRNAシーケンシング

12匹の8~10週齢C57BL/6マウスを、上述のようにCTXでTA筋に注射し、それらのTA筋を、CTX注射後1、3、5、7日目に各時点につき3匹のマウスでそれぞれ採取した。3匹の8~10週齢の未損傷マウスのTA筋もまた採取した。各筋試料の総RNAをTRIzol試薬(Thermo Fisher 15596026)によって製造業者の指示書に従って単離し、Qiagen RNeasyカラムによって精製した。RNA試料(各時点につき3つの複製物)を、品質検査、ライブラリー調製、および次世代シングルリードシーケンシングのための社内のシーケンシングおよび発現解析中核(Sequencing and Expression Analysis Core)に渡した。1マイクログラムの総RNAを使用して、Illumina適合性のシーケンシングライブラリーを作製し、ライブラリーを50bpのシングルリードを用いて、Illumina HiSeq 1000上で配列決定した。リードをマウスのトランスクリプトーム(2013年3月時点のRefseqマウス転写物)にBWA(H. Li, et al., Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754, 2009)を用いてアラインメントした。1試料当たり平均で3600万個のリードをマウスのトランスクリプトームにマッピングした。生データを解析するために、100万のマッピングされたリード当たりの転写物のキロベース当たりのリード(RPKM)を各時点の各遺伝子について算出し、CTX後1、3、5、7日の各遺伝子のRPKMを未損傷筋のものに正規化し、結果を平均して発現レベルの倍率変化を生成した。次に、データを2つの方法で解析した: 1) 未損傷筋と比較してCTX後3日目の筋において100倍超の増加を示した遺伝子を選択した; 2) 100コドン未満のオープンリーディングフレーム(ORF)を含有すると推定される遺伝子を選択した。次に、両基準を満たす遺伝子を選択し、さらに、未分化および分化筋芽細胞およびC2C12不死化筋芽細胞由来の内製のRNA-Seqデータに対して検討した。sMINIONは、動的に発現しただけでなく、未分化および分化筋芽細胞試料間で10倍を超える倍率変化を示したごく小さなORFであった。

10

20

30

【0298】

CRISPR/Cas9媒介性遺伝子編集によるMINIONノックアウトマウスの作製
4週齢の雌C57BL/6Jマウスを5IUの妊馬血清性ゴナドトロピン(PMSG)の腹腔内注射の後、47時間後の5IUのヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)の注射によって過剰排卵させた。HCG注射の直後に雌マウスを1:1でC57BL/6J雄マウスと交配した。翌朝、雌を交尾栓および交尾栓を持つ雌の輸卵管から採取した接合体について確認した。インビトロで転写されたCas9のmRNA(100ng/μL)と2種のgRNA(50ng/μL)を、受精した接合体の前核に同時注入した。注入処置を生き延びた接合体を(50~60胚/輸卵管)の偽妊娠ICR受容雌の1つの輸卵管に移植した。注入された胚から作製されたマウスの遺伝子型を同定し、配列決定して(後述のゲノム改変のためのアッセイを参照のこと)、MINIONのゲノム領域内での変異の存在を判定した。次に、変異体を樹立した動物をC57BL/6Jマウスに交配し、子孫を生殖細胞系列伝達について解析した。

40

【0299】

インビトロで転写されたCas9のmRNAを作製するために、10bpのスペーサーとT7プロモーターを、内製のコンストラクト(pCR-Blunt II-TOPO-NLS-Cas9-NLS)からのPCR増幅によってストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)のCas9のコード領域に付加し、増幅されたゲル精製Cas9のPCR産物を、mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRAキット(Life Technologies)を用いるインビトロ転写

50

のための鋳型として使用した。インビトロ転写された gRNA を作製するために、最初に 2 つのオリゴヌクレオチドを合成した (IDT) :

オリゴヌクレオチド 1 :

5' TTAATACGACTCACTATAG - (gRNA プロトスペーサー) - GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCG
(それぞれ、配列番号 67 および 95)

オリゴヌクレオチド 2 :

【化 1】

5'AAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTAT
TTTAACTT (配列番号 68)

10

。
【0300】

オリゴヌクレオチドのアニーリング後の PCR 増幅の後に、5' 末端に追加の「G」を有する T7 プロモーター (オリゴヌクレオチド 1 を参照) を gRNA に付加した。増幅されたゲル精製 gRNA の PCR 産物を、MEGAshortscript T7 キット (Life Technologies) を用いるインビトロ転写の鋳型として使用した。Cas9 の mRNA と gRNA の両方を、MEGAclear キット (Life Technologies) を用いて精製し、RNase フリー水に溶出した。マウス MINION の ORF 領域を標的化する gRNA のプロトスペーサー配列は次のとおりである: sgRNA 1: 5' GGACCGGGCCGTCGTGGAGG (配列番号 69); sgRNA 2: 5' CCAGAGTGGACCACTCCAG (配列番号 70) 135 bp 欠失アレルの作製用; sgRNA 3: 5' GCGGGCAACAAGGCAGCAGC (配列番号 104); および sgRNA 4: 5' CTGGGAGTGGTCCACTCTGG (配列番号 105) 155 bp 欠失アレルの作製用。

20

【0301】

ゲノム改変および遺伝子型同定のためのアッセイ

注入された胚から生じるマウスにおける変異を検出するために、標的化された領域に隣接するプライマー: Seq-F: 5' FGAGTGAACCTTAACCAAGCTTTC (配列番号 71); Seq-R: 5' GCGTTGCTGTTTCCAGGACCCGTG (配列番号 72) を用いて PCR を行った。PCR 産物を、製造業者の指示書に従って Surveyor アッセイにおいて使用した。次に、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動によって分析し、選択された産物を PCR-blunt-クローニングベクターにクローン化し、配列決定した。標的領域に変異を含有するマウスを交配して、生殖細胞系列伝達を確認した。変異を有するマウス系統の中で、MINION の ORF 内に 135 bp のインフレーム欠失を有するものをさらなる分析のために選択した。

30

【0302】

135 bp 欠失を有する次の子孫の遺伝子型同定のために、標的化される領域に隣接するプライマーセット: F0: 5' -CAAAGGGAGGGAGGGATTAAAG-3' (配列番号 73); R0: 5' -CAGAGAGGAAGGGTCAATCAAC-3' (配列番号 74) を使用して、ゲノム DNA を増幅し、非改変アレル由来の約 760 bp の産物および変異したアレル由来の約 625 bp の産物をそれぞれ作製した。155 bp 欠失アレルを保有する子孫の遺伝子型同定のために、異なるプライマーセット: Fwd-2: 5' AACACAATCTGTAGCCTGCTAGGAG (配列番号 106); および Rev-2: 5' TATAAGCTGAAGGGAGGACTCCAC (配列番号 107) を使用してゲノム DNA を増幅し、非改変アレル由来の約 555 bp の産物および変異体アレル由来の約 400 bp の産物をそれぞれ作製した。PCR 産物を、2% アガロース (Sigma A9539) を用いるゲル電気泳動によって分離した。野生型マウスが、より大きなサイズの単一バンドを示す一方で、欠失を含有するホモ接合体は、

40

50

より小さいサイズの単一バンドを示し、ヘテロ接合体は両方のバンドを示す。

【0303】

筋芽細胞の単離

マウス胚性筋芽細胞の単離のために、妊娠 C57BL/6J マウスを人道的に安楽死させ、その胚を迅速ではあるが丁寧に解剖し、1×抗生物質-抗真菌剤 (Gibco 15240062) を含むハムの F10 栄養混合物 (Gibco 11550043) を含有する解剖緩衝液中に置いた。各胚について、遺伝子型同定用の番号付けしたチューブに尾部を保存し、一方で全ての四肢については、皮をはぎ、解剖し、4 mg/ml の I I 型コラゲナーゼ (Worthington LS004176; 使用前に新たに作製され、濾過される) を含む約 1.5 ml の解剖緩衝液を含有する番号付けした 2 ml のエッペンドルフチューブ中に置いた。筋が大部分消化され、骨と軟組織のみが残るまで、試料を 80 rpm および 37 °C で 30~45 分間プラットフォームロッカー上で回転させた。一般に、初期胚はより短いインキュベーション時間が求められた。各段階の後に細胞懸濁液を顕微鏡で確認して、過剰な消化を回避した。不必要な組織を室温で定着させた後、上清を 50 ml コニカルチューブに移した。次に、ディスパーゼ I I (Gibco 17105041) を、1.2 mg/ml 以上の最終濃度 (> 0.6 U/ml) で両チューブに添加した: (1) 50 ml チューブ中の上清については、細胞を随時混合しながら 37 °C で 20~30 分間インキュベートした; (2) 2 ml チューブ (4 mg/ml の I I 型コラゲナーゼと 1.2 mg/ml 以上のディスパーゼ I I を含む 1.5 ml の新たに作製し濾過した解剖緩衝液) 中に残存している組織については、チューブを 80 rpm および 37 °C で 20~30 分間ロッカー上でさらに回転させて、さらに消化および解離させた。

【0304】

解離後、2 ml チューブ中の懸濁液を 50 ml チューブのものと混合した。次に、約 4~5 倍の洗浄培地 (ハムの F10 および 10% ウマ血清、濾過済み) を添加した後、消化された混合物を、細心に気泡を防ぎながら 10 ml の 20 ゲージ針にゆっくりと丁寧に約 4 回通過させた。次に、さらなる洗浄培地を添加して、最終体積を 30 ml にした。この懸濁液を、新しい 50 ml のコニカルチューブの口上において予洗した 40 μm のナイロンメッシュフィルターで濾過し、フィルターを 10 ml の洗浄培地で同じチューブ中にすすいだ。次に、全ての 50 ml チューブを室温で 5 分間 125 g により遠心分離し、上清を移して、125 g で再度 5 分間スピンドウンした。2 回の遠心分離から得たペレットを再懸濁し、2 ml の筋芽細胞単離培地中で混合した後、DMEM 低グルコース (Gibco 11885084) とハムの F-10 栄養混合物 (Gibco 11550043) の 1:1 混合物; 20% (v/v) FBS; 1×抗生物質-抗真菌剤; および新たに添加された 2.5 ng/ml の rhFGF (Promega G5071) を含有する 20 ml の培地を添加した。DMEM を欠くが上記の残りの品目を含有する培地もまた、同様の結果をもたらした。

【0305】

まず、各胚から単離された細胞混合物を定型の 150 mm TC 処理ディッシュに 37 °C で 30 分間蒔き (前プレート I)、線維芽細胞を排除するために別の 150 mm ディッシュに 37 °C で 30 分間再び蒔き (前プレート I I)、次に、主に筋芽細胞を含有する上清を、2 つの 100 mm コラーゲンコーティングディッシュに移した。翌日、細胞を調べて、継代の必要性を判定した。場合により、前プレート I I ディッシュは幾分か筋芽細胞も含有し、これらを、コラーゲンディッシュにおけるもののほかに、維持し、増殖させた。0.05% のトリプシンが、ディッシュから細胞を解離するために使用された。数回の継代後、1×抗生物質-抗真菌剤を 1×ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco (登録商標)) で置き換えた。培養液中の線維芽細胞の数が減少するにつれて、胚性筋芽細胞が非常にゆっくりと増殖し始め得るが、それらをより密に播種して、緩徐な増殖から回復させなければならない。

【0306】

成体マウスの筋芽細胞を、若干の変更はあるものの同様にして単離した: 筋を骨から取

り出し、小型のはさみで刻んだ；2 ml のチューブの代わりに15 ml のコニカルチューブを使用し、2 倍の体積の消化緩衝液を用いた；より長い消化時間および解離時間を用いた。

【0307】

インビトロ筋芽細胞分化アッセイ

胚および成体マウスの両方に由来する初代筋芽細胞については、50 μ l の筋芽細胞増殖培地（DMEM低グルコースとハムのF-10栄養混合物の1：1混合物；20%（v/v）FBS；新たに添加された2.5 ng/ml rhFGF）中の約3000個の細胞を、画像化のために384ウェルコラーゲンコーティングPerkinElmer CellCarrier（商標）プレート（6007550）の各ウェルに播種した。翌日、分化培地（3%～5%のウマ血清を含むDMEM高グルコース（Gibco（登録商標）11995073））を細胞に添加した（DM0日目）。分化培地を毎日置き換えた。免疫蛍光染色のために、細胞をDM3日目および4日目で固定した。C2C12細胞については、約1500～2000個の細胞を384ウェルプレート（10%FBSを含むDMEM高グルコース）の各ウェルに播種し、約 2×10^5 個の細胞を、C2C12増殖培地（10%FBSを含むDMEM高グルコース）を用いて6ウェルプレートの各ウェルに播種した。翌日、分化培地（2%のウマ血清を含むDMEM高グルコース）を、細胞（DM0日目）に添加し、分化培地を同様に毎日置き換えた。細胞を、記載のとおり異なる時点で回収し、かつ固定した。

10

【0308】

組織学

胚の試料を有するパラフィン切片については、マウス胚（E14.5以降）を断頭し、尾部を遺伝子型同定のために番号付けしたチューブに回収した。後期胚（E17.5以降）における固定を向上させるために、試験される領域において胚の皮をはいだ。胚を、4%パラホルムアルデヒド（PFA：Electron Microscopy Sciences #15714）を用いて、PBS中4で緩やかに回転させながら一晚固定した。PBSで素早く2回すすいだ後、脱水および長期保存のために胚を70%エタノール中に置いた。試験される組織/臓器については、適切な部分を切断し、常用のプロトコルを用いるパラフィン包埋および切片化にかけた。

20

【0309】

成体マウス組織の凍結切片については、骨格筋試料を解剖し、木製だば上で部分的にトラガントゴム（Sigma G1128；PBS中10% w/v）に包埋し、液体窒素で冷却されたガラスビーカー中の2-メチルブタン中で凍結した。次に、新鮮な凍結筋試料を、-20に冷却されたクリオスタットを用いて10 μ m厚で切片にした。次に、これらの新鮮な凍結筋切片を、後の染色処置の前に、PBSで希釈された1%PFA中において室温で5分間固定した。凍結切片およびパラフィン切片の両方を、常用のプロトコルに従ってヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）で染色した。

30

【0310】

組織切片の免疫蛍光染色

筋凍結切片については、上記のように1%PFA/PBSによる固定の後、スライドをPBSで洗浄し、PBSで希釈された0.2%Triton X-100により室温で10分間透過処理し、続いて、PBSで再度洗浄した。切片を、PBS中の1%加熱不活性化したロバ血清、1%BSA、0.025%Tween 20を含有する新たに調製され、濾過された溶液を用いて、室温で1時間ブロックした。ブロックの後、切片を一次抗体とともに4で一晩インキュベートし、PBSで洗浄し、続いて、二次抗体とともに室温で2時間インキュベートした。PBSで5分間洗浄後、切片を、PBS中において1：20,000に希釈した核染色DAPI（Molecular Probes D1306；5mg/ml原液）とインキュベートし、スライドをImmumount（Shandon）およびカバーガラスを用いて、マウントし、密封した。胚性組織を含むパラフィン切片については、脱パラフィン化および再水和したスライドをPBS中の0.2%

40

50

のTriton X-100で10分間透過処理し、PBSで再度洗浄した。次に、切片を、PBS中の5%の加熱不活性化した正常ヤギ血清を含有する新たに作製され、濾過された溶液を用いて、室温で1時間ブロッキングした。ブロッキングの後、同様の手順を凍結切片について前述のとおり実施した。

【0311】

免疫蛍光のために使用される一次抗体は：マウス抗MHC（MY32クローン、Sigma M4276、パラフィン切片上で1：300の希釈および凍結切片上で1：500の希釈）；マウス抗デスミン（D33クローン、DAKO M0760、1：300の希釈）；ヒツジ抗MINION（R&D systems AF4580；1：200希釈）であった。全ての二次抗体（Invitrogen Alexa-Fluor）を1：250の希釈で使用し、宿主種はロバまたはヤギのいずれかであった。同じ宿主種由来の二次抗体のみが、共染色のために一緒に使用された。

10

【0312】

接着細胞による免疫蛍光染色

線維芽細胞および筋芽細胞中のアクチンフィラメントの免疫蛍光染色のために、高親和性F-アクチンプローブAlexa Fluor 546コンジュゲートファロイジン（Invitrogen、A22283）を製造業者の指示書に従って使用した。略述すると、384ウェルPerkinElmer Cell Carrierプレートを再び使用した。細胞をPBS中の4%PFAで8~10分間固定し、PBSで素早く2回洗浄し、その後、PBS中の0.2%Triton X-100で10分間透過処理した。PBSによる1回の洗浄後、細胞を、PBS中の新たに作製し、濾過した5%の加熱不活性化した正常ヤギ血清で1時間ブロッキングし、一次抗体とともに4で一晩インキュベートした。翌日、PBSにより素早く2回洗浄した後、細胞を二次抗体とともに室温で1~2時間インキュベートした。PBSにより素早く3回洗浄した後、細胞をDAPI（5mg/ml原液、PBS中で1：20,000の希釈）とともに10分間インキュベートした。次に、384ウェルプレートを、UltraVIEW共焦点画像化システムまたはImageXpress Micro（IXM；Molecular Devices）共焦点画像化システム（下記の顕微鏡法の部を参照のこと）のいずれかを用いて画像化した。

20

【0313】

使用された一次抗体は：マウス抗MHC（MY32クローン、Sigma M4276、1：400の希釈）；マウス抗デスミン（D33クローン、DAKO M0760、1：300の希釈）であった。全ての二次抗体（Invitrogen Alexa-Fluor）を1：250の希釈で使用し、宿主種はロバまたはヤギのいずれかであった。同じ宿主種由来の二次抗体のみが、共染色のために一緒に使用された。

30

【0314】

顕微鏡法および画像化

Invitrogen EVOS FL Auto画像化システムを、免疫蛍光染色、GFPウイルス感染、および細胞標識の常用の試験のために使用した。スライドガラス上のH&Eおよび免疫染色された組織切片の画像化のために、Hamamatsu NanoZoomerおよびAperio VERSAスキャナーを使用して、20x対物レンズを用いてスライド全体の画像を取得した。384ウェルプレート中の免疫蛍光細胞試料の画像化のために、IXM共焦点ハイコンテンツイメージングシステムを、10xおよび20x対物レンズとともに使用した。組織切片および細胞試料に対するより高解像度の画像を得るために、UltraVIEW VoX 3D生細胞イメージングシステム（PerkinElmer）スピニングディスク共焦点顕微鏡システムを、40xおよび60x対物レンズとともに使用した。全マウス胚の全ての写真を、Leica KL200 LED解剖顕微鏡と組合わせたiPhone 5Sを用いて取得した。

40

【0315】

細胞培養

後期マウス胚および成体マウスから単離された初代筋芽細胞の培養のために、新たに添

50

加された 2.5 ng/ml の rhFGF を含む濾過された筋芽細胞増殖培地 (DMEM 低グルコースとハムの F-10 栄養混合物の $1:1$ 混合物; $20\% \text{ FBS}$) を使用した。一般に、約 $2 \sim 4 \times 10^5$ 個の細胞を、 100 mm コラーゲンコーティングディッシュに播種し、細胞を、増殖速度に応じて、 $2 \sim 3$ 日に1回、 $1:2 \sim 1:4$ の比で分割した。 0.05% のトリプシンが、ディッシュから細胞を解離するために使用された。筋芽細胞は通常、大部分の線維芽細胞の除去後にクライシス期を経たが、この時点でより密に播種することができた。培養液中の初代筋芽細胞を毎日監視し、必要に応じて新鮮な培地と置き換えた。不死化 C2C12 筋芽細胞 (ATCC) の培養のために、濾過された C2C12 増殖培地 ($10\% \text{ FBS}$ を含む DMEM 高グルコース) を使用した。約 $1 \sim 1.5 \times 10^5$ 個の細胞を、 100 mm の組織培養処理済みディッシュに播種し、細胞を2日おきに分割した。 0.25% のトリプシンを細胞の解離のために使用した。不死化 $10\text{T}1/2$ 線維芽細胞株の培養のために、濾過された線維芽細胞増殖培地 ($15\% \text{ FBS}$ を含む DMEM 高グルコース) を使用した。約 1×10^5 個の細胞を、 100 mm の組織培養処理済みディッシュに播種し、細胞を3日おきに1回分割した。 0.25% のトリプシンを細胞の解離のために使用した。不死化 $\text{RAW}264.7$ マクロファージ株の培養のために、 $10\% \text{ FBS}$ を含む DMEM 高グルコースを含有する濾過された増殖培地を使用した。約 $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞を、 175 cm^2 フラスコに播種した。細胞を、それらが約 $60 \sim 75\%$ コンフルエントであった場合に、 $2 \sim 3$ 日に1回分割した。細胞の取り出しを確実にし、細胞死を減少させるために、 0.25% のトリプシンおよびセルスクレーパーを組合わせて使用した。多核破骨細胞様細胞の形成を誘導するために、 50 ng/ml の sRANKL (PeproTech 、 174 アミノ酸) を、細胞とともに3日間インキュベートした。 129 マウス由来の CJ7 胚性幹細胞の培養のために、 $15\% \text{ FBS}$ ならびに3つの阻害剤: 培地に付いてくる GSK3 阻害剤; MEK 阻害剤 PD184352 (終濃度 $0.8 \mu\text{M}$); および FGFR 阻害剤 PD173074 (終濃度 $0.1 \mu\text{M}$) を含む $\text{ESGRO Complete PLUS}$ 培地 ($\text{Millipore SF001-500P}$) からなる、新たに作製され、濾過された増殖培地を使用した。通常、細胞は、標準的な手順に従って、マウス胚性線維芽細胞と共培養されたが、 RNA およびタンパク質の単離のために、線維芽細胞フィーダー層を有しないゼラチンコーティングディッシュに播種された。約 1×10^6 個の細胞を、各 100 mm ディッシュに播種した。培地を毎日置き換えた。細胞を、実験的必要性に応じて $1:5 \sim 1:10$ の比で2日に1回分割した。 0.05% のトリプシンを細胞の解離のために使用した。全ての細胞培養培地は、他に断りがないければ、 100 ユニット/ml のペニシリンおよび $100 \mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを含有した。

10

20

30

【0316】

タンパク質分析のための組織および細胞溶解物の調製

胚性と成体の両方のマウス組織試料を計量し、液体窒素中で急速凍結し、使用するまで -80 で保存した。タンパク質溶解物の調製のために、8倍量の氷冷溶解緩衝液 ($2 \times \text{Halt}$ プロテアーゼ阻害剤カクテルおよび $1 \times \text{Roche PhosSTOP}$ ホスファターゼ阻害剤カクテルを新たに添加した、 50 mM Tris-HCl $\text{pH} 7.5$ 、 150 mM NaCl 、 1 mM EDTA 、 $10\% \text{グリセロール}$) ならびに $1 \sim 23 \text{ mm}$ のタングステンカーバイドビーズ (Qiagen) を、 1.5 ml または 2.0 ml のエッペンドルフチューブ中の各試料に添加した。次に、これらを Tissue Lysor I を使用して 4 で $3 \sim 8$ 分間、 30 サイクル/秒でホモジナイズした。次に、溶解物に、最終濃度 0.1% の SDS 、 0.1% のデオキシコール酸ナトリウムおよび 1% の Triton X 100 まで界面活性剤を添加し、試料を 4 で $2 \sim 4$ 時間回転させた。次に、溶解物を新しいチューブに移し、 4 で 10 分間、 $15000 \sim 21000 \text{ g}$ でスピンドウンした。多量の脂質を含有する臓器については、上清を移し、 4 で 10 分間、 $15000 \sim 21000 \text{ g}$ で再度スピンドウンした。

40

【0317】

細胞試料のために、 Alfa Aesar 製の緩衝液 (J60423) を通常は使用し

50

た（上記のプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテルを含む、50 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、5%グリセロール、0.1% SDS、0.5%デオキシコール酸ナトリウムおよび1% Triton X 100）。細胞をDPBSで素早くすすぎ、続いて、約300 μ Lの氷冷溶解緩衝液を、6ウェルプレートの各ウェルに添加した。氷上での5分間のインキュベーション後、細胞をピペティングし、1.5 mLのエピペンドルフチューブに移し、10分おきに1秒間のボルテックスを行いながら氷上で30分間インキュベートした。次に、試料を4 で10分間、15000~21000 gでスピンドウンした。イオン性界面活性剤を含まない第2の緩衝液を一部の実験に使用し（上記のプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテルを含む、50 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、10%グリセロール、1 mM EDTA、および1% Triton X 100）、同様の結果を得た。BSA標準液によるBio-Rad DCタンパク質アッセイを実施して、上清のタンパク質濃度を測定した。溶解物を、NuPAGE LDS試料緩衝液（NP0007）およびジチオスレイトール（終濃度100 mM）と混合し、SDS-PAGEの前に94 で10分間煮沸した。

10

【0318】

細胞内分画分析

分化培地で3日間インキュベートされたC2C12細胞を、製造業者の指示書に従ってQproteome Cell Compartmentシステム（Qiagen、37502）を用いる細胞内分画試験のために使用した。まず、細胞をディッシュから解離し、その後キットの第1緩衝液を添加した。細胞質ゾル/膜/核/細胞骨格画分を細胞から抽出し、各画分からの約10 μ gのタンパク質溶解物をウェスタンブロットに対してロードした。

20

【0319】

SDS-PAGEおよびウェスタンブロット

約10~30 μ gの細胞溶解物および40~60 μ gの組織溶解物を各ウェルにロードした。タンパク質の分離のためにNuPAGE Novexゲル電気泳動システムを使用した。NuPAGE MES SDSランニング緩衝液（NP0002）および4~12%のNuPAGE Novex Bis-Trisゲルを使用した。タンパク質を、iBlot転写システム（Thermo Fisher）を用いてPVDFまたはニトロセルロース膜に転写した。通常、TBST（137 mM NaCl、20 mM Tris、0.1% Tween-20、pH7.6）中に新たに調製された5%ミルクを、PVDFおよびニトロセルロース膜の両方と用いるブロッキング緩衝液として使用した。しかし、ヒツジで産生された一次抗体を用いるMINIONの検出については、TBST中に新たに作製し、濾過された10%口バ血清を、PVDF膜（Millipore Immobilon-PSQ、0.2 μ mポアサイズ）と用いるブロッキング緩衝液として使用した。ウェスタンブロットにおいて使用される一次抗体および二次抗体の情報は、下の表（表3）において列記される。異なる感度を有する2種のECL基質を、示されるとおりに使用した。本発明者らは、抗ヒトTMEM8C抗体が、マウス初代筋細胞および培養細胞の溶解物の両方において内因性ならびに過剰発現されたMyomakerタンパク質を認識するが（図20、21C~21D）、長時間にわたる抗体インキュベーションおよび露光時間が必要となることを見出した。

30

40

【0320】

【表 3 - 1】

表 3.ウェスタンブロットのための抗体および ECL 基質情報

一次抗体	希釈	一次抗体 インキュ ベーション 条件	HRP コンジュゲート 二次抗体	希釈	二次抗体 インキュ ベーション 条件	最も使用 される ECL 基質
ヒツジ 抗 MINION (R&D AF4580)	1:1000 (1ug/ml)	4℃ 一晚	ロバ 抗ヒツジ (Thermo Fisher A16047)	1:5000	室温 (RT) で 1-2 時間	Luminata Forte (EMD Millipore WBLUF01 00; 感度 増大).等量 の水で希釈 される。
マウス 抗 GAPDH (EMD Millipore MAB374)	1:20,000	室温 30 分 -1 時間	ヤギ 抗マウス (Thermo Fisher A16078)	1:20,000	室温 1 時間	SuperSigna 1 West Pico (Thermo Fisher 34080).等 量の水で 希釈される。
マウス 抗 α - チューブリン (Sigma T9026)	1:20,000	室温 1-2 時間	同上	1:20,000	室温 1-2 時間	SuperSigna 1 West Pico; 等量 の水で希釈 される。
マウス 抗 MHC MY32 (Sigma M4276)	1:1000	4℃ 一晚	同上	1:5000	室温 1-2 時間	Luminata Forte; 等量 の水で希釈 される。
マウス 抗 ミオゲニン (DSHB F5Dc)	1:200	4℃ 一晚	同上	1:5000	室温 1-2 時間	Luminata Forte
マウス 抗 Pax7 (sc-81648)	1:100	4℃ 一晚	同上	1:5000	室温 1-2 時間	Luminata Forte
マウス 抗 デスミン クローン D33 (DAKO M0760)	1:200	4℃ 一晚	同上	1:5000	室温 1-2 時間	Luminata Forte
ウサギ 抗 MyoD1 (Novus Biologicals NBP1-54153)	1:5000	4℃ 一晚	ヤギ 抗ウサギ (Cell Signaling #7074)	1:2000	室温 1-2 時間	Luminata Forte
ウサギ 抗 N- カドヘリン (Cell signaling #4061)	1:1000	4℃ 一晚	同上	1:2000	室温 1-2 時間	Luminata Forte

10

20

30

40

【表 3 - 2】

ウサギ 抗 カルネキシン (Novus Biologicals NB100- 1965SS)	1:1000	4℃ 一晚	同上	1:2000	室温 1-2 時間	SuperSigna 1 West Pico	
ウサギ 抗 H2B (Cell signaling #8135)	1:1000	4℃ 一晚	同上	1:2000	室温 1-2 時間	Luminata Forte	10
ウサギ 抗 ビメンチン [EPR3776] (Abcam ab92547)	1:10,000	4℃ 一晚	同上	1:2000	室温 1-2 時間	SuperSigna 1 West Pico	
ウサギ 抗ヒト TMEM8C (Myomaker) (Abcam ab188300)	1:200	4℃ 少なく とも 2 日	同上	1:500- 1:800	4℃ 一晚 さらに 室温 3 時間; または 4℃ 2 日	Luminata Forte	20
HRP コンジュ ゲート マウス 抗 FLAG M2 (Sigma A8592)	1:10,000	4℃ 一晚	--	--	--	SuperSigna 1 West Pico; 等量 の水で希釈 される。	

【 0 3 2 2 】

RNA の調製および RT - qPCR

製造業者の指示書に従って TRIzol 試薬 (Thermo Fisher 1559 6026) を用いて、異なる細胞株試料から総 RNA を単離した。製造業者の指示書に従って qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences) を用いて、第一鎖 cDNA 合成を実施した。PCR のために、約 5 ng の RNA からの cDNA を、Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher 4367659) を含む 12.5 μ l の反応において使用した。RNA のみを有する反応が陰性対照として調製された。Applied Biosystems 7900HT thermocycler を、以下のプライマーとともに使用した: MINION (5' - GGACCACTCCAGAGGAAGGA - 3' (配列番号 75) および 5' - GGACCGACGCCTGGACTAAC - 3' (配列番号 76) および GAPDH (5' - AGGTCGGTGTGAACGGATTTG - 3' (配列番号 77) および 5' - TGTAGACCATGTAGTTGAGGT - 3' (配列番号 78))。比較 CT 法を用いて相対定量を実施した。MINION 遺伝子の CT 値を、式: 2^{-CT} を用いて同じ試料中の基準遺伝子 GAPDH のものに正規化した。

【 0 3 2 3 】

肺浮遊試験

肺浮遊試験を、以前に記載された方法 (Z. Jakus et al., Lymphatic function is required prenatally for lung inflation at birth. The Journal of experimental medicine 211, 815, 2014; および M. Borensztein et al., Myod and H19 - Igf2 locu

s interactions are required for diaphragm formation in the mouse. Development 140, 1231, 2013) から適合させた。MINION^{-/-} × MINION^{+/-} 交雑由来の E18.5 胚を、人道的に屠殺した妊娠雌から帝王切開によって迅速に単離し、乾燥キムワイブ上に置いた。体温を維持するために、これらの新生仔を手のひら、続いて、37 のチャンバーでインキュベートした。出産後、子を標準の室内気に曝し、少なくとも1時間監視した。MINION^{-/-} の新生仔は、一律にアトニー性で無呼吸であり、出産のほとんど直後にチアノーゼになった。MINION^{+/-} と MINION^{+/-} マウスの大多数は、正常な呼吸を呈し、十分な灌流を示す桃色の体色を示した。空気呼吸の少なくとも1時間後、子に麻酔をかけ、計量し、遺伝子型同定のために尾を切り取り、断頭し、肺を解剖し、浮遊試験のために15 ml のコニカルチューブまたは2 ml のエペンドルフチューブ内の PBS 中に置いた。次に、肺を、15分間を超えて監視し、その後、浮遊または沈降のいずれかとしてスコア化した。約50匹の E18.5 の早産新生仔を調べた。

10

【0324】

プラスミドおよびクローニング

shRNA コンストラクトのクローニングのために、19~21ヌクレオチドの標的配列を、BLOCK-iT RNAi Designer (Thermo Fisher) および内製の最適化されたアルゴリズムの両方を用いて選択した。マウス MINION 遺伝子のために、コード配列を標的化する2つと3' UTR を標的化する2つの、4つの shRNA 標的配列を最初に選択した。pGL3ルシフェラーゼレポーターベクターにおいて存在するが、マウストランスクリプトームにおいて類似の配列を欠くホタル (フォティヌス・ピラリス (Photinus pyralis)) のルシフェラーゼ遺伝子を標的化する対照配列を使用した。各 shRNA のために、2つの55~59 nt のオリゴヌクレオチドを下に示すとおりに設計し、合成した (IDT)。各々がセンスおよびアンチセンス標的配列、9 nt の介在性のヘアピンループ、ならびに突出末端クローニングのための5'末端のTTTGと3'末端のGATCを含有するオリゴヌクレオチドをアニールした。次に、これらを BbsI / SpeI で消化された pGWL-si2/U6ベクターにライゲートした。その後、Gateway LR Clonase II Enzyme Mix を使用して、これらの shRNA カセットを、マウス U6 プロモーター下で shRNA を発現する第3世代のレンチウイルスゲートウェイベクターであるベクター pLentiLox3.7-GW (pLL3.7-GW) にクローン化した。CMV-EGFP レポーターカセットが、発現を監視するためにベクターに含まれた。

20

30

【0325】

【表 4】

表 4. shRNA 標的配列およびオリゴヌクレオチド設計情報

shRNA コンストラクト 名	標的配列	オリゴヌクレオチド 名 (S: センス; A: アンチセンス)	オリゴヌクレオチド配列
mMINION- U1	GCTAAGAGGT GGTATTTAA (配列番号 79)	3'UTR shRNA_1S	TTTGCTAAGAGGTGGTATTTAATTCA AGAGATTAATAACCACCTCTTAGCT TTTT (配列番号 84)
		3'UTR shRNA_1A	CTAGAAAAAGCTAAGAGGTGGTATT TAATCTCTTGAATTAATAACCACCTC TTAG (配列番号 85)
mMINION- U2	GCAGCAGGTA GTCAATAAAC G (配列番号 80)	3'UTR shRNA_2S	TTTGCAGCAGGTAGTCAATAAACGT TCAAGAGACGTTTATTGACTACCTG CTGCTTTTT (配列番号 86)
		3'UTR shRNA_2A	CTAGAAAAAGCAGCAGGTAGTCAAT AACGTCTCTTGAACGTTTATTGACT ACCTGCTG (配列番号 87)
mMINION- C1	GCTGTCTGCTC TTTGCCT (配列番号 81)	CDS shRNA_1S	TTTGCTGTCTGCTCTTTGTCCTTTCA AGAGAAGGACAAAGAGCAGACAGC TTTTT (配列番号 88)
		CDS shRNA_1A	CTAGAAAAAGCTGTCTGCTCTTTGTC CTTCTCTTGAAAGGACAAAGAGCAG ACAG (配列番号 89)
mMINION- C2	GTGGACCACTC CCAGAGGA (配列番号 82)	CDS shRNA_2S	TTTGTGGACCACTCCCAGAGGATTC AAGAGATCCTCTGGGAGTGGTCCAC TTTTT (配列番号 90)
		CDS shRNA_2A	CTAGAAAAAGTGGACCACTCCCAGA GGATCTCTTGAATCCTCTGGGAGTG GTCCA (配列番号 91)
対照 (Ctrl)	GACGAACACTT CTTCATCG (配列番号 83)	Ctrl shGL3_S	TTTGACGAACACTTCTTCATCGTTCA AGAGACGATGAAGAAGTGTTCGTCT TTTT (配列番号 92)
		Ctrl shGL3_A	TAGAAAAAGACGAACACTTCTTCAT CGTCTCTTGAACGATGAAGAAGTGT TCGT (配列番号 93)

10

20

30

40

【 0 3 2 6 】

cDNAコンストラクトのクローニングのために、マウスMINION(84aaアイソフォーム用)、ヒトMINIONオルソログ、マウス`tmem8c(myomaker)`、`nanoluc`(対照A)、ルシフェラーゼ(対照B)、1bp挿入を有するマウスMINION、1bp欠失を有するヒトMINION、およびマウスMINIONトラン

50

ケーション(39aa形態)のコード配列(CDS)を、両末端のattB部位および開始コドンの前のコンセンサスコザック配列(5'GCCACC(配列番号94))とともに合成した(IDT)。マウスおよびヒトMINIONのCDSのために、タグのないバージョンおよびC末端に3xFLAG-1xHATagされた(3F1H)バージョンを作製した。nanolucのCDSについては、C末端1xFLAGタグを付加した。Gateway BP Clonase II Enzyme mix(Thermo Fisher 11789020)を用いて、合成されたDNA配列をpDONR221ベクターにクローン化し、続いて、配列が確認されたエンターベクターを、Gateway LR Clonase II Enzyme mixを用いてpCIGARゲートウェイレトロウイルスベクターにクローン化した。pCIGARベクターは、IRES-eGFPのすぐ上流の導入遺伝子のGateway媒介性の挿入組換えを可能にするために改変されたMSCV系のパイシストロニックなレトロウイルスベクターである。加えて、空pCIGARベクター(MCSバージョン)を、さらなる対照ベクター(対照C)として使用した。2つの3F1HタグされたマウスおよびヒトMINIONコンストラクトの発現試験の後に、2つのバンドが抗FLAG抗体によるウェスタンブロットによって検出されたことが認められた(図16)。これは、実際の開始コドンとともにpCIGARベクターの5'末端に受け継いだインフレームの追加の開始コドンの存在を反映しており、アスタリスクによって示される、N末端に追加の16アミノ酸を有する産物をもたらす。実際の開始コドンの前に6ntのコンセンサスコザック配列が付加されたため、目的の産物の強度がより一層強くなっている。したがって、他の全てのcDNAベクターは、上流での転写開始を回避するために、コザック配列の直前に追加のTヌクレオチドを含有した。

【0327】

初代および形質転換した筋芽細胞におけるレンチウイルスshRNAノックダウンアッセイ

レンチウイルス粒子を、第3世代レンチウイルスパッケージングシステムおよびFUGENE6トランスフェクション試薬(Promega)を使用して、HEK293T細胞において作製した。トランスフェクションの1日後に新鮮な培地を置き換え、翌日、上清培地を回収した。培地を短時間遠心分離して死細胞を除去し、純粋なウイルスを、8μg/mlのポリブレンとともに293T細胞に対する逆感染の方法によるQC感染のために使用した(スピンインフェクションなしの一晚のインキュベーション)。感染の3日後のFACSによるGFP発現の分析は概して、約 1×10^6 vp/mlの力価を示した。純粋なウイルスをさらに、100kDaの遠心フィルターユニット(Amicon)を用いて約100倍に濃縮し、等分し、-80℃で保存した。

【0328】

マウスMINION転写物のノックダウン効率を試験するために、shRNAをコードするレンチウイルスを使用してC2C12細胞に感染させた。ウイルスを、8μg/mlのポリブレンを含有する増殖培地に希釈し、その後、C2C12細胞とともに37℃で短時間インキュベーションし、24ウェルまたは12ウェルプレートのいずれかを用いて1ラウンドのスピンインフェクションを32℃で1~1.5時間、1100gで実施した。概算された 1×10^8 vp/mlのウイルス力価(293T細胞で測定された)に基づいて、293T細胞のMOI30に相当するウイルス量をC2C12細胞で使用した。翌日、新鮮な培地を置き換え、2日後、GFP⁺細胞をFACSによってソートした(図24のゲーティング戦略を参照のこと)。未分化のC2C12細胞におけるGFPシグナルは、EVOS蛍光顕微鏡法によってかろうじて識別可能であったが、FACS分析で判断されたように70~85%の感染効率が常に達成された。ソートされたGFP⁺C2C12細胞を回収し、増殖させ、インビトロ分化アッセイのために6ウェルプレートに播種した。DMの4~6日目に、細胞溶解物を回収し、MINIONタンパク質の発現をウェスタンブロットによって調べた。MINIONの3'UTR(U1/U2)を標的化する2つのshRNAコンストラクトが、MINIONの発現を最も効率的に減少させることが見出され(図14B)、C2C12および初代筋芽細胞における次の実験のために、細胞を

U1およびU2のshRNAウイルスのみで感染させた。MINION^{K^D}C2C12細胞を作製するために、U1に感染したGFP⁺のソートされた細胞をU2 shRNAウイルスで再感染させ、GFPシグナルによって再ソートした(上位30~50%)。同様に、野生型C2C12細胞を、対照shGL3ウイルス(Ctrl)で2回のラウンドにおいて感染させ、2回ソートしてCtrl^{K^D}細胞を得た。これらのMINION^{K^D}およびCtrl^{K^D}C2C12細胞を増殖させ、384ウェルおよび6ウェルプレートにおけるインビトロ分化アッセイのために使用した。MINION^{K^D}細胞はまた、cDNAレトロウイルスを用いるインビトロ再構成アッセイのためのバックグラウンドとしても使用された。

【0329】

同様の感染工程を、成体マウスに由来する初代筋芽細胞においてMINIONをノックダウンするために追従したが、ただし、初代筋芽細胞はポリブレン処理に対してより感受性が高いように見えるため、6 μ g/mlのポリブレンを使用し、ポリブレンを欠く新鮮な培地が、翌日ではなくその日の終わりに添加された。感染し、ソートされたこれらの初代細胞を増殖させることは困難であるため、1ラウンドのウイルス感染をCtrlウイルスまたはU1とU2ウイルスの1:1比の混合物のいずれかを用いて実施し、細胞を2~3日後のGFPシグナルによってソートした。C2C12細胞で使用されたウイルスの約3分の1または2分の1量を、初代筋芽細胞において使用した。ソートされた初代筋芽細胞を3日間回収し、次に、インビトロ分化アッセイのために384ウェルプレートに播種した。

【0330】

C2C12細胞および10T1/2細胞のレトロウイルス感染

FUGENE6トランスフェクション試薬(Promega)を用いて、pCIGARレトロウイルスベクターおよびpCL-EcoまたはpCL-10A1パッケージングベクターによりHEK293細胞をコトランスフェクトすることによって、cDNAをコードするレトロウイルスを作製した。トランスフェクションの1日後に培地を置き換え、翌日、上清培地を回収した。死細胞を排除するための短時間の遠心分離後、純粋なウイルスを、8 μ g/mlのポリブレンとともにNIH-3T3細胞(pCL-Ecoパッケージ化ウイルス用)または293T細胞(pCL-10A1パッケージ化ウイルス用)に対する逆感染の方法による384ウェルプレートにおけるQC感染のために使用した(スピン感染なしの一晩のインキュベーション)。GFP発現を、感染の3日後にFACSによって分析し、通常、0.3~1.2 $\times 10^6$ vp/mlの力価が得られた。

【0331】

C2C12細胞および10T1/2細胞を感染させるために、純粋なウイルスを8 μ g/mlのポリブレンと37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートし、続いて細胞に添加し、次に37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。24ウェルまたは12ウェルプレートを用いて1ラウンドのスピン感染を32 $^{\circ}$ Cで1~1.5時間、1100gで実施した。4~6時間後、ポリブレンを含む新鮮で純粋なウイルスを添加し、2ラウンド目のスピン感染を実施した。新鮮な培地を感染した細胞に添加してポリブレンを希釈した。翌日培地を置き換え、2~3日後、感染した細胞は通常、顕微鏡法によって非常に強力なGFP蛍光を呈した。この2ラウンドの感染方法の感染効率は、広範なウイルス濃度にわたって概して95%を超えたが、そのため、FACSは通常必要ではなかった。この強力なGFPシグナルを使用して、位相コントラストイメージングおよび核マーカールに加えて、細胞の境界を目立たせた(図22、23A~23F);さらに、4%PFAで固定されたが界面活性剤で透過処理されなかった細胞において、GFPシグナルは核領域においてより高く、細胞境界および核の両方の明確な標示が可能になった。

【0332】

感染の各ラウンドのために、3T3または293T細胞におけるMOI3~6に相当するウイルス量を、MINION^{K^D}C2C12細胞に対して使用し、感染した細胞を増殖させ、分化培地におけるインビトロ再構成アッセイのために使用した。野生型10T1/

10

20

30

40

50

2細胞およびC2C12細胞における共発現ならびに細胞混合実験のために、3T3または293T細胞におけるMOI2~4に相当するウイルス量を使用した。各比較のために、同じパッケージングプラスミドおよび同様のMOIで作製されたウイルスを感染のために使用した。異なる種類の対照ウイルス(ルシフェラーゼ、NanoLuc-FLAG、空ベクター)を用いて実験を繰り返した。共発現および混合実験のために、上述の2ラウンドのスピニンフェクションプロトコルを用いて1種のcDNAレトロウイルスで細胞を感染させ、数日間増殖させ、続いて、同じ方法を用いて第2のcDNAをコードするレトロウイルスで感染させた。最終感染の翌日、細胞を異なる色素で標識し、混合し、後述のとおり384ウェルまたは24ウェルプレートに播種した。

【0333】

細胞標識および混合実験

一連の細胞浸透性蛍光色素の性能を、複数の希釈にわたり異なる標識方法を使用して10T1/2線維芽細胞およびC2C12筋芽細胞に対して試験し、シグナル強度およびパターンを少なくとも4日間顕微鏡法によって連続的に監視した。CellTracker Deep Red dye (Thermo Fisher C34565、最終1:250)およびCellTrace Violet dye (Thermo Fisher C34571、最終1:500)を後の実験のために選択し、これらは、単核細胞の細胞質および核領域を標識することが観察された。しかし、融合した多核細胞においては(図21F、23A~23F)、CellTrace Violet色素は、色素で本来標識された核において強い濃縮を呈し、他のviolet標識されていない核に拡散しなかったが、CellTracker Deep Red色素は、核周囲の濃縮を示し、細胞境界を認識するのに有用であった。これらの特徴により融合効率の容易な定量化が可能になった(図21G)。

【0334】

細胞標識は、若干の変更を伴う製造業者の指示書に従って実施された。細胞をトリプシン処理し、遠心分離し、PBSで1回洗浄し、2mlのエピンドルフチューブに移し、遠心分離し、 $0.8 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度でPBSにおいて再懸濁した。2x細胞標識溶液を蛍光色素(Deep Red色素 1:125およびViolet色素 1:250)を含むPBSに個別に調製し、短時間のボルテックスによって十分に混合した。2x標識溶液と細胞懸濁液の等量(通常、各々250 μ L)を混合し、随時混合しながら37 $^{\circ}$ Cで40~45分間インキュベートした。次に、標識細胞を1mlの新鮮な培地と混合し、37 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートし、150gで遠心分離した。この時点で、標識細胞を新鮮な培地を用いてさらに3回洗浄し、37 $^{\circ}$ Cで10~15分間インキュベーションし、150xgで遠心分離した。最後の洗浄の後、細胞を計数し、384ウェルまたは24ウェルプレートにおける最終の混合実験のために必要な濃度に希釈し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。これらの追加の洗浄およびインキュベーション工程を用いて、細胞懸濁液および細胞表面において未結合の残留色素を排除したが、これは、同日に実施される細胞混合実験にとって極めて重要であった。インキュベーションの後、Deep Red色素で標識された細胞を、Violet色素で標識されたものと1:1の比で混合し、1ウェル当たり800~4000細胞が試験される濃度範囲で384ウェルまたは24ウェルプレートに播種した。384ウェルプレートにおける細胞を、異なる時点(24~48時間)において室温で10分間4%PFAにより固定し、画像化前にPBSで洗浄した。10%~15%のFBSを含有する増殖培地を、10T1/2とC2C12細胞の両方における全ての実験のために使用した。

【0335】

分化指数および融合指数

いくつかの指数を使用して、インビトロ分化中のC2C12細胞ならびに成体および胚性初代筋芽細胞の融合効率を調べた。C2C12(図12F)および成体初代筋芽細胞(図15B)において示される分化指数は、IXM共焦点ハイコンテントイメージングによって得られる各20x画像内の総核数と比較した、単核および多核細胞の両方を含む全て

10

20

30

40

50

のMHC⁺細胞内に含有される核の割合として算出された。別個の複製ウェルからの少なくとも6個の別々の領域を、各遺伝子型について定量化した。C2C12 (図12G)および成体初代筋芽細胞 (図15C) において示される融合指数は、IXMイメージングによって得られる各20×画像内の総核数と比較した、2個以上の核を有したMHC⁺筋管内に含有される核の割合として算出された。別個の複製ウェルからの少なくとも6個の別々の領域を、各遺伝子型について定量化した。胚性初代筋芽細胞 (図12C) において示される融合指数は、各20×IXM画像上の全てのデスミン⁺細胞内の核の数と比較した、3個以上の核を有するデスミン⁺筋管内に含有される核の割合として算出された。別個の複製ウェルからの少なくとも6個の別々の領域を、各遺伝子型について定量化した。線維芽細胞が依然としてこれらの早期継代初代培養において存在したため、デスミン⁺細胞における総核数のみが定量化のために含まれた。C2C12細胞 (図12H) および成体初代筋芽細胞 (図15D) における融合効率を調べるための別の指数は、筋管に着目した。筋管を、各管内に含有される核の数：2個の核、3～5個の核、6～10個の核、または10個を超える核の数によって3～4つのサブグループに分割した (図12H)。各サブグループの割合は、筋管の総数との比較において、各遺伝子型について算出された。別個の複製ウェルからの少なくとも6個の別々の領域を、各遺伝子型について定量化した。

【0336】

10T1/2細胞における共発現実験のために、2つの指標を使用して融合効率を調べた。第1の融合指数 (図21E) は、図22に示される実験に基づき、総核数と比較した、4個以上の核を含有するGFP⁺融合細胞内の核の割合として算出された。異なる複製ウェルからの少なくとも4つの別個の10×IXM画像が、各遺伝子型の定量化のために使用された。MINIONのみまたはMyomakerのみを発現する細胞がMINIONとMyomakerを共発現する細胞に融合する能力を調べるために、第2の指数を使用して (図21G)、4つの異なる組み合わせにおいてDeep Red色素標識細胞とViolet色素標識細胞間の融合効率を算出した (図21F、23A～23F)。これらの組み合わせにおいて、全てのDeep Red色素標識細胞は、MyomakerとMINIONのどちらのタンパク質が感染によって最初に発現されたとしてもこれらの共発現を有し、これらの細胞はそれら自体で融合することができ、Deep Red⁺融合細胞になった。Violet色素標識細胞は、MyomakerおよびMINIONのいずれも (MyomakerまたはMINIONのいずれかが最初に発現された) ; Myomakerのみ (空ベクター対照とともに) ; またはMINIONのみ (ルシフェラーゼ対照とともに) を発現した。1個以上のViolet色素標識核を含有するDeep Red⁺融合細胞 (4個以上の核を含有する) の割合を、各10×IXM画像のDeep Red⁺融合細胞の総数と比較した。別個の複製ウェルからの少なくとも12個の別々の領域を、各遺伝子型について定量化した。

【0337】

実施例2：MINIONは、筋再生、筋発生および筋分化中に高度に発現される骨格筋特異的微小タンパク質である

筋発生は、時間的に調節された幹細胞活性化および分化、シンシチウムの筋管を形成するための前駆細胞の融合、ならびに収縮性筋線維を生成するための筋管の成熟を必要とする。このプロセスの早期および後期が集中的に研究されてきたが (Comai, et al., *Molecular and cellular regulation of skeletal myogenesis. Current Topics In Developmental Biology* 110:1, 2014; Buckingham, et al., *Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. Developmental Cell* 28:225, 2014)、細胞融合を制御する機構および調節因子についての本発明者らの理解は、特に、哺乳動物において不十分である (Hindi, et al., *Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion. Scie*

10

20

30

40

50

nce signaling 6, re2, 2013; Hochreiter - Hufford et al., Phosphatidylserine receptor BAI1 and apoptotic cells as new promoters of myoblast fusion. Nature 497, 263, 2013)。近年、膜貫通タンパク質 Tmem8c / Myomaker が同定され、筋芽細胞の融合に必要であり、分化している筋芽細胞への非筋芽細胞の融合に十分であることが示された (Millay et al., Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. Nature 499: 301, 2013)。しかし、重要なことに、Myomaker の発現は、非筋細胞の別の非筋細胞への融合を駆動するには不十分であった。

10

【0338】

遺伝子をコードする標準的に定義されたタンパク質に加えて、近年の研究は、筋における調節因子の新たなクラスの存在を示した。これらの小さな ORF (smORF) は転写され、翻訳されるが、それらのサイズのために大部分はバイオインフォマティクスのサイレントであり、アミノ酸 (aa) 長が 100 未満の微小タンパク質を通常コードする。推定量は広く変動するが、ヒトおよびマウスのゲノムは、少なくとも数千のこれらの「隠れた」遺伝子を含有すると考えられる (Saghatelian et al., Discovery and characterization of smORF-encoded bioactive polypeptides. Nature chemical biology 11, 909, 2015)。興味深いことに、今日まで報告された少数の哺乳動物の微小タンパク質の中のいくつかは筋において同定されており、これらの全ては、サルコリピンおよびホスホランパンなどの既知の SERCA 調節タンパク質に対して構造的類似性を有する筋小胞体 / 小胞体 Ca^{2+} ATPアーゼ (SERCA) のための調節因子をコードする (Nelson et al., A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. Science 351, 271, 2016; Anderson et al., A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. Cell 160, 595, 2015; Magny et al., Conserved regulation of cardiac calcium uptake by peptides encoded in small open reading frames. Science 341, 1116, 2013)。

20

30

【0339】

未損傷および再生している筋の全トランスクリプトーム RNA-seq 分析が実施されて、骨格筋発生および再生において重要な役割を果たす新規の微小タンパク質が同定された (Bentzinger, et al., Building muscle: molecular regulation of myogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in biology 4, 2012)。本発明者らは、強力な時間的調節 (損傷後 3 日目の上方制御)、アノテートされた 100 コドン未満の ORF 長、およびインビトロでのマウス筋芽細胞分化中における類似した動的パターンの調節を示す転写物を探索した (図 1A)。予測された遺伝子 7325 (Gm7325) が、全ての基準を満たす唯一の遺伝子であったが、これは ES 細胞中で発現する可能性があるが機能が知られていない推定上の 84 aa の微小タンパク質をコードしている (Chen, et al., Molecular cloning and functional analysis of ESGP, an embryonic stem cell and germ cell specific protein. Acta biochimica et biophysica Sinica

40

50

37:789, 2005)。後述の理由から、本発明者らは、この遺伝子をMINION (微小タンパク質融合誘導因子)と命名した。MINION発現の時間的パターンは、Myomakerのものと非常に類似したが、2つの他のsmORFであるcc13またはサルコリピンのものとは異なっていた(図1B)。

【0340】

ウェスタンブロットにより、MINION転写物が翻訳され; MINIONタンパク質が未損傷前脛骨(TA)筋には存在しないが再生中に強力に誘導され、損傷後3~4日目にピークを迎えることが確認された(図1C)。免疫蛍光分析は、発生期に再生している筋線維内でのMINION発現を実証したが(図2A)、MINIONタンパク質は、未損傷の成体筋(図2B)でも他の非筋組織(図2C)でも検出できなかった。早期胚発生のRNA-seq分析は、体節期15に早くも検出できたが、肢および尾芽形成後の体節期36まで大幅に増加したMinion発現を明らかにした(図2D)。MINIONの発生上の発現は、マウスの肢および舌(両者とも骨格筋を含有する)において見られたが、胚または新生仔の心筋においては見られなかった(図1D、図2E)。MINIONのmRNAおよびタンパク質レベルの両方が、インビトロでの筋芽細胞分化中に急速に増大した(図1Dおよび図3A~3C)。全長タンパク質は、N末端シグナル配列および支配的なアルファヘリックスの二次構造を含有すると予測されたが(図1E)、過剰発現および上清濃度は、タンパク質分泌の証拠を示さなかった(データは示さず)。しかし、細胞内分画により、膜結合画分(原形質膜、ER、およびゴルジ体を含む)内で大幅な濃縮が確認されたが、これは、膜コンパートメントへの挿入または膜コンパートメントとの結合を示唆している(図3D)。

10

20

【0341】

TBLASTN検索により、長鎖非コードRNA(RP1-302G2.5; LOC101929726)としての転写物の先のアノテーションにもかかわらず、84コドンのインタクトなORFを有する推定上のヒトMINIONホモログが明らかになった(図4A)。進化的な保存が哺乳動物種にわたって見られたが(図1F)、ショウジョウバエ(Drosophila)または他の無脊椎動物においては有力な配列ホモログは見出されなかった。サルコリピン、ホスホランパン、または近年報告された微小タンパク質DWORF(Nelson et al., A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. Science 351, 271, 2016)に対する配列類似性は見られなかった。Minionの発現は、塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス転写因子であるミオゲニンの発現をわずかに追跡したが(図1F)、これは標準的な筋調節因子(MRF、例えば、MyoDおよびミオゲニン)による制御を示唆している。実際に、ヒトおよびマウスMINION遺伝子座の上流の調節領域の分析により、MRFに対する進化的に保存されたE-ボックス結合部位が明らかになった(図4A)。MyoDおよびミオゲニンの両方は、ENCODE全ゲノムChIP-seqによって示されるとおり、分化している筋芽細胞におけるこれらの部位に特異的に結合した(図4B)(Sloan et al., ENCODE data at the ENCODE portal. Nucleic acid research 44, D726, 2016も参照のこと)。

30

40

【0342】

要するに、これらのデータは、MINIONが、急速な増殖時および幹細胞由来筋芽細胞の融合時に発生および再生している骨格筋において特異的に発現される膜結合微小タンパク質であることを示す。

【0343】

実施例3: MINION微小タンパク質は骨格筋発生に必要である

MINIONの空間的および時間的発現パターンおよびMINION調節配列における機能的MRF結合E-ボックスの存在は、骨格筋発生における役割を示唆した。これを試験するために、CRISPR/Cas9ゲノム編集を使用して、MINION欠損マウス

50

を作製した(図5A)。単一のコードエクソンを標的化する2つのガイドRNA(gRNA)を胚に同時注入し、F₀の子を変異に関してスクリーニングした(図5Aおよび6、図25)。小さな挿入/欠失変異およびgRNA標的部位間のより大きな欠失を同定し(図6A)、135bpインフレーム欠失(MINIION^Δ; 図5A~5C、図6B)または155bpフレームシフト欠失(図25A、25B、25D)のいずれかを含有する変異体を樹立した2つの系統をさらに特徴付けた。別段の言及がない限り、後の実験は135bp欠失アレルを伴う。ヘテロ接合型MINIION^{Δ/+}動物は生存可能であり、予想されたメンデル比で回復し、後期ホモ接合型変異体MINIION^{Δ/Δ}胚もまた得られ、生存ホモ接合型MINIION^{Δ/Δ}動物は、周産期致死性と一致して出生後に回復しなかった(図6C~6D)。MINIIONタンパク質の消失は、MINIION欠損動物由来の胚および周産期の肢ならびに舌骨格筋において確認された(図7A~7B)。

【0344】

後期MINIION^Δ胚は、そのサイズおよび重量の縮小、肢の直径の縮小、脊柱弯曲、およびアトニー、ならびに早期における特徴的な背部および頂部皮下浮腫によって識別可能であった(図8A~8C)。MINIION^ΔE17.5胚およびP0新生仔期の子の分析により、早期胎仔期に明らかな欠陥はなかったにもかかわらず、肢筋系の小さな外見(図5D、8B)、および筋群の全体サイズの縮小(図9A~9D)が実証された。骨格筋形成における明らかな異常は、筋細胞マーカー(MHCおよびデスミン)に対する組織学および免疫蛍光染色の両方によってE18.5~19.5で見られた; 一方で、対照の舌骨格筋は、大量の伸長した多核筋管を含有し、MINIION^Δ筋は、発生期の短い線維および未融合の単核細胞の両方の蓄積とともに、融合した線維の著しい減少を示した(図2D、図9A~9D)。同様の欠陥はMINIION^Δ前肢、横隔膜および肋間筋系においても存在したが(図10Aおよび10B、図26、図5F、図9D、図10C)、後者の観察により、MINIION^Δ周産期致死性は呼吸機能の欠如を反映する可能性があることを示唆している。したがって、後期胎仔は帝王切開によって出産され、室内気に曝され、1時間監視された後、肺を解剖され、浮遊試験にかけられた。E18.5MINIION^Δ胚は、心収縮および反射反応を示したが(データは示さず)、空気への暴露後すぐに死亡した。横隔膜および肋間筋形成の著しい減少に一致して、対照動物ではないMINIION^Δ由来の肺は浮遊しなかったが、これは、出生後の肺浮遊の欠如(図5G)およびおそらくは骨格筋機能不全に関連した周産期致死性を示している。

【0345】

累積的に、これらのデータは、MINIION^Δ胚が、骨格筋機能不全の結果のために周産期で死亡することを示唆する。

【0346】

実施例4: MINIION微小タンパク質は筋前駆細胞の融合に必要である

MINIION^Δ筋における多核筋線維の欠如は、MINIIONが筋芽細胞の融合に特異的に必要であり得ることを示唆する。実際に、MINIION^Δまたは対照の筋に由来する初代胚性筋芽細胞における分化および融合の誘導により、MINIION欠損細胞において特異的に、多核筋芽細胞(3個以上の核)の形成にほぼ完全に失敗することを実証した(図12A~12B、図13)。重要なこととして、筋原性への拘束および最終分化のマーカーは通常、インビボおよびインビトロの両方においてMINIION^Δ筋芽細胞において誘導されたが(図6E、図10A~10B、図11A~11C、図13)、これは、筋形成の異常が、前駆細胞の分化それ自体で阻止されることに起因しなかったことを示唆している。本発明者らはさらに、MINIIONコード配列および3'非翻訳領域(UTR)を標的化するshRNAによる安定したレンチウイルスの形質導入を介する不死化マウスC2C12筋芽細胞における機能喪失体を用いてこれを確認した(図14A)。MINIION発現のほぼ完全な抑制は、個々のshRNAを用いて達成され(図14B)、2つのほとんど活性なshRNAの組み合わせにより、分化細胞において検出感度以下のタンパク質レベルをもたらした(MINIION^{K^D}; 図12C)。野生型およびMiniion^{K^D}筋芽細胞の両方の免疫蛍光染色は、分化している単核筋芽細胞および発生期の

10

20

30

40

50

多核筋管の両方においてMinonタンパク質の内因性の発現を示した(図27A~27B)。この発現パターンはさらに、心臓毒(CTX)注射の3日後の再生している肢筋の縦断切片の免疫蛍光染色によって確認された(図27C)。ミオゲニン、MyoD、デスミン、MHC発現の分析により、MINION^{KD}細胞における任意の分子的な分化異常が存在しないこと(図12C、12Eおよび14C)および筋芽細胞の融合に対する著しい妨害の存在(図12D、12Fおよび12G)の両方が確認された。興味深いことに、MINION欠損筋芽細胞は、融合できないにもかかわらず正常に伸長し整列したが(図12D)、これは、筋芽細胞の接着は影響を及ぼされなかったことを示唆している。同様の結果は、初代非不死化成体マウス筋芽細胞のレンチウイルスのshRNA形質導入を用いて得られた(図15A~15D)。

10

【0347】

MINION転写物を標的化するために使用されるshRNAは3'UTRを認識するため、本発明者らは、MINION^{KD}細胞の融合欠損を相補する様々なcDNAの能力を試験した(図16A~16B)。全長のC末端タグされたマウスMINIONおよびタグのないマウスMINIONは両方ともに、融合を頑強にレスキューしたが(図16C)、これは、MINION^{KD}細胞において観察される細胞融合がオフターゲット作用の結果ではなかったことを実証している。次に、先に長鎖非コードRNA(GRCh37ゲノムアセンブリ)としてアノテートされた推定上のヒトMinionオルソログは、同様の相補性アッセイにおいて試験されたが、これは、タグのないヒトMinionのORFおよびC末端エピトプタグされたヒトMinionのORFの両方が、MINION^{KD}細胞における細胞融合を強力に再構成したことを実証している(図12H、図16C)。タンパク質コーディングを介してこれらのORFの機能を最終的に立証するために、単一クレオチドの挿入または欠失を、タグのないマウスおよびヒトMinionのcDNAにそれぞれ導入した。これらのフレームシフト点変異体は、融合欠損を相補することができなかったが(図17Aおよび17B)、これは、転写物が非コードRNAとしてではなく、微小タンパク質として機能することを確認している。MINION^{-/-}マウスにおいて見出される135bp欠失アレルを同様に模倣するcDNAによるMINION^{KD}の再構成では、融合欠損をレスキューできなかったが(図18)、これが真の機能喪失アレルに相当することを確認している。

20

【0348】

上記の結果は、MINIONタンパク質が、発生している筋における細胞融合に必要であることを実証する。興味深いことに、この作用は筋特異的であるように見えるが、それは、MINION発現が、胎盤または融合するマクロファージ系細胞などの生理的細胞融合の他の状況において検出可能ではなかったためである(図19A~19B)。

30

【0349】

実施例5: MINIONとMyomakerの共発現は異種系において細胞融合を誘導するのに十分である

MINIONに関連した細胞融合の機構をより理解するために、MINIONとMyomakerの間の機能的関連性を調査した。Myomakerタンパク質は、MINIONのレベルが同様に高い場合に(図1Bおよび1E)、再生している筋および分化しているマウス筋芽細胞において容易に検出可能であった(図20)。

40

【0350】

Myomakerが線維芽細胞の分化している筋芽細胞への融合を誘導するのに十分であることは以前に報告されており(Anderson et al. Widespread control of calcium signaling by a family of SERCA-inhibiting micropeptides. Sci. Signal. 9, ra119, 2016)、したがって、本発明者らは、Minionが線維芽細胞において発現された場合に同様の表現型を呈するかどうかを調べた。C3H10T1/2線維芽細胞を、GFPおよび対照、MyomakerまたはMinionのいずれかをコードするレトロウイルスで感染させ; 次に、GFP陽性線維芽細胞を、

50

野生型 C2C12 筋芽細胞と混合し、分化培地で 3 ~ 4 日間維持した。分化している筋芽細胞および筋管は、MHC 発現によって標識され、GFP 陽性線維芽細胞の筋管への融合は、Minion または対照ではなく Myomaker が発現された場合に、容易に検出された (図 28A)。しかし、Myomaker を発現する線維芽細胞は、分化している Minion^{K^D} 筋芽細胞に融合できなかった (図 28B)。MINION 発現の消失は、分化している筋芽細胞における Myomaker 発現を低下させず (図 21A)、myomaker の過剰発現は、MINION^{K^D} 細胞における融合欠損をレスキューすることができなかった (図 21B ~ 21C)。共免疫沈降では、検出可能な物理的相互作用が明らかにならなかった (データは示さず)。

【0351】

以前の研究は、myomaker 単独では非筋原細胞間の融合を誘導できないことを実証した (Millay et al., Nature 499, 301, 2013)。10T1/2 線維芽細胞において異種性に発現される場合、Myomaker も Minion も単独では (図 21D) 線維芽細胞間の細胞融合を駆動するのに十分ではなかった (図 21F、22、および示されないデータ)。しかし、注目すべきことに、MINION と Myomaker の共発現は、形質導入された線維芽細胞の相互の迅速かつ均一な融合を駆動して、大型の多核融合細胞を形成した (図 21E および図 22)。同様の結果は、増殖条件下で培養された筋芽細胞において観察された (データは示さず)。MINION および/または Myomaker を発現し、かつ蛍光色素で特異的に標識された細胞集団を用いる細胞混合実験は、これが不完全な細胞質分裂ではない真の細胞融合を表し、かつこれらの条件下での細胞融合は、融合対の一方のみでの MINION の発現を必要とする一方で、Myomaker の発現は両方の融合細胞内で必要とされることを実証した (図 21F ~ 21G、図 23A ~ 23E)。

【0352】

したがって、MINION は、分化している筋芽細胞との細胞融合を媒介する Myomaker にとって必要であり、MINION および Myomaker は合わせて、筋細胞および非筋細胞、例えば、線維芽細胞などの非融合誘導性系列の両方における融合の誘導のための最小のプログラムに相当する。

【0353】

実施例 6 : Minion に誘導された融合は細胞骨格の再構築を必要とする

機構的に、微小タンパク質内の小さなサイズの機能ドメインおよび機能ドメインの欠如は、それらが主としてタンパク質-タンパク質相互作用を介して機能するという示唆をもたらした (Ma J. et al., Improved identification and analysis of small open reading frame encoded polypeptides. Anal. Chem. 88, 3967-3975, 2016)。Minion の機能に関する最も単純なモデルは Myomaker との物理的相互作用であるが、このようなモデルは機能喪失表現型における差異を説明しないであろう (それぞれ、整列の欠如および整列の存在)。実際に、タグされたバージョンの Minion およびタグのないバージョンの Minion の両方を用いる、内因性および過剰発現された Myomaker との共免疫沈降での広範な試行は、ウェスタンプロットによって判定されるとおり (データは示さず)、分化している筋細胞における 2 つのタンパク質間の検出可能な物理的相互作用を明らかにしなかった。したがって、本発明者らは、分化している筋芽細胞において発現される FLAG タグされた Minion を用いたアフィニティー精製に続く質量分析 (AP-MS) を実施した。Myomaker は特異的に相互作用するタンパク質として再度回収されなかったが、細胞骨格タンパク質を含む複数のクラスの高度に濃縮された相互作用するタンパク質が同定された (図 29A ~ 29B ; 表 5)。実際に、本発明者らは、Minion と Myomaker の共発現によって誘導される多核線維芽細胞が、細胞周辺部でのアクチン壁の形成を伴う著しい細胞骨格の再編成を呈したことを観察した (Duan R. & Gallagher P. J. Dependence of myoblast fusion on a cort

10

20

30

40

50

ical actin wall and nonmuscle myosin IIA . Dev . Biol . 325 , 374 - 385 2009) (図 30 A) 。 細胞骨格の再構築を妨害する2つの異なるアクチン重合阻害剤による処理は、この最小の2つの因子の系においてアクチンの再構築および細胞融合の両方を阻止した (図 30 B) 。 本発明者らは、Minionは、分化している骨格筋への細胞の融合を媒介するMyomakerに必要とされるこれまで未知であった因子であり、かつMinionとMyomakerは、融合をもたらす細胞骨格の再編成の誘導のための最小のプログラムとして一緒に機能することができる と 結論づける (図 30 C) 。

【 0 3 5 4 】

【表 5 - 1】

表 5.アフィニティー精製-質量分析後にMINIONと複合体を形成して有意に濃縮されたタンパク質

説明	アクセッション番号	分子量	フィッシャーの 正確検定 (p 値) *(p<0.00414)	スペクト ル数	固有 ペプチド	配列 カバレッジ (%)
胚性幹細胞および生殖細胞 特異的タンパク質 ESGP Os=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Gm7325 PE=2 SV=1	Q2Q5T5	9.6 kDa	< 0.00010	33	3	50
ジスフェリン OS=ハツカネズ ミ (Mus musculus) GN=Dysf PE=1 SV=3	DYSF_MOUSE	238 kDa	< 0.00010	23	17	13
アルデヒドデヒドロゲナーゼ ファミリー3 メンバー B1 OS= ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Aldh3b1 PE=2 SV=1	AL3B1_MOUSE	52 kDa	< 0.00010	58	15	46
ATP アーゼファミリーAAA ドメイン-含有タンパク質 1 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Atad1 PE=1 SV=1	ATAD1_MOUSE	41 kDa	<0.00010	15	7	30
シグナル認識粒子 68 kDa タンパク質 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Srp68 PE=2 SV=2	SRP68_MOUSE	71 kDa	< 0.00010	19	11	25
カルセケストリン-2 OS=ハツ カネズミ (Mus musculus) GN=Casq2 PE=2 SV=3	CASQ2_MOUSE	48 kDa	< 0.00010	35	9	24
カルシウムユニポーター タンパク質, ミトコンドリアの OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Mcu PE=2 SV=2	MCU_MOUSE	40 kDa	< 0.00010	34	12	38
イノシトール 1,4,5-三リン酸 受容体タイプ 3 OS=ハツカ ネズミ (Mus musculus) GN=Itpr3 PE=1 SV=3	ITPR3_MOUSE	304 kDa	0.0027	14	11	6
シナプトポディン 2 様タンパク 質 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Synpo21 PE=2 SV=1	SYP2L_MOUSE	103 kDa	0.0024	9	5	8
DnaJ ホモログサブファミリー C メンバー16 OS=ハツカ ネズミ (Mus musculus) GN=Dnajc16 PE=1 SV=2	DJC16_MOUSE	89 kDa	0.00032	12	9	19

10

20

30

40

【 0 3 5 5 】

【表 5 - 2】

シンタキシン-8 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Stx8 PE=1 SV=1	STX8_MOUSE	27 kDa	0.00062	11	4	19
NADH-ユビキノノキシドレダクターゼ 75 kDa サブユニット, ミトコンドリアの OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Ndufs1 PE=1 SV=2	NDUS1_MOUSE	80 kDa	0.00010	19	9	20
アデニル酸キナーゼアイソザイム 4, ミトコンドリアの OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Ak4 PE=2 SV=1	KAD4_MOUSE	25 kDa	0.00010	15	6	52
ソルピンおよび SH3 ドメイン含有タンパク質 2 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Sorbs2 PE=1 SV=2	SRBS2_MOUSE	132 kDa	0.0024	9	6	7
液胞タンパク質選別会合タンパク質 45 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Vps45 PE=1 SV=1	VPS45_MOUSE	65 kDa	0.0012	10	7	15
NADH デヒドロゲナーゼ [ユビキノ] フラボタンパク質 1, ミトコンドリアの OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Ndufv1 PE=1 SV=1	NDUV1_MOUSE	51 kDa	0.0022	12	7	24
B 細胞受容体会合タンパク質 31 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Bcap31 PE=1 SV=3	BAP31_MOUSE	28 kDa	0.00032	12	7	27
NADH デヒドロゲナーゼ [ユビキノ] 1 アルファ部分複合体サブユニット 10, ミトコンドリアの OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Ndufa10 PE=1 SV=1	NDUAA_MOUSE	41 kDa	0.0040	12	7	24
グアニンヌクレオチド結合タンパク質 G(s) サブユニットアルファ ショートアイソフォームのクラスター OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Gnas PE=1 SV=1 (GNAS2_MOUSE)	GNAS2_MOUSE [7]	46 kDa	0.00012	22	9	34
アセト乳酸シンターゼ様タンパク質 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Ilvbl PE=2 SV=1	ILVBL_MOUSE	68 kDa	0.0011	22	10	32

10

20

30

40

【 0 3 5 6 】

【表 5 - 3】

細胞骨格関連タンパク質 5 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Ckap5 PE=2 SV=1	CKAP5_MOUSE	226 kDa	0.0038	23	13	8
電位依存性アニオン選択 チャンネルタンパク質 1 OS= ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Vdac1 PE=1 SV=3	VDAC1_MOUSE	32 kDa	0.00094	28	10	15
アポリポタンパク質 O 様 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Apool PE=2 SV=1	APOOL_MOUSE	29 kDa	0.0039	28	9	49
接合部筋小胞体タンパク質 1 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Jsrp1 PE=1 SV=2	JSPR1_MOUSE	36 kDa	0.0023	31	8	53
三要素モチーフ含有タンパク 質 72 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Trim72 PE=1 SV=1	TRI72_MOUSE	53 kDa	0.00048	40	16	55
チトクロム b-c1 複合体サブ ユニット 1, ミトコンドリアの OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Uqcrc1 PE=1 SV=2	QCR1_MOUSE	53 kDa	0.0010	38	13	41
真核生物翻訳開始因子 4A- II OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Eif4a2 PE=2 SV=2	IF4A2_MOUSE	46 kDa	0.0023	45	9	53
T-複合体タンパク質 1 サブ ユニット シータ OS=ハツカ ネズミ (Mus musculus) GN=Cct8 PE=1 SV=3	TCPQ_MOUSE	60 kDa	< 0.00010	57	22	48
イソバレリル CoA デヒドロゲ ナーゼ, ミトコンドリアの OS= ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Ivd PE=1 SV=1	IVD_MOUSE	46 kDa	0.0012	50	16	49
T-複合体タンパク質 1 サブ ユニット ベータ OS=ハツカ ネズミ (Mus musculus) GN=Cct2 PE=1 SV=4	TCPB_MOUSE	57 kDa	0.00076	53	20	55
新生ポリペプチド結合複合体 サブユニット アルファ, 筋特異 的な形態 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Naca PE=1 SV=2	NACAM_MOUSE	220 kDa	0.0031	50	23	18

10

20

30

40

【 0 3 5 7 】

【表 5 - 4】

コプロポルフィリノーゲン-III オキシダーゼ, ミトコンドリアの OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Cpox PE=1 SV=2	HEM6_MOUSE	50 kDa	0.0014	57	19	52
T-複合体タンパク質 1 サブ ユニット アルファ OS=ハツカ ネズミ (Mus musculus) GN=Tcp1 PE=1 SV=3	TCPA_MOUSE	60 kDa	0.0035	65	20	52
極長鎖特異的アシル CoA デヒドロゲナーゼ, ミトコンドリアの OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Acadv1 PE=1 SV=3	ACADV_MOUSE	71 kDa	0.0017	72	26	57
三機能酵素 サブユニット ベータ, ミトコンドリアの OS= ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Hadhb PE=1 SV=1	ECHB_MOUSE	51 kDa	< 0.00010	93	22	68
三機能酵素 サブユニット アルファ, ミトコンドリアの OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Hadha PE=1 SV=1	ECHA_MOUSE	83 kDa	< 0.00010	201	33	66
ATP シンターゼ サブユニット ベータ, ミトコンドリアの OS= ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Atp5b PE=1 SV=2	ATPB_MOUSE	56 kDa	< 0.00010	231	26	77
細胞質ダイニン 1 重鎖 1 OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Dync1h1 PE=1 SV=2	DYHC1_MOUSE	532 kDa	< 0.00010	444	157	46
Myc ボックス依存性相互作用 タンパク質 1 のクラスター OS=ハツカネズミ (Mus musculus) GN=Bin1 PE=1 SV=1 (BIN1_MOUSE)	BIN1_MOUSE [3]	64 kDa	0.003	75	16	42

10

20

30

【 0 3 5 8 】

本明細書で提供されるデータは、微小タンパク質MINIONおよび膜貫通タンパク質Myomakerによって媒介される細胞融合のための進化的に保存された経路を明らかにする。本発明者らの研究は、融合対内で、細胞融合を駆動するために両方の細胞がMyomakerを発現しなければならないが、一方の細胞のみでMINIONを発現する必要があるという予期しない極性を明らかにした。これは、脊椎動物の筋形成が、創始細胞の別個の集団と融合能力のある筋芽細胞との間で融合が起こる、以前は認識されていない無脊椎動物との類似性を有することを示唆する(Chen, et al., Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. Science 308: 369, 2005)。この非対称性に基づいて、本発明者らは、脊椎動物の筋発生のモデルを提案し、その中で、融合は、細胞膜の付着または接着を誘導し得る膜貫通タンパク質(Myomaker)と、ポア形成を駆動するアルファヘリック

40

50

スの疎水性融合ペプチドとして機能し得る融合誘導性タンパク質のMINIONとの協調的な作用を要する。

【0359】

筋生物学に対する示唆以上に、本明細書の既定の2つの成分によるシステムは、プログラム可能であり、かつ潜在的な標的化した細胞融合への契機となり、癌細胞の腫瘍溶解性の融合(Nakamura et al., *Antibody-targeted cell fusion. Nature biotechnology* 22, 331, 2004を参照のこと)、免疫療法における樹状細胞の癌細胞への融合(Avigan, et al., *Dendritic/tumor fusion cells as cancer vaccines. Seminars in oncology* 39:287, 2012を参照のこと)、再生医療における使用(Dittmar, et al., *Cell fusion in health and disease. Volume II: cell fusion in disease. Introduction. Advances in experimental medicine and biology* 714:1, 2011を参照のこと)、およびヘテロカリオンに基づく核リプログラミングの研究(Blau et al., *Plasticity of the differentiated state. Science* 230:758, 1985を参照のこと)を含む様々な治療および研究応用を見出し得る。最後にかつ重要なこととして、本発明者らの研究は、本発明者らが知るところでは、必須の哺乳動物微小タンパク質MINIONの最初の報告となる。したがって、それらは、本クラスの小さな、ほとんども研究されておらず、かつ大部分はバイオインフォマティクスのサイレントであるタンパク質が脊椎動物の生物学において重大な意味を持ち、かつ探索されていない機能を有するという、現在までで最も有力な証拠に相当する。

10

20

【0360】

特に他に定義されない限り、本明細書で用いる技術用語および科学用語は、本開示の属する分野の当業者に通常理解されるものと同じ意味を有する。

【0361】

特に指示がない限り、特に詳細に記載されていない全ての方法、工程、手法および操作は、それ自体、当業者には明らかで知られている様式で実施することができ、また実施されてきた。例えば、ここでもまた、本明細書で言及される、標準的な手引き書、および一般的な背景技術、ならびにその中で引用されている、さらなる参考文献が参照される。特に指示がない限り、本明細書で引用される参考文献の各々は、参照によりその全体において組み込まれる。

30

【0362】

本発明に対する特許請求の範囲は、非限定的なものであり、下記に提示される。

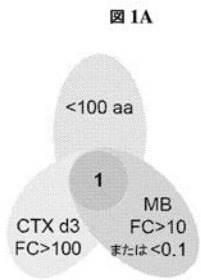
【0363】

本明細書では、特定の態様および特許請求の範囲について、詳細に開示してきたが、これは、例示のみを目的とする例としてなされたものであり、付属の特許請求の範囲、または任意の、対応する、将来の適用についての、特許請求の範囲の対象事物の範囲に関して、限定することを意図するものではない。特に、本発明者らは、特許請求の範囲により規定される、本開示の精神および範囲から逸脱しない限りにおいて、本開示に対して、多様な代替、改変、および変更が施され得ることを想定する。核酸の出発材料、目的のクローン、またはライブラリーの種類の選択は、本明細書に記載される態様について通じた当業者には、通例の事項であると考えられる。他の態様、利点、および変更も、以下の特許請求の範囲内にあると考えられる。当業者であれば、まさしく常用の実験を使用して、本明細に記載される本発明の特定の態様に対する多くの均等物を認識し、または確認することができるであろう。このような均等物は、以下の特許請求の範囲により包含されることが意図される。後で出願される対応する出願における請求項の範囲の書き直しは、種々の国の特許法による制限に基づくこともあり、請求項の対象事物の放棄と解釈されるべきではない。

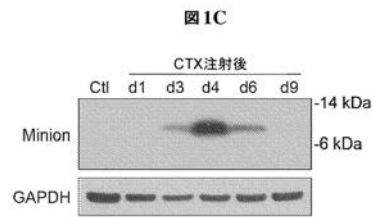
40

50

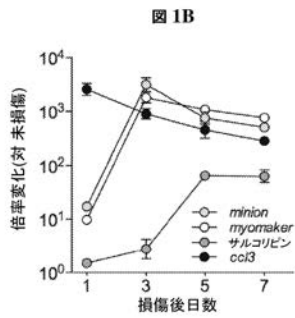
【 図 1 - 1 】



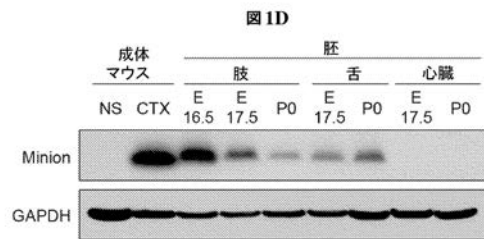
【 図 1 - 3 】



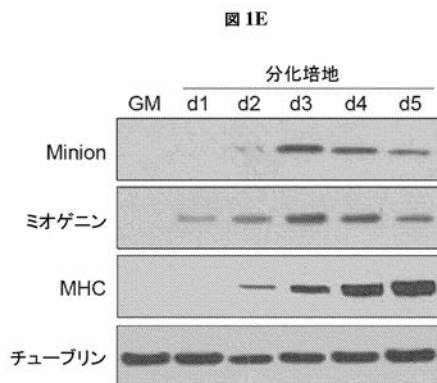
【 図 1 - 2 】



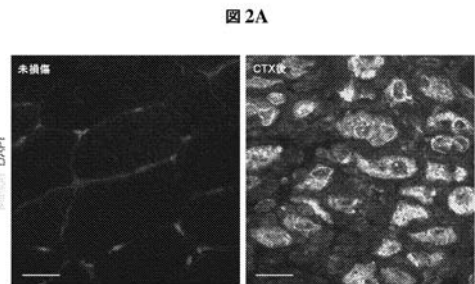
【 図 1 - 4 】



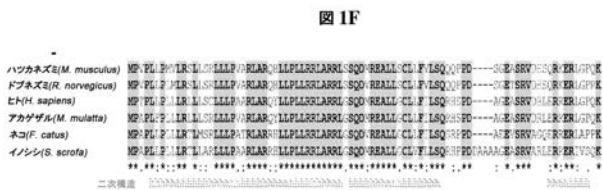
【 図 1 - 5 】



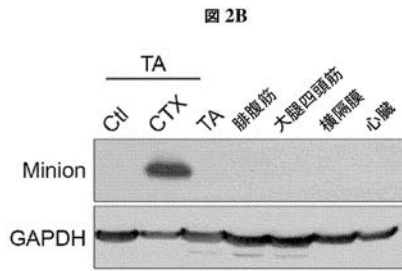
【 図 2 - 1 】



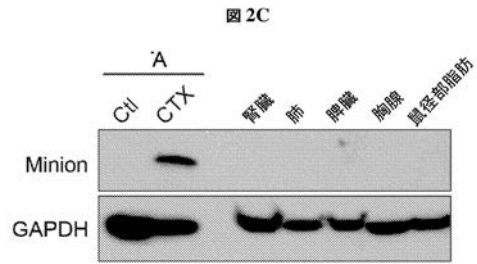
【 図 1 - 6 】



【 図 2 - 2 】



【 図 2 - 3 】



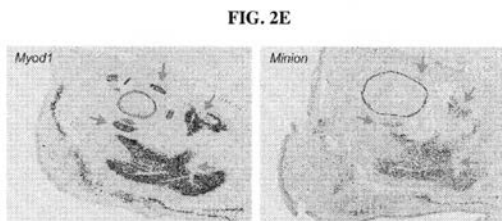
【 図 2 - 4 】

図 2D

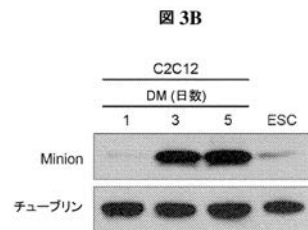
体節期	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>MyoD1</i>	0.1	0.1	0.1		0.1				0.1					
<i>Minion</i>												0.1		

体節期	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	34	35	36
<i>MyoD1</i>						0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	1	1	2	
<i>Minion</i>	0.2		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.2	0.2	0.5	0.3	0.7

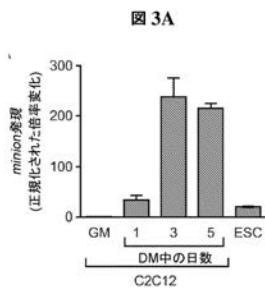
【 図 2 - 5 】



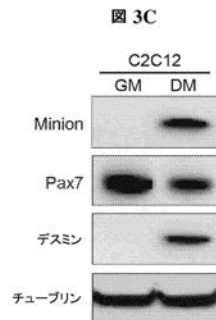
【 図 3 - 2 】



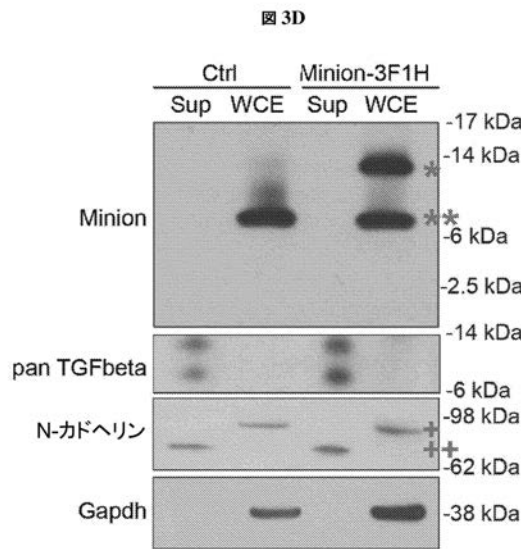
【 図 3 - 1 】



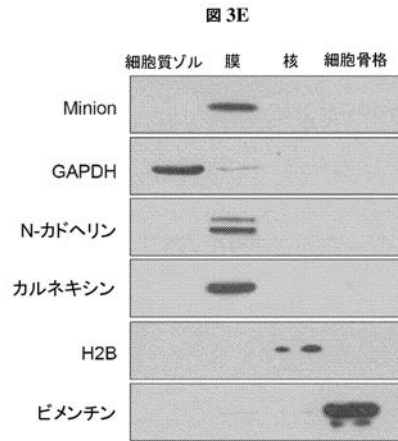
【 図 3 - 3 】



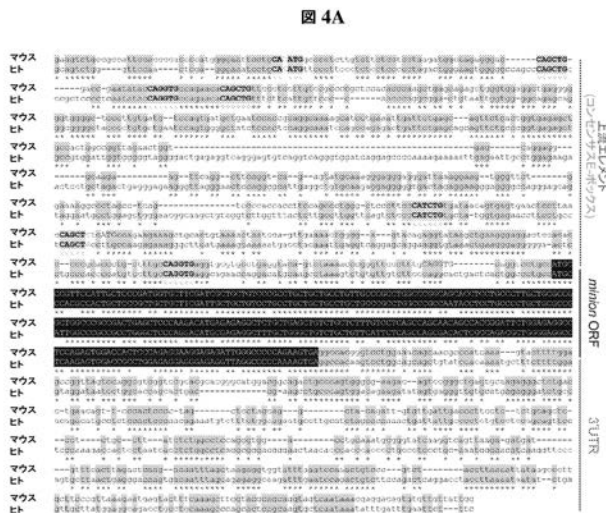
【 図 3 - 4 】



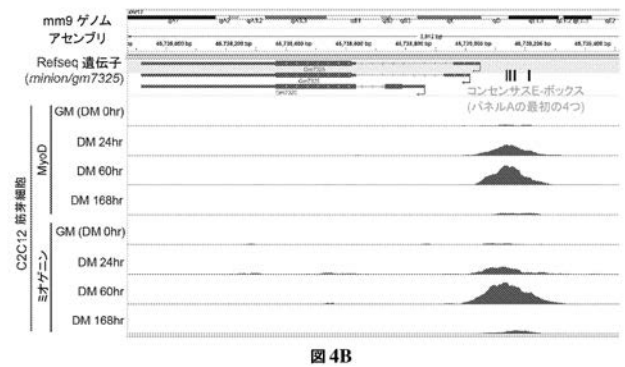
【 図 3 - 5 】



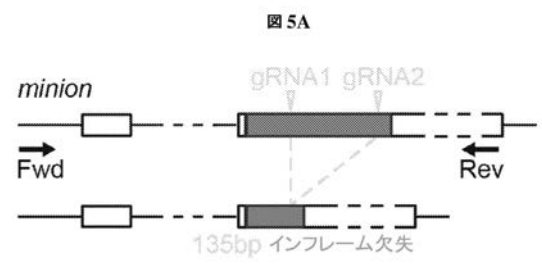
【 図 4 - 1 】



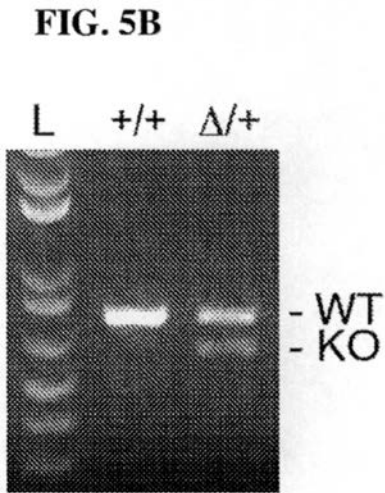
【 図 4 - 2 】



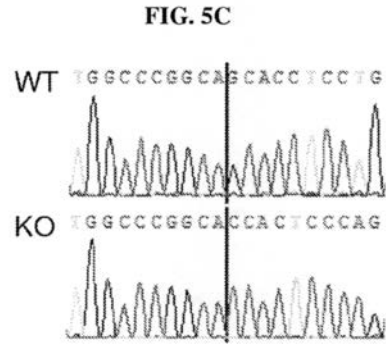
【 図 5 - 1 】



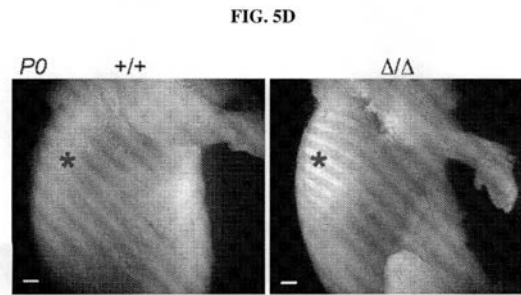
【 図 5 - 2 】



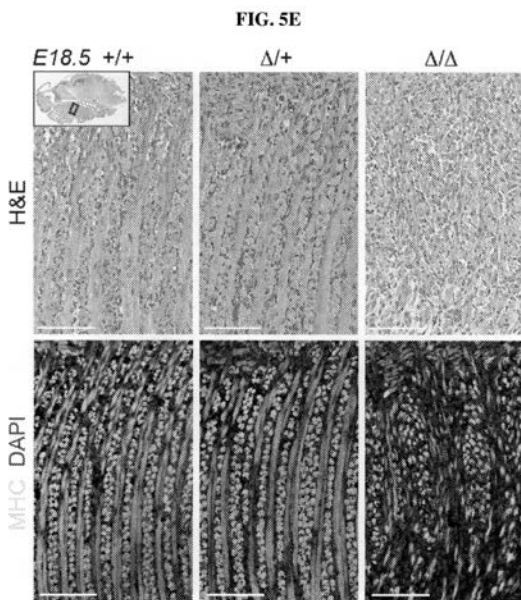
【 図 5 - 3 】



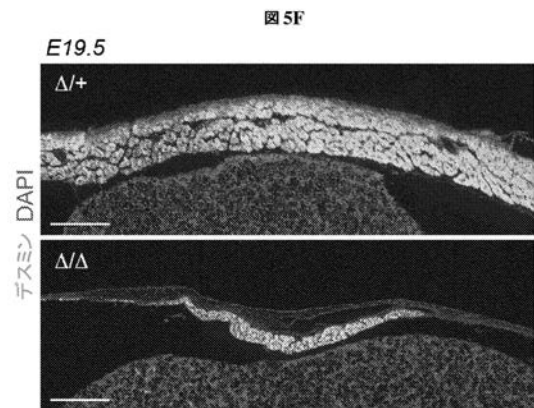
【 図 5 - 4 】



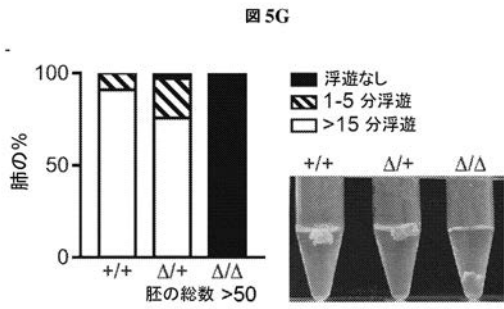
【 図 5 - 5 】



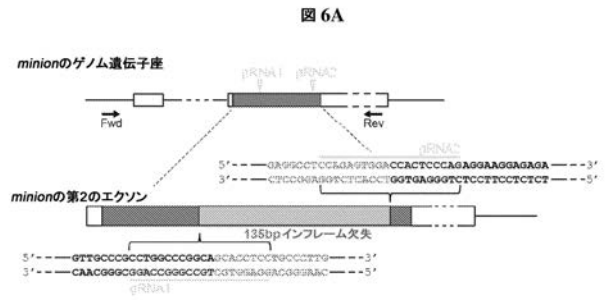
【 図 5 - 6 】



【 図 5 - 7 】



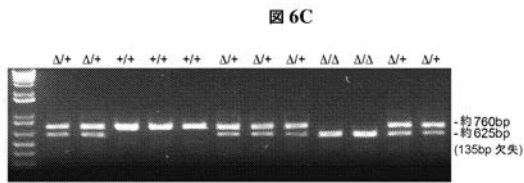
【 図 6 - 1 】



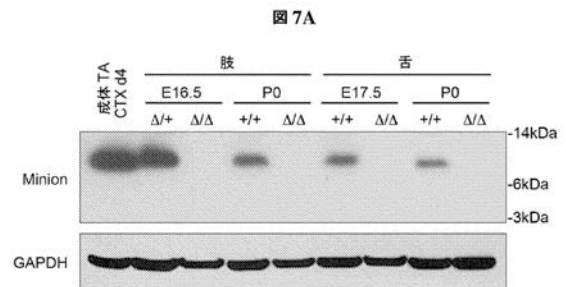
【 図 6 - 2 】



【 図 6 - 3 】



【 図 7 - 1 】

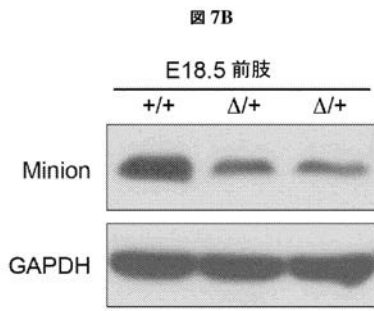


【 図 6 - 4 】

図 6D

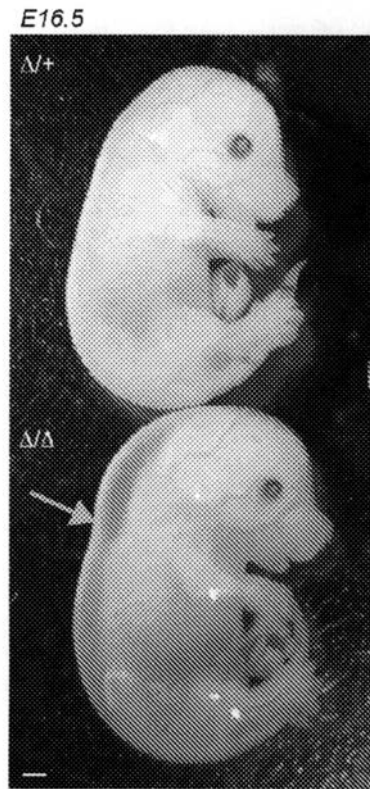
Het x Het	+/+	Δ/+	Δ/Δ	総数
E18.5-E19.5 胚	19 (23%)	47 (57%)	17 (20%)	83
成体マウス	51 (31%)	111 (69%)	0	162

【 図 7 - 2 】



【 図 8 - 1 】

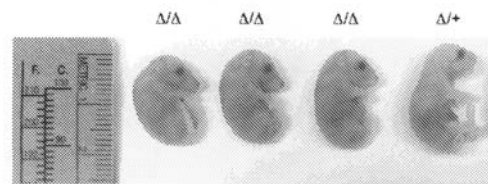
FIG. 8A



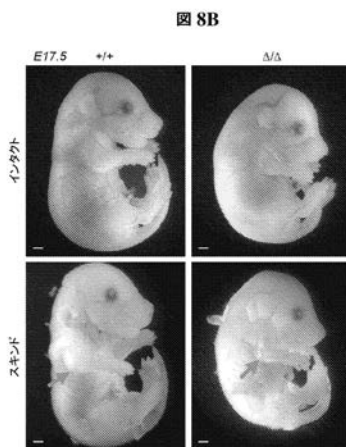
【 図 8 - 2 】

【 図 8 - 3 】

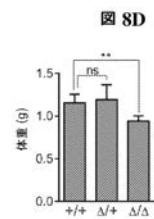
FIG. 8C



【 図 8 - 4 】

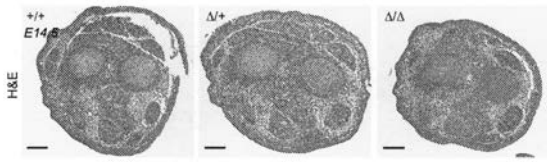


【 図 8 - 4 】



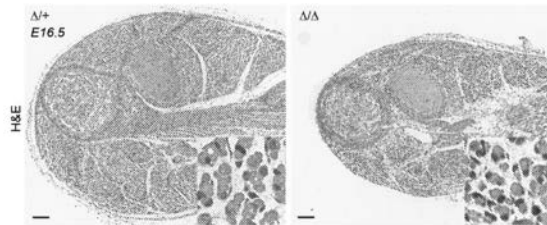
【 図 9 - 1 】

FIG. 9A



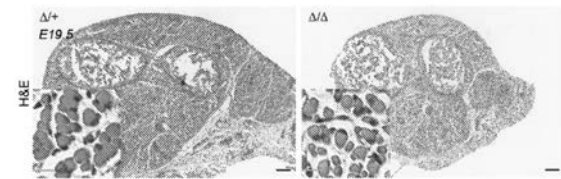
【 図 9 - 2 】

FIG. 9B



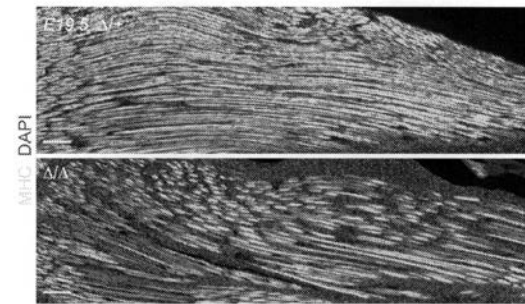
【 図 9 - 3 】

FIG. 9C



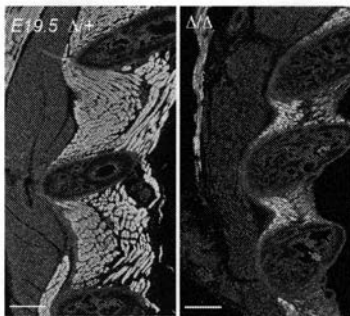
【 図 10 - 2 】

FIG. 10B



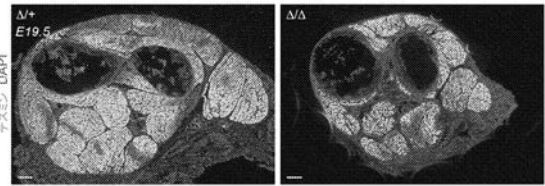
【 図 10 - 3 】

FIG. 10C



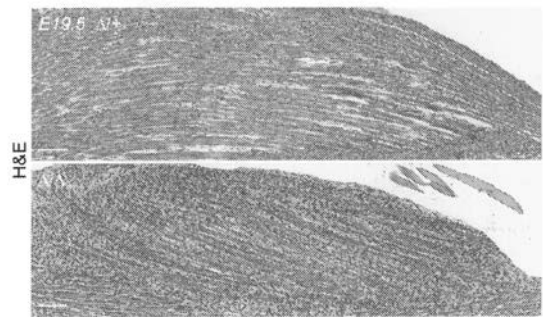
【 図 9 - 4 】

図 9D



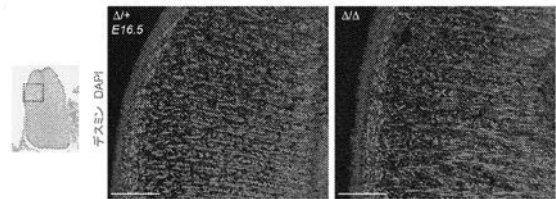
【 図 10 - 1 】

FIG. 10A



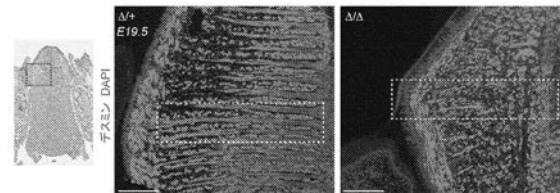
【 図 11 - 1 】

図 11A

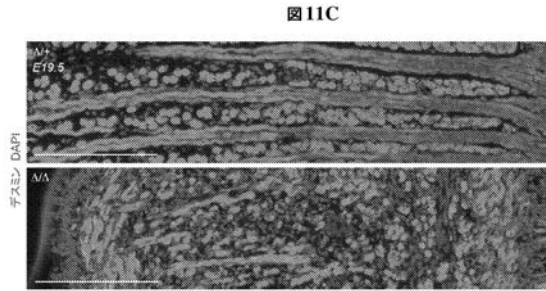


【 図 11 - 2 】

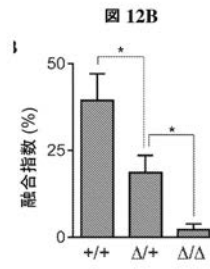
図 11B



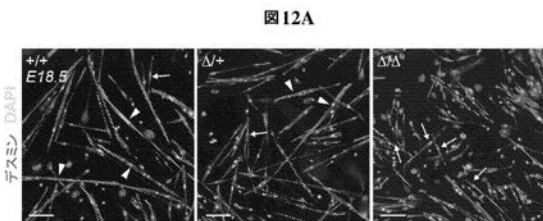
【 図 1 1 - 3 】



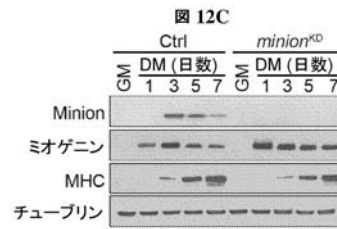
【 図 1 2 - 2 】



【 図 1 2 - 1 】

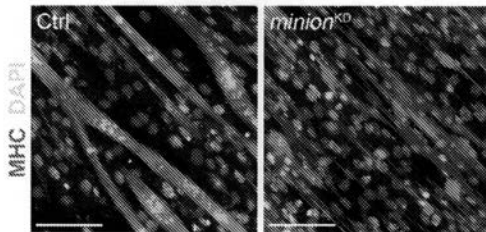


【 図 1 2 - 3 】

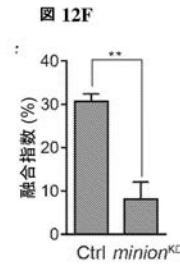


【 図 1 2 - 4 】

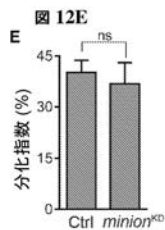
FIG. 12D



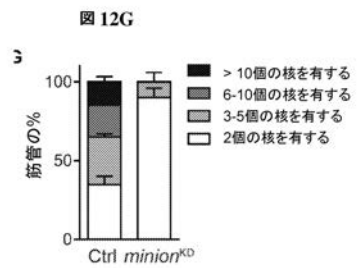
【 図 1 2 - 6 】



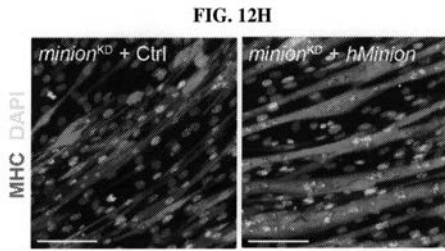
【 図 1 2 - 5 】



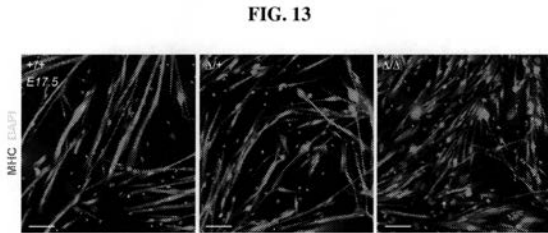
【 図 1 2 - 7 】



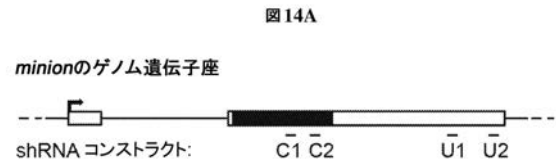
【 図 1 2 - 8 】



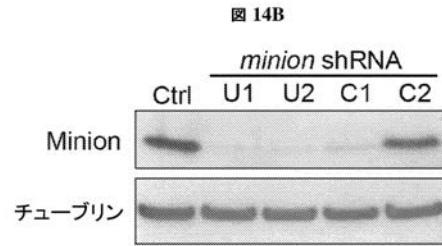
【 図 1 3 】



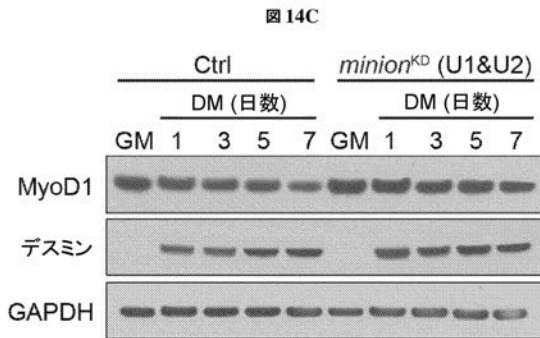
【 図 1 4 - 1 】



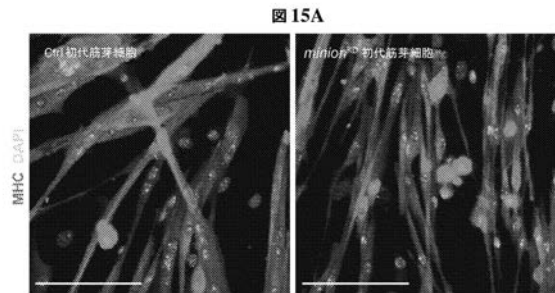
【 図 1 4 - 2 】



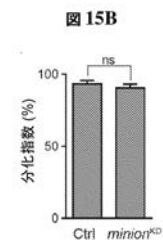
【 図 1 4 - 3 】



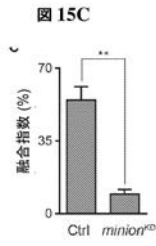
【 図 1 5 - 1 】



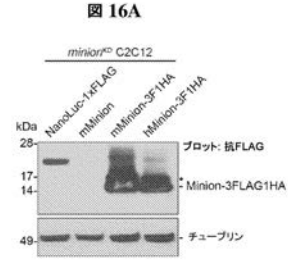
【 図 1 5 - 2 】



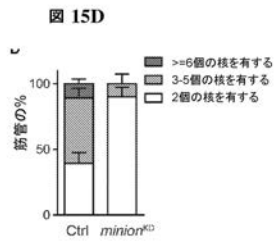
【 図 15 - 3 】



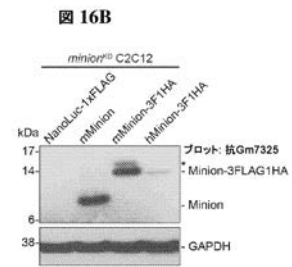
【 図 16 - 1 】



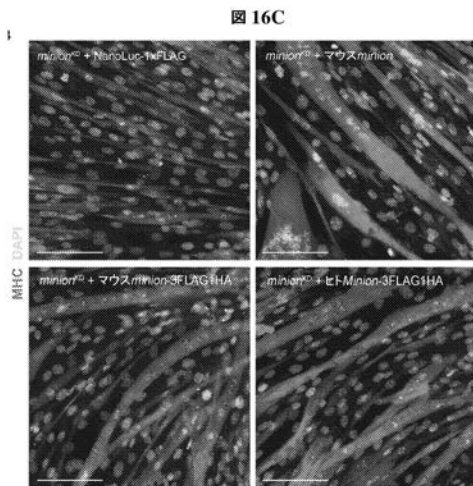
【 図 15 - 4 】



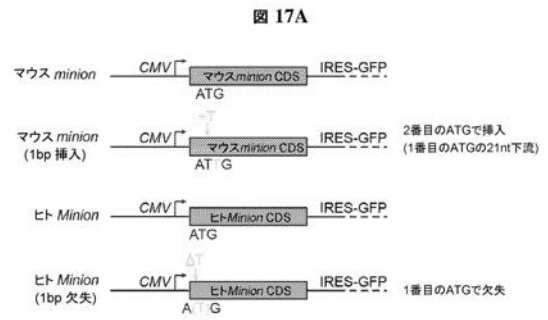
【 図 16 - 2 】



【 図 16 - 3 】

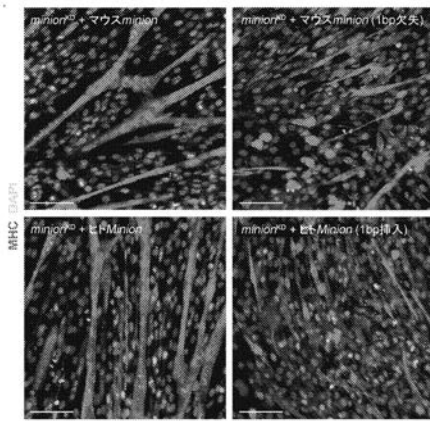


【 図 17 - 1 】



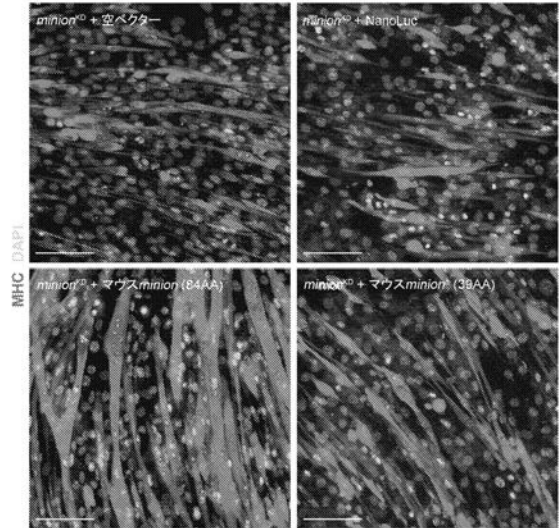
【 図 17 - 2 】

図 17B



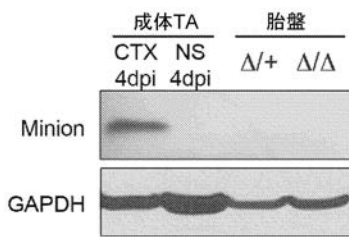
【 図 18 】

図 18



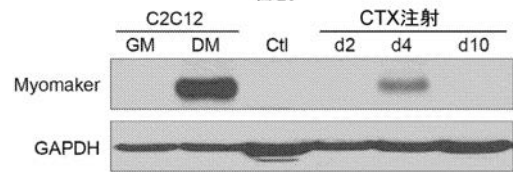
【 図 19 - 1 】

図 19A



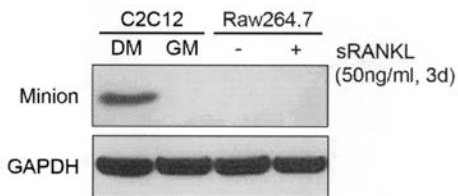
【 図 20 】

図 20



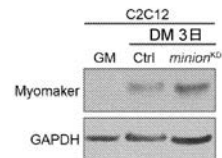
【 図 19 - 2 】

FIG. 19B



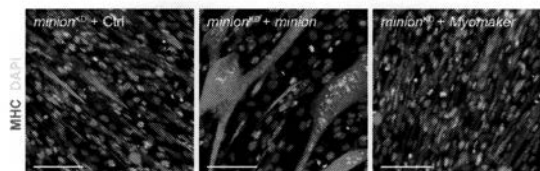
【 図 21 - 1 】

図 21A

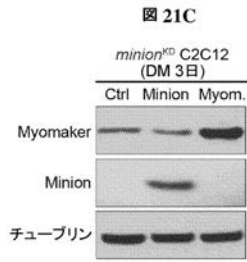


【 図 21 - 2 】

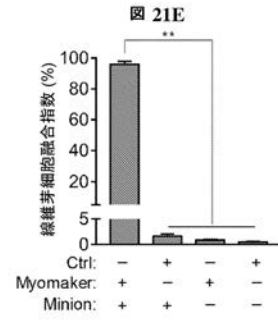
FIG. 21B



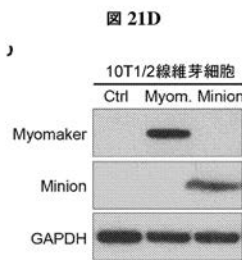
【 図 2 1 - 3 】



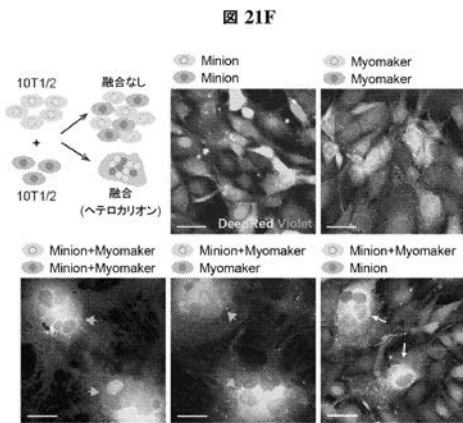
【 図 2 1 - 5 】



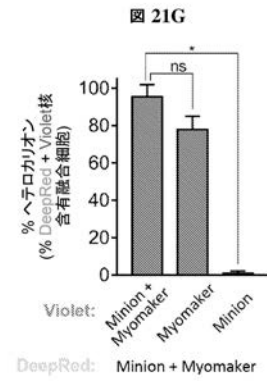
【 図 2 1 - 4 】



【 図 2 1 - 6 】

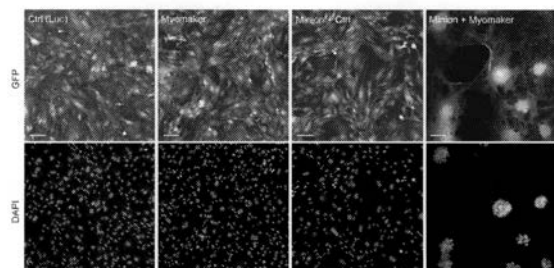


【 図 2 1 - 7 】

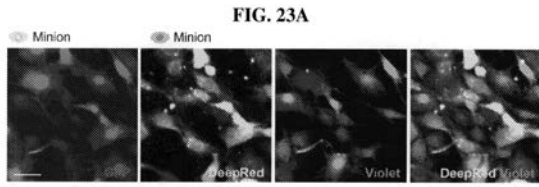


【 図 2 2 】

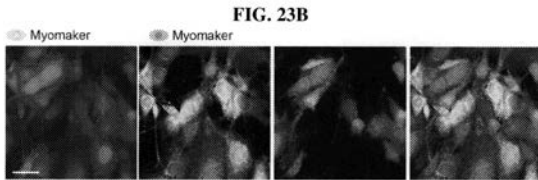
FIG. 22



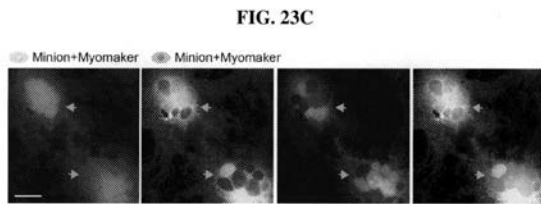
【 図 2 3 - 1 】



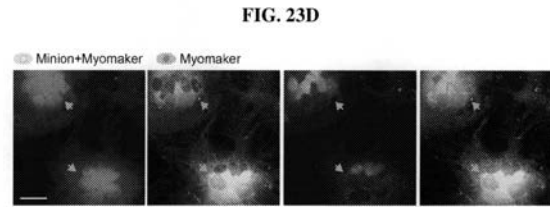
【 図 2 3 - 2 】



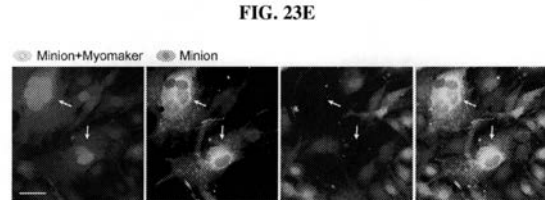
【 図 2 3 - 3 】



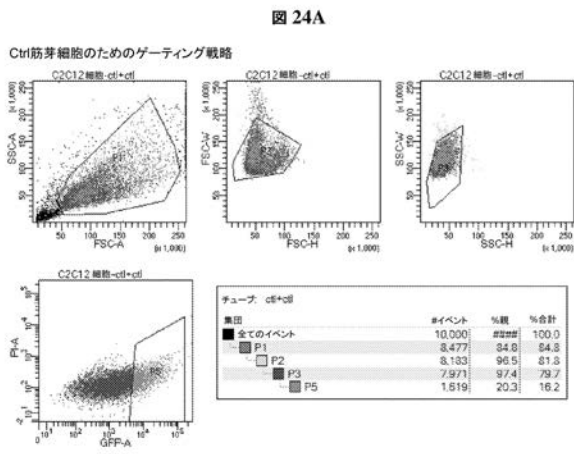
【 図 2 3 - 4 】



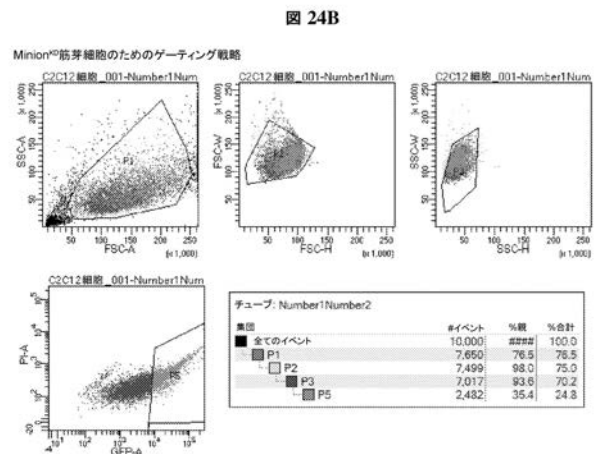
【 図 2 3 - 5 】



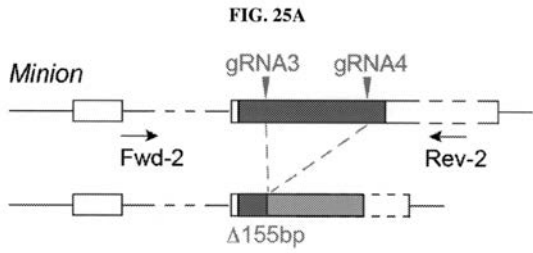
【 図 2 4 - 1 】



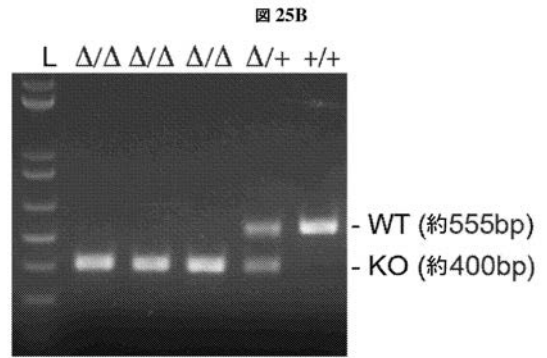
【 図 2 4 - 2 】



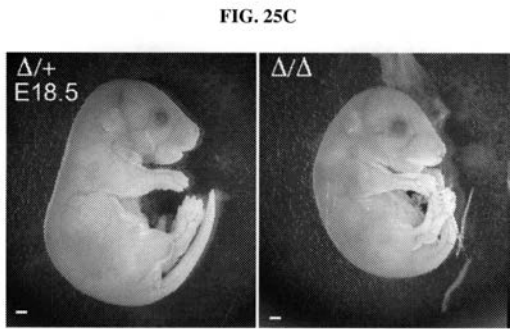
【 図 2 5 - 1 】



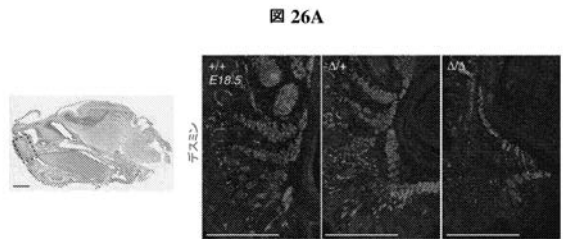
【 図 2 5 - 2 】



【 図 2 5 - 3 】



【 図 2 6 - 1 】



【 図 2 5 - 4 】

FIG. 25D

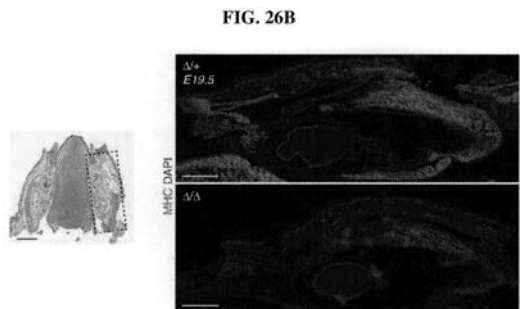
Minion-FL (84AA) **MFVFLIPNVLRLRLRLSPANLAPQHLPLIPLTAPLAEPLSQQMRKALLCCLLPYLRQQQPFPLGKKA**SRVDMGQRKRIQPQK
 Minion-155KO (7AAA) **MFVFLIPNVLRLRLRLSLGDLPLSAGEIIGFDSYSPAVLETVYFIRNVLLEKPYSPVGFPRARJNVDKDFVLEDSFD**

【 図 2 6 - 2 】

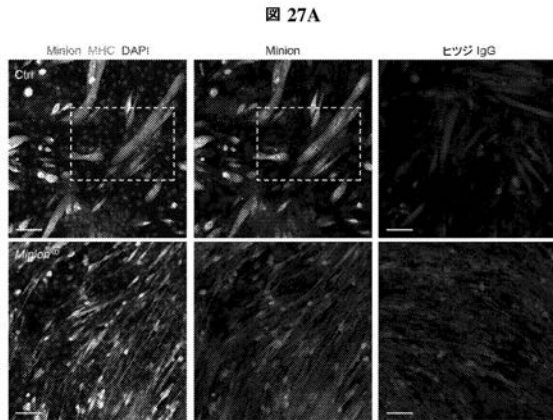
【 図 2 5 - 5 】

図 25E

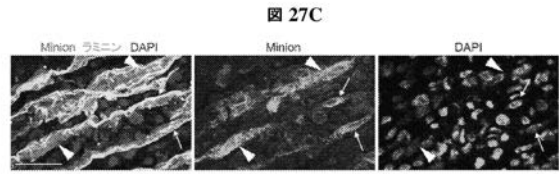
Het x Het	+/+	Δ/+	Δ/Δ	総数
E16.5-E18.5 胚	5	12	9	26
成体マウス	18	26	0	44



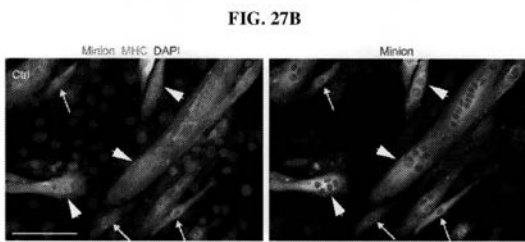
【 図 27 - 1 】



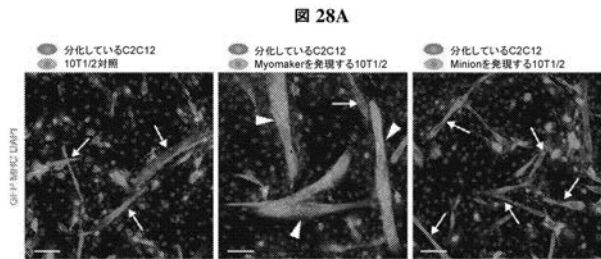
【 図 27 - 3 】



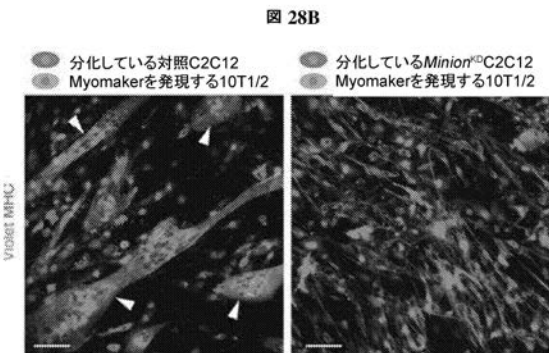
【 図 27 - 2 】



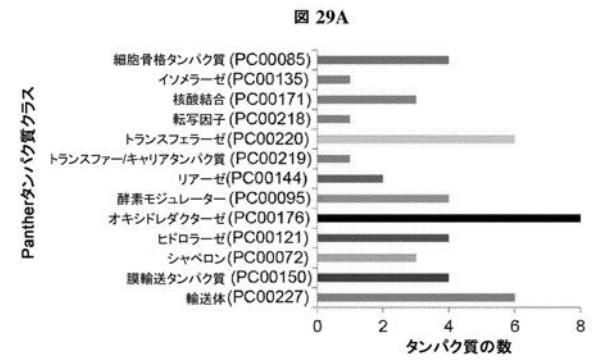
【 図 28 - 1 】



【 図 28 - 2 】

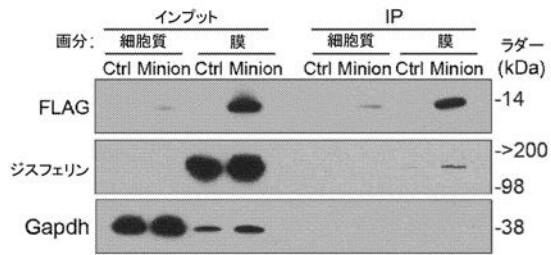


【 図 29 - 1 】



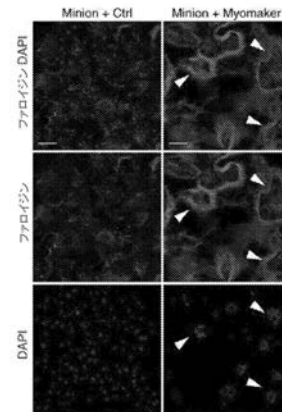
【 図 2 9 - 2 】

図 29B



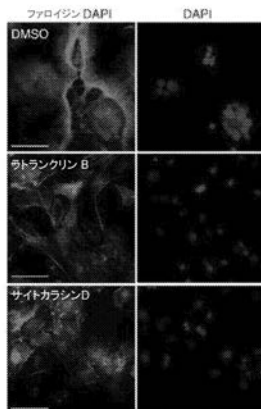
【 図 3 0 - 1 】

図 30A



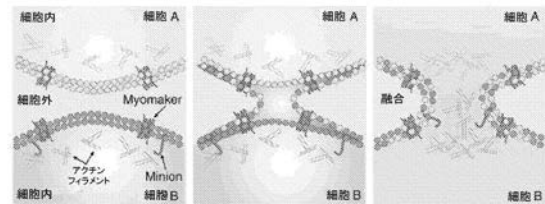
【 図 3 0 - 2 】

図 30B



【 図 3 0 - 3 】

図 30C



【配列表】

2020500020000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2017/057060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/47 A61K38/17 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K 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, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 2 November 2016 (2016-11-02), "RecName: Full=Protein myomixer {ECO:0000250 UniProtKB:Q2Q5T5}; AltName: Full=Microprotein inducer of fusion {ECO:0000303 PubMed:28569745}; Short=Protein minion {ECO:0000303 PubMed:28569745}; Short=hMINION {ECO:0000303 PubMed:28569745}"; XP55441004, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A0A1B0GTQ4 Database accession no. A0A1B0GTQ4	1-14, 22-27, 29-35, 41-47
A	sequence -/--	15-21, 28, 36-40, 48-128
<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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "B" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 January 2018		Date of mailing of the international search report 12/02/2018
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 Griesinger, Irina

3

Form PCT/ISA210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2017/057060

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p style="text-align: center;">-----</p> DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; December 2005 (2005-12), CHEN YAN-MEI ET AL: "Molecular cloning and functional analysis of ESGP, an embryonic stem cell and germ cell specific protein", XP002777333, Database accession no. PREV200600147114 abstract	1-14, 22-27, 29-35, 41-47
A		15-21, 28, 36-40, 48-128
X	<p style="text-align: center;">-----</p> WO 2007/128984 A2 (RANDOX LAB LTD [GB]; CROCKARD MARTIN ANDREW [GB]; LAMONT JOHN VICTOR []) 15 November 2007 (2007-11-15)	1-14, 22-27, 29-35, 41-47
A	sequence 17	15-21, 28, 36-40, 48-128
X	<p style="text-align: center;">-----</p> WO 2014/210448 A1 (UNIV TEXAS [US]) 31 December 2014 (2014-12-31) cited in the application	48-73, 75-81, 86-97, 99-105, 110-126
A	claims 11, 31	74, 82-85, 98, 106-109, 127,128
X	<p style="text-align: center;">-----</p> DOUGLAS P. MILLAY ET AL: "Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation", NATURE, vol. 499, no. 7458, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 301-305, XP055440853, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature12343 abstract	48-73, 75-81, 86-97, 99-105, 110-126
A		74, 82-85, 98, 106-109, 127,128
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2017/057060

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>QIAO ZHANG ET AL: "The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 8, 1 June 2017 (2017-06-01), page 15664, XP055440729, DOI: 10.1038/ncomms15664 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-128
X,P	<p>MALGORZATA E. QUINN ET AL: "Myomergin induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 8, 1 June 2017 (2017-06-01), page 15665, XP055440754, DOI: 10.1038/ncomms15665 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-128
X,P	<p>PENGPENG BI ET AL: "Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer", SCIENCE, vol. 356, no. 6335, 21 April 2017 (2017-04-21), pages 323-327, XP055440750, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aam9361 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-128

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2017/057060

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2007128984	A2	15-11-2007	EP 2004857 A2	24-12-2008
			US 2009192107 A1	30-07-2009
			WO 2007128984 A2	15-11-2007

WO 2014210448	A1	31-12-2014	US 2016136240 A1	19-05-2016
			WO 2014210448 A1	31-12-2014

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864 1 0 0 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/869 (2006.01)	C 1 2 N	15/869 Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/864 Z	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/867 Z	
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/07 (2006.01)	C 1 2 N	15/88 Z	
C 1 2 N	7/00 (2006.01)	C 1 2 N	15/07	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 1 2 N	7/00	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	25/08 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/02 1 0 1	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 K	35/13 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	35/15 (2015.01)	A 6 1 K	35/13	
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/15 Z	
A 6 1 K	35/33 (2015.01)	A 6 1 K	35/28	
A 6 1 K	35/34 (2015.01)	A 6 1 K	35/33	
A 6 1 K	35/407 (2015.01)	A 6 1 K	35/34	
A 6 1 K	35/44 (2015.01)	A 6 1 K	35/407	
A 6 1 K	35/36 (2015.01)	A 6 1 K	35/44	
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	35/36	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	38/02	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	35/768 (2015.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/768	
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	35/763 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K	35/765 (2015.01)	A 6 1 K	35/763	
A 6 1 K	35/766 (2015.01)	A 6 1 K	35/765	
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	35/766	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	39/00 H	
A 6 1 K	9/127 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	47/69 (2017.01)	A 6 1 K	47/42	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 K	47/69	
		C 1 2 P	21/08	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON
2. TWEEN
3. iPhone

(72) 発明者 コーベル, ステファン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121, サンディエゴ, ジョン ジェイ ホップキンス
ドライブ 10675, ディービーイー ゲノミクス インスティテュート オブ ザ ノバル
ティス リサーチ ファンデーション, ノバルティス インスティテュート フォー ファンクシ
ョナル ゲノミクス, インコーポレイテッド内

(72) 発明者 サンパス, スリハリ シダンビ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121, サンディエゴ, ジョン ジェイ ホップキンス
ドライブ 10675, ディービーイー ゲノミクス インスティテュート オブ ザ ノバル
ティス リサーチ ファンデーション, ノバルティス インスティテュート フォー ファンクシ
ョナル ゲノミクス, インコーポレイテッド内

(72) 発明者 サンパス, スリナス シダンビ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121, サンディエゴ, ジョン ジェイ ホップキンス
ドライブ 10675, ディービーイー ゲノミクス インスティテュート オブ ザ ノバル
ティス リサーチ ファンデーション, ノバルティス インスティテュート フォー ファンクシ
ョナル ゲノミクス, インコーポレイテッド内

(72) 発明者 シュメット, クリスチャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121, サンディエゴ, ジョン ジェイ ホップキンス
ドライブ 10675, ディービーイー ゲノミクス インスティテュート オブ ザ ノバル
ティス リサーチ ファンデーション, ノバルティス インスティテュート フォー ファンクシ
ョナル ゲノミクス, インコーポレイテッド内

(72) 発明者 チャン, チャオ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121, サンディエゴ, ジョン ジェイ ホップキンス
ドライブ 10675, ディービーイー ゲノミクス インスティテュート オブ ザ ノバル
ティス リサーチ ファンデーション, ノバルティス インスティテュート フォー ファンクシ
ョナル ゲノミクス, インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA05

4B065 AA93X AA93Y AA94X AA94Y AA95X AB01 AB06 AC14 BA02 BA05
CA24 CA25 CA44 CA45

4C076 AA19 AA95 BB01 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 BB21 BB25
BB27 BB31 CC01 CC10 CC11 CC21 CC41 EE41 EE59 FF11

4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 BA01 MA52 MA56 MA59 MA63 MA66
NA05 NA13 NA14 ZA011 ZA012 ZA021 ZA022 ZA061 ZA062 ZA211
ZA212 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZA941 ZA942 ZB261 ZB262 ZB271
ZB272 ZC211 ZC212

4C085 AA03 AA38 BB01 CC02 CC03 EE01 EE06 FF13 FF14 GG02
GG03 GG04 GG06 GG08

4C086 AA01 AA02 EA16 MA52 MA56 MA59 MA63 MA66 NA05 NA13

	NA14	ZA01	ZA02	ZA06	ZA21	ZA33	ZA36	ZA94	ZB26	ZB27
	ZC21									
4C087	AA01	AA02	BB33	BB34	BB44	BB47	BB52	BB63	BB64	BB65
	BC83	CA04	MA52	MA56	MA59	MA63	MA66	NA05	NA13	NA14
	ZA01	ZA02	ZA06	ZA21	ZA33	ZA36	ZA94	ZB26	ZB27	ZC21
4H045	AA11	AA20	AA30	BA41	CA40	DA76	EA20	EA28	EA51	FA74