

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-515542

(P2018-515542A)

(43) 公表日 平成30年6月14日(2018.6.14)

| (51) Int.Cl.                   | F I           | テーマコード (参考)          |
|--------------------------------|---------------|----------------------|
| <b>A 6 1 K 47/42 (2017.01)</b> | A 6 1 K 47/42 | 4 B 0 6 5            |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b> | C 1 2 N 15/00 | Z N A A<br>4 C 0 7 6 |
| <b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 1/15  | 4 C 0 8 4            |
| <b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 1/19  | 4 C 0 8 5            |
| <b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 1/21  | 4 C 0 8 7            |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求            |               | (全 26 頁) 最終頁に続く      |

(21) 出願番号 特願2017-559588 (P2017-559588)  
 (86) (22) 出願日 平成28年5月14日 (2016.5.14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年12月21日 (2017.12.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/032573  
 (87) 国際公開番号 WO2016/187076  
 (87) 国際公開日 平成28年11月24日 (2016.11.24)  
 (31) 優先権主張番号 62/162, 582  
 (32) 優先日 平成27年5月15日 (2015.5.15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508221224  
 ボード オブ リージェンツ オブ ザ  
 ユニバーシティ オブ ネブラスカ  
 アメリカ合衆国, ネブラスカ州 6858  
 3-0745, リンカーン, ホールドレッ  
 ジ ストリート 3835, ヴァーナー  
 ホール  
 (74) 代理人 100127926  
 弁理士 結田 純次  
 (74) 代理人 100140132  
 弁理士 竹林 則幸  
 (72) 発明者 ベンジャミン・ジェイ・パウリック  
 アメリカ合衆国ネブラスカ州68203.  
 リンカーン, バインストリート2203.  
 アパートメント8

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 選択細胞への分子送達に適用する遺伝子操作したボツリヌス菌毒素

(57) 【要約】

遺伝子操作したペイロード送達システムは、孔形成ユニットに共有結合した標的細胞結合ユニット、および孔形成ユニットに非共有結合しうる領域を用いて適合させたペイロード部分を含む。孔形成ユニットはクロストリジウム毒素の特定の血清型由来であり、他方、ペイロード領域はクロストリジウム毒素の別の血清型由来である。本開示のキメラタンパク質ベースの組成物は、ペイロードを神経細胞に特異的に送達することができる。

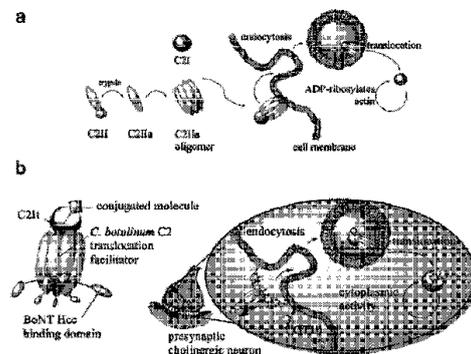


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

薬剤を標的細胞に送達するための組成物であって、  
標的細胞結合ユニット、  
孔形成ユニット、および

該薬剤を含むペイロードユニットであって、該孔形成ユニットに非共有結合している前記ペイロードユニット

を含み、該孔形成ユニットは非神経毒性の二成分毒素の第 1 の A B 型由来のポリペプチドであり、該標的細胞結合ユニットは毒素の第 2 の型由来のポリペプチドであり、前記第 2 の型は該第 1 の型とは異なる、前記組成物。

10

## 【請求項 2】

孔形成ユニットは、ボツリヌス菌毒素 C 2 の孔形成ユニットの重鎖由来のポリペプチドまたはポリペプチドオリゴマーである、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

孔形成ユニットは、ボツリヌス菌毒素 C 2 以外の毒素由来の天然のまたは改変された重鎖結合ドメインを含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

孔形成ユニットは、ウエルシュ菌のアルファ、ベータ、イプシロンおよびイオタ毒素、スピロフォルム菌のイオタ様毒素ならびに炭疽毒素からなる群から選択される毒素由来の天然のまたは改変された孔形成ドメインを含む、請求項 3 に記載の組成物。

20

## 【請求項 5】

標的細胞結合ユニットは、ボツリヌス菌毒素 C 2 以外の毒素由来の天然のまたは改変された重鎖結合ドメインを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

標的細胞結合ユニットは、ボツリヌス菌神経毒、ウエルシュ菌の毒素アルファ、ベータ、イプシロンおよびイオタ毒素、スピロフォルム菌のイオタ様毒素、コレラ毒素、炭疽毒素、志賀毒素、志賀様毒素、ジフテリア毒素、リシンならびに外毒素 A からなる群から選択される毒素由来の天然のまたは改変された重鎖結合ドメインを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

## 【請求項 7】

標的細胞結合ユニットは、神経細胞に優先的に結合する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 8】

薬剤を神経細胞に優先的に送達する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

標的細胞結合ユニットは、ボツリヌス菌神経毒 C 1 の重鎖結合ドメイン ( C 1 H c c ) 由来である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 10】

標的細胞結合ユニットは、孔形成ユニットに共有結合する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

## 【請求項 11】

ペイロードユニットは、標的細胞結合ユニットまたは孔形成ユニットに共有結合していない、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 12】

薬剤は、治療薬、診断薬およびそれらの組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つのメンバーを含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 13】

薬剤は、毒素、細胞周期阻害物質、アポトーシス誘導剤、DNA 複製阻害物質、RNA 合成阻害物質、タンパク質合成阻害物質、酵素、タンパク質結合薬剤、抗体、中和抗体、標識剤、磁気ビーズおよびそれらの組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つのメ

50

ンバーを含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

薬剤は、A D P - リボシルトランスフェラーゼを含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 5】

薬剤は、ボツリヌス菌毒素 C 2 からの C 2 I を含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

薬剤は、蛍光性薬剤を含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 7】

標的細胞結合ユニットはボツリヌス菌神経毒 C 1 からの重鎖結合ドメイン ( C 1 H c c ) であり、孔形成ユニットはボツリヌス菌毒素 C 2 の孔形成ユニットの重鎖であり、ペイロードユニットはボツリヌス菌毒素 C 2 からの C 2 I を含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 8】

標的細胞結合ユニットは、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチドを含み、孔形成ユニットは、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチドを含み、ペイロードユニットは、配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 9】

標的細胞結合ユニットおよび孔形成ユニットは共有結合で連結して、配列番号 4 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチドを形成し、ペイロードユニットは、配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 0】

薬剤を標的細胞へ送達する方法であって、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の組成物を標的細胞へ投与することを含む前記方法。

【請求項 2 1】

組成物が対象へ注射により投与され、該対象が標的細胞を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

標的細胞は、脳腫瘍の細胞、神経芽細胞腫の細胞および網膜芽細胞腫の細胞、末梢ニューロン；運動ニューロン、感覚ニューロンならびにそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 2 0 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

配列番号 1 ~ 6 からなる群から選択されるポリペプチドと少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 1 5 年 5 月 1 5 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 1 6 2 , 5 8 2 号の優先権を主張するものであり、これはまたあらゆる目的のために全体を参照によって本出願に組み入れる。

【0 0 0 2】

政府の権利

本発明は、米国国防総省国防脅威削減局の授与による助成第 H D T R A - 1 0 - C - 0 0 5 5 号の下、政府支援を受けてなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有す

10

20

30

40

50

る。

【背景技術】

【0003】

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は、芽胞を形成する耐熱性の嫌気性細菌であり、A～G血清型として知られる数種の血清型をもつタンパク質ベースの毒素 (ボツリヌス毒素) を生産し、その血清型のうちのCには3つの亜型があり、血清型C1、C2およびC3として知られる。C1神経毒は、ニューロンによるアセチルコリン放出を阻害することにより、低用量で人間や動物を麻痺させ、回復は遅く、人が再び呼吸できるようになるまで数週間にわたる換気が治療に必要となることがある。C2毒素は神経刺激性ではなく、壊死と出血を引き起こす。C3毒素は、これらのC血清型の中で特性の決定が最も進んでいない。

10

【0004】

毒素ベースの送達システムのほとんどは、標的細胞に結合して、脂質二重層を通して標的細胞の細胞質ゾルへ物質 (ペイロード) を移送する (translocate) マルチドメインタンパク質である。これらのシステムは、改造したAB型毒素であり、ペイロードドメイン (A) および結合/トランスロケーション (translocation) ドメイン (B) からなる。このAおよびBドメインは、ポリペプチドによるまたはジスルフィド結合による共有結合で連結させることができ、後にトランスロケーションのステップで切断される。非共有結合で連結した (二成分の) AおよびB毒素ドメインは、独立して転写、翻訳されて、毒性を発揮する前に会合する。ボツリヌス菌C2毒素 (C2) は神経毒ではないが、二成分AB毒素の設計を有する。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、ペイロード (または薬剤) を標的細胞へ送達するためのキメラ毒素ベースの送達組成物 (またはシステム) を提供することにより当技術分野を前進させるものである。一実施形態において、組成物は、他のさらなる成分を追加してまたは追加することなく、標的細胞結合ユニット、孔形成ユニットおよびペイロードユニットを含んでもよい。

【0006】

一実施形態において、孔形成ユニットは、既知の毒素、例えばボツリヌス菌からの毒素の孔形成ユニットと同じであってもよい。別の実施形態において、孔形成ユニットは改変を有する既知の毒素の孔形成ユニット由来であってもよい。別の実施形態において、孔形成ユニットは、孔形成ユニットとして機能しうる任意のタンパク質であってもよい。

30

【0007】

ペイロードユニットは、標的細胞に送達する薬剤を含んでもよい。一態様において、ペイロードユニットは、孔形成ユニット、または連結した孔形成ユニットおよび標的細胞結合ユニットと非共有結合していてもよい。別の態様において、孔形成ユニットと標的細胞結合ユニットは共有結合で連結する。

【0008】

一実施形態において、ペイロードユニットは、既知の毒素、例えばボツリヌス菌からの毒素のペイロードユニットと同じであってもよい。別の実施形態において、ペイロードユニットは、改変を有する既知の毒素のペイロードユニット由来であってもよい。別の実施形態において、ペイロードユニットは、薬剤の送達のためのペイロードユニットとして機能しうる任意のタンパク質であってもよい。

40

【0009】

別の実施形態において、標的細胞結合ユニットは、抗体、抗体断片、アフィボディ、成長因子、受容体結合リガンドまたはそれらの組合せからなる群から選択される、特定の標的細胞に結合するリガンドを含んでもよい。別の実施形態において、標的細胞結合ユニットは、C2以外のボツリヌス菌毒素由来の天然のまたは改変された重鎖結合ドメインを含んでもよい。

50

## 【0010】

別の実施形態において、標的細胞結合ユニットは、神経細胞に優先的に結合する。別の実施形態において、組成物は、薬剤を神経細胞に優先的に送達する。別の実施形態において、標的細胞結合ユニットは、ボツリヌス菌神経毒C1の重鎖結合ドメイン(C1 Hc c)(図2c、配列番号1を参照)である。

## 【0011】

別の実施形態において、孔形成ユニットは非神経毒性(すなわちニューロンを特異的に標的としない)毒素の第1の型由来のポリペプチドであってもよく、標的細胞結合ユニットは毒素の第2の型由来のポリペプチドであってもよく、ここで第2の型は、毒素の第1の型とは異なる。別の実施形態において、非神経毒性毒素の第1の型は、二成分毒素であ

10

## 【0012】

別の実施形態において、孔形成ユニットは第1のクロストリジウム毒素血清亜型由来のポリペプチドであってもよく、他方、標的細胞結合ユニットは第2のクロストリジウム毒素血清亜型由来のポリペプチドであり、ここで第2の血清亜型は、第1の血清亜型とは異なる。別の実施形態において、孔形成ユニットはボツリヌス菌毒素C2の孔形成ユニットの重鎖由来のポリペプチド(図2c、配列番号2を参照)である。

## 【0013】

別の実施形態において、孔形成ユニットは、ボツリヌス菌毒素C2以外の毒素由来の天然のまたは改変された重鎖結合ドメインを含んでもよい。一態様において、孔形成ユニットは、ウエルシュ菌(*Clostridium perfringens*)のアルファ、ベータ、イプシロンおよびイオタ毒素、スピロフォルム菌(*Clostridium spiriforme*)のイオタ様毒素、炭疽毒素ならびにそれらの組合せからなる群から選択される毒素由来の天然のまたは改変された孔形成ドメインを含んでもよい。

20

## 【0014】

一実施形態において、孔形成ユニットはボツリヌス菌毒素C2の孔形成ユニットの重鎖由来のポリペプチドであり、他方、標的細胞結合ユニットはボツリヌス菌毒素C2以外の毒素由来の天然のまたは改変された重鎖結合ドメインを含んでもよい。一態様において、標的細胞結合ユニットは、ボツリヌス菌神経毒、ウエルシュ菌の毒素アルファ、ベータ、イプシロンおよびイオタ毒素、スピロフォルム菌のイオタ様毒素、コレラ毒素、炭疽毒素、志賀毒素、志賀様毒素、ジフテリア毒素、リシン、外毒素Aならびにそれらの組合せからなる群から選択される毒素由来の天然のまたは改変された重鎖結合ドメインを含んでもよい。

30

## 【0015】

別の実施形態において、ペイロードユニットは、標的細胞結合ユニットまたは孔形成ユニットに共有結合していない。別の実施形態において、ペイロードユニットはボツリヌス菌毒素C2由来のポリペプチド(図2d、配列番号3を参照)である。

## 【0016】

別の実施形態において、薬剤は、治療薬、診断薬、造影剤およびそれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1つのメンバーを含む。別の態様において、薬剤は、毒素、細胞周期阻害物質、アポトーシス誘導剤、DNA複製阻害物質、RNA合成阻害物質、タンパク質合成阻害物質、酵素、タンパク質結合薬剤、抗体、中和抗体、標識剤、磁気ビーズおよびそれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1つのメンバーを含んでもよい。

40

## 【0017】

別の実施形態において、薬剤は、ADP-リボシルトランスフェラーゼを含む。別の実施形態において、薬剤は、ボツリヌス菌毒素C2からのC2Iを含む。別の実施形態において、薬剤は、標的細胞を標識するまたはモニタリングするための蛍光性薬剤を含む。

## 【0018】

一実施形態において、標的細胞はがん細胞であってもよい。別の実施形態において、標

50

的細胞はニューロンであってもよい。別の実施形態において、標的細胞は、脳腫瘍の細胞、神経芽細胞腫の細胞、網膜芽細胞腫の細胞、末梢ニューロン、運動ニューロン、感覚ニューロンまたはそれらの組合せであってもよい。

【0019】

別の実施形態において、遺伝子操作したペイロード送達組成物は、孔形成ユニットに共有結合した標的細胞結合ユニット、および孔形成ユニットに非共有結合しうる領域を用いて適合させたペイロード部分を含んでもよい。別の実施形態において、リンカー、(EP)<sub>10</sub>で連結した孔形成ユニットに共有結合した標的細胞結合ユニットを含むことができるポリペプチド(配列番号4)を開示する。ここで標的細胞結合ユニットはボツリヌス菌神経毒C1の重鎖結合ドメイン(C1 Hcc)であり、孔形成ユニットはボツリヌス菌毒素C2の孔形成ユニットの重鎖由来のポリペプチドである。

10

【0020】

別の実施形態において、活性のあるペイロード領域は、ボツリヌス毒素C2の軽鎖ペイロード部分由来の連結領域を介して孔形成ユニットに結合している。別の態様において、標的細胞結合ユニットは、ボツリヌス毒素C1の標的細胞結合ユニット由来である。

【0021】

別の実施形態において、標的細胞結合ユニットはボツリヌス菌神経毒C1からの重鎖結合ドメイン(C1 Hcc)であり、孔形成ユニットはボツリヌス菌毒素C2の孔形成ユニットの重鎖であり、ペイロードユニットはボツリヌス菌毒素C2からのC2Iを含む。

【0022】

別の実施形態において、標的細胞結合ユニット、孔形成ユニットおよびペイロードユニットを含む、薬剤を標的細胞に送達するための組成物において、標的細胞結合ユニットは、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも80、90、95、99%または100%の配列同一性を有するポリペプチドを含み、孔形成ユニットは、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも80、90、95、99%または100%の配列同一性を有するポリペプチドを含み、ペイロードユニットは、配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも80、90、95、99%、または100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

20

【0023】

別の実施形態において、標的細胞結合ユニット、孔形成ユニットおよびペイロードユニットを含む、薬剤を標的細胞に送達するための組成物において、標的細胞結合ユニットと孔形成ユニットは共有結合で連結して、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも80、90、95、99%または100%の配列同一性を有するポリペプチドを形成し、ペイロードユニットは、配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも80、90、95、99%または100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

30

【0024】

別の実施形態において、本開示の組成物を対象へ注射により投与してもよい。ここで対象は標的細胞を含む。

【0025】

別の実施形態において、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを開示するが、ここでポリペプチドは、配列番号1~6からなる群から選択されるポリペプチドと少なくとも80、90、95、99%または100%の同一性を有する。一態様において、ポリヌクレオチドはベクターで運んでもよい。一態様において、ベクターは自己複製することができる。

40

【0026】

別の実施形態において、ポリヌクレオチドを含む宿主細胞も開示する。宿主細胞は、薬剤を標的細胞に送達するための組成物を生産するのに使用してもよい。別の実施形態において、宿主細胞を薬剤の送達のために対象へ導入してもよい。別の実施形態において、本開示の目的のためには、宿主細胞は細菌またはウイルスであってもよい。

【図面の簡単な説明】

【0027】

50

【図1】(a)天然のC2毒素による中毒の分子によるステップ、および(b)C2II-C1およびC2It輸送システムに基づく神経の送達モデルを示す図である。

【図2】ボツリヌス菌C1、ボツリヌス菌C2II、融合C2II-C1およびC2Iのタンパク質ドメインを示す図である。数字は各タンパク質のアミノ酸残基に相当する。(a)BoNT C1は、連結した酵素活性をもつ軽鎖ペイロードと結合/トランスロケーションドメインとを有する。(b)C2II結合/トランスロケーション成分は4つのドメインを有する。アミノ酸残基の182は、C2IIのC2IIaへの活性化のためのトリプシン切断位置を示す。ドメイン4(D4)を除去して、C2II-C1のトランスロケーションドメインとしてのC2II D4を生産した。(c)融合C2II-C1(配列番号4)は、グリシン-セリン残基ペアが両側に位置する(EP)<sub>10</sub>リンカー(配列番号5)を用いてC2II D4(配列番号2)とBoNT C1 H<sub>CC</sub>(配列番号1)を連結して作製した。アミノ酸182はC2II-C1の活性化部位である。(d)C2毒素の天然のC2Iの酵素活性をもつペイロードおよびトランケートされたC2Itドメイン。アミノ酸299、348、387および389はC2I(配列番号3)のADP-リボシル化活性に必須であり、よって、C2It(配列番号6)には存在しない。

【図3】異なる程度に(differentially)GT1b富化した(enriched)細胞集団へのC2II-C1が媒介したC2It-488の取込みを評価するフローサイトメリーの図である。(a)クマシー染色した精製C2It(約26kDa)のSDS-PAGE。レーン:M:分子定規、1:トロンピン切断後の可溶性溶出画分。(b)示したN2A細胞は、GT1b富化した後、組換えタンパク質である活性化C2II-C1(2μg/mL)およびC2It-488(4μg/mL)と共に2時間、インキュベートした。次に、細胞をプロナーゼ(1μg/mL)で処理して膜に結合したC2It-488を除去した。試料は、FACSDivaソフトウェアを使用したBD FACSCantoIIフローサイトメーターで分析した。(c)フローサイトメリーによる細胞内蛍光の定量的評価。百分率は平均±SEM(n=3)として表しており、C2II-C1が媒介したC2It-488のGT1b依存性の取込みの統計的有意性は、各対照の平均値との比較によるスチューデントのt検定を用いて算出した。p<0.005。

【図4】(a)および(b)は、C2II-C1およびC2I-568で処理した、異なる程度にGT1b富化したN2A細胞のCLSM画像である。画像はすべて、60倍油浸レンズと2倍光学ズームレンズを使用して取得した。N2A集団は、Rab5a-GFP初期エンドソームマーカー(緑)で24時間処理した後、DAPIで染色した。活性化C2II-C1(2μg/mL)、C2It-568(赤、4μg/mL)およびGT1b(50μg/mL)は2時間インキュベートした。(a)タンパク質添加前の4時間、細胞をGT1b富化した。(b)タンパク質添加前の4時間、細胞はGT1b富化を行わなかった。

【図5】C2II-C1が媒介したC2Iによる、異なる程度にGT1b富化した細胞集団の細胞円形化を示す図である。(a)クマシー染色した精製C2IのSDS-PAGE。予想質量:C2I-GST(約75kDa)C2I(約49kDa)、分子定規、1:溶解物上清、2:トロンピン切断前の精製樹脂、3:トロンピン切断後の可溶性溶出画分。(b)A172神経膠芽細胞種細胞を約60%コンフルエントになるまで増殖させ、示すようにGT1b富化したまたは富化しなかった。(c)チミジンブロックを解除しまたは解除することなく、ヨウ化プロビジウムで染色した同調HeLa細胞の経時的なフローサイトメリーを用いて、過剰チミジンの除去および解除用デオキシチジン添加後のS期DNA合成の進行を確認した。(d)異なる程度にGT1b富化した同調HeLa細胞の細胞円形化。

【発明を実施するための形態】

【0028】

分子ペイロードを標的細胞の細胞質ゾルへ送達するための組成物および方法を開示する。細菌は、細胞を標的に定めて、有毒なペイロードを標的細胞の細胞質ゾルへ送達する機

10

20

30

40

50

構を進化させてきた。この機構を改変し、遺伝子操作して有益なペイロードを送達することができる。

【0029】

一般的には、A B型細菌性毒素には連結型と非連結型（二成分）の2つのクラスがある。連結型毒素は、典型的には、毒素ドメインおよび結合/トランスポーションドメインの両方を含む一本鎖タンパク質を有する。二成分毒素は、典型的には、別々に発現した2つのタンパク質分子を有し、結合/トランスポーションドメインと毒素ドメインは非共有相互作用を介して集合体をなす。

【0030】

本開示の目的のために、用語「由来の」は、分子が別の分子に基づき構築され、該別の分子に対し、構造上、同一、実質的に同一または実質的に類似であることを意味する。別の態様において、由来した分子は、典型的には、別の分子と同一、実質的に同一または実質的に類似の機能性を発揮する。

10

【0031】

用語「配列同一性」は、アミノ酸またはヌクレオチド配列における類似度を表すために使用する。より小さい分子をより大きい分子と比較する場合、より小さい分子をより大きい分子の全長または部分断片に対して比較してよい。

【0032】

天然のC2毒素は2つの別個のタンパク質から構成される。Bドメインタンパク質（C2II）は、標的細胞に結合してAドメイン（C2I、ペイロード）を移送する。Aドメインは、細胞質アクチンのADP-リボシル化により細胞円形化およびアポトーシスを開始させるADP-リボシルトランスフェラーゼである（図1a）。C2IIモノマーは、タンパク質分解性のプロセッシングを受けてN末端から20kDaセグメントが除去されることにより、結合/トランスポーションドメインがC2IIaへと活性化される。C2IIaモノマーはその後、自発的にオリゴマーを形成し、細胞膜上のアスパラギン連結グリカンとの相互作用を介して細胞表面に結合する。AドメインであるC2Iは、C2IIaオリゴマーと結合し、そのC2IIa/C2I複合体はクラスリンおよびRho依存性の機構により内在化する。初期エンドソームの酸性化によってC2IIaオリゴマーによる膜孔形成が起こり、これを通してC2Iは細胞質へ輸送される。

20

【0033】

治療用の開発のために、二成分毒素の遺伝子操作は、これにより結合/トランスポーションドメインおよびペイロードドメインを個別に発現させて精製することができるため、有益であることは確かである。ボツリヌス菌からのC2毒素は二成分構造であるが、種々の細胞と結合し、中毒にはN連結型グリカンを必要とする（すなわち、特異的神経毒ではない）ため、非特異性の毒素である。本明細書では、C2毒素結合ドメインを神経細胞へ再標的化させるように遺伝子操作する方法を開示する。より具体的には、C1ボツリヌス神経毒からの標的結合ドメインを使用してもよい。C1ボツリヌス神経毒からの結合ドメインは、連結型毒素の設計において末梢神経組織への薬物送達のための標的化成分として、またリポソーム表面への修飾として既に利用されている。

30

【0034】

一実施形態において、C2毒素の結合ドメインの置換には、再標的化した結合/トランスポーション成分が、活性化されるとオリゴマーを形成し、細胞表面の新しい標的部分へ結合し、そしてペイロードを標的細胞の細胞質ゾルへ移送する能力を保持することが必要である。C2毒素の天然の結合ドメインは分子のC末端部に位置し、D4と呼ばれる（図2bを参照）。一態様において、D4がなくても人工膜ではトランスポーションの孔は形成できるため、D4はオリゴマー形成に必要ではない。別の態様において、D4をC2IIから削除して末梢ニューロンに分子を標的化すると考えられるBoNT C1結合ドメインで置換する。BoNT C1 H<sub>c</sub>c（図2a）は、ガングリオシドGT1bおよびGD1bに優先的に結合する。

40

【0035】

50

別の実施形態において、B o N T / A の N 末端の重鎖ドメイン ( H C N ) はキメラ C 2 I I - C 1 には含めない。H C N は、フォスファチジルイノシトール - リン酸との相互作用により膜と会合するように毒素を配向させる可能性があることがわかっている。H C N は、天然の B o N T のトランスロケーションでは作用することができるものの、キメラ C 2 I I - C 1 のトランスロケーション事象では必要でないことがわかっている。

#### 【 0 0 3 6 】

別の実施形態において、連結型毒素から結合ドメインを取り出して、二成分毒素の結合 / トランスロケーションドメイン中に挿入する。この構成によって、得られた分子は、C 2 毒素の活性化およびトランスロケーションの機構を維持しながらニューロンへ再標的化される。B o N T および C 2 のエンドサイトーシスおよびトランスロケーション機構では、いずれの毒素についても、p H 依存性タンパク質立体構造変化を特徴とする、クラスリン / r h o / ダイナミン媒介性エンドサイトーシスのエンドソーム進入経路が関わるという点で類似性があることを留意されたい。

#### 【 0 0 3 7 】

別の実施形態において、トリプシンで活性化するとオリゴマー形成すると考えられる可溶性 C 2 I I - C 1 融合タンパク質の発現を試みてきた。C 1 H<sub>c</sub>c ドメインの直接融合は溶解度に問題があり成功しなかった。この制約を修正するために、柔軟性のあるグリシン - セリンリンカー ( G<sub>4</sub>S )<sub>n</sub> を使用したが、同様の問題に遭遇した。最終的に、強固な ( E P )<sub>10</sub> リンカーを使用することにより、活性化とオリゴマー形成を両立しうる可溶性融合タンパク質が得られた。S D S - P A G E で、限定的なトリプシン消化により C 2 I I - C 1 融合タンパク質が活性化され、その後、オリゴマー形成したことを確認した。ウエスタンブロットングを用いて、C 1 H<sub>c</sub>c ドメインがオリゴマー類 ( o l i g o m e r i c s p e c i e s ) に組み込まれることを確認した。C 2 I I - C 1 オリゴマーに特異的な B o N T C 1 抗原性、および C 2 I I D 4 と比べた電気泳動移動度の減少が認められたことから、C 2 I I - C 1 の C 末端の C 1 H<sub>c</sub>c は、オリゴマー形成を阻害することなく、限定的なトリプシン消化に適合しうるということが明らかである。

#### 【 0 0 3 8 】

C 2 I I - C 1 によるペイロードの結合および内在化を定量化および可視化するために、フローサイトメトリーおよび顕微鏡実験に使用する、蛍光標識した C 末端をトランケートされた C 2 I ベースペイロードである C 2 I t ( 図 2 d ) を構築した。C 2 I のアミノ酸 1 ~ 2 2 6 から構成された C 2 I t ( A D P - リボシル化活性部位残基は含まない ) を、2 つの異なるバージョンとして、アミン反応性化学反応によって A l e x a F l u o r 4 8 8 および 5 6 8 を用いて蛍光標識した ( C 2 I t - 4 8 8 および C 2 I t - 5 6 8 ) 。既に、人為的に G T 1 b 富化した N 2 A 細胞において B o N T C 1 H<sub>c</sub> の進入が G T 1 b 依存性であることが示されており<sup>30</sup>、この戦略を適用して、C 2 I I - C 1 融合タンパク質による標的化の研究を行った。遺伝子操作した B 成分である C 2 I I - C 1 が活性化されてオリゴマー形成し、蛍光標識した A 成分である C 2 I t と会合すると、蛍光標識した C 2 I t の G T 1 b 依存性の取込みが観察されるはずである。融合体の非神経特異性の C 2 成分がトランスロケーション活性を促進するには進入だけ十分であると推測されたため、この細胞モデルでは、既述された B o N T C 1 中毒を増強するために電気刺激は採用しなかった。フローサイトメトリーのために、N 2 A 細胞の培養物を G T 1 b 富化して、他方、別の培養物は富化せず、両培養物を活性化 C 2 I I - C 1 および C 2 I t - 4 8 8 と共にインキュベートし、その後、分析前に、両培養物ともプロナーゼで処理して細胞外タンパク質を除去した。細胞内蛍光が 1 0<sup>3</sup> 吸光度単位を上回る細胞をフローサイトメトリーでカウントし、これを繰り返して得られた結果から、結合ドメイン受容体 G T 1 b 富化した N 2 A 細胞集団は、C 2 I I - C 1 で送達された蛍光 C 2 I t を優先的に取り込んだことが示された ( 図 3 ) 。ここで示した結果は、B o N T C 1 H<sub>c</sub>c を使用して、別の毒素結合ドメインを置換することができ、G T 1 b 依存性の進入特異性が得られることを示している。この取込みが G T 1 b 依存性であることを確認するために、また、N 2 A 細胞内における細胞内局在を決定するために、共焦点顕微鏡法を採用した (

10

20

30

40

50

図4)。C2It-568は、GT1b富化細胞に優先的に進入しており、蛍光標識した初期エンドソームと共局在していなかった。トランスロケーションドメインが作り出した孔を通してC2Itが輸送されることによる初期エンドソームからの脱出(escape)は、細胞質ゾルへのペイロード送達の決定要因である。これらの結果は、C2II-C1がC2ItをGT1b特異的に送達したことから、遺伝子操作したペイロードと結合/トランスロケーションドメインが会合するという予想と一致する。初期エンドソームとC2It-568が共局在しなかった(図4(a))ことは、細胞質体を操作するために細胞質ゾルへ送達させたい他のペイロードを探求するための根拠となる。

#### 【0039】

C2II-C1融合体により活性酵素を細胞質ゾルへ送達するために、天然のC2毒素A成分、C2Iを作製してもよい。C2I酵素は、細胞質ゾルのアクチンをADP-リボシル化して真核細胞では細胞円形化を起こすことが知られている。ガングリオシドGT1b富化したヒト神経膠芽細胞種A172およびHeLa細胞株へ、C2IをC2II-C1によって送達した後、その影響を調べた。いずれの細胞株も、GT1b富化していない対照と比較した場合、GT1b富化細胞集団の細胞円形化は2倍超の増加であった。比較すると、融合トランスロケーター、C2II-C1の存在下でペイロードが誘発した同調HeLa細胞の細胞円形化は、Barthらが報告している天然のC2IIトランスロケーションドメインの存在下での細胞円形化効率より低い。発現中に特徴付けられたC2II-C1のトランケート型は、C2II-C1オリゴマーに組み込まれていた可能性があり、これは結合効率の低下をもたらす可能性がある。SDS-PAGEでは最終精製画分にモノマーのC2II-C1がみられないことが示されたものの、解離したまたはオリゴマーに組み込まれていないモノマーのC2II-C1が、オリゴマーの送達システムの機能型と結合に関して競合している可能性がある。これらの知見は、GT1b依存性の様式でC2II-C1により特異的に送達されたC2I酵素が本来もっている細胞質ゾルでの活性を確認するものである。

#### 【0040】

別の実施形態において、BoNTの本来の標的に作用するC2II-C1融合タンパク質の送達利用に、改変したC2Itに基づく代替ペイロードを使用してもよい(図1b)。天然のC2IIトランスロケーションドメインとの補完的な活性のためには、C2I成分の中のアミノ酸残基1~87の最少領域が必要である。最近行われた炭疽致死因子を使ったペイロード開発作業と同じように、非正準(non-canonical)ポリペプチドのトランスロケーションは改変したC2Iを用いても可能であると考えられる。本開示は、さらなる出願のために、他の結合特異性およびペイロードドメイン探索の基礎を提供するものである。

#### 【0041】

以下の実施例は本開示を例示するために提供するが、限定することを意図してはいない。化学物質および物理的パラメータは典型的な試薬またはパラメータとして提示しており、当業者は本発明の原理と精神から逸脱することなく、本開示に照らして様々な置換または改変を行ってもよい。

#### 【実施例1】

#### 【0042】

キメラ構築物、C2II-C1、C1<sub>HCC</sub>、C2<sub>D4</sub>、C2ItおよびC2Iの構築および発現。

プラスミドpUC57-C2II-C1<sub>HCC</sub>は、コドン最適化遺伝子合成品として購入した。これは、BoNT<sub>C1</sub>のアミノ酸Y1094~E1291に相当するC1<sub>HCC</sub>配列の上流にある、C末端の7個のアミノ酸をトランケートしたC2II遺伝子からなる。プライマーC2II<sub>D4F</sub>およびC2II<sub>D4-GS</sub>(EP)<sub>R</sub>でC2IIのアミノ酸M1~T592に相当する遺伝子を増幅し、C1<sub>HCC</sub>ドメインとのオーバーラッピングPCRに使用する5' BamHI突出部および3' グリシン-セリン(EP)連結領域を加えた。BoNT<sub>C1</sub><sub>HCC</sub>遺伝子は、3' EcoRI制限部位を含む

10

20

30

40

50

ようにプライマー (EP) GS - C1 H<sub>c</sub>c F および C1 H<sub>c</sub>c R を使用して PCR で増幅した。二巡目の PCR は、GS (EP)<sub>10</sub> GS F および C1 H<sub>c</sub>c R を用いて行い、C2 I I D4 - GS (EP) 配列の 3' を相補するように、C1 H<sub>c</sub>c の 5' 増幅産物を伸長させた。得られた 2 つの断片をオーバーラッピング PCR により融合し、C2 I I D4 - GS (EP)<sub>10</sub> GS - C1 H<sub>c</sub>c (C2 I I - C1) を得た。C1 H<sub>c</sub>c の生成には、プライマー C1 H<sub>c</sub>c F および C1 H<sub>c</sub>c R を使用して pUC 57 - C2 I I - C1 H<sub>c</sub>c テンプレート上で PCR 増幅を行った。C2 I I D4 の生成には、プライマー C2 D4 F および C2 D4 R を使用して、ドメイン 4 をもたない C2 I I 遺伝子を増幅した。プラスミド pUC 57 - C2 I t は、コドン最適化遺伝子合成品として購入した。C2 I t (C2 I アミノ酸 1 ~ 226 に相当、PDB 2J3V) は、BamHI および EcoRI 制限部位を用いて pGex - 2T で直接サブクローニングした。全長の C2 I (C2 I アミノ酸 1 ~ 431 に相当) は、隣接プライマーとして C2 I F と C2 I R、オーバーラッピングプライマーとして C2 I O F と C2 I O R とを用いて、C2 I t を合成 DNA から増幅した DNA へ融合するオーバーラッピング PCR により生成した。最終的な PCR 産物はすべて、BamHI と EcoRI で消化して pGex - 2T にライゲートした。DH5 を電気穿孔法により形質転換して、N 末端 GST 融合体として C2 I I - C1、C1 H<sub>c</sub>c、C2 I I D4、C2 I t および C2 I を増産した。DNA 構築物の同一性は配列決定して確認した。プライマー配列を表 1 に列記する。

10

【0043】

20

【表 1】

表 1 プライマー配列

|                          |   |
|--------------------------|---|
| C2II Δ D4F               | CGCGGATCCATGCTGGTCTCC (配列番号 7)  |
| C2II Δ D4-GS(EP)R        | CCGGCTCTGGTTCCGGTTCAGAACCGGTGATCACTTTGACC<br>A GAATATTCATG (配列番号 8)       |
| (EP)GS C1 HccF           | CCAGAACCAGAGCCAGAACCAGGTTCTACCAACGTTGTCA<br>AA GACT ATTGGGG (配列番号 9)      |
| C1 HccR                  | CGGGAATTCTTATTCTGAAACCGGGAC (配列番号 10)                                     |
| GS(EP) <sub>10</sub> GSF | AACCGGAACCAGAGCCGGAACCGGAACCGGAACCGGAGC<br>CA GAACCAGAGCCAGAACC (配列番号 11) |
| C1 HccF                  | CGCGGATCCATGGGCACCAACGTTGTCAAAGACTATTGG<br>(配列番号 12)                      |
| C2II Δ D4R               | CGGGAATTCTTA GGTGATCACTTTGACCAG (配列番号 13)                                 |
| C2IF                     | CGCGGATCCATGCCGATTATTAAGAACCGATTGACTTCAT<br>C AACAAACCGG (配列番号 14)        |
| C2IR                     | CCGGAATTCTTAGATTTCTTTGTTTGGATACCTTCAGCATC<br>A AT (配列番号 15)               |
| C2IOF                    | GCAAGAACTGGACTTTTACAACAAAGGCTCGGAAGCCTGG<br>GG TCGGAAAACCTATG (配列番号 16)   |
| C2IOR                    | CATAGTTTCCGCACCCAGGCTTCCGAGCCTTTGTTGTAA<br>AA GTCCAGTTCTTGC (配列番号 17)     |

10

20

30

## 【 0 0 4 4 】

融合タンパク質を大腸菌 ( E . c o l i ) B L 2 1 ( D E 3 ) 内で過剰生産した。細胞株はすべて、400 mL の 100 μ g / m L アンピシリン添加 LB で 37 °C で増殖させ、OD<sub>600</sub> が約 0.5 になった時点で 0.5 mM の IPTG を加えて 25 °C で 16 時間、誘導した。細胞を 100 mL ずつ分取して回収し、ペレットを -20 °C で保存した。細胞を 1% Triton、pH 7.4 の PBS に再懸濁し、分取した細胞をフレンチプレスを使用して 10,000 psi で 3 回通して溶解した。4 °C で、80,000 × g で 20 分間の超遠心分離により細胞破片を除去した。バッチ内の GST 融合タンパク質上清のアフィニティ精製には、グルタチオン固定化アガロース ( G e n s c r i p t ) を用い、培養物上清 15 mL 当たり洗浄済み樹脂 150 μ L を使用して、4 °C で 1 時間、インキュベートした。樹脂を pH 7.4 の PBS で洗浄して、結合していないタンパク質を除去した。製造業者の推奨に従い、ウシトロピンを使用してタンパク質を GST タグから切り離し、ガラスウールを入れたシリンジでろ過を行って精製樹脂から分離した。さらに、記載の通りに、酵素：基質比が 1：5 で、C2II - C1 をトリプシンと 30 分間インキュベートし、最後にトリプシン阻害剤でトリプシンを失活させる処理を行って、組換え C2II を活性化した。

40

## 【 0 0 4 5 】

50

C2II-C1、C2IID4、C1H<sub>cc</sub>、C2IおよびC2Itを、10%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEまたは4~12%勾配Bis-Trisゲルで分離した。C2II-C1を、抗BoNT C1ポリクローナル抗体(MetabioLogics Inc.、Madison、WI)を用いて同定し、陽性対照として精製C1H<sub>cc</sub>を、また陰性対照としてC2IID4を用いた。タンパク質をSDS-PAGEで分離し、Towbin緩衝液中でニトロセルロース膜に転写し、5%粉乳PBS-tween緩衝液中でブロッキングし、その後、1μg/ulの抗BoNT C1抗体を0.5%粉乳PBS-tweenで1:5,000に希釈してプローブした。0.5%粉乳PBS-tweenで希釈した抗ウサギHRP二次抗体(1:5,000)をECLプロットング基質と共に使用してシグナル検出した。

10

## 【0046】

Neuro-2a細胞(N2A)(ATCC、CCL-131)は、10%(v/v)ウシ胎仔血清(FBS)およびペニシリン-ストレプトマイシンを補充したイーグル最少必須培地(EMEM)で培養した。A172細胞は、10%(v/v)FBSおよびペニシリン-ストレプトマイシン(100U/mL~100μg/mL)を補充したDMEMで増殖させた。HeLa細胞(ATCC、CCL-2)は、10%FBSおよびペニシリン-ストレプトマイシンを補充したEMEMで培養した。HeLa細胞は、ガングリオシド富化に先立ち、解除にデオキシチジンを用いるダブルチミジンブロック法により同調させた。ガングリオシド富化細胞は、50μg/mL GT1b(Enzo Life Sciences、Farmingdale、NY)を低血清(0.5%FBS)培養培地で、室温で20分間、超音波処理することにより調製した。引き続き、細胞はGT1bと共に4時間培養した。組換えタンパク質を加える前に、細胞をPBSで3回洗浄して培養培地から遊離ガングリオシドを除去した。488nmレーザー光と586/42バンドパスフィルターを搭載したBD FACS Cantor IIを使用したフローサイトメトリーにて、ヨウ化プロピジウムでDNA染色してHeLaの同調を確認した。10,000細胞/イベントをカウントし、スチューデントのt検定(n=3)で細胞当たりの蛍光の平均の統計的有意性を測定した。

20

## 【0047】

アミン反応性のAlexa Fluor色素は、無水DMSO(10mg/mL)に溶解して分取物として-20℃で保存した。精製タンパク質を5mg/mLを超えるまで濃縮し、1M重炭酸ナトリウムを加えてpH8.5~9.0に調整した。タンパク質溶液にAlexa Fluor無水DMSO溶液を加えて、室温で1時間、連続的攪拌した。過剰なAlexa FluorおよびDMSOはゲルろ過(G-25樹脂)で除去した。標識されたタンパク質を80,000×gで超遠心分離し、続いて、超遠心分離法の前後の分光光度測定を行い、標識強度を評価した。タンパク質の分子当たり蛍光分子1個を超えた標識強度を評価基準(quality control)のカットオフ値として設定し、超遠心分離後では、可視沈殿物または明らかな分光光度的性質上の変化は認められなかった。

30

## 【0048】

N2A細胞を24穴培養プレートで約80%コンフルエントになるまで増殖させた。細胞は図3cに示したようにGT1b富化した。作業容量(working volume)を0.5mLとして活性化C2II-C1を4μg/mL、またC2It-488を2μg/mLで加えて、細胞と共に2時間、インキュベートした。細胞をPBSで2回洗浄した後、トリプシン処理を行い、回収した。細胞を遠心分離し、プロナーゼ(1μg/mL)を添加したPBSに再懸濁し、氷上で5分間、インキュベートした。次に、プロテアーゼ阻害剤反応混液を加え、細胞を遠心分離し、阻害剤反応混液を添加したPBSに再懸濁した。次に、488nmレーザー光および530/30発光バンドパスフィルターを用いたBD FACS Cantor IIフローサイトメーターで10,000イベント/細胞をカウントした。(吸光閾値10<sup>3</sup>吸光度単位を超えた)C2It-488陽性細胞をカウントし、総細胞に対する百分率として評価した。実験を繰り返してスチューデントのt検

40

50

定 (  $n=3$  ) により評価した。

【 0 0 4 9 】

24穴培養プレートにコラーゲンコート12mm厚no.1カバースリップを敷き、N2A細胞を播種した。N2A細胞を約80%コンフルエントになるまで増殖させた。初期エンドソームマーカーと区別できるように、精製C2Itは、Alexa Fluor 488と代えてAlexa Fluor 568スクシンイミジルエステル(C2It-568)で標識した。GT1b富化の約24時間前、バキュロウイルス形質導入システムであるBacMam2.0Cell Lights Rab5a-GFP初期エンドソームのマーカー(Life Technologies)を加えた。次に、本発明者らの方法に記載のように、細胞をGT1b富化した。細胞を洗浄して遊離ガングリオシドを除去した後、組換えタンパク質を加えた。作業容量を0.5mLとして活性化C2II-C1を4 $\mu$ g/mLで加え、C2It-568を2 $\mu$ g/mLで加えて細胞と共に2時間、インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、DAPIで染色した。加工後、オリンパスIX-81倒立顕微鏡と、レーザー光405nm(青)、488nm(緑)および543nm(赤)の連続モードにしたオリンパスFV500共焦点レーザー走査顕微鏡を使用して蛍光画像を取得した。使用した対応発光遮断域(emission barriers)は、それぞれ430~460nm、505~550nmおよび560~610nmとした。細胞形態については透過光を使用し、画像はすべて60倍油浸レンズと2倍光学ズームレンズを使用して取得した。画像のコントラストはすべて20%強めた。ヒト神経膠芽細胞種A172細胞(ATCC、CRL-1620)は24穴培養プレートで、高いコンフルエントでみられる細胞円形化を抑えるために約60%コンフルエントまで増殖させた。上記の項に記載のようにHeLa細胞を同調させた。両細胞株とも、本発明者らの方法に記載のように、50 $\mu$ g/mLのGT1b富化した。作業容量を0.5mLとしてC2II-C1を40 $\mu$ g/mLで加え、C2Iを20 $\mu$ g/mLで加え、細胞と共に7時間、インキュベートした。細胞の写真は、Amscope MTv3.0.0.5ソフトウェアを使ったAmscopeIN300TC倒立実体顕微鏡で40倍で撮影した。円形化細胞をカウントし、フレーム内の総細胞に対する百分率として測定した。この実験を3回繰り返して、学生t検定( $n=3$ )で統計的有意性を評価した。C2IをC2II-C1を組み合わせると毒性をもつことが想定されたため、バイオセーフティレベル2実験室におけるC2Iを使った実験の実施に先立ち、機関内のバイオセーフティ委員会の承認を得た。

10

20

30

【 実施例 2 】

【 0 0 5 0 】

ボツリヌス菌C2毒素のニューロンの細胞質ゾルへの再標的化

BoNT血清亜型C1神経毒およびADPリボシル化を行うC2毒素ベースの多重組換えタンパク質構築物を、大腸菌を使用して発現させ、精製した。天然のBoNT C1を図2aに示し、天然のC2II結合/トランスロケーションドメインを図2bに示す。対照として使用するために、C末端のドメイン4を欠失するC2毒素(C2IID4)、およびC1神経毒結合ドメインC1H<sub>CC</sub>を生産した。C2IID4とBoNT C1のC1H<sub>CC</sub>(1094~1291)をグルタメート-プロリン10回反復ペプチドリンカー、(EP)<sub>10</sub>で連結させてC2II-C1を生成した(図2c)。これに加え、活性酵素部位を除いた非有毒性C2It(1~226)を含むペイロード、全長のC2I(1~431)を含むペイロードの2つのC2Iベースペイロードを構築した(図2d)。

40

【 0 0 5 1 】

グルタチオンアフィニティタグ(GST)の切断、およびトリプシンによるC2II-C1のオリゴマーへの活性化を確認した。大腸菌BL21(DE3)細胞を溶解し、超遠心分離して不溶性タンパク質を除去し、上清をアフィニティ樹脂に通した。次に、樹脂を大規模に洗浄し、タンパク質結合樹脂をロードし、全長の樹脂結合タンパク質の質量およびトロンピン切断の程度を調べた。次に、樹脂をトロンピンで処理してGSTタグを切り

50

離した。次に、樹脂からタンパク質を溶離してトリプシンで処理した。電気泳動の移動度で観察された質量が約90 kDaからより大きな250 kDa超へシフトしたことから示されるように、トリプシン活性化C2II-C1モノマーはオリゴマーを形成した。活性化C2II-D4も同じ方法で生産し、活性化C2II-C1と比較した。C2II-C1の七量体型の予想分子量は約497 kDaであり、七量体C2-D4は予想分子量としては約350 kDaであった。予想通り、C2II-C1オリゴマーの質量はC2IID4オリゴマーの質量より大きかった。C2II-C1およびC2-D4のオリゴマー型は、電気泳動中のSDSでは安定性を維持し、加熱すると部分的に解離した。抗BoNT C1抗原性による精製の間さらなるバンドが同定された。しかし、C2II-C1オリゴマーを徹底して加熱した後は、解離した組成物の大部分は全長のC2II-C1モノマーであることがわかった。

10

#### 【0052】

オリゴマー形成したC2II-C1およびC2IID4のウエスタンブロッティングを行った。次に、タンパク質を抗BoNT C1抗体でプローブした。陽性対照としてBoNT C1 HCC (MW約23 kDa)を使用した。C2II-C1オリゴマーは抗BoNT C1抗体と交差反応したが、オリゴマー形成したC2IID4は交差反応しなかった。これにより、BoNT C1 HCCが、オリゴマーの状態で(EP)<sub>10</sub>反復リンカーを介在してC2IID4とうまく融合できていたことが確認された。

#### 【0053】

C2II-C1による蛍光標識C2Itペイロードの神経への標的化。C2II-C1結合/トランスロケーション成分が媒介する結合およびペイロードの内在化を、蛍光標識したC2Iベースペイロード、C2It (図2d) GをGT1bガングリオシド受容体を有するまたは有しない細胞の集団に対して用いて調べた。マウス神経芽細胞腫Neuro-2A (N2A)細胞は、本来、GT1bを細胞表面に提示しないが、人為的に富化することができる。ペイロードC2Itを精製した後(図3a)、タンパク質にAlexa Fluor 488スクシンイミジルエステル標識をコンジュゲートした(C2It-488)。異なる程度にGT1b富化したN2A細胞と共に、C2Itおよび活性化C2II-C1を異なる程度にインキュベートした。細胞外タンパク質を酵素消化により除去した後、フローサイトメトリーを使用して内在化C2It-488を定量した。蛍光上昇を伴う細胞数が最も高かったのは、GT1b富化およびC2II-C1の添加と対応していた(図3bパネル2)。GT1bの存在下および非存在下において、C2II-C1の非存在下でのC2Itのバックグラウンドの取込みは僅かであった。GT1b富化のみでは、バックグラウンドの蛍光の有意な増加はみられなかった(図3bパネル1、4)。C2It-488ペイロードのみでの取込みも僅かであった(図3bパネル3、6)。標的化によらない取込みが最も高かったのは(約2%)、C2II-C1およびC2Itを加えた、GT1bを有さない集団であった(図3bパネル5)。C2It-488の取込みのC2II-C1およびGT1bへの依存度は、スチューデントのt検定により実験間p値<0.05となり、有意性があることがわかった。全体として、細胞内C2It-488送達効率は、GT1bおよびC2II-C1の存在下において約18% (細胞集団の百分率)まで得ることができた(図3c)。

20

30

40

#### 【0054】

フローサイトメトリーによる結合および内在化の定量化を行った後、共焦点蛍光顕微鏡を用いて、活性化C2II-C1により標的細胞へ送達されたC2Itを可視化して細胞内の局在化を特定した。C2ItをAlexa Fluor 568蛍光色素にコンジュゲートした(C2It-568)。チャンネルを分けて、C2It-568(赤)、Rab5a-GFP初期エンドソームのマーカー(緑)およびDAPI核(青)の画像化を行った。細胞をGT1b富化した場合、細胞内で初期エンドソームと共局在した、C2II-C1で送達されたC2It-568は低レベルであったことが観察された(図4(a))。この結果は、活性のあるトランスロケーションドメインによりC2Itがエンドソームを脱出することと一致した。GT1bがない場合、C2It-568シグナルは概ね細胞

50

の外側に限定され、初期エンドソームに会合したレポーターのシグナルは低レベルであった(図4(b))。これらの知見は、結合/内在化に関するフローサイトメトリーのデータと一致する(図3b、c)。C2II-C1、GT1bまたはC2It-568を欠くさらなる対照並べ替え(control permutation)では、初期エンドソームの解離を伴うC2Itレポーターの細胞内送達は達成できなかった。

#### 【0055】

C2II-C1による天然C2I酵素の再標的化。天然のC2Iペイロードにより引き起こされる細胞円形化により、異なる程度にGT1b富化したヒト神経膠芽細胞種A172および同調HeLa細胞株の両細胞株における活性酵素の細胞質ゾルへの送達を測定した。全長C2Iを精製し(図5a)、活性化C2II-C1と組み合わせた後、細胞株培養物に加えて7時間置いた。細胞円形化は、GT1b富化していないA172細胞集団より2.8倍高いことが明らかとなった(図5b)。Barth et al., Infect. Immun. 67, 5083-5090 (1999)で既報のGT1b富化していない野生型C2IIの過去のデータと比較するため、GT1b富化した非神経細胞株として、同調HeLa細胞の送達依存性の細胞円形化を調べた。フローサイトメトリー法により、初期S期のHeLa細胞の同調をDNA定量により確認した(図5c)。同調HeLa細胞では、円形化はGT1b富化していない集団を2.1倍上回っていた(図5d)。スチューデントのt検定を用いて、実験間の実験的有意性を評価した。対照集団をGT1b富化集団と比較して、p値<0.05が得られた。

10

20

#### 【0056】

配列番号1~6の配列のリスト:

配列番号1 -

NNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQLNP|FPDFDKLGGSSGEDRGKV|VTQEN|VYNSMYESFS|SFWIR|NKWVSNLPGYT|IDSVKNNSGWS|IG|ISNLFVFTLKQNEDESEQS|NFSYD|SNNAPGYNKWFFVTVTNMMGMNK|Y|IN|GKL|DT|IKV|KELTG|INFSKT|TFE|INK|PDTGL|ITSDSDN|NMW|RDFY|FAKELDGKD|IN|LFNSLQYTNVVKDYWGND|LRYNKEYY|MVN|DYLNRYMYANSRQ|VFNTRRRNNDNFNEGYK|I|KR|RGNTNDTRVRGGD|LYFDMT|NNKAYNLFMKN|ETMYADNHSTED|YA|GLREQTKD|INDN|IFQ|QPMNNTYYYASQ|FKSNFNGEN|SG|CS|GTYRFRLLGGDWYRHNYLV|PTVKQGNYSALLESTSTHWGFVPVSE

配列番号2 -

MLVSKFENS|VKNSNKNYFT|INGLMGYFFENDFFNLN|ISPTLDGNLTFSKED|INS|LGNK|IKSARW|GL|KPS|ITGEY|LSTNSPNCRVELNGE|FNLSLNTSNTVNL|QGNVYD|IR|EQLMSENQLLKNYEG|KLYWETSD|IKE|IPSEVLLKPNYS|NTNEKSKF|PNNTLFSNAK|KANANRDTDRDG|PDEWE|NGYTVMNQKAVAWDDKFAANGYK|KYSNPFPKCTANDPYTD|FEK|VSGQ|DPSVSMVARDPM|SAYP|VGVMERLVVSKSET|TGDSTKSMKSTSHSSTN|INTVGAEVSGSLQLAGG|FPVFSMSASANYSH|TQNTSTVDDTTGESFSQGLS|INTAESAY|NPN|RYNTGTAPVY|NVTP|TTTT|V|DKQSVAT|KQGES|L|GDYLNPGGTYP|IGEPPMALNTMDQFSSRL|IP|INYQLKS|DNGGTVM|LSTSQFTGNFAKYN|SNGNLVTDGNNWGPYL|GT|KSTTASL|TSLPDQTTQVAVVAPNFSDPEDKTPRL|TLEQALVKA|FRLEKKN|GK|FYFHGME|SANQK|QVFLDRNTNV|DFENQLKNTANKD|MNC|IKRNMN|LVKV|ITFKEN|SS|INI|INDTNFGVESMTGLSKR|KGNDG|YRASTKSF|SFKSKE|KYPEGFYRMR|FV|QSYEPFTCNFKLFNNL|YSNSFD|GYDEFFFYFCNGSKSFFD|SCD|INS|NRLSGVFL|I

30

配列番号3 -

MPI|IKEP|IDF|INKPESEAKEW|GKEEERWFTKLN|NLEEVAVNQLKNKEYKTK|DNFSTD|LFSSLT|A|E|MKEDENQNL|FDVER|REALLKNTLDRDA|GYVNF|TPKELG|INFS|RDVELDRD|SDETL|DKVRQQ|INQEYTKFSF|SLGLNDNS|NESV|PV|VKTRVPTTFDYGLNDKETV|SLLLLNQGFS|IPESA|IT|TKGKDY|L|EGSLSQELDFY|NKGSEAWGAENYGDY|SKLSHEQLGALE|GYLHSDYKA|NSYLRN|RVPNDELNKK|EL|SSALS|VKP|PQTL|AYRRVDG|PFDLP|SDFSF|DKKENG|E|IADKQK|LNEF|DKWTGKE|ENLSFS|STSLKSTPSSFSKSRF|FRLRLSEGA|GAF|YGFSGFQDEQE|LLNKNSTFK|FR|ITP|ITS|INRVTKMTQVV|DAEG|QNKE|I

40

配列番号4 -

MLVSKFENS|VKNSNKNYFT|INGLMGYFFENDFFNLN|ISPTLDGNLTFSKED|INS|LGNK|IKSARW|GL|KPS|ITGEY|LSTNSPNCRVELNGE|FNLSLNTSNTVNL|QGNVYD|IR|EQLMSENQLLKNYEG|KLYWETSD|IKE|IPSEVLLKPNYS|NTNEKSKF|PNNTLFSNAK|KANANRDTDRDG|PDEWE|NGYTVMNQKAVAWDDKFAANGYK|KYSNPFPKCTANDPYTD|FEK|VSGQ|DPSVSMVARDPM|SAYP|VGVMERLVVSKSET|TGDSTKSMKSTSHSSTN|INTVGAEVSGSLQLAGG|FP

50



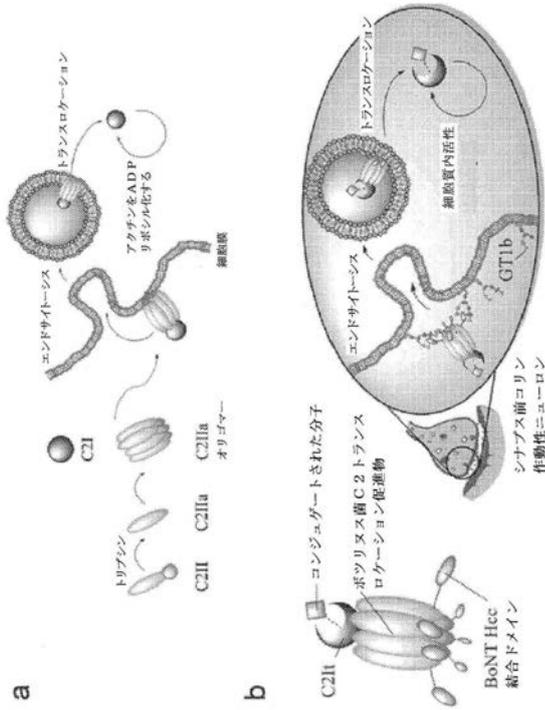
- elivery system promotes the uptake of biotinylated molecules in macrophages and T-leukemia cells. *Biol. Chem.* 391, 1315-1325 (2010).
10. Fahrner, J. et al. Genetically engineered clostridial C2 toxin as a novel delivery system for living mammalian cells. *Bioconjug. Chem.* 21, 130-139 (2010).
  11. Schleberger, C., Hochmann, H., Barth, H., Aktories, K. & Schulz, G. E. Structure and action of the binary C2 toxin from *Clostridium botulinum*. *J. Mol. Biol.* 364, 705-715 (2006).
  12. Aktories, K. et al. Botulinum-C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature* 322, 390-392 (1986).
  13. Simpson, L. L. Molecular basis for the pharmacological actions of *Clostridium botulinum* type C2 toxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230, 665-669 (1984). 10
  14. Ohishi, I., Iwasaki, M. & Sakaguchi, G. Purification and characterization of 2 components of botulinum C2 toxin. *Infect. Immun.* 30, 668-673 (1980).
  15. Iwasaki, M., Ohishi, I. & Sakaguchi, G. Evidence that botulinum C2-toxin has 2 dissimilar components. *Infect. Immun.* 29, 390-394 (1980).
  16. Ohishi, I. Activation of botulinum C2 toxin by trypsin. *Infect. Immun.* 55, 1461-1465 (1987).
  17. Nagahama, M. et al. Binding and Internalization of *Clostridium botulinum* C2 Toxin. *Infect. Immun.* 77, 5139-5148 (2009).
  18. Fritz, G., Schroeder, P. & Aktories, K. Isolation and characterization of a *Clostridium botulinum* C2 toxin-resistant cell line: evidence for possible involvement of the cellular C2II receptor in growth-regulation. *Infect. Immun.* 63, 2334-2340 (1995). 20
  19. Pust, S., Barth, H. & Sandvig, K. *Clostridium botulinum* C2 toxin is internalized by clathrin- and Rho-dependent mechanisms. *Cell Microbiol.* 12, 1809-1820 (2010).
  20. Kaiser, E., Haug, G., Hliscs, M., Aktories, K. & Barth, H. Formation of a biologically active toxin complex of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin without cell membrane interaction. *Biochemistry* 45, 13361-13368 (2006).
  21. Barth, H. et al. Cellular uptake of *Clostridium botulinum* C2 toxin requires oligomerization and acidification. *J. Biol. Chem.* 275, 18704-18711 (2000). 30
  22. Haug, G. et al. Cellular uptake of *Clostridium botulinum* C2 toxin: Membrane translocation of a fusion toxin requires unfolding of its dihydrofolate reductase domain. *Biochemistry* 42, 15284-15291 (2003).
  23. Chaddock, J. A. et al. Inhibition of vesicular secretion in both neuronal and nonneuronal cells by a retargeted endopeptidase derivative of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Infect. Immun.* 68, 2587-2593 (2000).
  24. Blocker, D. et al. The C terminus of component C2II of *Clostridium botulinum* C2 toxin is essential for receptor binding. *Infect. Immun.* 68, 4566-4573 (2000). 40
  25. Gill, D. M. Bacterial toxins-a table of lethal amounts. *Microbiol. Rev.* 46, 86-94 (1982).
  26. Montecucco, C. & Schiavo, G. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.* 13, 1-8 (1994).
  27. Strotmeier, J. et al. The biological activity of botulinum neurotoxin type C is dependent upon novel types of ganglioside binding sites. *Mol. Microbiol.* 81, 143-156 (2011).
  28. Simpson, L. L. The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. *Pharmacol. Rev.* 33, 155-188 (1981).
  29. Yowler, B. C. & Schengrund, C. L. Glycosphingolipids-Sweets for botulinum n 50

eurotoxin. *Glycoconj. J.* 21, 287-293 (2004).

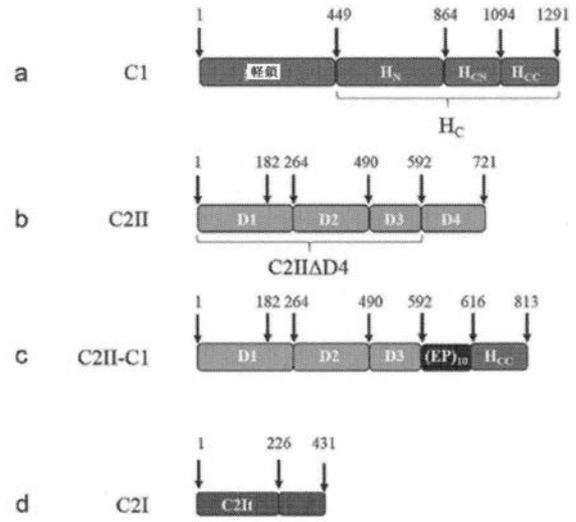
30. Karalewitz, A. P. A., Fu, Z. J., Baldwin, M. R., Kim, J. J. P. & Barbieri, J. T. Botulinum neurotoxin serotype C associates with dual ganglioside receptors to facilitate cell entry. *J. Biol. Chem.* 287, 40806-40816 (2012).
31. Barth, H., Klingler, M., Aktories, K. & Kinzel, V. Clostridium botulinum C2 toxin delays entry into mitosis and activation of p34(cdc2) kinase and cdc25-C phosphatase in HeLa cells. *Infect. Immun.* 67, 5083-5090 (1999).
32. Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G. & Haisma, H. J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Control. Release* 151, 220-228 (2011).
33. Sandvig, K. & van Deurs, B. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther.* 12, 865-872 (2005). 10
34. Verdurmen, W. P., Luginbuhl, M., Honegger, A. & Pluckthun, A. Efficient cell-specific uptake of binding proteins into the cytoplasm through engineered modular transport systems. *J. Control. Release* 200, 13-22 (2015).
35. Eckhardt, M., Barth, H., Blocker, D. & Aktories, K. Binding of Clostridium botulinum C2 toxin to asparagine-linked complex and hybrid carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 275, 2328-2334 (2000).
36. Andreu, A., Fairweather, N. & Miller, A. D. Clostridium neurotoxin fragments as potential targeting moieties for liposomal gene delivery to the CNS. *ChemBioChem* 9, 219-231 (2008). 20
37. Edupuganti, O. P. et al. Targeted delivery into motor nerve terminals of inhibitors for SNARE-cleaving proteases via liposomes coupled to an atoxic botulinum neurotoxin. *FEBS J.* 279, 2555-2567 (2012).
38. Tsukamoto, K. et al. Binding of Clostridium botulinum type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid—Novel insights into the receptor for clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 280, 35164-35171 (2005).
39. Rummel, A. et al. Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J. Neurochem.* 110, 1942-1954 (2009). 30
40. Muraro, L., Tosatto, S., Motterlini, L., Rossetto, O. & Montecucco, C. The N-terminal half of the receptor domain of botulinum neurotoxin A binds to microdomains of the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 76-80 (2009).
41. Harper, C. B. et al. Dynamin inhibition blocks botulinum neurotoxin type A endocytosis in neurons and delays botulism. *J. Biol. Chem.* 286, 35966-35976 (2011).
42. Couesnon, A., Pereira, Y. & Popoff, M. R. Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. *Cell Microbiol.* 10, 375-387 (2008).
43. Simpson, L. L. Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 167-193 (2004). 40
44. Zhao, H. L. et al. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-alpha 2b fusion protein by linker engineering. *Protein Expr. Purif.* 61, 73-77 (2008).
45. Bhandari, D. G., Levine, B. A., Trayer, I. P. & Yeadon, M. E. H-1-NMR study of mobility and conformational constraints within the proline-rich N-terminal of the LC1 alkali light chain of skeletal myosin. Correlation with similar segments in other protein systems. *Eur. J. Biochem.* 160, 349-356 (1986).
46. Evans, J. S., Levine, B. A., Trayer, I. P., Dorman, C. J. & Higgins, C. F. Sequenced-imposed structural constraints in the tonB protein of Escherichia coli 50

- . FEBS Lett. 208, 211-216 (1986).
47. Roditi, I. et al. Expression of *Trypanosoma brucei* procyclin as a fusion protein in *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 35-43 (1989).
48. Kroken, A. R. et al. Unique Ganglioside Binding by Botulinum Neurotoxins C and D-SA. *FEBS J.* 278, 4486-4496 (2011).
49. Heine, K., Pust, S., Enzenmuller, S. & Barth, H. ADP-Ribosylation of Actin by the *Clostridium botulinum* C2 Toxin in Mammalian Cells Results in Delayed Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death. *Infect. Immun.* 76, 4600-4608 (2008).
50. Barth, H., Roebeling, R., Fritz, M. & Aktories, M. The binary *Clostridium botulinum* C2 toxin as a protein delivery system- Identification of the minimal protein region necessary for interaction of toxin components. *J. Biol. Chem.* 277, 5074-5081 (2002). 10
51. Rabideau, A. E., Liao, X., Akcay, G. & Pentelute, B. L. Translocation of Non-Canonical Polypeptides into Cells Using Protective Antigen. *Sci. Rep.* 5, 11944 (2015).
52. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
53. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* 76, 4350-4354 (1979). 20
54. Burnette, W. N. Western blotting-electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein-A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203 (1981).
55. Ma, H. T. & Poon, R. Y. Synchronization of HeLa cells. *Methods Mol. Biol.* 761, 151-161 (2011).
56. Barth, H., Preiss, J. C., Hofmann, F. & Aktories, K. Characterization of the catalytic site of the ADP-ribosyltransferase *Clostridium botulinum* C2 toxin by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 29506-29511 (1998).
57. US20090269361 A1. 30
58. WO2013126690 A1.

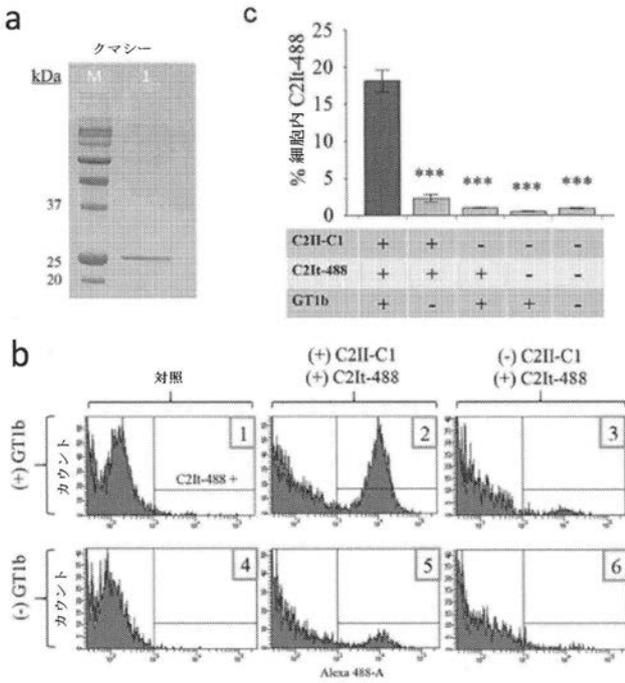
【 図 1 】



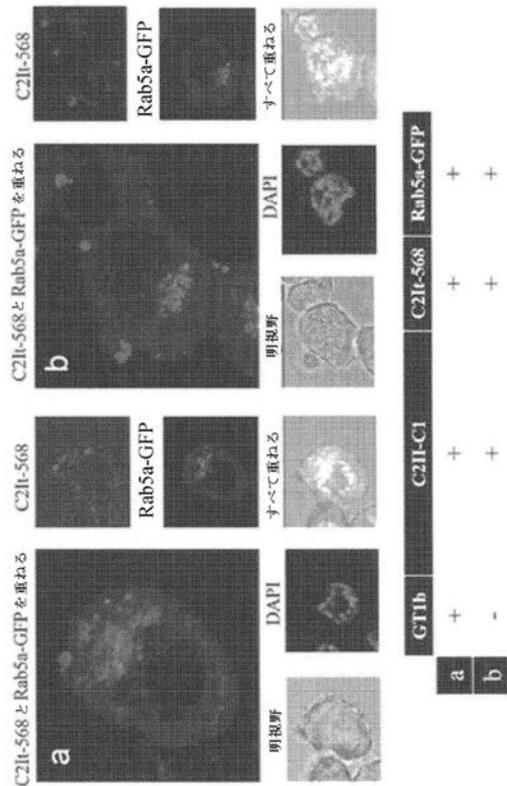
【 図 2 】



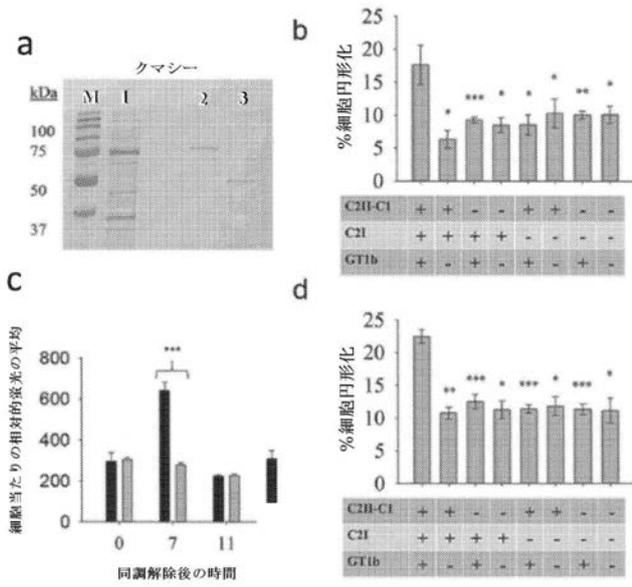
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配 列 表 】

[2018515542000001.app](#)

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 30 年 3 月 9 日 (2018.3.9)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 配 列 表

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 配 列 表 】

[2018515542000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |   | International application No.<br>PCT/US16/32573   |
|--|---|---|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - C07K 14/00, 14/33, 14/195 (2016.01)<br>CPC - C07K 14/00, 14/33, 14/195<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC(8) Classifications: C07K 14/00, 14/32, 14/33, 14/325, 14/195, 16/32 (2016.01)<br>CPC Classifications: C07K 14/00, 14/32, 14/33, 14/325, 14/195, 16/32<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); EBSCO Discovery; PubMed; Google; Google Scholar; Google Patents; KEYWORDS: agent, target, binding unit, pore forming unit, heavy chain, Clostridium botulinum toxin C2   |   |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |   |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.   |
| X  | US 2015/0044210 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) February 12, 2015; abstract; paragraphs [0007], [0008], [0012], [0034], [0039], [0041], [0069], [0070], [0085], [0100]; claim 1 | 1-4, 5/1-4  |
| X  | US 2006/0110409 A1 (SHONE, C et al.) January 09, 2003; paragraphs [0081], [0119]  | 23-24   |
| A  | US 2006/0153876 A1 (SANDERS, I) July 13, 2006; entire document  | 1-4, 5/1-4, 23-24   |
| A  | US 2011/0280908 A1 (LEPLA, S et al.) November 17, 2011; entire document   | 1-4, 5/1-4, 23-24   |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.  |   |   |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |   |   |
| Date of the actual completion of the international search<br>28 July 2016 (28.07.2016)   |   | Date of mailing of the international search report<br><div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">30 AUG 2016</div> |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300  |   | Authorized officer<br>Shane Thomas<br>PCT Helpdesk: 571-272-4900<br>PCT OSP: 571-272-7774   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/32573

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a.  forming part of the international application as filed:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
 on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).  
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/32573

|   |  |
|---|--|
| <b>Box No. II</b>   | <b>Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b> |
| <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:<br/>because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:<br/>because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 6-22<br/>because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>  |  |
| <b>Box No. III</b>  | <b>Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>          |
| <p>This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p> |  |

## 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 5/10 (2006.01)   | C 1 2 N 5/10   | 4 H 0 4 5  |
| A 6 1 K 9/08 (2006.01)   | A 6 1 K 9/08   |            |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01)  | A 6 1 K 45/00  |            |
| A 6 1 K 38/45 (2006.01)  | A 6 1 K 38/45  |            |
| A 6 1 K 38/04 (2006.01)  | A 6 1 K 38/04  |            |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | D          |
| A 6 1 K 35/742 (2015.01) | A 6 1 K 35/742 |            |
| A 6 1 P 25/00 (2006.01)  | A 6 1 P 25/00  |            |
| A 6 1 P 25/02 (2006.01)  | A 6 1 P 25/02  |            |
| 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 43/00 (2006.01)  | A 6 1 P 35/00  |            |
| C 0 7 K 14/33 (2006.01)  | A 6 1 P 43/00  | 1 1 1      |
|                          | C 0 7 K 14/33  |            |

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

(72) 発明者 ポール・ブルーム

アメリカ合衆国ネブラスカ州 6 8 5 0 6 . リンカーン . パン・ドン・ストリート 4 4 2 0

(72) 発明者 ケヴィン・ヴァン・コット

アメリカ合衆国ネブラスカ州 6 8 5 8 8 - 0 6 4 3 . リンカーン . ユニバーシティ・オブ・ネブラスカ - リンカーン . オスマー・ホール 2 0 7 エヌ

F ターム(参考) 4B065 AA23Y AA26X AB01 AC14 BA02 BB14 BB37 BC03 BD14 CA24

CA44

4C076 AA12 BB11 CC01 EE41 FF34 FF68

4C084 AA01 AA17 BA44 DA33 DC25 MA17 MA66 NA14 ZA011 ZA201

ZA211 ZA221 ZA331 ZB211 ZB261 ZC191 ZC411

4C085 AA13 EE01 GG01

4C087 AA01 AA02 BC68 CA16 MA17 MA66 NA14 ZA01 ZA20 ZA21

ZA22 ZA33 ZB21 ZB26 ZC19 ZC41

4H045 BA10 CA11 DA83 EA20 FA74 GA26