

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5994068号
(P5994068)

(45) 発行日 平成28年9月21日(2016.9.21)

(24) 登録日 平成28年9月2日(2016.9.2)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 17/00 (2006.01)	C O 7 K 17/00
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
C O 7 K 1/22 (2006.01)	C O 7 K 1/22

請求項の数 12 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-530055 (P2013-530055)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月23日 (2012.8.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/071303
 (87) 国際公開番号 W02013/027796
 (87) 国際公開日 平成25年2月28日 (2013.2.28)
 審査請求日 平成27年6月22日 (2015.6.22)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-182539 (P2011-182539)
 (32) 優先日 平成23年8月24日 (2011.8.24)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 504258527
 国立大学法人 鹿児島大学
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100144794
 弁理士 大木 信人
 (72) 発明者 伊東 祐二
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
 国立大学法人鹿児島大学内

審査官 西村 亜希子

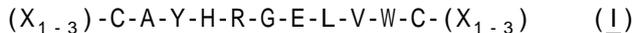
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IgG結合性ペプチド及びそれによるIgGの検出および精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の式I:



(式中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Aはアラニン残基であり、

Yはチロシン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Rはアルギニン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

Eはグルタミン酸残基であり、

Lはロイシン残基であり、

Vはバリン残基であり、かつ

Wはトリプトファン残基である。)

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とするペプチド。

【請求項2】

17アミノ酸残基とした場合の、N末端から1~3、15~17番目の各アミノ酸残基が、1番目のアミノ酸残基= S、G、F又は、なし

2番目のアミノ酸残基= D、G、A、S、P又は、なし

3番目のアミノ酸残基= S、D、T、N、E又はR、

15番目のアミノ酸残基= S、T又はD、

16番目のアミノ酸残基= H、G、Y、T、N、D、F又は、なし、

17番目のアミノ酸残基= Y、F、H、M又は、なし

である、請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】

以下の1)~12)のいずれかのアミノ酸配列からなる、請求項2に記載のペプチド。

1) DCAYHRGELVWCT (配列番号55)

2) GPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号56)

3) RCAYHRGELVWCS (配列番号57)

4) GPRCAYHRGELVWCSFH (配列番号58)

5) SPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号100)

6) GDDCAYHRGELVWCTFH (配列番号101)

7) GPSCAYHRGELVWCTFH (配列番号102)

8) GPDCAYHRGELVWCSFH (配列番号103)

9) GPDCAYHRGELVWCTHH (配列番号104)

10) GPDCAYHRGELVWCTFY (配列番号105)

11) SPDCAYHRGELVWCTFY (配列番号106)

12) SDDCAYHRGELVWCTFY (配列番号107)

10

20

【請求項4】

ペプチドが2つのシステイン(C)残基間でジスルフィド結合を形成している、請求項1~3のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項5】

標識が結合されている、請求項1~4のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項6】

請求項1~5のいずれか1項に記載のペプチドと連結されたタンパク質からなる融合タンパク質。

【請求項7】

請求項1~5のいずれか1項に記載のペプチドを固相に結合してなる固定化ペプチド。

30

【請求項8】

請求項1~5のいずれか1項に記載のペプチドをコードする核酸。

【請求項9】

請求項1~5のいずれか1項に記載のペプチド又は請求項7に記載の固定化ペプチドをIgGと結合させること、並びに、結合したIgGを遊離させてIgGを回収することを含む、IgGの精製方法。

【請求項10】

請求項1~5のいずれか1項に記載のペプチド又は請求項7に記載の固定化ペプチドにサンプル中のIgGを結合させ、結合したIgGを検出することを含む、IgGの検出方法。

【請求項11】

請求項1~5のいずれか1項に記載のペプチド又は請求項7に記載の固定化ペプチドの少なくとも1種を含む、ヒトIgGの分析又は精製のためのキット。

40

【請求項12】

請求項7に記載の固定化ペプチドを含有する、IgG分離用カラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ランダムペプチドライブラリから得られたヒトIgG結合性ペプチド及び該ペプチドによるIgGの検出および精製方法に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

現在、抗体医薬は、最も確実性の高い分子標的医薬として注目されており、新しい医薬品分野を急速に拡大している。現在開発中又は使用されている抗体医薬のほとんどは免疫グロブリンG（以下「IgG」と記載する）クラスに属する抗体を用いるものである。

【 0 0 0 3 】

従来的に、IgG抗体の精製には、Staphylococcus aureus由来のプロテインAまたはプロテインGタンパク質が用いられている（非特許文献1, 2）。これらのタンパク質は、マウス、ウサギのIgGにも結合するため、研究試薬のレベルでのIgG精製に多用されてきたが、近年ヒトIgG1を中心とした抗体医薬が、医薬分野に利用されるようになり、工業的、製薬的な利用における重要性がますます高まっている。特にプロテインAカラムは、抗体医薬の精製においても中心的な役割を果たしており、多くの抗体医薬の製造メーカーは、このカラムを中心とした精製システムを導入している。

【 0 0 0 4 】

しかしながら、このプロテインAカラムは、いくつかの問題点が指摘されている。1つには、精製抗体中へのプロテインAの混入の問題である。プロテインAはバクテリア由来のタンパク質であり、人体投与後の免疫原性が高く、またエンドトキシンの混入が危惧される。このような医薬品精製に用いるアフィニティリガンドとしては、不都合な物質の混入が起こらないよう、リガンドとしてのプロテインAには高い精製度が求められており、これが医薬品精製に利用するプロテインAカラムのコストを上げている要因になっている。

【 0 0 0 5 】

このような問題を解決すべく、新たなIgG抗体の精製システムの開発が行われている。例えば、プロテインAミメティックペプチド（非特許文献3, 4）や、プロテインAとIgG抗体のFcとのX線結晶構造を基に設計された、非ペプチド性のアフィニティリガンド（非特許文献5）が報告されているが、それらは結合能力や特異性における問題で利用には限界があった。

【 0 0 0 6 】

また、ファージライブラリや合成ペプチドライブラリなどを使って、新たなIgG結合性ペプチドを探索する研究が多くなされている（特許文献1-3）。

【 0 0 0 7 】

このように、新たなペプチド、低分子によるIgG抗体精製の研究は行われているものの、プロテインA、Gカラムに代わりうる、工業的なスケールで対応可能な新たな精製システムは存在せず、当該分野において依然として、IgG抗体を精製するための新たな手法が求められている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【特許文献1】WO 01/045746

【特許文献2】WO 02/086070

【特許文献3】WO 02/38592

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【非特許文献1】Ey, P. L., Prowse, S. J., and Jenkin, C. R. (1978) *Immunochemistry* 15(7), 429-436

【非特許文献2】Akerstrom, B., Brodin, T., Reis, K., and Bjorck, L. (1985) *J Immunol* 135(4), 2589-2592

【非特許文献3】Fassina, G., Verdoliva, A., Odierna, M. R., Ruvo, M., and Cassini, G. (1996) *J Mol Recognit* 9(5-6), 564-569

【非特許文献4】Fassina, G., Palombo, G., Verdoliva, A., and Ruvo, M. (2002) *Affinity Purification of Immunoglobulins Using Protein A Mimetic (PAM)* In: Walker, J. M. (ed). *The Protein Protocols Handbook, Second Edition*, Humana Press Inc., T

10

20

30

40

50

otowa, NJ

【非特許文献5】Li, R., Dowd, V., Stewart, D. J., Burton, S. J., and Lowe, C. R. (1998) Nature biotechnology 16(2), 190-195

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、ヒトIgGに特異的又は選択的に結合性を有するペプチドを提供することを目的とする。

【0011】

本発明はまた、該ペプチドを用いてヒトIgGを精製する又は分析（検出又は定量）する方法を提供することを別の目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0012】

ヒトIgGは、主に血液中に存在し、外来からの異物の排除や抗体依存性細胞障害活性を通じて、生体防御や恒常性の維持に重要な役割を果たしている。特に近年では、このような特性のために、IgGは抗体医薬として、ガンやリュウマチなどの自己免疫疾患を中心に、治療薬として使用されている。本発明は、このように医薬品として重要な地位を占めつつあるIgG抗体の状況を踏まえ、ヒトIgG（特にIgG1）に特異的又は選択的に結合可能なペプチドを提供することによって、背景技術に記載したような現方の弱点を解決した、医薬として使用可能なIgGの精製及び分析法の確立のために有用であると考えられる。

20

【0013】

本発明は、要約すると、以下の特徴を有する。

【0014】

[1] 下記の式I:

$$(X_{1-3})-C-(X_2)-H-R-G-(Xaa1)-L-V-W-C-(X_{1-3}) \quad (I)$$

(式中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Rはアルギニン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

30

Xaa1はグルタミン酸残基またはアスパラギン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

Vはバリン残基であり、かつ

Wはトリプトファン残基である。)

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とするペプチド。

【0015】

[2] 下記の式II:

$$(X_{1-3})-C-(Xaa2)-(Xaa3)-H-R-G-(Xaa1)-L-V-W-C-(X_{1-3}) \quad (II)$$

(式中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

40

Cはシステイン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Rはアルギニン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa1はグルタミン酸残基またはアスパラギン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

Vはバリン残基であり、

Wはトリプトファン残基であり、

Xaa2はアラニン残基、セリン残基またはトレオニン残基であり、かつ

Xaa3はチロシン残基またはトリプトファン残基である。)

50

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とする、[1]のペプチド。

【0016】

[3] 下記の式III:

$(X_{1-3})-C-A-Y-H-R-G-E-L-V-W-C-(X_{1-3})$ (III)

(式中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Aはアラニン残基であり、

Yはチロシン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Rはアルギニン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

Eはグルタミン酸残基であり、

Lはロイシン残基であり、

Vはバリン残基であり、かつ

Wはトリプトファン残基である。)

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とする、[1]または[2]のペプチド。

【0017】

[4] 17アミノ酸残基とした場合の、N末端から1~3、15~17番目の各アミノ酸残基が、

1番目のアミノ酸残基= S、G、F又は、なし

2番目のアミノ酸残基= D、G、A、S、P又は、なし

3番目のアミノ酸残基= S、D、T、N、E又はR、

15番目のアミノ酸残基= S、T又はD、

16番目のアミノ酸残基= H、G、Y、T、N、D、F又は、なし、

17番目のアミノ酸残基= Y、F、H、M又は、なし

である、[1]~[3]のいずれかのペプチド。

【0018】

[5] 以下の1)~12)のいずれかのアミノ酸配列からなる、[4]のペプチド。

【0019】

1) DCAYHRGELVWCT (配列番号55)

2) GPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号56)

3) RCAYHRGELVWCS (配列番号57)

4) GPRCAYHRGELVWCSFH (配列番号58)

5) SPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号100)

6) GDDCAYHRGELVWCTFH (配列番号101)

7) GPSCAYHRGELVWCTFH (配列番号102)

8) GPDCAYHRGELVWCSFH (配列番号103)

9) GPDCAYHRGELVWCTHH (配列番号104)

10) GPDCAYHRGELVWCTFY (配列番号105)

11) SPDCAYHRGELVWCTFY (配列番号106)

12) SDDCAYHRGELVWCTFY (配列番号107)

[6] 下記の式IV:

$D-C-(Xaa2)-(Xaa3)-H-R-G-(Xaa1)-L-V-W-C-T$ (IV)

(式中、

Dはアスパラギン酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Rはアルギニン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

10

20

30

40

50

Xaa1はグルタミン酸残基またはアスパラギン残基であり、
 Lはロイシン残基であり、
 Vはバリン残基であり、
 Wはトリプトファン残基であり、
 Tはトレオニン残基であり、
 Xaa2はアラニン残基、またはトレオニン残基であり、かつ
 Xaa3はチロシン残基またはトリプトファン残基である。)によって表される、13アミノ酸
 残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とする、[1
]または[2]のペプチド。

【 0 0 2 0 】

10

[7] 以下の1)~4)のいずれかのアミノ酸配列からなる、[6]のペプチド。

【 0 0 2 1 】

- 1) DCTYHRGNLVWCT (配列番号 4 7)
- 2) DCAYHRGNLVWCT (配列番号 4 8)
- 3) DCTYHRGELVWCT (配列番号 5 0)
- 4) DCAWHRGELVWCT (配列番号 5 3)

[8] 下記の式V :

D-C-(Xaa1)-(Xaa2)-(Xaa3)-(Xaa4)-G-(Xaa5)-L-(Xaa6)-W-C-T (V)

(式中、

Dはアスパラギン酸残基であり、

20

Cはシステイン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

Wはトリプトファン残基であり、

Tはトレオニン残基であり、

Xaa1はアラニン残基、セリン残基またはトレオニン残基であり、

Xaa2はトリプトファン残基またはチロシン残基であり、

Xaa3はヒスチジン残基、アルギニン残基、セリン残基またはトレオニン残基であり、

Xaa4はアスパラギン残基またはアルギニン残基であり、

Xaa5はグルタミン酸残基、アスパラギン残基、アルギニン残基、またはアスパラギン酸残
 基であり、かつ

30

Xaa6はイソロイシン残基またはバリン残基である)によって表される、13アミノ酸残基か
 らなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とするペプチド。

【 0 0 2 2 】

[9] 以下の1)~12)のいずれかのアミノ酸配列からなる、[8]のペプチド。

【 0 0 2 3 】

- 1) DCTYTNGNLVWCT (配列番号 2 9)
- 2) DCAYTNGNLVWCT (配列番号 3 1)
- 3) DCSYTNGNLVWCT (配列番号 3 2)
- 4) DCTWTNGNLVWCT (配列番号 3 4)
- 5) DCTYHNGNLVWCT (配列番号 3 5)
- 6) DCTYRNGNLVWCT (配列番号 3 6)
- 7) DCTYSNGNLVWCT (配列番号 3 7)
- 8) DCTYTRGNLVWCT (配列番号 3 9)
- 9) DCTYTNGELVWCT (配列番号 4 0)
- 10) DCTYTNGRLVWCT (配列番号 4 1)
- 11) DCTYTNGDLVWCT (配列番号 4 2)
- 12) DCTYTNGNLVWCT (配列番号 4 5)

40

[1 0] ペプチドが2つのシステイン(C)残基間でジスルフィド結合を形成している、[1]
 ~[9]のいずれかのペプチド。

50

【 0 0 2 4 】

[1 1] 標識が結合されている、[1] ~ [1 0]のいずれかのペプチド。

【 0 0 2 5 】

[1 2] [1] ~ [1 1]のいずれかのペプチドと連結されたタンパク質からなる融合タンパク質。

【 0 0 2 6 】

[1 3] [1] ~ [1 1]のいずれかのペプチドを固相に結合してなる固定化ペプチド。

【 0 0 2 7 】

[1 4] [1] ~ [1 1]のいずれかのペプチドをコードする核酸。

【 0 0 2 8 】

[1 5] [1] ~ [1 1]のいずれかのペプチド又は[1 3]の固定化ペプチドをIgGと結合させること、並びに、結合したIgGを遊離させてIgGを回収することを含む、IgGの精製方法。

【 0 0 2 9 】

[1 6] [1] ~ [1 1]のいずれかのペプチド又は[1 3]の固定化ペプチドにサンプル中のIgGを結合させ、結合したIgGを検出することを含む、IgGの検出方法。

【 0 0 3 0 】

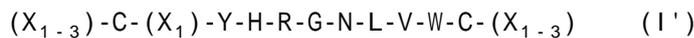
[1 7] [1] ~ [1 1]のいずれかのペプチド又は[1 3]の固定化ペプチドの少なくとも1種を含む、ヒトIgGの分析又は精製のためのキット。

【 0 0 3 1 】

[1 8] [1 3]の固定化ペプチドを含有する、IgG分離用カラム。

【 0 0 3 2 】

[1 9] 下記の式I' :



(式中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Yはチロシン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Rはアルギニン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

Nはアスパラギン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

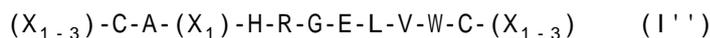
Vはバリン残基であり、かつ

Wはトリプトファン残基である。)

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とする、[1]のペプチド。

【 0 0 3 3 】

[2 0] 下記の式I'' :



(式中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Aはアラニン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Rはアルギニン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

Eはグルタミン酸残基であり、

Lはロイシン残基であり、

Vはバリン残基であり、かつ

Wはトリプトファン残基である。)

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結

10

20

30

40

50

合可能であることを特徴とする、[1]のペプチド。

【0034】

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2011-182539号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

【発明の効果】

【0035】

本発明のヒトIgG結合性ペプチドは、IgA、IgM及びIgEと比べてIgGに対し高い選択性をもってヒトIgGに結合可能であるという利点を有している。このことは、例えばヒト血清等からIgGを選択的に分離することを可能にすることを意味する。

【図面の簡単な説明】

10

【0036】

【図1】ヒトIgG結合ファージクローンのELISAによる結合特異性を示す。

【図2】Lib-Aの配列(A)とそこから得られたペプチドの配列(B)を示す。

【図3】Lib-Bの配列を示す。

【図4】Lib-Cの配列を示す。

【図5】表面プラズモンによるGFC-C35-3/15(T5A, T7H, N8R, N10E)ペプチド(A)およびGFC-C35-3/15(T5A, Y6W, T7H, N8R, N10E)ペプチド(B)のヒトIgG(左パネル)およびヒトIgA(右パネル)に対する結合解析の結果を示す。

【図6】Lib-Dの配列を示す。

【図7】Lib-Dから得られたペプチド配列を基に各サイトで見られたアミノ酸の出現頻度を示す。

20

【図8】IgG結合性ペプチドを固定化したカラムによるヒト血清からのIgGの精製結果を示す。

【図9】IgG結合性ペプチドを固定化したカラムによりヒト血清から精製された溶出画分DのSDS-PAGEの結果を示す。各レーンはそれぞれ以下のサンプルを示す。1: マーカー、2: IgG、3: HAS、4: 血清、5: 溶出画分D。

【発明を実施するための形態】

【0037】

今回、本発明者らが見出したヒトIgGに対し特異的又は選択的な結合性を有するペプチドは、T7ファージ提示システムによって構築された分子内に1つのジスルフィド結合を含むランダムペプチドライブラリ(Sakamoto, K., Ito, Y., Hatanaka, T., Soni, P. B., Mori, T., and Sugimura, K. (2009) *The Journal of biological chemistry* 284(15), 9986-9993)を参考に、新たにデザイン、構築したライブラリからバイオパンニング法を利用して単離されたものであり、このとき得られた2種の特異的クローンは、互いに共通の配列の相同性が見られ、その配列を基に多様に置換又は欠失して調製した合成ペプチドは、IgGに対する特異性を示した。これらのペプチドのIgG結合に必須の残基の同定を行い、親和性増強へのアプローチ並びに該ペプチドを使ったヒト血清からのIgGの精製への応用を可能にした。本発明のIgG結合性ペプチドは、最もコンパクトなもので、13残基と小さく、これにより低コストによるペプチドをベースにしたIgGの精製システムの構築が期待できる。

30

40

【0038】

以下に、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0039】

具体的には、本発明のIgG結合性ペプチド、該ペプチドによるIgGの精製法及び分析法、そのようなIgG精製又は検出のためのキットについて説明する。

【0040】

(IgG結合性ペプチド)

本発明のペプチドは、多数のランダムペプチドを含むファージライブラリのなかからヒトIgGと特異的に又は選択的に結合性を有するものとしてスクリーニングされたものである。

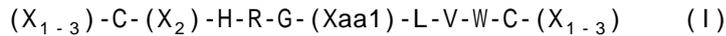
50

【 0 0 4 1 】

本明細書中で使用するヒトIgGは、IgG1, IgG2, IgG3及びIgG4を指すものとする。

【 0 0 4 2 】

すなわち、本発明のペプチドは、広義の一次構造として、下記の式I：



(式中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Rはアルギニン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa1はグルタミン酸残基またはアスパラギン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

Vはバリン残基であり、かつ

Wはトリプトファン残基である。)

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とするペプチドである。

【 0 0 4 3 】

上記式で、N末端又はC末端の X_{1-3} という表記は、システイン(C又はCys)以外の独立的に任意のアミノ酸残基Xが1~3個連続していることを意味し、それを構成するアミノ酸残基は同じか又は異なる残基であるが、好ましくは3個すべてが同じ残基でない配列からなる。同様に、 X_2 もシステイン(C又はCys)以外の独立的に任意のアミノ酸残基Xが2個連続していることを意味し、それを構成するアミノ酸残基は同じか又は異なる残基であるが、好ましくは当該2個連続しているアミノ酸残基は同じ残基でない配列からなる。

【 0 0 4 4 】

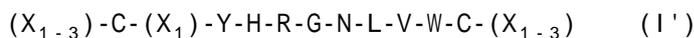
式Iの2つのシステイン残基はジスルフィド結合して環状ペプチドを形成することができる。通常、式Iのペプチドはジスルフィド結合している。

【 0 0 4 5 】

式Iのペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Xをさらに特定した式I'および式I''で表されるペプチドを以下に示す。

【 0 0 4 6 】

すなわち、式I'で表されるペプチドは、



(式中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Yはチロシン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Rはアルギニン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

Nはアスパラギン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

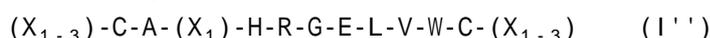
Vはバリン残基であり、かつ

Wはトリプトファン残基である。)

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とする。

【 0 0 4 7 】

式I''で表されるペプチドは、



(式中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Aはアラニン残基であり、

10

20

30

40

50

Hはヒスチジン残基であり、
 Rはアルギニン残基であり、
 Gはグリシン残基であり、
 Eはグルタミン酸残基であり、
 Lはロイシン残基であり、
 Vはバリン残基であり、かつ
 Wはトリプトファン残基である。)

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とする。

【0048】

また、式Iのペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Xをさらに特定した式IIで表されるペプチドを以下に示す。

【0049】

すなわち、式IIで表されるペプチドは、

$(X_{1-3})-C-(Xaa2)-(Xaa3)-H-R-G-(Xaa1)-L-V-W-C-(X_{1-3})$ (II)

(式中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Rはアルギニン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa1はグルタミン酸残基またはアスパラギン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

Vはバリン残基であり、

Wはトリプトファン残基であり、

Xaa2はアラニン残基、セリン残基またはトレオニン残基であり、かつ

Xaa3はチロシン残基またはトリプトファン残基である。)

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とする。

【0050】

上記の式I'、式I''および式IIのペプチドのアミノ酸配列において、17アミノ酸残基とした場合の、N末端から1番目及び2番目並びに16番目及び17番目のアミノ酸残基Xは欠失していてもよく、そのようなペプチドは13アミノ酸長からなる。

【0051】

本明細書で使用する「17アミノ酸残基とした場合の」とは、ペプチドのアミノ酸残基をアミノ酸番号で呼ぶときに、最長のアミノ酸長である17残基のN末端から順番に1番目から17番目まで番号づけするために便宜的に表現した用語である。

【0052】

またさらに、式Iのペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Xをさらに特定した式IIIで表されるペプチドを以下に示す。

【0053】

式IIIで表されるペプチドは、

$(X_{1-3})-C-A-Y-H-R-G-E-L-V-W-C-(X_{1-3})$ (III)

(式中、Xの各々は独立的にシステイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Aはアラニン残基であり、

Yはチロシン残基であり、

Hはヒスチジン残基であり、

Rはアルギニン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

Eはグルタミン酸残基であり、

10

20

30

40

50

Lはロイシン残基であり、
 Vはバリン残基であり、かつ
 Wはトリプトファン残基である。)によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とする。

【0054】

上記の式IIIのペプチドのアミノ酸配列において、17アミノ酸残基とした場合の、N末端から1番目及び2番目並びに16番目及び17番目のアミノ酸残基Xは欠失していてもよく、そのようなペプチドは13アミノ酸長からなる。

【0055】

さらに、上記の各式のペプチドのアミノ酸配列のシステイン(C)以外のアミノ酸残基、すなわち、17アミノ酸残基とした場合のN末端から1~3、5、6、15~17番目の各アミノ酸残基は、以下のものから選択されることが好ましい。ここで、各大文字のアルファベットは、アミノ酸の一文字表記である：

- 1番目のアミノ酸残基= S、G、F又は、なし
- 2番目のアミノ酸残基= D、G、A、S、P又は、なし
- 3番目のアミノ酸残基= S、D、T、N、E又はR、
- 5番目のアミノ酸残基= A又はT、
- 6番目のアミノ酸残基= Y又はW、
- 15番目のアミノ酸残基= S、T又はD、
- 16番目のアミノ酸残基= H、G、Y、T、N、D、F又は、なし、
- 17番目のアミノ酸残基= Y、F、H、M又は、なし。

【0056】

- 5番目のアミノ酸残基= A又はT、
- 6番目のアミノ酸残基= Y又はW、

式Iのペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Xをさらに特定した式IVで表されるペプチドを以下に示す。

【0057】

式IVで表されるペプチドは、
 D-C-(Xaa2)-(Xaa3)-H-R-G-(Xaa1)-L-V-W-C-T (IV)

Dはアスパラギン酸残基であり、
 Cはシステイン残基であり、
 Hはヒスチジン残基であり、
 Rはアルギニン残基であり、
 Gはグリシン残基であり、
 Xaa1はグルタミン酸残基またはアスパラギン残基であり、
 Lはロイシン残基であり、
 Vはバリン残基であり、
 Wはトリプトファン残基であり、
 Tはトレオニン残基であり、
 Xaa2はアラニン残基、またはトレオニン残基であり、かつ
 Xaa3はチロシン残基またはトリプトファン残基である。)によって表される、13アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とする。

【0058】

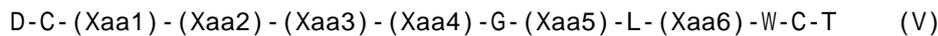
式Iのペプチドの具体例のいくつかを以下の1)~17)に列挙するが、これらに制限されないことはいうまでもない。このようなペプチドはいずれもヒトIgGに対し他の種の免疫グロブリンと比べて格別高い結合特異性又は結合選択性を有している：

- 1) DCTYHRGNLVWCT (配列番号47)
- 2) DCAYHRGNLVWCT (配列番号48)
- 3) DCTYHRGELVWCT (配列番号50)

- 4) DCAYHRGELVWCT (配列番号 5 2)
 5) DCAWHRGELVWCT (配列番号 5 3)
 6) DCAYHRGELVWCT (配列番号 5 5)
 7) GPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号 5 6)
 8) RCAYHRGELVWCS (配列番号 5 7)
 9) GPRCAYHRGELVWCSFH (配列番号 5 8)
 1 0) SPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号 1 0 0)
 1 1) GDDCAYHRGELVWCTFH (配列番号 1 0 1)
 1 2) GPSCAYHRGELVWCTFH (配列番号 1 0 2)
 1 3) GPDCAYHRGELVWCSFH (配列番号 1 0 3)
 1 4) GPDCAYHRGELVWCTHH (配列番号 1 0 4)
 1 5) GPDCAYHRGELVWCTFY (配列番号 1 0 5)
 1 6) SPDCAYHRGELVWCTFY (配列番号 1 0 6)
 1 7) SDDCAYHRGELVWCTFY (配列番号 1 0 7)。

【 0 0 5 9 】

また、本発明のペプチドは、広義の一次構造として、下記の式V：



(式中、

Dはアスパラギン酸残基であり、

Cはシステイン残基であり、

Gはグリシン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

Wはトリプトファン残基であり、

Tはトレオニン残基であり、

Xaa1はアラニン残基、セリン残基またはトレオニン残基であり、

Xaa2はトリプトファン残基またはチロシン残基であり、

Xaa3はヒスチジン残基、アルギニン残基、セリン残基またはトレオニン残基であり、

Xaa4はアスパラギン残基またはアルギニン残基であり、

Xaa5はグルタミン酸残基、アスパラギン残基、アルギニン残基、またはアスパラギン酸残基であり、かつ

Xaa6はイソロイシン残基またはバリン残基である)によって表される、13アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGと結合可能であることを特徴とするペプチドである。

【 0 0 6 0 】

式Vの2つのシステイン残基はジスルフィド結合して環状ペプチドを形成することができる。通常、式Vのペプチドはジスルフィド結合している。

【 0 0 6 1 】

式Vのペプチドの具体例のいくつかを以下の10)~21)に列挙するが、これらに制限されないことはいうまでもない。このようなペプチドはいずれもヒトIgGに対し他の種の免疫グロブリンと比べて格別に高い結合特異性又は結合選択性を有している：

- 10) DCTYTNGNLVWCT (配列番号 2 9)
 11) DCAYTNGNLVWCT (配列番号 3 1)
 12) DCSYTNGNLVWCT (配列番号 3 2)
 13) DCTWTNGNLVWCT (配列番号 3 4)
 14) DCTYHNGNLVWCT (配列番号 3 5)
 15) DCTYRNGNLVWCT (配列番号 3 6)
 16) DCTYSNGNLVWCT (配列番号 3 7)
 17) DCTYTRGNLVWCT (配列番号 3 9)
 18) DCTYTNGELVWCT (配列番号 4 0)
 19) DCTYTNGRLVWCT (配列番号 4 1)

10

20

30

40

50

20) DCTYTNGDLVWCT (配列番号 4 2)

21) DCTYTNGNLIWCT (配列番号 4 5)。

【 0 0 6 2 】

前述のとおり、本発明に関わる上記式のペプチドは、各アミノ酸配列のなかに離間した2つのシステイン(C)残基を有し、該システイン残基間でジスルフィド結合を形成しうるようにシステイン残基が配置されていることを特徴としており、好ましいペプチドは、2つのシステイン残基がジスルフィド結合して環状ペプチドを形成し、各システイン残基のN末端側及びC末端側には1または2個のシステイン以外の任意のアミノ酸残基を有していても良い。各システイン残基のN末端側及びC末端側には1または2個のアミノ酸残基を有する場合において、17アミノ酸残基とした場合のN末端から1~2、16~17番目の各アミノ酸残基は、上記例示のものである。

10

【 0 0 6 3 】

本発明のペプチドは、ヒトIgGとの結合親和性が、他のヒト免疫グロブリン(IgA, IgE, IgM)と比較して約10倍以上、好ましくは約50倍以上、より好ましくは約200倍以上高い。本発明のペプチドとヒトIgGとの結合に関する解離定数(Kd)は、表面プラズモン共鳴スペクトル解析(例えばBIACOREシステム使用)により決定可能であり、例えば $1 \times 10^{-1} \text{M} \sim 1 \times 10^{-3} \text{M}$ 未満、好ましくは $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 未満、より好ましくは $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 未満である。

【 0 0 6 4 】

本発明のペプチドは、慣用の液相合成法、固相合成法などのペプチド合成法、自動ペプチド合成機によるペプチド合成などによって製造することができる(Kelley et al., Genetics Engineering Principles and Methods, Setlow, J.K. eds., Plenum Press NY. (1990) Vol.12, p.1-19; Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis (1989) W.H. Freeman Co.; Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82: p.5132、*「新生化学実験講座1 タンパク質IV」*(1992)日本生化学会編,東京化学同人)。あるいは、本発明のペプチドをコードする核酸を用いた遺伝子組換え法やファージディスプレイ法などによって、ペプチドを製造してもよい。例えば本発明のペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを発現ベクター中に組み込み、宿主細胞中に導入し培養することにより、目的のペプチドを製造することができる。製造されたペプチドは、常法により、例えば、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLCなどのクロマトグラフィー、硫酸分画、限外ろ過、免疫吸着法などにより、回収又は精製することができる。

20

30

【 0 0 6 5 】

ペプチド合成は、各アミノ酸の、結合しようとする - アミノ基と - カルボキシル基以外の官能基を保護したアミノ酸類を用意し、それぞれのアミノ酸の - アミノ基と - カルボキシル基との間でペプチド結合形成反応を行う。通常、ペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基のカルボキシル基を適当なスペーサー又はリンカーを介して固相に結合しておく。上で得られたジペプチドのアミノ末端の保護基を選択的に除去し、次のアミノ酸の - カルボキシル基との間でペプチド結合を形成する。このような操作を連続して行い側基が保護されたペプチドを製造し、最後に、すべての保護基を除去し、固相から分離する。保護基の種類や保護方法、ペプチド結合法の詳細は、上記の文献に詳しく記載されている。

40

【 0 0 6 6 】

遺伝子組換え法は、本発明のペプチドをコードするDNAを適当な発現ベクター中に挿入し、適当な宿主細胞にベクターを導入し、細胞を培養し、細胞内から又は細胞外液から目的のペプチドを回収することを含む。ベクターは、限定されないが、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、ファージミド、ウイルスなどのベクターである。プラスミドベクターとしては、限定するものではないが、大腸菌由来のプラスミド(例えばpET22b(+), pBR322, pBR325, pUC118, pUC119, pUC18, pUC19, pBluescript等)、枯草菌由来のプラスミド(例えばpUB110, pTP5等)、酵母由来のプラスミド(例えばYEp13, YCp50等)などが挙げられる。ファージベクターとしては、限定するものではないが、T7ファージディスブ

50

レイベクター (T7Select10-3b、T7Select1-1b、T7Select1-2a、T7Select1-2b、T7Select1-2c等(Novagen))、ファージベクター (Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、gt10、gt11、ZAP、ZAPII等)が挙げられる。ウイルスベクターとしては、限定するものではないが、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、センダイウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスなどが挙げられる。コスミドベクターとしては、限定するものではないが、Lorist 6、Charomid9-20、Charomid9-42などが挙げられる。ファージミドベクターとしては、限定するものではないが、例えばpSKAN、pBluescript、pBK、pComb3Hなどが知られている。ベクターには、目的のDNAが発現可能なように調節配列や、目的DNAを含むベクターを選別するための選択マーカー、目的DNAを挿入するためのマルチクローニングサイトなどが含まれる。そのような調節配列には、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、S-D配列又はリボソーム結合部位、複製開始点、ポリAサイトなどが含まれる。また、選択マーカーには、例えばアンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、等が用いられる。ベクターを導入するための宿主細胞は、大腸菌や枯草菌等の細菌、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞 (例えば、哺乳動物細胞)、植物細胞等であり、これらの細胞への形質転換又はトランスフェクションは、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、パーティクルガン法、PEG法等を含む。形質転換細胞を培養する方法は、宿主生物の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。例えば、大腸菌や酵母細胞等の微生物の培養では、宿主微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有する。本発明のペプチドの回収を容易にするために、発現によって生成したペプチドを細胞外に分泌させることが好ましい。そのために、その細胞からのペプチドの分泌を可能にするペプチド配列をコードするDNAを目的ペプチドをコードするDNAの5'末端側に結合する。細胞膜に移行した融合ペプチドがシグナルペプチダーゼによって切断されて、目的のペプチドが培地に分泌放出される。あるいは、細胞内に蓄積された目的ペプチドを回収することもできる。この場合、細胞を物理的又は化学的に破壊し、タンパク質精製技術を使用して目的ペプチドを回収する。

【0067】

それゆえに、本発明はさらに、本発明のペプチドをコードする核酸にも関する。ここで、核酸は、DNA又はRNA (例えばmRNA)を含む。

【0068】

本発明のペプチドは、IgGの検出を可能にするために、標識されていてもよい。標識は、限定されないが、例えば蛍光色素、化学発光色素、酵素、放射性同位元素、蛍光タンパク質、ビオチンなどを含む。好ましい標識の例は、フルオレセイン、FITCなどのフルオレセイン誘導体、ローダミン、テトラメチルローダミンなどのローダミン誘導体、テキサスレッドなどの蛍光色素である。

【0069】

本発明のペプチドは、任意のタンパク質と融合させてもよい。タンパク質がGFP (緑色蛍光タンパク質)のような蛍光タンパク質、ペルオキシダーゼなどの酵素などであれば、該タンパク質を標識として使用できる。この場合、本発明のペプチドと該タンパク質とを、必要に応じて適当なリンカーを介して融合タンパク質として遺伝子組換え法によって作製できる。このとき、本発明のペプチドがヒトIgGとの結合性を損なわないように融合タンパク質を作製するべきである。

【0070】

本発明のペプチドはさらに、ヒトIgGの分離精製、分析などに使用できるように、アフィニティカラムに充填可能な固相上に固定化されてもよい。

【0071】

ペプチドを固定化するのに用いる好適な固相としては、限定するものではないが、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、スチレン-ブタジエン共重合体、(メタ)アクリル酸エステルポリマー、フッ素樹脂、シリカゲル、架橋デキストラン、ポリサッカライド、アガロース等の多糖類、ガラス、

10

20

30

40

50

金属、磁性物質、及びこれらの組み合わせなどが挙げられる。そのような固相の形状は、例えば、トレー、球、繊維、粒子、棒、平板、容器、セル、マイクロプレート、試験管、膜（フィルム又はメンブラン）、ゲル、チップなどの任意の形状でよい。具体的には例えば、磁性ビーズ、ガラスビーズ、ポリスチレンビーズ、セファロースビーズ、シリカゲルビーズ、多糖類ビーズ、ポリスチレンプレート、ガラスプレート、ポリスチレンチューブなどが挙げられる。これら固相への本発明のペプチドの固定化は、当業者に周知の方法を用いて行うことができ、例えば物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法等によって行うことができる。固定化は共有結合にて行うことが好ましく、固相表面に化学官能基（例えばヒドロキシ基、アミノ基、N-ヒドロキシスクシンイミジル基など）、好ましくは炭素数約4~20のアルキレン鎖をスペーサーとして有する化学官能基を有しており、これとペプチドのカルボキシ末端を化学的に反応させてエステル結合又はアミド結合等を形成する。本発明のペプチドを固定化した固相は、アフィニティークロマトグラフィーカラム、HPLCカラム等のカラムに充填して、ヒトIgGを検出、精製又は分離するために用いることができる。

10

【0072】

(IgGの精製法)

本発明はさらに、上記の本発明のペプチド又は固定化ペプチドをIgGと結合させること、並びに、結合したIgGを遊離させてIgGを回収することを含む、IgGの精製方法を提供する。

【0073】

本発明のペプチドを固定化した固相を、アフィニティークロマトグラフィーカラム、HPLCカラム等のカラムに充填し、適当なバッファーで平衡化し、室温~0℃、好ましくは約10~0℃、更に好ましくは約4℃、の低温でヒトIgGを含有する液をアプライし、固相上のペプチドにヒトIgGを結合させる。例えば血清中のIgGを分離する場合には、中性域のpH、例えばpH6.0~7.5のバッファーを使用してカラムにアプライし、結合操作を行うことができる。溶出は、酸性域のpH、例えばpH2~4のバッファー（例えば0.3MのNaClを含有するpH3.5からpH2.5の0.2Mグリシン-HClバッファー）をカラムに流して行うことができる。

20

【0074】

IgGが回収されたかどうかは、例えば、電気泳動、その後の抗ヒトIgG抗体を使用するウェスタンブロット法によって測定できる。泳動条件は、5~20%アクリルアミドグラジエントゲルを用いたSDS-PAGEを行い、また、ウェスタンブロット条件は、泳動後のタンパク質をPVDF膜に転写し、スキムミルクでブロッキング後、抗ヒトIgG鎖ヤギ抗体とHRP標識抗ヤギIgGマウス抗体で検出を行うことができる。

30

【0075】

本発明の方法は、種々の方法で生産されたIgG含有生産物からIgGを精製する工程のなかでIgGに富む画分を得る場合に有用である。それゆえに、アフィニティークロマトグラフィー、HPLC等のカラムクロマトグラフィーにおいて本発明の方法を使用することが好ましい。IgGの精製に際しては、このようなクロマトグラフィー法に加えて、タンパク質の慣用的な精製技術、例えばゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー、硫酸分画、限外ろ過などを適宜組み合わせることができる。

40

【0076】

(IgGの分析法)

本発明はさらに、上記の本発明のペプチド又は固定化ペプチドにサンプル中のIgGを結合させ、結合したIgGを検出することを含む、IgGの検出方法を提供する。ここで、検出には、定性又は定量のいずれかの分析を含むものとする。

【0077】

IgGの検出は、操作中に適するバッファーを使用しながら、メンブランやポリスチレンウェルプレートなどにサンプルを結合し、これに本発明の標識ペプチドを接触させ、必要に応じて洗浄後、標識のレベルを定性又は定量することによって行うことができる。

50

【0078】

あるいは、上記のような本発明のペプチドを固定化したHPLCカラムを使用する場合には、該カラムに、ヒトIgGを含有するサンプルを注入し、結合バッファーを流してペプチドにヒトIgGを結合し、例えば吸光度280nmで、もしくは280nmの励起光による350nmの蛍光で、タンパク質を検出し記録し、溶出緩衝液（例えば、0.15MのNaClを含む0.1Mグリシン塩酸緩衝液pH2.5へのグラジエント溶出）にてカラムから溶出させ、現れたピーク及びピーク面積により、IgGの定性及び定量を行うことができる。

【0079】

(キット及びカラム)

本発明はさらに、上記の本発明のペプチド又は固定化ペプチドの少なくとも1種を含む、ヒトIgGの分析（定性、定量等）又は精製のためのキットを提供する。

10

【0080】

本発明のキットに含まれる個々のペプチド又は固定化ペプチドは、個別の容器に収容される。また、必要であれば、ヒトIgGの分析手順や精製手順を記載した使用説明書をキットに備えてもよい。さらにキットには、分析に必要な試薬やバッファー、固定化ペプチド充填カラムなどを含めてもよい。

【0081】

本発明はさらに、上記の本発明の固定化ペプチドを含有する、IgG分離用カラムを提供する。

【0082】

上記IgG分離用カラムは、IgGを分離するためのカラムであり、具体的には、IgGの分析又は精製・分取のための、クロマトグラフィーカラム、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)カラム等のカラムを包含する。カラムのサイズは、特に制限されないものとし、分析用、精製・分取用などの用途、アプライ(搭載)又は注入する量、などに応じて変化させうる。また、カラムの材質は、金属、プラスチック、ガラス等の、カラムとして通常使用されるようなものでよい。

20

【0083】

上記のカラムは、上記の手法に準じて作製した本発明の固定化ペプチド（乾燥又は湿潤状態）をカラムに密に充填することによって製造できる。

【実施例】

30

【0084】

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は、それらの実施例によって制限されないものとする。

【0085】

T7ファージ提示法によって構築した2つのCysによって環状構造を持つランダムペプチドライブラリから、ヒトIgG特異的なファージを単離するため、以下のバイオパンニングの手法を用いた。

【0086】

すなわち、0.5%BSAと0.1 μ MのタイプII IgG結合ペプチドK6R (J. Biol. Chem. 284, 9986, 2009) を含むPBS中の 5×10^{10} pfuのT7ファージライブラリ ($X_3CX_8CX_3$ 、 $X_3CX_9CX_3$ 、 $X_3CX_{10}CX_3$ の等量混合物) 溶液を、ヒトIgG Fc (From human plasma, Athens Research & Technology, Athens, GA, USA) でコート (1 μ g/100 μ l/well) し、0.5%BSAでブロッッキングした96穴マイクロプレート (Nunc, Maxisorp) のウェルに加え、1時間反応させた。上清のファージ溶液を除いた後、0.1%Tweenを含むPBSで10回ウェルを洗浄した。大腸菌B LT5615 (Novagen) の培養液 (300 μ l) を加えて感染させ、3mlの大腸菌培養液と一緒に37にて、増殖、溶菌するまでインキュベートした。溶菌後の培養液から定法に従い、ポリエチレングリコールによるファージ沈殿法によってファージを回収した。得られたファージは、PBSに溶解させ、0.45 μ mのフィルターを通した後、次のパンニングに用いた。上記を含め4回のパンニングを行うことによって、IgG特異的なファージを濃縮した。

40

【0087】

50

4回のパンニング後に得られたファージの種々のIgGに対する結合特異性をELISAで調べたところ、図1に示したように、ヒトIgGに結合するだけでなく、ウサギやヤギ、マウスのIgGとも結合活性が見られた。

【0088】

そこで、得られたファージの提示するペプチドモチーフの解析を行いアミノ酸配列を決定した(表1)。

【表1】

ランダムペプチドライブラリより得られた

IgG 結合性のファージが提示するペプチド配列の比較

	1*****8-9*****17		
GfC-A2	SFTCAYDRDGNLVWCTHS	配列番号 1	1/30
GfC-B17	SSDCTYQR-GELVWCTHL	配列番号 2	1/30
GfC-C3	PGECTKHM-GELVWCVSK	配列番号 3	1/80
GfC-C35	GPDCTYTN-GNLVWCTFH	配列番号 4	2/80
GfC-C65	KPRCSYLR-GQLVWCLHS	配列番号 5	2/80
	C*G*LVWC***		

10

ただし、ペプチドのアミノ酸の番号付けは、 $X_3CX_9CX_3$ の

ペプチドライブラリの長さを基準とし、N末から1-17と番号を振った。

20

【0089】

比較的結合活性の強かったGfC-C35について、ペプチド合成を行い、表面プラズモン共鳴(SPR)解析による親和性評価を行ったところ、Kd値で14 μ Mと親和性が低く、親和性リガンドとして利用するには、親和性の増強が必要であることが分かった。

【0090】

そこで、まず、2つのCysで挟まれた領域を対象に、GfC-C35で完全に保存されていたGly9, Leu11, Val12およびTrp13、ならびにThr15を固定し、その他の部位をNNKの混合ヌクレオチドでランダム化したライブラリ(ライブラリA: Lib-A、図2(A))を構築し、バイオパニングによって得られたペプチドの配列から、結合に優位なアミノ酸の特性を評価した(ただし、ライブラリから得られたペプチドのアミノ酸配列の1位は、共通の特徴がほとんど見られないことから、このライブラリ化からは外した)。このライブラリAを用いて、ヒト抗体に対するバイオパニングを行った後、得られたファージのペプチドの配列と、各アミノ酸部位で見られたアミノ酸を図2(B)に示す。5位には側鎖の小さなThr, Ser, Alaのみが見られ、また、6位には、Trpが最も多くその他Tyr, Pheの芳香環を持った側鎖で占められていた。7位はHisが最も多く、一部SerとTrpが見られた。また、8位にはArg, Leu, Metが多く見られた。さらに10位では親水性のアミノ酸で占められていたが、その中ではArgが最も多かった(図2)。

30

【0091】

以上の結果から、Gly9, Leu11, Val12, Trp13およびThr15を固定化した場合の、IgG結合における重要な各部位の側鎖の特徴が明らかになったが、再度、保存された残基の重要性の確認と、より強い結合力を持ったペプチドのスクリーニングを行うため、ライブラリB: Lib-Bをデザインした。

40

【0092】

すなわち、図3に示したように、Lib-Aで得られたクローンのペプチド配列の特性を含めながら、表1で完全に保存されていたアミノ酸(Leu11, Val12, Trp13およびThr15)についても、類似の側鎖を持ったアミノ酸を含む変異を導入しライブラリ構築を行った。ただし、Gly9は、ペプチドの立体構造の維持に重要と思われたので固定化し、また、2つのCysより外側についてはライブラリ化からは外し、元のGfC-C35のペプチドの配列(Asp3とThr15)を付加するのみとした)。構築したライブラリを用いて、厳しい洗浄条件でバ

50

イオパニングを行い、ELISAでのスクリーニングによって強い結合活性を示したクローンのペプチド配列を解析した。

【 0 0 9 3 】

得られた配列を表 2 に示す。

【表 2】

	3	9	
1-T3331	DC SYRF	GELVW CT	配列番号 6
2-T3338	DC SYHF	GELVW CT	配列番号 7
3-T33313	DC AFHL	GHLVW CT	配列番号 8
4-T33314	DC AFHR	GDLVW CT	配列番号 9
5-T33315	DC AFHF	GDLVW CT	配列番号 10
6-T33320	DC TYHF	GKLVW CT	配列番号 11
7-T33324	DC AFHL	GELVR CT	配列番号 12
8-T33317	DC TWKF	GDLIW CT	配列番号 13
9-T33339	DC AYHL	GQLVR CT	配列番号 14
10-T33341	DC SFHL	GDLVW CT	配列番号 15
11-T32213	DC SYHL	G DYVW CT	配列番号 16
12-T32222	DC SWHM	GQLIW CT	配列番号 17
	AYHF	DLVW	
	SF L	E	
	TW		

10

20

【 0 0 9 4 】

結果、5位については、SerやThrと比べて顕著な優位性は見えなかったがAlaが一番多かった。6位については、Lib-Aで有意であったTrpに代わり、TyrとPheが優位になった。7位については、ライブラリでは多様なアミノ酸を導入したにもかかわらず、Hisが圧倒的に多くなった。8位は、Lib-AでのArgとLeuに代わり、PheとLeuが多くを占めた。10位では、酸性のアミノ酸AspとGluが多くを占めたが、ポジティブな電荷を持つLys、HisやGlnも少数みられた。一方、最初の単離されたクローンの配列から予想されたように、Leu 11, Val 12, Trp 13は、ほぼ保存されていたが、極僅か11位ではTyr、12位ではIle、13位ではArgへの置換が見られた。

30

【 0 0 9 5 】

これらの高頻度で出現するアミノ酸は、各アミノ酸の側鎖のIgGに対する結合への寄与を反映させたものと考えられる。元のライブラリ(ライブラリ0: Lib-0)、ライブラリA、B(Lib-A, B)から得られたクローンのペプチド配列において、高い頻度で見られたアミノ酸を各位置ごとにまとめて表3に示す。

【表 3】

各ライブラリからパニングによって得られたファージのペプチド配列において高頻度で出現したアミノ酸

	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	16
Lib 0		Y		R	G		L	V	W	T	H
Lib A	SAT	WFY	HSW	RLM	-	REN	-	-	-	-	
Lib B	AST	YFW	H	FL	-	DE	L	V	W	-	
Lib C	SA	WFY	H	L(R)	-	Q	ML	V(I)	W	TS	

表中、-は固定化したアミノ酸を示し、それぞれGly9、Leu11、Val12、Trp13、Thr15を示す。

40

【 0 0 9 6 】

50

この情報に基づいて、さらにCysの両外側の配列を付加しランダム化したライブラリを構築した (Lib-C、図4)。このライブラリでは、Cysの内部の配列は、Lib-A、Bにおける高頻度で出現するアミノ酸を含み、Cysの両外側の残基をNNKの混合ヌクレオチドによる完全なランダム配列か、あるいは、Lib-0またはLib-Aで見られた類似のアミノ酸と類似のアミノ酸を含むようにライブラリ化した。ライブラリの構成に関し、6位には本来Thrを入れるべきであったが、塩基混合においてThrを入れると非常にアミノ酸数が多くなることから、Thrに代えて疎水および/またはアロマティックのアミノ酸を入れた。また、7位には本来Ser、Arg、Trp等を入れるべきであったが、Hisが圧倒的に多かったことからHisを加え、そのコントロールとしてTyr、Glnを加えた。

【0097】

このライブラリを使って、再度パニングにより、結合性の高いクローンを選別し、配列を解析した結果を表4に示す。

【表4】

GFc-C35	GPDC TYTNG NLVWC TFH	配列番号 4
T6-1	RGC SYHLG QLVWC TAV	配列番号 18
T6-2	VKC SWHLG QMVWC TSN	配列番号 19
T6-7	ANC SWHLG DMVWC STI	配列番号 20
T6-15	VKC SWHLG QMVWC SNS	配列番号 21
T6-16	VKC SWHLG QMVWC SNS	配列番号 22
T6-20	LNC AFHRG RLVWC TDL	配列番号 23
T6-26	SKC SFHLG QLIWC S	配列番号 24
T6-33	TRC SYHLG EMVWC APS	配列番号 25
T6-41	LNC AFHRG RLVWC TDL	配列番号 26
T6-43	VGC AYHLG NMVWC TSF	配列番号 27
	K SW L QM T	
	AY R L S	
	F	

【0098】

結果、N末側Cysの外側の2、3位では、特徴的なアミノ酸の出現が見られなかったが、C末側Cysの外側の15位ではThrとSerの高い出現が見られた。しかし、16、17位では特徴的なアミノ酸が見られなかった。内部配列については、ほぼ、Lib-0,A,Bから取れた配列の結果 (表3) と矛盾しない配列が得られた。

【0099】

次に、結合の増強に寄与すると考えられる各サイトで高い頻度で見られたアミノ酸の導入の効果を、合成ペプチドを用いて評価、検証を行うこととした。

【0100】

検証のためのアミノ酸の領域を狭めるために、GFc-C35の配列のうち、両端から1つずつ (GFc-C35-2/16)、または2つずつ削ったペプチド (GFc-C35-3/15) を合成した。この内、GFc-C35-3/15の合成ペプチドを基準にして、アミノ酸変異導入による親和性への影響を評価した。すなわち、ファージライブラリから得られた高い頻度あるいは一部で観察されたアミノ酸に置換したペプチドを合成し、その結合解析を行うことで、各アミノ酸置換の親和性への寄与を評価した。結果を表5に示す。

【表5】

合成ペプチドでのアミノ酸置換による親和性評価の検討

ペプチド	配列		Kd (μM)
GFc-C35	GPDCYTYTNGNLVWCTFH	配列番号 4	14
GFc-C35-2/16	PDCTYTYTNGNLVWCTF	配列番号 28	25
GFc-C35-3/15	DCTYTYTNGNLVWCT	配列番号 29	130
GFc-C35-3/15 (D3R)	RCTYTYTNGNLVWCT	配列番号 30	69
GFc-C35-3/15 (T5A)	DCAYTYTNGNLVWCT	配列番号 31	61
GFc-C35-3/15 (T5S)	DCSYTYTNGNLVWCT	配列番号 32	120
GFc-C35-3/15 (Y6F)	DCTFTYTYTNGNLVWCT	配列番号 33	2100
GFc-C35-3/15 (Y6W)	DCTWTYTYTNGNLVWCT	配列番号 34	50
GFc-C35-3/15 (T7H)	DCTYHYTYTNGNLVWCT	配列番号 35	3
GFc-C35-3/15 (T7R)	DCTYRYTYTNGNLVWCT	配列番号 36	83
GFc-C35-3/15 (T7S)	DCTYSYTYTNGNLVWCT	配列番号 37	26
GFc-C35-3/15 (N8L)	DCTYTYTLGNLVWCT	配列番号 38	260
GFc-C35-3/15 (N8R)	DCTYTYTRGNLVWCT	配列番号 39	8
GFc-C35-3/15 (N10E)	DCTYTYTNGELVWCT	配列番号 40	26
GFc-C35-3/15 (N10R)	DCTYTYTNGRLVWCT	配列番号 41	42
GFc-C35-3/15 (N10D)	DCTYTYTNGDLVWCT	配列番号 42	80
GFc-C35-3/15 (N10Q)	DCTYTYTNGQLVWCT	配列番号 43	160
GFc-C35-3/15 (L11M)	DCTYTYTNGNMVWCT	配列番号 44	280
GFc-C35-3/15 (V12I)	DCTYTYTNGLIWCT	配列番号 45	12
GFc-C35-3/15 (T15S)	DCTYTYTNGNLVWCS	配列番号 46	34

【0101】

両端から1つずつ (GFc-C35-2/16)、または2つずつ削ったペプチド (GFc-C35-3/15) の親和性解析を行ったところ、それぞれのKd値は、GFc-C35の14 μMに比べ、25 μMおよび130 μMと増大し、親和性が低下した。この結果から、両端の残基 (1、2、16、17位) の結合への寄与が明らかとなった。

【0102】

Asp3については、Lib-0およびLib-CでArgが共通してみられた (表1および4)。置換したペプチド (GFc-C35-3/15 (D3R)) と元のペプチド (GFc-C35-3/15) の親和性を比較したところ、親和性の上昇がみられた。

【0103】

Thr5については、Lib-Aにおいて、ほとんどAla、Thr、Serのみが見られ、また、その後のLib-B,Cにおいて3つのアミノ酸の中での優位性がみられなかった (表3)。置換した2種のペプチド (GFc-C35-3/15 (T5A)、GFc-C35-3/15 (T5S)) と元のペプチド (GFc-C35-3/15) の親和性を比較したところ、Alaにより置換したペプチドが最も、高い親和性を示した。

【0104】

Tyr6については、Lib-A,Bからは、Trp、Tyr、Pheがほぼ均等に見られたが、それぞれを導入した置換体を作製し評価を行ったところ、GFc-C35-3/15 (Y6F) は大きく親和性の低下がみられ、Trpへの置換 (GFc-C35-3/15 (Y6W)) では、親和性の上昇がみられた。

【0105】

Thr7については、Lib-Aから得られたHis、Serをそれぞれ導入した置換体を作製し評価した。いずれの場合も、大きく親和性が向上したが、特にHisへの置換は顕著に親和性が増加した (約50倍)。

10

20

30

40

50

【0106】

Asn8については、Lib-0およびLib-A、Bで多く見られたLeuとArgへの置換を行った。Argへの置換（GFc-C35-3/15（N8R））では、約18倍のKd値の低下がみられ、親和性が大きく増大した。一方、Leuへの置換（GFc-C35-3/15（N8L））は大きく親和性を低下した。

【0107】

Asn10については、Lib-Aからは、電荷の対照的なArgとGluが多く見られた。このアミノ酸を導入したペプチド（GFc-C35-3/15（N10R）およびGFc-C35-3/15（N10E））では共に元のペプチド（GFc-C35-3/15）より親和性が向上した。この結果は、荷電性の残基が結合活性を増加させ得ることを示唆する。このことは、Asn10を電荷を持たないGlnで置換した場合（GFc-C35-3/15（N10Q））に、元のペプチドとほぼ同等の親和性を有し、親和性の増強の効果がなかったことから支持される。一方、Asn10をAspで置換した場合（GFc-C35-3/15（N10D））でも親和性の向上が若干認められるが、長い側鎖を持つGluで置換したペプチド（GFc-C35-3/15（N10E））程には親和性が向上しなかった。したがって、親和性が向上させるためには、導入するアミノ酸残基が、ある程度の長さの側鎖を有することが示唆された。

【0108】

Leu11については、Lib-0およびLib-Bでは、11位の位置は、Leuが圧倒的に多く、結合に重要残基とみなされるが、Lib-Cにおいては、Metの出現もみられた。そのため、Leu11をMetで置換したところ（GFc-C35-3/15（L11M））、親和性の低下がみられた（Kd値で約2倍）。

【0109】

Val12については、Lib-Cにおいて見られたIleに置換したところ、元のペプチドと比べてKd値が1/10程度となり、親和性が向上した。

【0110】

Thr15については、Lib-Cにおいて高頻度で出現したSerに置換したところ、元のペプチドと比較して親和性の上昇がみられた（Kd値で約1/4程度）。

【0111】

上記の検討を基に、親和性の向上に寄与することが予測されるアミノ酸置換を組み合わせたペプチドを合成した（表6）。

【表6】

アミノ酸置換の組み合わせによる IgG 結合ペプチドの親和性の向上

ペプチド	配列		Kd (μM)
GFc-C35-3/15 (T7H, N8R)	DCTYHRGNLVWCT	配列番号 47	1.1
GFc-C35-3/15 (T7H, N8R, T5A)	DCAYHRGNLVWCT	配列番号 48	0.25
GFc-C35-3/15 (T7H, N8R, Y6W)	DCTWHRGNLVWCT	配列番号 49	2.0
GFc-C35-3/15 (T7H, N8R, N10E)	DCTYHRGELVWCT	配列番号 50	0.27
GFc-C35-3/15 (T7H, N8R, V12I)	DCTYHRGNLIWCT	配列番号 51	4.8
GFc-C35-3/15 (T5A, T7H, N8R, N10E)	DCAYHRGELVWCT	配列番号 52	0.054
GFc-C35-3/15 (T5A, Y6W, T7H, N8R, N10E)	DCAWHRGELVWCT	配列番号 53	0.26
GFc-C35-3/15 (D3R, T5A, T7H, N8R, N10E, T15S)	RCAYHRGELVWCS	配列番号 54	0.147

【0112】

まず、最も効果の大きかった、Thr7HisとAsn8Argの置換を導入したところ（GFc-C35-3/15（T7H, N8R））、Kd値が1.1 μMと低下し、親和性増強の効果がみられた。

【0113】

さらに、このペプチド（GFc-C35-3/15（T7H, N8R））に、表5で効果のあったT5A、Y6W、N10E、V12Iを一つずつ導入したところ、T5AまたはN10Eを導入したペプチド（GFc-C35-3/15（T7H, N8R, T5A）またはGFc-C35-3/15（T7H, N8R, N10E））では、親和性増強の効果が

見られたが、Y6WまたはV12Iを導入したペプチド（GFc-C35-3/15（T7H, N8R, Y6W）またはGFc-C35-3/15（T7H, N8R, V12I））では、親和性が低下した。これは、個々の優位変化を積み上げて、お互いの効果の補償や干渉作用により、必ずしも加成性が成り立たないことを示唆する。

【 0 1 1 4 】

続いて、親和性増強の効果が大きかったペプチドGFc-C35-3/15（T5A, T7H, N8R, N10E）およびGFc-C35-3/15（T5A, Y6W, T7H, N8R, N10E）の表面プラズモン共鳴（SPR）解析を行った。

【 0 1 1 5 】

結果を、図 5 に示す。

10

【 0 1 1 6 】

センサーグラムの解析によると、GFc-C35-3/15（T5A, T7H, N8R, N10E）の親和性（Kd値）は、54nMであり、元のGFc-C35-3/15ペプチドに比べ、Kd値は、約24分の1となった。また、結合速度定数は、 $k_a=4.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ と極めて早く、また解離速度定数 $k_d=2.5 \times 10^{-2} \text{ S}^{-1}$ であった。

【 0 1 1 7 】

GFc-C35-3/15（T5A, Y6W, T7H, N8R, N10E）の親和性（Kd値）は、257nMであり、元のGFc-C35-3/15ペプチドに比べ上昇した。解離反応速度定数 k_d 値は、 $1.4 \times 10^{-2} \text{ S}^{-1}$ であり、GFc-C35-3/15（T5A, T7H, N8R, N10E）の半分まで低下し、親和性の増加に寄与している一方で、結合速度定数 k_a が $5.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ と極端に低下（8分の1以下）しているために、GFc-C35-3/15（T5A, Y6W, T7H, N8R, N10E）は全体として親和性が低下していた。このように、Y6Wの置換は、 k_a 値と k_d 値の両方に大きく影響を与えるアミノ酸置換であることが示された。

20

【 0 1 1 8 】

GFc-C35-3/15（D3R, T5A, T7H, N8R, N10E, T15S）の親和性は、147nMであり、元のGFc-C35-3/15ペプチドに比べ上昇した。しかしながら、GFc-C35-3/15（T5A, T7H, N8R, N10E）と比較すると親和性は低下した。

【 0 1 1 9 】

上記検討により、元のペプチドであるGFc-C35-3/15よりも約2400倍の親和性を有するGFc-C35-3/15（T5A, T7H, N8R, N10E）が得られた。この最も高い親和性を示したペプチドを以下C35A-3/15と称する。

30

【 0 1 2 0 】

表 5 の結果よりGFc-C35の配列のうち、両端から1つずつ（GFc-C35-2/15）、または2つずつ削ったペプチド（GFc-C35-3/15）のKd値は、GFc-C35に比べ、その親和性は低下しており、両端の残基（1, 2, 16, 17位）の結合への寄与が明らかとなった。そこで、両端の2残基の親和性への寄与を評価した。最も高い親和性を示したC35A-3/15に対して、1位にGly、2位にPro、16位にPhe、17位にHisを加えたペプチド（C35A）を合成し、親和性解析を行った。

【 0 1 2 1 】

これら4残基のアミノ酸付加による効果を確認するため、C35A-3/15（D3R, T15S）についても1位にGly、2位にPro、16位にPhe、17位にHisを加えたペプチド（C35A（D3R, T15S））を合成し、親和性解析を行った。なお、C35A-3/15（D3R, T15S）は表 6 におけるGFc-C35-3/15（D3R, T5A, T7H, N8R, N10E, T15S）と同様の配列である。

40

【 0 1 2 2 】

結果を表 7 に示す。

【表 7】

ペプチド	配列		Kd (μM)
C35A-3/15	DCAYHRGELVWCT	配列番号 55	0.054
C35A	GPDCAYHRGELVWCTFH	配列番号 56	0.009
C35A-3/15 (D3R, T15S)	RCAYHRGELVWCS	配列番号 57	0.147
C35A (D3R, T15S)	GPRCAYHRGELVWCSFH	配列番号 58	0.042

【 0 1 2 3 】

C35A-3/15の配列の両端にGly、Pro、Phe、Hisを導入したペプチド (C35A) では、元の配列と比較して親和性の向上がみられた (Kd値で約5分の1)。また、C35A-3/15 (D3R, T15S) の配列の両端に同様のアミノ酸を導入したペプチド (C35A (D3R, T15S)) でも、元の配列と比較して親和性が向上した (Kd値で約3分の1)。

10

【 0 1 2 4 】

2種類のペプチドにおいて、両端の2残基 (1、2、16、17位) の導入により親和性の向上が認められたことから、Cys残基の外部配列もヒトIgGに対する親和性に寄与していることが示された。すなわち、Cys残基の外部配列の最適化によって、より高い親和性を有する配列を得る可能性が示唆された。そこで、2つのCys残基間の内側の配列を固定化し、Cys残基の外側のアミノ酸についてXYZの混合ヌクレオチドによってランダム化したライブラリ (Lib-D、図6) を構築し、バイオパンニングによって得られたペプチドの配列から、結合に優れたアミノ酸の特性を評価した。

20

【 0 1 2 5 】

すなわち、 5×10^{11} pfuのT7ファージライブラリ (X_3 CAYHRGELVWCX₃) 溶液を、RNAse (Ribonuclease A from bovine pancreas, SIGMA) をコート (4 μg/400 μl/well) し、0.5% BSAでブロッキングした96穴マイクロプレート (Nunc, Maxisorp) のウェルに加え、1時間反応させた (吸収ステップ1)。その上清を、次に、HSA (Human serum albumin, SIGMA) をコート (4 μg/400 μl/well) し、0.5% BSAでブロッキングした96穴マイクロプレート (Nunc, Maxisorp) のウェルに加え、1時間反応させた (吸収ステップ2)。その後、その上清を、ヒトIgG1 (モノクローナル、中外製薬株式会社) をコート (1 μg/200 μl/well) し、0.5% BSAでブロッキングしたウェルに移し、1時間反応を行った (結合ステップ) 。上清のファージ溶液を除いた後、0.1% Tweenを含むPBSで3回ウェルを洗浄した (洗浄ステップ) 。大腸菌BLT5403 (Novagen) の培養液 (200 μl) を加えて感染させ、10mlの大腸菌培養液と一緒に37 °Cにて、増殖、溶菌するまでインキュベートした (増殖ステップ) 。溶菌後の培養液から定法に従い、ポリエチレングリコールによるファージ沈殿法によってファージを回収した。得られたファージは、PBSに溶解させ、次のパンニングに用いた。上記を含め7回のパンニングを行うことによって、IgG特異的なファージを濃縮した。ただし、2~7回目のパンニングでは、ステップを追うごとに洗浄回数を増やし最大30回行った。また、6~7回目のパンニングにおいて吸収ステップは行っていない。7回目のパンニング後ファージを単クローン化し、ELISAによってヒトIgGに対する結合特異性を評価した。評価したファージの内、ヒトIgGに対し、高い結合活性を示したクローンについて、提示されたペプチド配列を解析した。その結果を表8に示す。

30

40

【表 8】

クローン名	配列	
1-14	NDTCAYHRGELVWCTYS	配列番号 59
1-15	SDSCAYHRGELVWCDGY	配列番号 60
1-16	VDSCAYHRGELVWCSNY	配列番号 61
1-23	SAECAYHRGELVWCSVF	配列番号 62
1-27	FNDCAVHRGELVWCSGY	配列番号 63
1-36	HETCAVHRGELVWCDHH	配列番号 64
1-38	SYECAVHRGELVWCSTY	配列番号 65
1-55	SGNCAVHRGELVWCNFL	配列番号 66
2-1	SGDCAVHRGELVWC SYH	配列番号 67
2-17	LSSCAVHRGELVWC SHF	配列番号 68
2-18	FSDCAVHRGELVWC GHF	配列番号 69
2-25	GDPCA VHRGELVWC SNF	配列番号 70
2-33	DVYCAVHRGELVWCNGD	配列番号 71
2-36	GHSCAVHRGELVWC SHM	配列番号 72
2-38	RGQCAVHRGELVWC SHY	配列番号 73
2-71	EFNCAVHRGELVWC TDY	配列番号 74
2-72	GRSCAVHRGELVWC STF	配列番号 75
2-80	TARCAVHRGELVWC EDM	配列番号 76

10

20

【 0 1 2 6 】

得られたペプチド配列を基に、各サイトで見られたアミノ酸の出現頻度を図 7 に示す。

【 0 1 2 7 】

N末側の 1 位ではSerが優位であり、元の配列 (C35A) のGlyの出現頻度は2番目に高かった。2 位ではAsp、Glyが優位に出現した。3 位ではSer残基の出現が優位であり、元の配列で見られたAspの出現頻度は2番目に高かった。C末側の 1 5 位ではSerの出現頻度が顕著に高かった。1 6 位ではHis、Glyの出現頻度が高かった。1 7 位ではTyrが優位に出現し、芳香環を有するTyr、Pheの出現が優位であった。これらの結果は 2 つのCys残基の外部配列にこれらのアミノ酸を導入することで、ヒトIgGに対しより高い親和性を有するペプチドをデザインできる可能性を示すものである。

30

【 0 1 2 8 】

上記の検討を基に、各サイトで高い頻度で見られたアミノ酸の導入の効果を、合成ペプチドを用いて評価、検証を行うこととした。

【 0 1 2 9 】

C 3 5 A の合成ペプチドを基準にして、アミノ酸変異導入により、上記ファージライブラリにて高い頻度で観察されたアミノ酸に置換したペプチドを合成し、上記と同様に表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析によりヒトIgGに対する結合解析を行い、各アミノ酸置換の親和性に対する寄与を評価した。結果を以下の表 9 に示す。

40

【表 9】

ペプチド	配列		Kd (μM)
C35A (G1S)	SPDCAYHRGELVWCTFH	配列番号 100	0.0093
C35A (P2D)	GDDCAYHRGELVWCTFH	配列番号 101	0.0133
C35A (D3S)	GPSCAYHRGELVWCTFH	配列番号 102	0.0285
C35A (T15S)	GPDCAYHRGELVWCSFH	配列番号 103	0.0144
C35A (F16H)	GPDCAYHRGELVWCTHH	配列番号 104	0.0114
C35A (H17Y)	GPDCAYHRGELVWCTFY	配列番号 105	0.012
C35A (G1S, H17Y)	SPDCAYHRGELVWCTFY	配列番号 106	0.011
C35A (P2D, H17Y)	SDDCAYHRGELVWCTFY	配列番号 107	0.013

10

【 0 1 3 0 】

得られたIgG結合性ペプチドの有用性を確認するために、IgG結合性ペプチドを固定化したカラムを用いて、ヒト血清からのIgGの精製を行った。IgG結合性ペプチドを固定化したカラムは以下の方法によって作製した。

【 0 1 3 1 】

1mM HCl (5mL)にて平衡化したHiTrap NHS-activated HPカラム (1ml, GE Healthcare) に、ペプチド溶液 (4.0 mgのN末端をPEG化したC35A-3/15 (NH₂-PEG4-DCAYHRGELVWCT-NH₂) 4mgを0.05M 炭酸緩衝液 (pH8.3) 1.1mLに溶解したもの (濃度1.5mM)) 1mLを加え、室温で30分間固定化した。その後、1M Tris (1mL)で洗浄し、1M Tris (2mL)を加えて室温で30分間ブロッキングした。PBS (6mL) で3回、続いてPBS (1mL) で1回洗浄した。上記操作により、固定化量1.2 μmolのペプチド固定化カラムを作製した。

20

【 0 1 3 2 】

Profiniaタンパク質精製システム (BIO RAD) に得られたペプチド固定化カラム (1.2 μmol) を使用し、ヒト血清 (1mL) を5倍希釈したPBS溶液 (5mL) をペプチド固定化カラムにアプライした。PBSにてカラムを洗浄後、0.1M グリシン塩酸 (pH2.5) にてステップワイズ溶出を行った。カラムからのタンパク質の溶出は、280nmの吸光度で追跡した。

【 0 1 3 3 】

結果を図 8 に示す。

30

【 0 1 3 4 】

溶出画分の溶液 (画分D, 5mL) の吸光度の測定結果より、タンパク質の回収量は10.4mgであることが確認された。

【 0 1 3 5 】

図 8 に示される溶出画分Dについて、SDS-PAGE (還元処理) を従来公知の手法に従ってIgGの確認を行った。即ち、溶出画分Dを2-メルカプトエタノールにより還元処理を行った後、4~20%ポリアクリルアミドグラジェントゲル (ミニプロティアンTGXゲル; BioRad) 上で電気泳動を行い、Gelcode Blue Regentにて染色させた。結果、IgGの軽鎖 (L鎖) 及び重鎖 (H鎖) を示す25kDa付近及び50kDa付近のきれいなバンドが確認された (図 9 のレーン 5)。ただし、レーン 1, 2, 3, 4 は分子量マーカー、標品のヒトIgG, HSA, ヒト血清のサンプルを示す。

40

【 0 1 3 6 】

このことから、IgG結合性ペプチドを固定化したカラムは、ヒトIgG精製用のアフィニティカラムとして利用できることが明らかとなった。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 3 7 】

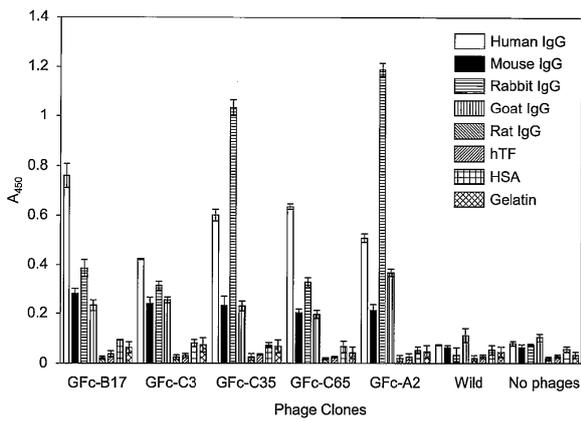
本発明は、ヒトIgGと特異的又は選択的に結合可能なペプチドを提供するものであり、これによって、抗体医薬としてのIgGの製造におけるIgGの精製のために、またIgGの分析のために産業上有用である。

50

【 0 1 3 8 】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【 図 1 】



【 図 2 】

(A)

	2	5	10	15
Lib-A	XXC	XXXXG	XLVWC	TXX

(B)

4-3	REC	AFWRG	RLVWC	TFT	配列番号77
4-4	RRC	AWHMG	NLVWC	TLQ	配列番号78
4-6, 34	SSC	SFWRG	RLVWC	TSL	配列番号79
4-12	LGC	SWHRG	ELVWC	TRL	配列番号80
4-16	EVC	SWWRG	RLVWC	TGL	配列番号81
4-26	QRC	AWHLG	SLVWC	TMM	配列番号82
4-28	REC	TWHLG	ELVWC	TGY	配列番号83
4-41	PGC	TFHLG	NLVWC	TFA	配列番号84
4-43	GDC	TYWRG	RLVWC	TLK	配列番号85
Beads4	DSC	SWSFG	RLVWC	TQF	配列番号86
Beads12	DWC	SWSRG	ALVWC	TDR	配列番号87
Beads16	PVC	AYSRG	MLVWC	TRA	配列番号88
Beads20	SVC	AVHLG	DLVWC	TVT	配列番号89
Beads21	LYC	SRHMG	RLVWC	TAG	配列番号90
Beads23	RSC	SYSRG	RLVWC	TRW	配列番号91
Beads27	FSC	SSHLG	VLVWC	TPM	配列番号92
Beads28	GSC	RWHRG	RLVWC	TGF	配列番号93
Beads35	QGC	TWHMG	RLVWC	TTG	配列番号94
Beads37	GSC	SWHMG	KLVWC	TDM	配列番号95
	S	SWHR	R		
	V	AFSL	E		
	E	TYWM	N		
	R				

【 図 3 】

Lib-B

Number	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
DNA	5'-	GAT	TGT	DCY	TDS	NRS	WKS	GGT	VAS	TDS	RYY	YDS	TGT	ACT	-3'
		D	C	A	W	H	L	G	N	L	V	W	C	T	
		T	Y	W	M	D	F	I	H						
		S	F	S	R	E	Y	T	F						
		L	D	F	Q	W	A	Y							
		C	Q	C	H	C	L								
		*	Y	W	K	*	Q								
		C	I		R										
		R	S		C										
		N			*										
		K													
		G													
		E													
		*													

*は終始コドンを含む事を示す。

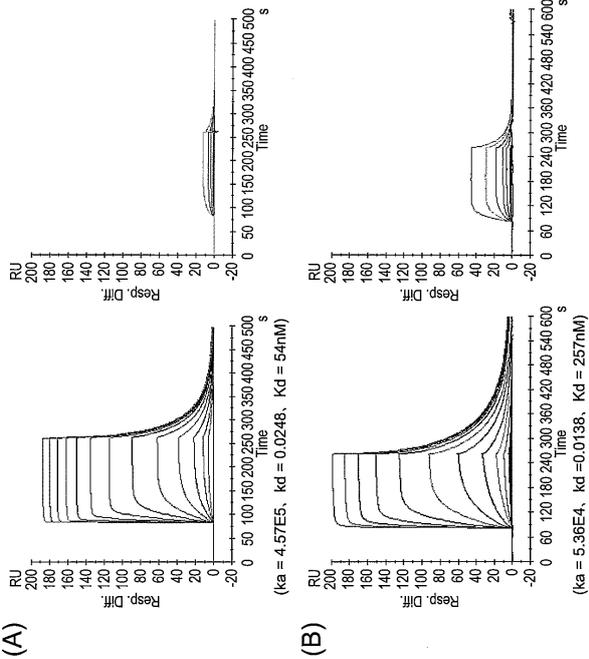
【 図 4 】

Lib-C

Number	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
DNA	5'-	NNK	RRN	TGT	DCY	YAH	YKS	GGT	YRW	WTS	RBV	YDS	TGT	RBV	NNK	NNK	-3'
		X	D	C	A	W	H	L	G	R	L	V	W	C	T	X	X
		E	T	Y	Y	F	N	F	I	H	S						
		S	S	F	Q	R	E	I	T	F	V						
		R	L	*	C	D	M	S	Y	I							
		N	C	W	H	G	L	A									
		K	*		K	A	C	G									
		G			S	R											
					Q	Q											
					G	*											

*は終始コドンを含む事を示す。

【 図 5 】



【 図 6 】

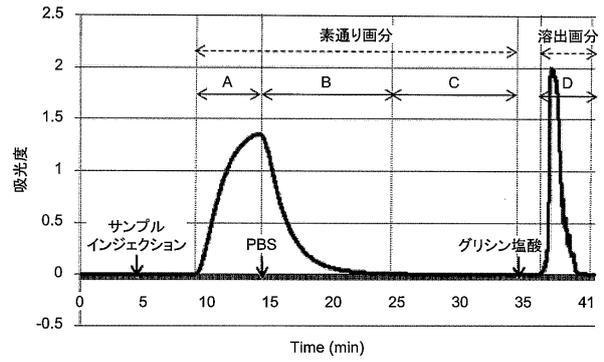
Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Amino acid	X	X	X	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	X	X	X
DNA	NNW	NNW	NNW	TGT	GCA	TAC	CAT	CGG	GGA	GAA	TTG	GTT	TGG	TGT	NNW	NNW	NNW
	XYZ	XYZ	XYZ	TGT	GCA	TAC	CAT	CGG	GGA	GAA	TTG	GTT	TGG	TGT	XYZ	XYZ	XYZ

X, Y, Zは以下の比率の混合スケレオチド
 X: G 38%, A 19%, T 26%, C 17%
 Y: G 31%, A 34%, T 17%, C 18%
 Z: G 24%, C 76%

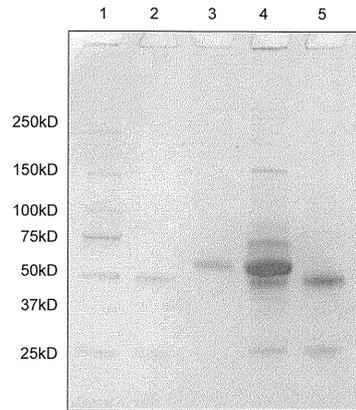
【 図 7 】

GFC-C35	G	P	D	C	T	Y	T	N	G	N	L	V	W	C	T	F	H	配列番号4
C35A-3/15	D	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T	S28	S56	H28	Y33	配列番号52
アミノ酸の 出現頻度	G17	G17	D17	F11	S11	T11	H6	A11	N11	N6	N6	E11	V6	Y6	P6	D11	S6	
	L6	E6	Y6	L6	V6	Q6	R6	H6	R6	E6	F6	F6	D6	V6				
	T6	R6																

【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

0005994068000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 0 7 K	7/64	(2006.01)	C 0 7 K	7/64	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
G 0 1 N	30/88	(2006.01)	G 0 1 N	30/88	J
			G 0 1 N	30/88	2 0 1 R

(56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0087765 (US, A1)
 国際公開第2005/086947 (WO, A2)
 特表2003-518075 (JP, A)
 国際公開第2008/054030 (WO, A1)
 特表2003-505108 (JP, A)
 国際公開第01/002001 (WO, A1)
 J. Biol. Chem., 2009年, Vol.284, No.15, pp.9986-9993
 第10回日本蛋白質科学会年会 プログラム・要旨集, 2010年 5月15日, p.136
 生物物理, 2008年, Vol.48, No.5, pp.294-298
 Peptide Science, 2008年, Vol.14, Issue 8 Supplement, p.141
 Proteins, 2002年, Vol.48, pp.539-557
 Science, 2000年, Vol.287, pp.1279-1283
 Analytical Biochemistry, 2008年, Vol.374, pp.99-105
 Journal of Proteome Research, 2005年, Vol.4, pp.2250-2256

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 7 / 0 8
 C 0 7 K 1 / 2 2
 C 0 7 K 7 / 6 4
 C 0 7 K 1 7 / 0 0
 C 0 7 K 1 9 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 9
 G 0 1 N 3 0 / 8 8
 G 0 1 N 3 3 / 5 3
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CPlus/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)
 UniProt/GeneSeq