

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/092867

発行日 令和1年11月7日(2019.11.7)

(43) 国際公開日 平成30年5月24日(2018.5.24)

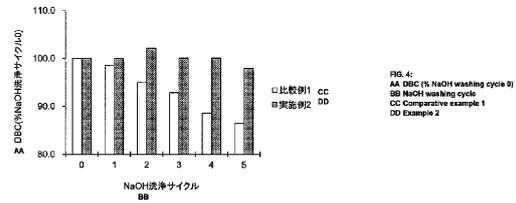
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C07K 7/04 (2006.01)</b>	C O 7 K 7/04 Z N A	4 H O 4 5
<b>C07K 17/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 17/00	
<b>C07K 1/22 (2006.01)</b>	C O 7 K 1/22	
<b>C07K 16/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/00	
<b>B01J 20/281 (2006.01)</b>	B O 1 J 20/281 R	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2018-551692 (P2018-551692)	(71) 出願人 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
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/041404	
(22) 国際出願日 平成29年11月17日(2017.11.17)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-225483 (P2016-225483)	(71) 出願人 000002901 株式会社ダイセル 大阪府大阪市北区大深町3番1号
(32) 優先日 平成28年11月18日(2016.11.18)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(74) 代理人 110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
	(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
	(72) 発明者 内村 誠一 兵庫県姫路市網干区新在家1239 株式会社ダイセル内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IgG結合ペプチドを含む固相担体及びIgGの分離方法

(57) 【要約】

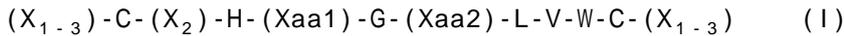
本発明は、IgG精製のために用いることができ、かつ安定性、例えばアルカリ安定性に優れたIgG結合ペプチドを提供すること等を課題とする。また、本発明は、上記IgG結合ペプチドを用いてIgGを精製する方法等を提供することを課題とする。具体的には、本発明は、IgG結合ペプチドを含む固相担体、該固相担体を含むIgG分離用カラム、該固相担体又はカラムを含むキット、及び該固相担体又はカラムを用いるIgGの精製方法等に関する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトIgGと結合可能であることを特徴とするペプチドを固定化した固相担体であって、前記ペプチドが、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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa2はグルタミン酸残基又はアスパラギン残基であり、

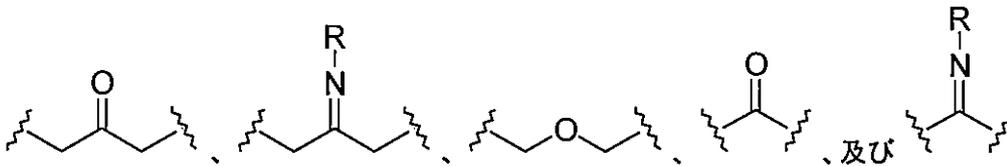
Lはロイシン残基であり、

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、かつ前記ペプチドの外側の2つのシステイン残基中のスルフィド基が、以下の式：

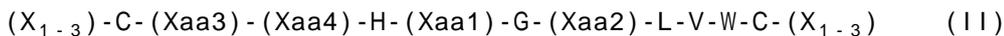
## 【化 1】



で表されるリンカーからなる群より選択されるリンカーにより連結されており、ここでRは、置換された若しくは置換されていないC1~C6アルキルである、固相担体。

## 【請求項 2】

前記ペプチドが、下記の式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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa2はグルタミン酸残基又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、

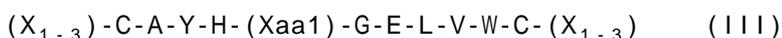
Xaa3はアラニン残基、セリン残基又はトレオニン残基であり、かつ

Xaa4はチロシン残基又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む、請求項 1 に記載の固相担体。

## 【請求項 3】

前記ペプチドが、下記の式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、

10

20

30

40

50

Hはヒスチジン残基であり、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

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む、請求項1又は2に記載の固相担体。

10

【請求項4】

17アミノ酸残基とした場合の、前記ペプチドの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、ホモシステイン、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、ホモシステイン、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1~3のいずれか一項に記載の固相担体。

20

【請求項5】

前記ペプチドが、以下の1)~14)のいずれかのアミノ酸配列からなる、ただし、Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、Xaa2はホモシステインである、請求項4に記載の固相担体：

1) DCAYH(Xaa1)GELVWCT (配列番号1)

2) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号2)

3) RCAYH(Xaa1)GELVWCS (配列番号3)

4) GPRCAYH(Xaa1)GELVWCSFH (配列番号4)

5) SPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号5)

6) GDDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号6)

7) GPSCAYH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号7)

8) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCSFH (配列番号8)

9) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTHH (配列番号9)

10) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFY (配列番号10)

11) SPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFY (配列番号11)

12) SDDCAYH(Xaa1)GELVWCTFY (配列番号12)

13) RGNCAH(Xaa1)GQLVWCTYH (配列番号13)

14) G(Xaa2)DCAYH(Xaa1)GELVWCT(Xaa2)H (配列番号14)。

30

【請求項6】

前記ペプチドが、下記の式IV：

40

D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa2はグルタミン酸残基又はアスパラギン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

50

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、  
 Xaa3はアラニン残基又はトレオニン残基であり、かつ、  
 Xaa4はチロシン残基又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む、請求項1又は2に記載の固相担体。

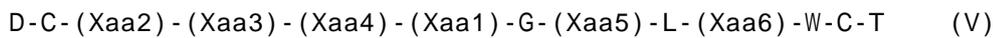
【請求項7】

前記ペプチドが、以下の1)~4)のいずれかのアミノ酸配列からなる、ただし、Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体である、請求項6に記載の固相担体：

- 1) DCTYH(Xaa1)GNLVWCT (配列番号15)
- 2) DCAYH(Xaa1)GNLVWCT (配列番号16)
- 3) DCTYH(Xaa1)GELVWCT (配列番号17)
- 4) DCAWH(Xaa1)GELVWCT (配列番号18)。

【請求項8】

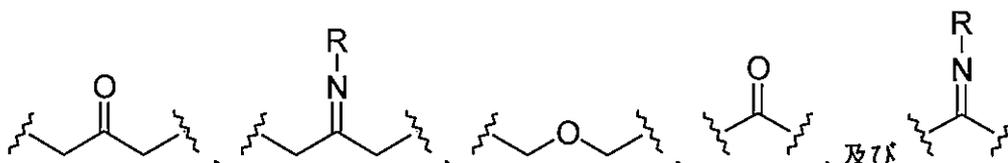
ヒトIgGと結合可能であることを特徴とするペプチドを固定化した固相担体であって、前記ペプチドが、下記の式V：



(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はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、  
 Xaa2はアラニン残基、セリン残基又はトレオニン残基であり、  
 Xaa3はトリプトファン残基又はチロシン残基であり、  
 Xaa4はヒスチジン残基、アルギニン残基、セリン残基又はトレオニン残基であり、  
 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、又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又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、かつ前記ペプチドの外側の2つのシステイン残基中のスルフィド基が、以下の式：

【化2】



で表されるリンカーからなる群より選択されるリンカーにより連結されており、ここでRは、置換された若しくは置換されていないC1~C6アルキルである、固相担体。

【請求項9】

Xaa1がアルギニン残基、リシン残基若しくはそのアシル化誘導体、又はロイシン残基である、請求項1~8のいずれか一項に記載の固相担体。

【請求項10】

前記ペプチドが、以下のアミノ酸配列からなる、請求項1に記載の固相担体：

GPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号31)。

【請求項 1 1】  
前記リンカーが、  
【化 3】



で表されるリンカーである、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の固相担体。

【請求項 1 2】  
前記ペプチドのN末端がPEG化されている、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の固相担体。 10

【請求項 1 3】  
前記ペプチドのC末端がアミド化されている、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の固相担体。

【請求項 1 4】  
前記ペプチドが多量体化されている、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の固相担体。

【請求項 1 5】  
前記ペプチドの多量体が、該ペプチド間にスペーサーを有する、請求項 1 4 に記載の固相担体。 20

【請求項 1 6】  
前記ペプチドと固相の間にスペーサーを有する、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の固相担体。

【請求項 1 7】  
請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の固相担体を含む、IgG分離用カラム。

【請求項 1 8】  
請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の固相担体又は請求項 1 7 に記載のIgG分離用カラムを含む、IgGの精製のためのキット。

【請求項 1 9】  
請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の固相担体又は請求項 1 7 に記載のIgG分離用カラムにIgGを結合させる工程、及び結合したIgGを溶出させてIgGを回収する工程を含む、IgGの精製方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、IgG結合ペプチドを含む固相担体、該固相担体を含むIgG分離用カラム、該固相担体又はカラムを含むキット、及び該固相担体又はカラムを用いるIgGの精製方法等に関する。

【背景技術】 40

【0002】

IgG抗体は、現在最も注目されているバイオ医薬品の1つである。近年、IgG抗体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。抗体の精製にはプロテインAカラムが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。

【0003】

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 50

る。IgGのような医薬品の精製に用いるアフィニティーリガンドとしては、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る要因になっている。このため、プロテインAに代わる新たなアフィニティーカラムの開発が期待されている。

【0004】

本発明者らは、これまでにジスルフィド結合で環化された特定の配列を含むペプチドリガンドによりIgGを精製し得ることを報告しているが（特許文献1）、本ペプチドリガンドは、アルカリ溶液洗浄の繰り返しにより、親和性が低下するという問題を抱えていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】W02013/027796

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、IgG精製のために用いることができ、かつ安定性、例えばアルカリ安定性に優れたIgG結合ペプチドを提供すること等を課題とする。また、本発明は、上記IgG結合ペプチドを用いてIgGを精製する方法等を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

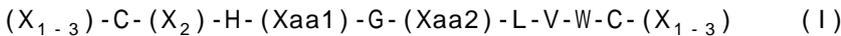
本発明者は、ペプチド中のシステイン残基におけるスルフィド基を、特定の構造を有するリンカーによって架橋することにより、ペプチドの安定性が顕著に改善することを見出し、本願発明を完成させた。

【0008】

したがって、本発明は、以下の態様を包含する。

(1) ヒトIgGと結合可能であることを特徴とするペプチドを固定化した固相担体であって、

前記ペプチドが、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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa2はグルタミン酸残基又はアスパラギン残基であり、

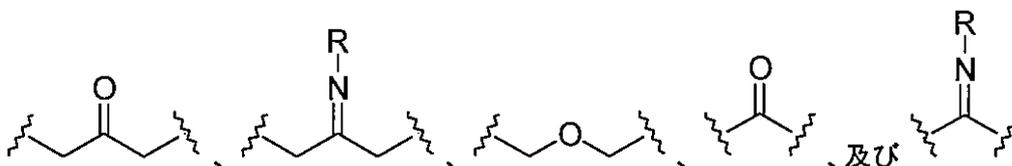
Lはロイシン残基であり、

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、かつ前記ペプチドの外側の2つのシステイン残基中のスルフィド基が、以下の式：

【化1】



で表されるリンカーからなる群より選択されるリンカーにより連結されており、ここでR

10

20

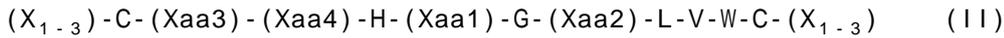
30

40

50

は、置換された若しくは置換されていないC1～C6アルキルである、固相担体。

(2) 前記ペプチドが、下記の式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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa2はグルタミン酸残基又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、

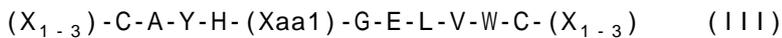
Wはトリプトファン残基であり、

Xaa3はアラニン残基、セリン残基又はトレオニン残基であり、かつ

Xaa4はチロシン残基又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む、(1)に記載の固相担体。

(3) 前記ペプチドが、下記の式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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

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む、(1)又は(2)に記載の固相担体。

(4) 17アミノ酸残基とした場合の、前記ペプチドの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、ホモシステイン、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、ホモシステイン、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)のいずれかに記載の固相担体。

(5) 前記ペプチドが、以下の1)～14)のいずれかのアミノ酸配列からなる、ただし、Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、Xaa2はホモシステインである、(4)に記載の固相担体:

1) DCAYH(Xaa1)GELVWCT (配列番号1)

2) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号2)

3) RCAYH(Xaa1)GELVWCS (配列番号3)

4) GPRCAYH(Xaa1)GELVWCSFH (配列番号4)

5) SPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号5)

10

20

30

40

50

- 6 ) GDDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH ( 配列番号 6 )  
 7 ) GPSCAYH(Xaa1)GELVWCTFH ( 配列番号 7 )  
 8 ) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCSFH ( 配列番号 8 )  
 9 ) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTHH ( 配列番号 9 )  
 1 0 ) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFY ( 配列番号 1 0 )  
 1 1 ) SPDCAHYH(Xaa1)GELVWCTFY ( 配列番号 1 1 )  
 1 2 ) SDDCAYH(Xaa1)GELVWCTFY ( 配列番号 1 2 )  
 1 3 ) RGNCAHYH(Xaa1)GQLVWCTYH ( 配列番号 1 3 )  
 1 4 ) G(Xaa2)DCAYH(Xaa1)GELVWCT(Xaa2)H ( 配列番号 1 4 )。

( 6 ) 前記ペプチドが、下記の式 IV :

10

D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa2はグルタミン酸残基又はアスパラギン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

20

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、

Xaa3はアラニン残基又はトレオニン残基であり、かつ、

Xaa4はチロシン残基又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む、(1)又は(2)に記載の固相担体。

(7) 前記ペプチドが、以下の1)~4)のいずれかのアミノ酸配列からなる、ただし、Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体である、(6)に記載の固相担体 :

30

1 ) DCTYH(Xaa1)GNLVWCT ( 配列番号 1 5 )

2 ) DCAYH(Xaa1)GNLVWCT ( 配列番号 1 6 )

3 ) DCTYH(Xaa1)GELVWCT ( 配列番号 1 7 )

4 ) DCAWH(Xaa1)GELVWCT ( 配列番号 1 8 )。

【 0 0 0 9 】

(8) ヒトIgGと結合可能であることを特徴とするペプチドを固定化した固相担体であって、

前記ペプチドが、下記の式V :

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

(式中、

Dはアスパラギン酸残基であり、

40

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はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

Xaa2はアラニン残基、セリン残基又はトレオニン残基であり、

Xaa3はトリプトファン残基又はチロシン残基であり、

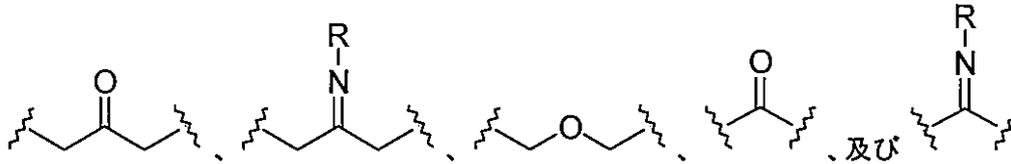
Xaa4はヒスチジン残基、アルギニン残基、セリン残基又はトレオニン残基であり、

50

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、又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又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、かつ前記ペプチドの外側の2つのシステイン残基中のスルフィド基が、以下の式：

【化2】



10

で表されるリンカーからなる群より選択されるリンカーにより連結されており、ここでRは、置換された若しくは置換されていないC1~C6アルキルである、固相担体。

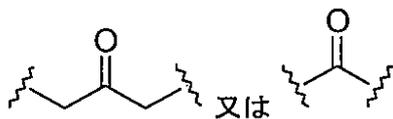
(9) Xaa1がアルギニン残基、リシン残基若しくはそのアシル化誘導体、又はロイシン残基である、(1)~(8)のいずれかに記載の固相担体。

(10) 前記ペプチドが、以下のアミノ酸配列からなる、(1)に記載の固相担体：

GPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号31)。

(11) 前記リンカーが、以下の式：

【化3】



20

で表されるリンカーである、(1)~(10)のいずれかに記載の固相担体。

(12) 前記ペプチドのN末端がPEG化されている、(1)~(11)のいずれかに記載の固相担体。

(13) 前記ペプチドのC末端がアミド化されている、(1)~(12)のいずれかに記載の固相担体。

(14) 前記ペプチドが多量体化されている、(1)~(13)のいずれかに記載の固相担体。

30

(15) 前記ペプチドの多量体が、該ペプチド間にスペーサーを有する、(14)に記載の固相担体。

(16) 前記ペプチドと固相間にスペーサーを有する、(1)~(15)のいずれかに記載の固相担体。

(17) (1)~(16)のいずれかに記載の固相担体を含む、IgG分離用カラム。

(18) (1)~(16)のいずれかに記載の固相担体又は(17)に記載のIgG分離用カラムを含む、IgGの精製のためのキット。

(19) (1)~(16)のいずれかに記載の固相担体、又は(17)に記載のIgG分離用カラムにIgGを結合させる工程、及び

結合したIgGを溶出させてIgGを回収する工程を含む、IgGの精製方法。

40

【0010】

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2016-225483号の開示内容を包含する。

【発明の効果】

【0011】

本発明の固相担体に含まれるペプチドは、システイン残基におけるスルフィド基を、特定の構造を有するリンカーによって架橋することによって、安定性が改善されている。したがって、本発明の固相担体は、アルカリ洗浄工程等によってIgG結合能が低減されにくいため、効率的なIgG精製に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

50

## 【0012】

【図1】図1は、実施例3で作製したペプチド固定化カラムにヒト血清由来  $\gamma$ -グロブリン(Wako)を吸着させ、酸性の溶出溶液(20 mM クエン酸, pH2.5)を用いて溶出した場合の結果を示す。横軸は、溶出液の体積を、縦軸は280nmの吸光度により測定されるタンパク質濃度を示す。

【図2】図2は、実施例3で作製したペプチド固定化カラムから、クエン酸又はIgG結合ペプチドによりタンパク質を溶出させ、0.5 mL分画した各フラクションのSDS-PAGEの結果を示す。タンパク質の検出は、CBB染色で行った。

【図3】図3はペプチド固定化量の異なる3種(1 mg、4 mg、10 mg)のカラムを吸着溶液で平衡化した後、吸着溶液に溶解した1 mg/mLヒト血清由来  $\gamma$ -グロブリンを1 mL/min (滞留時間1 min)の流速で送液した際のDBCの測定結果を示す。DBCは、280 nm吸光度において、非吸着成分を除いた値がサンプル全体の吸光度の10%に到達するまでに送液されたサンプル量から求めた。

【図4】図4は、実施例2で調製したリンカーにより架橋されたIgG結合ペプチド、及び比較例1で調製したジスルフィドにより架橋されたIgG結合ペプチドの、水酸化ナトリウム処理時のDBCの測定結果を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0013】

## &lt; IgG結合ペプチドを含む固相担体 &gt;

一態様において、本発明は、IgG結合ペプチドを含む固相担体に関する。本明細書における「固相担体」としては、限定するものではないが、ガラスビーズ、シリカゲル等の無機担体、架橋ポリビニルアルコール、架橋ポリアクリレート、架橋ポリアクリルアミド、架橋ポリスチレン等の合成高分子や結晶性セルロース、架橋セルロース、架橋アガロース、架橋デキストラン等の多糖類からなる有機担体、さらにはこれらの組み合わせによって得られる有機-有機、有機-無機等の複合担体等が挙げられるが、中でも親水性担体は非特異吸着が比較的少なく、IgG結合ペプチドの選択性が良好であるため好ましい。ここでいう親水性担体とは、担体を構成する化合物を平板状にしたときの水との接触角が60度以下の担体を示す。このような担体としてはセルロース、キトサン、デキストラン等の多糖類、ポリビニルアルコール、エチレン-酢酸ビニル共重合体けん化物、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリアクリル酸グラフト化ポリエチレン、ポリアクリルアミドグラフト化ポリエチレン、ガラス等からなる担体が代表例として挙げられる。

## 【0014】

固相担体の形態としては、ビーズ状、線維状、粒子条、膜状(中空系も含む)、ゲル状等いずれも可能であり、任意の形態を選ぶことができる。特定の排除限界分子量を持つ担体作製の容易さからビーズ状が特に好ましく用いられる。ビーズ状の平均粒径は10~2500  $\mu\text{m}$ のものが使いやすく、とりわけ、IgG結合ペプチド固定化反応のしやすさの点から25  $\mu\text{m}$ から800  $\mu\text{m}$ の範囲が好ましい。固相担体としては、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、シリカゲルビーズ、及び多糖類ビーズ等が挙げられる。

## 【0015】

さらに固相担体表面には、IgG結合ペプチドの固定化反応に用いる官能基が存在しているとIgG結合ペプチドの固定化に好都合である。これらの官能基の代表例としては、水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、チオール基、シラノール基、エポキシ基、スクシンイミド基、N-ヒドロキシスクシンイミド基等、酸無水物基、ヨードアセチル基等が挙げられる。

## 【0016】

固相担体としては、市販品を用いることもできる。市販品としては、多孔質セルロースゲルであるGCL2000、GC700、アリルデキストランとメチレンビスアクリルアミドを共有結合で架橋したSephacryl S-1000、アクリレート系の担体であるToyopearl、アガロース系

の架橋担体であるSepharoseCL4B、エポキシ基で活性化されたポリメタクリルアミドであるオイパーギットC250L、NHS基で活性化されたセファロース担体を含むNHS活性化プレパックカラム等を例示することができる。ただし、本実施態様においてはこれらの担体、活性化担体のみに限定されるものではない。

【0017】

上述の固相担体はそれぞれ単独で用いてもよいし、任意の2種類以上を混合してもよい。また、固相担体としては、その使用目的及び方法からみて、表面積が大きいことが望ましく、適当な大きさの細孔を多数有する、すなわち、多孔質であることが好ましい。

【0018】

上記固相担体には、本明細書に記載のIgG結合ペプチドが固定化されていることが好ましく、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、例えばIgG結合ペプチドのN末端のアミノ基を、直接又はスペーサーを介して固相担体に共有結合させることによって行うことが好ましい。IgG結合ペプチドの立体障害を小さくすることにより分離効率を向上させ、さらに非特異的な結合を抑えるために、親水性スペーサーを介して固定化することがより好ましい。親水性スペーサーは特に限定しないが、例えば、両末端をカルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等で置換したポリアルキレンオキサイドの誘導体を用いるのが好ましい。

【0019】

上記固相担体へ導入されるIgG結合ペプチド及びスペーサーとして用いられる有機化合物の固定化方法及び条件は特に限定されるものではないが、一般にタンパク質やペプチドを担体に固定化する場合に採用される方法を例示する。例えば、担体をアミノ基を含む化合物、N-ヒドロキシスクシンイミジル基を含む化合物、臭化シアン、エピクロロヒドリン、ジグリシジルエーテル、トシルクロライド、トレシルクロライド、ヒドラジン等と反応させて活性化し（担体が元々持っている官能基よりIgG結合ペプチドが反応しやすい官能基に変え）、IgG結合ペプチドと反応、固定化する方法、また、担体とIgG結合ペプチドが存在する系にカルボジイミドのような縮合試薬、または、グルタルアルデヒドのように分子中に複数の官能基を持つ試薬を加えて縮合、架橋することによる固定化方法が挙げられるが、固相担体の滅菌時または利用時にIgG結合ペプチドが固相担体より容易に脱離しない固定化方法を適用することがより好ましい。

【0020】

本明細書に記載のIgG結合ペプチドを含む固相担体は、クロマトグラフィーカラム等に充填して、ヒトIgGを精製又は分離するために用いることができる。

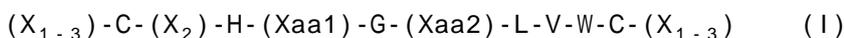
【0021】

本発明の固相担体に含まれ得るIgG結合ペプチドについて、以下詳細に説明する。

本明細書中で使用する「IgG」は、哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジー等の霊長類、ラット、マウス、及びウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物のIgG、好ましくはヒトのIgG（IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4）を指すものとする。本明細書におけるIgGは、さらに好ましくは、ヒトIgG1、IgG2、若しくはIgG4、又はウサギIgGであり、特に好ましくはヒトIgG1、IgG2、又はIgG4である。

【0022】

一態様において、本発明の固相担体に含まれ得るIgG結合ペプチドは、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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

Gはグリシン残基であり、

10

20

30

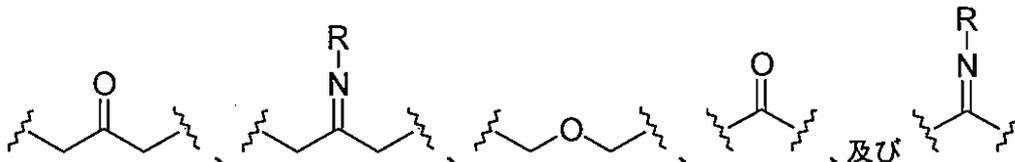
40

50

Xaa2はグルタミン酸残基又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、かつ前記ペプチドの外側の2つのシステイン残基中のスルフィド基が、以下の式：

【化4】



10

で表されるリンカーからなる群より選択されるリンカーにより連結されている。

【0023】

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。

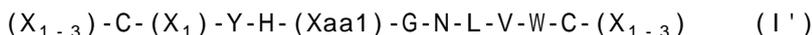
20

【0024】

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'及び式I''で表されるペプチドを以下に示す。

【0025】

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、

30

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

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む。

【0026】

式I''で表されるペプチドは、

40



(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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

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、

50

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む。

【0027】

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。

【0028】

すなわち、式IIで表されるペプチドは、

$(X_{1-3})-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa2はグルタミン酸残基又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、

Xaa3はアラニン残基、セリン残基又はトレオニン残基であり、かつ

Xaa4はチロシン残基又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む。

【0029】

上記の式I'、式I''及び式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。

【0030】

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、式Iのペプチドについて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。

【0031】

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IIIで表されるペプチドを以下に示す。

【0032】

すなわち、式IIIで表されるペプチドは、

$(X_{1-3})-C-A-Y-H-(Xaa1)-G-E-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

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む。

【0033】

10

20

30

40

50

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アミノ酸長からなってもよい。

【0034】

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、ホモシステイン又は、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、ホモシステイン又は、なし、

17番目のアミノ酸残基= Y、F、H、M又は、なし。

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。

【0035】

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IVで表されるペプチドを以下に示す。

【0036】

すなわち、式IVで表されるペプチドは、

D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-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、

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

Gはグリシン残基であり、

Xaa2はグルタミン酸残基又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、

Xaa3はアラニン残基又はトレオニン残基であり、かつ、

Xaa4はチロシン残基又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む。

【0037】

式Iのペプチドの具体例のいくつかを以下の1)~18)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：

1) DCAYH(Xaa1)GELVWCT (配列番号1)、

2) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号2)、

3) RCAYH(Xaa1)GELVWCS (配列番号3)、

4) GPRCAYH(Xaa1)GELVWCSFH (配列番号4)、

5) SPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号5)、

6) GDDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号6)、

7) GPSCAYH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号7)、

8) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCSFH (配列番号8)、

9) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTHH (配列番号9)、

10) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFY (配列番号10)、

10

20

30

40

50

- 1 1 ) SPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFY ( 配列番号 1 1 )、  
 1 2 ) SDDCAYH(Xaa1)GELVWCTFY ( 配列番号 1 2 )、  
 1 3 ) RGNCAHYH(Xaa1)GQLVWCTYH ( 配列番号 1 3 )、  
 1 4 ) G(Xaa2)DCAYH(Xaa1)GELVWCT(Xaa2)H ( 配列番号 1 4 )、  
 1 5 ) DCTYH(Xaa1)GNLVWCT ( 配列番号 1 5 )、  
 1 6 ) DCAYH(Xaa1)GNLVWCT ( 配列番号 1 6 )、  
 1 7 ) DCTYH(Xaa1)GELVWCT ( 配列番号 1 7 )、及び  
 1 8 ) DCAWH(Xaa1)GELVWCT ( 配列番号 1 8 )

( 式中、Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、Xaa2はホモシステインであり、好ましくはホモシステイン同士は互いにジスルフィド結合を形成している )。

10

## 【 0 0 3 8 】

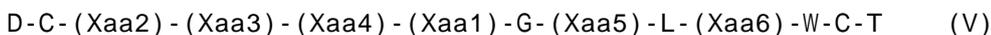
式Iのペプチドの好ましい具体例として、

- 1 ) DCAYH(Xaa1)GELVWCT ( 配列番号 1、但し、Xaa1はR )、  
 2 ) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH ( 配列番号 2、但し、Xaa1はR、L、K又はアセチル化リシン )、及び  
 4 ) GPRCAYH(Xaa1)GELVWCSFH ( 配列番号 4、但し、Xaa1はR )、  
 が挙げられ、特に好ましい例として、GPDCAYHRGELVWCTFH ( 配列番号 3 1 ) が挙げられる。

20

## 【 0 0 3 9 】

また、一態様において、本明細書に記載のIgG結合ペプチドは、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、

30

Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体であり、

Xaa2はアラニン残基、セリン残基又はトレオニン残基であり、

Xaa3はトリプトファン残基又はチロシン残基であり、

Xaa4はヒスチジン残基、アルギニン残基、セリン残基又はトレオニン残基であり、

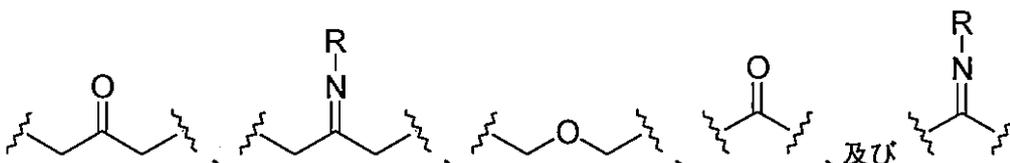
Xaa5はグルタミン酸残基、アスパラギン残基、アルギニン残基、又はアスパラギン酸残基であり、かつ

Xaa6はイソロイシン残基又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、かつ前記ペプチドの外側の2つのシステイン残基中のスルフィド基が、以下の式：

40

## 【 0 0 4 0 】

## 【 化 5 】



で表されるリンカーからなる群より選択されるリンカーにより連結されている。

## 【 0 0 4 1 】

式Vのペプチドの具体例のいくつかを以下の19)~30)に列挙するが、これらに制

50

限されないことはいうまでもない：

- 19) DCTYT(Xaa1)GNLVWCT (配列番号19)、  
 20) DCAYT(Xaa1)GNLVWCT (配列番号20)、  
 21) DCSYT(Xaa1)GNLVWCT (配列番号21)、  
 22) DCTWT(Xaa1)GNLVWCT (配列番号22)、  
 23) DCTYH(Xaa1)GNLVWCT (配列番号23)、  
 24) DCTYR(Xaa1)GNLVWCT (配列番号24)、  
 25) DCTYS(Xaa1)GNLVWCT (配列番号25)、  
 26) DCTYT(Xaa1)GNLVWCT (配列番号26)、  
 27) DCTYT(Xaa1)GELVWCT (配列番号27)、  
 28) DCTYT(Xaa1)GRLVWCT (配列番号28)、  
 29) DCTYT(Xaa1)GDLVWCT (配列番号29)、及び  
 30) DCTYT(Xaa1)GNLIWCT (配列番号30)

(式中、Xaa1はアルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体である)。

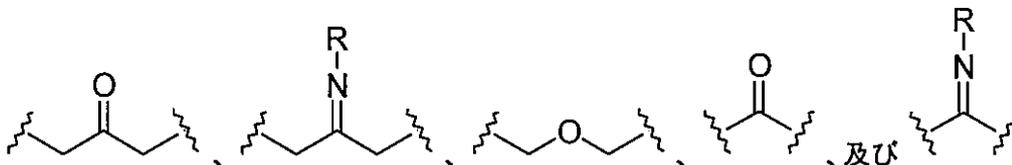
【0042】

上記の通り、本明細書に記載のIgG結合ペプチドにおいて、Xaa1は、アルギニン残基、リシン残基、ロイシン残基、若しくはアスパラギン残基、又はそれらの誘導体、好ましくはアルギニン残基、リシン残基若しくはその誘導体、ロイシン残基若しくはアスパラギン残基、さらに好ましくはアルギニン残基、リシン残基若しくはその誘導体、又はロイシン残基である。本明細書において、誘導体の種類は特に限定しないが、アセチル基又はプロピニル基等のアシル化誘導体(アシル化誘導体は、一般式：R-CO-で表され、式中、Rは炭化水素、好ましくは炭素数1~6のアルキル基である)が挙げられる。誘導体の例として、例えばリシン残基のアミノ基がアシル化、例えばアセチル化された誘導体が挙げられる。

【0043】

前述の通り、本明細書に記載のIgG結合ペプチドは、各アミノ酸配列の中に離間した少なくとも2つのシステイン(C)残基を有し、該システイン残基のスルフィド基が、以下の式：

【化6】



で表されるリンカーからなる群より選択されるリンカーにより連結されていることを特徴としている。

【0044】

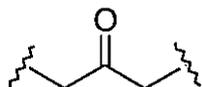
上記IgG結合ペプチドにおけるリンカーは、好ましくは、

【化7】



で表されるリンカー、さらに好ましくは

【化8】



10

20

30

40

50

で表されるリンカーである。

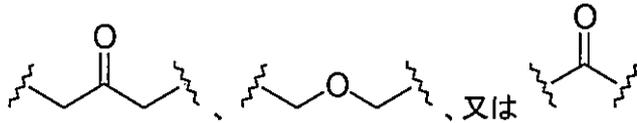
【0045】

上記IgG結合ペプチドにおけるリンカー中のRは、置換された又は置換されていないアルキル、好ましくは置換された又は置換されていないC1~C6アルキル、即ちメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、又はヘキシル基である。Rの置換基は特に限定しないが、例えば、ヒドロキシ基、(モノ若しくはポリ)エチレンオキシド基、カルボキシル基、アルコキシ基、アシル基、アルキル基、アミド基、エステル基、ハロゲン基(F、Cl、Br、又はI)、又はこれらの組み合わせであってよい。また、波線部分は、スルフィド基との結合部分を意味する。当該リンカーは、通常のスルフィド結合よりも、安定性、例えばアルカリ耐性又は還元反応等耐性、好ましくはアルカリ耐性に優れる。

10

【0046】

上記リンカーを有するペプチドを調製する方法は特に限定しない。例えば、以下の式：  
【化9】



で表されるリンカーを有するペプチドは、例えば以下の方法：

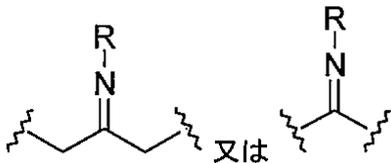
システイン残基を2つ含むペプチドと、上記リンカーの波線部分に架橋反応に關与する反応性の官能基(例えば、ハロゲン基、イミダゾール基等)を有する化合物を、例えば酸性条件下で混合する工程を含む方法により得ることができる。

20

【0047】

さらに、上記カルボニル基を有するペプチドを、一級アミン(RNH<sub>2</sub>)と反応させることにより、

【化10】



30

で表されるリンカーにより連結されたペプチドを得ることができる(Rは上記と同じ意味である)。

【0048】

前記化合物において、ハロゲン基は、好ましくはF、Cl、Br、及びI、さらに好ましくはCl、Br、及びIからなる群から選択される。ハロゲン基は好ましくは同一であり、さらに好ましくは、ハロゲン基はいずれもClである。

【0049】

本方法における混合工程の条件は、ペプチドのシステイン残基間で連結反応が生じる条件であれば特に限定しない。例えば、ペプチドと前記化合物を、適当なバッファー中において、室温(例えば約15~30)又は低温で混合することにより反応を行うことができる。該混合工程は、連結反応を促進する塩基(又はアルカリ)、例えば弱塩基性の無機又は有機(例えば、塩化グアニジウム、重炭酸ナトリウム、及びジエチルアミン等)を適量加えて行ってもよい。

40

【0050】

本方法の混合工程におけるペプチドと化合物の混合比率は、特に限定しない。ペプチドと化合物のモル比率は、例えば1:0.2~1:10、好ましくは1:0.5~1:5又は1:1~1:2とすることができる。

【0051】

該混合工程における混合時間(反応時間)は、ペプチドのシステイン残基間で連結反応が生じる限り限定するものではないが、例えば、1分~5時間、好ましくは10分~2時間又

50

は15分～1時間とすることができる。

【0052】

本方法は、必要に応じて、上記工程を行った後の混合物から、不純物、例えば、未反応のペプチド及び化合物等を分離し、システイン残基が連結されたペプチドを精製する工程をさらに含んでよい。該工程は、本分野で公知の方法、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、及びHPLC等のクロマトグラフィー等により行うことができる。

【0053】

また、本明細書に記載のIgG結合ペプチドは、その安定性の向上等のため、例えば、N末端のPEG化（ポリエチレングリコール付加）、及びC末端のアミド化等により修飾されていても良い。PEG化を行う場合のPEGの分子数は特に限定されず、例えば、1～50分子、1～20分子、2～10分子、2～6分子、又は4分子のPEGを付加することができる。

10

【0054】

また、本明細書に記載のIgG結合ペプチドは、多量体化されていてもよい。本明細書において、IgG結合ペプチドの「多量体化」とは、共有結合を介して2分子以上の上記IgG結合ペプチドが連結されていることを指し、IgG結合ペプチドの多量体は、例えば2～6量体、2～5量体、2～4量体、2～3量体、好ましくは2量体であってよい。

【0055】

前記ペプチドの多量体は、該ペプチド間にスペーサーを有していてもよい。多量体化は、当業者に公知の方法により行うことができ、例えば上記IgG結合ペプチドのN末端のアミノ基を、スペーサーを介して2分子以上連結することによって行うことができる。スペーサーの種類は特に限定しないが、例えば両末端にカルボキシル基を有するアスパラギン酸及びグルタミン酸等のアミノ酸、並びに両末端をカルボキシル基、アルデヒド基、エポキシ基、N-ヒドロキシスクシンイミジル基等の官能基で置換したポリアルキレンオキサイドの誘導体が挙げられる。

20

【0056】

本明細書に記載のIgG結合ペプチドは、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倍以上高いものであり得る。本明細書に記載のペプチドとヒト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 $1 \times 10^{-1}$ M未満、 $1 \times 10^{-3}$ M未満、好ましくは $1 \times 10^{-4}$ M未満、より好ましくは $1 \times 10^{-5}$ M未満である。本明細書に記載のIgG結合ペプチドは、IgGのFcドメインに結合し得る。

30

【0057】

本明細書に記載のペプチドは、慣用の液相合成法、固相合成法等のペプチド合成法、自動ペプチド合成機によるペプチド合成等（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)によって製造することができる。あるいは、本明細書に記載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等によって、ペプチドを製造してもよい。例えば本明細書に記載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等のクロマトグラフィー、硫酸分画、限外ろ過、及び免疫吸着法等により、回収又は精製することができる。

40

【0058】

ペプチド合成では、例えば、各アミノ酸（天然であるか非天然であるかを問わない）の

50

、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。このようにして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。

#### 【 0 0 5 9 】

遺伝子組換え法による製造は、例えば、本明細書に記載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方法によりなされ得る。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、及びウイルス等のベクターである。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）、及び酵母由来のプラスミド（例えばYEp13, YCp50等）等が挙げられる。ファージベクターとしては、限定するものではないが、T7ファージディスプレイベクター（T7Select10-3b, T7Select1-1b, T7Select1-2a, T7Select1-2b, T7Select1-2c等(Novagen)）、及びファージベクター（Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, gt10, gt11, ZAP, ZAP11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、及びセンダイウイルス等の動物ウイルス、並びにパキウロウイルス等の昆虫ウイルス等が挙げられる。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, 及びCharomid9-42等が挙げられる。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, 及びpComb3H等が知られている。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等が含まれ得る。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、及びポリAサイト等が含まれる。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、及びジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、等が用いられ得る。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）、及び植物細胞等であり、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、及びPEG法等を含む。形質転換細胞の培養は、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液は、宿主微生物が資化し得る炭素源、窒素源、及び無機塩類等を含む。本明細書に記載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。これは、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'末端側に結合することにより行うことができる。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。

#### 【 0 0 6 0 】

< IgG分離用カラム又はIgGの精製のためのキット >

一態様において、本発明は、上記のIgG結合ペプチドを含む固相担体を含む、IgG、好ましくはヒトIgG分離用カラムに関する。

#### 【 0 0 6 1 】

10

20

30

40

50

上記IgG分離用カラムは、IgGの精製又は分離のための、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、精製用、分取用等の用途、アプライ(搭載)又は注入する量、カラムの長さ又は内径等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。

【0062】

上記のカラムは、上記の本発明の固相担体(乾燥又は湿潤状態のいずれであってもよい)をカラムに密に充填することによって製造できる。

【0063】

また、一態様において、本発明は、上記のIgG結合ペプチドを含む固相担体を含む、IgG、好ましくはヒトIgGの精製のためのキットに関する。 10

【0064】

本発明のキットは、ヒトIgGの分析手順や精製手順を記載した使用説明書、精製に必要な試薬やバッファー、固相担体の充填用カラムの少なくとも一つを含んでよい。

【0065】

< IgGの精製方法 >

一態様において、本発明は、上記固相担体、又は上記IgG分離用カラムにIgGを結合させる工程、及び結合したIgGを溶出させてIgGを回収する工程を含む、IgG、好ましくはヒトIgGの精製方法に関する。

【0066】

結合工程は、当業者に公知の方法により行うことができる。例えば、上記固相担体又はIgG分離用カラム適当なバッファーで平衡化し、0 ~ 室温、好ましくは0 ~ 約10、更に好ましくは約4の低温でIgGを含有する液をアプライし、固相担体上のペプチドに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、結合工程を行うことができる。 20

【0067】

溶出工程も、当業者に公知の方法より行うことができる。例えば、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バッファー又は20 mM クエン酸バッファー)をカラムに流して行ってもよいし、上記のIgG結合ペプチドを用いて競合溶出により溶出させてもよい。特に、コストの点から酸により溶出を行うことが好ましい。この場合、固相担体又はカラムを、水酸化ナトリウム溶液、水酸化カリウム溶液、及び水酸化カリウム溶液等のアルカリ性の溶液(例えば、0.1 M 水酸化ナトリウム溶液)で洗浄することにより固相担体又はカラムを再生し、再度結合工程に用いることができる。溶液のアルカリ性の程度は当業者であれば容易に決定することができる。したがって、本発明の方法は、任意に、アルカリ性の溶液により洗浄することにより固相担体又はカラムを再生する工程を含み得る。 30

【0068】

IgGが回収されたかどうかは、例えば、電気泳動による分子量の確認、及び任意にその後の抗IgG抗体を使用するウエスタンブロット法によって判定できる。例えば、電気泳動は、5~20%アクリルアミドグラジエントゲルを用いたSDS-PAGEにより行ってよく、また、ウエスタンブロットは、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。 40

【0069】

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を精製する工程において、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等のクロマトグラフィー、硫酸分画、限外ろ過等を適宜組み合わせることができる。 50

## 【 0 0 7 0 】

本発明を以下の実施例によってさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例によって制限されないものとする。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 7 1 】

[ 実施例1: IgG結合ペプチドの調製及び結合親和性の測定 ]

N末端をビオチン化PEG4でブロックした以下の6つのIgG結合ペプチドをFmoc固相合成法により常法に従って合成した：

DCAYH(Xaa1)GELVWCT ( 配列番号 1、ただしXaa1はアルギニンで、C末端はアミド化 ) ；

GPRCAYH(Xaa1)GELVWCSFH ( 配列番号 4、ただしXaa1はアルギニンで、C末端はアミド化 )

10

；

GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH ( 配列番号 2、ただしXaa1はアルギニンで、C末端はアミド化 )

；

GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH ( 配列番号 2、ただしXaa1はロイシンで、C末端はアミド化 ) ；G

PDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH ( 配列番号 2、ただしXaa1はリシンで、C末端はアミド化 ) ；

GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH ( 配列番号 2、ただしXaa1はアセチル化リシンで、C末端はアミド化 )。

## 【 0 0 7 2 】

保護基を除去した後、pH8.5の水溶液中酸化条件下で分子内S-S結合を形成させ、逆相HPLCを用いて、流速1.0ml/min、0.1%のTFAを含む10%から60%のアセトニトリルのグラジエント溶出によって分子内S-S結合を有するペプチドを精製した。

20

## 【 0 0 7 3 】

精製したIgG結合ペプチドの親和性解析は、以下の方法で行った。BIAcoreT200 ( GE healthcare ) にセットしたCM5センサーチップ上へ、0.4M EDC ( 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)-carbodiimide、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド ) と0.1 M sulfo-NHS ( sulfo-N-hydroxysuccinimide、スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド ) を等量混合後、10  $\mu$ l/mlの流速で、センサーチップに7分間インジェクトすることによりセンサーチップを活性化し、pH4.0 ( 10 mM 酢酸Na ) の条件下で、固定化量がRU値で4000 ~ 5000となるように、IgGを固定化した。HBS-EP緩衝液 ( 0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、0.005 % Tween 20、3 mM EDTA、pH 7.0 ) を用いながら、流速50  $\mu$ l/mlにて、10nMから2  $\mu$ Mの濃度のペプチドを180 秒間インジェクトすることで結合反応をモニターし、その後、緩衝液により600 sec洗浄することで解離反応を測定した。結合パラメーターの解析は、BIAevaluation T100ソフトウェアを用いて行った。

30

## 【 0 0 7 4 】

親和性測定の結果を、以下の表1に示す。表1の結果は、いずれのペプチドもIgGと結合性を有し、抗体の精製に用い得ることを示している。

## 【 0 0 7 5 】

【表 1】

ペプチドの配列	配列番号	ka	kd	KD (nM)	
				1:1 binding	平衡値
DCAYHXaa1GELVWCT-NH <sub>2</sub>	1、但し Xaa1 は R	4.57E+05	0.0248	54	64.5
GPRCAYHXaa1GELVWCSFH-NH <sub>2</sub>	4、但し Xaa1 は R	8.40E+05	0.0353	42	56
GPDCAYHXaa1GELVWCTFH-NH <sub>2</sub>	2、但し Xaa1 は R	1.57E+06	0.0144	9.1	10
GPDCAYHXaa1GELVWCTFH-NH <sub>2</sub>	2、但し Xaa1 は L	1.7E+05	0.014	8.1	-
GPDCAYHXaa1GELVWCTFH-NH <sub>2</sub>	2、但し Xaa1 は K	1.25E+06	0.195	156	131
GPDCAYHXaa1GELVWCTFH-NH <sub>2</sub>	2、但し Xaa1 は K(Acetyl)	4.4E+05	0.12	2700	2800

各種ペプチドの親和性(全て、ペプチドの N 末端をビオチン化 PEG4 でブロックしたものをを用いた)。最下段の K(Acetyl)は、アセチル化されたリシン残基を意味する。

## 【 0 0 7 6 】

[ 実施例 2 : リンカーにより架橋された IgG 結合ペプチドの調製 ]

NH<sub>2</sub>-PEG4 化合物 ペプチド GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH ( 配列番号 2、Xaa1 はアルギニンで、C 末端はアミド化 ) は、ペプチド合成ビーズ ( Rink-amide-Chemmatrix resin、Biotage ) 上にて、Fmoc 固相合成法により常法に従って合成した。

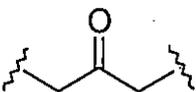
## 【 0 0 7 7 】

樹脂からのペプチドの切り出し、脱保護を行った後、ペプチドを得た。得られたペプチド 65mg ( 15.6 μmol ) を 6 M 塩化グアニジウム ( Gn · HCl ) を含むリン酸緩衝液 ( pH = 7.3 ) 5 mL に溶解し、これにアセトニトリル 120 μL に溶解した 1, 3-Dichloro-2-propanone ( 2.9 mg、23.4 μmol、1.5 等量モル ) を加えて、室温で攪拌した。1 時間後、HPLC 分析によって反応の終了を確認し、反応溶液を直接 HPLC にて精製することによって、環化ペプチド ( 33 mg、7.8 μmol、収率 50% ) を得た。

## 【 0 0 7 8 】

以上の手順により、GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH ( 配列番号 2、Xaa1 はアルギニンで、C 末端はアミド化 ) で示されるアミノ酸配列を含み、外側の 2 つのシステイン残基中のスルフィド基が、以下の式：

## 【 化 1 1 】

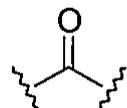


で表されるリンカーにより連結されている、N 末端 PEG4 化及び C 末端アミド化ペプチド a を得た。

## 【 0 0 7 9 】

また、上記と同様の方法にて調製したペプチド ( Fmoc-HN-PEG4-GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH ( 配列番号 2、Xaa1 はアルギニンで、C 末端はアミド化 ) ) 1.1mg を 220 μL の DMF に溶解し ( 2mM )、これにアセトニトリルに溶解した 10mM のチオカルボニルジイミダゾール 22 μL ( 0.5 等量モル ) を加えて、氷上で 2.5 時間攪拌した。HPLC 分析によって反応の終了を確認し、反応溶液を直接 HPLC にて精製することによって、2 つのシステイン残基中のスルフィド基が、以下の式：

## 【 化 1 2 】



10

20

30

40

50

で表されるリンカーにより連結されている、環化ペプチド b を得た(0.3 mg、収率27%)。本ペプチドについて、実施例1と同様にIgGとの親和性を測定したところ、Kdは1  $\mu$ Mであった。

【0080】

[実施例3：ヒト血清由来  $\alpha$ -グロブリンの分離]

ジクロロアセトン架橋ペプチドが、ヒト抗体精製アフィニティーリガンドとして利用可能か、NHS活性化プレパックカラム (GE Healthcare)に固定化し、各種評価を実施した。

【0081】

ペプチド固定化カラムは以下の方法で作製した。なお、溶液の送液にはシリンジを用いた。

【0082】

1 mL容量のNHS活性化プレパックカラムに、1 mM塩酸5 mLを送液し、カラム内のイソプロパノール溶液を除去した。次いで、1.0 mg/mLペプチド溶液 (DMSOに溶解した100 mg/mLの実施例2で調製したペプチド a の溶液をカップリング溶液(20 mM 炭酸緩衝液、50 mM 塩化ナトリウム、pH8.3)で100倍に希釈) 1 mLを送液し、室温で1時間固定化した。その後、1 M Tris (pH8.0)5 mLで、未反応のNHSを室温1時間ブロッキングした。最後に、吸着溶液 (20mM リン酸緩衝液、150 mM 塩化ナトリウム、pH7.4) 5 mLを送液し、クロマトグラフィー評価に用いた。

【0083】

作製したペプチド固定化カラムを液体クロマトグラフィー装置AKTAExplore (GE Healthcare)に接続し、吸着溶液で平衡化した。次いで、吸着溶液に溶解した1 mg/mLヒト血清由来  $\alpha$ -グロブリン(Wako)を1 mL/minの流速で1 min送液した。さらに、カラムを吸着溶液で洗浄し、酸性の溶出溶液(20 mM クエン酸、pH2.5)を送液することで、吸着成分を溶出した。カラムからのタンパク質の溶出は、280nmの吸光度で検出した。実験結果を図1に示す。

【0084】

図1に示す様に、pHの低下により、カラムに吸着したヒト血清由来  $\alpha$ -グロブリンの溶出が確認されたことから、実施例2で調製したペプチドが、アフィニティーカラムのリガンドとして利用できることが明らかとなった。

【0085】

[実施例4：ペプチドによる競合溶出]

実施例3と同じ方法で作製したカラムに対し、1 mgのヒト由来血清  $\alpha$ -グロブリンを送液し、吸着させた。カラムを吸着溶液で洗浄後、吸着溶液に溶解した0.4 mg/mLの実施例2で調製したペプチド a の溶液を2.5 mL送液した。0.5 mL分画した各フラクションを定法に従い、還元条件下でのSDS-PAGEに供した。タンパク質の検出は、CBB染色で行った。比較のため、クエン酸溶出でも同様の操作を行った。

【0086】

図2に示すように、軽鎖 (L鎖)及び重鎖 (H鎖)を示す25kDa付近及び50kDa付近のバンドが確認されたことから、溶出方法として、ペプチド溶液を用いることが可能であることが明らかとなった。

【0087】

[実施例5：動的結合容量(DBC)測定]

実施例3と同様の方法で、ペプチド固定化量の異なる3種 (1 mg, 4 mg, 10 mg)のカラムを作製した。ただし、ペプチド溶液は、4 mg/mL、10 mg/mLを準備し、固定化に用いた。

【0088】

各カラムを吸着溶液で平衡化した後、吸着溶液に溶解した1 mg/mLヒト血清由来  $\alpha$ -グロブリン (Wako)を1 mL/min、0.4 mL/min、0.2 mL/min (滞留時間1 min、2.5 min、5 min)の流速で送液した。DBCは、280 nm吸光度において、非吸着成分を除いた値がサンプル全体の吸光度の10%に到達するまでに送液されたサンプル量から求めた。1 mL/min流速でのクロマトグラムを図3に示し、DBCを表2にまとめた。なお、比較のため、市販Protein A担

10

20

30

40

50

体MabSelect (GE Healthcare)についても同じ測定を行った。

【 0 0 8 9 】

【 表 2 】

固定化量	滞留時間		
	1 min	2.5 min	5 min
1 mg	2.3	3.4	7.0
4 mg	12.1	15.8	23.1
10 mg	23.1	29.5	31.4
MabSelect	10.0	24.3	43.7

10

【 0 0 9 0 】

図3及び表2に示すように、ペプチド固定化量を増加させることによってDBCが高くなることが明らかになった。10 mgペプチド固定化カラムのDBCは、滞留時間5 minの低流速では、MabSelectよりも低かったが、滞留時間1 minの高流速では、有意に高く、高流速での精製に適していることが示唆された (表2)。

【 0 0 9 1 】

[ 実施例6：アルカリ耐性の評価 ]

実施例3と同じ方法で作製した1 mgペプチド固定化1 mLカラムに、0.1 M 水酸化ナトリウム溶液を5 mL送液した。その後、吸着溶液で洗浄を行い、実施例5と同様に、流速1 mL/minでのDBC測定を行った。続いて、水酸化ナトリウム溶液処理/DBC測定を5回繰り返し行うことでアルカリ耐性を評価した。水酸化ナトリウム処理を行う前のDBCを100%とし、DBC変動率を求めた。

20

【 0 0 9 2 】

[ 比較例1 ]

比較例1として、ジスルフィド結合で架橋されたペプチドを1 mg固定化したカラムを作製し、実施例5と同様にアルカリ耐性評価を実施した。

実施例5及び比較例1の結果を図4に示し、実測値を表3にまとめた。

【 0 0 9 3 】

30

【 表 3 】

NaOH 洗浄サイクル	DBC 10% (%NaOH 洗浄サイクル 0)		DBC 10% (mg/mL)	
	比較例 1	実施例 5	比較例 1	実施例 5
0	100.0	100.0	14.0	4.8
1	98.6	100.0	13.8	4.8
2	95.0	102.1	13.3	4.9
3	92.9	100.0	13.0	4.8
4	88.6	100.0	12.4	4.8
5	86.4	97.9	12.1	4.7

40

【 0 0 9 4 】

図4、及び表3に示すように、ジスルフィド結合で架橋されたペプチドでは、5回の水酸化ナトリウム処理により、DBCが86.4%にまで低下した (比較例1)。一方、ジクロロアセトン架橋ペプチドでは、DBCの低下は認められず、高いアルカリ耐性を有することが明らかになった。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 9 5 】

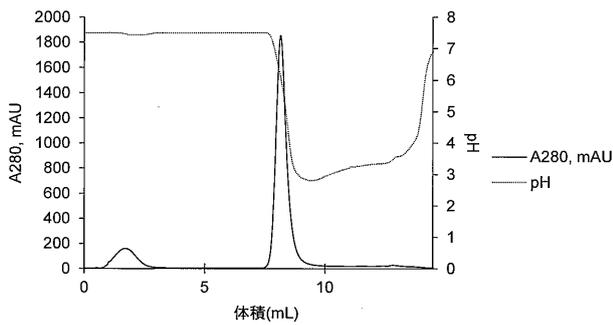
50

本発明の固相担体に含まれるペプチドは、システイン残基におけるスルフィド基を、特定の構造を有するリンカーによって架橋することによって、安定性が改善されている。したがって、本発明の固相担体は、アルカリ洗浄工程等によってIgG結合能が低減されにくいため、効率的なIgG精製に用いることができ、医薬品としても用いられるIgGの効率的な生産に利用することができる。

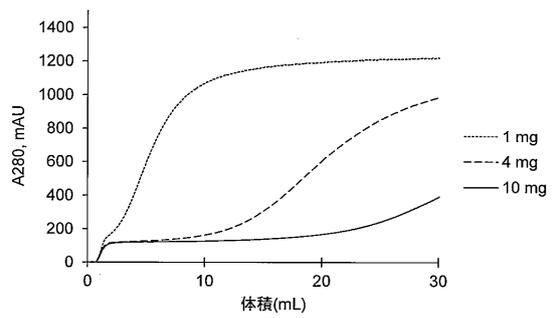
【0096】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

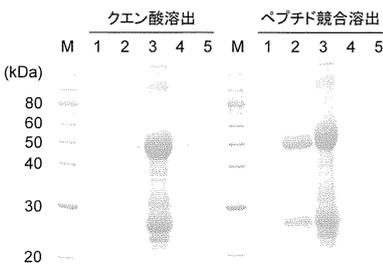
【図1】



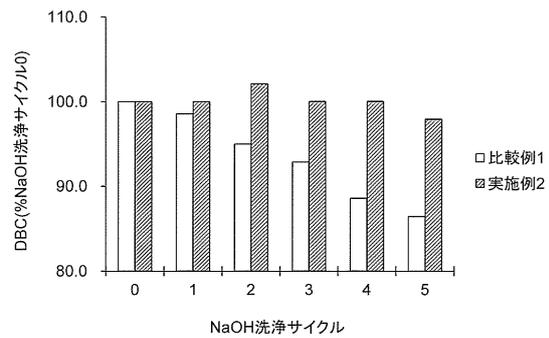
【図3】



【図2】



【図4】



【配列表】

2018092867000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/041404
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. C07K7/04(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Intel. C07K7/04, C07K1/22, C07K17/00, G01N30/88, C07K16/00, C12N15/09  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN), UniProt/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/027796 A1 (OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.) 28 February 2013, claims, examples & US 2014/0274790 A1, claims, examples & EP 2749646 A1	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 February 2018 (02.02.2018)		Date of mailing of the international search report 13 February 2018 (13.02.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/041404

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KANG, H. Y., et al., "Cyclic peptide ligand with high binding capacity for affinity purification of immunoglobulin G", J. Chromatogr. A, Sep-2016, vol. 1466, pp. 105-112, ISSN 0021-9673, in particular, abstract, materilas	1-19
A	DIAS, R. L., et al., "Protein ligand design: from phage display to synthetic protein epitope mimetics in human antibody Fc-binding peptidomimetics", J. Am. Chem. Soc., Mar-2016, vol. 128, issue 8, pp. 2726-2732, ISSN 0002-7863, in particular, abstract, p. 2727 right column, fig. 2.	1-19
A	WANG, Y., et al., "A Thiol-Ene Coupling Approach to Native Peptide Stapling and Macrocyclization", Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2015, vol. 54, issue 37, pp. 10931-10934, ISSN 1433-7851, in particular, abstract, fig. 3., fig. 4.	1-19
A	JP 2013-507927 A (AILERON THERAPEUTICS, INC.) 07 March 2013, claims, paragraphs [0209]-[0221] & WO 2011/047215 A1, claims, paragraphs [00159]-[00168] & US 2011/0223149 A1 & EP 2488193 A1	1-19
P, A	WO 2016/186206 A1 (KAGOSHIMA UNIVERSITY) 24 November 2016, claims (Family: none)	1-19

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 4 1 4 0 4											
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K7/04(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n													
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K7/04, C07K1/22, C07K17/00, G01N30/88, C07K16/00, C12N15/09													
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年		
日本国実用新案公報	1922-1996年												
日本国公開実用新案公報	1971-2018年												
日本国実用新案登録公報	1996-2018年												
日本国登録実用新案公報	1994-2018年												
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)、WPIDS/WPIX (STN)、UniProt/GeneSeq													
C. 関連すると認められる文献													
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号											
A	WO 2013/027796 A1 (大塚化学株式会社) 2013.02.28, 請求の範囲, 実施例 & US 2014/0274790 A1, 特許請求の範囲, 実施例 & EP 2749646 A1	1-19											
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリ <table border="0"> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの												
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの												
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの												
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献												
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願													
国際調査を完了した日 02.02.2018		国際調査報告の発送日 13.02.2018											
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 池上 文緒 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3765										

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2017/041404

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	KANG, H.Y., et al., Cyclic peptide ligand with high binding capacity for affinity purification of immunoglobulin G, J. Chromatogr. A, Sep-2016, vol.1466, p.105-112, ISSN 0021-9673, 特に Abstract, Materilas	1-19
A	DIAS, R.L., et al., Protein ligand design: from phage display to synthetic protein epitope mimetics in human antibody Fc-binding peptidomimetics, J. Am. Chem. Soc., Mar-2016, vol.128, issue 8, p.2726-2732, ISSN 0002-7863, 特に Abstract, p.2727 右欄, Figure 2.	1-19
A	WANG, Y., et al., A Thiol-Ene Coupling Approach to Native Peptide Stapling and Macrocyclization, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2015, vol.54, issue 37, p.10931-10934, ISSN 1433-7851, 特に Abstract, Figure 3., Figure 4.	1-19
A	JP 2013-507927 A (エルロン・セラピューティクス・インコーポレイテッド) 2013.03.07, 特許請求の範囲, 段落[0209]-[0221] & WO 2011/047215 A1, 特許請求の範囲, 段落[00159]-[00168] & US 2011/0223149 A1 & EP 2488193 A1	1-19
P, A	WO 2016/186206 A1 (国立大学法人鹿児島大学) 2016.11.24, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-19

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
 C 1 2 N 15/11 (2006.01) C 1 2 N 15/11 Z

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA16 BA17 BA57 BA60 DA75 EA20 FA20

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。