

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年4月27日(27.04.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/069158 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/080977
- (22) 国際出願日: 2016年10月19日(19.10.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-207864 2015年10月22日(22.10.2015) JP
- (71) 出願人: プロテノバ株式会社(PROTENOVA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒7692604 香川県東かがわ市西村1488番地1 Kagawa (JP).
- (72) 発明者: 真島 英司(MAJIMA, Eiji); 〒7692604 香川県東かがわ市西村1488番地1 プロテノバ株式会社内 Kagawa (JP). 島 厚志(SHIMA, Atsushi); 〒7692604 香川県東かがわ市西村1488番地1 プロテノバ株式会社内 Kagawa (JP).

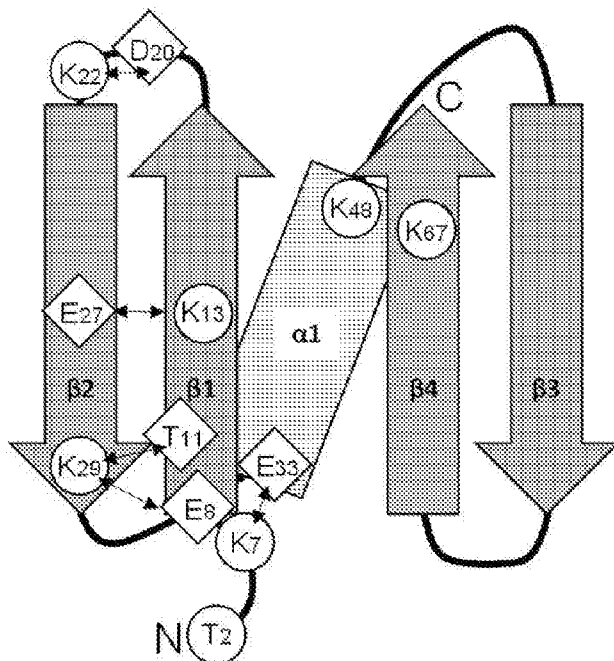
- (74) 代理人: 田中 順也, 外(TANAKA, Junya et al.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島6-2-40 中之島インテス21階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: IMMUNOGLOBULIN-BINDING POLYPEPTIDE

(54) 発明の名称: イムノグロブリン結合ポリペプチド

[図2]



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a polypeptide that has a high binding capacity to immunoglobulin kappa chains and excellent alkali stability by modifying an amino acid sequence in immunoglobulin-binding domains of protein L derived from *Peptostreptococcus magnus*. A polypeptide having a high binding capacity to immunoglobulin kappa chains and excellent alkali stability is obtained by substituting a specific lysine residue with a basic amino acid or an amino acid having a hydroxyl group in immunoglobulin-binding domains of protein L derived from *Peptostreptococcus magnus* strain 3316.

(57) 要約: 本発明の目的は、*Peptostreptococcus magnus* 由来のプロテインLにおけるイムノグロブリン結合ドメインのアミノ酸配列を改変することにより、イムノグロブリンのカップ鎖に対する結合能が高く、アルカリ安定性に優れたポリペプチドを提供することである。*Peptostreptococcus magnus* 3316株由来のプロテインLの各イムノグロブリン結合ドメインにおいて、特定のリジン残基を塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換することによって、イムノグロブリンのカップ鎖に対する結合能が高く、しかもアルカリ安定性に優れたポリペプチドが得られる。



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称： イムノグロブリン結合ポリペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、イムノグロブリン又はその断片に結合するポリペプチドに関する。より具体的には、本発明は、イムノグロブリン又はその断片のカップ鎖に対する結合性が高く、アルカリ条件下での安定性（アルカリ安定性）に優れたポリペプチドに関する。更に、本発明は、当該ポリペプチドの製造方法、当該ポリペプチドの固定化物、及び当該ポリペプチドを利用したイムノグロブリン又はその断片の分離方法等に関する。

背景技術

[0002] 従来、イムノグロブリン（抗体とも称される）は、標的物質に対する結合特異性が高く、研究用試薬や臨床検査試薬として広く利用されている。また、近年では、遺伝子組換え技術の進歩によって、ヒト抗体やヒト化抗体の作製技術が確立され、イムノグロブリンは、抗体医薬としてリウマチや癌等の医療分野で実用化されるに至っている。

[0003] イムノグロブリンは、主に動物細胞培養により製造されており、その精製にはイムノグロブリン結合能を有するリガンドを使用したアフィニティークロマトグラフィーが広く利用されている。イムノグロブリンの精製に利用されるアフィニティークロマトグラフィーでは、イムノグロブリンに特異的に結合するリガンドとして、プロテインA、プロテインL、プロテインG等のポリペプチド、又はこれらのイムノグロブリン結合ドメインが用いられている。

[0004] 一方、近年、イムノグロブリンの精製に使用されるリガンドの安定性の向上が求められるようになってきている。特に、イムノグロブリンの精製では、ウイルス等の失活、リガンドを固定化した担体の洗浄等のためにアルカリ溶液が使用されており、イムノグロブリンの精製に使用されるリガンドには、アルカリに対して高い安定性を備えていることが1つの重要な要素になってい

る。

[0005] 従来、プロテインAのアルカリ安定性を向上させる技術については精力的に検討されている。例えば、特許文献1には、プロテインAのCドメインの特定のアミノ酸、又はプロテインAのZドメインの特定のアミノ酸残基を置換することにより、優れたイムノグロブリン結合能及びアルカリ安定性を備えさせ得ることが報告されている。また、特許文献2には、プロテインAのアスパラギン残基を別のアミノ酸に置換することによってアルカリ安定性を備えさせ得ることが報告されている。

[0006] このように、プロテインAについては、アルカリ安定性を付与する技術が種々報告されているものの、プロテインLのアルカリ安定性を付与する技術については十分な検討がなされていないのが現状である。

[0007] プロテインLは、*Peptostreptococcus magnus* (別名 *Finegoldia magna*) の細胞表面に局在しており、イムノグロブリンのカッパ鎖に特異的に結合できることが知られている。プロテインLには、*Peptostreptococcus magnus* 312株由来のもの(非特許文献1)と*Peptostreptococcus magnus* 3316株由来のもの(非特許文献2及び特許文献3)が報告されている。*Peptostreptococcus magnus* 3316株由来のプロテインLには、イムノグロブリンのカッパ鎖に結合する4つのドメインがあり(非特許文献2及び特許文献3)、これらのドメインは相互にアミノ酸配列の類似性が高く、しかもこれらの4つのドメインは単独でもイムノグロブリンに対する結合能を示すことが知られている。312株の5つのカッパ鎖結合ドメインのアミノ酸配列も3316株の各ドメインのアミノ酸配列に対して類似性が高い。しかしながら、*Peptostreptococcus magnus* 由来のプロテインLの各ドメインのアミノ酸配列において、どのような改変が、アルカリ安定性に寄与するかについては一切明らかにされていない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開番号第2007/097361号

特許文献2：国際公開第2000／023580号

特許文献3：US patent No. 6,162,903 (2000)

非特許文献

[0009] 非特許文献1：W. Kastern et al., J.Biol. Chem. (1992) 267, 12820-12825

非特許文献2：J.P. Murphy et al., Mol. Microbiol. (1994)12, 911-920

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明の目的は、*Peptostreptococcus magnus*由来のプロテインLにおけるイムノグロブリン結合ドメインのアミノ酸配列を改変することにより、イムノグロブリンのカッパ鎖に対する結合能が高く、アルカリ安定性に優れたポリペプチドを提供することである。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者は、前記課題を解決すべく鋭意検討を行ったところ、*Peptostreptococcus magnus* 3316株由来のプロテインLの各イムノグロブリン結合ドメインにおいて、特定のリジン残基を塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換することによって、イムノグロブリンのカッパ鎖に対する結合能が高く、しかもアルカリ安定性に優れたポリペプチドが得られることを見出した。本発明は、かかる知見に基づいて更に検討を重ねることにより完成したものである。

[0012] 即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

項1. 下記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)、及び(3-1)～(3-4)のいずれかに示すイムノグロブリン結合ドメインを少なくとも1つ含むポリペプチド。

(1-1)配列番号1に示すアミノ酸配列において、第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

(1-2)配列番号2に示すアミノ酸配列において、第7位、第13位、第22位

、及び第29位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

(1-3)配列番号3に示すアミノ酸配列において、第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

(1-4)配列番号4に示すアミノ酸配列において、第6位、第12位、第21位、及び第28位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

(2-1)配列番号1に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(2-2)配列番号2に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(2-3)配列番号3に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミ

ノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(2-4)配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-1)配列番号1に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、配列番号1に示すアミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が80%以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-2)配列番号2に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、配列番号2に示すアミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が80%以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-3)配列番号3に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミ

ノ酸配列において、配列番号 3 に示すアミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が 80% 以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号 3 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-4) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列における第 6 位、第 12 位、第 21 位、及び第 28 位よりなる群から選択される少なくとも 2 つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、配列番号 4 に示すアミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が 80% 以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号 4 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

項 2. 前記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)、及び(3-1)～(3-4)に示すイムノグロブリン結合ドメインの中から選択される 1 個のイムノグロブリン結合ドメインが含まれる単ドメイン型ペプチドである、項 1 に記載のポリペプチド。

項 3. 前記 下記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)、及び(3-1)～(3-4)に示すイムノグロブリン結合ドメインから選択される 2 個以上のイムノグロブリン結合ドメインが連結されてなる複ドメイン型ペプチドである、項 1 に記載のポリペプチド。

項 4. 前記(1-1)、(2-1)、及び(3-1)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 1 に示すアミノ酸配列における第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位の全てが、塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されている、項 1 ～ 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

項 5. 前記(1-1)、(2-1)、及び(3-1)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位よりなる群から選択される部位の少なくとも 2 個以上が、アル

ギニン又はトレオニンに置換されている、項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチド。

項 6. 前記(1-2)、(2-2)、及び(3-2)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 2 に示すアミノ酸配列における第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位の全てが、塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されている、項 1～3 のいずれかに記載のポリペプチド。

項 7. 前記(1-2)、(2-2)、及び(3-2)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位よりなる群から選択される部位の少なくとも 2 個以上が、アルギニン又はトレオニンに置換されている、項 1～3 及び 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

項 8. 前記(1-3)、(2-3)、及び(3-3)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 3 に示すアミノ酸配列における第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位の全てが、塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されている、項 1～3 のいずれかに記載のポリペプチド。

項 9. 前記(1-3)、(2-3)、及び(3-3)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 3 に示すアミノ酸配列において、第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位よりなる群から選択される部位の少なくとも 2 個以上が、アルギニン又はトレオニンに置換されている、項 1～3 及び 8 のいずれかに記載のポリペプチド。

項 10. 前記(1-4)、(2-4)、及び(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 4 に示すアミノ酸配列における第 6 位、第 12 位、第 21 位、及び第 28 位の全てが、塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換さ

れている、項 1 ～ 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

項 1 1. 前記(1-4)、(2-4)、及び(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 4 に示すアミノ酸配列において、第 6 位、第 1 2 位、第 2 1 位、及び第 2 8 位よりなる群から選択される部位の少なくとも 2 個以上が、アルギニン又はトレオニンに置換されている、項 1 ～ 3 及び 1 0 のいずれかに記載のポリペプチド。

項 1 2. 項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載のポリペプチドをコードしている DNA。

項 1 3. 項 1 2 に記載の DNA を含む組換えベクター。

項 1 4. 項 1 3 に記載の組換えベクターを用いて宿主を形質転換して得られる形質転換体。

項 1 5. 項 1 4 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載のポリペプチドの製造方法。

項 1 6. 項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載のポリペプチドが不溶性担体に固定化されてなる、イムノグロブリン結合用担体。

項 1 7. 項 1 6 に記載のイムノグロブリン結合用担体を用いて、イムノグロブリン又はそのカッパ鎖を含む断片の分離を行う、イムノグロブリン又はその断片の分離方法。

発明の効果

[0013] 本発明のポリペプチドによれば、イムノグロブリン又はそのカッパ鎖を含む断片に対する結合能が高く、アルカリ条件下に晒されても、イムノグロブリン又はそのカッパ鎖を含む断片に対する結合能を維持できるので、アルカリ性溶液による溶出や洗浄を繰り返しても、イムノグロブリン又はそのカッパ鎖を含む断片に対する結合能の低下を抑制でき、イムノグロブリン又はそのカッパ鎖を含む断片の製造コストの低減と効率化を図ることができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]Peptostreptococcus magunus 3316株由来のプロテインLのイムノグロ

ブリン結合ドメイン 1～4 のアミノ酸配列を比較した図である。

[図2] *Peptostreptococcus magunus* 3316株由来のプロテインLのイムノグロブリン結合ドメイン 1～4 の三次元構造を模式的に示した図である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明を詳細に説明する。なお、配列表以外では、アミノ酸配列における 20 種類のアミノ酸残基は、一文字略記で表現することがある。即ち、グリシン (G l y) は G、アラニン (A l a) は A、バリン (V a l) は V、ロイシン (L e u) は L、イソロイシン (I l e) は I、フェニルアラニン (P h e) は F、チロシン (T y r) は Y、トリプトファン (T r p) は W、セリン (S e r) は S、トレオニン (T h r) は T、システイン (C y s) は C、メチオニン (M e t) は M、アスパラギン酸 (A s p) は D、グルタミン酸 (G l u) は E、アスパラギン (A s n) は N、グルタミン (G l n) は Q、リジン (L y s) は K、アルギニン (A r g) は R、ヒスチジン (H i s) は H、プロリン (P r o) は P である。

[0016] 本明細書において、「非極性アミノ酸」には、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニン、フェニルアラニン、及びトリプトファンが含まれる。また、「非電荷アミノ酸」には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンが含まれる。また、「酸性アミノ酸」には、アスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。また、「塩基性アミノ酸」には、リジン、アルギニン、及びヒスチジンが含まれる。

[0017] 1. ポリペプチド

本発明のポリペプチドの一態様として、下記(1-1)～(1-4)のいずれかに示すイムノグロブリン結合ドメインを少なくとも 1 つ含むポリペプチドが挙げられる。

(1-1)配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位よりなる群から選択される部位の少なくとも 2 個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているア

ミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

(1-2)配列番号2に示すアミノ酸配列において、第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

(1-3)配列番号3に示すアミノ酸配列において、第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

(1-4)配列番号4に示すアミノ酸配列において、第6位、第12位、第21位、及び第28位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

[0018] 配列番号1～4に示すアミノ酸配列は、それぞれPeptostreptococcus magnus 3316株由来のプロテインL（配列番号5に示すアミノ酸配列、DDBJデータベースID番号Q51918）に含まれる4つのイムノグロブリン結合ドメインの各アミノ酸配列である。具体的には、配列番号1に示すアミノ酸配列は、配列番号5に示すアミノ酸配列における468～537位の領域に存在するイムノグロブリン結合ドメイン（以下、「イムノグロブリン結合ドメイン4」と表記することもある。）に該当し、配列番号2に示すアミノ酸配列は、配列番号5に示すアミノ酸配列における394～463位の領域に存在するイムノグロブリン結合ドメイン（以下、「イムノグロブリン結合ドメイン3」と表記することもある。）に該当し、配列番号3に示すアミノ酸配列は、配列番号5に示すアミノ酸配列における320～389位の領域に存在するイムノグロブリン結合ドメイン（以下、「イムノグロブリン結合ドメイン2」と表記することもある。）に該当し、配列番号4に示すアミノ酸配列は、配列番号5に示すアミノ酸配列における249～317位の領域に存在するイムノグロブリン結合ドメイン（以下、「イムノグロブリン結合

ドメイン 1」と表記することもある。)に該当する。

[0019] イムノグロブリン結合ドメイン 1～4 は、図 1 に示すように、保存性が高く、相同性が高いアミノ酸配列を有している。

[0020] また、イムノグロブリン結合ドメイン 1～4 は、図 2 に示すように、N 末端側から、 β シート構造（配列番号 1～3 に示すアミノ酸配列における第 9～17 位；配列番号 4 に示すアミノ酸配列における第 8～16 位）（以下、 β シート 1 又は $\beta 1$ と表記することもある）、 β シート構造（配列番号 1～3 に示すアミノ酸配列における第 23～30 位；配列番号 4 に示すアミノ酸配列における第 22～29 位）（以下、 β シート 2 又は $\beta 2$ と表記することもある）、 α ヘリックス構造（配列番号 1～3 に示すアミノ酸配列における第 32～50 位；配列番号 4 に示すアミノ酸配列における第 31～49 位）（以下、 α ヘリックス 1 又は $\alpha 1$ と表記することもある）、 β シート構造（配列番号 1～3 に示すアミノ酸配列における第 53～58 位；配列番号 4 に示すアミノ酸配列における第 52～57 位）（以下、 β シート 3 又は $\beta 3$ と表記することもある）、及び β シート構造（配列番号 1～3 に示すアミノ酸配列における第 63～68 位；配列番号 4 に示すアミノ酸配列における第 62～67 位）（以下、 β シート 4 又は $\beta 4$ と表記することもある）が連結した状態になっている。なお、図 2 は、便宜上、イムノグロブリン結合ドメイン 4（配列番号 1）が形成する三次元構造を示している。

[0021] 配列番号 1～3 に示すアミノ酸配列における第 7 位及び配列番号 4 に示すアミノ酸配列における第 6 位にあるアミノ酸は、 β シート 1 よりも N 末端側に存在しており、当該アミノ酸は、三次元構造上、 α ヘリックス 1 中に存在する特定のアミノ酸（配列番号 1～3 に示すアミノ酸配列の場合は第 33 位のアミノ酸、配列番号 4 に示すアミノ酸配列の場合は第 32 位のアミノ酸）と相互作用し易い場所に位置している。また、配列番号 1～3 に示すアミノ酸配列における第 13 位及び配列番号 4 に示すアミノ酸配列における第 12 位にあるアミノ酸は、 β シート 1 中に存在しており、当該アミノ酸は、三次元構造上、 β シート 2 中に存在する特定のアミノ酸（配列番号 1～3 に示す

アミノ酸配列の場合は第27位のアミノ酸、配列番号4に示すアミノ酸配列の場合は第26位のアミノ酸)と相互作用し易い場所に位置している。また、配列番号1～3に示すアミノ酸配列における第22位及び配列番号4に示すアミノ酸配列における第21位にあるアミノ酸は、 β シート1と β シート2の間のループ領域に存在しており、当該アミノ酸は、三次元構造上、同ループ領域に存在する特定のアミノ酸(配列番号1～3に示すアミノ酸配列の場合は第20位のアミノ酸、配列番号4に示すアミノ酸配列の場合は第19位のアミノ酸)と相互作用し易い位置に配されている。更に、配列番号1～3に示すアミノ酸配列における第29位及び配列番号4に示すアミノ酸配列における第28位にあるアミノ酸は、 β シート2中に存在しており、当該アミノ酸は、三次元構造上、 β シート1中に存在する特定のアミノ酸(配列番号1～3に示すアミノ酸配列の場合は第8位及び/又は11位のアミノ酸、配列番号4に示すアミノ酸配列の場合は第7位及び/又は10位のアミノ酸)と相互作用し易い位置に配されている。ここでの相互作用は、水素結合や静電的相互作用が考えられる。

[0022] 本発明のポリペプチドでは、これらのイムノグロブリン結合ドメインのアミノ酸配列において、特定の4つの部位(配列番号1～3のアミノ酸配列の場合は、第7位、第13位、第22位、及び第29位;配列番号4のアミノ酸配列の場合は、第6位、第12位、第21位、及び第28位)の内2つ以上の部位を特定のアミノ酸に置換することによって、それと相互作用し易い場所に位置している他のアミノ酸との作用によって構造上の安定性が向上し、優れたアルカリ安定性を備えることが可能になっていると考えられる。

[0023] 前記(1-1)～(1-3)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号1～3に示す各アミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位の内、アミノ酸置換を導入する部位数は2以上であればよいが、アルカリ安定性をより一層向上させるという観点から、好ましくは3以上、更に好ましくは4(即ち、全て)が挙げられる。

[0024] また、前記(1-1)～(1-3)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列

番号 1～3 に示す各アミノ酸配列における第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位の内、3 か所についてアミノ酸置換を導入する場合、アミノ酸置換が導入される部位については、これらの 4 つの部位から任意に選択すればよいが、アルカリ安定性をより一層向上させるという観点から、好ましくは第 13 位、第 22 位及び第 29 位の 3 つの部位、第 7 位、第 22 位及び第 29 位の 3 つの部位、又は第 7 位、第 13 位及び第 22 位の 3 つの部位；更に好ましくは第 13 位、第 22 位及び第 29 位の 3 つの部位、又は第 7 位、第 22 位及び第 29 位の 3 つの部位が挙げられる。

[0025] 前記(1-1)～(1-3)のイムノグロブリン結合ドメインでは、配列番号 1～3 に示す各アミノ酸配列における第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位の内、2 つ以上の部位に導入されるアミノ酸置換については、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸への置換であればよい。置換される塩基性アミノ酸としては、具体的には、アルギニン、ヒスチジン、好ましくはアルギニンが挙げられる。また、置換される水酸基を有するアミノ酸としては、具体的には、トレオニン、セリン、チロシン、好ましくはトレオニンが挙げられる。アルカリ安定性をより一層向上させるという観点から、第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位の内、2 つ以上の部位に導入されるアミノ酸置換として、アルギニン又はトレオニンへの置換、更に好ましくは、アルギニンへの置換が挙げられる。

[0026] 前記(1-1)～(1-3)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号 1～3 に示す各アミノ酸配列における第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位の内、2 つの部位にアミノ酸置換を導入する場合、アミノ酸置換は、2 つともリジン以外の塩基性アミノ酸への置換であることが好ましく、2 つともアルギニンへの置換であることが更に好ましい。また、前記(1-1)～(1-3)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号 1～3 に示す各アミノ酸配列における第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位の内、3 つの部位にアミノ酸置換を導入する場合、少なくとも 2 つはリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）への置換であることが好ましく、3 つともリジ

ン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）への置換であることが更に好ましい。更に、前記(1-1)～(1-3)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号1～3に示す各アミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位の内、4つの部位にアミノ酸置換を導入する場合、少なくとも2つはリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）への置換であることが好ましく、少なくとも3つはリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）への置換であることが更に好ましく、4つともリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）への置換であることが特に好ましい。

[0027] 前記(1-1)～(1-3)のイムノグロブリン結合ドメインのアミノ酸配列の好適な例として、配列番号1～3における第7位、第13位、第22位、及び第29位の4つの部位がリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）に置換されているアミノ酸配列；配列番号1～3における第7位、第22位、及び第29位の3つの部位がリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）に置換されているアミノ酸配列；配列番号1～3に示す各アミノ酸配列における第7位及び第13位の2つの部位がリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）に置換され、且つ第22位がリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン又はヒスチジン）又は水酸基を有するアミノ酸（特に、トレオニン）に置換されているアミノ酸配列が挙げられる。これらの中でも、配列番号1～3に示す各アミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位の4つの部位がリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）に置換されているアミノ酸配列は、卓越したアルカリ安定性を備えており、特に好適である。

[0028] 前記(1-4)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号4に示すアミノ酸配列における、第6位、第12位、第21位、及び第28位の内、アミノ酸置換を導入する部位数は2以上であればよいが、アルカリ安定性をより一層向上させるという観点から、好ましくは3以上、更に好ましくは4（即ち、全て）が挙げられる。

[0029] また、前記(1-4)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号4に

示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位の内、3か所についてアミノ酸置換を導入する場合、アミノ酸置換が導入される部位については、これらの4つの部位から任意に選択すればよいが、アルカリ安定性をより一層向上させるという観点から、好ましくは第12位、第21位及び第28位の3つの部位、第6位、第21位及び第28位の3つの部位、又は第6位、第12位及び第21位の3つの部位；更に好ましくは第12位、第21位及び第28位の3つの部位、又は第6位、第21位及び第28位の3つの部位が挙げられる。

[0030] 前記(1-4)のイムノグロブリン結合ドメインでは、配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位の内、2つ以上の部位に導入されるアミノ酸置換については、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸への置換であればよく、置換される塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸の具体例、好ましいもの等については、前記(1-1)～(1-3)のイムノグロブリン結合ドメインの場合と同様である。

[0031] 前記(1-4)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位の内、2つの部位にアミノ酸置換を導入する場合、アミノ酸置換は、2つともリジン以外の塩基性アミノ酸への置換であることが好ましく、2つともアルギニンへの置換であることが更に好ましい。また、前記(1-4)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位の内、3つの部位にアミノ酸置換を導入する場合、少なくとも2つはリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）への置換であることが好ましく、3つともリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）への置換であることが更に好ましい。更に、前記(1-4)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号4に示す各アミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位の内、4つの部位にアミノ酸置換を導入する場合、少なくとも2つはリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）への置換であることが好ましく、少なくとも3つはリジン

以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）への置換であることが更に好ましく、4つともリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）への置換であることが特に好ましい。

[0032] 前記(1-4)のイムノグロブリン結合ドメインに含まれるアミノ酸配列の好適な例として、配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位の4つの部位がリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）に置換されているアミノ酸配列；配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、及び第21位の3つの部位がリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）に置換されているアミノ酸配列；配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位及び第12位の2つの部位がリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）に置換され、且つ第21位がリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン又はヒスチジン）又は水酸基を有するアミノ酸（特に、トレオニン）に置換されているアミノ酸配列が挙げられる。これらの中でも、配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位の4つの部位がリジン以外の塩基性アミノ酸（特に、アルギニン）に置換されているアミノ酸配列は、卓越したアルカリ安定性を備えており、特に好適である。

[0033] また、本発明のポリペプチドの他の態様として、下記(2-1)～(2-4)及び(3-1)～(3-4)のいずれかに示すイムノグロブリン結合ドメインを少なくとも1つ含むポリペプチドが挙げられる。

(2-1)配列番号1に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(2-2)配列番号2に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、

及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(2-3)配列番号3に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(2-4)配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-1)配列番号1に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、配列番号1に示すアミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が80%以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-2)配列番号2に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、

及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、配列番号2に示すアミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が80%以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-3)配列番号3に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、配列番号3に示すアミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が80%以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号3に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-4)配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、配列番号4に示すアミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が80%以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

[0034] 以下、前記(2-1)～(2-4)及び(3-1)～(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号1～3に示す各アミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位以外のアミノ酸部位、配列番号4に示す各アミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位以外のアミノ酸部位を、「任意改変部位」と表記することもある。

[0035] 前記(2-1)及び(3-1)のイムノグロブリン結合ドメインは、前記(1-1)のイムノグロブリン結合ドメインの改変体であり、配列番号1に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位の内、少なくとも2つ

のアミノ酸に導入されるアミノ酸置換の態様、好ましいアミノ酸置換部位等は、前記(1-1)のイムノグロブリン結合ドメインの場合と同様である。

[0036] 前記(2-2)及び(3-2)のイムノグロブリン結合ドメインは、前記(1-2)のイムノグロブリン結合ドメインの改変体であり、配列番号2に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位の内、少なくとも2つのアミノ酸に導入されるアミノ酸置換の態様、好ましいアミノ酸置換部位等は、前記(1-2)のイムノグロブリン結合ドメインの場合と同様である。

[0037] 前記(2-3)及び(3-3)のイムノグロブリン結合ドメインは、前記(1-3)のイムノグロブリン結合ドメインの改変体であり、配列番号3に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位の内、少なくとも2つのアミノ酸に導入されるアミノ酸置換の態様、好ましいアミノ酸置換部位等は、前記(1-3)のイムノグロブリン結合ドメインの場合と同様である。

[0038] 前記(2-4)及び(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインは、前記(1-4)のイムノグロブリン結合ドメインの改変体であり、配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位の内、少なくとも2つのアミノ酸に導入されるアミノ酸置換の態様、好ましいアミノ酸置換部位等は、前記(1-4)のイムノグロブリン結合ドメインの場合と同様である。

[0039] 前記(2-1)～(2-4)のイムノグロブリン結合ドメインの任意改変部位に導入されるアミノ酸の改変は、置換、付加、挿入、および欠失の中から1種類の改変（例えば置換）のみを含むものであってもよく、2種以上の改変（例えば、置換と挿入）を含んでも良い。前記(2-1)～(2-4)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、任意改変部位に置換、付加、挿入又は欠失されるアミノ酸は、1個又は複数個若しくは数個であればよく、例えば1～13個、好ましくは1～6個、1～5個、又は1～4個、更に好ましくは1～3個、特に好ましくは1又は2個或いは1個が挙げられる。

[0040] また、前記(3-1)～(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号1～4に示す各アミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性は、80%以上であればよいが、好ましくは90%以上、更に好ま

しくは95%以上、特に好ましくは99%以上が挙げられる。

[0041] ここで、前記(3-1)～(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号1～4に示す各アミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性とは、配列番号1～4に示す各アミノ酸配列から前記任意改変部位のみを抜き出して、当該任意改変部位のみを比較して算出される配列同一性である。また、「配列同一性」とは、BLAST PACKAGE [s g i 3 2 b i t e d i t i o n , V e r s i o n 2 . 0 . 1 2 ; a v a i l a b l e f r o m N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n (N C B I)] の b l 2 s e q p r o g r a m (T a t i a n a A . T a t s u s o v a , T h o m a s L . M a d d e n , F E M S M i c r o b i o l . L e t t . , V o l . 1 7 4 , p 2 4 7 - 2 5 0 , 1 9 9 9) により得られるアミノ酸配列の同一性の値を示す。パラメーターは、Gap insertion Cost value : 11、Gap extension Cost value : 1に設定すればよい。

[0042] 前記(2-1)～(2-3)及び(3-1)～(3-3)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号1～3に示す各アミノ酸配列における第8位、第11位、第20位、第27位、及び第33位のアミノ酸は、前記アミノ酸置換部位に配されるリジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸との相互作用によって、アルカリ安定性の向上に寄与していると考えられることから、これらの部位には置換又は欠失を導入しないことが望ましい。また、前記(2-4)及び(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインについても、同様に、配列番号4に示す各アミノ酸配列における第7位、第10位、第19位、第26位、及び第32位のアミノ酸は、前記アミノ酸置換部位に配されるリジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸との相互作用によって、アルカリ安定性の向上に寄与していると考えられることから、これらの部位には置換又は欠失を導入しないことが望ましい。

[0043] 前記(2-1)～(2-3)及び(3-1)～(3-3)のイムノグロブリン結合ドメインの任

意改変部位に導入されるアミノ酸置換の具体的態様として、配列番号 1～3 に示す各アミノ酸配列における第 2 位のアミノ酸がリジンに置換、第 4 8 位のアミノ酸がアルギニンに置換、第 6 7 位のアミノ酸がアルギニンに置換等が挙げられる。また、前記(2-4)及び(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインについても、同様に、任意改変部位に導入されるアミノ酸置換の具体的態様として、配列番号 4 に示すアミノ酸配列における第 2 位のアミノ酸がリジンに置換、第 4 7 位のアミノ酸がアルギニンに置換、第 6 6 位のアミノ酸がアルギニンに置換等が挙げられる。

[0044] また、前記(2-1)～(2-4)及び(3-1)～(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインの任意改変部位に導入されるアミノ酸置換の他の態様として、保存的置換が挙げられる。即ち、前記任意改変部位における置換としては、例えば、置換前のアミノ酸が非極性アミノ酸であれば他の非極性アミノ酸への置換、置換前のアミノ酸が非荷電性アミノ酸であれば他の非荷電性アミノ酸への置換、置換前のアミノ酸が酸性アミノ酸であれば他の酸性アミノ酸への置換、及び置換前のアミノ酸が塩基性アミノ酸であれば他の塩基性アミノ酸への置換が挙げられる。

[0045] 前記(2-1)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、「イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上している」とは、イムノグロブリンのカップ鎖に対する結合能があり、且つポリペプチドをアガロースゲル担体に固定した状態で、下記条件で測定した残存活性が、同条件で測定した配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの残存活性よりも高いことを意味する。より具体的には、下記条件で測定したポリペプチドの残存活性が、同条件で測定した配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの残存活性に比べて 1.8 % 以上、好ましくは 8 % 以上、更に好ましくは 18 % 以上高いことを意味する。なお、前記(2-2)～(2-4)及び(3-1)～(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインでも、同様である。

(測定条件)

アガロースゲル担体に固定化したポリペプチドに対して、0.1 M NaOH水溶液で3回洗浄して同アルカリ溶液に置換した後に25℃にて17時間保温する（アルカリ処理）。次いで、PBSで3回洗浄した後に、ヒトIgGの結合量（mg/mlゲル）を測定する。アルカリ処理しなかった場合についても、アガロースゲル担体に固定化したポリペプチドのヒトIgGの結合量（mg/mlゲル）を測定する。アルカリ処理しなかった場合のポリペプチドのヒトIgGの結合量を100%として、アルカリ処理後のポリペプチドのヒトIgGの結合量の割合を残存活性（%）として算出する。

[0046] 前記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)及び(3-1)～(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインの中でも、前記(1-1)、(2-1)及び(3-1)のイムノグロブリン結合ドメインは、イムノグロブリンに対する結合能、及びアルカリ安定性が格段に優れており、本発明のポリペプチドに含まれるイムノグロブリン結合ドメインとして特に好適である。

[0047] 本発明のポリペプチドは、イムノグロブリン結合ドメインを1個有する単ドメイン型ポリペプチドであってもよく、またイムノグロブリン結合ドメインを2個以上連結した複ドメイン型ポリペプチドであってもよい。本発明のポリペプチドが複ドメイン型ポリペプチドである場合には、イムノグロブリンのカッパ鎖含有断片の結合能が高くなるという利点がある。

[0048] 本発明のポリペプチドが単ドメイン型ポリペプチドである場合には、前記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)及び(3-1)～(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインの内の1個のドメインが含まれていればよい。

[0049] また、本発明のポリペプチドが複ドメイン型ポリペプチドである場合には、前記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)及び(3-1)～(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインの内、少なくとも1個のドメインが含まれていればよく、前記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)及び(3-1)～(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインの内、2個以上のドメインからなるものであってもよく、また、前記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)及び(3-1)～(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインの内、1個以上のドメインと、プロテインLを構成している野生型の各イムノグ

ロブリン結合ドメイン（配列番号１～４に示すアミノ酸配列）やプロテインＡを構成している各イムノグロブリン結合ドメインが１個以上含まれているものであってもよい。本発明のポリペプチドが複ドメイン型ポリペプチドである場合、より一層優れたアルカリ安定性を備えさせるという観点から、構成するイムノグロブリン結合ドメインの全てが、前記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)及び(3-1)～(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれかであるものが好ましい。

[0050] 本発明のポリペプチドを複ドメイン型ポリペプチドにする場合、連結されているイムノグロブリン結合ドメインの総数については、２個以上であればよいが、好ましくは２～１０個、更に好ましくは２～６個が挙げられる。

[0051] 本発明のポリペプチドを複ドメイン型ポリペプチドにする場合、構成する各イムノグロブリン結合ドメインは、それぞれのＣ末端とＮ末端が直接連結されていてもよく、また各各イムノグロブリン結合ドメイン間が１～４０個、好ましくは１～１０個のアミノ酸残基を介して連結されていてもよい。

[0052] また、本発明のポリペプチドは、担体への結合性の付与、ポリペプチドの発現の向上、精製の容易性の付与等のために、他の機能を有するポリペプチド、ペプチドタグ等がＮ末端側又はＣ末端側に付加されていてもよい。このような目的で、本発明のポリペプチドのＮ末端側及び／又はＣ末端側に付加されるアミノ酸の数については、特に制限されないが、例えば１～４００個、好ましくは１～１００個、更に好ましくは１～３０個が挙げられる。

[0053] ２．ＤＮＡ

本発明のポリペプチドをコードしているＤＮＡ（以下、「本発明のＤＮＡ」と表記することもある）は、例えば、野生型のプロテインＬ（配列番号５）をコードしているＤＮＡを鋳型として、目的のイムノグロブリン結合ドメインをコードしているＤＮＡをＰＣＲ等によって取得し、当該ＤＮＡに前記アミノ酸置換が導入されるように変異を導入することにより得ることができる。また、本発明のＤＮＡは、遺伝子の合成法によって人工合成することもできる。

- [0054] ここで、*Peptostreptococcus magunus* 3316株由来の野生型のプロテインL（配列番号5）をコードしているDNAは、例えば、配列番号6に示す塩基配列として知られており、*Peptostreptococcus magunus*3316株からPCRを用いた定法により単離することができる。また、*Peptostreptococcus magunus* 3316株由来の野生型のプロテインLをコードしているDNAは、遺伝子の合成法によって人工合成することもできる。
- [0055] 塩基配列の特定の部位に特定の変異を導入する方法は公知であり、例えばDNAの部位特異的変異導入法等が利用できる。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば、市販のキットを用いて行うこともできる。
- [0056] 塩基配列に変異を導入したDNAは、DNAシーケンサーを用いて塩基配列を確認することができる。一旦、塩基配列が確定されると、その後は化学合成、クローニングされたプローブを鋳型としたPCR、又は当該塩基配列を有するDNA断片をプローブとするハイブリダイゼーションによって、前記ポリペプチドをコードするDNAを得ることができる。
- [0057] また、部位特異的突然変異誘発法等によって前記ペプチドをコードするDNAの変異型であって変異前と同等の機能を有するものを合成することができる。なお、前記ペプチドをコードするDNAに変異を導入するには、Kunkel法、Gapped duplex法、メガプライマーPCR法等の公知の手法によって行うことができる。
- [0058] 本発明のDNAの一例として、配列番号7に示す塩基配列が挙げられる。配列番号7に示す塩基配列からなるDNAは、配列番号1に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位及び第29位がアルギニンに置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードしているDNAである。
- [0059] また、本発明のDNAには、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメインをコードし、且つ、配列番号7に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列を含むDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAが包含される。

[0060] ここで、「ストリンジェントな条件下」とは、0.5% SDS、5×デンハルツ [Denhartz's、0.1%ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400] および100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNAを含む6×SSC (1×SSCは、0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0) 中で、50℃～65℃で4時間～一晩保温する条件をいう。

[0061] ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、具体的には、以下の手法によって行われる。即ち、DNAライブラリー又はcDNAライブラリーを固定化したナイロン膜を作成し、6×SSC、0.5% SDS、5×デンハルツ、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション溶液中、65℃でナイロン膜をブロックする。その後、³²Pでラベルした各プローブを加えて、65℃で一晩保温する。このナイロン膜を6×SSC中、室温で10分間、0.1% SDSを含む2×SSC中、室温で10分間、0.1% SDSを含む0.2×SSC中、45℃で30分間洗浄した後、オートラジオグラフィーをとり、プローブと特異的にハイブリダイズしているDNAを検出することができる。

[0062] 更に、本発明のDNAには、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメインをコードし、且つ配列番号7に示す塩基配列からなるDNAに80%以上の相同性を有するDNAも包含される。当該相同性として、好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上が挙げられる。

[0063] ここで、DNAの「相同性」とは、BLAST PACKAGE [sgl 32 bit edition, Version 2.0.12; available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI)] の bl2seq program (Tatiana A. Tatsusova, Thomas L. Madden, FEMS Microbiol. L

ett., Vol. 174, 247-250, 1999) により得られる同一性の値を示す。パラメーターは、Gap insertion Cost value: 11、Gap extension Cost value: 1 に設定すればよい。

[0064] 本発明のDNAは、コドン利用頻度を宿主に最適化したものが好ましい。例えば、宿主として大腸菌を使用する場合であれば、コドン利用頻度を大腸菌に最適化させたDNAが好適である。

[0065] 3. 組換えベクター

本発明のポリペプチドをコードするDNAを含む組換えベクター（以下、「本発明の組換えベクター」と表記することもある）は、発現ベクターに本発明のDNAを挿入することにより得ることができる。

[0066] 本発明の組換えベクターには、本発明のDNAに作動可能に連結されたプロモーター等の制御因子が含まれる。制御因子としては、代表的にはプロモーターが挙げられるが、更に必要に応じてエンハンサー、CCAATボックス、TATAボックス、SP1部位等の転写要素が含まれていてもよい。また、作動可能に連結とは、本発明のDNAを調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の制御因子と本発明のDNAが、宿主細胞中で作動し得る状態で連結されることをいう。

[0067] 発現ベクターとしては、宿主内で自律的に増殖し得るファージ、プラスミド、又はウイルスから遺伝子組換え用として構築されたものが好適である。このような発現ベクターは公知であり、例えば、商業的に入手可能な発現ベクターとしては、pQE系ベクター（株式会社キアゲン）、pDR540、pRIT2T（GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社）、pET系ベクター（メルク株式会社）等が挙げられる。発現ベクターは、宿主細胞との適切な組み合わせを選んで使用すればよく、例えば、大腸菌を宿主細胞とする場合には、pET系ベクターとBL21（DE3）大腸菌株の組み合わせ、又はpDR540ベクターとJM109大腸菌株の組み合わせなどが好ましく挙げられる。

[0068] 4. 形質転換体

本発明の組換えベクターを用いて宿主を形質転換することによって形質転換体（以下、「本発明の形質転換体」と表記することもある）が得られる。

[0069] 形質転換体の製造に使用される宿主としては、組換えベクターが安定であり、且つ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質を発現できるのであれば特に制限されないが、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属等に属する細菌；酵母等が好適な例として挙げられるが、その他、動物細胞、昆虫細胞、植物等であってもよい。これらの中でも大腸菌が特に好ましい。

[0070] 本発明の形質転換体は、宿主に本発明の組換えベクターを導入することによって得ることができ、宿主に組換えベクターを導入する条件は、宿主の種類等に応じて適宜設定すればよい。宿主が細菌の場合であれば、例えば、カルシウムイオン処理によるコンピテントセルを用いる方法及びエレクトロポレーション法等が挙げられる。宿主が酵母の場合であれば、例えば、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、スフェロプラスト法及び酢酸リチウム法等が挙げられる。宿主が動物細胞の場合であれば、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法及びリポフェクション法等が挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合であれば、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法及びエレクトロポレーション法等が挙げられる。宿主が植物の場合であれば、例えば、エレクトロポレーション法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法及びPEG法等が挙げられる。

[0071] 5. ポリペプチドの製造

本発明のポリペプチドは、前記形質転換体を培養することによって製造することができる。

[0072] 形質転換体の培養条件は、宿主の栄養生理的性質を考慮して適宜設定すればよいが、好ましくは液体培養が挙げられる。また、工業的製造を行う場合であれば、通気攪拌培養が好ましい。

[0073] 本発明の形質転換体を培養し、培養液を遠心分離等の方法により培養上清又は菌体を回収する。本発明のポリペプチドが菌体内に蓄積されている場合であれば、菌体を超音波、フレンチプレス等の機械的方法又はリゾチーム等の溶菌酵素により処理を施し、必要に応じてプロテアーゼ等の酵素やドデシル硫酸ナトリウム（SDS）等の界面活性剤を使用することにより可溶化し、本発明のポリペプチドを含む水溶性画分を得ることができる。

[0074] また、適当な発現ベクターと宿主を選択することにより、発現した本発明のポリペプチドを培養液中に分泌させることもできる。

[0075] 上記のようにして得られた本発明のポリペプチドを含む培養液又は水溶性画分は、そのまま精製処理に供してもよいが、当該培養液又は水溶性画分中の本発明のポリペプチドを濃縮した後に精製処理に供してもよい。

[0076] 濃縮は、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、塩析処理、親水性有機溶媒（例えば、メタノール、エタノールおよびアセトン）による分別沈殿法等により行うことができる。

[0077] 本発明のポリペプチドの精製処理は、例えば、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、イオン交換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等の方法を適宜組み合わせることによって行うことができる。

[0078] このようにして精製された本発明のポリペプチドは、必要に応じて、凍結乾燥、真空乾燥、スプレードライ等により粉末化してもよい。

[0079] 6. イムノグロブリン結合担体

本発明のポリペプチドは、イムノグロブリンの回収や精製を簡便に行うために、不溶性担体に固定化され、イムノグロブリン結合担体として使用される。本発明のポリペプチドの固定化に使用される不溶性担体としては、特に制限されないが、例えば、キトサン、デキストラン、セルロース、アガロースなどの天然由来の高分子材料；ビニルアルコール、ポリイミド、メタクリレートなどの合成有機材料；ガラス、シリカ等の無機材料等が挙げられる。

[0080] 不溶性担体の形状については、特に制限されず、中空糸膜状、モノリス状、ビーズ状等のいずれの形状のものであってもよい。これらの形状の中でも

、ビーズ状は、一般的に、体積当たりの表面積が比較的大きく、イムノグロブリン結合能の高いアフィニティー担体の製造に適しているので、好適である。

[0081] 本発明のポリペプチドを不溶性担体に固定化するには、例えば、本発明のポリペプチド中のアミノ基、カルボキシル基、又はチオール基を不溶性担体とカップリング反応させればよい。具体的には、不溶性担体に対して、シアノゲンブロミド、エピクロロヒドリン、N-ヒドロキシスクシンイミド、トシルクロリド、トレシルクロリド、カルボジイミド、グルタルアルデヒド、ヒドラジン等のカップリング剤と反応させて活性化したり、或は担体にカルボキシル基やチオール基等の反応性官能基を導入したりした後に、本発明のポリペプチドとカップリング反応を行う固定化方法が挙げられる。このようなカップリング反応は、当該技術分野において周知であり（例えば、J a n s o n, J.-C., 編集 [P r o t e i n p u r i f i c a t i o n]、第3版、221-258頁、I S B N 978-0-471-74661-4）、慣用されている方法に従って行うことができる。

[0082] また、本発明のポリペプチド中のアミノ基を介して不溶性担体に固定化する場合であれば、アミノ基と反応して共有結合を形成できる反応性官能基（トレシル基、エポキシ基、カルボキシル基、ホルミル基等）を有する担体を用いることが望ましい。このような不溶性担体としては、トヨパールAF-トレシル-650、トヨパールAF-エポキシ-650、トヨパールAF-カルボキシ-650、トヨパールAF-ホルミル-650（以上、東ソー株式会社）、NHS活性化セファロース、臭化シアン活性化セファロース、エポキシ活性化セファロース（以上、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社）、プロフィニティエポキシド（バイオラッド株式会社）、グリオキサール-アガロース（アガロースビーズテクノロジーズ株式会社）、セルフラインホルミル（JNC株式会社）等として市販されており、これらの市販品を使用することができる。

[0083] 更に、本発明のポリペプチドと不溶性担体が共存する系に、カルボジイミ

ドやグルタルアルデヒド等の縮合又は架橋試薬を加えることによって、本発明のポリペプチドを不溶性担体に固定化することもできる。

[0084] 7. イムノグロブリン又はその断片の分離方法

本発明のポリペプチドは、イムノグロブリンのカッパ鎖に結合するので、Ig G、Ig M、Ig A、Ig D、Ig E等のイムノグロブリン、及びこれらのカッパ鎖含有断片（Fab断片等）等の分離に使用できる。

[0085] 本発明のポリペプチドを用いてイムノグロブリン又はその断片を分離するには、本発明のポリペプチドを固定化した不溶性担体を使用すればよい。具体的には、本発明のポリペプチドを固定化した不溶性担体を用いたイムノグロブリンの分離は、アフィニティーカラム・クロマトグラフィー法によって行うことができる。

[0086] アフィニティーカラム・クロマトグラフィー法によってイムノグロブリンを分離するには、本発明のポリペプチドを固定化した不溶性担体を充填したカラムに、イムノグロブリン又はその断片を含む溶液を通液させた後に、カラム内部を洗浄し、次いで、適切なpHに調整した溶出液をカラムに通液することによって、イムノグロブリンを溶出させればよい。

実施例

[0087] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定して解釈されるものではない。

[0088] 参考例1：ペプトストレプトコッカスマグナス由来プロテインLのイムノグロブリン結合ドメインタンパク質の製造と結合活性及びアルカリ安定性の評価

[各イムノグロブリン結合ドメインの製造]

[設計と改変体の構築]

イムノグロブリン結合ドメイン1を含むキメラタンパク質をPL-021、イムノグロブリン結合ドメイン2を含むキメラタンパク質をPL-022、イムノグロブリン結合ドメイン3を含むキメラタンパク質をPL-023、及びイムノグロブリン結合ドメイン4を含むキメラタンパク質をPL-0

14と命名した。

[0089] [PL-014の発現プラスミド作成]

まず互いの3'末端側の約15塩基が相補的な合成オリゴDNA oligo-166（配列番号8）及びoligo-167（配列番号9）を互いの鋳型にしたPCRにより、DNAフラグメントA1（イムノグロブリンカッパ軽鎖結合ドメイン4の前半部分）を作成した。同様にして合成オリゴDNA oligo-168（配列番号10）及びoligo-169（配列番号11）を用いたPCRにより、DNAフラグメントA2（イムノグロブリンカッパ軽鎖結合ドメイン4の後半部分）を作成した。次に、DNAフラグメントA1及びDNAフラグメントA2を制限酵素EcoRIで切断し、ライゲーション反応により互いに連結してDNAフラグメントA3を得た。次いで、DNAフラグメントA3を鋳型とし、NdeI認識配列を持つ翻訳開始コドンと人工N末端配列「MAQHDEAGLAL」（配列番号12）をコードする配列を含んだ合成オリゴDNA oligo-178（配列番号13）をフォワードプライマー、人工配列「NIK FAGAL」をコードする配列内にEcoO109I認識配列を含んだ合成オリゴDNA oligo-170（配列番号14）をリバースプライマーとしたPCRにより、DNAフラグメントA4を作成した。また別に、人工配列「FAGALPSKS」をコードする配列内にEcoO109I認識配列を含んだ合成オリゴDNA oligo-189（配列番号15）をフォワードプライマー、人工C末端配列「AQAPKKKK」をコードする配列内に続いて翻訳終止コドンとBamHI認識配列を含んだ合成オリゴDNA oligo-191（配列番号16）をリバースプライマーとして用い、特許文献1に示されている改変プロテインA由来イムノグロブリンFc結合Cドメインの第3 α ヘリックス部分配列（8個のリジンを含む21残基の α ヘリックス部分配列；配列番号17）とそれに続く3残基のリジンからなる配列（配列番号18）をコードするDNAフラグメント5を作成した。DNAフラグメントA4をNdeI及びEcoO109Iにて切断し、DNAフラグメント5をEcoO109I及びBamHIにて切断して、一度にpET-9aプラスミド（ノバジェン、メルク株式会社）上のNdeI-

B a m H I 部分に組み込むことにより、N末端側から、人工N末端配列 1 1 残基（配列番号 1 2）、プロテインLのイムノグロブリンカップ軽鎖結合ドメイン4の70残基（配列番号1）、アラニンーロイシンからなる連結配列 2 残基、プロテインA由来イムノグロブリンFc結合Cドメイン第3 α ヘリックスの改変C末端配列 2 1 残基（配列番号 1 7）、及び人工C末端配列 3 残基（配列番号 1 8）がこの順で連結されたキメラタンパク質 P L - O 1 4 の発現プラスミドを得た。

[0090] [P L - O 2 1 の発現プラスミド作成]

P L - O 1 4 の発現プラスミド作成と同様に、まず互いの 3' 末端側の約 1 5 塩基が相補的な合成オリゴDNA oligo-193（配列番号 1 9）及びoligo-194（配列番号 2 0）を互いの鋳型にしたPCRにより、DNAフラグメントB 1 を作成した。同様にして合成オリゴDNA oligo-195（配列番号 2 1）及びoligo-196（配列番号 2 2）を用いたPCRにより、DNAフラグメントB2を作成した。次にDNAフラグメントB 1 及びDNAフラグメントB2を鋳型とし、合成オリゴDNA oligo-178（配列番号 1 3）及びoligo-196（配列番号 2 1）をプライマーとしたPCRによりDNAフラグメントB3を得た。DNAフラグメントB3をN d e I 及びE c o O 1 0 9 I にて切断し、E c o O 1 0 9 I 及びB a m H I にて切断したDNAフラグメント5とともに一度にp E T - 9 a プラスミド上のN d e I - B a m H I 部分に組み込むことにより、N末端側から、人工N末端配列 1 1 残基（配列番号 1 2）、プロテインLのイムノグロブリンカップ軽鎖結合ドメイン1の69残基（配列番号4）、アラニンーロイシンからなる連結配列 2 残基、プロテインA由来イムノグロブリンFc結合Cドメイン第3 α ヘリックスの改変C末端配列 2 1 残基（配列番号 1 7）、及び人工C末端配列 3 残基（配列番号 1 8）がこの順で連結されたキメラタンパク質 P L - O 2 1 の発現プラスミドを得た。

[0091] [P L - O 2 2 の発現プラスミド作成]

プロテインLのイムノグロブリンカップ軽鎖結合ドメイン2はドメイン4とN末端から37残基が同一配列であるので、先に作成したDNAフラグメン

トA1をそのまま使用した。また互いの3'末端側の約15塩基が相補的な合成オリゴDNA oligo-199（配列番号23）及びoligo-201（配列番号24）を互いの鋳型にしたPCRにより、DNAフラグメントC2を作成した。次にDNAフラグメントA1及びフラグメントC2を制限酵素EcoRIで切断し、ライゲーション反応により互いに連結してDNAフラグメントC3を得た。PL-014の発現プラスミドを鋳型として、合成オリゴDNA oligo-200（配列番号25）及びoligo-191（配列番号16）をプライマーとしたPCRにより、DNAフラグメントC4を作成した。DNAフラグメントC3及びDNAフラグメントC4は部分的に重複する配列を持つように設計されており、これらを鋳型として合成オリゴDNA oligo-178（配列番号13）及びoligo-191（配列番号16）をプライマーとしたPCRにより、PL-022をコードするcDNAが得られた。このcDNAをNdeI及びBamHIにて切断し、pET-9aプラスミド上のNdeI-BamHI部分に組み込むことにより、N末端側から、人工N末端配列11残基（配列番号12）、プロテインLのイムノグロブリンカップ軽鎖結合ドメイン2の70残基（配列番号3）、アラニン-ロイシンからなる連結配列2残基、プロテインA由来イムノグロブリンFc結合Cドメイン第3 α ヘリックスの改変C末端配列21残基（配列番号17）、及び人工C末端配列3残基（配列番号18）がこの順で連結されたキメラタンパク質PL-022の発現プラスミドを得た。

[0092] [PL-023の発現プラスミド作成]

PL-014の発現プラスミドを鋳型とし、合成オリゴDNA oligo-197（配列番号26）及びoligo-198（配列番号27）をプライマーとしたPCRによりDNAフラグメントD1を作成した。また互いの3'末端側の約15塩基が相補的な合成オリゴDNA oligo-199（配列番号23）及びoligo-202（配列番号28）を互いの鋳型にしたPCRにより、DNAフラグメントD2を作成した。次にDNAフラグメントD1及びDNAフラグメントD2を鋳型とし、合成オリゴDNA oligo-197（配列番号26）及びoligo-202（配列番号28）をプライマーとしたPCRによりDNAフラグメントD3を作成した。プロテインL

のイムノグロブリンカップ軽鎖結合ドメイン3はC末端側から26残基がドメイン2と同一配列であるので、先に作成したDNAフラグメントC4をそのまま使用し、DNAフラグメントD3及びDNAフラグメントC4を鋳型として合成オリゴDNA oligo-178（配列番号13）及びoligo-191（配列番号16）をプライマーとしたPCRにより、PL-023をコードするcDNAが得られた。このcDNAをNdeI及びBamHIにて切断し、pET-9aプラスミド上のNdeI-BamHI部分に組み込むことにより、N末端側から、人工N末端配列11残基（配列番号12）、プロテインLのイムノグロブリンカップ軽鎖結合ドメイン3の70残基（配列番号2）、アラニン-ロイシンからなる連結配列2残基、プロテインA由来イムノグロブリンFc結合CDメイン第3 α ヘリックスの改変C末端配列21残基（配列番号17）、及び人工C末端配列3残基（配列番号18）がこの順で連結されたキメラタンパク質PL-023の発現プラスミドを得た。

[0093] 以上のようにして得た各イムノグロブリン結合ドメインの発現プラスミドの核酸配列を、CEQ8000型DNAシーケンサー（ベクマンコールター株式会社）を用いて解析し、設計どおりの配列であることを確認した。次に各発現プラスミドにてBL21（DE3）コンピテントセル（メルク株式会社）を形質転換することで、各タンパク質の発現株を得た。

[0094] それぞれのイムノグロブリン結合ドメインの発現大腸菌株を、25mg/Lのカナマイシン及び2.0%グルコースを含むLB培地にて12時間種培養した。得られた種培養液を、25mg/Lのカナマイシン及び0.8%グルコースを含む2×TY培地に接種し、37℃にて16時間培養して目的とするイムノグロブリン結合ドメインを発現させた後、遠心分離によって大腸菌を回収した。次に、回収した大腸菌を50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.5）に懸濁し、超音波処理して大腸菌を破碎し、更に遠心分離によって目的のイムノグロブリン結合ドメインを上清に回収した。得られた各上清を菌体抽出液としてドデシル硫酸ナトリウム-15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）に供したところ、各分子量の位置に目

的のイムノグロブリン結合ドメインが生産されていることが確認できた。

[0095] [各イムノグロブリン結合ドメインの精製と純度検定]

各イムノグロブリン結合ドメインの菌体抽出液をpH 6.0に調整したのちに、陽イオン交換体SP-セファロースファストフロー（GEヘルスケア株式会社）カラムにアプライした。20 mMリン酸バッファー（pH 6.0）にて洗浄後、0.5 M NaClの直線的濃度勾配によりカラムからタンパク質を溶出した。溶出液をSDS-PAGEにて確認したところ、目的となるイムノグロブリン結合ドメインは0.1から0.2 M NaCl間に溶出していた。次に、イムノグロブリン結合ドメインを含む同溶出液のpHを9に調整した後に陰イオン交換体ギガキャップQ（東ソー株式会社）カラムに添加した。20 mMリン酸バッファー（pH 7.8）にて洗浄後、0.3 M NaCl直線的濃度勾配にてイムノグロブリン結合ドメインを分離溶出した。各溶出液をSDS-PAGEに供して純度を確認した結果、各イムノグロブリン結合ドメインは理論値の分子量の位置に単一バンドとして精製されていることを確認した。

[0096] [ゲル担体への固定化とイムノグロブリン結合活性測定による評価]

精製した各イムノグロブリン結合ドメインを、ホルミル活性化アガロースゲル担体に10 mg/mLゲルの濃度で常法に従って、それぞれ固定化した。固定化後の反応溶液を回収し、固定化率を測定したところ、すべての各イムノグロブリン結合ドメインにおいて固定化効率が90%以上であった。更に固定化反応後のゲル担体をPBS溶液で洗浄後、40 mg/mLのヒトIgG（化学及血清療法研究所より入手）を含むPBS溶液を加えて1時間振とうした後に、PBSで洗浄したゲル担体から0.1 M グリシン塩酸バッファー（pH 2.5）でゲル担体に結合したヒトIgGを溶出した。その溶出液を分光光度計にて280 nmの吸収を測定し、13.8 ($1 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)の比吸光係数をもとに結合したイムノグロブリン量（IgG結合活性）を求めた。

[0097] 各イムノグロブリン結合ドメインのゲルへの固定化量及びIgG結合活性

を表1に示す。この結果より、プロテインLの4つのドメイン中で、ドメイン4が最も高いIgG結合活性を有することが分かった。

[0098] [表1]

イムノグロブリン結合ドメインのIgG結合活性

ドメイン名	番号	固定化量 mg/mLゲル	IgG結合活性 mg/mLゲル
ドメイン1	PL-021	9.6	45.3
ドメイン2	PL-022	9.5	53.3
ドメイン3	PL-023	9.4	52.2
ドメイン4	PL-014	9.6	57.4

[0099] [各イムノグロブリン結合ドメインとヒトIgG及びヒトFabとの分子間相互作用解析]

分子間相互作用解析装置BLITZ（ポール社製）を用いて溶液中の各イムノグロブリン結合ドメインとヒトIgG及びヒトFab断片との相互作用を解析した。ビオチン化ヒトIgGはビオチン化キット（EZ-Link Biotinylation Kit、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて調製した。0.1% BSA（牛血清アルブミン）含有20mM MES緩衝液（pH6.5）で0.1mg/mLに調製したビオチン化IgGとストレプトアビジンセンサーチップを室温で60分間インキュベートすることにより、IgG固定化チップを作製した。その後、20mM MES緩衝液（pH6.5）で洗浄した同センサーチップを精製イムノグロブリン結合ドメインPL-021、PL-022、PL-023、及びPL-014の各1.6μg/mL濃度を含む0.1%BSA含有20mM MES緩衝液（pH6.5）に添加し、50秒後の各イムノグロブリン結合ドメインの結合量をそれぞれ測定した。その結果、PL-014>PL-023=PL-022>PL-021の順位で結合活性が高かった。

[0100] 次に、ヒトIgGをパパイン処理して調製したFabを同様の方法でビオチン化したのちにストレプトアビジンセンサーチップに固定化して、各イムノグロブリン結合ドメインの結合量を測定した結果、Fabに対してもドメイン4のPL-014が最も高い結合活性を示した。

[0101] 以上の結果から、溶液中においてもイムノグロブリン結合ドメイン4はIgGのカップ軽鎖に対して最も高い結合能を示すことが分かった。

[0102] [固定化ゲル担体のアルカリpH条件での安定性の評価]

次に、4つのイムノグロブリン結合ドメイン固定化ゲル担体を0.1M NaOH水溶液で3回洗浄して同アルカリ溶液に置換した後に25℃にて17時間保温した。その後、PBSで3回洗浄し、前記と同条件でヒトIgG結合活性を測定した。アルカリ処理前のそれぞれのIgG結合量を100%としたときの17時間処理後の残存IgG結合量の割合をアルカリ処理後の残存活性(%)として求めた。得られた結果を表2に示す。

[0103] この結果から、PL-014>PL-023>PL-022>PL-021の順位で高いアルカリ安定性を示した。これより、プロテインLの4つのドメインの中でも、ドメイン4が最もアルカリ安定性が高いことが明らかとなった。以後、このドメイン4を基本設計として更にアルカリ安定性の高い改変体の創出を試みた。

[0104] [表2]

イムノグロブリン結合ドメインのアルカリ安定性

ドメイン名	番号	固定化量 mg/mLゲル	アルカリ処理後の 残存活性(%)
ドメイン1	PL-021	9.6	17.7
ドメイン2	PL-022	9.5	39.1
ドメイン3	PL-023	9.4	42.9
ドメイン4	PL-014	9.6	64.1

[0105] 実施例1：イムノグロブリン結合ドメイン4の改変体の製造と結合活性及びアルカリ安定性評価

[改変体の製造]

イムノグロブリン結合活性とアルカリ安定性が高いイムノグロブリン結合ドメイン4を基本配列として、更なるアルカリ安定性の向上を目指して、イムノグロブリン結合ドメイン4における2位のトレオニン残基と、7位、13位、22位、29位、48位、及び67位の7個のリジン残基の合計8個のアミノ酸残基に注目してアミノ酸を置換した改変体を作製した。

[0106] [設計と改変体の構築]

ドメイン4を基本配列として、表3に示す2位のトレオニン残基と、7位、13位、22位、29位、48位、及び67位の7個のリジン残基を各々置換した改変体を作製した。

[0107] [PL-024の発現プラスミド作成]

まず、PL-014の配列上に存在するイムノグロブリン結合ドメイン4領域（配列番号1）における7位、13位、22位、29位、48位、及び67位の7箇所のリジン残基をアルギニン残基にそれぞれ置換した改変体PL-024の発現プラスミドを構築した。

[0108] PL-023の発現プラスミドを鋳型とし、合成オリゴDNA oligo-178（配列番号13）及びoligo-203（配列番号29）をプライマーとしたPCRによりDNAフラグメントE1を作成した。またPL-014の発現プラスミドを鋳型とし、合成オリゴDNA oligo-204（配列番号30）及びoligo-205（配列番号31）をプライマーとしたPCRによりDNAフラグメントE2を作成した。同様にPL-014の発現プラスミドを鋳型とし、合成オリゴDNA oligo-206（配列番号32）及びoligo-207（配列番号33）をプライマーとしたPCRによりDNAフラグメントE3を作成した。次に、DNAフラグメントE1及びDNAフラグメントE2を鋳型として、oligo-178（配列番号13）及びoligo-205（配列番号31）をプライマーとしたPCRによりPL-024の前半のDNAフラグメントE4を、フラグメントE3及びフラグメント5を鋳型として合成オリゴDNA oligo-206及びoligo-191をプライマーとしたPCRによりPL-024の後半のDNAフラグメントE5を作成した。最後にDNAフラグメントE4及びDNAフラグメントE5を鋳型として合成オリゴDNA oligo-178（配列番号13）及びoligo-191（配列番号16）をプライマーとしたPCRによりPL-024のcDNAフラグメント全体を作成し、このcDNAをNdeI及びBamHIにて切断して、pET-9aプラスミド上のNdeIーBamHI部分に組み込むことにより、キメラタンパク質PL-024の発現プラスミドを得た。

[0109] [2位、7位、13位、22位、29位、48位、及び67位の8個のアミノ酸残基の置換の組み合わせを持つキメラタンパク質の発現プラスミド作成]

次に、イムノグロブリン結合ドメイン4領域（配列番号1）における2位、7位、13位、22位、29位、48位、及び67位の8箇所のアミノ酸残基の複数の置換の組み合わせを持つ変異体をコードするcDNAを調製した。具体的には、PL-014のcDNAを鋳型とし、それぞれの位置の塩基配列を変異させたオリゴDNAを準備し、オーバーラップ伸張法（二段階PCR法）にてまず2位、7位、13位、22位、29位、48位、67位それぞれの位置の一アミノ酸置換体をコードするcDNAフラグメントを作成した。次に、一アミノ酸置換体のcDNAを鋳型として同様のオーバーラップ伸張法（二段階PCR法）にて別の位置の変異を導入した。更に、得られた変異体プラスミドを鋳型とし、別の位置に変異をもたらすプライマーを用いたPCRによって、種々の組み合わせの複数の部位にアミノ酸置換を含む変異体のcDNAフラグメントを調製した。

[0110] 以上のようにして得た各改変体cDNAを実施例1と同様に大腸菌発現ベクターpET9a上に挿入して発現プラスミドを構築した。得られた各改変体の置換パターンを表3に示す。

[0111]

[表3]

	配列番号 1 に示すアミノ酸配列における改変部位と置換アミノ酸						
	2 位	7 位	13 位	22 位	29 位	48 位	67 位
野生型 (PL-014)	T	K	K	K	K	K	K
改変体							
PL-024		R	R	R	R	R	R
PL-026	K	R	R				
PL-027		R	R	R			
PL-028	K				R	R	R
PL-035		R	R				
PL-036	K	R	R	R			
PL-038	R	R	R	R	R	R	R
PL-043	R						
PL-044	K			R			
PL-045	R			R			
PL-046	K	R		R			
PL-047	K		R	R			
PL-048	K		R	R	R		
PL-049	K	R	R	R	R		
PL-050	K	R	R	T			
PL-051	K	R	R	L			
PL-052	K	R	R	H			
PL-053	K	R	R	E			
PL-054	K	R	R	Q			
PL-055	K	R	R	F			
PL-056	K	R	R	A			
PL-057	K	R	R		R		
PL-058	K	R		R	R		
PL-059	K	R			R		
PL-060	K	T	R	R			

表中、各改変体において、アミノ酸部位において空欄になっている箇所は変異を導入していないこと（即ち、2 位は T ; 7 位、13 位、22 位、29 位、48 位及び 67 位は K）を示す。

[0112] 斯くして得た発現プラスミドの核酸配列を、CEQ8000型DNAシーケンサー（ベックマンコールター株式会社）を用いて解析し、設計通りの配列であることを確認した。次に、各発現プラスミドにてBL21（DE3）コンピテントセル（メルク株式会社）を形質転換することにより、各イムノグロブリン結合ドメイン4改変体の発現株を得た。

[0113] それぞれのイムノグロブリン結合ドメイン4の改変体を発現する大腸菌株を、前記参考例1と同様の手法で、37℃にて16時間培養して目的とするイムノグロブリン結合ドメイン4改変体を発現させた後、遠心分離によって

大腸菌を回収した。次に回収した大腸菌を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に懸濁し、超音波処理して大腸菌を破碎し、更に遠心分離によって目的のイムノグロブリン結合ドメイン 4 改変体を上清に回収した。得られた各上清を菌体抽出液として SDS-PAGE に供したところ、各分子量の位置に目的となるイムノグロブリン結合ドメイン 4 の改変体が生産されていることが確認できた。

[0114] [各改変体の精製と純度検定]

各改変体の菌体抽出液を pH 6.0 に調整した後に、参考例 1 と同様の手法で陽イオン交換体 SP-セファロースファストフロー (GEヘルスケア株式会社) カラムにアプライし、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) にて洗浄後、0.5 M NaCl の直線的濃度勾配にてタンパク質を溶出した。目的の改変体が含まれる溶出画分を集めて pH を 9 に調整した後に陰イオン交換体ギガキャップ Q (東ソー株式会社) カラムに添加した。20 mM リン酸バッファー (pH 7.8) にて洗浄後、0.3 M NaCl 直線的濃度勾配にて目的の改変体を溶出した。各溶出液を SDS-PAGE に供して純度を確認した結果、各改変体は理論値の分子量の位置に単一バンドとして精製されていることを確認した。

[0115] [ゲル担体への固定化とイムノグロブリン結合活性測定による評価]

精製した各改変体を、ホルミル活性化アガロースゲル担体に 10 mg/mL ゲルの濃度で常法に従って、それぞれ固定化した。固定化後の反応溶液を回収し、固定化率を測定したところ、すべての改変体の固定化効率が 95% 以上であることを確認した。次に、参考例 1 と同様の方法で各固定化ゲル担体のヒト IgG 結合活性を測定した。

[0116] 得られた結果を表 4 に示す。この結果から、配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、7 位、13 位、22 位、29 位、48 位、及び 67 位の 7 つのリジン残基全てを置換した PL-024 と PL-038 は、PL-014 よりも 11% 高い活性を示した。配列番号 1 に示すアミノ酸配列における 29 位、48 位、及び 67 位をアルギニンに置換すると、5% 活性が高くなった

。また、配列番号 1 に示すアミノ酸配列における 7 位、13 位、22 位、29 位、48 位、及び 67 位のリジン残基のアルギニンへの置換数が多いほど、活性が高くなる傾向が認められた。

[0117] [表4]

	配列番号 1 に示すアミノ酸配列における改変部位と置換アミノ酸							I g G 結合活性 mg/mL ゲル
	2 位	7 位	13 位	22 位	29 位	48 位	67 位	
野生型 (PL-014)	T	K	K	K	K	K	K	57.0
改変体								
PL-024		R	R	R	R	R	R	63.4
PL-026	K	R	R					57.8
PL-027		R	R	R				58.6
PL-028	K				R	R	R	60.1
PL-035		R	R					56.9
PL-036	K	R	R	R				59.1
PL-038	R	R	R	R	R	R	R	63.6
PL-043	R							59.3
PL-044	K			R				58.9
PL-045	R			R				60.6
PL-046	K	R		R				59.7
PL-047	K		R	R				59.2
PL-048	K		R	R	R			57.9
PL-049	K	R	R	R	R			59.7
PL-050	K	R	R	T				59.0
PL-051	K	R	R	L				57.3
PL-052	K	R	R	H				58.5
PL-053	K	R	R	E				55.9
PL-054	K	R	R	Q				58.4
PL-055	K	R	R	F				57.3
PL-056	K	R	R	A				61.6
PL-057	K	R	R		R			55.6
PL-058	K	R		R	R			58.6
PL-059	K	R			R			56.1
PL-060	K	T	R	R				57.6

表中、各改変体において、アミノ酸部位において空欄になっている箇所は変異を導入していないこと（即ち、2 位は T ; 7 位、13 位、22 位、29 位、48 位及び 67 位は K）を示す。

[0118] [ゲル担体に固定化した各改変体のアルカリ条件での安定性の評価]

各改変体を固定化したゲル担体を 0.1 M NaOH 水溶液に置換した後に、25℃にて 17 時間保温した。その後、PBS で 3 回洗浄し、前記と同条件でヒト IgG 結合活性を測定した。アルカリ処理前のそれぞれの IgG 結合量を 100% としたときの 17 時間処理後の残存 IgG 結合量の割合をア

ルカリ処理後の残存活性（％）として求めた。得られた結果を表5に示す。

[0119] 表5から分かるように、配列番号1に示すアミノ酸配列における2位のトレオニン残基をリジン又はアルギニンに置換しても、アルカリ安定性に影響は与えなかった。

[0120] また、配列番号1に示すアミノ酸配列における7位、13位、22位、29位、48位、及び67位のリジン残基の全てをアルギニンに置換した場合には、格段に高いアルカリ安定性が認められた（PL-024及びPL-038）。

[0121] 更に、配列番号1に示すアミノ酸配列における7位、13位、22位、及び29位の4か所のリジン残基をアルギニンに置換した場合（PL-049）では、最も高いアルカリ安定性が認められ、7位、13位、及び22位の3か所のリジン残基をアルギニンに置換した場合（PL-027、PL-036）、並びに13位、22位、及び29位の3か所のリジン残基をアルギニンに置換した場合（PL-048）、7位、13位、及び29位の3か所のリジン残基をアルギニンに置換した場合（PL-057）、7位、22位、及び29位の3か所のリジン残基をアルギニンに置換した場合（PL-058）でも、優れたアルカリ安定性を備えていた。また、配列番号1に示すアミノ酸配列における7位、13位、22位、及び29位のリジン残基の内、2つをアルギニンに置換した場合（PL-026、PL-035、PL-046、PL-047、PL-059）でも、野生型（PL-014）に比して、アルカリ安定性の向上が認められた。一方、配列番号1に示すアミノ酸配列における7位、13位、22位、及び29位のリジン残基の内、1つのリジン残基のみを置換した場合（PL-044）では、アルカリ安定性の向上は認められなかった。

[0122] 一方、配列番号1に示すアミノ酸配列における7位及び13位のリジン残基をアルギニンに置換し、且つ22位のリジン残基をトレオニンに置換した場合（PL-050）には、アルカリ安定性の向上が認められた。同じく22位をヒスチジンに置換した場合（PL-052）は、変異を導入していない22位がリジン残基の場合（PL-026、PL-035）と同等のアルカリ安定性を示したが、22位のリジン残基をロイシン、グルタミン酸、グルタミン、フェニルアラニ

ン、又はアラニンに置換した場合には、アルカリ安定性の低下が認められた。以上の結果から、22位のリジン残基は、塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸の置換が望ましいことが確認された。

[0123] イムノグロブリン結合ドメイン4（配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド）の三次元構造（図2）において、7位のリジン残基は、 α ヘリックス構造1中の33位のグルタミン酸残基と相互作用し易い位置に配置されている。そのため、7位のリジン残基を、グルタミン酸とイオン結合又は水素結合をするアミノ酸（即ち、塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸）に置換すると、33位のグルタミン酸残基との相互作用によって、アルカリ安定性の向上が図られると推測される。

[0124] また、同様のことが、配列番号1に示すアミノ酸配列における13位、22位、及び29位のリジン残基でも当てはまる。具体的には、配列番号1に示すアミノ酸配列における13位のリジン残基は β シート1中に存在しており、これは β シート2中に存在する27位のグルタミン酸と相互作用し易い位置に配置されている。また、配列番号1に示すアミノ酸配列における22位のリジン残基は β シート1と β シート2の間のループ部分に存在しており、これは同ループ部分に存在する20位のアスパラギン酸と相互作用し易い位置に配置されている。更に、配列番号1に示すアミノ酸配列における29位のリジン残基は β シート1中に存在する8位のグルタミン酸及び／又は11位のトレオニンと相互作用し易い位置に配置されている。そのため、配列番号1に示すアミノ酸配列における13位、22位、及び29位のリジン残基を、グルタミン酸、アスパラギン酸及び／又は11位のトレオニンとイオン結合又は水素結合をするアミノ酸（即ち、塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸）に置換することにより、これらのアミノ酸間の相互作用によってアルカリ安定性の向上が図られると推測される。このことは、PL-050とPL-052ではアルカリ安定性の向上が認められたが、PL-051、PL-053～PL-056ではアルカリ安定性の向上が認められなかった前記実験結果と符合している。

[0125] 即ち、以上の結果から、配列番号1に示すアミノ酸配列における7位、1

3 位、22 位、及び29 位のリジン残基の内、少なくとも2 個以上を塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換することによって、アルカリ安定性の向上が図れることが明らかとなった。

[0126] [表5]

	配列番号1に示すアミノ酸配列における改変部位と置換アミノ酸							アルカリ処理後の 残存活性 (%)
	2位	7位	13位	22位	29位	48位	67位	
野生型 (PL-014)	T	K	K	K	K	K	K	61.5
改変体								
PL-024		R	R	R	R	R	R	79.6
PL-026	K	R	R					63.8
PL-027		R	R	R				73.8
PL-028	K				R	R	R	54.6
PL-035		R	R					63.3
PL-036	K	R	R	R				73.9
PL-038	R	R	R	R	R	R	R	79.9
PL-043	R							61.3
PL-044	K			R				60.1
PL-045	R			R				60.6
PL-046	K	R		R				63.9
PL-047	K		R	R				66.9
PL-048	K		R	R	R			76.3
PL-049	K	R	R	R	R			81.6
PL-050	K	R	R	T				70.3
PL-051	K	R	R	L				60.5
PL-052	K	R	R	H				64.2
PL-053	K	R	R	E				55.6
PL-054	K	R	R	Q				57.1
PL-055	K	R	R	F				58.7
PL-056	K	R	R	A				56.4
PL-057	K	R	R		R			70.6
PL-058	K	R		R	R			76.4
PL-059	K	R			R			64.3
PL-060	K	T	R	R				69.2

表中、各改変体において、アミノ酸部位において空欄になっている箇所は変異を導入していないこと（即ち、2 位はT；7 位、13 位、22 位、29 位、48 位及び67 位はK）を示す。

[0127] 実施例2：イムノグロブリン結合ドメイン4改変体の複ドメイン型ポリペプチドの製造と結合活性及びアルカリ安定性評価

[複ドメイン型ポリペプチド発現プラスミドの構築とタンパク質発現]

改変体PL-024キメラタンパク質のDNA配列は、NdeI認識配列を持つ翻訳開始コドン（CATATG）と人工N末端配列「MAQHDEAGLAL」をコードする配列にプロテインLのイムノグロブリンカップ軽鎖

結合ドメイン改変ドメインをコードする配列が続く、そのC末端部分の人工配列「N I K F A G A L」をコードする配列内にE c o O 1 0 9 I 認識配列（G G G G C C T）を有し、更にプロテインAのイムノグロブリンFc結合Cドメイン第3アルファヘリックスの改変C末端配列21残基が続く、最後に人工C末端配列「K K K」をコードする配列と翻訳終止コドン及びB a m H I 認識配列を含んでいる。このP L - 0 2 4 キメラタンパク質のc D N A を予めプラスミド上のE c o O 1 0 9 I 切断部位を削除したp U C 1 9 プラスミドのクローニングサイトに挿入して得られたプラスミドを複ドメイン型ポリペプチドc D N A の構築に用いた。

[0128] 改変体P L - 0 2 4 のc D N A を鋳型とし、合成オリゴD N A oligo210（配列番号34）及びoligo211（配列番号35）をプライマーとしたP C R によりN及びC両末端にE c o O 1 0 9 I 認識配列を持つプロテインLのイムノグロブリンカップ軽鎖結合ドメイン改変ドメイン部分のみのc D N A フラグメントを調製し、このフラグメントの両端をE c o O 1 0 9 I にて切断した。次に、上記P L - 0 2 4 キメラタンパク質のc D N A をサブクローニングしたp U C 1 9 プラスミドをE c o O 1 0 9 I で切断し、切断部位をアルカリフォスファターゼにより脱リン酸化した後、この部位にライゲーション反応により上記P C R フラグメントを挿入した。この反応によってフラグメントが1個挿入されたクローンでは、N末端側から、プロテインLのイムノグロブリンカップ軽鎖結合ドメイン改変ドメインが2個連結された後ろにプロテインAのイムノグロブリンFc結合Cドメイン第3 α ヘリックスの改変C末端配列21残基（配列番号17）、及び人工C末端配列（配列番号18）がこの順で続く形の2量体のキメラタンパク質のc D N A として得られ、同様にフラグメントが3個挿入されたクローンでは4量体のキメラタンパク質のc D N A として、フラグメントが5個挿入されたクローンでは6量体のキメラタンパク質のc D N A として得られた。

[0129] なお、プロテインAのイムノグロブリンFc結合Cドメイン第3 α ヘリックスの改変C末端配列21残基が「P K」の2残基または「P K K K K K」

の6残基といったより短い配列であってもよく、付加するC末端配列が改変体の複ドメイン型ポリペプチドのアルカリ安定性に影響を及ぼさないことを確認している。このように付加するC末端配列は、プロテインAのイムノグロブリンFc結合Cドメイン第3 α ヘリックスの改変配列に限定されるものではなく、ゲル担体の固定化において反応しやすいアミノ酸残基を多く含む配列とすることにより、改変体を配向制御してゲルへ固定化することが可能である。

[0130] 以上の様にして得た4量体PL-424と6量体PL-624のcDNAをサブクローニングしたpUC19プラスミドから制限酵素NdeI及びBamHIにより各cDNAを切り出し、これを大腸菌発現ベクターであるpET9a上のNdeI-BamHIサイトに挿入して発現プラスミドを構築し、それぞれの発現プラスミドの核酸配列を、CEQ8000型DNAシーケンサー（ベックマンコールター株式会社）を用いて解析し、設計通りの配列であることを確認した。次に各発現プラスミドにてBL21(DE3)コンピテントセル（メルク株式会社）を形質転換することで、各複ドメイン型ポリペプチドの発現株を得た。

[0131] 各発現株を、25mg/Lのカナマイシンと2.0%グルコースを含むLB培地にて12時間種培養し、この種培養液を25mg/Lのカナマイシンと0.8%グルコースを含む2×TY培地に接種し、37℃にて16時間培養して目的とする複ドメイン型ポリペプチドを発現させた後、遠心分離によって大腸菌を集めた。次に集めた大腸菌を50mM MES緩衝液（pH6.0）に懸濁し、超音波処理して大腸菌を破碎し、遠心分離によって目的の複ドメイン型ポリペプチドを上清に回収した。得られた各上清を菌体抽出液としてSDS-PAGEに供したところ、それぞれの分子量の位置に目的の複ドメイン型ポリペプチドが生産されていることが確認できた。なお、得られた4量体PL-424のアミノ酸配列を配列番号36に示し、得られた6量体PL-624のアミノ酸配列を配列番号37に示す。

[0132] [複ドメイン型ポリペプチドの精製と純度検定]

複ドメイン型ポリペプチド PL-424 と PL-624 の菌体抽出液をそれぞれ pH 6.0 に調整したのちに、前記参考例 1 と同様の方法で陽イオン交換体 SP-セファロースファストフロー（GEヘルスケア株式会社）カラムにアプライし、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）にて洗浄後、0.2 M NaCl の直線濃度勾配にてタンパク質を溶出した。目的の多量体が含まれる溶出画分を集めて pH を 8 に調整した後に陰イオン交換体ギガキャップ Q（東ソー株式会社）カラムに添加した。20 mM リン酸バッファ（pH 7.8）にて洗浄後、0.35 M NaCl 直線濃度勾配にて目的の複ドメイン型ポリペプチドを溶出させた。各溶出液を SDS-PAGE に供して純度を確認した結果、各複ドメイン型ポリペプチドは理論値の分子量の位置に単一バンドとして精製されていることを確認した。

[0133] [ゲル担体への固定化とイムノグロブリン結合活性測定による評価]

精製した複ドメイン型ポリペプチド PL-424 と PL-624 を、ホルミル活性化アガロースゲル担体に 10 mg/mL ゲルの濃度で、常法に従ってそれぞれ固定化した。固定化後の反応溶液を回収して固定化率を測定したところ、PL-424 と PL-624 は、それぞれ 97.3% と 98.0% の固定化率であった。次に、前記参考例 1 と同様の方法で各固定化ゲル担体の ヒト IgG 結合活性を測定した。更に、比較のために、天然配列の 4 量体（プロテイン L）が 10 mg/mL ゲルで固定化されている Captol（GEヘルスケア社）を使用して、同様に ヒト IgG 結合活性を測定した。その結果を表 6 に示す。さらに、ヒト IgG をパパイン処理して調製した精製 Fab を 20 mg/mL 濃度含む PBS 溶液を各固定化ゲルに加えて 1 時間振とうした後に、ヒト IgG の場合と同様の方法で結合活性を測定した。なお Fab 量は $13.5 \text{ (1 g}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ の比吸光係数を用いて求めた。

[0134] ヒト IgG 結合活性は、単ドメイン型ポリペプチド PL-024 と比べると複ドメイン型ポリペプチド PL-424（ドメイン数 4）は 144%、複ドメイン型ポリペプチド PL-624（ドメイン数 6）は 151% とそれぞれ単ドメイン型ポリペプチドよりも高い活性を示すことが分かった。分子量

が145 kDaのIgGに対して47 kDaのFab断片がIgGに近い結合量であることは注目すべき点である。それぞれの分子量に基づいてモル数を計算すると、PL-424（ドメイン数4）10mgで632 nmol、PL-624（ドメイン数6）10mgで661 nmolのIgGが結合したことになる。一方、Fab断片は、PL-424（ドメイン数4）10mgで1540 nmol、6PL-624（ドメイン数6）10mgで1615 nmolが結合した。即ち、発明の複ドメイン型ポリペプチドには、IgGに対する結合能よりも、Fab断片に対する結合能の方が格段に高いことが明らかとなった。これは、Fabは分子サイズが小さいので結合において立体障害が起こりにくいからであると考えられる。

[0135] 一方、天然配列の複ドメイン型ポリペプチド（ドメイン数4）（プロテインL）が10mg/mLゲルで固定化されているCaptorL（GEヘルスケア社）と比較すると、本発明の多量体は、Fab断片で約2.4倍、IgGで2.2倍の結合量であった。

[0136] [表6]

名称		Fab結合活性 mg/mLゲル	IgG結合活性 mg/mLゲル
PL-424	4量体	72.4	91.6
PL-624	6量体	75.9	95.8
CaptorL (比較例)	4量体 (天然型)	30.9	43.6

[0137] [ゲル担体に固定化した複ドメイン型ポリペプチドのアルカリpH条件での安定性の評価]

各ドメイン型ポリペプチドを固定化したゲル担体を0.1M NaOH水溶液に置換した後に、25℃にて17時間保温した。その後、PBSで3回洗浄し、前記と同条件でヒトIgG結合活性を測定した。アルカリ処理前のそれぞれのIgG結合量を100%としたときの17時間処理後の残存IgG結合量の割合をアルカリ処理後の残存活性（%）として求めた。得られた結果を表7に示す。

[0138] 複ドメイン型ポリペプチド P L - 4 2 4 (ドメイン数 4) と P L - 6 2 4 (ドメイン数 6) は単ドメイン型ポリペプチド P L - 0 2 4 とほぼ同様のアルカリ安定性を示すことが分かった。天然配列の複ドメイン型ポリペプチド (ドメイン数 4) の C a p t o L と比較すると、P L - 4 2 4 で 1. 4 倍、P L - 6 2 4 で 1. 5 倍の高いアルカリ安定性を備えていることがわかった。

[0139] [表7]

名称		アルカリ処理後の 残存活性 (%)
P L - 4 2 4	4 量体	7 9 . 3
P L - 6 2 4	6 量体	8 3 . 8
C a p t o L (比較例)	4 量体 (天然型)	5 5 . 3

[0140] 実施例 3 : イムノグロブリン結合ドメイン 3 の改変体の製造と結合活性及びアルカリ安定性評価

[改変体の製造]

次に、イムノグロブリン結合ドメイン 3 を基本配列として、アルカリ安定性の向上を目指して、イムノグロブリン結合ドメイン 3 (配列番号 2) における 7 位、13 位、22 位、及び 29 位の 4 個のリジン残基をアルギニンに置換した改変体を作製した。

[0141] [P L - 0 6 1 の発現プラスミド作成]

P L - 0 2 4 の発現プラスミドを鋳型とし、合成オリゴ DNA oligo-178 (配列番号 13) 及び oligo-334 (配列番号 38) をプライマーとした PCR により 7 位、13 位、及び 22 位のリジン残基がアルギニンに置換され、23 位がイソロイシンとなった 28 位までの配列をコードする cDNA フラグメントを作成した。また P L - 0 2 4 の発現プラスミドを鋳型とし、oligo-335 (配列番号 39) 及び oligo-191 (配列番号 16) をプライマーとした PCR により 29 位のリジン残基がアルギニンに置換された 24 位以降のイムノグロブリン結合ドメイン 3 の配列をコードする cDNA フラグメントを作成した。

。これら二つのDNAフラグメントを鋳型として合成オリゴDNA oligo-178（配列番号13）及びoligo-191（配列番号16）をプライマーとしたPCRにより、PL-061をコードするcDNAが得られた。このcDNAをNdeI及びBamHIにて切断し、pET-9aプラスミド上のNdeI-BamHI部分に組み込むことにより、N末端側から、人工N末端配列11残基（配列番号12）、配列番号2における7位、13位、22位、及び29位のリジン残基がアルギニンに置換されたプロテインLのイムノグロブリンカップ軽鎖結合ドメイン3の70残基、アラニン-ロイシンからなる連結配列2残基、プロテインA由来イムノグロブリンFc結合Cドメイン第3 α ヘリックスの改変C末端配列21残基（配列番号17）、及び人工C末端配列3残基（配列番号18）がこの順で連結されたキメラタンパク質PL-061の発現プラスミドを得た。

[0142] [改変体の精製と純度検定]

改変体PL-061の菌体抽出液をpH6.0に調整した後に、参考例1と同様の手法で陽イオン交換体SP-セファロースファストフロー（GEヘルスケア株式会社）カラムにアプライし、20mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）にて洗浄後、0.5M NaClの直線的濃度勾配にてタンパク質を溶出した。目的の改変体が含まれる溶出画分を集めてpHを9に調整した後に陰イオン交換体ギガキャップQ（東ソー株式会社）カラムに添加した。20mMリン酸バッファー（pH7.8）にて洗浄後、0.3M NaCl直線的濃度勾配にて目的の改変体を溶出した。各溶出液をSDS-PAGEに供して純度を確認した結果、各改変体は理論値の分子量の位置に単一バンドとして精製されていることを確認した。

[0143] [ゲル担体への固定化とイムノグロブリン結合活性測定による評価]

精製した改変体PL-061を、ホルミル活性化アガロースゲル担体に10mg/mLゲルの濃度で常法に従って、それぞれ固定化した。固定化後の反応溶液を回収し、固定化率を測定したところ、固定化効率が95%以上であることを確認した。次に、参考例1と同様の方法で各固定化ゲル担体のヒ

ト IgG 結合活性を測定した。

[0144] 得られた結果を表 8 に示す。この結果から、配列番号 2 における 7 位、13 位、22 位、及び 29 位の 4 個のリジン残基をアルギニンに置換した場合であっても、前記イムノグロブリン結合ドメイン 4 の場合と同様に、ヒト IgG 結合活性の向上が認められた。

[0145] [表 8]

名称	IgG 結合活性 mg/mL ゲル
PL-061	59.8
野生型 (PL-023)	52.2

[0146] [ゲル担体に固定化した改変体のアルカリ pH 条件での安定性の評価]

改変体 PL-061 を固定化したゲル担体を 0.1 M NaOH 水溶液に置換した後に、25℃にて 17 時間保温した。その後、PBS で 3 回洗浄し、前記と同条件でヒト IgG 結合活性を測定した。アルカリ処理前のそれぞれの IgG 結合量を 100% としたときの 17 時間処理後の残存 IgG 結合量の割合をアルカリ処理後の残存活性 (%) として求めた。得られた結果を表 9 に示す。

[0147] この結果から、配列番号 2 における 7 位、13 位、22 位、及び 29 位の 4 個のリジン残基をアルギニンに置換することによっても、アルカリ安定性が向上することが確認された。

[0148] [表 9]

名称	アルカリ処理後の 残存活性 (%)
PL-061	63.3
野生型 (PL-023)	42.9

[0149] なお、*Peptostreptococcus magnus* 3316 株由来のプロテイン L におけるイムノグロブリン結合ドメインのアミノ酸配列は、*Peptostreptococcus magnus* 312 株由来のものと配列相同性が高いが、本発明者によって、*Peptostreptococcus*

occus magnus 312株由来のプロテインLにおけるイムノグロブリン結合ドメインに対して、前記と同様の変異を施しても、アルカリ安定性の向上が図れないことが確認されている。即ち、前記実施例1～3で実証されたアルカリ安定性を向上させ得る変異は、Peptostreptococcus magnus 3316株由来のプロテインLにおけるイムノグロブリン結合ドメインに特有のものであるといえる。

請求の範囲

[請求項1] 下記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)、及び(3-1)～(3-4)のいずれかに示すイムノグロブリン結合ドメインを少なくとも1つ含むポリペプチド。

(1-1)配列番号1に示すアミノ酸配列において、第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

(1-2)配列番号2に示すアミノ酸配列において、第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

(1-3)配列番号3に示すアミノ酸配列において、第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

(1-4)配列番号4に示すアミノ酸配列において、第6位、第12位、第21位、及び第28位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を含むイムノグロブリン結合ドメイン。

(2-1)配列番号1に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外

のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(2-2)配列番号2に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(2-3)配列番号3に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(2-4)配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、前記アミノ酸置換部位以外のアミノ酸の1個又は数個が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-1)配列番号1に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、配列番号1に示すアミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が80%以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-2)配列番号2に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、配列番号2に示すアミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が80%以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-3)配列番号3に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、配列番号3に示すアミノ酸配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が80%以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号3に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

(3-4)配列番号4に示すアミノ酸配列における第6位、第12位、第21位、及び第28位よりなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸が、リジン以外の塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されているアミノ酸配列において、配列番号4に示すアミノ酸

配列に対する前記アミノ酸置換部位を除いた配列同一性が80%以上であり、且つ、イムノグロブリンに対する結合能を有し、配列番号4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと比較してアルカリ安定性が向上しているイムノグロブリン結合ドメイン。

[請求項2] 前記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)、及び(3-1)～(3-4)に示すイムノグロブリン結合ドメインの中から選択される1個のイムノグロブリン結合ドメインが含まれる単ドメイン型ペプチドである、請求項1に記載のポリペプチド。

[請求項3] 前記(1-1)～(1-4)、(2-1)～(2-4)、及び(3-1)～(3-4)に示すイムノグロブリン結合ドメインから選択される2個以上のイムノグロブリン結合ドメインが連結されてなる複ドメイン型ペプチドである、請求項1に記載のポリペプチド。

[請求項4] 前記(1-1)、(2-1)、及び(3-1)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも1つを含み、

配列番号1に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位の全てが、塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されている、請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチド。

[請求項5] 前記(1-1)、(2-1)、及び(3-1)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも1つを含み、

配列番号1に示すアミノ酸配列において、第7位、第13位、第22位、及び第29位よりなる群から選択される部位の少なくとも2個以上が、アルギニン又はトレオニンに置換されている、請求項1～4のいずれかに記載のポリペプチド。

[請求項6] 前記(1-2)、(2-2)、及び(3-2)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも1つを含み、

配列番号2に示すアミノ酸配列における第7位、第13位、第22位、及び第29位の全てが、塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミ

ノ酸に置換されている、請求項 1～3 のいずれかに記載のポリペプチド。

[請求項7] 前記(1-2)、(2-2)、及び(3-2)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位よりなる群から選択される部位の少なくとも 2 個以上が、アルギニン又はトレオニンに置換されている、請求項 1～3 及び 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

[請求項8] 前記(1-3)、(2-3)、及び(3-3)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 3 に示すアミノ酸配列における第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位の全てが、塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されている、請求項 1～3 のいずれかに記載のポリペプチド。

[請求項9] 前記(1-3)、(2-3)、及び(3-3)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 3 に示すアミノ酸配列において、第 7 位、第 13 位、第 22 位、及び第 29 位よりなる群から選択される部位の少なくとも 2 個以上が、アルギニン又はトレオニンに置換されている、請求項 1～3 及び 8 のいずれかに記載のポリペプチド。

[請求項10] 前記(1-4)、(2-4)、及び(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 4 に示すアミノ酸配列における第 6 位、第 12 位、第 21 位、及び第 28 位の全てが、塩基性アミノ酸又は水酸基を有するアミノ酸に置換されている、請求項 1～3 のいずれかに記載のポリペプチド。

[請求項11] 前記(1-4)、(2-4)、及び(3-4)のイムノグロブリン結合ドメインのいずれか少なくとも 1 つを含み、

配列番号 4 に示すアミノ酸配列において、第 6 位、第 12 位、第 21 位、及び第 28 位よりなる群から選択される部位の少なくとも 2 個以上が、アルギニン又はトレオニンに置換されている、請求項 1 ～ 3 及び 10 のいずれかに記載のポリペプチド。

[請求項 12] 請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載のポリペプチドをコードしている DNA。

[請求項 13] 請求項 12 に記載の DNA を含む組換えベクター。

[請求項 14] 請求項 13 に記載の組換えベクターを用いて宿主を形質転換して得られる形質転換体。

[請求項 15] 請求項 14 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載のポリペプチドの製造方法。

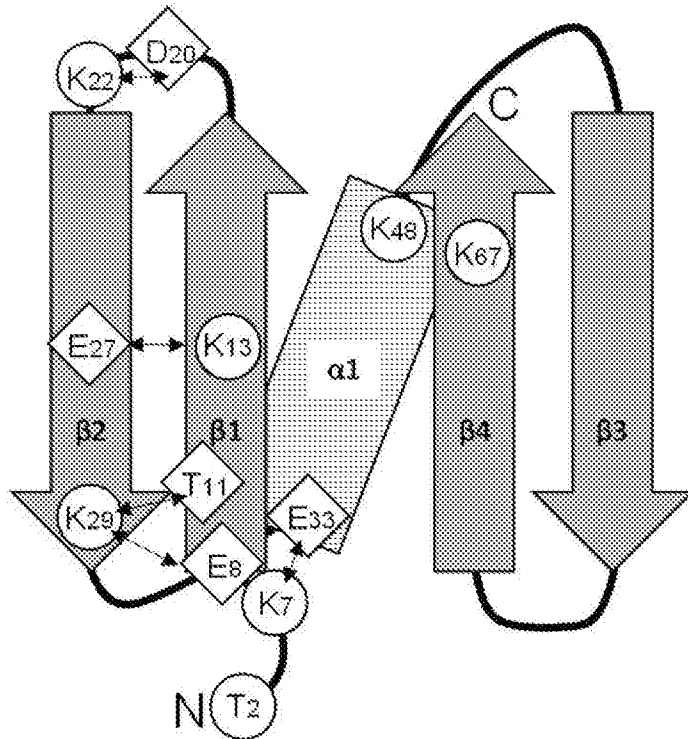
[請求項 16] 請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載のポリペプチドが不溶性担体に固定化されてなる、イムノグロブリン結合用担体。

[請求項 17] 請求項 16 に記載のイムノグロブリン結合用担体を用いて、イムノグロブリン又はそのカッパ鎖を含む断片の分離を行う、イムノグロブリン又はその断片の分離方法。

[図1]

イムノグロブリン結合ドメイン1 :	ETP-EPEEEV TIKASLIFAD GSTQNAEPKG TPAKAVSDAY AYADALKKDY GEYTYDVADK GLTLNIKFAG
イムノグロブリン結合ドメイン2 :	EKPEEPKEEV TIKVNLIFAD GKTQTAEFKG TPEEATAKAY AYADLLAKEN GEYTADLEDG GNTINIKFAG
イムノグロブリン結合ドメイン3 :	ETPEEPKEEV TIKVNLIFAD GKTQTAEFKG TPEEATAKAY AYANLLAKEN GEYTADLEDG GNTINIKFAG
イムノグロブリン結合ドメイン4 :	ETPEEPKEEV TIKVNLIFAD GKTQTAEFKG TPEEATAEAY <u>RYADLLAKVY</u> <u>GEYTADLEDG</u> <u>GYTINIKFAG</u>
三次元構造	β 1 β 2 α 1 β 3 β 4

[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/080977

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K14/315(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C07K14/315, C07K17/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/BIOSIS(STN),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq, WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2015-501299 A (City of Hope), 15 January 2015 (15.01.2015), SEQ ID NO:59; paragraph [0198] & US 2012/0301400 A1 SEQ ID NO:59; paragraph [0357] & US 2015/0030535 A1 & US 2014/0113348 A1 & WO 2013/055404 A1 & EP 2766382 A1	1, 2, 5, 7, 9, 11-14
Y	Protein Express Co., Ltd., Tosha no Kumikae Tanpaku Hatsugen Gijutsu ni yori Kaihatsu·Seizo sareta Kokino Ligand o Mochiita Kotai Seisei Resin no Goshokai, Innovation Japan 2015 https://www.jst.go.jp/tt/fair/ij2015/exhibitor/group17/page1.html , on line, 27 August 2015 (27.08.2015), a whole article, Tenji no Gaiyo, retrieval date 11 January 2017 (11.01.2017)	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
12 January 2017 (12.01.17)

Date of mailing of the international search report
24 January 2017 (24.01.17)

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/JP2016/080977

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 7-507925 A (MICROBIOLOGICAL RESEARCH AUTHORITY), 07 September 1995 (07.09.1995), fig. 1 & JP 7-507682 A & US 6162903 A fig. 1 & GB 9209804 D & GB 9209804 D0 & WO 1993/022438 A1 & WO 1993/022439 A1 & EP 640134 A1	1-17
A	WO 00/15803 A1 (AFFITECH AS), 23 March 2000 (23.03.2000), & US 2002/0137918 A1 & GB 9819998 A & GB 9909578 A & GB 2341379 A & EP 1114161 A1	1-17
A	MINAKUCHI, Kazunobu et al., Remarkable alkaline stability of an engineered protein A as immunoglobulin affinity ligand: C domain having only one amino acid substitution, Protein Science, 2013, Vol. 22, p. 1230-1238	1-17
P,A	JP 2016-79149 A (Protein Express Co., Ltd.), 16 May 2016 (16.05.2016), (Family: none)	1-17
P,A	WO 2016/096644 A1 (GE HEALTHCARE BIOPROCESS R&D AB), 23 June 2016 (23.06.2016), & WO 2016/096643 A1 & SE 1451564 A1	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K14/315(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

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. C12N15/09, C07K14/315, C07K17/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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), Cplus/MEDLINE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq, WPIDS (STN)

C. 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
X	JP 2015-501299 A (シティ・オブ・ホープ) 2015.01.15, 配列番号 59、[0198] 段落 & US 2012/0301400 A1, SEQ ID NO: 59, [0357] & US 2015/0030535 A1 & US 2014/0113348 A1 & WO 2013/055404 A1 & EP 2766382 A1	1, 2, 5, 7, 9, 11-14

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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ー

「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
「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
「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)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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
「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
「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
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.01.2017

国際調査報告の発送日

24.01.2017

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)

濱田 光浩

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

3763

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
Y	株式会社プロテイン・エクスプレス, 当社の組み換えタンパク発現技術により開発・製造された高機能リガンドを用いた抗体精製レジンのご紹介。 , イノベーション・ジャパン 2015 https://www.jst.go.jp/tt/fair/ij2015/exhibitor/group17/page1.html , on line, 2015.08.27, 全体、展示の概要, 検索日 2017/01/11	1-17
Y	JP 7-507925 A (マイクロバイオリジカル・リサーチ・オーソリティ) 1995.09.07, 図 1 & JP 7-507682 A & US 6162903 A, Fig. 1 & GB 9209804 D & GB 9209804 D0 & WO 1993/022438 A1 & WO 1993/022439 A1 & EP 640134 A1	1-17
A	WO 00/15803 A1 (AFFITECH AS) 2000.03.23, & US 2002/0137918 A1 & GB 9819998 A & GB 9909578 A & GB 2341379 A & EP 1114161 A1	1-17
A	MINAKUCHI, Kazunobu et al., Remarkable alkaline stability of an engineered protein A as immunoglobulin affinity ligand: C domain having only one amino acid substitution, Protein Science, 2013, Vol. 22, p. 1230-1238	1-17
P. A	JP 2016-79149 A (株式会社プロテイン・エクスプレス) 2016.05.16, (ファミリーなし)	1-17
P. A	WO 2016/096644 A1 (GE HEALTHCARE BIOPROCESS R&D AB) 2016.06.23, & WO 2016/096643 A1 & SE 1451564 A1	1-17