

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6790212号
(P6790212)

(45) 発行日 令和2年11月25日(2020.11.25)

(24) 登録日 令和2年11月6日(2020.11.6)

(51) Int.Cl. F I
C 4 O B 40/06 (2006.01) C 4 O B 40/06 Z N A
C 1 2 N 15/15 (2006.01) C 1 2 N 15/15

請求項の数 9 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2019-186470 (P2019-186470)	(73) 特許権者	307010166 第一三共株式会社
(22) 出願日	令和1年10月10日(2019.10.10)		東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
(62) 分割の表示	特願2018-217894 (P2018-217894) の分割	(74) 代理人	100146581 弁理士 石橋 公樹
原出願日	平成25年8月7日(2013.8.7)	(74) 代理人	100113583 弁理士 北野 範子
(65) 公開番号	特開2020-23531 (P2020-23531A)	(74) 代理人	100161160 弁理士 竹元 利泰
(43) 公開日	令和2年2月13日(2020.2.13)	(74) 代理人	100119622 弁理士 金原 玲子
審査請求日	令和1年10月10日(2019.10.10)	(72) 発明者	西宮 大祐 東京都品川区広町一丁目2番58号 第一三共株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2012-176208 (P2012-176208)		
(32) 優先日	平成24年8月8日(2012.8.8)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヌクレオチド・ライブラリー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表の配列番号14において第43番塩基チミン乃至第93番チミンからなる塩基配列が配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列で置き換えられてなる塩基配列を含んでなり、配列番号1で示されるアミノ酸配列においてX₁乃至X₁₂がシステイン以外の天然界に存在するアミノ酸であり、多様性が1×10⁸以上であるヌクレオチド・ライブラリー。

【請求項2】

下記(ア)乃至(エ)の特徴を有する、請求項1記載のライブラリー：

(ア) 配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて1番目乃至5番目、7番目、9番目および10番目のX_{a a}が、それぞれ、システインおよびプロリンを除く、天然界に存在する任意のアミノ酸である：

(イ) 配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて6番目および8番目のX_{a a}が、それぞれ、システインを除く、天然界に存在する任意のアミノ酸である：

(ウ) 配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて11番目のX_{a a}が、チロシン、セリン、フェニルアラニン、ロイシンおよびスレオニンからなる群より選択されるアミノ酸である：

(エ) 配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて12番目のX_{a a}が、アスパラギン、アスパラギン酸、ロイシン、リジン、グルタミン、アラニンおよびグルタミン酸からなる群より選択されるアミノ酸である。

【請求項 3】

単一のアミノ酸配列をコードする塩基配列が、複数のパリエーションを有してよい、請求項 1 または 2 に記載のライブラリー。

【請求項 4】

細胞に含まれていることを特徴とする、請求項 1 乃至 3 のいずれか一つに記載のライブラリー。

【請求項 5】

細胞のコドン使用に応じて、コドンが選択され、及び/又は、複数のコドンの使用頻度若しくは割合が調節されていることを特徴とする、請求項 4 記載のライブラリー。

【請求項 6】

微生物に含まれていることを特徴とする、請求項 1 乃至 3 のいずれか一つに記載のライブラリー。

【請求項 7】

微生物が、ウイルス、ファージ、ファージ様分子、又はそれらのいずれかの粒子である、請求項 6 に記載のライブラリー。

【請求項 8】

ベクターに含まれていることを特徴とする、請求項 1 乃至 3 のいずれか一つに記載のライブラリー。

【請求項 9】

ベクターが、ファージミド、コスミド又はプラスミドである、請求項 8 に記載のライブラリー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペプチド、該ペプチドの誘導体、該ペプチドまたは該誘導体に含まれるペプチドに対応するヌクレオチド、ヌクレオチドを含むベクター、該ベクターおよび/またはヌクレオチドが導入された細胞、該細胞を培養する工程を含んでなるペプチドおよび/またはその誘導体の製造方法、該ペプチドおよび/またはその誘導体を含んでなるペプチド・ライブラリー、標的分子に結合するペプチドおよび/またはその誘導体の同定方法、標的分子に結合するペプチドおよび/またはその誘導体の製造方法、被検ペプチドおよび/またはその誘導体が標的分子に結合するか否かを判定する方法、該ヌクレオチドを含んでなるヌクレオチド・ライブラリー、該ペプチドもしくはその誘導体、該ヌクレオチド、該ベクターまたは該細胞を含むことからなる組成物、該ペプチドもしくはその誘導体、該ヌクレオチド、該ベクターまたは該細胞を含むことからなる試薬等に関する。

【背景技術】

【0002】

S P I N K 2 (S e r i n e P r o t e a s e I n h i b i t o r K a z a l - t y p e 2) は、3つのdisulfide bondを有するKazal-type domainから成る7kDaのタンパク質である。ヒト生体内では精巣や精嚢で発現しており、trypsin/acrosin inhibitorとして機能している(非特許文献1)。

【0003】

1991年、Winterらがphage displayを用いた抗体のスクリーニングを報告したことにより、phage displayは完全ヒト型抗体の創製法として、抗体医薬開発に大きな影響を与えた(非特許文献2)。近年ではタンパク質工学の進歩により、phage displayやribosome displayなどのディスプレイ技術を用いて、non-antibody scaffoldの開発が盛んになりつつある。Non-antibody scaffoldは、engineering binding (affinity) proteinなどとも呼ばれ、抗体の可変領域(CDR)様の結合領域を付与した人工タンパク質のことである。標的となるタンパク

10

20

30

40

50

質 X に対する結合性を有し、タンパク質間相互作用が可能な点に加え、生産性や免疫原性、組織浸潤性などの観点に特長を持っている。Kunitz domain library (Dyax) (特許文献 1) や anticalin (Pieris) などに代表されるように、科学上または産業上の台頭が望まれているが、その種類は未だ少なく、疾患関連分子に対する新規な non-antibody scaffold の創出が期待されている (非特許文献 3)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】米国特許出願公開 US 2008/0020394 A1 (または日本出願公表 特表 2007-524348)

10

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Chen T, Lee TR, Liang WG, Chang WS, Lyu PC. (2009) Identification of trypsin-inhibitory site and structure determination of human SPINK2 serine proteinase inhibitor. *Proteins*. 77(1):209-19.

【非特許文献 2】James D. Marks, Hennie R. Hoogenboom, Timothy P. Bonnert, John McCafferty, Andrew D. Griffiths, Greg Winter (1991) Bypassing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*. 222(3):581-97.

20

【非特許文献 3】Skerra A. (2007) Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr Opin Biotechnol*. 18:295-304.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

30

発明者らは、SPINK2 およびその改変体について鋭意検討した結果、SPINK2 の内在性の標的以外の分子に対して高い結合活性を示すペプチドを含むライブラリーを製し、当該ライブラリーから内在性の標的以外の標的分子に対して高い結合活性を示すペプチドを単離すること等により、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、例えば、

(1)

下記 (i) または (ii) から選択されるペプチド:

(i) 配列表の配列番号 14 において第 43 番塩基チミン乃至第 93 番チミンからなる塩基配列が配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列で置き換えられてなる塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を含むペプチド; および、

40

(ii) 配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 2 乃至 8 及び 10 乃至 14 以外の、1 個以上 5 個以下のアミノ酸がアミノ酸置換、欠失、付加および/または挿入してなるアミノ酸配列を有する (i) 記載のペプチド、

(2)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 1 番目乃至 5 番目、7 番目、9 番目および 10 番目の Xaa が、それぞれ、システインおよびプロリンを除く任意のアミノ酸である、(1) 記載のペプチド、

(3)

50

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 6 番目および 8 番目の X a a が、それぞれ、システインを除く任意のアミノ酸である、(1) または (2) 記載のペプチド、

(4)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 1 1 番目の X a a が、チロシン、セリン、フェニルアラニン、ロイシンおよびスレオニンからなる群より選択されるアミノ酸である、(1) 乃至 (3) のいずれか一つに記載のペプチド、

(5)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 1 2 番目の X a a が、アスパラギン、アスパラギン酸、ロイシン、リジン、グルタミン、アラニンおよびグルタミン酸からなる群より選択されるアミノ酸である、(1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載のペプチド、

(6)

保存的アミノ酸置換が、疎水性アミノ酸グループ、中性親水性アミノ酸グループ、酸性アミノ酸グループ、塩基性アミノ酸グループ、主鎖の方角に影響を与えるアミノ酸のグループ、および、芳香族アミノ酸グループから選択されるいずれかのグループ内において行われることを特徴とする、(1) 乃至 (5) のいずれか一つに記載のペプチド、

(7)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 1 番目の X a a が、アルギニン、メチオニン、ロイシン、トリプトファンおよびセリンからなる群より選択されるアミノ酸である、(1) 乃至 (6) のいずれか一つに記載のペプチド、

(8)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 2 番目の X a a が、スレオニン、アルギニン、トリプトファンおよびフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸である、(1) 乃至 (7) のいずれか一つに記載のペプチド、

(9)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 3 番目の X a a が、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、セリンおよびフェニルアラニンからなる群より選択されるアミノ酸である、(1) 乃至 (8) のいずれか一つに記載のペプチド、

(1 0)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 4 番目の X a a が、トリプトファン、アルギニンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸である、(1) 乃至 (9) のいずれか一つに記載のペプチド、

【 0 0 0 8 】

(1 1)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 5 番目の X a a が、グリシン、アルギニン、ロイシン、ヒスチジン、トリプトファン、メチオニンおよびチロシンからなる群から選択されるアミノ酸である、(1) 乃至 (1 0) のいずれか一つに記載のペプチド、

(1 2)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 6 番目の X a a が、アスパラギン、ヒスチジン、プロリン、リジン、トリプトファン、アルギニンおよびアスパラギン酸からなる群から選択されるアミノ酸である、(1) 乃至 (1 1) のいずれか一つに記載のペプチド、

(1 3)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 7 番目の X a a が、アルギニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、アラニンおよびグリシンからなる群から選択されるアミノ酸である、(1) 乃至 (1 2) のいずれか一つに記載のペプチド、

(1 4)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 8 番目の X a a が、スレオニン、プロリン、アスパラギンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸である、(1) 乃至 (1 3) のいずれか一つに記載のペプチド、

(1 5)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 9 番目の X a a が、トリプトファン、メチ

10

20

30

40

50

オニン、チロシンおよびフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸である、(1)乃至(14)のいずれか一つに記載のペプチド、

(16)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて10番目のX a aが、グルタミン、バリン、リジン、メチオニン、アラニン、ロイシンおよびアスパラギンからなる群から選択されるアミノ酸である、(1)乃至(15)のいずれか一つに記載のペプチド、

(17)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて11番目のX a aが、チロシン、フェニルアラニンおよびロイシンからなる群から選択されるアミノ酸である、(1)乃至(16)のいずれか一つに記載のペプチド、

10

(18)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて12番目のX a aがリジンである、(1)乃至(17)のいずれか一つに記載のペプチド、

(19)

配列表の配列番号2乃至9(図12のペプチド番号1、2、6、7、12乃至14および17)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む、(1)乃至(18)のいずれか一つに記載のペプチド、

(20)

(1)乃至(19)のいずれか一つに記載のペプチドに化学的修飾および/または生物学的修飾が施されてなる該ペプチドの誘導体、

20

【0009】

(21)

下記(i)乃至(iii)のいずれか一つに記載のヌクレオチド：

(i)(1)乃至(19)のいずれか一つに記載のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるヌクレオチドを含んでなるヌクレオチド；

(ii)(1)乃至(19)のいずれか一つに記載のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含んでなるヌクレオチド；および、

(iii)(1)乃至(19)のいずれか一つに記載のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるヌクレオチド、

(22)

30

(21)記載のヌクレオチドを含んでなるベクター、

(23)

(21)記載のヌクレオチドまたは(22)記載のベクターが導入された細胞、

(24)

下記工程(i)および(ii)を含んでなる(1)乃至(19)のいずれか一つに記載のペプチドの製造方法：

(i)(23)記載の細胞を培養する工程；および、

(ii)工程(i)で得られた培養物から該ペプチドを回収する工程、

(25)

(1)乃至(19)のいずれか一つに記載のペプチドおよび/または(20)記載のペプチドの誘導体を含んでなるペプチド・ライブラリー、

40

(26)

ペプチドおよび/またはペプチドの誘導体が、(24)記載の工程(i)および(ii)を含んでなる方法により調製されたものであることを特徴とする、(25)記載のライブラリー、

(27)

ライブラリーにおいて、表現型(phenotype)である該ペプチド又はペプチド誘導体および該表現型に対応する遺伝型(genotype)であるヌクレオチドが直接的または間接的にリンクしていることを特徴とする、(25)または(26)記載のライブラリー、

50

(2 8)

ヌクレオチドが (2 1) に記載のヌクレオチドである、(2 7) に記載のライブラリー

(2 9)

ファージ・ディスプレイ・ライブラリー、リボゾーム・ディスプレイ・ライブラリー若しくは核酸ディスプレイ・ライブラリーである、(2 5) 乃至 (2 8) のいずれか一つに記載のライブラリー、

(3 0)

下記 (i) および (i i) の工程を含んでなる、標的分子に結合する、(1) 乃至 (1 9) のいずれか一つに記載のペプチドまたは (2 0) 記載のペプチド誘導体の同定方法：
(i) (2 5) 乃至 (2 9) のいずれか一つに記載のライブラリーに含まれるペプチドまたはペプチド誘導体と該標的分子とを接触させる工程；および、

(i i) 該標的分子に結合するペプチドまたはペプチド誘導体を回収する工程、

【 0 0 1 0 】

(3 1)

下記 (i) 乃至 (i i i) の工程を含んでなる、標的分子に結合する、(1) 乃至 (1 9) のいずれか一つに記載のペプチドまたは (2 0) 記載のペプチド誘導体の製造方法：
(i) (2 5) 乃至 (2 9) のいずれか一つに記載のライブラリーに含まれるペプチドまたはペプチド誘導体と該標的分子とを接触させる工程；および、

(i i) 該標的分子に結合するペプチドまたはペプチド誘導体を回収する工程；および、

(i i i) 前記 (i i) において回収された該ペプチドまたはペプチド誘導体に含まれる、該標的分子に結合するペプチドを化学合成、遺伝子組換えまたはイン・ビトロ翻訳により調製する工程、

(3 2)

下記 (i) および (i i) の工程を含んでなる、(1) 乃至 (1 9) のいずれか一つに記載のペプチドまたは (2 0) 記載のペプチドの誘導体が標的分子に結合するか否かを判定する方法：

(i) (1) 乃至 (1 9) のいずれか一つに記載の被検ペプチドまたは (2 0) 記載の被検ペプチド誘導体と該標的分子とを接触させる工程；および、

(i i) 被検ペプチドまたは被検ペプチド誘導体が該標的分子に結合する場合、該ペプチドまたは被検ペプチド誘導体は陽性であると決定する工程、

(3 3)

下記 (i) 乃至 (i i i) の工程を含んでなる、標的分子に結合する、(1) 乃至 (1 9) のいずれか一つに記載のペプチドまたは (2 0) 記載のペプチドの誘導体の製造方法：

(i) (1) 乃至 (1 9) のいずれか一つに記載の被検ペプチドまたは (2 0) 記載の被検ペプチド誘導体と該標的分子とを接触させる工程；

(i i) 被検ペプチドまたは被検ペプチド誘導体が該標的分子に結合する場合、該ペプチドまたは被検ペプチド誘導体は陽性であると決定する工程；および、

(i i i) 工程 (i i) において被検ペプチドまたはペプチド誘導体が陽性と判定された場合、該ペプチドまたはペプチド誘導体に含まれる、該標的分子に結合するペプチドを、遺伝子組換えまたはイン・ビトロ翻訳により調製する工程、

(3 4)

(2 1) に記載のヌクレオチドを含んでなるヌクレオチド・ライブラリー、

(3 5)

ヌクレオチドがファージミド、コスミドもしくはプラスミドまたはその断片である、(3 4) 記載のライブラリー、

(3 6)

ヌクレオチドが原核もしくは真核細胞内、または、ウイルス DNA または RNA 上もしくはウイルス粒子中に存在する、(3 4) または (3 5) 記載のヌクレオチド・ライブラ

10

20

30

40

50

リー、

(37)

(1) 乃至 (19) のいずれか一つに記載のペプチド、(20) 記載のペプチドの誘導体、(21) 記載のヌクレオチド、(22) 記載のベクターまたは(23) 記載の細胞を含むことからなる組成物、

(38)

(1) 乃至 (19) のいずれか一つに記載のペプチド、(20) 記載のペプチドの誘導体、(21) 記載のヌクレオチド、(22) 記載のベクターまたは(23) 記載の細胞を含むことからなる試薬、

(39)

予め決定された標的分子に結合する、(1) 乃至 (19) のいずれか一つに記載のペプチド、または、(20) 記載のペプチドの誘導体、

(40)

標的分子が S P I N K 2 の内在性の標的ではないことを特徴とする、(39) 記載のペプチドまたはペプチドの誘導体、

【 0 0 1 1 】

(41)

標的分子がヒト由来であることを特徴とする、(39) または (40) 記載のペプチドまたはペプチドの誘導体、

(42)

内在性の標的がトリプシンおよび/またはアクロシンである、(39) 乃至 (41) のいずれか一つに記載のペプチドまたはペプチドの誘導体、

(43)

内在性の標的がトリプシンである、(39) 乃至 (42) のいずれか一つに記載のペプチドまたはペプチドの誘導体、

(44)

(39) 乃至 (43) のいずれか一つに記載のペプチドまたはペプチドの誘導体を含むことからなる組成物または試薬、

(45)

下記 (i) 乃至 (i i i) の工程を含んでなる、トリプシンおよび/またはアクロシン以外のセリンプロテアーゼに結合し且つ該セリンプロテアーゼの有する蛋白質分解活性(ペプチド結合加水分解活性：以下同じ)を阻害する、(1) 乃至 (19) のいずれか一つに記載のペプチドまたは(20) 記載のペプチド誘導体の同定方法：

(i) (25) 乃至 (29) のいずれか一つに記載のライブラリーに含まれるペプチドまたはペプチド誘導体と該セリンプロテアーゼとを接触させる工程；

(i i) 該セリンプロテアーゼに結合するペプチドまたはペプチド誘導体を回収する工程；および、

(i i i) 該ペプチドまたはペプチド誘導体が該セリンプロテアーゼの有する蛋白質分解活性を阻害する場合、該ペプチドまたはペプチド誘導体を陽性と判定する工程、

(46)

下記 (i) 乃至 (i v) の工程を含んでなる、トリプシンおよび/またはアクロシン以外のセリンプロテアーゼに結合し且つその蛋白質分解活性を阻害する、(1) 乃至 (19) のいずれか一つに記載のペプチドまたは(20) 記載のペプチド誘導体の製造方法：

(i) (25) 乃至 (29) のいずれか一つに記載のライブラリーに含まれるペプチドまたはペプチド誘導体と該セリンプロテアーゼとを接触させる工程；

(i i) 該セリンプロテアーゼに結合するペプチドまたはペプチド誘導体を回収する工程；および、

(i i i) 工程 (i i) において回収されたペプチドまたはペプチド誘導体が該セリンプロテアーゼの有する蛋白質分解活性を阻害する場合、該ペプチドまたはペプチド誘導体を陽性と判定する工程；、および、

10

20

30

40

50

(i v) 工程 (i i i) において陽性と判定されたペプチドまたはペプチド誘導体に含まれる、該セリンプロテアーゼの有する蛋白質分解活性を阻害するペプチドを化学合成、遺伝子組換えまたはイン・ビトロ翻訳により調製する工程、

(47)

下記 (i) および (i i) の工程を含んでなる、(1) 乃至 (19) のいずれか一つに記載のペプチドまたは (20) 記載のペプチドの誘導体がトリプシンおよび/またはアクロシン以外のセリンプロテアーゼの有する蛋白質分解活性 (ペプチド結合加水分解活性 : 以下同じ) を阻害するか否かを判定する方法 :

(i) (1) 乃至 (19) のいずれか一つに記載の被検ペプチドまたは (20) 記載の被検ペプチド誘導体と該セリンプロテアーゼとを接触させる工程 ; および、

10

(i i) 該ペプチドまたはペプチド誘導体が該セリンプロテアーゼの有する蛋白質分解活性を阻害する場合、該ペプチドまたはペプチド誘導体を陽性と判定する工程、

(48)

下記 (i) 乃至 (i i i) の工程を含んでなる、トリプシンおよび/またはアクロシン以外のセリンプロテアーゼの有する蛋白質分解活性を阻害する、(1) 乃至 (19) のいずれか一つに記載のペプチドまたは (20) 記載のペプチドの誘導体の製造方法 :

(i) (1) 乃至 (19) のいずれか一つに記載の被検ペプチドまたは (20) 記載の被検ペプチド誘導体と該セリンプロテアーゼとを接触させる工程 ;

(i i) 該ペプチドまたはペプチド誘導体が該セリンプロテアーゼの有する蛋白質分解活性を阻害する場合、該ペプチドまたはペプチド誘導体を陽性と判定する工程 ; および、

20

(i i i) 工程 (i i) において陽性と判定されたペプチドまたはペプチド誘導体に含まれる、該セリンプロテアーゼの有する蛋白質分解活性を阻害するペプチドを、遺伝子組換えまたはイン・ビトロ翻訳により調製する工程、および、

(49)

下記 (i) または (i i) から選択されるペプチド :

(i) 配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含み、且つ下記 (ア) 乃至 (エ) であるペプチド ;

(ア)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 1 番目乃至 5 番目、7 番目、9 番目および 10 番目の X a a が、それぞれ、システインおよびプロリンを除く任意のアミノ酸である

30

(イ)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 6 番目および 8 番目の X a a が、それぞれ、システインを除く任意のアミノ酸である、

(ウ)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 11 番目の X a a が、チロシン、セリン、フェニルアラニン、ロイシンおよびスレオニンからなる群より選択されるアミノ酸である、

(エ)

配列表の配列番号 1 のアミノ末端から数えて 12 番目の X a a が、アスパラギン、アスパラギン酸、ロイシン、リジン、グルタミン、アラニンおよびグルタミン酸からなる群より選択されるアミノ酸である :

40

および、

(i i) 配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において、アミノ末端から数えて 1 番目乃至 12 番目の X a a 以外の、1 個以上 5 個以下のアミノ酸が保存的アミノ酸置換、欠失、付加および/または挿入してなるアミノ酸配列を含むペプチド、

(50)

保存的アミノ酸置換が、疎水性アミノ酸グループ、中性親水性アミノ酸グループ、酸性アミノ酸グループ、塩基性アミノ酸グループ、主鎖の方角に影響を与えるアミノ酸のグループ、および、芳香族アミノ酸グループから選択されるいずれかのグループ内において行

50

われることを特徴とする、(49)記載のペプチド、

【0012】

(51)

下記(ア)乃至(シ)である、(49)又は(50)に記載のペプチド：

(ア)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて1番目のXaaが、アルギニン、メチオニン、ロイシン、トリプトファンおよびセリンからなる群より選択されるアミノ酸である、

(イ)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて2番目のXaaが、スレオニン、アルギニン、トリプトファンおよびフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸である、

10

(ウ)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて3番目のXaaが、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、セリンおよびフェニルアラニンからなる群より選択されるアミノ酸である、

(エ)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて4番目のXaaが、トリプトファン、アルギニンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸である、

(オ)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて5番目のXaaが、グリシン、アルギニン、ロイシン、ヒスチジン、トリプトファン、メチオニンおよびチロシンからなる群から選択されるアミノ酸である、

20

(カ)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて6番目のXaaが、アスパラギン、ヒスチジン、プロリン、リジン、トリプトファン、アルギニンおよびアスパラギン酸からなる群から選択されるアミノ酸である、

(キ)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて7番目のXaaが、アルギニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、アラニンおよびグリシンからなる群から選択されるアミノ酸である、

(ク)

30

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて8番目のXaaが、スレオニン、プロリン、アスパラギンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸である、

(ケ)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて9番目のXaaが、トリプトファン、メチオニン、チロシンおよびフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸である、

(コ)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて10番目のXaaが、グルタミン、バリン、リジン、メチオニン、アラニン、ロイシンおよびアスパラギンからなる群から選択されるアミノ酸である、

(サ)

40

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて11番目のXaaが、チロシン、フェニルアラニンおよびロイシンからなる群から選択されるアミノ酸である、

(シ)

配列表の配列番号1のアミノ末端から数えて12番目のXaaがリジンである、

(52)

(49)乃至(51)のいずれか一つに記載のペプチドに化学的修飾および/または生物学的修飾が施されてなる該ペプチドの誘導体、

(53)

予め決定された標的分子に結合する、(49)乃至(51)のいずれか一つに記載のペプチド、または、(52)記載のペプチドの誘導体、

50

および、

(54)

標的分子がSPINK2の内在性の標的ではないことを特徴とする、(53)記載のペプチドまたはペプチドの誘導体、等に関するがそれらに限定されるものではない。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、所望の標的分子に結合するペプチドを選抜するのに有用なペプチド・ライブラリーを提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

10

【0014】

【図1】標的分子である *-chymotrypsin* に対するパニングから得られたSPINK2変異体(ポリクローン)をファージに提示し、該標的分子に結合することをELISA法により確認した図。陰性対象の分子としては、BSAを用いた。

【図2】標的分子である *plasma kallikrein* に対するパニングから得られたSPINK2変異体(ポリクローン)をファージに提示し、該標的分子に結合することをELISA法により確認した図。陰性対象の分子としては、BSAを用いた。

【図3】標的分子である *hEGFR/Fc* に対するパニングから得られたSPINK2変異体(ポリクローン)をファージに提示し、該標的分子に結合することをELISA法により確認した図。陰性対象の分子としては、BSAを用いた。

20

【図4】標的分子である *hHER2/Fc* に対するパニングから得られたSPINK2変異体(ポリクローン)をファージに提示し、該標的分子に結合することをELISA法により確認した図。陰性対象の分子としては、BSAを用いた。

【図5】大腸菌で発現精製した *-chymotrypsin* 結合ペプチド(シングルクローン)の分子状態を還元状態下のSDS-PAGEで分析した図。

【図6】大腸菌で発現精製した *-chymotrypsin* 結合ペプチド(シングルクローン)の分子状態を非還元状態下のSDS-PAGEで分析した図。

【図7】大腸菌で発現精製した *-chymotrypsin* 結合ペプチド8種類の結合親和性をELISA法により定量的に測定した図。

【図8】大腸菌で発現精製した *-chymotrypsin* 結合ペプチド番号2および6(clone2および6)の結合親和性をELISA法により定量的に測定した図。

30

【図9】大腸菌で発現精製した *-chymotrypsin* 結合ペプチド番号2(clone2)の標的特異性をELISA法により確認した図。

【図10】大腸菌で発現精製した *-chymotrypsin* 結合ペプチド番号6(clone6)の標的特異性をELISA法により確認した図。

【図11】大腸菌で発現精製した *-chymotrypsin* 結合ペプチド番号2および6(clone2および6)の *-chymotrypsin* 阻害活性を定量的に測定した図。

【図12】SPINK2変異体8種類(*-chymotrypsin* 結合ペプチド番号1、2、6、7、12乃至14および17)のランダム領域のアミノ酸配列(配列番号2乃至9)。

40

【図13】多様性を伴うペプチドのランダム領域のアミノ酸配列(配列番号1)。アミノ酸番号2乃至8及び10乃至14は任意のアミノ酸を示す。

【図14】断片1の塩基配列(配列番号10)

【図15-1】pCANTAB 5E の塩基配列(図15-2に続く)

【図15-2】pCANTAB 5E の塩基配列(下線部は配列番号11に同じで「断片2」の塩基配列:図15-3に続く)

【図15-3】pCANTAB 5E の塩基配列(図15-4に続く)

【図15-4】pCANTAB 5E の塩基配列

【図16】断片3の塩基配列(配列番号12)

50

【図 17】断片 5 の塩基配列（配列番号 13）

【図 18】SPINK2 のアミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 14）

【図 19】図 18 記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列（配列番号 15）

【図 20 - 1】断片 1 ~ 断片 5 を含む PCR 用鋳型 DNA の塩基配列（配列番号 16 : 図 20 - 2 に続く）

【図 20 - 2】断片 1 ~ 断片 5 を含む PCR 用鋳型 DNA の塩基配列（配列番号 16 : 続き）

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、ペプチド、ペプチド誘導体、ペプチド・ライブラリー、ヌクレオチド、ベクター、細胞、ペプチドおよび/またはその誘導体の製造方法、所望の性質を有するペプチドおよび/またはその誘導体の同定方法、所望の性質を有するペプチドおよび/またはその誘導体の製造方法、被検ペプチドまたはその誘導体が標的分子に結合するか否かを判定する方法、ヌクレオチド・ライブラリー、組成物、試薬等を提供する。本発明の様々な態様について以下に述べるが、本発明の態様はそれらに限定されるものではない。

10

【0016】

1. ペプチド

本発明はペプチドを提供する。

【0017】

本発明の「ペプチド」は、「ポリペプチド」、「蛋白質」をもその意味に包含する。また、本発明において、かかる「ペプチド」は、「ペプチドの誘導体に含まれるペプチド」をもその意味に包含する。

20

【0018】

本発明の一つの態様において、ペプチドは、配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む。かかるペプチドに含まれる配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において アミノ末端から数えて 1 番目乃至 12 番目の X a a は、それぞれ、任意のアミノ酸であるが、好適にはシステインを除く任意のアミノ酸である。

【0019】

本発明のより好適な態様において、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列に含まれる、配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列中、アミノ末端から数えて 1 乃至 5 番目、7 番目、9 番目および 10 番目の X a a（配列番号 1 の 2 乃至 6 番目、8 番目、11 番目および 12 番目のアミノ酸にそれぞれ相当する）は、システインおよびプロリンを除く任意のアミノ酸である； アミノ末端から数えて 6 番目および 8 番目の X a a（配列番号 1 の 7 番目および 10 番目のアミノ酸にそれぞれ相当する）は、システインを除く任意のアミノ酸である； アミノ末端から数えて 11 番目の X a a（配列番号 1 の 13 番目のアミノ酸に相当する）は、チロシン、セリン、フェニルアラニン、ロイシンおよびスレオニンからなる群より選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて 12 番目の X a a（配列番号 1 の 14 番目のアミノ酸に相当する）は、アスパラギン、アスパラギン酸、ロイシン、リジン、グルタミン、アラニンおよびグルタミン酸からなる群より選択されるアミノ酸である； また、アミノ末端から数えて 1 番目乃至 12 番目の X a a は、本段落に記載された各群から選択されるアミノ酸が、保存的アミノ酸置換されたもの（本発明の他の部分に詳述されている）であってもよい。

30

40

【0020】

本発明のより一層好適な態様において、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列に含まれる、配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列中、アミノ末端から数えて 1 番目の X a a（配列番号 1 の 2 番目のアミノ酸に相当する）は、アルギニン、メチオニン、ロイシン、トリプトファンおよびセリンからなる群より選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて 2 番目の X a a（配列番号 1 の 3 番目のアミノ酸に相当する）は、スレオニン、アルギニン、トリプトファンおよびフェニルアラニンからなる群より選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて 3 番目の X a a（配列番号 1 の 4 番目のアミノ酸に

50

相当する)は、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、セリンおよびフェニルアラニンからなる群より選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて4番目のX a a (配列番号1の5番目のアミノ酸に相当する)は、トリプトファン、アルギニンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて5番目のX a a (配列番号1の6番目のアミノ酸に相当する)は、グルタミン、アルギニン、ロイシン、ヒスチジン、トリプトファン、メチオニンおよびチロシンからなる群より選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて6番目のX a a (配列番号1の7番目のアミノ酸に相当する)は、アスパラギン、ヒスチジン、プロリン、リジン、トリプトファン、アルギニンおよびアスパラギン酸からなる群から選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて7番目のX a a (配列番号1の8番目のアミノ酸に相当する)は、アルギニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、アラニンおよびグリシンからなる群より選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて8番目のX a a (配列番号1の10番目のアミノ酸に相当する)は、スレオニン、プロリン、アスパラギンおよびセリンからなる群より選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて9番目のX a a (配列番号1の11番目のアミノ酸に相当する)は、トリプトファン、メチオニン、チロシンおよびフェニルアラニンからなる群より選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて10番目のX a a (配列番号1の12番目のアミノ酸に相当する)は、グルタミン、バリン、リジン、メチオニン、アラニン、ロイシンおよびアスパラギンからなる群より選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて11番目のX a a (配列番号1の13番目のアミノ酸に相当する)は、チロシン、フェニルアラニンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸である； アミノ末端から数えて12番目のX a a (配列番号1の14番目のアミノ酸に相当する)はリジンである； また、アミノ末端から数えて1番目乃至12番目のX a aは、本段落に記載された各群から選択されるアミノ酸が、保存的アミノ酸置換されたもの(本発明の他の部分に詳述されている)であってもよい。

【0021】

さらに、本発明のある好適な態様において、本発明のペプチドは、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列に加え、当該アミノ酸配列のアミノ末端側に、直接あるいは1又は2個以上の任意のアミノ酸を挟んで、配列表の配列番号14の第1番塩基グアニン又は第4番目塩基シトシン乃至第42番塩基チミンからなる塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を、カルボキシル末端側に、直接あるいは1又は2個以上の任意のアミノ酸を挟んで、配列表の配列番号14の第94番塩基グアニン乃至189番塩基シトシンからなる塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を、それぞれ含んでもよい。かかるペプチドの有するアミノ酸配列においては、配列表の配列番号14の第1番塩基グアニン乃至第3番塩基チミンによりコードされるアスパラギン酸は、その対応する位置に含まれていなくてもよい。また、かかるペプチドの有するアミノ酸配列には、さらに他の任意のアミノ酸配列が含まれていてもよい。そのようなペプチドとしては、例えば、後述する実施例1において調製されたランダム変異SPINK2ライブラリーに含まれるペプチド、該ライブラリーから実施例3において選別され、ランダム領域のアミノ酸配列が決定されたペプチド等を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

【0022】

また、本発明のある態様において、ペプチドの有するアミノ酸配列に含まれる、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列のアミノ末端から数えて1番目乃至12番目のX a a以外のアミノ酸は置換、欠失、付加および/又は挿入されていてもよい。かかるアミノ酸配列において、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列または該配列に対応するアミノ酸配列のアミノ末端から数えて1番目乃至12番目のX a a以外の、置換、欠失、付加および/又は挿入されたアミノ酸の数は、1個以上10個以下であればよく、その下限は1個である。その上限は10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個であり、最小1個である。かかるアミノ酸の置換は、好適には保存的アミノ酸置換である。

【0023】

かかるアミノ酸配列において、配列番号1で示されるアミノ酸配列または該配列に対応

10

20

30

40

50

するアミノ酸配列のアミノ末端から数えて1番目乃至12番目のX a aは、それぞれ、任意のアミノ酸であるが、好適にはシステインを除く任意のアミノ酸であり、より好適には、前記の各群から選択されるアミノ酸であるか、あるいは該アミノ酸が保存的アミノ酸置換されたものである。

【0024】

「保存的アミノ酸置換 (conservative amino acid substitution)」とは、機能的に等価または類似のアミノ酸との置換を意味する。ペプチドにおける保存的アミノ酸置換は、該ペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。例えば、同様の極性を有する一つまたは二つ以上のアミノ酸は機能的に等価に作用し、かかるペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。一般に、あるグループ内の置換は構造および機能について保存的であると考えられることができる。しかしながら、当業者には自明であるように、特定のアミノ酸残基が果たす役割は当該アミノ酸を含む分子の三次元構造における意味合いにおいて決定され得る。例えば、システイン残基は、還元型の(チオール)フォームと比較してより極性の低い、酸化型の(ジスルフィド)フォームをとることができる。アルギニン側鎖の長い脂肪族の部分は構造的小および機能的に重要な特徴を構成し得る。また、芳香環を含む側鎖(トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン)はイオン-芳香族相互作用または陽イオン-pi相互作用に寄与し得る。かかる場合において、これらの側鎖を有するアミノ酸を、酸性または非極性グループに属するアミノ酸と置換しても、構造的小および機能的には保存的であり得る。プロリン、グリシン、システイン(ジスルフィド・フォーム)等の残基は主鎖の立体構造に直接的な効果を与える可能性があり、しばしば構造的ゆがみなしに置換することはできない。

【0025】

保存的アミノ酸置換は、以下に示すとおり、側鎖の類似性に基づく特異的置換(レーニンジャ、生化学、改訂第2版、1975年刊行、73乃至75頁:L. Lehninger, Biochemistry, 2nd edition, pp73-75, Worth Publisher, New York (1975))および典型的置換を含む。

【0026】

(1) 非極性アミノ酸グループ: アラニン(以下、「Ala」または単に「A」と記す)、バリン(以下、「Val」または単に「V」と記す)、ロイシン(以下、「Leu」または単に「L」と記す)、イソロイシン(以下、「Ile」または単に「I」と記す)、プロリン(以下、「Pro」または単に「P」と記す)、フェニルアラニン(「Phe」または単に「F」と記す)、トリプトファン(以下、「Trp」または単に「W」と記す)、メチオニン(以下、「Met」または単に「M」と記す)

(2) 非荷電極性アミノ酸グループ: グリシン(以下、「Gly」または単に「G」と記す)、セリン(以下、「Ser」または単に「S」と記す)、スレオニン(以下、「Thr」または単に「T」と記す)、システイン(以下、「Cys」または単に「C」と記す)、チロシン(以下、「Tyr」または単に「Y」と記す)、アスパラギン(以下、「Asn」または単に「N」と記す)、グルタミン(以下、「Gln」または単に「Q」と記す)

(3) 酸性アミノ酸グループ: アスパラギン酸(以下、「Asp」または単に「D」と記す)、グルタミン酸(以下、「Glu」または単に「E」と記す)

(4) 塩基性アミノ酸グループ: リジン(以下、「Lys」または単に「K」と記す)、アルギニン(以下、「Arg」または単に「R」と記す)、ヒスチジン(以下、「His」または単に「H」と記す)

【0027】

また、自然界に存在するアミノ酸は、その共通する側鎖の性質に基づいて次のようなグループに分けることができる。

(1) 疎水性アミノ酸グループ: ノルロイシン(Norleucine)、Met、Ala、Val、Leu、Ile

- (2) 中性親水性アミノ酸グループ：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln
 (3) 酸性アミノ酸グループ：Asp、Glu
 (4) 塩基性アミノ酸グループ：His、Lys、Arg
 (5) 主鎖の方角に影響を与えるアミノ酸のグループ：Gly、Pro
 (6) 芳香族アミノ酸グループ：Trp、Tyr、Phe

以下に、保存的置換の例を示すが、本発明の保存的アミノ酸置換はこれらに限定されるものではない。

【0028】

Alaは、例えば、Val、Leu、Ile、Met、ノルロイシン、Pro、Phe、Trpと置換し得る。

10

Argは、例えば、Lys、Hisと置換し得る。

Asnは、例えば、Cys、Ser、Thr、Gln、Tyr、Glyと置換し得る。

Aspは、例えば、Gluと置換し得る。

Cysは、例えば、Gly、Ser、Thr、Tyr、Asn、Glnと置換し得る。

Glnは、例えば、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asnと置換し得る。

Gluは、例えば、Aspと置換し得る。

Glyは、例えば、Ser、Cys、Thr、Tyr、Asn、Gln、Pro、Asp、Gluと置換し得る。

Hisは、例えば、Lys、Argと置換し得る。

Ileは、例えば、Leu、Val、Met、Pro、Ala、Phe、Trp、ノルロイシンと置換し得る。

20

Leuは、例えば、ノルロイシン、Ile、Val、Pro、Met、Ala、Phe、Trp、Metと置換し得る

Lysは、例えば、Arg、Hisと置換し得る。

Metは、例えば、Ala、Val、Leu、Phe、Ile、Pro、Trp、ノルロイシンと置換し得る。

ノルロイシンは、例えば、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trpと置換し得る。

Pheは、例えば、Trp、Leu、Val、Ile、Ala、Tyr、Pro、Metと置換し得る。

30

Proは、例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Met、Glyと置換し得る。

Serは、例えば、Thr、Cys、Asn、Gln、Gly、Tyrと置換し得る。

Thrは、例えば、Val、Ser、Gly、Cys、Tyr、Asn、Glnと置換し得る。

Trpは、例えば、Tyr、Phe、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Metと置換し得る。

Tyrは、例えば、Gly、Cys、Asn、Gln、Trp、Phe、Thr、Serと置換し得る。

Valは、例えば、Ile、Leu、Met、Trp、Phe、Ala、ノルロイシン、Proと置換し得る。

40

【0029】

かかるアミノ酸から構成されるアミノ酸配列を有する、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列（配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列に対応する：ランダム領域）の例としては、以下のものを挙げるができるが、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列はこれらに限定されるものではない。

【0030】

CRTRW GNRCT WQYKP VC （配列表の配列番号2： 図12の -キモトリプシン結合ペプチド1番）

CMRHR RHFCT MVYKP VC （配列表の配列番号3： 図12の -キ

50

モトリブシン結合ペプチド2番)

C R R W L L P W C T Y K Y K P V C (配列表の配列番号4: 図12の -キ

モトリブシン結合ペプチド6番)

C L W R R H K L C P F K F K P V C (配列表の配列番号5: 図12の -キ

モトリブシン結合ペプチド7番)

C W R S W R W A C P Y M Y K P V C (配列表の配列番号6: 図12の -キ

モトリブシン結合ペプチド12番)

C W F F R W R W C N W A L K P V C (配列表の配列番号7: 図12の -キ

モトリブシン結合ペプチド13番)

C S T W R M W G C P W L Y K P V C (配列表の配列番号8: 図12の -キ

モトリブシン結合ペプチド14番)

C W R R W Y D R C S F N L K P V C (配列表の配列番号9: 図12の -キ

モトリブシン結合ペプチド17番)

【0031】

本発明において、アミノ酸は、L-アミノ酸、D-アミノ酸、またはその混合物(DL-アミノ酸)であるが、特に明記しない限りL-アミノ酸を意味する。

【0032】

また、本発明において、アミノ酸は、上記以外のアミノ酸(以下、便宜的に「異常アミノ酸」と総称する。)であってよい。異常アミノ酸としては、例えば、天然のペプチドや蛋白質において見出されるセレノシステイン、N-ホルミルメチオニン、ピロリジン、ピログルタミン酸、シスチン、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、チロキシン、O-ホスホセリン、デスモシン、 β -アラニン、サルコシン、オルニチン、クレアチン、アミノ酪酸、オパイン、テアニン、トリコロミン酸、カイニン酸、ドウモイ酸、アクロメリン酸等を挙げることができ、非天然アミノ酸としては、Ac-アミノ酸、Boc-アミノ酸、Fmoc-アミノ酸、Trt-アミノ酸、Z-アミノ酸等のN末端保護アミノ酸、アミノ酸t-ブチルエステル、ベンジルエステル、シクロヘキシルエステル、フルオレニルエステル等のC末端保護アミノ酸、ジアミン、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、アミノ酸のTic誘導體、アミノフォスホン酸を含むその他のアミノ酸等を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

【0033】

本発明のペプチドは、化学合成、遺伝子組換え、イン・ビトロ翻訳等、ペプチドや蛋白質を製造する方法として当業者に周知の方法により調製することができる。また、本発明のライブラリー等から同定または選抜されたペプチドも、それらの方法により調製することができる。

【0034】

化学合成法としては、例えば、t-ブトキシカルボニル(t-Butoxycarbonyl: Boc)法、9-フルオレニルメトキシカルボニル(9-Fluorenylmethoxycarbonyl: Fmoc)法等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。Fmoc法は、脱保護条件が温和であり、樹脂からのペプチドの切り出しが簡便であること等の特長を有している(Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach, ed. by W. C. Chan, P. D. White Eds., Oxford University Press, New York, 2000.)。

【0035】

本発明において、「ペプチドの誘導體」および「ペプチド誘導體」とは、本発明のペプチドに化学的な修飾または生物学的な修飾が施されたものを意味する。化学的な修飾とは、本発明のペプチド中またはペプチド上において、化学反応、すなわち原子-原子間の結合の生成若しくは切断により、元のペプチドとは異なる物質に変化させることを意味する。生物学的修飾とは、本発明のペプチド中またはペプチド上において、生物学的反応、すなわち生物に由来する蛋白質(酵素、サイトカイン等)、核酸(リボザイム等)、細胞、

10

20

30

40

50

組織、器官若しくは非ヒト個体を利用して、またはそれらの直接的または間接的な作用により、元のペプチドとは異なる物質を生じさせることを意味する。

【0036】

かかる「誘導体」は、元のペプチドとは異なる物質であれば特に限定されるものではないが、例えば、天然に生じる糖鎖または人工的に創出された糖鎖を含むもの、ポリエチレングリコール（PEG）等のポリマーを含むもの、合成化合物または天然化合物を含むもの、標識されたもの、固相化に必要な部分を含むもの、アミノ末端側にシグナルペプチドが連結しているもの、精製または単離を行う際に利用するタグを含むもの、ディスプレイ、パニング、発現等に適したベクターに由来するアミノ酸やアミノ酸配列、フレームシフトを回避するため又は制限酵素サイトを導入するために該ペプチドをコードする塩基配列が変更されることにより生じたアミノ酸やアミノ酸配列、および、表現型であるペプチドおよび該表現型に対応する遺伝型が直接的または間接的にリンクしているもの、ならびに、それらのうち二つ以上を組み合わせたもの等をあげることができる。

10

【0037】

本発明のペプチド誘導体は、本発明のペプチドを原料として、化学反応、生化学反応、翻訳後修飾等、ペプチドや蛋白質を化学的または生物学的に修飾する方法として当業者に周知の方法に供することにより、調製することができる。また、本発明のライブラリー等から同定または選抜されたペプチドの誘導体も、それらの方法により調製することができる。また、所望の翻訳後修飾能を有する細胞を用いた遺伝子組換えによっても、かかる翻訳後修飾が施された本発明のペプチド誘導体を調製することができる。さらに、イン・ビ

20

【0038】

PEG化の方法としては、例えば、ペプチドまたは蛋白質とN-Hydroxysuccinimide Ester (NHS) - PEGとを反応させる方法等をあげることができるが、それに限定されるものではない。

【0039】

本発明のペプチドおよびその誘導体は、好適な態様において、標的分子（本発明の他の箇所において詳細に記載されている）に結合する。予め決定された標的分子に結合する本発明のペプチドは、当該標的分子がマーカーとなり得る各種疾患の検査用の試薬等として有用である。前述のとおり、本発明には、ペプチドの有するアミノ酸配列に含まれる、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列のアミノ末端から数えて1番目乃至12番目のXaa以外1乃至数個（数個は1乃至10個の任意に整数個）のアミノ酸が置換、欠失、付加および/又は挿入されてなるアミノ酸配列を有するペプチドが含まれるが、かかるペプチドはその好適な態様において標的分子に結合し、かかる標的分子は予め決定されていることが好ましい。

30

【0040】

本発明のペプチドおよびその誘導体がとり得る形態としては、例えば、単離された形態（凍結乾燥標品、溶液等）、他の分子に結合した形態（固相化された形態、融合蛋白質、異分子との会合体、標的分子と結合した形態等）、他のペプチド等をも含む物理的集合（本発明のペプチド・ライブラリーを含む）、細胞表面上（大腸菌や酵母の細胞表面上等）に発現または提示（ディスプレイと同義）された形態（本発明の細胞を含む）、ウイルス粒子上に発現または提示（ディスプレイと同義）された形態等をあげることができるが、それらに限定されるものではなく、使用、保存等の目的に適合した形態を任意に選択することができる。

40

【0041】

2.ヌクレオチド

本発明はヌクレオチドを提供する。

【0042】

本発明において、「ヌクレオチド」は、モノヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたは

50

ポリヌクレオチドであり、「核酸」、「核酸分子」または「遺伝子」とも呼ばれる。本発明のヌクレオチドとしては、例えば、DNA、cDNA、RNA、mRNA、cRNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プライマー、ベクター等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。また、本発明のヌクレオチドは、一本鎖ヌクレオチド、二本鎖ヌクレオチドおよび三本以上のヌクレオチドの会合体のいずれであってもよく、DNAおよびRNAからなるハイブリッド一本鎖ヌクレオチド、該ヌクレオチドとその相補鎖からなる二本鎖、一本鎖DNAおよび一本鎖RNAからなるハイブリッド二本鎖、二本鎖RNA、分子内に二本鎖構造部分を有し得る一本鎖ヌクレオチド等をも包含する。さらに、本発明のヌクレオチドは、天然に生じる塩基またはモノヌクレオチド以外の（人工的に創出された）塩基もしくはモノヌクレオチドを一つまたは二つ以上含んでいてもよい。

10

【0043】

本発明の好適なヌクレオチドとしては、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるヌクレオチドを含んでなるヌクレオチド、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含んでなるヌクレオチド等をあげることができる。かかる好適なヌクレオチドは、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列以外の塩基配列および/または非ヌクレオチド部分を含んでいてもよく、化学的または生物学的な修飾（本発明の他の部分に記載されている）が施されていてもよい。それらはいずれも「ヌクレオチド」に包含される。

【0044】

20

また、本発明のヌクレオチドは、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるヌクレオチドをも包含する。

【0045】

本発明においては、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列が、あるヌクレオチドの塩基配列の一部または全部によりコードされている場合、かかるヌクレオチドを「（かかる）ペプチドに対応するヌクレオチド」とよび、かかるペプチドを「（かかる）ヌクレオチドに対応するペプチド」とよぶ。

【0046】

本発明のペプチドに対応するヌクレオチドとしては、例えば、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるヌクレオチドを含んでなるヌクレオチド、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含んでなるヌクレオチド、本発明のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるヌクレオチド等をあげることができるが、これらに限定されるものではない。

30

【0047】

本発明のヌクレオチドに対応するペプチドとしては、本発明のヌクレオチドの塩基配列の一部もしくは全部によりコードされるアミノ酸配列からなるペプチドを含んでなるペプチド、本発明のヌクレオチドの塩基配列の一部または全部によりコードされるアミノ酸配列を含んでなるペプチド、本発明のヌクレオチドの塩基配列の一部または全部によりコードされるアミノ酸配列からなるペプチド、それらのペプチドのいずれか一つの誘導体等をあげることができるが、これらに限定されるものではない。

40

【0048】

本発明においては、「表現型に対応する遺伝型」なる表現も「ペプチドに対応するヌクレオチド」と同じ意味に用いられる。同様に、「遺伝型に対応する表現型」なる表現も「ヌクレオチドに対応するペプチド」と同じ意味に用いられる。

【0049】

本発明のヌクレオチドの化学的または生物学的な修飾物が本発明のペプチドを含んでいる場合、かかる修飾物は、前述の本発明の「ペプチドの誘導体」の意味に包含される。

【0050】

本発明のより好適なヌクレオチドとしては、前述の好適なヌクレオチドのうち、標的分子に結合する本発明のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるヌ

50

レオチドを含んでなるヌクレオチド、標的分子に結合する本発明のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含んでなるヌクレオチド、標的分子に結合する本発明のペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるヌクレオチド等をあげることができる。

【0051】

本発明において、アミノ酸配列をコードする塩基配列を設計するに際しては、各アミノ酸に対応するコドンを一様または二種以上使用することができる。それゆえ、あるペプチドまたは蛋白質が有する単一のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、複数のバリエーションを有し得る。かかるコドンの選択に際しては、該ペプチドに対応する遺伝型、すなわち該塩基配列を含むヌクレオチドが導入される細胞（宿主細胞）のコドン使用（codon usage）に応じて適宜コドンを選択したり、複数のコドンの使用の頻度もしくは割合を適宜調節したりすることができる。例えば、大腸菌を細胞（宿主細胞）として用いる場合は、大腸菌において使用頻度が高いコドンを使用して塩基配列を設計することができる。

10

【0052】

本発明のヌクレオチドは、化学合成、遺伝子組換え等、ヌクレオチドを製造する方法として当業者に周知の方法により調製することができる。また、本発明のライブラリー等から本発明の同定方法により回収（選抜、濃縮、単離を含む）されたペプチドに対応するヌクレオチドも、それらの方法により調製することができる。

【0053】

本発明のヌクレオチドがとり得る形態としては、例えば、単離された形態（凍結乾燥標品、溶液等）、他の分子に結合した形態（固相化された形態等）、該ヌクレオチドを含む組換えベクター（本発明のベクター）、該ヌクレオチドまたは該ベクターが導入された細胞（本発明の細胞）、ウイルスもしくはウイルス粒子に含まれる形態（本発明のベクターとして含まれる形態を含む）、他のヌクレオチド等をも含む物理的集合（本発明のヌクレオチド・ライブラリーを含む）等をあげることができるが、それらに限定されるものではなく、使用、保存等の目的に適合した形態を任意に選択することができる。

20

【0054】

3. ベクター

本発明は組換えベクター（以下、単に「ベクター」ともよぶ）を提供する。

30

【0055】

本発明のベクターは、本発明のヌクレオチドを含み、且つ本発明のヌクレオチドを細胞、微生物または個体に導入するための手段であれば特に限定されないが、好適には、ファージミド、コスミド、プラスミド等の核酸ベクターをあげることができる。

【0056】

本発明のベクターは、原核細胞または真核細胞に感染するウイルスまたはウイルス性ベクターであってもよい。

【0057】

本発明において、「ファージミド」とは、プラスミド複製起点の他に、一本鎖バクテリオファージから誘導された第二の複製起点を含む細菌プラスミドを意味する。かかるファージミドを有する細胞は、M13またはそれに類似のヘルパーバクテリオファージによる重感染において、一本鎖複製モードを介してファージミドを複製することができる。すなわち、バクテリオファージ被覆タンパク質により被覆された感染性粒子の中に、一本鎖ファージミドDNAがパッケージされる。このようにして、ファージミドDNAを、感染細菌中にクローン二本鎖DNAプラスミドとして、ファージミドを、重感染した細胞の培養上清からバクテリオファージ状の粒子として、それぞれ形成することができる。バクテリオファージ状の該粒子を、F性線毛を有する細菌にかかるDNAを感染させるために該細菌中に注入することにより、粒子自体をプラスミドとして再形成することができる。

40

【0058】

本発明のペプチドに対応するヌクレオチドおよびバクテリオファージ被覆蛋白質（co

50

at protein) 遺伝子を含んで構成される融合遺伝子を該ファージミドに挿入して細菌に感染させ、該細胞を培養すれば、かかるペプチドを、該細菌上またはファージ様粒子上に発現もしくは提示（ディスプレイと同義）させるか、または、該被覆蛋白質との融合蛋白質としてファージ粒子中もしくは該細菌の培養上清中に産生することができる。

【0059】

例えば、本発明のペプチドに対応するヌクレオチドおよびバクテリオファージ被覆タンパク質遺伝子 gpIIII を含んで構成される融合遺伝子をファージミドに挿入し、M13 またはそれに類似のヘルパーファージとともに大腸菌に重感染させれば、該ペプチドおよび該被覆蛋白質を含んで構成される融合蛋白質として、該大腸菌の培養上清中に産生させることができる。かかる融合蛋白質は該ペプチドの誘導体として本発明に包含される。

10

【0060】

ファージミドの代わりに、環状または非環状の各種ベクター、好適にはウイルスベクターを用いても、当業者に周知の方法に従って、該ベクターに含まれる本発明のヌクレオチドの塩基配列によりコードされるペプチドを、該ベクターが導入された細胞あるいはウイルス様粒子上に発現もしくは提示（ディスプレイと同義）させるか、または該細胞の培養上清中に産生することができる。

【0061】

本発明のベクター（組換えベクター）は、遺伝子組換え等当業者に周知の方法により調製することができる。

【0062】

本発明のベクターがとり得る形態としては、例えば、単離された形態（凍結乾燥標品、溶液等）、他の分子に結合した形態（固相化された形態等）、細胞に導入された形態（本発明の組換え細胞を含む）、他のベクター等をも含む物理的集合（本発明のヌクレオチド・ライブラリーの特定の態様を含む）等をあげることができるが、それらに限定されるものではなく、使用、保存等の目的に適合した形態を任意に選択することができる。

20

【0063】

4. 細胞

本発明は、その一つの態様において、組換え細胞（以下、単に「細胞」ともよぶ）を提供する。

【0064】

本発明の細胞は、本発明のペプチドに対応するヌクレオチドを含み且つ該ペプチドを発現する細胞である。かかる細胞の宿主細胞としては、真核細胞（株化細胞、初代培養細胞、継代培養細胞を含む）および原核細胞のいずれであっても特に限定されるものではない。

30

【0065】

原核細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 等の細菌細胞をあげることができるが、これらに限定されるものではない。

【0066】

真核細胞としては、例えば、動物細胞、昆虫細胞、酵母、真菌等をあげることができ、動物細胞としては、例えば、サルの細胞である COS 細胞（グルツマン、セル、23 巻、1981 年刊行、175 乃至 182 頁：Gluzman, Y., *Cell* (1981), vol. 23, pp 175 - 182；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション番号 ATCC CRL - 1650）、マウス線維芽細胞 NIH3T3（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション番号 ATCC CRL - 1658）、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (*Chinese hamster ovary cell*；CHO 細胞；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション番号 ATCC CCL - 61）、CHO 細胞のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（ウルラオブとチャシン、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー、77 巻、1980 年刊行、4126 乃至 4220 頁：Urlaub, G. and Chas

40

50

in, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980), vol. 77, pp 4126 - 4220)等をあげることができるが、これらに限定されるものではない。

【0067】

本発明の細胞は、本発明のヌクレオチドまたはベクターを宿主細胞へ導入することにより調製することができるが、好適には、本発明のベクターをトランスフェクション、形質転換、形質導入等で宿主細胞へ導入することにより調製することができる。

【0068】

本発明の細胞の調製に適用し得るベクターとしては、例えば、かかる原核細胞と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列、転写開始点、(翻訳の)開始コドンと終止コドン等から選択されるものの塩基配列を一つ以上含むプラスミド、コスミド、ファージミド等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。また、かかるヌクレオチドまたはベクターは、該ベクターまたはヌクレオチドが導入された細胞に表現形質(表現型)の選択性を付与し得る塩基配列を含んでいてもよい。かかるベクターまたはヌクレオチドを宿主細胞に導入し、得られた細胞を培養することにより、本発明のペプチドを発現させることができる。

10

【0069】

本発明のペプチドの翻訳後修飾に適した宿主細胞も、本発明の細胞として使用することができる。かかる宿主細胞が適用された本発明の細胞は、例えば、本発明のペプチド誘導体を調製する方法(のある態様)において使用することができる。

20

【0070】

本発明の細胞がとり得る形態としては、例えば、単離された形態(冷凍標品、凍結乾燥標品、溶液等)、他の分子に結合した形態(固相化された形態等)、本発明のヌクレオチドまたはベクターが導入された細胞(本発明の細胞に含まれる)、本発明のペプチドが表面に発現または提示(ディスプレイと同義)されている細胞(本発明の細胞に含まれる)、他の細胞等をも含む物理的集合(本発明のヌクレオチド・ライブラリーおよびペプチド・ライブラリーの特定の態様を含む)等をあげることができるが、それらに限定されるものではなく、使用、保存等の目的に適合した形態を任意に選択することができる。

【0071】

5. ペプチドの製造方法

30

本発明は、また他の態様として、本発明のペプチドの製造方法を提供する。

【0072】

本発明のペプチドは、前述のとおり、化学合成、遺伝子組換え、イン・ビトロ翻訳等、ペプチドや蛋白質を製造する方法として当業者に周知の方法により調製することができる。また、本発明のライブラリー等から本発明の同定方法により回収(選抜、濃縮、単離を含む)されたペプチドも、それらの方法により調製することができる。

【0073】

本発明のペプチドの製造方法は、ある態様において、次の工程(1-1)および(1-2)を含んでなる：

(1-1)本発明のペプチドに対応するヌクレオチドを含み且つ該ペプチド等を発現する細胞(本発明の細胞)を培養する工程；および、

40

(1-2)該培養物から該ペプチドを回収する工程。

【0074】

また、本発明のペプチドの製造方法は、他の態様において、次の工程(2-1)および(2-2)を含んでなる：

(2-1)標的分子に結合する本発明のペプチドのアミノ酸配列を決定する工程；および、

(2-2)該アミノ酸配列からなるペプチドを化学合成または遺伝子組換えにより調製する工程。

【0075】

50

さらに、本発明のペプチドの製造方法は、また他の態様において、次の工程（3 - 1）および（3 - 2）を含んでなる：

（3 - 1）本発明のペプチドに対応する対応するmRNAを調製する工程；および、
（3 - 2）前記（3 - 1）で得られたmRNAを鋳型として、イン・ビトロ翻訳により、該ペプチドを調製する工程。

【0076】

また、これらの製造方法には、事前の工程として、本発明の同定方法を適宜組合せることができる。すなわち、まず、本発明の同定方法に含まれる工程を実施し、次いで本発明の製造方法に含まれる工程を実施することができる。本発明のペプチドの製造方法は、そのような、本発明の同定方法（の各工程）をさらに含むことからなる方法をも包含する。

10

【0077】

そのような本発明のペプチドの製造方法は、例えば、次の工程（4 - 1）乃至（4 - 3）を含んでなる：

（4 - 1）本発明のペプチド・ライブラリーに含まれるペプチドと標的分子とを接触させる工程；

（4 - 2）該標的分子に結合するペプチドを回収する工程；および

（4 - 3）回収されたペプチドを、化学合成、遺伝子組換えまたはイン・ビトロ翻訳により調製する工程。

【0078】

同様に、これらの製造方法には、事前の工程として、本発明の判定方法を適宜組合せることができる。すなわち、まず、本発明の判定方法に含まれる工程を実施し、次いで本発明の製造方法に含まれる工程を実施することができる。本発明のペプチド等の製造方法は、そのような、本発明の判定方法（の各工程）をさらに含むことからなる方法をも包含する。

20

【0079】

そのような本発明のペプチド等の製造方法は、例えば、次の工程（5 - 1）乃至（5 - 3）を含んでなる：

（5 - 1）本発明の被検ペプチドと標的分子とを接触させる工程；

（5 - 2）被検ペプチドが該標的分子に結合する場合、該ペプチドは陽性であると決定する工程；および、

（5 - 3）前記（5 - 2）において被検ペプチドは陽性であると決定された場合、該ペプチドを化学合成、遺伝子組換えまたはイン・ビトロ翻訳により調製する工程。

30

【0080】

さらに、本発明のペプチドの製造方法は、他の態様において、SPINK2の内在性の標的分子であるトリプシンおよび/またはアクロシン以外の、好適にはトリプシン以外の標的分子に結合し且つ該標的分子の有する生物活性の一部または全部を活性化もしくは促進、または、阻害、不活性化もしくは抑制するペプチドを同定する工程を含んでなる。かかる製造方法は、例えば、次の（6 - 1）乃至（6 - 3）または（7 - 1）乃至（7 - 3）の工程を含む：

（6 - 1）本発明のペプチド・ライブラリーに含まれるペプチドと該標的分子とを接触させる工程；

（6 - 2）該標的分子に結合するペプチドを回収する工程；、および、

（6 - 3）該ペプチドが該標的分子の有する生物活性を活性化もしくは促進するか、または、該標的分子を刺激する（agonize）場合、該ペプチドを陽性と判定する工程。

（7 - 1）本発明のペプチド・ライブラリーに含まれるペプチドと該標的分子とを接触させる工程；

（7 - 2）該標的分子に結合するペプチドを回収する工程；、および、

（7 - 3）該ペプチドが該標的分子の有する生物活性を阻害、不活性化もしくは抑制するか、または、該標的分子に拮抗する（antagonize）場合、該ペプチドを陽性と判定する工程。

40

50

【0081】

また、本発明の製造方法は、別の態様において、(6-1)乃至(6-3)または(7-1)乃至(7-3)の替わりに、例えば、次の(8-1)および(8-2)または(9-1)または(9-2)を含んでなる：

(8-1)被検ペプチドとトリプシンおよび/またはアクロシン以外の、好適にはトリプシン以外の標的分子とを接触させる工程；および、

(8-2)該ペプチドが該標的分子の有する生物活性を活性化もしくは促進するか、または、該標的分子を刺激する(agonize)場合、該ペプチドを陽性と判定する工程。

(9-1)被検ペプチドとトリプシンおよび/またはアクロシン以外の、好適にはトリプシン以外の標的分子とを接触させる工程；および、

(9-2)該ペプチドが該標的分子の有する生物活性を阻害、不活性化もしくは抑制するか、または、該標的分子に拮抗する(antagonize)場合、該ペプチドを陽性と判定する工程。

10

【0082】

(6-1)乃至(6-3)、または、(8-1)および(8-2)等の工程に、(4-3)または(5-3)等に準じた工程を組み合わせるにより、標的分子の有する生物活性を活性化もしくは促進するペプチド、または、標的分子を刺激するペプチド(agonistic peptide)を製造することができる。同様に、(7-1)乃至(7-3)、または、(9-1)および(9-2)等の工程に、(4-3)または(5-3)等に準じた工程を組み合わせるにより、標的分子の有する生物活性を阻害、不活性化

20

【0083】

また、本発明はペプチドの誘導体(ペプチド誘導体)の製造方法を提供する。本発明のペプチド誘導体は、例えば、該誘導体に含まれるペプチドを上記の方法(ペプチドの製造方法)により調製した後、化学反応、生化学反応、翻訳後修飾等に供することにより、調製することができるが、それらに限定されるものではない。

【0084】

上記(2-2)、(3-2)、(4-3)または(5-3)において調製されるペプチドの代わりに、当該ペプチド(X)の有するアミノ酸配列から1もしくは2以上のアミノ酸又は部分アミノ酸配列が欠失してなるアミノ酸配列を有するペプチド(X')を調製することもできる。ペプチド(X')の製造方法も本発明に包含される。かかる方法により調製されるペプチド(X')は好適には標的分子に結合する。かかる好適なペプチド(X')のアミノ酸配列においては、元のペプチドの有するアミノ酸配列に含まれるが標的分子との結合に必須ではない1又は2以上のアミノ酸又は部分アミノ酸配列が欠失してもよい。

30

【0085】

本発明のペプチド誘導体の製造方法としては、例えば、上記の(1-1)および(1-2)、(2-1)および(2-2)、(3-1)および(3-2)、(4-1)乃至(4-3)、(5-1)乃至(5-3)、(6-1)乃至(6-3)、(7-1)乃至(7-3)、(8-1)および(8-2)、または、(9-1)および(9-2)等の各工程に加え、本発明のペプチドを原料として本発明のペプチド誘導体を調製する工程(以下、「誘導体調製工程」という。)をも含んでなる方法、上記の(2-2)、(3-2)、(4-3)および(5-3)においてペプチドの代わりにペプチドの誘導体を調製する工程を含んでなる方法、予めペプチド・ライブラリーにペプチド誘導体を含有させておく方法、被検ペプチドの替わりに被検ペプチド誘導体を用いる方法等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。

40

【0086】

本発明のペプチド誘導体の製造方法に含まれ得る上記(2-2)、(3-2)、(4-3)または(5-3)において調製されるペプチド誘導体の代わりに、当該ペプチド誘導

50

体（Ｙ）の有するアミノ酸配列から１もしくは２以上のアミノ酸又は部分アミノ酸配列が欠失してなるアミノ酸配列を有するペプチド誘導體（Ｙ'）を調製することもできる。ペプチド誘導體（Ｙ'）の製造方法も本発明に包含される。かかる方法により調製されるペプチド誘導體（Ｙ'）は好適には標的分子に結合する。かかる好適なペプチド誘導體（Ｙ'）のアミノ酸配列においては、元のペプチド誘導體の有するアミノ酸配列に含まれるが標的分子との結合に必須ではない１又は２以上のアミノ酸又は部分アミノ酸配列が欠失してもよい。また、所望の翻訳後修飾能を有する細胞を本発明のペプチドの製造方法において用いることにより、所望の翻訳後修飾が施されたペプチドとして、本発明のペプチド誘導體を調製することもできる。かかる場合、例えば、所望の翻訳後修飾能を有する細胞を、上記工程の（１－１）および（１－２）における細胞として、または、（２－２）、（４－３）および（５－３）における遺伝子組換えに適用される細胞（または宿主細胞）として、それぞれ用いることにより、所望の翻訳後修飾が施されたペプチド誘導體を調製することができるが、本発明の（ペプチド誘導體の製造方法の態様として）ペプチドの翻訳後修飾能を調製する方法は、それらに限定されるものではない。

10

【 0 0 8 7 】

6. ライブラリー

本発明はライブラリーを提供する。

【 0 0 8 8 】

本発明において、「ライブラリー」とは、類似するが、同一ではない分子の物理的集合（コレクション）を意味する。かかる集合は、例えば、一つの容器中に共存し得るが、異なる容器あるいは固相支持体上の異なる場所に、グループとしてまたは個々の分子として、物理的に分離されて存在してもよい。複数のライブラリーが同一の集合に含まれていてもよい。

20

【 0 0 8 9 】

本発明のライブラリーは、同一ではない本発明のペプチドおよび／またはヌクレオチドの物理的集合であれば何ら限定されるものではないが、例えば、ファージ・ディスプレイ・ライブラリー、リボゾーム・ディスプレイ・ライブラリー、核酸ディスプレイ・ライブラリー等をあげることができる。

【 0 0 9 0 】

「ファージ・ディスプレイ」とは、繊維状ファージ（filamentous phage）等の被覆蛋白質（coat protein）に外来のペプチドまたは蛋白質を連結し、融合蛋白質としてファージ様粒子上に発現または提示（ディスプレイと同義）させる技術（方法およびそのための手段）を意味する。また、かかる技術を利用した、該ペプチドまたは蛋白質に対応するヌクレオチドの回収（選抜、濃縮、単離を含む）も「ファージ・ディスプレイ」の意味に包含される。ファージ・ディスプレイ・ライブラリーは、かかる技術において使用される、本発明のライブラリーの一態様である。

30

【 0 0 9 1 】

「リボゾーム・ディスプレイ」とは、イン・ビトロ翻訳において、翻訳反応中に形成される、mRNA-リボゾーム-ペプチドまたは蛋白質、の三者を含んでなる複合体としての形態で、ペプチドまたは蛋白質を発現または提示（ディスプレイと同義）させる技術（方法およびそのための手段）を意味する。ここで、ペプチドまたは蛋白質は、該mRNAの翻訳産物である。また、かかる技術による、該ペプチドまたは蛋白質に対応するヌクレオチドの回収（選抜、濃縮、単離を含む）も「リボゾーム・ディスプレイ」の意味に包含される。リボゾーム・ディスプレイ・ライブラリーは、かかる技術において使用される、本発明のライブラリーの他の一態様である。

40

【 0 0 9 2 】

「核酸ディスプレイ」とは、ヌクレオチド（核酸と同義）と、該ヌクレオチドに対応するペプチドまたは蛋白質を含んでなる複合体としての形態で、ペプチドもしくは蛋白質を発現または提示（ディスプレイと同義）させる技術（方法およびそのための手段）を意味する（キーフェとスゾスタク、ネイチャー、410巻、715乃至718頁、2001年

50

刊行：Keefe, A. D. and Szostak, J. W., Nature, vol. 410 (2001), pp 715 - 718)。また、かかる技術による、該ペプチドまたは蛋白質に対応するヌクレオチドの回収（選抜、濃縮、単離を含む）も「核酸ディスプレイ」の意味にされ包含する。核酸ディスプレイ・ライブラリーは、かかる技術において使用される、本発明のライブラリーのまた他の一態様である。

【0093】

核酸ディスプレイとしては、例えば、mRNAディスプレイをあげることができるが、それに限定されるものではない。(Yamaguchi, J. et al., Nucleic Acids Research, vol. 37, No. 16 e108, pp 1 - 13 (2009))

mRNAディスプレイは、mRNAとその翻訳産物であるペプチドまたは蛋白質が介在部分を挟んで連結してなる複合体としての形態で、ペプチドまたは蛋白質を提示（ディスプレイと同義）させる技術である（キーフェとスゾスタク、ネイチャー、410巻、715乃至718頁、2001年刊行：Keefe, A. D. and Szostak, J. W., Nature, vol. 410 (2001), pp 715 - 718)。

【0094】

本発明においては、同一ではない本発明のペプチドおよび/またはヌクレオチドの物理的集合を含む細胞の物理的集合、微生物（ウイルス、ファージ、ファージ様分子、それらのいずれかの粒子等を含む）の物理的集合、および、天然に生じるかまたは人工的に創出されたベクター（ファージミド、コスミド、プラスミド等を含む）の物理的集合、ならびに、それらの断片の物理的集集合、および、科学のおよび/または生物学的な修飾物の物理的集合も、「ライブラリー」の意味に包含される。

【0095】

前述のとおり、本発明において、アミノ酸配列コードする塩基配列を設計するに際しては、各アミノ酸に対応するコドンを一様または二種以上使用することができる。それゆえ、あるペプチドまたは蛋白質が有する単一のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、複数のバリエーションを有し得る。かかるコドンの選択に際しては、該ペプチドに対応する遺伝型、すなわち該塩基配列を含むヌクレオチドが導入される細胞（宿主細胞）のコドン使用（codon usage）に応じて適宜コドンを選択したり、複数のコドンの使用の頻度もしくは割合を適宜調節したりすることができる。よって、本発明のヌクレオチド・ライブラリーには、単一のアミノ酸配列をコードする塩基配列のヌクレオチドは、複数のバリエーションを有し得る。すなわち、本発明のヌクレオチド・ライブラリーには、あるペプチドの有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むヌクレオチドの物理的集合が含まれていてもよい。かかる特定のペプチドに対応するヌクレオチドの物理的集合は、それら自体で一つのヌクレオチド・ライブラリーを形成し得る。

【0096】

本発明のライブラリーには、類似するが、同一ではない分子が複数含まれる。ライブラリーに含まれる類似分子の種類（の数）のことを「ライブラリーの多様性」という。例えば、100種の類似分子からなるライブラリーの多様性は 10^2 である。本発明において、ライブラリーの多様性は、特に限定されるものではないが、その数値が高いほど好ましい。

【0097】

本発明の同定方法および該同定方法の工程を含むペプチドの製造方法において使用されるペプチド・ライブラリーの多様性は、 1×10^5 以上、 2×10^5 以上、 5×10^5 以上、 1×10^6 以上、 2×10^6 以上、 5×10^6 以上、 1×10^7 以上、 2×10^7 以上、 5×10^7 以上、 1×10^8 以上、 2×10^8 以上、 5×10^8 以上、 1×10^9 以上、 2×10^9 以上、 5×10^9 以上、 1×10^{10} 以上、 2×10^{10} 以上、 5×10^{10} 以上、 1×10^{11} 以上、 2×10^{11} 以上、 5×10^{11} 以上、 1×10^{12} 以上、 2×10^{12} 以上、 5×10^{12} 以上、 1×10^{13} 以上、 2×10^{13} 以上、 5×10^{13} 以上、

0.1^3 以上、 1×10^{14} 以上、 2×10^{14} 以上、 5×10^{14} 以上、 1×10^{15} 以上、 2×10^{15} 以上、 5×10^{15} 以上、 1×10^{16} 以上、 2×10^{16} 以上、 5×10^{16} 以上、または、 1×10^{17} 以上である。かかるライブラリーの多様性は、実測値に限定されるものではなく、理論値であってもよい。

【0098】

7. 同定方法

本発明は、標的分子に結合するペプチドおよび/またはペプチド誘導体の同定方法を提供する。本発明の同定方法は、例えば、前記の工程(4-1)および(4-2)、(6-1)および(6-2)、(7-1)および(7-2)等を含んでいてもよいが、それらに限定されない。

【0099】

(1) 標的分子

本発明において「標的分子」とは、本発明のペプチドが結合する、ヒトもしくは非ヒト動物の個体に内在する物質または生体内に取り込まれ得る外因性の物質を意味する。本発明の標的分子は、好適にはSPINK2の内在性の標的であるトリプシンおよび/またはアクロシン以外の、より好適にはトリプシン以外の分子であり、より一層好適にはヒト由来のトリプシン以外のヒト由来の分子である。さらにより一層好適には、かかるヒト個体が罹患し得る疾患の発症もしくは増悪に直接または間接的に関与し得るか、または、かかる疾患と相関もしくは逆相関を示す、内在するかあるいは外因性の酵素、受容体、該受容体のリガンド、サイトカイン等の液性因子、その他の生体高分子、シグナル伝達物質、細胞、病原体、毒素、または、それらのいずれか一つもしくはそれ以上に由来する物質、例えば、その断片、分解物、代謝産物、加工物等である(以下、「疾患関連標的分子」という)。また、本発明の標的分子は、鉱物、ポリマー、プラスチック、合成低分子化合物等の非天然物質であってもよい。

【0100】

本発明のある態様として好適な標的分子はトリプシンおよび/またはアクロシン以外の、より好適にはトリプシン以外のプロテアーゼであり、より一層好適にはセリンプロテアーゼである。さらにより一層好適にはエンド型のセリンプロテアーゼであり、エンド型セリンプロテアーゼの例としては、キモトリプシンをあげることができる。組織、体液、細胞等から特定の蛋白質成分を精製、単離する際、かかる成分を含有する画分にそれらのプロテアーゼ阻害剤を添加すれば、かかる成分の分解を低減することができ、それらのプロテアーゼ阻害剤は組換え型および非組換え型の各種蛋白質の製造に有用である。

また、それらのプロテアーゼは好適には疾患関連標的分子である。

【0101】

本発明の標的分子は、本発明のペプチド・ライブラリーから該標的分子に結合するペプチド、該標的分子を刺激するペプチドまたは該標的分子に拮抗するペプチドを選抜する際、被検ペプチドと標的分子に対する結合性または刺激活性もしくは拮抗活性を判定する際に使用される。かかる標的分子は、全長分子若しくはその断片、または任意のアミノ酸、ペプチド、蛋白質、糖鎖、ポリマー、担体等が付加された誘導体であってもよい。また、かかる標的分子は固相化されていてもよい。

【0102】

(2) 標的分子の調製

本発明の標的分子は、疾患に罹患した組織、細胞から単離、精製して、あるいは組織、細胞等にその全部又は一部が結合又は含まれた形態で、使用することができる。また、本発明の標的分子は、化学合成、遺伝子組換え、イン・ビトロ翻訳等、ペプチドまたは蛋白質の製造方法として当業者に周知の方法により調製することができる。このようにして得られた標的分子から、必要に応じて、前述のような誘導体を調製してもよい。

【0103】

本発明において、ペプチドまたは蛋白質は、イン・ビトロ翻訳、すなわち、かかるペプチドまたは蛋白質に対応するDNA、cDNA等のヌクレオチドもしくは該ヌクレオチド

10

20

30

40

50

を含むベクターを、転写および翻訳に必要な酵素、基質、エネルギー物質等を含む溶液中で保温することによりイン・ビトロで所望のペプチドまたは蛋白質を合成する方法、遺伝子組換え、すなわち、該ヌクレオチド若しくはベクターを原核もしくは真核の細胞（宿主細胞）へ導入し、得られた組換え細胞を培養した後、該培養物から所望のペプチドまたは蛋白質を回収する方法、化学合成等により調製することができる。

【0104】

標的分子が細胞膜に存在する蛋白質またはそのドメインである場合、かかる蛋白質またはドメインの細胞外領域と免疫グロブリン（Ig）の定常領域とが連結してなる融合蛋白質を適切な宿主-ベクター系において発現させることにより、分泌蛋白質として当該分子を調製することもできる。

10

【0105】

標的分子に対応するヌクレオチドは、例えば、発現クローニング法により取得することができるが、これに限定されるものではない。発現クローニング法は、ペプチドまたは蛋白質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むcDNAの発現ライブラリーを構築し、かかるcDNAライブラリーを鋳型とし、該cDNAの全長または一部を特異的に増幅するプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応（以下「PCR」という：サイキ他、サイエンス、239巻、487乃至489頁、1988年刊行：Saiki, R. K., et al., Science (1988), vol. 239, pp 487-489）を行うことにより、ペプチドまたは蛋白質に対応するcDNAをクローニングする方法である。

20

【0106】

イン・ビトロ翻訳に適用し得るキットや試薬としては、例えば、ロシュ・ダイアグノスティックス社製のラピッドトランスレーションシステム（RTS）等を挙げることができる。

【0107】

遺伝子組換えの宿主細胞としては、本発明の細胞を調製するための宿主細胞として適用可能な原核または真核の細胞を適宜選択することができる。

【0108】

遺伝子組換えにおいて得られた組換え細胞（ヌクレオチドまたはベクターが導入された細胞）は、当業者に周知の方法に従って培養することができ、該培養物中またはかかる細胞内に所望のペプチドまたは蛋白質を産生させることができる。

30

【0109】

かかる培養に用いられる培地は、宿主細胞に応じて慣用されるものから適宜選択することができる。宿主細胞が大腸菌の場合、例えば、LB培地に必要に応じて、アンピシリン等の抗生物質やIPTGを添加して培養に供することができる。

【0110】

かかる培養により、組換え細胞の内外に産生された所望のペプチドまたは蛋白質は、その物理的、化学的および/または生物学的性質等を利用した公知の分画手法を適宜組み合わせることにより、精製および単離することができる。

【0111】

かかる分画手法としては、例えば、塩析、蛋白質沈殿剤による処理、透析、限外濾過、分子ふるい（ゲル濾過）クロマトグラフィー、吸着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、分配クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー等をあげることができるが、これらに限定されるものではない。

40

【0112】

また、ペプチドまたは蛋白質に、予め、精製するために有用な部分を連結または付加させることにより、効率よく所望のペプチドまたは蛋白質を精製することができる。例えば、予め6残基からなるヒスチジンタグを連結しておくことにより、ニッケル・アフィニティー・クロマトグラフィーにより効率よく所望のペプチドまたは蛋白質を精製することができる。また、予めIgGのFc領域を連結しておくことにより、プロテインA・アフィ

50

ニティー・クロマトグラフィーにより効率よく所望のペプチドまたは蛋白質を精製することができる

【0113】

(3) 標的分子とペプチドおよび/またはペプチド誘導体との接触

本発明の同定方法は、ペプチドおよび/またはその誘導体と標的分子とを接触させる工程を含む。ここで、該ペプチドおよび/またはその誘導体は、ペプチド・ライブラリーに含まれていてもよい。すなわち、本発明の同定方法は、ペプチド・ライブラリーに含まれるペプチドおよび/またはその誘導体と標的分子とを接触させる工程を含んでもよい。

【0114】

本発明において「接触させる」とは、二つまたはそれ以上の物質を、当該物質のうち二つ以上の間で相互作用可能な距離まで接近させることを意味する。かかる相互作用としては、例えば、共有結合、配位結合、金属-金属間結合、イオン結合、金属結合、水素結合、ファンデルワールス結合等(以下、「化学結合」という。)、クーロン力による結合、イオン間相互作用、水素結合、双極子相互作用、ファンデルワールス力等の静電的相互作用に基づく相互作用(以下、「分子間力」という。)、その他の相互作用、電荷移動相互作用、渡環相互作用、疎水相互作用、ペプチドと生体分子との会合等を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。本発明において「二つまたはそれ以上の物質」とは、標的分子および被検物質を含んでいれば、特に限定されるものではない。被検物質としては、標的分子に結合する物質であれば特に限定されるものではないが、例えば、本発明のペプチド、該ペプチドの誘導体、それらのいずれかが固相化された担体、それらの

10

20

【0115】

(4) 選抜

本発明の同定方法は所望の性質を有するペプチドおよび/またはペプチド誘導体、好適には標的分子に結合するペプチドおよび/またはペプチド誘導体を選抜する工程を含む。

30

【0116】

本発明において「結合」とは、ある条件の下において、二つまたはそれ以上の物質が、それらの間で相互作用(本発明の他の部分に記載されている)が生じ得る程度に、互いに近接しているか、あるいは会合した状態になることを意味する。

【0117】

本発明においては、ある条件の下で、標的分子と被検物質とを接触させ、次いで該標的分子に非特異的に吸着した被検物質および該標的分子に結合又は吸着しなかった被検物質を、被検物質を含む画分から除去した後も、該画分中に被検物質が存在していれば、かかる被検物質は該標的分子に「結合」とすると解することができる。

【0118】

二つまたはそれ以上の物質の間に単なる非特異的な吸着しか生じていない場合、それらの物質の間に「結合」は生じていないと解することができる。また、二つまたはそれ以上の物質を接触させても、それらの間で相互作用(本発明の他の部分に記載されている)が生じ得る程度に、互いに近接しないか、あるいは会合した状態にならない場合、それらの物質の間に「結合」は生じていないと解することができる。

40

【0119】

抗体と抗原の「結合」を測定する方法としては、フローサイトメトリー等により測定を行う蛍光抗体法(直接法、間接法)、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ(均一法、不均一法)、ELISA、ELISPOT等が広く使用されている。これらの方法において、被検抗体および抗原を本発明のペプチドまたはその誘導体および標的分子

50

に置き換えれば、抗体と抗原の「結合」の測定と同様に、ペプチドまたはその誘導体と標的分子の「結合」の有無を測定することができる。

【0120】

また、「結合」の有無は、結合活性または親和性の指標を測定することにより、決定することができる。結合親和性の指標としては、解離定数、結合定数等をあげることができる。

【0121】

以下で表される化学平衡状態にある分子AおよびAに結合する物質Bの化学的解離について、

【0122】

【化1】



【0123】

解離定数 (dissociation constant: K_d) は次の式により算出することができる：

$$K_d = [A][B] / [AB]$$

ここで $[A]$ 、 $[B]$ および $[AB]$ は、A、B および AB (会合体) の濃度をそれぞれ意味する。 K_d は解離したAおよびBと解離していないABとの比を意味するものであり、 K_d の逆数は結合定数 (K_a) である。

【0124】

本発明において用いられる「解離定数 (dissociation constant)」は、主に、ある標的分子に結合するためのペプチドおよび/またはペプチド誘導体の平衡 (equilibrium) 解離定数を意味する。

【0125】

本発明において、解離定数は、解離した物質 (ペプチド、ペプチド誘導体、標的分子等) および解離していない物質 (ペプチドおよび/またはペプチド誘導体 - 標的分子会合体等) の濃度を測定することにより、算出することができる。解離定数の測定 - 算出方法としては、当業者に周知の方法であれば特に限定されるものではないが、例えば、表面プラズモン共鳴を用いた方法、等温滴定カロリーメトリー法等をあげることができる。

【0126】

表面プラズモン共鳴を用いた方法においては、標的分子とそれに結合するペプチドおよび/またはその誘導体の相互作用を、次のとおり測定 - 算出することができる：複数のペプチド濃度において、表面プラズモン共鳴により、一連の結合・解離反応を検出する；得られた一連の結合・解離反応を解析する；得られた各種速度定数から解離定数を算出する。

【0127】

表面プラズモン共鳴の測定 - 算出システムとしては、例えば、ピアコア (Biacore) ・システム (GE Healthcare 社) 等をあげることができるが、これに限定されるものではない。ピアコア・システムを用いた場合の手順は次の通りである：ピアコア・システムのセンサーチップ上に標的分子をアミンカップリングで固定化する；複数のペプチド濃度において、該標的分子とペプチドとを接触させる；両者の相互作用を表面プラズモン共鳴により検出する；一連の結合・解離反応を、横軸を時間とし、縦軸を結合量 (RU) とする、センサーグラムとして描き出す；複数のペプチド濃度で描き出されたセンサーグラムから、BIAevaluationソフトウェア (GE Healthcare 社製) を用いて、1:1 ラングミュアールモデルにフィッティングさせ、各種速度パラメーターを算出する；各種速度パラメーターから解離定数を算出する。

【0128】

10

20

30

40

50

等温滴定カロリメトリー法においては、標的分子とそれに結合するペプチドおよび/またはその誘導体の相互作用を、次のとおり測定・算出することができる：標的分子を含む溶液にペプチド溶液を滴下する（逆でも可）；相互作用により発生した熱量を測定し、結合等温線を描く；結合等温線から解離定数（ K_D ）、反応の結合比（ N ）、エンタルピー変化（ H ）、エントロピー変化（ S ）が得られる。

【0129】

分子間相互作用に伴う微小な熱変化（発熱変化もしくは吸熱変化）をダイレクトに測定するシステムとしては、例えば、MicroCal・システム（GE Healthcare社）等をあげることができるが、これに限定されるものではない。MicroCal・システムを用いた場合の手順は次の通りである：一定温度に保たれたサンプルセルにリガンド溶液を滴定し攪拌する；分子間相互作用により結合量に正比例した熱の発生または吸収が起こり、サンプルセル中の溶液温度が変化する；セルフィードバックネットワーク（CFB）がリファレンスセルとの温度差（ T ）を感知する； T が0になるようにリファレンスセルまたはサンプルセルを加熱する； $T=0$ を保持するために要したフィードバック電力を測定することで、相互作用による発熱量または吸熱量を得る；発生熱量を縦軸に、標的分子とペプチドのモル比を横軸にとり、結合等温線から解離定数を算出する。

10

【0130】

本発明の同定方法および/または判定方法（後述）においては、例えば、標的分子に対して100 μ M以下、50 μ M以下、20 μ M以下、10 μ M以下、5 μ M以下、2 μ M以下、1 μ M以下、500 nM（0.5 μ M）以下、200 nM以下、100 nM以下、50 nM以下、20 nM以下、10 nM以下、5 nM以下、2 nM以下、1 nM以下、500 pM（0.5 nM）以下、200 pM以下、100 pM以下、50 pM以下、20 pM以下、10 pM以下、5 pM以下、2 pM以下、または、1 pM以下、の解離定数を示す被検物質を、標的分子に結合する、すなわち陽性と決定することができるが、解離定数の基準値、および「結合」の有無を決定する基準はこれらに限定されるものではない。

20

【0131】

本発明の同定方法において、「選抜」の工程は、標的分子に結合する被検物質を回収する工程でもあり、その産物中に標的分子に結合する被検物質が含有されているかまたは濃縮されていれば、かかる産物は、該標的分子に結合する物質のみからなるもの、および、該標的分子には結合しない物質が混在しているもののいずれであってもよい。また、かかる産物中に含有または濃縮された、標的分子に結合する被検物質は、単一のものであっても、2種以上の混合物であってもよい。

30

【0132】

本発明の同定方法における選抜工程、すなわち回収工程とは、標的分子に結合する物質が含まれるかまたは濃縮された画分を回収する工程を意味する。かかる工程は、本発明の技術分野において当業者に周知の分画・精製方法であれば特に限定されるものではないが、標的分子に結合した物質と、標的分子には結合しなかった物質および標的分子に非特異的に吸着した物質とを標的分子（を含む画分）から分離する工程、標的分子に結合した物質を溶出する（標的分子から分離する）工程等を含んでいてもよい。かかる工程においては、結合の有無につき解離定数等の判定基準を設けなくてもよい。

40

【0133】

本発明においては、本発明の同定方法に含まれる「選抜」を「パニング」と呼ぶことがある。本発明において、「パニング」とは、本発明のペプチドおよび/またはペプチド誘導体と標的分子とを接触させ、該標的分子に結合するペプチドおよび/またはペプチド誘導体を回収（選抜、濃縮、単離を含む）することを意味する。

【0134】

パニングには当業者に周知の方法を適用することができ、例えば、固相パニング法、液相パニング法をあげることができるが、これに限定されるものではない。固相パニング法では、例えば、標的分子を固相化し、次いで液相に含まれるペプチドと該標的分子とを接

50

触させ、次いで標的分子に結合しなかったペプチドおよび非特異的に結合したペプチドを除去した後、該標的分子に結合したペプチドを選択的に固相（に結合した該標的分子）から分離させることにより、所望の結合活性を有するペプチドを選抜することができるが、固相パニング法の操作はこれに限定されるものではない。液相パニング法では、例えば、溶液中でペプチドと該標的分子とを接触させ、次いで標的分子に結合しなかったペプチドおよび非特異的に結合したペプチドを除去した後、該標的分子に結合したペプチドを選択的に該標的から分離させることにより、所望の結合活性を有するペプチドを選抜することができるが、液相パニング法の操作はこれに限定されるものではない。

【 0 1 3 5 】

本発明の同定方法において、表現型（phenotype：表現形質と同義）に対応する遺伝型（genotype）：遺伝形質と同義）がリンクしたライブラリーを用いることにより、標的分子に結合するペプチド（「ペプチド誘導体に含まれるペプチド」をも含む）に対応するヌクレオチドを効率よく選抜し、それゆえ該ペプチドを効率よく調製することが可能になる。表現型とそれに対応する遺伝型（以下、単に「表現型と遺伝型」という）のリンクは、直接のおよび間接的のいずれであってもよい。

10

【 0 1 3 6 】

表現型と遺伝型が「直接的にリンクした」とは、表現型と遺伝型の挙動が一致していることを意味する。表現型と遺伝型の間、他の部分が介在している等、一定の距離があっても、両者の挙動が一致していれば「直接的にリンクした」の意味に包含される。すなわち、両者が物理的に隣接していることは必須ではない。

20

【 0 1 3 7 】

本発明において、表現型と遺伝型の「挙動が一致している」とは、本発明のペプチド、ヌクレオチド、ベクター、細胞、製造方法、同定方法、判定方法、ペプチド・ライブラリー、ヌクレオチド・ライブラリー、組成物、試薬等の態様において、両者の挙動が一致していることを意味する。それらの態様において、経時的に、一時的に、ある時点まで、もしくは、ある時点以降、内的要因、外的要因、それらの組合せもしくはその他の要因により、「挙動の一致」が全体的または部分的に失われても、「挙動が一致している」の意味に包含される。

【 0 1 3 8 】

表現型と遺伝型が直接的にリンクしたものとしては、例えば、リボゾーム・ディスプレイ・ライブラリー、核酸ディスプレイ・ライブラリー、本発明のペプチドに対応するヌクレオチドが直接的または間接的にリンクしていることを特徴とするペプチドおよび/またはその誘導体、かかるペプチドおよび/またはその誘導体を含んでなるペプチド・ライブラリー等をあげることができる。

30

【 0 1 3 9 】

表現型と遺伝型が「間接的にリンクした」とは、両者の挙動は必ずしも一致していないか、または、両者は必ずしも「直接的にリンクし」ていないが、特定の表現型から該表現型に対応する遺伝型へアクセスできることを意味する。表現型と遺伝型が間接的にリンクしたものとしては、例えば、ファージ・ディスプレイ・ライブラリー、発現クローニングに用いられるcDNAライブラリー等をあげることができるが、これらに限定されるものではない。

40

【 0 1 4 0 】

ファージ・ディスプレイ・ライブラリー又はcDNAライブラリーに含まれる各クローンにおいて、表現型としてのペプチドまたはその誘導体と、それに対応する遺伝型としてのヌクレオチドの挙動は、必ずしも一致していないが、該ライブラリーに含まれるペプチドおよび/またはその誘導体と標的分子とを接触させ、標的分子に結合しなかったか、または標的分子に非特異的に吸着したファージ様粒子を除去した後、標的分子に結合したファージ様粒子を選択的に溶出させること等の工程を経ることにより、標的分子に結合するペプチドおよび/またはその誘導体（ファージ様粒子上に発現または提示された）を選抜することができるとともに、対応する遺伝型、すなわち、かかるペプチドまたはその誘導

50

体（に含まれるペプチド）に対応するヌクレオチドを精製、単離し、その塩基配列を決定することができる。このような表現型からそれに対応する遺伝型へのアクセス上のメリットは、ファージ・ディスプレイ等の、表現型と遺伝型が「間接的にリンクした」場合に限定されるものではなく、「直接的にリンクした」場合にも享受できる。

【0141】

本発明の同定方法に含まれる工程は、2回以上繰り返して行うことができる。とりわけ、選抜の工程で回収されたペプチドおよび/またはペプチド誘導体から、あらためてペプチド・ライブラリーを構築して、接触および選抜の工程を行うことにより、標的分子に結合するペプチドおよび/またはその誘導体を、より高度に濃縮することが可能となる。これらの操作をさらに繰り返すことにより、標的分子に結合するペプチドおよび/またはその誘導体はより一層高度に濃縮され、最終的にそれらを単離する効率を上げることができる。さらに、標的分子に結合するペプチドおよび/またはその誘導体がより一層高度に濃縮されることで、よりアフィニティーの高いバインダーの単離が可能となる。

10

【0142】

また、標的分子に結合するペプチドおよび/またはその誘導体の高度な濃縮は、本発明の同定方法に含まれる工程において、標的に結合したペプチドおよび/またはその誘導体と非特異的に結合したものとをより強力に分離することによっても可能となる。そのような分離方法としては、例えば、非特異的に結合したペプチド等を除去する工程の回数を増やすことや、非特異的に結合したペプチドの除去に用いる試薬（界面活性剤等）をより強力なものに変更すること等が挙げられる。

20

【0143】

本発明のペプチドまたはその誘導体は、単量体、ホモもしくはヘテロの二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、または、九個以上の単量体から構成される多量体、のいずれの形態をもとり得る。

【0144】

標的分子一分子または標的部一箇所に結合する本発明のペプチドまたはその誘導体の分子数は、1、2、3、4、5、6、7、8、または9以上のいずれでもよく、かかるペプチドまたはその誘導体は、単量体、ホモもしくはヘテロの二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、または、九個以上の単量体から構成される多量体のいずれの形態で標的分子に結合してもよい。

30

【0145】

本発明のペプチドまたはその誘導体一分子あたりが結合する標的分子の分子数または標的部位数は、1、2、3、4、5、6、7、8、または9以上のいずれでもよい。

【0146】

また、本発明は標的分子の有する生物活性の一部又は全部を活性化もしくは促進するか、または、阻害、不活性化もしくは抑制するペプチドまたはペプチド誘導体を同定する方法、ならびに、標的分子を刺激するもしくは拮抗するペプチドまたはペプチド誘導体を同定する方法を提供する。すなわち、本発明は標的分子の活性化剤、促進剤もしくは刺激剤（agonist）、または、阻害剤、不活性化剤、抑制剤もしくは拮抗剤（antagonist）を同定する方法を提供する。それらの同定方法には、例えば、前記の工程（6-1）乃至（6-3）、（7-1）乃至（7-3）等を含んでもよいが、それらの工程を含むものに限定されない。

40

【0147】

8. 組成物

本発明は組成物を提供する。

【0148】

本発明の組成物は、本発明のペプチド、ペプチドの誘導体、ヌクレオチド、ベクターまたは細胞を含むことからなる。

【0149】

本発明のペプチドまたはその誘導体（本発明の細胞表面上に提示されたものを含む）を

50

含むことからなる組成物は、該ペプチドまたはその誘導体が結合する標的分子を検出するために使用することができる。

【0150】

本発明のヌクレオチド、ベクターまたは細胞を含むことからなる組成物は、該ヌクレオチド、該ベクターまたは該細胞に含まれる本発明のヌクレオチドの有する塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を有するペプチドを調製するために使用することができる。また、かかる組成物は、該ヌクレオチドを含むヌクレオチド、ベクター、細胞等を検出するためにも使用することができる。

【0151】

かかる組成物には、必要に応じて、緩衝剤、塩類、金属、防腐剤、界面活性剤、凍結または凍結乾燥等の調製方法により本発明のペプチド、ペプチドの誘導体、ヌクレオチド、ベクターまたは細胞が蒙るダメージを軽減または防止するための物質等を含有せしめることができる。

【0152】

9. 試薬

本発明は試薬を提供する。

【0153】

本発明の試薬は、本発明のペプチド、ペプチドの誘導体、ヌクレオチド、ベクターまたは細胞を含むことからなる。

【0154】

本発明のペプチドまたはその誘導体を含むことからなる試薬は、該ペプチドまたはその誘導体が結合する標的分子を検出するために使用することができる。

【0155】

本発明のヌクレオチド、ベクターまたは細胞を含むことからなる試薬は、該ヌクレオチドを含むヌクレオチド、ベクター、細胞等を検出するために使用することができる。

【0156】

本発明の試薬は組成物であってもよい。

かかる試薬を含むキットも、本発明の試薬に包含される。

【0157】

また、本発明のペプチド、ペプチド誘導体、それらが提示された細胞等は、標的分子等の物質を認識する素子として、かかる物質に対するバイオセンサーに利用することができる。

【0158】

10. 判定方法

本発明は、被検物質が、標的分子に結合するか否かを判定する方法をも提供する。本発明の判定方法は、例えば、前記の工程(5-1)および(5-2)等を含んでもよいが、それらに限定されない。

【0159】

本発明の判定方法には、本発明の同定方法に含まれる工程と同一または適宜改変した工程を使用することができる。ただし、かかる判定方法に供する被検物質は、ライブラリー等の集合に含まれていなくてもよい。例えば、判定方法に供する被検ペプチドまたは被検ペプチド誘導体は、ペプチド・ライブラリーに含まれるペプチドまたはペプチド誘導体に限定されるものではなく、他のペプチドから分離された単一のペプチドまたはペプチド誘導体、それらを含む混合物等であってもよい。すなわち、本発明の同定方法は、主として、被検物質の物理的集合から所望の性質を有するものを選抜する方法として適しているのに対して、本発明の判定方法は、特定の被検物質が所望の性質を有しているか否かを調べるための検定方法としても適している。

【0160】

本発明の判定方法において、例えば、被検物質が標的分子に結合するか否かを決定する工程においては、解離定数等親和性の指標に関する条件を充たしているか否かを判定の基

10

20

30

40

50

準とすることができる。また、本発明の同定方法と同じ選抜工程において被検物質が標的分子に結合する物質として回収されれば、該被検物質を陽性と判定することができる。

【0161】

また、本発明は、被検物質が標的分子の有する生物活性の一部又は全部を活性化もしくは促進、または、阻害、不活性化もしくは抑制するか否かを判定する方法、ならびに、被検物質が標的分子を刺激する (agonize) か否かまたは標的分子と拮抗する (antagonize) か否かを判定する方法をも提供する。そのような本発明の判定方法は、例えば、前記の工程 (8-1) および (8-2)、(9-1) および (9-2) 等を含んでいてもよいが、それらに限定されない。

【実施例】

【0162】

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、これらの実施例は本発明の技術的範囲をなんら限定するものではない。本発明の実施例で用いるプラスミド、制限酵素、DNA修飾酵素等は市販のものであり、常法に従って使用することができる。また、DNAのクローニング、ポリヌクレオチド配列の決定、宿主細胞の形質転換、形質転換細胞の培養、得られる培養物からの酵素の採取、精製等に用いた操作についても当業者によく知られているものであるか、文献等により容易に知ることのできるものである。

【0163】

[実施例1]

(1-1) ランダム変異SPINK2ライブラリーの作製

ランダム変異SPINK2ライブラリーをファージに提示するため、ファージミドベクターを構築した。まず、tH terminatorを含む領域を合成して「断片1 (配列番号10)」とし、lac operatorを含むpCANTAB 5E (GE healthcare) の2097から2232までの領域 (配列番号11) を合成して「断片2」とした。SD配列およびphoAシグナルペプチドを含む配列 (配列番号12) を「断片3」として、ファージコート蛋白質 (gene III) はpCANTAB 5E由来の配列を「断片4」として、さらに、Ipp terminatorを含む領域は「断片5 (配列番号13)」として合成した。「断片1」~「断片5」を鋳型として、下記プライマー1および2、ならびにKOD-plus-(TOYOBO: DNAポリメラーゼ、緩衝液、基質等から構成される) を用いたオーバーラップエクステンションPCR法 ((94 15秒、60 30秒、68 160秒) × 30 cycle) を行った。

プライマー1: 5' - A A A A A A C G C G T C T G C G G C C G C A T A G G G T A G C G A A A A C C T - 3'

プライマー2: 5' - A A A A A G G C G C C A T T C G C C A T T C A G G C T G C G C A A C T G T T G G - 3'

増幅した断片をアガロースゲル電気泳動に供した後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) によりDNAを調製した。調製したDNA断片およびpCANTAB 5Eを制限酵素AflIII (NEB) およびNarI (NEB) で37で1時間以上処理し、アガロースゲル電気泳動後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemにより精製した。精製した断片を、T4 DNA Ligase (NEB) を用いて、16で一晩反応させることで、ligation反応を実施した。Ligation溶液は、大腸菌JM109 (TOYOBO) に添加し、氷上で30分間静置した後、42で45秒の熱処理後、さらに氷上で5分間静置し、0.1mg/mlアンピシリンを含む2-YTプレートに播種後、37で一晩静置培養することで、大腸菌の形質転換を実施した。翌日、形質転換した大腸菌を、0.1mg/mlアンピシリンを含むTerrific Broth培地 (Invitrogen) に植菌し、37で一晩培養後、QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミドDNAを回収し (以下、「

10

20

30

40

50

mini prep処理」という)、配列解析を実施することで目的のベクターが構築されたことを確認し、「ファージミドベクターpPR3」と命名した。

ファージミドベクターpPR3は(1-2)で構築したファージミドベクターpPR3__SPINK2(WT)の代わりに、(1-3)以降の実施例において使用することができる。

【0164】

(1-2)ファージミドベクターpPR3__SPINK2(WT)の構築

ランダム変異SPINK2ライブラリーをファージに提示するため、ファージミドベクターを構築した。まず、tTH terminatorを含む領域を「断片1(配列番号10)」とし、lac operatorを含むpCANTAB 5E(GE healthcare)の2099から2232までの領域(配列番号11のヌクレオチド番号3から136まで)を「断片2」とした。SD配列ならびにphoAシグナルペプチドおよび野生型SPINK2、すなわちSPINK2(WT)のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む配列(配列番号12)を「断片3」、pCANTAB 5Eに基づくファージコート蛋白質(gene III)を含む配列(配列番号16のヌクレオチド番号600から1848まで)を「断片4」として、さらに、Ipp terminatorを含む領域は「断片5(配列番号13)」とした。「断片1」~「断片5」を含む塩基配列(配列番号16)を有するDNAを鋳型として、下記プライマー1および2、ならびにKOD-plus-(TOYOBO:DNAポリメラーゼ、緩衝液、基質等から構成される)を用いたオーバーラップエクステンションPCR法((94 15秒、60 30秒、68 160秒)×30cycle)を行った。

プライマー1': 5' - AAAAGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCC - 3'

プライマー2': 5' - AAAAAGAATTTCATTTAAACGGCAGACAAAAAAAATGTCGC - 3'

増幅した断片をアガロースゲル電気泳動に供した後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)によりDNAを調製した。調製したDNA断片およびpCANTAB 5Eを制限酵素SapI(NEB)およびEcoRI(NEB)で37で1時間以上処理し、アガロースゲル電気泳動後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemにより精製した。精製した断片を、T4 DNA Ligase(NEB)を用いて、16で一晩反応させることで、ligation反応を実施した。ligation溶液は、大腸菌JM109(TOYOBO)に添加し、氷上で30分間静置した後、42で45秒の熱処理後、さらに氷上で5分間静置し、0.1mg/mlアンピシリンを含む2-YTプレートに播種後、37で一晩静置培養することで、大腸菌の形質転換を実施した。翌日、形質転換した大腸菌を、0.1mg/mlアンピシリンを含むTerrific Broth培地(Invitrogen)に植菌し、37で一晩培養後、QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit(Qiagen)を用いてプラスミドDNAを回収し(以下、「mini prep処理」という)、配列解析を実施することで目的のベクターが構築されたことを確認した。さらに、構築したベクターは制限酵素EcoRIを用いて37で1時間以上処理し、Klenow処理後にT4 DNA Ligase(NEB)を用いて、16で1時間ligation反応させ、大腸菌JM109へ形質転換した。形質転換された大腸菌を培養した後に、mini prep処理し、得られたDNAの配列解析を実施することで構築したベクターを、「ファージミドベクターpPR3__SPINK2(WT)」と命名し、以下の実施例に供した。

【0165】

(1-3)ファージミドベクターpPR3__stuffer__TEVの構築

次に、ファージミドベクターpPR3__SPINK2(WT)に、TEV protease切断配列およびstufferを挿入した。TEV protease切断配列を

10

20

30

40

50

作製するため、下記プライマー3および4、ならびにKOD-plus-を用いたオーバーラップエクステンションPCR法((94 15秒、60 30秒、68 10秒)×30cycle)を行った。

プライマー3: 5' - GCGGCCGCATAGGGTAGCGAAAACCTGTATTTTCAGAG - 3'

プライマー4: 5' - GCTAAACAACCTTTC AACGGTgctaccGCTCTGAAAATACAGG - 3'

増幅した断片をアガロースゲル電気泳動に供した後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up SystemによりDNAを調製し、「断片6」とした。(1-2)で構築したpPR3__SPINK2(WT)を鋳型として、下記プライマー5および6、ならびにKOD-plus-を用いたPCR法((94 15秒、60 30秒、68 30秒)×30cycle)を実施することで、ファージコート蛋白質(gene III)を増幅した。

プライマー5: 5' - ACCGTTGAAAAGTTGTTTAGCAAAACCC - 3'

プライマー6: 5' - CATTAAAGCCAGAAATGGAAAGCGCAGTC - 3'

さらに、増幅したDNA断片を鋳型として、下記プライマー および ならびにKOD-plus-を用いたPCR法((94 15秒、60 30秒、68 45秒)×30cycle)を行った。

プライマー : 5' - AACACGCGTCTGCGGCCGCATAGGGTAGC - 3'

プライマー : 5' - AACGGATCCTCATTAAAGCCAGAAATGGAAAG - 3'

増幅した断片をアガロースゲル電気泳動に供した後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up SystemによりDNAを調製した。調製したDNA断片および(1-2)で構築したpPR3__SPINK2(WT)を制限酵素MluI(NEB)およびBamHI(NEB)で37 で1時間以上処理し、アガロースゲル電気泳動後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemにより精製した。精製した断片を、T4 DNA Ligaseを用いて、16 で一晩反応させることで、ligation反応を実施し、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換された大腸菌を培養した後に、miniprep処理し、得られたDNAの配列解析を実施した。構築したベクターを、「ファージミドベクターpPR3__TEV」と命名した。尚、操作は(1-1)に記載の方法に準じて行った。

構築したファージミドベクターpPR3__TEVおよびpCDNA3.1(+)(Invitrogen)を制限酵素EcoRI(NEB)およびMluI(NEB)で37 で1時間以上処理し、アガロースゲル電気泳動後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemにより精製した。精製した断片を、T4 DNA Ligaseを用いて、16 で一晩反応させることで、ligation反応を実施し、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換された大腸菌を培養した後に、miniprep処理し、得られたDNAの配列解析を実施して「ファージミドベクターpPR3__stuffer__TEV」と命名した。尚、操作は(1-2)に記載の方法に準じて行った。

【0166】

(1-4) ランダム変異SPINK2ファージミドベクターの作製

変異を導入しないSPINK2領域を増幅するため、ヒトSPINK2のアミノ酸配列をコードする塩基配列(配列番号14)を鋳型として、下記プライマー7および8、ならびにKOD-plus-を用いたPCR法((94 15秒、60 30秒、68 10秒)×30cycle)を行った。

プライマー7: 5' - GGTAGCGATATGAGCACCTATGC - 3'

プライマー 8 : 5' - GCACGGACCCATTGCGAATA - 3'

増幅した断片をアガロースゲル電気泳動に供した後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up SystemによりDNAを調製した。調製したDNA断片をInsert Aとした。

次に、ランダム領域（配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列に対応する領域）を含むSPINK2オリゴヌクレオチドを合成した。

5' - GC AAA TAT CGT ACC CCG AAT TGT UUU UU
U UUU UUU UUU VVV UUU TGT VVV UUU UUU WW
W XXX CCG GTT GGT AGC GAT ATG - 3'

UUU、VVV、WWWおよびXXXはA、T、G、Cの中から選択される任意の塩基を表す。

10

UUUには、Cys、Proを除く18種のアミノ酸(Ala、Glu、Gln、Asp、Asn、His、Trp、Arg、Lys、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Ser、Met、Gly、Thr)をコードするコドンが含まれている。

VVVには、Cysを除く19種のアミノ酸(Ala、Glu、Gln、Asp、Asn、His、Trp、Arg、Lys、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Ser、Met、Gly、Thr、Pro)をコードするコドンが含まれている。

WWWには、Tyr、Ser、Phe、Leu、Thrをコードするコドンが含まれている。

XXXには、Asn、Asp、Leu、Lys、Gln、Ala、Gluをコードするコドンが含まれている。

20

Insert AおよびSPINK2オリゴヌクレオチドを鋳型として、下記プライマー9および10、ならびにPfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase(Agilent)を用いたPCR法((95 20秒、55 20秒、72 30秒)×10cycle)を行った。

プライマー 9 : 5' - GTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGT - 3'

プライマー 10 : 5' - GCACGGACCCATTGCGAATA - 3'

増幅した断片をアガロースゲル電気泳動に供した後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up SystemによりDNAを調製した。調製したDNA断片をInsert Bとした。さらに、Insert Bを鋳型として、下記プライマー11および12、ならびにPfuUltra II Fusion HS DNA Polymeraseを用いたPCR法((95 20秒、55 20秒、72 30秒)×10cycle)を行った。

30

プライマー 11 : 5' - AAAGAATTCTGATCCGCGAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATAATCGT - 3'

プライマー 12 : 5' - AAAGGCGCGCCGCGACGGACCCATTGCGAATAATTTTAAT - 3'

増幅した断片をアガロースゲル電気泳動に供した後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up SystemによりDNAを調製した。調製したDNA断片をInsert Cとした。Insert Cを制限酵素EcoRI(NEB)およびAscI(NEB)で、ファージミドベクターpPR3__stuffer__TEVをEcoRI(TAKARA)およびMluI(TAKARA)を用いて、それぞれ37 で5時間以上処理し、Insert CをWizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いることで精製し、phagemid vectorをアガロースゲル電気泳動に供した後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)により精製した。精製した断片を、T4 DNA Ligase(NEB)を用いて、16 で一晩反応させることで、ligation反応を実施した。翌日、65 で10分熱処理を行い、Amicon-Ultra(30k:M

40

Amicon-Ultra(30k:M

50

illipore)により、DNAの脱塩を実施した。

【0167】

(1-5) ランダム変異SPINK2ファージミドベクターを有する大腸菌XL1-Blueの作製

次に、形質転換に用いるコンピテントセルを調製した。前日に37℃で一晩、2-YT培地(Invitrogen)を用いて培養したXL1-Blue(Stratagene)を2-YT培地に植菌し、37℃で数時間培養した。氷冷後、遠心分離(3,000g、10分、4℃)によりペレットを回収し、滅菌水で懸濁した後、遠心を行った。さらに、10%グリセロールでペレットを懸濁した後遠心分離し、再度、10%グリセロールによる懸濁した後遠心分離を行った。最後に、ペレットを10%グリセロールで懸濁して、コンピテントセルとした。

10

(1-4)で調製したDNAとコンピテントセルを用いて、エレクトロポレーション(1.97kV、186μF)により、形質転換を実施した。その後、SOC培地を用いて、37℃で1時間、振とう培養を行い、0.1mg/mlアンピシリン(和光純薬工業)および2%グルコース(nacalaitesque)を含む2-YTプレートにプレATINGし、30℃で静置培養した。翌日、1%グルコースおよび15%グリセロール(和光純薬工業)を含む2-YT溶液を用いてコロニーを回収し、-80℃で保存した。また、エレクトロポレーション後の培養液の一部は採取し、段階希釈後にプレATINGし、静置培養した。翌日、コロニー数を測定することで、ライブラリーサイズを見積もり、構築されたライブラリーのサイズは 1.2×10^{10} 程度であることを確認した。

20

【0168】

(1-6) ランダム変異SPINK2ファージライブラリーの構築

(1-5)で構築した大腸菌コロニー群を、0.1mg/mlアンピシリンおよび1%グルコースを含む2-YT培地に植菌し、OD_{600nm} = 0.3の大腸菌懸濁液を調製した。37℃で振とう培養を行うことで、OD_{600nm} = 0.5になるまで培養し、充分量のhelper phage VCSM13(Stratagene)を加えて、37℃で30分間静置し、さらに、37℃で30分間振とう培養を実施した。その後、氷上で30分間静置し、遠心分離(3,000g、20分、4℃)により、ペレットを回収し、0.1mg/mlアンピシリン、30μg/mlカナマイシン(nacalaitesque)、0.25mM IPTG(和光純薬工業)を含む2-YT培地で懸濁し、22℃で一晩、振とう培養を実施した。

30

翌日、遠心分離(9,000g、20分、4℃)により培養上清を回収し、20% Polyethylene Glycol 6000(nacalaitesque)および2.5M NaCl(和光純薬工業)溶液を1/4量添加し、4℃で30分間静置することで、ファージ粒子を沈殿させた(以下、「PEG沈殿」と呼ぶ)。PEG沈殿および遠心分離(9,000g、30分、4℃)を2回繰り返し、沈殿したファージをPBSに懸濁することで、ランダム変異SPINK2ファージライブラリーを調製した。

作製したファージ溶液を大腸菌XL1-Blueに感染させ、0.1mg/mlアンピシリンおよび1%グルコースを含む2-YTプレートに播種し、形成したコロニー数を測定した。ファージライブラリーの力価は、 1.8×10^{13} phage/mlであった。

40

【0169】

[実施例2]

標的分子に結合するSPINK2変異体の選別

(2-1) 液相パニング法

EZ-Link NHS-Chromogenic Biotin Reagent(Thermo)を用いて、付属の説明書に従い、(2-4)に記載の標的蛋白質をビオチン化した。

ビオチン化標的蛋白質は、SPINK2変異体提示ファージと混合して1~12時間反応させた。反応後、Dynabeads M-280 Streptavidin(In

50

vitrogen) (以下、単に「ビーズ」と呼ぶ)を加えることでビオチン化標的蛋白質をビーズに結合させ、0.05% Tweenを含むPBS (以下、「PBS-T」と呼ぶ)で所定の回数洗浄した後、AcTEVTM Protease (Invitrogen)で30分間反応させることで、ビーズ表面のビオチン化標的蛋白質に結合したSPINK2変異体提示ファージを回収した。回収したファージは、大腸菌XL1-Blueに感染させ、0.1mg/mlアンピシリンおよび1%グルコースを含む2-YTプレートに播種し、30で一晚培養した。尚、液相パニングの第一ラウンドには、ランダム変異SPINK2ファージライブラリーを、第二ラウンド以降には、前ラウンドで得られた大腸菌コロニー群から調製したファージを使用した。

【0170】

(2-2) 固相パニング法

Nunc Maxisorp flat-bottom 96 well plate (Nunc)に一定量の標的蛋白質を添加し、4で一晚静置することで、プレートへの固定化を実施した。また、Pierce NHS-Activated Agarose Dry Resin (Thermo)に一定量の標的蛋白質を添加し、付属の説明書に従い、アガロースへの固定化を実施した。

標的蛋白質を固定化したプレートまたはアガロースは、SPINK2変異体提示ファージと混合して1~12時間反応させた。反応後、ビーズを加えることでビオチン化標的蛋白質をビーズに結合させ、PBS-Tで所定の回数洗浄した後、AcTEVTM Protease (Invitrogen)で30分間反応させることで、ビーズ表面のビオチン化標的蛋白質に結合したSPINK2変異体提示ファージを回収した。回収したファージは、大腸菌XL1-Blueに感染させ、0.1mg/mlアンピシリンおよび1%グルコースを含む2-YTプレートに播種し、30で一晚培養した。尚、固相パニングの第一ラウンドには、ランダム変異SPINK2ファージライブラリーを、第二ラウンド以降には、前ラウンドで得られた大腸菌コロニー群から調製したファージを使用した。

【0171】

(2-3) ファージの調製

パニング後に得られた大腸菌コロニー群を、0.1mg/mlアンピシリンおよび1%グルコースを含む2-YT培地に植菌し、OD_{600nm} = 0.3の大腸菌懸濁液を調製した。37で振とう培養を行うことで、OD_{600nm} = 0.5になるまで培養し、充分量のhelper phage VCSM13 (Stratagene)を加えて、37で30分間静置し、さらに、37で30分間振とう培養を実施した。その後、氷上で30分間静置し、遠心分離(3,000g、20分、4)により、ペレットを回収し、0.1mg/mlアンピシリン、30μg/mlカナマイシン(nacalaitesque)、0.25mM IPTG(和光純薬工業)を含む2-YT培地で懸濁し、22で一晚、振とう培養を実施した。翌日、遠心分離により培養上清を回収し、PEG沈殿および遠心分離を2回繰り返すことで、次ラウンドで使用するファージ溶液を調製した。

【0172】

(2-4) 標的分子に結合するSPINK2変異体の選別

下記4種類のいずれか一つを標的蛋白質として、液相または固相パニングを3~5ラウンド実施した。

- ・Chymotrypsin (Worthington)
- ・Recombinant Human Plasma Kallikrein (R&D systems)
- ・Recombinant Human EGFR/Fc (R&D systems: 以下、「EGFR/Fc」と呼ぶ)
- ・Recombinant Human ErbB2/Fc (R&D systems: 以下、「HER2/Fc」と呼ぶ)

【0173】

(2-5) SPINK2変異体(ポリクローン)の標的蛋白質への結合性評価

(2-3)に記載の方法に従い、パニング後の大腸菌群からSPINK2変異体提示ファージを調製した。

Nunc Maxisorp flat-bottom 96 well plate (Nunc)に、(2-4)に記載の標的蛋白質、および、ネガティブコントロールとしてIgG-Free, Protease-Free Bovine Serum Albumin (Jackson ImmunoResearch Laboratories: 以下、「BSA」と呼ぶ)を添加し、4 で一晩静置することで、96 well plateのコーティングを行った。次に、パニング後の大腸菌群から調製したSPINK2変異体提示ファージをサンプルとして添加し、室温で1時間静置した。その後、サンプルを除き、PBS-Tで洗浄した後、HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate (GE Healthcare)を添加し、室温で1時間静置した。その後、HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugateを除き、PBS-Tで洗浄した後、POD基質A.B.T.S.キット(nacalai)を用いて発色させ、測定波長405nmの吸光度を測定した。サンプルおよびHRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugateの希釈にはPBS-Tを用いた。

10

結果を図1~図4に示す。各標的蛋白質に対するパニングにより、ランダム変異SPINK2ライブラリーから標的的特異的な結合性を示すSPINK2変異体(ポリクローン)が濃縮されたことが、ELISA法により確認された。

【0174】

20

[実施例3]

-chymotrypsin結合ペプチド(シングルクローン)の評価

(3-1)pET 32a(改変)の構築

pIRES Puro3(Clontech)を鋳型として、下記プライマー13および14、ならびにKOD-plus-(TOYOBO)を用いたPCR法((94 15秒、60 30秒、68 30秒)×30cycle)を行った。

5'-AAAGGATCCGCGAATTCATGACCGAGTACAAGCCAC-3'

5'-AAACTCGAGTTATGCGGCCGCTCAGGCACCGGGCTTGCGG-3'

30

増幅した断片をアガロースゲル電気泳動に供した後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)によりDNAを調製した。調製したDNA断片およびpET 32a(+)(Novagen)をそれぞれ制限酵素BamHI(TAKARA)およびXhoI(TAKARA)を用いて、37 で1時間以上処理し、アガロースゲル電気泳動後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)により精製した。精製した断片を、T4 DNALigaseを用いて、16 で一晩反応させることで、ligation反応を実施し、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換された大腸菌を培養した後に、miniprepおよび配列解析を実施することで、「pET 32a(改変)」を構築した。尚、操作は(1-2)に記載の方法に準じて行った。

40

【0175】

(3-2)-chymotrypsin結合ペプチドの大腸菌Origami B(DE3)での発現精製

QIAGEN Plasmid Midi Kit(Qiagen)を用いて、付属の説明書に従い、パニング後の大腸菌群からphagemid vectorを回収した。回収したベクターおよびpET 32a(改変)を、制限酵素EcoRI(TAKARA)およびNotI(TAKARA)を用いて、37 で1時間以上処理し、アガロースゲル電気泳動後に、所望のDNA断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)により精製した。精製した

50

断片を、T4 DNA Ligase (NEB)を用いて、16で一晩反応させることで、ligation反応を行い、大腸菌JM109の形質転換を実施した。尚、操作は(1-2)に記載の方法に準じて行った。Miniprepにより回収したプラスミドで、大腸菌Origami B (DE3) (Novagen)を形質転換し、0.1 mg/mlアンピシリンを含む2-YTプレートに播種した。

次に、0.1 mg/mlアンピシリンを含む2-YT培地にコロニーを植菌し、37で一晩培養後、その一部を再度0.1 mg/mlアンピシリンを含む2-YT培地に植菌し、 $OD_{600nm} = 1$ ぐらいまで培養した。その後、IPTG (最終濃度1 mM)を加え、16で一晩培養することで、発現誘導を実施した。翌日、遠心分離(3,000 g、20分、4)により集菌後、BugBuster Master Mix (Novagen)を添加し、室温で20分攪拌した。遠心分離(10,000 g、20分、4)により回収した上清に、TALON Metal Affinity Resin (TAKARA)を加え、4で1時間以上攪拌することで、当該ResinにHis tag融合目的蛋白質を吸着させた。リン酸ナトリウム緩衝液(50 mM Sodium Phosphate、300 mM NaCl、pH 7.4)でResinを数回洗浄した後、溶出液(50 mM Sodium Phosphate、300 mM NaCl、150 mM imidazol、pH 7.4)を添加することでHis tag融合蛋白質を回収した。さらに、Thrombin cleavage capture kit (Novagen)を用いてThioredoxin tagを切断し、TALONに添加することでThioredoxin tagを除去した。最後に、Amicon-Ultra (3k)を用いて、目的蛋白質の濃縮およびPBSへの置換を実施した。調製した目的蛋白質(SPINK2変異体)を、還元および非還元状態でSDS-PAGEに供することで、分子状態の解析を試みた。

結果を図5および6に示す。全てのクローンは、還元および非還元状態で単一バンドを示したことから、発現精製した目的蛋白質の分子状態は、モノマー体が主成分であることが確認された。

【0176】

(3-3)大腸菌で発現精製した -chymotrypsin結合ペプチドの標的結合親和性の評価

(3-2)で調製したSPINK2変異体(-chymotrypsin binder)の標的結合特異性を確認するため、ELISA法による評価を実施した。Nunc Maxisorp flat-bottom 96 well plateに、標的蛋白質chymotrypsinを添加し、4で一晩静置することで、96 well plateのコーティングを行った。次に、(3-2)で調製したSPINK2変異体をサンプルとして添加し、室温で1時間静置した。その後、サンプルを除き、PBS-Tで洗浄した後、S-Tag Antibody Affinity Purified HRP conjugated (BETHYL)を添加し、室温で1時間静置した。その後、検出抗体溶液を除き、PBS-Tで洗浄した後、POD基質A.B.T.S.キットを用いて発色させ、測定波長405 nmの吸光度を測定した。サンプルおよびS-Tag Antibody Affinity Purified HRP conjugate dの希釈にはPBS-Tを用いた。

結果を図7および8に示す。大腸菌で調製したSPINK2変異体は、全てが標的に対して結合性を有していた。また、ELISAはsigmoid曲線を示したことから、ELISAで検出されたシグナル強度の最低値および最大反応より、最大反応の50%を示す濃度、すなわちEC50を算出し、ペプチド番号2(clone 2)の結合活性値EC50は18.3 nM、ペプチド番号6(clone 6)のEC50は17.8 nMであることが確認された。

【0177】

(3-4)大腸菌で発現精製した -chymotrypsin結合ペプチドの標的特異性の評価

10

20

30

40

50

Nunc Maxisorp flat-bottom 96 well plate に、標的蛋白質 chymotrypsin およびネガティブコントロール trypsin (PIERCE) を添加し、4 で一晩静置することで、96 well plate のコーティングを行った。次に、(3-2) で調製した SPINK2 変異体をサンプルとして添加し、室温で1時間静置した。その後、サンプルを除き、PBS-T で洗浄した後、S-Tag Antibody Affinity Purified HRP conjugated を添加し、室温で1時間静置した。その後、検出抗体溶液を除き、PBS-T で洗浄した後、POD 基質 A.B.T.S. キットを用いて発色させ、測定波長 405 nm の吸光度を測定した。サンプルおよび S-Tag Antibody Affinity Purified HRP conjugated の希釈には PBS-T を用いた。

10

結果を図9および10に示す。ペプチド番号2および6(clone2および6)は、trypsin に対しては全く反応性を示さなかったが、標的蛋白質である chymotrypsin には強い反応を示したことから、標的の特異的な結合を有することが見出された。

【0178】

(3-5) 大腸菌で発現精製した -chymotrypsin 結合ペプチドの chymotrypsin 阻害活性評価

標的蛋白質 chymotrypsin に関して、(3-2) で調製した SPINK2 変異体および Pierce Quantitative Protease Assay Kit を用いて、阻害活性を定量した。操作は、付属の説明書に従い、実施した。

20

結果を図11に示す。ペプチド番号2および6(clone2および6)はともに阻害活性を示し、それぞれの IC50 は、815 nM、374 nM であった。

【0179】

(3-6) -chymotrypsin 結合ペプチドの配列解析

(3-3) で chymotrypsin に対して結合性を示した SPINK2 変異体 (-chymotrypsin 結合ペプチド) の配列解析を実施した。各 SPINK2 変異体で形質転換された大腸菌 Origami B (DE3) を、0.1 mg/ml アンピシリンを含む 2-YT 培地を用いて 37 で一晩培養し、翌日、QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit を用いて培養物からプラスミド DNA を回収した。

30

該プラスミド DNA を鋳型とし、次の塩基配列を有するプライマー 15 :

5' - GTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATC - 3'

を用いて、塩基配列を解析した。

ランダム化領域(ランダム領域)の解析結果を図12に示す。全ての SPINK2 変異体のランダム化領域は、異なる塩基配列を有していた。

【産業上の利用可能性】

【0180】

本発明のペプチド・ライブラリーは、各種標的分子に結合するペプチドの探索に使用することができ、検査薬、診断薬等の研究に有用である。また、予め決定された標的分子に結合するペプチドは検査薬、診断薬等として有用である。

40

【配列表フリーテキスト】

【0181】

配列表の配列番号 1 - 多様性を伴うペプチドのランダム領域(図13)
 配列表の配列番号 2 - キモトリプシン結合ペプチドのランダム領域(図12:ペプチド番号1)
 配列表の配列番号 3 - キモトリプシン結合ペプチドのランダム領域(図12:ペプチド番号2)
 配列表の配列番号 4 - キモトリプシン結合ペプチドのランダム領域((図12:ペプチド番号6)
 配列表の配列番号 5 - キモトリプシン結合ペプチドのランダム領域((図12:ペプ

50

チド番号 7)

配列表の配列番号 6 - キモトリプシン結合ペプチドのランダム領域 ((図 1 2 : ペプチド番号 1 2))

配列表の配列番号 7 - キモトリプシン結合ペプチドのランダム領域 ((図 1 2 : ペプチド番号 1 3))

配列表の配列番号 8 - キモトリプシン結合ペプチドのランダム領域 ((図 1 2 : ペプチド番号 1 4))

配列表の配列番号 9 - キモトリプシン結合ペプチドのランダム領域 ((図 1 2 : ペプチド番号 1 7))

配列表の配列番号 1 0 - 断片 1 (図 1 4)

配列表の配列番号 1 1 - 断片 2 (図 1 5 中 の 下 線 部)

配列表の配列番号 1 2 - 断片 3 (図 1 6)

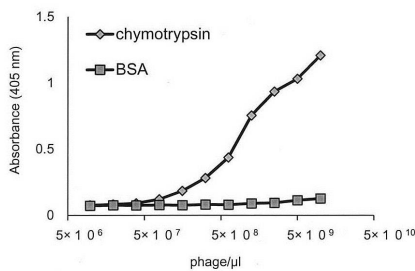
配列表の配列番号 1 3 - 断片 5 (図 1 7)

配列表の配列番号 1 4 - S P I N K 2 の アミノ酸配列をコードする塩基配列 (図 1 8)

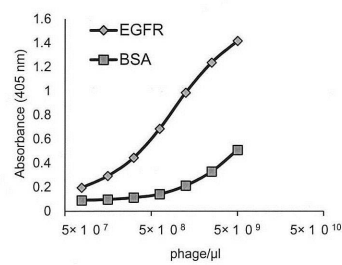
配列表の配列番号 1 5 - 配列表の配列番号 1 4 で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

配列表の配列番号 1 6 - 断片 1 ~ 断片 5 を含む P C R 用 鋳 型 D N A の 塩 基 配 列

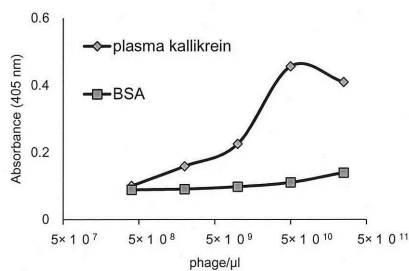
【 図 1 】



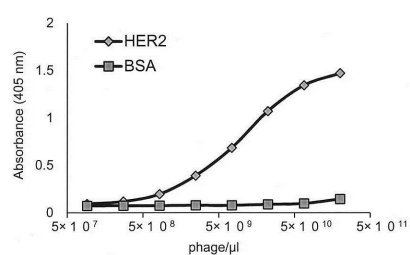
【 図 3 】



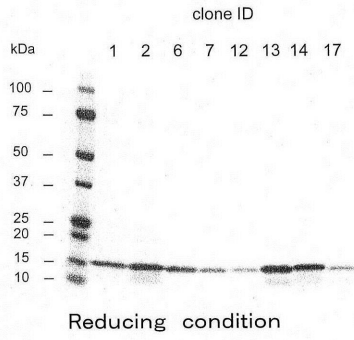
【 図 2 】



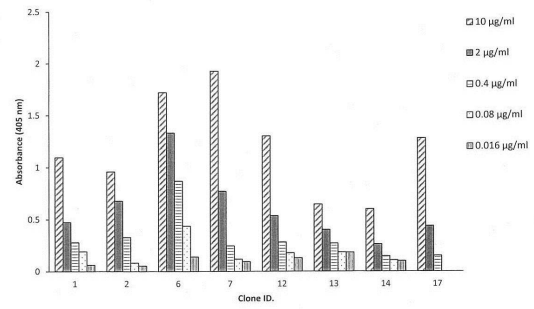
【 図 4 】



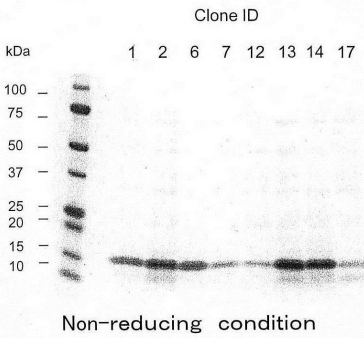
【 5 】



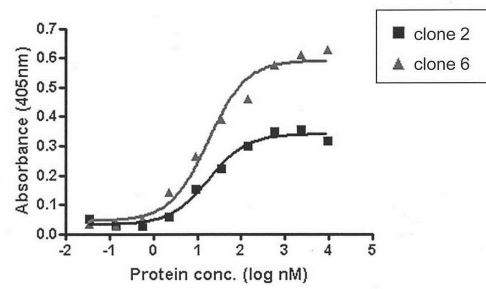
【 7 】



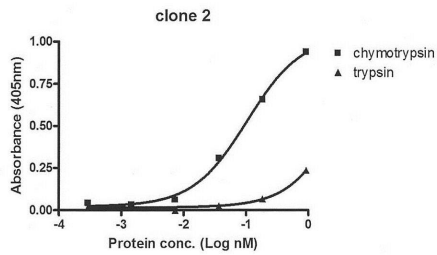
【 6 】



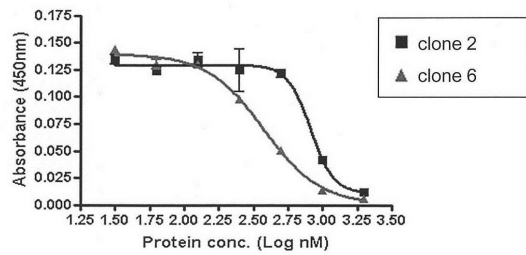
【 8 】



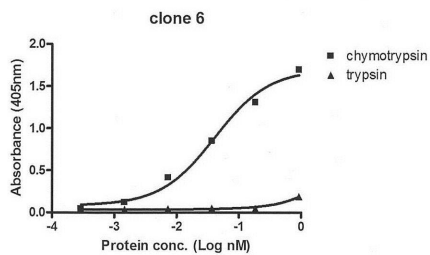
【 9 】



【 1 1 】



【 1 0 】



【 1 2 】

SPINK2変異体 (α-キモトリプシン結合ペプチド)	アミノ酸配列
Peptide No.1 (SEQ ID No.2)	CRTRW GNRCT WQYKP VC
Peptide No.2 (SEQ ID No.3)	CMRHR RHFCT MUYKP VC
Peptide No.6 (SEQ ID No.4)	CRRWL LPWCT YKYKP VC
Peptide No.7 (SEQ ID No.5)	CLWRR HKLCP FKF KP VC
Peptide No.12 (SEQ ID No.6)	CWRSW RWACP YMYKP VC
Peptide No.13 (SEQ ID No.7)	CWFFR WRWCN WALKP VC
Peptide No.14 (SEQ ID No.8)	CSTWR MWGCP WLYKP VC
Peptide No.17 (SEQ ID No.9)	CWRRW YDRCS FNLKP VC

【 図 1 3 】

CXXXX XXXCX XXXXP VC
(Xは任意のアミノ酸)

【 図 1 4 】

GTACCCGATAAAAAGCGGCTTCTGACAGGAGGCCGTTTTG
TTTTGCAGCCACCT

【 図 1 5 - 1 】


GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGTTAA
TGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACT
TTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTT
TCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATA
ACCCTGATAAATGCTTCAATAATATGAAAAAGGAAGAGT
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCCGCCCTTATCCCTTTT
TTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCAGAAAC
GCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCT
CGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGA
TCCTTGAGAGTTTTTCCGCCGAAGAAGCTTTTCCAATGAT
GAGCACTTTAAAGTTCGTATGTGGCGCGGTATTATCC
CGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCGCCGATAC
ACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCACTCAC
AGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA
TGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCA
ACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAAC
CGTTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCCT
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACG
ACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTCTAGCT
TCCCGCAACAATTAAGACTGGATGGAGCGGATAAAG
TTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTG
GTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCGCGGTGAGCGTGGGTCT
CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCT
CCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAAC
TATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC
TCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGAGACCAAGTTTACT
CATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATT

【 図 1 5 - 2 】

TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAAATCTCATG
ACCAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTTCGTTTCCACTGAGCGT
CAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCC
TTTTTTTCTGCGCGTAACTGTGCTTGGCAAACAAAAA
CCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTTGGCCGATCAAGAGC
TACCAACTTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGC
GCAGATACCAAACTACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTA
GGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACC
TCGCTCTGTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
CGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAG
TTACCAGGATAAGGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTT
CGTGACATACAGCCAGCTTGGAGCGAAGCCTACACCGA
ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACG
CTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCG
GCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGG
GGGAAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCCG
CACCTCTGACTTGGCGTGCATTTTTGTGATGCTCGTCCAG
GGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACCGCGCCTT
TTACGGTTCCTGGCCTTTTGGTGGCCTTTTGTCTCACATG
TTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTA
TTACCACCTTTGAGTGAAGCTGATACCGCTCGCCGACGCG
AACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAA
GAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGC
CGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG
GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAG
CTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTC
CGGCTCGTATGTTGTGTTGAATTTGAGCGGATAACAATT
TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCAAGCTT
TGGAGCCTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAATTA
TTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTCTTTCTATGCGGGCC
AGCGGCCATGGCCAGGTCCAACCTGAGGTCGACCTCGA
GATCAAAACGGGCGGCGCAGGTGCGCGGTGCCGTATCCG
GATCCGCTGAAACCGCTGCGGCATAGACTGTTGAAAGTT
GTTTAGCAAAAACCTCATAACAGAAAATTCATTTACTAACGT
CTGGAAGACGCAAAAACCTTTAGATCGTTACGCTAACAT
GAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTGGTTTTGTA
CTGGTGACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGTTCCAT


【 図 1 5 - 3 】

TGGGCTTGCTATCCCTGAAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAG
GGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTA
CTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTA
TACTTATATCAACCCCTCTCGACGGCACTTATCCGCCTGGT
ACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCATACTCTCTTGGAGG
AGTCTCAGCCTCTTAATACTTTTATGTTTCAAGATAAAG
GTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAAGTGTATACGGGC
ACTGTTACTCAAGGCACTGACCCCGTTAAAACTTATTACC
AGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTA
CTGGAACGGTAAATTCAGAGACTGCGCTTCCATTCTGGC
TTTAATGAGGATCCATTGTTTTGTAATATCAAGGCCAAT
CGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGCGG
CTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGG
TCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTGAGGGTG
GCGGTTCCGGTGGCGGCTCCGGTTCGGTGAATTTGATTA
TGAAAAAATGGCAAAACGCTAATAGGGGGCTATGACCGAA
AATGCGGATGAAAACGGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCA
AACTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGTCTATCGA
TGGTTTTATTGGTGACGTTTTCCGGCCTTGTCAATGGTAAT
GGTGCTACTGGTGATTTTTGCTGGCTCAATTTCCAAATGG
CTCAAGTCCGTGACGGTGATAATTCACCTTAATGAATAA
TTTCCGTCAATATTTACCTTCTTTGCCTCAGTCCGTTGAA
TGTCGCCCCATATGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAAT
TTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATCCGTGGTGT
CTTTGCGTTCTTTTTATATGTTGCCACCTTATGTATGTA
TTTTCGACGTTTGTCAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTT
AATAAGAAATCACTGGCCGCTGTTTTACAACGCTCGTACT
GGGAAAACCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCAGC
ACATCCCCCTTTCGCGAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCC
CGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGGCGAGCCTGAATG
GGCAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCTTACGCATCT
GTGCGGTAATTTACACCGCATACGTCAAAGCAACCATAGT
ACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGGCGGTGGT
GGTTACGGCGAGCGTACCGCTACACTTGCAGCGCCCTA
GCGCCCGCTCCTTTCCGTTTCTTCCCTTCTCTCGCCA
CGTTCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCAAACTCGGGGCT
CCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGAC


【 15 - 4】

CCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAAGTGGG
 CATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGA
 GTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTTGTTCCAAACTGGA
 ACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGTATTTAT
 AAGGGATTTTGGCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGA
 GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATA
 TTAACGTTTACAATTTTATGGTGCAGTCTCAGTACAATCT
 GCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCC
 AACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCG
 GCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCT
 GCATGTGTCAGAGGTTTTACCCTCATCACCGAAACGGCG
 GA


(下線部は断片2の塩基配列：配列表の配列番号11)

【 18】


GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGA
 ATTGTAGCCAGTATCGTCTGCCTGGTTGTCCGCGTCATTT
 TAATCCGGTTTGTGGTAGCGATATGAGCACCTATGCAAAT
 GAATGTACCCTGTGCATGAAAAATTCGTGAAGGTGGCCATA
 ATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCTAA

【 19】


DPQFGLFSKYRTPNCSQYRLPGCPRHFNPVCGSDMSTYAN
 ECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC

【 16】


AATTTCTAGATAACGAGGGCAAATCATGAAACAAAGCACT
 ATTGCACTGGCACTTTACCCTGTGCTGTTTACCCCTGTGA
 CGAAAGCTGCTAGCGCGAATTCIGATCCGCAGTTTGGTCT
 GTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTAGCCAGTATCGT
 CTGCCCTGGTTGTCCGCGTCATTTAATCCGGTTTGTGGTA
 CGGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCAT
 GAAAATTCGTGAAGGTGGCCATAATTAATAAATTTATTCG
 AATGGTCCGTGCGACGCGCTCTGCGGCCG

【 17】

CTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTT
 TTGTCTGCCGTTTAAATC

【 20 - 1】

GAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
 GGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTTCCCGA
 CTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGGTACCCGATAAAAAGCGGCT
 TCCTGACAGGAGGCGTTTTTGTGTTGCAGCCACCTCAAC
 GCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGG
 CTTTACACTTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT
 TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGAC
 CATGATTACGAATTTCTAGATAACGAGGGCAAATCATGAA
 ACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCCTGTGCTGTTT
 ACCCTGTGACGAAAAGCTGCTAGCGCGAATTCIGATCCGC
 AGTTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTTGTAG
 CCAGTATCGTCTGCCTGGTTGTCCGCGTCATTTTAAATCCG
 GTTTGTGGTAGCGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTA
 CCCTGTGCATGAAAATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTA
 AATTAATTCGCAATGGTCCGTGCGACGCGTCTGCGGCCGCA
 TAGGCAGGTGCATCTGGCGGTGGTTCTGGCGCAACCGTTG
 AAAGTTGTTTAGCAAACCCCATACAGAAAATTCATTTAC
 TAACGTCTGAAAAGACGACAAAACCTTTAGATCGTTACGCT
 AACTATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTGG
 TTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGT
 TCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGC
 TCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTG
 GCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCC
 GGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGCACTTATCCG
 CCTGGTACTGAGCAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTC
 TTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTTCATGTTTCAGAA
 TAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAACCTGTTTAT
 ACGGGCACTGTTACTCAAGGCACTGACCCCGTTAAAACCT
 ATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGA
 CGTTACTGGAACGGTAAATTCAGAGACTGCGCTTTCCAT
 TCTGGCTTTAATGAGGATCCATTCGTTTGTGAATATCAAG
 GCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGG

【 20 - 2】

CGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGT
 GGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTG
 AGGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGCTCCGGTCCGGTGATTT
 TGATTATGAAAAAATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATG
 ACCGAAAATGCCGATGAAAACGGCTACAGTCTGACGCTA
 AAGGCAAACCTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGTGTC
 TATCGATGGTTTTCATGGTGACGTTTTCCGGCCTTGCTAAT
 GGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGTGCTGCTAATTCCTC
 AAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAAT
 GAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCTTTGGCTCAGTCCG
 GTTGAATGTGCGCCCTTATGTCTTTGGCGCTGGTAAACCAT
 ATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCGG
 TGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATG
 TATGTATTTTTCGACGTTTGGTAACATACTGCGTAATAAAG
 AGTCTTAATAGTACCTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATT
 GTGGCACATTTTTTTTGTCTGCCGTTTAAATGAATTC

【配列表】

0006790212000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 橋本 隆二
東京都品川区広町一丁目2番58号 第一三共株式会社内

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 特表2008-545399(JP,A)
特開2008-260770(JP,A)
特表2011-511766(JP,A)
国際公開第2004/100988(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C40B 40/06

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed