

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-516210

(P2008-516210A)

(43) 公表日 **平成20年5月15日(2008.5.15)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566 Z N A	4 B O 2 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 C O 7 6
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 2 O 1 R	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁)

(21) 出願番号 特願2007-535119 (P2007-535119)
 (86) (22) 出願日 平成17年10月11日 (2005.10.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年6月1日 (2007.6.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/010932
 (87) 国際公開番号 W02006/040129
 (87) 国際公開日 平成18年4月20日 (2006.4.20)
 (31) 優先権主張番号 102004049479.7
 (32) 優先日 平成16年10月11日 (2004.10.11)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 501139870
 シル プロテインズ ゲーエムベーハー
 Scil Proteins GmbH
 ドイツ連邦共和国D-06120ハレ、ハ
 インリッヒ・ダメロウ・シュトラーセ01
 Heinrich-Damerow-Str. 01, D-06120, Hal
 le, Germany

(74) 代理人 100115255
 弁理士 辻丸 光一郎

(74) 代理人 100129137
 弁理士 中山 ゆみ

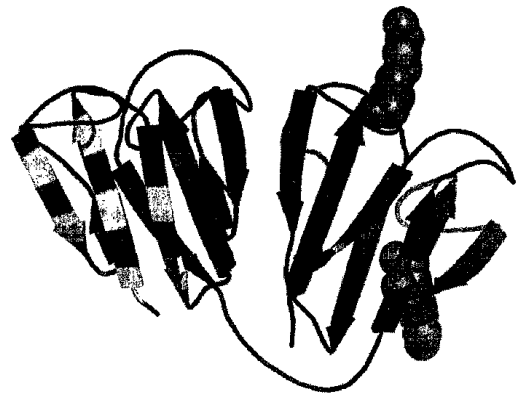
(72) 発明者 フィードラー、エリック
 ドイツ、06114 ハレ/ザーレ、コエ
 ルナーシュトラーセ 26

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療、診断およびクロマトグラフィーに使用するためのタンパク質複合体

(57) 【要約】

本発明は、 α -クリスタリンまたはユビキチンに基づ
 く少なくとも1つのポリペプチド分子と少なくとも1つ
 の機能性成分との間の共有結合を含む複合体に関する。
 さらに、本発明は、前記複合体の調製のための方法、な
 らびに診断、治療およびクロマトグラフィーにおける前
 記複合体の使用に関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

下記成分を含む複合体であり、

ユビキチンまたは - クリスタリンに基づく 1 以上のポリペプチド (I) であって、対応する野生型ポリペプチドと比較して新たに発生または変化させたリガンドに対する特異的結合の結合特性を、それぞれ有する前記ポリペプチドと、

それに共有結合的に結合される 1 以上の機能性成分 (II) とを含み、

前記 (II) に対する前記 (I) のカップリング後、全ての成分の機能性が維持されている、複合体。

【請求項 2】

前記野生型ポリペプチドと比較して新たに発生または変化させた前記結合特性が、前記ポリペプチド分子 (I) の シートの表面露出領域における 1 以上のアミノ酸置換に基づく、請求項 1 記載の複合体。

【請求項 3】

前記 (II) に対する前記 (I) のカップリングが、リガンドに特異的に結合するための前記ポリペプチド分子 (I) の シートの表面露出領域の外部領域において行われる、請求項 1 または 2 記載の複合体。

【請求項 4】

前記 (II) に対する前記 (I) のカップリングが、リガンドに対する特異的結合の新たに発生または変化させた結合特性を有する前記ポリペプチド分子 (I) の シートの外部領域において行われる、請求項 3 記載の複合体。

【請求項 5】

前記 (II) に対する前記 (I) のカップリングが、前記 (I) のアミノ酸残基を介して行われる、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 6】

前記 (II) に対する前記 (I) のカップリングが、(I) への付加的な末端ペプチド融合におけるアミノ酸残基を介して行われる、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 7】

前記カップリングが、前記 (I) におけるシステインまたはリジン側鎖を介して、未方向性 (未配向性) の形式で、部位特異的または選択的に行われる、請求項 5 記載の複合体。

【請求項 8】

前記リガンドに対する前記 (I) の結合表面の外部側鎖が、カップリングに關与する、請求項 5 または 7 記載の複合体。

【請求項 9】

前記ユビキチンに基づくポリペプチド分子 (I) において、前記カップリングが、前記ユビキチン分子のリジン残基 29 および 33 を介して行われる、請求項 7 または 8 記載の複合体。

【請求項 10】

前記 - クリスタリンに基づくポリペプチド分子 (I) において、リガンドに対する特異的結合の新たに発生または変化させた結合特性を有するペプチドドメインが、N 末端ドメインであり、且つ、前記 (II) に対する (I) のカップリングが、C 末端ドメインを介して行われる、請求項 7 または 8 記載の複合体。

【請求項 11】

前記 (I) に対する付加的な末端ペプチド融合が、1 以上のシステイン残基または 1 以上のリジン残基を含み、好ましくは、これらのアミノ酸残基は、リガンドとの (I) の相互作用に關与しない、請求項 6 記載の複合体。

【請求項 12】

前記機能性成分 (II) が、ポリペプチドおよびタンパク質、有機ポリマーおよび無機ボ

10

20

30

40

50

リマー、核酸、脂質、糖、低分子量物質、ペプチドならびにこれらの物質の誘導体からなる群から選択される、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 3】

前記機能性成分 (II) が、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質、好ましくは、タンパク質発色団、酵素、免疫グロブリン、免疫グロブリン誘導体、毒素または (I) のポリペプチドである、請求項 1 2 記載の複合体。

【請求項 1 4】

前記機能性成分 (II) が、ポリマー、好ましくは、デキストラン、ポリメタクリル酸、セファロース、アガロース、ポリビニル、ポリスチレン、シリカゲル、セルロースもしくはポリエチレングリコール、またはポリマー誘導体である、請求項 1 2 記載の複合体。

10

【請求項 1 5】

前記機能性成分 (II) が、低分子量物質、好ましくは、染料、ビオチン、ジオキシゲニン、重金属、キレート剤、放射性同位元素、抗生物質または細胞毒物質である、請求項 1 2 記載の複合体。

【請求項 1 6】

前記成分 (I) が、ポリペプチド、ペプチド、低分子量物質、脂質、糖、核酸、有機ポリマーおよび無機ポリマー、ならびに、これらの物質の誘導体からなる群から選択されたリガンドに対する新たに発生または変化された特異的結合の結合特性を示す、請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 7】

20

前記成分 (I) が、ポリペプチドまたはタンパク質、好ましくは、免疫グロブリンおよび免疫グロブリン誘導体、血漿から得られるタンパク質、血液凝固因子および阻害剤、成長因子、インターロイキン、サイトカイン、受容体タンパク質、糖化タンパク質、ウイルスタンパク質ならびに細胞表面マーカーであり、好ましくは、CD 1 4、CD 2 5 および CD 3 4 であるリガンドに対する新たに発生または変化された特異的結合の結合特性を示す、請求項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 8】

前記成分 (I) が、ペプチド、好ましくは、アフィニティタグ、好ましくは、S - タグ、T 7 - タグ、His - タグ、Strep - タグ、Myc - タグもしくはFLAG - タグ、または、ウイルス由来ペプチドであるリガンドに対する新たに発生または変化された特異的結合の結合特性を示す、請求項 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の複合体。

30

【請求項 1 9】

前記成分 (I) が、低分子量物質、好ましくは、ステロイド、コレステロールおよび、例えば、ハロゲン化炭化水素のような有毒物質であるリガンドに対する新たに発生または変化された特異的結合の結合特性を示す、請求項 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 2 0】

前記成分 (I) が、脂質または脂質誘導体、好ましくは、細菌のリポポリサッカライド、リポソームおよびリポタンパク質であるリガンドに対する新たに発生または変化された特異的結合の結合特性を示す、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の複合体。

40

【請求項 2 1】

前記成分 (II) が、前記 (I) と同一の、 α -クリスタリンまたはユビキチンに基づく 1 以上のポリペプチドであり、それに共有結合されることによって、(I) のリガンドに対する親和性の向上が、アビディティー効果により達成される、請求項 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 2 2】

前記成分 (II) が、成分 (I) が数回共有結合する、ポリペプチド、タンパク質またはポリマーであり、

これによって、前記 (I) のリガンドに対する親和性の向上が、アビディティー効果により達成される、請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の複合体。

50

【請求項 23】

前記成分(II)が、ポリペプチドまたはポリマーであり、前記成分(I)に対する共有結合の後、同型の他の複合体に対する共有結合または非共有結合を受け、

これによって、前記(I)のリガンドに対する親和性の向上が、アビディン効果により達成される、請求項1から22のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 24】

前記成分(I)が、SPC1-A1(SEQ. ID NO. 2)、SPC1-A7(SEQ. ID NO. 3)、SPC1-G3(SEQ. ID NO. 4)、SPU11-3-A1(SEQ ID NO. 12および13)およびSPC7-E9(SEQ ID NO. 8)の分子のうちの一つである、請求項1から23のいずれか一項に記載の複合体。

10

【請求項 25】

請求項1から24のいずれか一項に記載の複合体を製造する方法であって、既知配列の成分(I)から開始され、下記工程を含む方法。

タンパク質の空間構造の分析による、カップリングに適したアミノ酸残基、好ましくは、リガンドとの(I)の相互作用の表面の外部残基の同定；

適したカップリング試薬によるカップリングパートナーの活性化；

カップリング反応の実行；

複合体の単離；および

複合体の両成分の機能性の検出

20

【請求項 26】

請求項1から24のいずれか一項に記載の複合体を製造する方法であって、カップリングに適したアミノ酸残基が同定されていない既知配列の成分(I)から開始され、下記工程を含む方法。

置換、挿入または融合によるカップリングに適したアミノ酸残基、好ましくは、リガンドとの(I)の相互作用表面の外部表面に露出される残基の導入；

導入されたアミノ酸残基の露出度の検出；

この方法により変化させた成分(I)の機能性の検出；

適したカップリング試薬によるカップリングパートナーの活性化；

カップリング反応の実行；

複合体の単離；および

複合体の両成分の機能性の検出

30

【請求項 27】

請求項25または26記載の方法により製造される前記複合体。

【請求項 28】

請求項1から24または27のいずれか一項に記載の複合体を含む診断キット。

【請求項 29】

請求項1から24または27のいずれか一項に記載の複合体、および、薬学的に許容されるキャリアを含む、薬学組成物。

【請求項 30】

前記機能性成分が、膜、ポリマービーズまたはクロマトグラフィー支持材である、請求項1から24または27のいずれか一項に記載の複合体を含む親和性向上のための組成物。

40

【請求項 31】

診断、治療およびアフィニティークロマトグラフィーに使用するための、請求項1から24のいずれか一項に記載の複合体、請求項27記載の複合体、または、請求項28、29もしくは30記載のキットもしくは組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、 α -クリスタリンまたはユビキチンに基づく1以上のポリペプチド分子と1以上の機能性成分との間における共有結合を含む複合体に関する。さらに、本発明は、前記複合体の製造方法、ならびに、診断、治療およびクロマトグラフィーにおける前記複合体の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

α -II-クリスタリンは、 α -クリスタリンファミリーに属し、脊椎動物において、偏在的に分布する眼の水晶体の構造タンパク質である（非特許文献1）。前記 α -II-クリスタリンは、構造的に同一な2つのドメイン、および、主にシート構造からなるという特徴を有する、高度に相同なタンパク質ファミリーを形成する（非特許文献2）。

α -II-クリスタリンの重ね合わせ構造のモチーフは、グリークキー形態と呼ばれる。それは、4つの逆平行の鎖からなり、その内の2つ（一方が他方に横たわる）が、クリスタリンの1つのドメインを形成する（非特許文献3）。

【0003】

クリスタリンの本来の機能は、860mg/mLに達する極めて高い局所タンパク質濃度により達成される、眼の水晶体における高屈折率の発生に基づいている（非特許文献4）。それらの空間構造により、クリスタリンは、高いプロテアーゼ耐性を有する、非常に安定した可溶性タンパク質である。さらに、眼の水晶体内における局在は、 α -II-クリスタリンがタンパク質ターンオーバーの影響を受けないという効果を有する。従って、 α -II-クリスタリンは、最も長い半減期を有するタンパク質として知られている（非特許文献5）。

【0004】

このタンパク質ファミリーの中で最も優れた特性を有するのが、ウシの α -II-クリスタリンである。その空間構造は、異なる解像度で、野生型タンパク質および全範囲の点変異を決定できる（非特許文献6；非特許文献4；非特許文献7）。このことは、前記タンパク質が、2つのドメイン間の疎水性間隙を介して安定化されていることを示している。この間隙は、N末端ドメインにおける3残基およびC末端ドメインにおける形態的に同一の3残基からなる6つの疎水性残基の分子内相互作用により形成される（非特許文献8）。化学薬品に対する安定性は、主に、前記2つのドメインに結合する短いペプチドに大きく依存する（非特許文献9）。

【0005】

前記ウシ α -II-クリスタリンは、分子量約20kDaで、並外れた高い安定性により特徴付けられる。それは、中性pHで8M尿素に耐性を示す。pH1~9の範囲において、天然状態で存在し（非特許文献10；非特許文献11）、75°Cに達する温度でさえ、前記タンパク質は7M尿素に安定である（非特許文献12）。E.coliにおける α -II-クリスタリンの組換え細胞質発現は、非常に高収率で成功している（非特許文献9）。

【0006】

高い安定性、低分子量、高い細胞質発現率というタンパク質の化学的特性により、 α -II-クリスタリンのタンパク質クラスは、代替結合分子の発生のための有力な候補になり得る。

【0007】

ファージミドリブラリー（GCUC1）は、足場タンパク質としてのウシ α -II-クリスタリンに基づいてFiedler & Rudolphにより確立され、表面に露出した2、4、6、15、17、19、36および38部位（開始メチオニンを除く）の8つのアミノ酸が、DNAレベルでランダム化された。ファージディスプレイ法により数回の選択を行った後、 μ Mの範囲でエストラジオールへの特異的な結合および親和性を有するバリエーションが検出された。これらの結果は、ウシ α -II-クリスタリンにおいて、新しく発生される前には存在しなかった結合特性を示しており、前記 α -II-クリスタリンは、前記代替結合分子の単離のための足場タンパク質として、一般的に適していることを示している（特許文献1参照）。

10

20

30

40

50

【0008】

後の研究において、新しいライブラリが、ヒト - II - クリスタリンに基づいて確立された。前記足場タンパク質としてのヒト - II - クリスタリンの選択、および、新しいライブラリの付随的構成は、重要な利点を有する。

1. ウシタンパク質と比較して、ヒト - II - クリスタリンは、変性作用に対して著しく高い安定性を有している。

2. ヒト由来タンパク質は、治療的応用において、各変異の免疫原性が非常に低いという結果をもたらす。そして、

3. より高度な複雑性を有する新しく構築されたライブラリは、さらに高い親和性を有する結合分子の単離を可能とするであろう（非特許文献13）。

前記G C U C 1ライブラリと同様に、同じ8個のアミノ酸部位（開始メチオニンを除く、2、4、6、15、17、19、36および38部位）が、ランダム化のために選択された。新しいライブラリCR20は、それぞれ独立した理論上 5×10^8 通りの変異体を有するヒト - II - クリスタリンに基づき、特許文献1に記載された方法で確立され、前記ライブラリにおいて変異体は約130倍で表される。200以上の独立した変異体をシークエンスした後、全変異体の80%以上が、前記8箇所のランダム化部位においてのみ置換を有することがわかった。さらに、3番目のコドン部位を除く置換部位における変異の配列は、可能性のある全てのヌクレオチドと、ほとんど同一の分布を示した。このように、前記8箇所のランダム化部位における全32の可能性のあるコドンを含むこのライブラリは、質が高い。

【0009】

代替結合分子の生産に使用される第2の足場タンパク質は、ヒトユビキチンから作製される。ユビキチンは、小型、単量体、その配列で高く保存された細胞質タンパク質であり、原生動物から脊椎動物まで全ての公知真核生物の細胞において存在する。

【0010】

ユビキチンのペプチド鎖は、76個のアミノ酸からなり、非常にコンパクトな構造に折りたたまれている（非特許文献14）。ポリペプチド鎖のほぼ87%が、水素結合を介した2次構造要素の形成に参与している。著名な2次構造として、3.5 - ヘリックスターン、および、5本鎖からなる逆平行シートが、報告されている。これらの要素（逆平行シートは、その裏面上においてタンパク質表面に露出し、ヘリックスは、その上部において垂直に横たわって詰め込まれる）の特性の変化は、一般的に、いわゆる、ユビキチン様折りたたみモチーフと考えられている。他の構造的特性は、ヘリックスとシートとの間における前記タンパク質の内部の、著しい疎水性領域である。

【0011】

サイズが小さいために、ユビキチンの人工調製は、化学合成およびバイオテクノロジーの手段の両方により行うことができる。好ましい折りたたみ特性のために、ユビキチンは、例えば、E. coliのような微生物を用いた遺伝子工学により、細胞質または細胞膜周辺腔において比較的大量に生産できる。

【0012】

単純で効率的な微生物調製のため、ユビキチンは、その生産に問題がある他の外来タンパク質のための融合パートナーとして使用できる。ユビキチンに対する融合手段によって溶解度が改善し、それにより、改善した収量が達成される（非特許文献15）。

【0013】

コンピュータ分析を用いた結晶構造の利用可能なデータ（PDBデータベースエントリー1UBI）に基づくと、ユビキチン足場タンパク質におけるこれらのアミノ酸の部位は、表面、すなわち、溶媒または可能な結合パートナーに対して露出される側鎖に局在する。選択された部位は、第1アミノ末端シート鎖のはじめ（2、4、6部位）、ループ（62、63部位）、および、カルボキシ末端シート鎖のはじめ（64、65、66部位）において、それぞれ空間的に接近して局在化し、それらのアミノ酸側鎖によりユビキチン表面の接触領域が形成される。このようにして、表面が露出した高頻度可変領域が、ま

10

20

30

40

50

だ変化していないユビキチンのタンパク質構造上の分析領域において、ランダムなアミノ酸置換により発生した（国際特許出願／EP 2 0 0 4 / 0 0 5 7 3 0号、未発行）。

【0014】

シートタンパク質上での人工的な結合表面の発生は、従来の抗体に対する、新規で興味深い代替性を示す。 - II - クリスタリンまたはユビキチン様のタンパク質表面における新規で人工的に発生させた結合部位が、結果として、機能性結合分子をもたらすことの証明が得られた（特許文献1）（国際特許出願／EP 2 0 0 4 / 0 0 5 7 3 0号、未発行）。

【0015】

しかしながら、今まで、2つの成分のうちの1つの機能または両成分の機能の損失を受けることなく、診断、治療および分析応用に有用性を与える複合体を形成するために、他の成分に対してこれらのポリペプチド分子をカップリングすることは示唆がなかった。

【特許文献1】ドイツ公開特許第19932688A1号公報

【非特許文献1】Jaenicke, R., and Slingsby, C. (2001). Lens crystallins and their microbial homologs: structure, stability, and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36, 435-499.

【非特許文献2】Wistow, G. J., and Piatigorsky, J. (1988). Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu Rev Biochem* 57, 479-504.

【非特許文献3】Blundell, T., Lindley, P., Miller, L., Moss, D., Slingsby, C., Tickle, I., Turnell, B., and Wistow, G. (1981). The molecular structure and stability of the eye lens: x-ray analysis of gamma-crystallin II. *Nature* 289, 771-777.

【非特許文献4】Kumaraswamy, V. S., Lindley, P. F., Slingsby, C., and Glover, I. D. (1996). An eye lens protein-water structure: 1.2 angstrom resolution structure of gamma B-crystallin at 150K. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, 611.

【非特許文献5】Jaenicke, R. (1996). Stability and folding of ultrastable proteins: eye lens crystallins and enzymes from thermophiles. *Faseb J* 10, 84-92.

【非特許文献6】Najmudin, S., Nalini, V., Driessen, H. P., Slingsby, C., Blundell, T., Moss, D., and Lindley, P. (1993). Structure of bovine gB (g II)-crystalline at 1.47 angstrom. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49, 223-233.

【非特許文献7】Norledge, B. V., Mayr, E. M., Glockshuber, R., Bateman, O. A., Slingsby, C., Jaenicke, R., and Driessen, H. P. (1996). The X-ray structures of two mutant crystallin domains shed light on the evolution of multi-domain proteins. *Nat Struct Biol* 3, 267-274.

【非特許文献8】Wistow, G., Turnell, B., Summers, L., Slingsby, C., Moss, D., Miller, L., Lindley, P., and Blundell, T. (1983). X-ray analysis of the eye lens protein gamma-II crystallin at 1.9 A resolution. *J Mol Biol* 170, 175-202.

【非特許文献9】Mayr, E. M., Jaenicke, R., and Glockshuber, R. (1994). Domain interactions and connecting peptides in lens crystallins. *J Mol Biol* 235, 84-88.

【非特許文献10】Rudolph, R., Siebendritt, R., Nessler, G., Sharma, A. K., and Jaenicke, R. (1990). Folding of an all-beta protein: independent domain folding in gamma II-crystallin from calf eye lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4625-4629.

【非特許文献11】Sharma, A. K., Minke-Gogl, V., Gohl, P., Siebendritt,

10

20

30

40

50

R., Jaenicke, R., and Rudolph, R. (1990). Limited proteolysis of gamma II-crystallin from calf eye lens. Physicochemical studies on the N-terminal domain and the intact two-domain protein. Eur J Biochem 194, 603-609.

【非特許文献12】Jaenicke, R. (1994). Eye-lens proteins: structure, superstructure, stability, genetics. Naturwissenschaften 81, 423-429.

【非特許文献13】Ling, M. M. (2003). Large antibody display libraries for isolation of high-affinity antibodies. Comb Chem High Throughput Screen 6, 421-432.

【非特許文献14】Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., and Cook, W. J. (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. J Mol Biol 194, 531-544. 10

【非特許文献15】Butt, T. R., Jonnalagadda, S., Monia, B. P., Sternberg, E. J., Marsh, J. A., Stadel, J. M., Ecker, D. J. and Crooke, S. T. (1989) Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in Escherichia coli. PNAS 86, 2540-2544.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

従って、本発明の目的は、 α -クリスタリンまたはユビキチンに基づくポリペプチドと機能性成分との複合体であって、それぞれのポリペプチド分子が、野性型ポリペプチドと比較して変化したりガンドに対する特異的結合のための結合特性を有し、互いに結合した後、前記複合体の両成分が、維持されたそれらの機能、または、このようなカップリングにより増強されたそれらの機能を有する。 20

【0017】

本発明の他の目的は、このような複合体が、同定され、調製され、および、その機能特性を試験できることによる方法の提供である。

【課題を解決するための手段】

【0018】

前記目的は、独立項の主題により達成される。好ましい実施形態は、従属項に見られる。 30

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明は、例えば、タンパク質（発色団タンパク質（色素タンパク質）および酵素）、マトリクス（例えば、デキストラン、ポリメタクリル酸、アガロース、セファロース、ポリスチレン誘導体およびセルロース）および小分子（例えば、蛍光標識、ビオチン、ジゴキシゲニン、放射性同位元素および抗生物質）のような様々な分子に対する、 α -クリスタリンおよびユビキチンに基づく新規結合タンパク質の部位特異的および選択的な非方向性（*undirected*）のカップリングに関する。これらのいわゆる *Affilin*（商標）分子は、タンパク質のシート構造における結合領域の新たな設計により特徴づけられる。このように、これらは、自然界において結合性タンパク質のもっとも著名な種類である抗体とは異なる。抗体の場合、結合領域は、タンパク質の可動性ループ領域（*CDRs*）に局在する。*Affilin*（商標）と抗体との間における他の相違は、分子のサイズである。本発明の複合体の第1成分の基礎として使用される2つのポリペプチドは、それぞれ、分子量20kDa（ α -クリスタリン）および分子量10kDa（ユビキチン）である。一方、抗体は、150kDa（IgG）の分子量である。 40

【0020】

本発明は、これらのポリペプチドおよびそれぞれの結合パートナーからの複合体の調製方法、および、異なる応用におけるそれらの使用も含んでいる。また、驚いたことに、これらのカップリング手法は、前記カップリングパートナーの生物学的活性の損失だけでな 50

く、リガンドに対するポリペプチドの結合特性の損失も起こらないという結果を示す。

【0021】

本発明の具体例として、BIACOREシステムにおけるデキストランマトリクス、蛍光染料Oyster(商標)556、色素タンパク質フィコエリスリン(PE)および西洋わさびペルオキシダーゼ酵素に対する前記ポリペプチド成分のカップリング、ならびに、アフィニティークロマトグラフィーに使用するための支持基材に対するポリペプチドの固定が、記載されている。本発明によれば、前記カップリングは、前記ポリペプチド、例えば、タンパク質の求核性側鎖に対して直接的に、または、C末端ペプチドリンカーに対するターゲット法により行われた。驚くことに、前記カップリング法は、両方の足場タンパク質に適応でき、これらの分子の結合特性の機能障害を起こさなかった。前記相対的に小さなポリペプチド分子(それぞれ、10および20kDa)が、それらの結合活性を維持したまま、大きなタンパク質、例えば、フィコエリスリン(240kDa)に対して、結合されたことは、特に期待されていなかった。

10

【0022】

驚いたことに、この方法において得られた複合体は、Affilin(商標)分子の結合能力を制限せず、対照的に、巨視解離定数(アビディティー効果)の増加が、ポリペプチド分子の他の利用可能性(例えば、治療)を与える、ある複合体で確認された。さらに、これらのポリペプチド分子は、水に不溶性のマトリクスにカップリングした後でも、結合活性を示し、尿素、グアニジウム、エタノール、水酸化ナトリウムまたは塩酸のような変性試薬で処置した後に、再生、例えば、前記結合特性が回復されることがわかった。

20

【0023】

-クリスタリンおよびユビキチンに基づく分子の構造データの詳細な分析は、リジン残基の特別なターゲティングにより、非特異的なカップリング選択を与える可能性を提供した。構造分析は、-クリスタリンにおいて、リジンがタンパク質のC末端ドメインに存在することを示しており、このため、カップリングに適している(図1)。ユビキチンにおいても、このようなリジン残基の同定は可能であった。しかしながら、これらのカップリングストラテジーを実行する前に、結合領域に別のリジンがないことを、確認しなければならない。

【0024】

本発明のために、IgGFc(ヒト由来)またはproNGFに対して特異的に結合するポリペプチドが、ヒト-クリスタリンライブラリ(CR20)から選択され、NGF-結合ポリペプチドは、ヒトユビキチンライブラリ(UB10)から選択され、これらは続いて精製された。システインを含む規定の長さの特異的なC末端ペプチドリンカーの導入により、結合活性の機能障害なしに選択的なカップリングが得られる方法で、ペプチド分子の修飾が可能であった。効果的なカップリングのため、全ての残存する露出システインを除去する必要がある。ポリペプチド分子の非特異的なカップリング方法により、驚いたことに、前記ポリペプチドの結合活性を維持することが可能であり、さらに、アビディティー手段により親和性の向上が達成でき、そのため、診断および治療のための非常に魅力的なポリペプチドベースの分子複合体を調製することが可能となった。

30

【0025】

このような代替結合分子は、治療、診断およびクロマトグラフィーにおける多くの使用を見出す。様々なパートナーに対するポリペプチドのカップリングにより、使用の幅広い分野が、これらの新しい結合分子のために提供されるであろう。

40

【0026】

本発明は、特に下記の側面と実施形態を含む。第1の側面によれば、本発明は、下記の成分を含む複合体に関する。

ユビキチンまたは-クリスタリンに基づく1以上のポリペプチド(I)であって、対応する野生型ポリペプチドと比較して新たに発生または変化させた、リガンドに特異的に結合するための結合特性をそれぞれ有するポリペプチドと、

それに共有結合的に結合される1以上の機能性成分(II)とを含み、

50

前記(II)に対する前記(I)のカップリング後、全ての成分の機能が維持されている、複合体。

【0027】

言い換えれば、本発明の複合体は、ユビキチンまたは α -クリスタリンを野生型の形態では含まないが、特異的なリガンドに適応した形態でのみ含む。この特異的に適応した形態は、野生型の形態と比較して、変化させた(向上させた)または新たに発生させた、各リガンドに対する結合特性を提供する。 α -クリスタリンまたはユビキチンに基づくポリペプチドの共通の原理として、両方において、関心のあるリガンドに対する特異的な結合を可能にするため、シート構造上に人工的な結合表面を発生させることが指摘されるだろう。そこで、人工的な結合表面を提供するための少なくとも1つのシート構造の存在は、本発明の必須の特徴である。

10

【0028】

この状況において、複合体とは、翻訳後の、他の成分へのポリペプチド分子の共有結合を意味し、このため、例えば、遺伝子レベルにおけるポリペプチドの融合とは異なる。融合ポリペプチドは、いわゆる融合の結果である。

【0029】

本発明によれば、ユビキチンに基づく前記ポリペプチド分子は、ユビキチン様タンパク質のタンパク質スーパーファミリーのタンパク質、ユビキチン様折りたたみモチーフを有するタンパク質、ならびに、それらの断片または融合タンパク質からなる群から選択されることが好ましい。前記断片または融合タンパク質は、シート領域の少なくとも1つのシート鎖および任意に非シート領域を含むタンパク質の少なくとも1つの表面露出領域における1以上のアミノ酸修飾による、ユビキチン様折りたたみモチーフを有する。前記タンパク質は、それぞれ、所定の結合パートナーまたはリガンドに対する結合親和性を有しており、前記結合親和性は、ユビキチン様折りたたみモチーフが保持されなければ、存在しない。

20

【0030】

従って、本発明は、それぞれユビキチン様折りたたみモチーフを有する、“ユビキチン様タンパク質”のタンパク質スーパーファミリーのタンパク質、ユビキチン様折りたたみモチーフを有するタンパク質、および、それらの断片または融合タンパク質からなる群から選択されたものが、置換、挿入、欠損、化学的修飾または結合により修飾されたタンパク質を含む。この修飾によって前記タンパク質は、以下の方法により得られる前には存在しなかった、所望の結合パートナーに関する結合親和性を示す：

30

a) 修飾されたタンパク質の選択

b) 結合パートナーの決定

c) シート領域の少なくとも1つのシート鎖および任意に非シート領域を含むタンパク質の少なくとも1つの表面露出領域におけるアミノ酸の選択

d) ユビキチン様折りたたみモチーフが保持される間、置換、挿入、欠損および/または化学的な修飾により、選択されたアミノ酸の修飾

e) 工程b)において決定された結合パートナーへの前記修飾タンパク質の接触

f) 工程b)において決定された結合パートナーへの結合親和性を有するタンパク質の検出

40

【0031】

さらに、前述のユビキチンに基づく修飾タンパク質の製造およびこれらの修飾タンパク質の使用のための各方法が、記載されている。

【0032】

従って、本発明の複合体において、使用されるユビキチンに基づくポリペプチド分子(I)は、本出願において言及されるユビキチン様折りたたみモチーフをそれぞれ有するタンパク質またはポリペプチドの修飾により調製されることが好ましい。これらは、“ユビキチン様タンパク質”のタンパク質スーパーファミリーのタンパク質、ユビキチン様折りたたみモチーフを有する全てのタンパク質、ならびに、ユビキチン様モチーフを有してい

50

ることを条件に、これらのタンパク質の断片または融合タンパク質を含む。これらの各タンパク質またはポリペプチドを基準として、本来のタンパク質またはポリペプチドにおける1つ以上のアミノ酸が修飾される。特に、前記修飾は、アミノ酸の置換だけでなく、少なくとも1つ以上のアミノ酸の挿入および欠損、ならびに、アミノ酸の化学的な修飾を含んでいる。これらの修飾は、タンパク質の少なくとも1つの表面露出領域において、修飾されることで行われる。少なくとも1つのアミノ酸の修飾は、シート領域の少なくとも1つのシート鎖を含む。前記シート鎖は、前記結合パートナーまたはリガンドのそれぞれに接近（露出）するために、前記タンパク質の表面に局在しなければならず、決定され得る親和性により、前記修飾タンパク質に結合することが可能である。本発明の別の実施形態において、シート領域のシート鎖における前記変異に加えて、非シート領域もまた、修飾される。好ましくは、影響を与えるため、特に、予定された結合パートナーに対する結合親和性を増加させ、これにより特異性を増強させるために、表面が露出されていることが好ましい。

【0033】

1つ以上のアミノ酸の修飾のため、本来公知の様々な技術が、当業者に利用可能である。これらは、下記において、より詳細に述べられるであろう。加えて、Ausubel et al., 1994、Sambrook et al., 1989の刊行物を参照にすることが可能である。

【0034】

前記ユビキチンの非表面露出のコア領域のアミノ酸の修飾は、既に公知である（Finucane et al., 1999; Lazar et al., 1997）。ここでの変異は、溶媒や可能性のある結合パートナーに接近することができないため、疎水性コア内の局在に起因して、結合に関与しない部位を対象とする。

【0035】

“前には存在しなかった結合特性”、“新規に産出された人工的な結合部位”および“野生型タンパク質と比較して変化させたリガンドへの特異的な結合のための結合特性”という用語の意味は、それぞれ、本発明の文脈において、下記のように説明できる。これらの用語は、修飾された領域における修飾タンパク質が、予定された結合パートナーまたは前記ユビキチンの本来の結合パートナーに対する結合特性をこれまで示していないことを意味すると解される。

【0036】

リガンドとして定義できる前記結合パートナーは、本発明における前記修飾タンパク質に対する測定可能な親和性を有する。本発明によれば、形成された複合体の解離定数 $K_D = 10^{-5} M$ 以下は、定量化できる結合特性の存在、すなわち、パートナーが結合される親和性の存在のための最小値として見なすことができる。応用に依存して、 $10^{-6} M \sim 10^{-12} M$ の値が好ましく、より好ましくは、例えば、クロマトグラフィーへの応用には、 $10^{-7} M \sim 10^{-11} M$ の値、または例えば、診断もしくは治療への応用には、 $10^{-9} M \sim 10^{-12} M$ の値である。さらに好ましい結合親和性は、 $10^{-7} M \sim 10^{-10} M$ の範囲、好ましくは、 $10^{-11} M$ までである。前記結合親和性の決定方法は、本来公知であり、以下においてさらに述べられる。

【0037】

本発明における修飾は、アミノ酸の置換、挿入、欠損または化学的な修飾を意味することを意図している。

【0038】

本発明における修飾されたタンパク質として、“ユビキチン様タンパク質”のスーパーファミリーのタンパク質が使用できる。本発明によれば、このスーパーファミリーは、Murzinら（1995）においてリストアップされたサブグループを含む。これらは、例えば、前記“ユビキチン関連タンパク質”、“UBXドメイン”、“GABARAP様”、“RAS-結合ドメイン”等のタンパク質ファミリーを含んでいる。好ましくは、“ユビキチン関連タンパク質”のタンパク質ファミリーのタンパク質が使用される。本発明

によれば、それらのタンパク質は、ユビキチン様折りたたみモチーフを有するタンパク質からなる。これらの例は、SUMO-1、FAU、NEDD-8、UBL-1およびGD XならびにRub1、APG8、ISG15、URM1、HUB1、エロンギンB、PLIC2(N-末端ドメイン)、ヒトのパーキン(N-末端ドメイン)である。

【0039】

本発明において、ユビキチン様タンパク質のスーパーファミリーから使用できるタンパク質は、高い範囲に特徴付けられる。参照の例でしかないが、下記のインターネットサイト、<http://bip.weizmann.ac.il/scop/index.html>に示されている。このサイトによれば、ユビキチン様タンパク質のファミリーは、前記ユビキチン関連タンパク質のファミリーが属するスーパーファミリーとして定義されている。このスーパーファミリーの全てのメンバーは、第1に、逆平行に配置しているシートにより特徴付けられ、およびセグメントに細分化される。その折りたたみは、

- Graspおよびユビキチン様として定義される。そのコア領域は、下記に定義される(2)-(2)であり、前記数字は、鎖の数を示し、鎖の全体がシートを形成する。前記シートを左から右まで(底部のアミノ末端、頂部のカルボキシ末端)見ると、鎖の部位に関して、混合されたシートは、2143通りもある。このように、ユビキチン様タンパク質のメンバーの特徴は、そのトップにおいて垂直に横たわってバックされているヘリックスの背面上で、タンパク質の一表面に露出された逆平行シートである。このユビキチン様折りたたみモチーフは、本発明において使用でき、また、修飾できるタンパク質の特徴であり、他のタンパク質からのファミリーメンバーを明確に区別できる。この定義の点において、PLIC2のユビキチン様N末端ドメインおよび前記パーキンのユビキチン様ドメインは、本発明により含まれる。

【0040】

当業者は、配列比較、いわゆる、アライメントを用いることによって、または、構造の重ね合わせ法により、前記タンパク質が、ユビキチン様タンパク質のタンパク質スーパーファミリーのメンバーであるか否かを、予備的に判断できる。当然、最新の証拠は、たいいてい、構造分析、例えば、X線結晶学または多次元的な核磁気共鳴分光法による構造分析によって提供される。近年、遺伝学的なアルゴリズムを用いる構造分析も、また、良好な予測を成し遂げてきている。

【0041】

ユビキチンスーパーファミリーに関するさらなる情報が、例えば、Larsenの2002年の刊行物において見いだされる。加えて、Buchberger et alの2001年の刊行物も参考になる。Buchbergerは、- - - - - 構成、すなわち、21534配置における“混合シート”のフォームにおける5つの鎖の配置の2次構造を有するユビキチン様タンパク質の特性として、典型的なGraspフォールドを述べている。この点において、UBXが、例えば、ユビキチン(Buchberger et al., 2001)の1次配列において、有意な相同性を有さないにも関わらず、三次元構造が、例えば、ユビキチンと同一であるために、前記ユビキチン様タンパク質に分類されると指摘された。この点において、ユビキチンにおける、48番目および49番目のアミノ酸は、時々、別々の鎖として考えられる(非特許文献14)。この5番目の鎖は、前記ユビキチン構造において、前記ヘリックスの後方に局在し、前記21534配置における“混合シート”を提供するであろう。しかし、2つのアミノ酸のみからなる構成が、実際のところ、2つのアミノ酸のこの鎖が、シート鎖と呼び得るか否かは疑わしい。Buchberger et al(2001)によれば、上記で説明した通り、21534の配置を有するタンパク質もまた、ユビキチン様タンパク質のスーパーファミリーに問題もなく分類され得た。本発明において、上記でより詳細に述べられた21543の定義が、ユビキチンにおける前記鎖の配置に選択された。

【0042】

前述したファミリーおよびスーパーファミリーのタンパク質は、通常、高く保存されている。既知のデータによれば、前記ユビキチンは、例えば、全ての哺乳動物において、同

一のアミノ酸配列を有している。酵母のユビキチンは、この配列と三つのアミノ酸が異なるのみである。ヒトのユビキチンまたは哺乳動物のユビキチンは、それぞれ76個のアミノ酸からなり、最初に述べた構造を有している。

【0043】

本発明において用いられる修飾タンパク質は、そのアミノ酸配列において、修飾される元のタンパク質、例えば、前記ヒトユビキチンに対して、少なくとも30%、好ましくは、少なくとも40または50%、さらに好ましくは、少なくとも60%、70%、80%、90%または95%の同一性を有しており、どのような場合でも、前記タンパク質は、上記で述べたユビキチン様折りたたみモチーフを有している。

【0044】

本発明によれば、修飾タンパク質の調製のために選択される前記タンパク質は、好ましくは、ヒトのユビキチンまたは異なる起源のユビキチン、例えば、異なる哺乳類のユビキチンである。前記哺乳類のユビキチンとして、特に、哺乳類の分野における、げっ歯類、家畜および農業用の動物のユビキチンが、用いられる。本発明によれば、前記調製したタンパク質の使用分野は公知であり、すなわち、前記修飾タンパク質が、例えば、ヒトの疾病の治療のために薬学的な組成として用いられる場合、ヒトのタンパク質が、修飾される元のタンパク質として用いられることが好ましい。同様の方法において、これは他の分野にも使用される。

【0045】

前記ヒトおよび哺乳類のユビキチンは、それぞれ、76個のアミノ酸を有している。PDBデータベース(<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>)における1UBQの構造によれば、逆平行シートの形成に寄与する鎖の4つのアミノ酸は、本発明によれば、下記のアミノ酸部位である。

【0046】

第1の鎖(N末端): 2~7番目; 第2のシート鎖: 12~16番目; 第3の鎖: 41~45番目; 第4の鎖(C末端): 66~71番目。前記シートを頂点(底面のアミノ末端、頂点のカルボキシ末端)から、または左から右に見た場合、前記鎖の部位は、第2、第1、第4、第3番の鎖であり、第1と第4の鎖の間において、ポリペプチド鎖は、ヘリックスを形成する。

【0047】

修飾のための前記アミノ酸の選択および修飾

【0048】

例えば、無料で使用できるProtein Data Bank(商標)(Bernstein et al., 2000; <http://www.rcsb.org/pdb>)のような、対応する構造データに基づき、側鎖が表面に露出された、すなわち、溶媒または可能性のある結合パートナーに配向した、開始タンパク質(例えば、ユビキチン足場タンパク質)におけるアミノ酸を、コンピュータ分析手法により局在化できる。さらに、おそらく、ランダム置換が足場タンパク質の安定性にネガティブな影響を与えない、または、わずかの影響である、開始タンパク質(例えば、ユビキチン等)におけるこれらのアミノ酸を、コンピュータ分析により同定できる。

【0049】

この情報は、結合部位の要素として、各アミノ酸の適正に関する最初の指示を提供でき、それから、実際の試験を必要とする。本発明の好ましい実施形態によれば、例えば、前記ヒトのユビキチンにおける2、4、6、62、63、64、65および66番目のアミノ酸が、それらの表面への露出、および、それらのランダムな置換のための構造全体の耐性のために、選択された。

【0050】

前述した部位は、第1のアミノ末端シート鎖(2、4、6番目の部位)の開始部、および、前記ループ(62、63番目の部位)またはカルボキシ末端シート鎖(64、65、66番目の部位)の開始部において、それぞれ互いに空間的に近接して局在し、アミ

10

20

30

40

50

ノ酸側鎖により、前記ユビキチンの表面における近接領域を形成する（図1）。分析された領域におけるランダムなアミノ酸置換（ランダム化）の方法により、抗体の高原結合部位と類似する形態で、ユビキチンの他の無処理の構造上の超可変領域の表面露出領域が産出される。

【0051】

ProSAllソフトウェア（“Protein Structure Analysis”；Proceryon Biosciences社、ザルツブルグ）を用いることで、例えば、ユビキチン（WT）と比較したタンパク質安定性が、 10^4 通りの変異について、また、“コントロールエピトープ”の残基（ランダム化部位24、28、31、32、35、37、38、39）が置換されたランダムに得られた同数の変異体サンプルについて、決定された。この場合、結合部位の領域においてランダムに置換された、in silicoで産生された変異体の約19%は、少なくともユビキチン（WT）の安定性と同一程度の安定性を有している。一方、約90%は、“コントロールエピトープ”の安定性よりも安定である（図2）。このコンピュータに基づく結果は、適切なアミノ酸の選択のための基礎として用いられ得る。

10

【0052】

前記ヒトのユビキチンの利用可能な構造データをはじめとして、産出される結合部位の領域における8つのアミノ酸部位は、最初に選択されることが好ましい。この領域における1次配列のランダム変異（ランダム変異誘発）の方法、および、後の特異的な選択により、それらの変異が得られた。これらは、予定されたハプテンもしくは抗原、または、一般的に予定された結合パートナーの、それぞれに対する所望の結合活性を示した。この方法において、新規の結合特性は、結果として修飾されたタンパク質により与えられるが、その構造およびタンパク質の化学的な特性は、元のタンパク質と高い度合いで同一のままである。そのため、例えば、小型、高い安定性、コスト効率の調整、ならびに、前述のリガンドに対する高い親和性と特異性による互いの容易な修飾というような利点を発揮する。この観点において、人工的な結合タンパク質の産出のための足場構造としてのユビキチンの安定性は、1)ユビキチンが小型なために、多数のアミノ酸置換についての足場の耐久性は、予期できず、また、2)硬く、柔軟性がないと考えられるシートを含む人工的な結合部位の機能性は、あらかじめ可能とは考えられなかったため、予期されなかった。

20

【0053】

代わって、本発明によれば、 β -クリスタリンに基づくポリペプチド分子が用いられる。

30

【0054】

初めに述べたように、脊椎動物のクリスタリンの1分類である β -クリスタリンは、約22kDaの分子量を有する単量体タンパク質である。 β -クリスタリンの主要な構造的なモチーフは、逆平行の β -シートである（Hazes and Hol, 1992, Richardson et al., 1992, Hemmingsen et al., 1994）。 β -クリスタリンは、2つの非常によく似た球状ドメインからなり、一方のN末端ドメインと他方のC末端ドメインとが互いにV型リンカーペプチドによって結合している。 β -クリスタリンの折りたたみパターン特性は（“Greek key”モチーフ、Slingsby, 1985, 特許文献2）は、おそらく、十分な熱安定性、および、変性試薬に対する安定性（Mandal et al., 1987）の理由である。

40

【0055】

通常折りたたまれた状態において、 β -II-クリスタリンは、どのような結合特性も示さない。 β -シート構造モチーフからなるこのタンパク質の、選択された溶媒に曝される領域の変異（変異誘発）は、驚いたことに、前記タンパク質の表面構造の変化および電荷（charge）パターンの変化をもたらし、このため、新しい結合特性を発生する。この場合、タンパク質の構造の維持には実質的には寄与しない領域またはアミノ酸部位のみが選択される。小型 β -シートタンパク質の変異誘発（Riddle et al., 1997）は、後の配列変異にかかわらず、タンパク質の高いパーセンテージが、 β -シートの

50

元の構造を形成し得ることを示している。

【0056】

ここで述べた方法において、標的変異誘発は、シートの硬い領域においてどのような結合特性も欠損しているタンパク質について行われる。このように、抗体分子と比較可能な、十分な安定性および特異的な結合特性を持つタンパク質が産出されている。

【0057】

前記ファージディスプレイシステムは、新しく産出された結合特性を有する変異誘発されたシートタンパク質の単離に適したシステムとして働く。前記システムは、特異的な結合特性のためのタンパク質変異体の幅広いレパートリーを、非常に効果的にスクリーニングすることが可能である (Smith, 1985)。この目的のために、各タンパク質変異体は、繊維状ファージの表面上に準備され、固相に固定された標的分子に作用できる。前記標的分子に結合するタンパク質は、前記ファージの溶出により得られる。ファージDNAの単離後、特異的に結合するタンパク質変異体のDNA配列を決定できる。前記ファージディスプレイシステム他に、例えば、細菌ディスプレイ (Stahl and Uhlen, 1997)、または、リボソームディスプレイ (Hanes et al., 1997) のような他の選択システムを用いても良い。

10

【0058】

前述の工程の方法により、驚いたことに、非結合タンパク質を特異的な結合特性を有するタンパク質に変異させるという方法で、例えば、シートにおける標的部特異的な変異誘発法により、非常に安定なシートタンパク質 - II - クリスタリンの変異が可能である。このように、8つのアミノ酸部位のランダム化により、最初に、タンパク質の相対的に硬い領域内で、足場分子に変異誘発が行われる。従って、特異的な結合特性に関して“抗体様”タンパク質種は、シートタンパク質である - II - クリスタリンから調製される。一般的に、- II - クリスタリン、または、他の小型で安定なシートタンパク質は、新しい結合特性を設計するための新しい足場分子として、述べられた方法とともに使用できる。モデル化された前記シートタンパク質は、例えば、別の応用において、組換え抗体の代替となりうる。

20

【0059】

この点において、他のより詳細な情報は、それら全体における参照により本明細書中に取り込まれる国際公開W001/04144号パンフレットにおいて確認できる。

30

【0060】

ここで定義される“リガンド”という用語は、- クリスタリンまたはユビキチンに基づくポリペプチド分子により、特異的に結合される物質に言及される。

【0061】

この結合パートナー、いわゆる、リガンドとしては、生化学的、生物工学的、診断的および治療的に関係する分子全てが用いられる。可能性のあるリガンドのリストは、ポリペプチドおよびタンパク質 (例えば、免疫グロブリン、免疫グロブリン誘導体、血漿から得られるタンパク質、血液凝固因子および阻害剤、成長因子、インターロイキン、サイトカイン、受容体タンパク質、ウイルスタンパク質、および、CD14、CD25およびCD34のような細胞表層マーカー)、ペプチド (例えば、S-タグ、T7-タグ、His-タグ、Strep-タグ、Myc-タグ、FLAG-タグのようなアフィニティタグ、および、ウイルス由来のペプチド)、低分子量物質 (例えば、ステロイド、コレステロールおよびハロゲン化炭化水素のような有毒物質)、脂質 (例えば、細菌のリボポリサッカライド、リボソームおよびリポタンパク質)、糖 (例えば、Lewis Yのような細胞表層マーカー)、核酸 (DNA, RNA)、有機および無機ポリマー、ならびに、これらの物質の誘導体を含んでいる。この点において、下記で述べた好ましい実施形態を参照する。

40

【0062】

ここで用いられる“機能性成分”という用語は、前記 - クリスタリンまたは前記ユビキチンに基づいたポリペプチド分子に共有結合的に結合する複合体の第2の成分と定義す

50

る。“機能性”という用語は、診断、治療、クロマトグラフィーおよび分析における使用に適した成分、あるいは、すでに知られている成分を意味すると解される。一般的に、“機能性成分”は、例えば、酵素活性、分光学的に測定可能な特性または毒性等の測定可能な特性を有するあらゆる成分として定義される。それとは別に、本複合体における機能性成分の構造および機能は、制限されない。唯一必要なのは、前記ポリペプチド分子と前記機能性成分との共有結合後、全ての成分の機能性が維持されていることである。前記ポリペプチド分子の場合、この機能性は、特異的なリガンドへの結合能力であり、前記機能性成分の場合、例えば、染料としてのその効果である。

【0063】

本発明によれば、1以上、例えば、2つの機能性成分がポリペプチド分子に結合することができる（上記で規定）。前記ポリペプチド分子に対して前記成分が特異的な結合を達成するために、例えば、成分の一方は、リジン残基に対して特異的に結合するように形成され、他方は、前記ポリペプチド分子におけるシステイン残基に対して特異的に結合するように形成される。このタイプの2つの成分の例は、蛍光染料であり、一方が、蛍光供与体として働き、もう一方が、蛍光受容体として働く。

【0064】

前記成分の結合特性、および、好ましく用いられる前記結合成分の詳細は、以下に述べられている。

【0065】

リガンドに対するポリペプチド分子の結合活性、および、カップリングパートナー（機能性成分）の活性の検出は、上記で述べた通り、重要な特徴である。リガンドへに対する結合活性の検出は、異なる方法によって行うこともできる。ELISA技術において、結合は、抗体-ペルオキシダーゼ複合体の手段により検出されるのに対して、前記Biacoreシステムは、検出のために、表面プラズモン共鳴現象を利用する。蛍光滴定、蛍光偏光法または蛍光相関分光法（FCS）のような他の技術は、Affilin（商標）のフルオロフォアの特性に基いている。カップリングパートナー、いわゆる、機能性成分の活性の検出のために、それらの公知の特性は重要である。このように、蛍光染料もしくはフィコエリスリンのような発色団またはフルオロフォア分子は、それらのスペクトル特性の手段により分析される。ペルオキシダーゼまたはアルカリフォスファターゼのような酵素は、モデル物質のターンオーバーにより検査される。毒素のような他の分子は、細胞培養実験において、直接的に生物学的活性を試験できる。放射性同位元素の場合、その放射能は、適切なカウンターを用いて測定できる。糖および核酸のような様々な他の分子のために、商用的に利用可能な検出試薬がある。

【0066】

一実施形態において、上述の通り、野生型ポリペプチドと比較して、新しく産出されたまたは変化させた結合特性は、前記ポリペプチド分子（I）のシートの表面露出領域における1つ以上のアミノ酸置換に基づく。この目的のために、前記ポリペプチド分子（I）当たり約6~10、好ましくは8つのアミノ酸が置換される。このことは、ユビキチンおよび-クリスタリンに基づく前記ポリペプチド分子（I）に等しく適用する。

【0067】

前記（I）の（II）へのカップリングは、リガンドに対する特異的な結合を対象とするポリペプチド分子（I）のシートの表面露出領域の外側領域において、行われることが好ましいことを指摘できる。このように、本発明の複合体に対する重要な必要性が、すなわち、全成分の機能の維持が達成されることがわかる。

【0068】

ここでは、リガンドに対する結合表面の外側、より正確には、denリガンドへの結合に関与するシートの外側に局在するユビキチンの29、33番目のリジン（29、33番目のリジンは、ヘリックスに局在する）へのカップリングを一例として示す。リガンドに対する結合部位から離れて位置する、このアミノ酸残基側鎖を介するカップリングは、複合体の成分の機能的障害を導かない。

10

20

30

40

50

【0069】

この点において、特に、リガンドに対する特異的なカップリングのための新しく産出された、または、変化された結合特性を有する前記ポリペプチド分子（I）のシートの外側領域において、前記（I）の（II）への結合が行われることが好ましい。前述の場合、この領域は、例えば、ユビキチン分子のヘリックスであり、または、 α -クリスタリンに関して、シートの他（すなわち、前記シートは、リガンドへの結合に参与しない）である。特に、クリスタリンのN末端ドメイン（シート）は、リガンドに対する新たに産出された結合表面を有していることが、図1から明らかであり、リジン残基は、C末端部位（ハイライト）は、機能性成分（II）とのカップリングに適している。

【0070】

一実施形態によれば、前記（I）の（II）に対するカップリングまたは連結は、それぞれ、（I）のアミン酸残基を介して生じる。言い換えれば、前記カップリングは、前記ポリペプチド分子（I）自体に存在するアミノ酸残基を介してなし遂げられる。

【0071】

この場合、前記カップリングは、前記（I）のシステインまたはリジン残基鎖を介して、部位特異的または選択的に非配向性（非方向性）の方法で、行われる。ここで、“部位特異的に”という用語は、正確に規定された部位を定義するために、前記分子（I）における確に規定された部位に、システインまたはリジンが存在または導入されることを意味する。“選択的に、非配向性（非方向性）の方法”とは、このような残基が数個存在し、選択的に起こるけれども、これらの残基に結合する数が、あるランダムファクターに支配されていることを意味する。

【0072】

本発明の複合体の2つの成分のカップリング、すなわち、それらの共有結合に関して、下記の説明が与えられる。

【0073】

タンパク質は、多数の官能基を含んでおり、それにより、他の分子へのカップリングが達成できる。これらの明確な例示は、下記で述べる。例えば、適切な架橋結合試薬を介したパートナーとの共有結合により、1つの分子において、異なる活性を組み合わせることが可能である。一例として、抗体について述べる。前記抗体は、染料分子に結合し、このように、後に診断に使用できる、容易に検出可能な検出試薬の提供が見出されている。

【0074】

類似の方法において、抗体は、他のタンパク質、好ましくは、アルカリフォスファターゼまたはペルオキシダーゼのようないわゆるレポーター酵素と結合される。これらのレポーター酵素は、基質を変換し、それによって、吸光、蛍光または発光により検出されるシグナルを得ることができる。

【0075】

適切な架橋結合試薬の選択により、タンパク質、すなわち、本発明のポリペプチド分子を、多くの他の基質クラス由来の他の機能性成分に結合させることができる。有機および無機ポリマー、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、糖ならびに低分子量物質の多数もまた、この目的のために使用できる。前記ポリマーの分類からの好ましいカップリングパートナーは、例えば、デキストラン、ポリメタクリル酸、セファロース、アガロース、ポリスチレン、ポリビニル、シリカゲル、セルロースまたはポリエチレングリコール（PEG）である。後者の修飾は、例えば、生物学的治療薬（*biotherapeutics*）の薬物動態学的特性の調節のために用いられる。適切かつカップリングのための予め活性化された官能基を有するPEG誘導体の多くは、商用的に入手できる（ネクタール *Therapeutics* 社）。先で述べた前記他のポリマー材料は、多くの生化学的、生物工学的および治療方法において、キャリア物質として働く。特に、ここでは、例えば、クロマトグラフィーへの応用、特に、親和性クロマトグラフィーについて述べる。これらのポリマー物質は、ゲルマトリクスとして用いられる。この目的のために、適切な化学基を有するポリマービーズの表面は、機能化され、例えば、所望の活性でタンパク質のカップ

10

20

30

40

50

リングが可能となるように活性化されている。この方法において、特定のリガンドに対する特異性を有する結合タンパク質もまた、固定される。その結果、ゲルマトリクスは、複雑な基質混合物からのリガンドを有効かつ迅速に濃縮するために使用できる。この濃縮は、カラムクロマトグラフィーまたはフィルター表面によっても行うことができる。さらに、磁力特性を有し、混合物から効率的に分離できるポリマービーズ（磁力ビーズ）も、親和性向上のために、有利に用いられる。

【0076】

重要な一例は、マトリクス結合タンパク質 A（抗体分子に対して固有親和性を有する細菌タンパク質）に対するアフィニティークロマトグラフィーにより、真核細胞の上清から、治療目的のために抗体をラージスケールで精製する例である。

10

【0077】

前述の抗体 - レポーター酵素融合体の他に、2つのタンパク質成分のカップリングの例は、多数ある。従って、最も簡単なケースの一例として、ホモ2量体またはホモ多量体が、2以上の同一タンパク質分子のカップリングにより産出できる。

【0078】

前記結合タンパク質の場合、アビディティー効果は、多量化により達成できる。すなわち、標的物質に対する多量体の親和性は、単量体の結合タンパク質の親和性と比較して、著しく増加する。また一方、異なる標的物質に対する特異性を有する2つの結合タンパク質のカップリングにより、例えば、互いに空間的に近接で、各ターゲット物質を運ぶアダプターとして使用できる、いわゆる2特異性結合分子が得られる。

20

【0079】

生細胞に対して毒性を有するタンパク質、いわゆる、毒素（例えば、ヒマ毒、コレラ毒素、シュドモナス属の菌体外毒素等）もまた、抗体または他の結合分子に対する興味深いカップリングパートナーになる。カップリングに続いて、この2機能複合体は、例えば、ガン細胞の表面において、前記結合タンパク質を介して、特異的なターゲット物質と選択的に結合でき、その後、ターゲット細胞は、細胞毒活性により破壊される。

【0080】

タンパク質の性質に関連する他のカップリングパートナーは、例えば、GFPおよびその誘導体のようなタンパク質発色団、または、フィコエリスリンのような色素含有タンパク質である。十分に検出可能なレポーター物質があると、結果的に得られる発色団または蛍光カップリング産物自体が、研究または診断の有用なツールとなる。

30

【0081】

一方、既に前述したが、色素または蛍光タンパク質複合体もまた、低分子量染料分子のカップリングにより入手できる。架橋結合基を有する適切な染料分子の多くは、商用的に、例えば、Invitrogen社から入手できる。診断および治療で使用するための、タンパク質複合体を得る他の低分子量カップリングパートナーは、例えば、ビオチン、ジゴキシニン、重金属誘導体、キレート試薬、放射性同位元素、細胞毒物質または抗生物質である。

【0082】

本発明において、タンパク質およびポリペプチド分子、ならびに、主にカップリングに適した機能性成分に含まれる官能基は、アミノ基、カルボキシ基、水酸基およびスルヒドリル基である。また、チロシンのフェノール基も官能基であり、芳香環系は、カップリング試薬の攻撃のための部位として働き得る。カップリングに適したアミノ酸残基は、特異的な性質により特徴付けられる。一方では、前記カップリング試薬に露出可能な反応性側鎖を有する必要がある。理想的なケースでは、この官能基は、タンパク質表面に局在し、溶媒に曝される。さらに、この残基の修飾は、タンパク質の機能を妨げない。好ましくは、本発明において、修飾される残基は、酵素の活性部位またはポリペプチドの結合表面から著しく離れている。さらに、これらの領域は、同型のアミノ酸残基の空隙でもあり、修飾されるとタンパク質の機能を損ない得る。従って、利点は、それぞれのタンパク質のまれなアミノ酸残基でもある。

40

50

【 0 0 8 3 】

前述のように、ユビキチンに基づくポリペプチド分子（I）にとって、ユビキチン分子の29番目および33番目のリジン残基を介したカップリングが、好ましいと考えられる。より好ましくは、前記29番目および33番目の残基より、リガンドに対する結合表面にさらに短い距離で局在している11番目および48番目のリジン残基を介したカップリングが可能である。

【 0 0 8 4 】

前記 - クリスタリンに基づくポリペプチド分子（I）の場合、野生型ポリペプチドと比較して、新たに産出または変化されたりガンドに対する特異的な結合のための結合特性を有するペプチドドメインは、N末端ドメインであり、前記（II）に対する（I）のカップリングは、C末端ドメインを介して行われる。これは、好ましくは、システインを含むC末端ペプチド融合の可能性に適用し、また、C末端ドメインに存在し、且つ、前記機能性成分に対するカップリングのために利用可能なリジンのようなアミノ酸側鎖にも適用できる。前記 - クリスタリンの91番目および163番目の残基が使用されることが好ましい（図1参照。）。

10

【 0 0 8 5 】

非タンパク質構成（proteinogenic）アミノ酸の中で、まず、側鎖に - アミノ基を有するリジン、および、スルフヒドリル機能を有するシステインについて指摘する。特に、これらの官能基は、反応性があるため、本発明において、機能性分子に対するポリペプチド分子の特異的なカップリングのためのパートナーとして非常に適している。このため、スルフヒドリル基のみと特異的に反応する試薬、ひいては、例えば、マレインイミド、ヨード酢酸、ヒドロキシメルクリ安息香酸、Ellmann's 試薬等の本発明において使用できる試薬が、文献に開示されている。さらに、他の例も、Voet & Voet（1995）およびLottspeich & Zorbach（1998）のような各文献において記載されている。

20

【 0 0 8 6 】

例えば、酸無水物（本発明でも使用できる無水酢酸、N - ヒドロキシスクシンイミド等）のようなリジン特異的側鎖試薬も、多数述べられている。それらの反応性に加えて、リジンは、カップリングのための他の有利な特性を有している。その側鎖は荷電しているため、ほとんどが、タンパク質の表面に局在している、すなわち、生物系において、溶媒（主に水）に露出することができる。この露出度も、前記カップリング試薬に必要であり、このため不可欠である。

30

【 0 0 8 7 】

タンパク質において、表面に露出した遊離システインは、相対的にまれであり、細胞外タンパク質において、これらのシステインのほとんどは、2量体の相互作用を安定化するジスルフィド結合に関与する。しかしながら、含まれるシステインが修飾を受け易い状態になるために、ジスルフィド結合は、還元によって切断され得る。本発明におけるポリペプチド分子が、カップリング試薬に露出可能なシステインを含まない場合、変異誘発により、適切な部位にこのような残基を導入することができる。この点において、カップリングに適した表面に露出されたアミノ酸部位の予測を促進することから、タンパク質の空間的構造の知見は、有利な知見である。また一方、数個のシステイン残基が、部位特異的なカップリングを生じるタンパク質に存在する場合（定義されたシステイン残基、上記参照）、部位直接的変異誘発法により、これらを除くのは不可能である。この場合、システイン残基と類似の性質を有するセリン残基による置換が、好ましい。

40

【 0 0 8 8 】

また、対象のタンパク質配列における変異誘発により、カップリングに適切なアミノ酸残基を得ることは、しばしば不可能である。タンパク質が、アミノ酸残基の挿入、または、カップリングに適したアミノ酸残基を含むN - 末端もしくはC - 末端のペプチド配列での融合を許容する場合、遺伝学的なレベルでこれらの部位に導入され得る。

【 0 0 8 9 】

50

従って、他の実施形態において、前記(II)に対する(I)のカップリングは、(I)に対する付加的な末端ペプチド融合におけるアミノ酸残基を介して行われる。

【0090】

これらの末端ペプチド融合の露出度の試験は、例えば、発色特性を有する側鎖特異的なカップリング試薬、例えば、システイン用のEllmann's試薬の使用により行うことができる(前記例示参照)。他にも、前記末端ペプチド融合の露出度は、それらの長さにより制御することができる。ペプチド融合の場合、例えば、結合用のアミノ酸側鎖とタンパク質との間へのいわゆるスペーサーの挿入により、結合用のアミノ酸側鎖の露出度の増加が可能である。ペプチド融合の場合、これらは、付加的で不活性なアミノ酸残基ある。サイズが小さく、非常に柔軟な構造であると想定できるため、特に、グリシンおよびセリン残基が適している。

10

【0091】

カップリング試薬に対して露出可能であるタンパク質の官能基の数に依存して、カップリングの特異性が異なるタイプに区別できる。例えば、システイン特異的なカップリング試薬を使用した場合、システイン残基のみが選択的に反応するが、例えば、数個のシステイン残基が存在する場合、カップリングの正確な部位は、決定できない。これは、選択的であるが、非配向性(非方向性; undirected)のカップリングと呼ばれる。しかしながら、カップリング試薬に対して露出されるシステインが1つだけ存在する場合、カップリングは、部位特異的に生じる。

【0092】

20

適切なカップリング試薬の多くは、商用的に入手できる(例えば、Pierce社)。本発明において、使用できるカップリング試薬の特異的な形態は、架橋剤または単にリンカーと呼ばれる(Herrmann & Morse, 1973; Takamiya et al., 1975; Reichlin, 1980)。

【0093】

リンカーは、共有結合により2つ(またはそれ以上)の分子を結合する物質として定義される。リンカーは、2つ(またはそれ以上)の反応性(活性化された)官能基を含み、その空間的距離は、それらに結合する化学基によってさらに制御できる。異なる官能基を有するヘテロ-2官能性リンカーと対比的に、同一の官能基を有するリンカーは、ホモ-2官能性と呼ばれる。そのため、リンカー物質の適切な選択により、完全に異なる物質類を互いに結合することも可能である。

30

【0094】

本発明において、使用できるリンカーの一例として、SPC1-A7-CysのC末端部位を参照できる(表2参照)。

【0095】

しかしながら、例えば、タンパク質の二量化におけるジスルフィド結合の形成のような、タンパク質のカップリングの特異的なケースは、活性化されたリンカーを必要としない。酸化的条件下、スルフヒドリル残基は、ジスルフィドを形成するため、すなわち、2つの硫黄原子の間の共有結合のために、十分に高い反応性を有している。

【0096】

40

本発明において、カップリング反応は、1工程反応として、または、複数工程においても、行うことができる。2つの同一分子の単なる二量化の場合、それぞれが1つの反応性残基のみを有していれば、定義された複合体を得るためのホモ-2官能性リンカーを用いて、カップリング成分とインキュベートするだけで充分である。異なる反応基を有する異なるカップリングパートナーの場合も、前記1工程反応は、適したヘテロ-2官能性リンカーを用いてのみ可能である。

【0097】

代わりに、同一の反応基を持つ異なる結合パートナー(反応体)の間でのカップリングもまた、複数工程において行うことができる。この目的のため、ほとんどの場合、まず、一方のカップリングパートナーのみを過剰なリンカーとインキュベートし、結果として得

50

られた一価の反応体 - リンカー複合体を単離し、その後、リンカーの残存する遊離官能基を介して、第2の反応体に結合させる。生化学および生物学において使用を見出された化学物質の多くは、いわゆる、活性化形態、すなわち、すでに反応性リンカーに結合した状態で、商用的に入手できる (Pierce社、Invitrogen社)。

【0098】

カップリングの度合い、すなわち、前記複合体における個々の成分の相対比は、2以上の反応基が存在する場合、使用する反応体の化学量論により、ある範囲に制御できる。異なるカップリングパートナーを有する定義された複数のカップリングは、逐次的なカップリングにより、または、異なるカップリング化学の使用により、例えば、機能性成分2が、各ポリペプチドのリジンに結合すると同時に、第1の機能性成分がシステインにカップリングすることにより、可能である。典型的な例が、FRET測定のための蛍光供与体 / 受容体対への結合である。この目的に適した染料分子の組合せは、Invitrogen社から入手できる。

10

【0099】

本発明において、複合体をもたらす選択されたカップリングメカニズムには非依存的に、本複合体の機能能力が予想されるものではなく、驚くべきものであったことを、改めて指摘する。従って、ここで説明されたことを参照することが可能である。

【0100】

さらに、本発明において開示された複合体が産生でき、さらに、個々の成分の全機能が保持され、または、増強されることも、当業者にとって予想できなかったことであることを述べておく。

20

【0101】

本発明において、一方のポリペプチド分子と、他方の機能性成分との間におけるサイズ比は、非常に異なっている。例えば、フィコエリスリンに前記分子を結合させた場合、時々、前記ポリペプチド分子の10~20倍になるが、蛍光染料Oyster (商標) のように小さい場合もある。驚いたことに、特に、非常に大きな分子との結合において、前記ポリペプチド分子の構造およびリガンドへの結合親和性は、両方とも維持されている。このことは、この方法において、予期され得なかった。

【0102】

上述の説明のように、機能性成分に対するカップリングのための側鎖は、リガンドへの結合の機能性が損なわれないために、リガンドに対する (I) の結合表面の外側に局在されることが好ましい。

30

【0103】

別の好ましい実施形態によれば、前述のように、(I) に対する前記末端ペプチド融合は、1以上のシステイン残基または1以上のリジン残基を含んでおり、これらのアミノ酸残基は、リガンドとの (I) の相互作用に関与していないことが好ましい。

【0104】

前記機能性成分 (II) は、ポリペプチドおよびタンパク質、有機および無機ポリマー、核酸、脂質、糖、低分子量物質、ペプチドならびにこれらの物質の誘導体からなる群から選択されることが好ましい。結合の原理およびカップリング試薬に関しては、上記の説明を参照。

40

【0105】

好ましい実施形態によれば、前記機能性成分 (II) は、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質、好ましくは、発色タンパク質、酵素、免疫グロブリン、免疫グロブリン誘導体、毒素またはI由来のポリペプチドである。

【0106】

前記機能性成分 (II) がポリマーの場合、デキストラン、ポリメタクリル酸、セファロース、アガロース、ポリビニル、ポリスチレン、シリカゲル、セルロースもしくはポリエチレングリコール、または、ポリマー誘導体から選択されることが好ましい。

【0107】

50

前記機能性成分(II)が低分子量物質の場合、染料、ビオチン、ジゴキシジニン、重金属、キレート試薬、放射性同位元素、抗生物質または細胞毒物質であることが好ましい。

【0108】

好ましい実施形態によれば、成分(I)に特異的に結合するリガンドは、ポリペプチド、ペプチド、低分子量物質、脂質、糖、核酸、有機および無機ポリマー、ペプチドならびにこれらの物質の誘導体からなる群から選択されることが好ましい。

【0109】

このリガンドがポリペプチドまたはタンパク質の場合、免疫グロブリンおよび免疫グロブリン誘導体、血漿から得られるタンパク質、血液凝固因子および阻害剤、成長因子、インターロイキン、サイトカイン、受容体タンパク質、糖化タンパク質、ウイルスタンパク質ならびに細胞表面マーカー、好ましくは、CD14、CD25およびCD34が、用いられることが好ましい。

10

【0110】

前記リガンドがペプチドの場合、アフィニティタグ、好ましくは、S-タグ、T7-タグ、His-タグ、Streep-タグ、Myc-タグもしくはFLAG-タグ、または、ウイルス由来ペプチドであることが好ましい。

【0111】

前記リガンドは、低分子量物質、好ましくは、ステロイド、コレステロールおよび、例えば、ハロゲン化炭化水素のような有毒物質、または、脂質もしくは脂質誘導体、好ましくは、細菌のリポポリサッカライド、リポソームおよびリポタンパク質であっても良い。

20

【0112】

好ましい実施形態によれば、本発明の複合体の成分(II)は、 α -クリスタリンまたはユビキチンに基づく1以上のポリペプチドであり、それと共有結合することにより、(I)のリガンドに対する親和性の向上が、アビディティー効果によって達成される。詳細な説明は上記の記述を参照。

【0113】

さらに、前記成分(II)は、複数の方法において、(I)のリガンドへの前記親和性の向上が、アビディティー効果により達成されることにより、前記(I)が共有結合的に結合されるポリペプチド、タンパク質またはポリマーであることが好ましい。前記に代えて、成分(II)は、成分(I)に共有結合後に、(I)のリガンドへの前記親和性の向上が、アビディティー効果により達成されることにより、同型の別の複合体に共有結合的または非共有結合的な結合を受けるポリペプチドまたはポリマーである。

30

【0114】

好ましい実施形態によれば、成分(I)は、SPC1-A1(Seq. ID NO: 2)、SPC1-A7(Seq. ID NO: 3)、SPU11-3-A1(SEQ ID NO: 12および13)、SPC1-G3(Seq. ID NO: 4)、およびSPC7-E9(SEQ ID NO: 8)の分子の1つである。

【0115】

しかしながら、本発明は、正確な核酸配列のみではなく、それらの変異体をも含む。本発明における“変異体”は、特に、SEQ ID NO.で規定された核酸と比較して、1以上の置換、挿入および/または欠損が存在する核酸のことを言う。これらの変異体において、少なくとも1つ、または、2、3、4つ以上のヌクレオチドが、核酸の片方の末端または両方の末端、または、核酸の内側の部分において、欠損し、または、別のヌクレオチドにより置換されることが好ましい。

40

【0116】

このように、本発明の前記核酸は、それぞれのSEQ ID NO.の核酸に実質的に対応する配列を有する核酸も含んでいる。本発明における前記核酸は、例えば、前記SEQ ID NO.の核酸に対して、少なくとも約80%、典型的に少なくとも約90%または95%の配列相同性を有してもよい。

【0117】

50

前記“核酸配列”という用語は、ヌクレオチドのヘテロポリマー、または、これらのヌクレオチドの配列に関する。ここで用いられる前記“核酸”という用語は、RNAと、cDNAを含むDNA、ゲノムDNAおよび合成塩基（例えば、化学的合成）、PNAのように他のポリマーに結合した塩基も含んでいる。

【0118】

本発明は、適度にストリンジェントな条件において、本発明の前記核酸に対してハイブリダイズする変異体も含んでいる。

【0119】

一般的に、ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、オリゴヌクレオチドと所望の標的分子との間における二本鎖分子（完全なハイブリッド）のみが形成される、または、所望の標的有機体のみが検出される、反応条件を参照する。特に、この観点におけるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、65℃で、0.2×SSC（0.03M NaCl、0.003Mクエン酸ナトリウム、pH7）のことである。短い断片、例えば、20ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドの場合、前記ハイブリダイゼーション温度は65℃以下、例えば、55℃より高く、好ましくは、60℃より高い。どのような場合でも65℃以下である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション温度は、ヌクレオチドのサイズまたは長さ、および、ヌクレオチドの組成のそれぞれに依存し、マニュアル化された実験により、当業者により決定できる。適度にストリンジェントな条件とは、例えば、42℃、および、42℃で0.2×SSC/0.1%SDSで洗浄することにより達成できる。

【0120】

前記それぞれの温度条件は、選択した実験的条件に依存して異なり、また、試験する核酸サンプルに依存する。この場合、適切に調節する必要がある。前記ハイブリダイゼーション産物の検出は、例えば、放射ラベルされた分子の場合、オートラジオグラフィーにより、または、蛍光標識された分子が使用された場合は、蛍光定量法により行われ得る。

【0121】

当業者は、実際に適度にストリンジェントな条件を達成し、特異的な検出方法が可能になる、それ自体公知の方法において、選択された実験方法に対する条件を適応できる。適度にストリンジェントな条件は、例えば、参考となるハイブリダイゼーションの方法により決定できる。適した核酸またはオリゴヌクレオチド濃度で使用する必要がある。前記ハイブリダイゼーションは、適した温度（より高い温度にすれば、ハイブリッドの結合は弱まる）で行う必要がある。

【0122】

第2の側面において、本発明は、既知の配列の成分（I）で開始される前述で定義した複合体の調製方法に関し、下記工程を含む。

タンパク質の空間構造の分析による、カップリングに適したアミノ酸残基、好ましくは、リガンドとの（I）の相互作用の表面の外側のアミノ酸残基の同定；
適したカップリング試薬によるカップリングパートナーの活性化；
カップリング反応の実行；
複合体の単離；および
複合体の両成分の機能性の検出

【0123】

カップリングに適したアミノ酸残基が同定されていない既知配列の成分（I）から開始される本発明の複合体の調製のための改良された方法であり、下記工程を含む。

置換、挿入または融合によるカップリングに適したアミノ酸残基、好ましくは、リガンドとの（I）の相互作用の表面の外側表面に曝されるアミノ酸残基の導入；
導入されたアミノ酸残基の露出度の検出；
この方法により変化させた成分（I）の機能性の検出；
適したカップリング試薬によるカップリングパートナーの活性化；
カップリング反応の実行；

10

20

30

40

50

複合体の単離；および

複合体の両成分の機能性の検出

【0124】

カップリング方法等のより詳細な説明は、上記を参照。

【0125】

第3の側面によれば、本発明は、前述の方法により調製される複合体を提供する。

【0126】

さらに、本発明は、上記で規定した複合体を含む診断キットを含む。

【0127】

本発明の他の側面は、本発明の複合体および薬学的に許容されるキャリアを含む薬学組成物である。

10

【0128】

前記薬学組成物において、複合体は、疾病の治療または少なくとも緩和のための投与において、適切なキャリアまたはキャリア物質と混合される。このタイプの組成は、（前記活性剤および前記キャリアに加えて、）賦形剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定剤、可溶化剤、および、技術分野で周知の他の物質を含んでもよい。前記“薬学的に許容される”という用語は、活性成分または活性薬のそれぞれの生物学的活性の有効性を損なわない無毒な物質と規定する。前記キャリアの選択は、投与経路に依存する。

【0129】

前記薬学的組成物は、付加的に、前記活性剤の活性を強める、もしくは、活性を補う別の成分を含んでもよく、または、治療において、それらを用いても良い。このような付加的な要因および/または物質は、前記薬学的組成物に、相乗的な効果を達成するため、または、副作用もしくは有害作用のそれぞれを最小化するために含まれてもよい。

20

【0130】

本出願の複合体の形成、調製、および、投与のための技術は、それぞれ、“Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA, (最新版)において見出される。さらに、治療に効果的な量は、症状の改善、例えば、処置、治療、予防またはこのような状態の改善等を達成するのに十分な化合物量に関する。適切な投与経路は、例えば、経口、直腸、経粘膜または腸管投与ならびに筋肉内、皮下、髄内注射、および、くも膜下腔内、直接的な脳室内、静脈内、腹腔内もしくは鼻腔内注射を含む非経口投与を含む。中でも、患者への静脈内投与が、好ましい。

30

【0131】

他の側面によれば、本発明は、ここで規定した複合体の使用、診断、治療および親和性クロマトグラフィーにおけるキットまたは組成の使用に関する。

【0132】

カップリング方法が提示され、それに加えて、親和性クロマトグラフィーにおける複合体の使用を含む複合体の種々の応用を可能にするデータも得られた。この使用のための例は、アフィニティークロマトグラフィーによる抗体精製および血漿タンパク質、成長因子またはインフルエンザワクチンの精製、ならびに、遺伝子工学により調製されたアフィニティタグを有するタンパク質の精製のため、ならびに、エンドトキシンおよびアルブミンのそれぞれの減少のための、プロテインAの交換である。さらに、マトリクスに対するカップリングにより、血液血漿交換またはバイオレメデーションへの使用が考察できる。

40

【0133】

使用の他分野は、診断である。この点において、細菌またはウイルス感染のための血液バンクのスクリーニング、もしくは、ELISAのような古典的な検出技術、または、Luminexシステムのような新規技術開発においての使用が、考察できる。治療だけでなく診断において、このような複合体は細胞分離に使用可能である。

【0134】

治療において、本発明の複合体の使用が可能であり、特に、輸送分子として一般的に使

50

用できる。治療における他の応用は、本発明のポリペプチド分子による方向性ターゲティングにおける遺伝子治療、遺伝子輸送の系のためのカップリングである。方向性のあるターゲティングや細菌毒性に対するカップリングにより、治療における免疫毒性としての使用が、良好に得られるであろう。

【0135】

下記において、本発明は、複数の図および付随の例示に関して説明されているが、これらの図および例示は、単に本発明を図示するだけであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

【0136】

ヒト -II- クリスタリンライブラリからの、IgG Fcおよびp r o N G Fに結合するA f f i l i n (商標) 変異体の選択、発現および精製

【0137】

ヒト - クリスタリンライブラリC R 2 0 から始まり、選択工程は、ファージディスプレイシステム法により行った。最初の1ラウンドで、単一ファージE L I S Aにおいて、IgG Fcに対する特異的な結合を示す複数のA f f i l i n (商標) 変異体を選択および単離できた。ここで用いられる“A f f i l i n (商標)”という用語は、本発明の複合体におけるポリペプチド分子成分に相当し、ユビキチンまたは - クリスタリンに基づき、且つ、野生型と比較してリガンドに対する特異的な結合のための変化された結合特性を有する。p E T 2 0 b 発現ベクター (Novagen社) への遺伝子のクローニングに続き、E . c o l i (B L 2 1 (D E 3)、Stratagene社) において、A f f i l i n (商標) 変異体を組換え法により過剰発現させ、続いて、2種類のクロマトグラフィー工程 (I M A C およびゲルろ過) により精製した。タンパク質濃度依存E L I S A およびB i a c o r e 検査で、n M 範囲において解離定数を有するIgG Fcに対する特異的な結合を決定できた。

【0138】

IgG Fcに結合するA f f i l i n (商標) 変異体を選択するため、1 mLのC R 2 0 ライブラリ (6.5×10^{10} cfu) を、1 Lの2 x Y T 培地 (2% グルコースおよび100 μ g / mL アンピシリンを含有) において、37 °C、220 rpmで、OD₆₀₀ が0.4の吸光度に達するまで培養した。その後、前記細菌培養液に、感染用ヘルパーファージM 1 3 K O 7 (Invitrogen社、カールスルーエ、ドイツ) を10倍量過剰量添加して、1時間、37 °C、100 rpmで培養した。それから、前記細菌の懸濁液を、20分間、1000 x gで遠心し、そのペレットを、1 Lの2 x Y T 培地 (8 mM G S H、100 μ g / mL アンピシリンおよび50 μ g / mL カナマイシンを含有) に再度懸濁させた。

【0139】

ファージの産出またはファージの放出を、それぞれ、30 °C、200 rpmで一晩行った。前記ファージの単離には、Kay, Winter & McCafferty (1996) に記載されたプロトコールを使用した。

【0140】

1 mLの単離ファージ (1.4×10^{14} cfu) を、1 mLの6% B S A (P B S 中) を用いて、1時間、室温 (R T) でブロックした。一方、マイクロタイタープレート (N U N C 社) の10ウェルを、10 μ g / mL (P B S 中) モノクローナルIgG Fc (R o c h e 社) 溶液100 μ Lを用いて、常温で一晩コートし、P B S (0.1% T w e e n 2 0 含有) を用いて3回洗浄した。その後、各ウェルにおける未結合部位を、300 μ LのP B S (3% B S A、0.5% T w e e n 2 0 含有) を用いて、2時間、常温でブロックした。続いて、P B S (0.1% T w e e n 2 0 含有) を用いて3回ウェルを洗浄した。ウェル当たりブロックされた前記ファージを100 μ L添加した後、1時間、常温、20 rpmでインキュベートした。未結合または弱い結合のファージを、それぞれ、2 x P B S を用いて2回、2 x P B S (3% B S A 含有) を用いて2回、最

10

20

30

40

50

後に、2 × P B Sを用いて2回、洗浄することにより除去した。残った結合ファージを、ウェル当たり100 μ Lの100 m M トリエチルアミンを添加し、10分間、室温でインキュベートすることにより溶出した。基本培地に溶出された前記ファージの中和ため、これに(計1 m L)に500 μ Lの1 M T r i s / H C l (p H 7 . 4)に添加した。引き続き、前記ウェルをP B Sを用いて3回洗浄した。

【0141】

トリエチルアミンを用いた溶出にもかかわらず、マイクロタイタープレートに強固に結合したファージを、再感染のために、直接、X L 1 - b l u eの対数増殖期の細菌培養液(O D ₆₀₀ = 0 . 4) 100 μ Lを用いて、30分間、37 °Cでインキュベートした。基本培地中に溶出された前記ファージを用いたX L 1 - b l u eの再感染のために、750 μ Lの中和溶出液を、9 m LのO D ₆₀₀ = 0 . 4のX L 1 - b l u eと共に、30分間、37 °Cでインキュベートした。その後、基本培地に溶出したファージに再感染した菌体と、強固にファージが結合した再感染菌体とを混合し、S O B A G培地(アンピシリン含有)を含む16 × 16 c mのプレートに蒔き、37 °Cで一晩培養した。パニング工程の後、約2000のクローンが得られた。これらを、約12 . 5 m Lの2 × Y T培地(20%グリセロール含有)から採取し、-80 °Cで保存した。

10

【0142】

単一のファージを培養するために、パニングの第1ラウンドで得られた細胞プールを、選択培地(S O B A G)に蒔き、37 °Cで一晩培養した。前記S O B A Gプレートから、92個の単一のクローンを、ウェル当たり2 m Lの2 × Y T培地(2%グルコースおよび100 μ g / m Lのアンピシリン含有)を含む24 × 5 m Lディープウェルプレートに移し、37 °C、180 r p mで一晩培養した。加えて、プレートあたり、ファージミドベクター内にヒト野生型 - クリスタリン遺伝子を含む1つの単一のコロニー(X L 1 - b l u e)を、コントロールとして用いた。ウェル当たり2 . 5 m Lの2 × Y T培地(2%グルコースおよび100 μ g / m Lのアンピシリン含有)を含む滅菌24 × 5 m Lディープウェルプレートで、それぞれ、一晩培養した培養液の種菌1%と共にインキュベートし、細菌培養液を37 °C、180 r p mで、O D ₆₀₀が約0 . 4に達するまで培養した。その後、前記培養液を、ウェル当たり2 . 5 μ LのヘルパーファージM 13 K O 7 (10¹³ c f u / m L)を用いて感染させ、1時間、37 °C、100 r p mでインキュベートした。それから、細菌を遠心によりペレット化し、上清を除き、前記ペレットを、ウェル当たり2 . 5 m Lの2 × Y T培地(8 m M グルタチオン、100 μ g / m Lアンピシリンおよび50 μ g / m Lカナマイシン含有)に再懸濁し、30 °C、200 r p mで一晩培養した。ファージが含まれる上清を得るために、プレートの遠心を、4600 r p mで行った。前記ファージの沈殿およびペレット化を、K a y , W i n t e r & M c C a f f e r t yに記載の方法で行った。そして、前記ファージペレットを、約200 μ LのP B S(3% B S A含有、p H 7 . 4)に再懸濁した。この手順により、前記ファージを濃縮し、その後、E L I S Aに用いた。

20

30

【0143】

この目的のために、N U N Cプレートのウェルを、100 μ L抗原溶液(それぞれ、10 μ g / m LヒトのモノクローナルI g G F cまたはB S A)を用いて、4 °Cで一晩コーティングした。翌日、E L I S Aプレートを、ブロッキングバッファー(P B S、3% B S A、0 . 5% T w e e n 20、p H 7 . 4)を用いて、2時間、室温でインキュベートした。洗浄バッファー(P B S、0 . 1% T w e e n 20、p H 7 . 4)を用いて前記ウェルを洗浄した後、前記ブロッキングしたファージ調製液100 μ Lを、それぞれ前記ウェルに加え、1時間、室温でインキュベートした。洗浄バッファー(P B S、0 . 1% T w e e n 20、p H 7 . 4)を用いて、前記ウェルを洗浄した後、モノクローナル抗M 13抗体(P O D複合体; M o B i T e c社、ゲーチンゲン)を、P B S(p H 7 . 4(100 μ L / ウェル))で1 : 5000に希釈して添加し、再度、1時間、室温でインキュベートした。その後、前記ウェルを、洗浄バッファー(P B S、0 . 1% T w e e n 20、p H 7 . 4)を用いて3回、および、P B Sを用いて3回洗浄し、T M B P l u s (K

40

50

ementec社、デンマーク)を用いて呈色反応を開始した(100 μ L/ウェル)。20分後、前記呈色反応を、0.2M硫酸の添加により停止した。得られた黄色を450nm(参照波長:620nm)で測定し、記録した。

【0144】

モノクローナルIgG Fcへの結合に関し、明らかなシグナルを示し、かつ、BSAに対する検出可能な結合をほとんど示さないファージ調製液から、-II-クリスタリン変異体遺伝子を、プライマーpCAN700を用いて配列決定した。結果として、その中から3つのクローンSPC1-A1、SPC1-A7およびSPC1-G3を、pET20b発現ベクター中に、NcoIおよびBstEIIの制限酵素部位を用いてサブクローニングし、発現株BL21(DE3)、pUBS520(Stratagene社)に導入した。

10

【0145】

前記菌体を、2xYT培地(100 μ g/mLアンピシリンおよび50 μ g/mLカナマイシン含有)において、OD₆₀₀が0.6~0.8の吸光度になるまで、37、200rpmで培養し、その後、組換えタンパク質の発現を、IPTG(終濃度1mM)で誘導した。30、200rpm、4時間の培養後、細胞を遠心(6000xg、20分間、4)により回収した。細胞破碎を、NPI-10バッファー(Qiagen社)中、5mM -メルカプトエタノールの存在下、リゾチーム(0.1mg/mL)法、および、超音波(6x15秒、氷を用いた冷却下)により行った。遠心(40,000xg、30分間、4)後、上清をIMACカラム(HiTrap Chelating HP、Amersham Bioscience社)に添加し、NPI-20(Qiagen社、+5mM -メルカプトエタノール)を用いて洗浄した(カラムの20倍量)。溶出は、NPI-500(Qiagen社、+5mM -メルカプトエタノール)を用いたリニアグラジエント(直線勾配)により行った(カラムの30倍量)。-II-クリスタリンを含む画分を、SDS-PAGE法により分析し、各画分をプールし、ゲルろ過カラム(1.6x60、Sephadex75、Amersham Bioscience社)に添加した。PBSを、流速0.75mL/分で、ランニングバッファーとして用いた。ゲルろ過分析は、SDS-PAGE法により行い、-II-クリスタリン含有画分を混合し、4で保存した。この精製工程の後、Affilin(商標)変異体は、95%以上の純度であった(SDS-PAGE)。

20

30

【0146】

前記精製タンパク質の結合特性を、前述の濃度依存ELISAにおいて、直ちに試験した。この目的のため、異なる濃度(100nM~10 μ M)のAffilin(商標)変異体を用い、抗-II-クリスタリン抗体(PODとのモノクローナル抗体複合体)を、検出抗体として用いた。試験した全3種類のAffilin(商標)変異体は、ヒトIgG Fcに対する特異的結合を示し、BSAまたはマイクロタイタープレートへの非特異的な結合は、検出されないことがわかった。コントロールとして用いた前記ヒト野生型-II-クリスタリンは、IgG Fc、BSAまたはマイクロタイタープレートに対する結合を示さなかった。

【0147】

BIACORE試験において、前記3種類のAffilin(商標)変異体の解離定数を測定した。この目的のために、約180RUのヒトIgG Fc(50mMクエン酸ナトリウム中50 μ g/mL、pH5.0)を、CM5チップに固定化した。未結合部位を、最終的に1Mエタノールアミン(pH8.5)により不活性化した。

40

【0148】

それから、流速30 μ L/分で、6つの異なる濃度(166nM~1 μ M)を、前記チップに180秒間通過させた。その後、前記チップを0.005%界面活性剤P20(Biacore社)を含むHBSを用いて、同じ流速で180秒間洗浄した。Biaevaluation Software(Biacore社、ウプサラ、スウェーデン)を用いて得られたセンサーグラムから、IgG Fcに対するAffilin(商標)変異体

50

の解離定数を決定した (SPC1-A1: 230 nM、SPC1-A7: 280 nM および SPC1-G3: 800 nM)。競合実験において、IgG Fc に対する前記 Affilin (商標) 変異体の特異的結合は検出されたが、前記チップマトリックスに対する結合は検出されなかった (図 2)。

【0149】

前記変異体 SPC1-A1、SPC1-A7 および SPC1-G3 の選択と類似の方法により、標的分子 proNGF に対する Affilin (商標) 変異体 SPC7-E9 を単離した。解離定数を、1~6 nM の範囲で、BIACORE-Mussungen 法により決定することができた (図 3)。

【実施例 2】

【0150】

ヒトユビキチンライブラリ (UB10) からの、システインノットタンパク質に対する Affilin (商標) 変異体の選択、発現および精製

【0151】

新たに生じた結合親和性を有する修飾タンパク質の選択のための合成ユビキチン遺伝子の提供

【0152】

例えば、Sambrook et al (1989) のように当業者に公知の標準プロトコールによって、遺伝子工学の研究を行った。

【0153】

人工結合タンパク質の調製の開始点として、置換 Ile44Ala、Lys48Arg、Arg54Leu、Val70Ala、Arg72Leu、Gly75Ala、および、欠失 Gly76 を有する修飾ユビキチン足場タンパク質の DNA 配列 (Seq ID NO: 2) を調製するために、下記工程を行った。遺伝子合成のため、PCR 反応を 50 μ L の容量で行った。これには、遺伝子の塩基対配列で表される 6 種類のオリゴデオキシヌクレオチド (それぞれ 0.1 μ M Seq ID NO: 26、Seq ID NO: 27、Seq ID NO: 28、Seq ID NO: 29、Seq ID NO: 30、Seq ID NO: 31) 各 2.5 μ L を含み、合成される遺伝子が鑄型として存在する。使用した前記オリゴデオキシヌクレオチドの配列は、それぞれ、約 15 塩基対によりそれらの 3' 末端および 5' 末端が交互にオーバーラップする 40~50 塩基対の長さの人工遺伝子の、翻訳 DNA 鎖ならびに非翻訳 DNA 鎖の領域に相当する。さらに、前記試料は、2.5 μ L の各フランキングプライマー (Seq ID NO. 32、Seq ID NO. 33; 10 μ M)、5 μ L の 10x Taq バッファー (100 mM Tris / HCl pH 9.0、500 mM KCl、1% (v/v) Triton X-100)、3 μ L の 25 mM MgCl₂ および 4 μ L の dNTP 混合物 (各 2.5 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP) を含む。水を充填した後、前記反応試料を、変性のために、サーモサイ클ラーにより、2 分間、94 °C で加熱した。それから、2.5 U の Taq ポリメラーゼ (Promega 社) を加熱中に添加 (加熱開始) し、PCR プログラムを開始した。インキュベーションは、それぞれ、94 °C で 1 分間、55 °C で 1 分間、72 °C で 1.5 分間を、25 サイクル行った。最後のインキュベーションを、72 °C で 5 分間行った。

【0154】

所望の PCR 産物を、分析アガロースゲル電気泳動法により同定し、MinElute Reaction Cleanup キット (Qiagen 社) を用いて、前記試料から精製した。単離した DNA 1.0 ng を 2 回目の増幅の鑄型として使用し、前記 2 回目の増幅を、Pfu ポリメラーゼ (Promega 社) を用いて、50 μ L の容量で行った。この目的のために、5 μ L の提供 10x Pfu バッファー (200 mM Tris / HCl pH 8.8、20 mM MgCl₂、100 mM KCl、100 mM (NH₄)₂SO₄、1% (v/v) Triton X-100、1 mg/mL BSA) および 4 μ L の dNTP 混合物を用い、水で充填した。さらに、前記試料は、適切な制限酵素部位の導入のためのフランキングプライマー (Seq ID NO. 32、Seq ID NO. 3

10

20

30

40

50

3 ; 10 μ M) を含む。所望のPCR産物を、調製アガロースゲル電気泳動法により単離し、クローニングベクターpCR (商標) 4 Blunt - TOPO (商標) に、Zero Blunt (商標) TOPO (商標) PCRクローニングキット (Invitrogen社) を用いて、メーカーの説明書に従って挿入した。供給された化学的コンピテントセルを、対応する連結反応試料を用いて形質転換し、LB / amp / kan培地のアガプレート上にまいた。前記プレートを、16時間、37 で培養し、生育したコロニーについて、所望の連結産物の分析を行った。この目的のため、プラスミドDNAを、Qiagen社のプラスミド単離キットを用いて、メーカーの説明書に従って、ミニスケールで調製し、前記フランキングプライマー法により前記PCR産物に導入された認識配列に対して、Nde IおよびXho I DNAヌクレアーゼ (New England Biolabs社) を用いた制限消化を行った。期待された切断パターンを示すプラスミドを用いて、Taqポリメラーゼにより挿入された遺伝子カセット領域内のDNA配列分析を行った。この目的のために、メーカーの説明書に従って、Cycle Reader (商標) AutoDNA Sequencing kit (Fermentas社)、0.5 μ g プラスミドDNAおよび1.0 pmol 各蛍光標識プライマーを用いた。新たに合成されたDNA鎖を、ポリメラーゼ反応中に標識し、ジデオキシヌクレオチドの取り込みによる塩基特異的な方法により、統計的に終結させた。それから、結果的に得られた蛍光DNA断片を、ポリアクリルアミド - 尿素ゲル電気泳動により、LiQuorシーケンシング装置において分離し、隣接するレーンにおけるACGTのバンドパターンとして視覚化した。

10

20

【0155】

正確なDNA配列を有する遺伝子カセットを、調製用Nde I / Xho I制限消化により、クローニングベクターpCR (商標) 4 Blunt - TOPO (商標) から切り出し、調製用アガロースゲル電気泳動で単離した。ユビキチン変異体のライブラリ構築のため、修飾ユビキチン足場タンパク質の遺伝子の挿入を、対応するタンパク質産生用の発現ベクターpET20B (-) (Novagen社)、または、ファスミドベクターpMUBI - 1に行った。

【0156】

ユビキチン変異体のライブラリの調製

【0157】

前記合成ユビキチン遺伝子のN末端およびC末端それぞれにおける8つのコドンのランダム部位特異的変異誘発のため、2つ連続的PCR反応を行った。第1回目の増幅工程は、Pfuポリメラーゼ (Promega社) を用いて、10 x 50 μ Lの容量で行った。この目的のために、各試料当たり、供給10 x Pfuバッファー5 μ LのおよびdNTP混合物4 μ Lを使用し、水で充填した。さらに、各試料は、所望の塩基対置換の導入のため、フランキングプライマー (Seq ID No. 34、Seq ID No. 35 ; 10 μ M) を各2.5 μ L含む。非変異ユビキチン遺伝子を保有するために、テンプレートとして1.0 ngのpMUBI - 1を用いた。Pfuポリメラーゼ (上記参照) 2.5 Uを添加後、インキュベーションを、94 で1分間、60 で1分間、72 で1.5分間を25サイクル行った。最後のインキュベーションを、72 で5分間行った。使用したテンプレートDNAの選択的切断のため、反応試料当たり10 UのDpn Iを添加し、37 で1時間インキュベートした。所望のPCR産物を、調製用アガロースゲル電気泳動法およびQIAquick gel extraction kit (Qiagen社) により単離した。

30

40

【0158】

第2回目の増幅工程は、1000 μ Lの試料容量で行い、前記1回目のPCR反応で得られた産物約1.0 ngおよびTaqポリメラーゼを用いた。前記反応試料を、ピペットで20倍容量に調節した。上記の詳細は、10 x Taqバッファー、25 mM MgCl₂、dNTP混合物、および、5'末端がビオチン化され且つSfi Iエンドヌクレアーゼ用認識配列を保有する互いに共通しないフランキングプライマー (Seq ID No

50

. 36、Seq ID No. 37; 10 μ M) からなる。水で充填した後、2.5 U の Taq ポリメラーゼを加熱下で添加 (上記参照) し、PCR プログラムを開始した。インキュベーションは、94 で1分間、60 で1分間、72 で1.5分間を、25 サイクル行った。最後のインキュベーションは、72 で5分間行った。

【0159】

得られた増幅産物の切断は、PCR 反応試料において直接行った。この目的のため、総容量 4000 μ L において、完了した PCR 反応溶液を、同量の供給 10x buffer II (100 mM Tris/HCl pH 7.9、100 mM MgCl₂、500 mM NaCl、10 mM ジチオスレイトール含有)、10x BSA 溶液および水と混合した。さらに、4000 U の制限酵素 Sfi I (New England Biolabs 社) を添加し、16 時間、50 でインキュベートした。MinElute Reaction Cleanup キット (Qiagen 社) を用いて、前記試料から DNA を単離し、400 μ L の滅菌水に懸濁した。Sfi I に切断されなかった前記 PCR 産物の分離のため、前記単離 DNA を、表面にストレプトアビジンが結合した磁力ビーズ (“Dynabeads Kilobase Binder”) 1.0 mg/mL を含む同量の “Binding Solution (DynaL 社) と混合し、室温 (RT)、4.5 時間、ローラーミキサー上でインキュベートした。任意に存在するビオチン化 DNA に結合した前記ビーズは、沈殿するが、Sfi I により完全に切断された DNA は、ビオチン化末端を持たず、上清に残るはずであった。一晚沈殿させた。結果的に得られた Sfi I により切断され且つ所望の部位で変異誘発されたユビキチン遺伝子を、滅菌水に溶解し、QIAquick PCR Purification kit (Qiagen 社) を用いて脱塩した。前記遺伝子は、最終的に水中で 200 fmol/ μ L の濃度であった。

10

20

【0160】

レシピエントベクターの調製のため、前記プラスミド pMUBI-1 を、メーカーの説明書に従って Sfi I により切断し、長い方の (ベクターの) 断片を、調製用アガロースゲル電気泳動法および QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen 社) により単離した。分子内の連結を避けるために、5' 末端を脱リン酸化した。この目的のため、0.5 U のエビ (Pandalus borealis) 由来アルカリフォスファターゼおよび前記供給バッファーを、総容量 200 μ L で使用した。前記混合物を、90 分間、37 でインキュベートし、DNA を、前記試料から、QIAquick PCR Purification kit (Qiagen 社) を用いて単離し、QIAquick PCR Purification kit を用いて脱塩した。最終的に、前記ベクター断片の DNA は、水中で、50 fmol/ μ L の濃度であった。

30

40

【0161】

連結のため、1.6 pmol の前記 PCR 断片および 8.0 pmol の pMUBI-1 のベクター断片を、2 U の T4 DNA リガーゼ (Gibco BRL 社) の存在下、総容量 1600 μ L (50 mM Tris/HCl pH 7.6、10 mM MgCl₂、1 mM ATP、1 mM DTT、5% (w/v) PEG-8,000) において、3 日間、16 でインキュベートした。65 で15分間、前記試料を加熱した後、前記 DNA を沈殿させた。この目的のため、100 μ L の前記各反応溶液に、100 μ L のエタノールおよび 10 μ L の NaAc (5 M、pH 3.0) を混合し、16 時間、-20 で保管した。続いて、遠心 (60 分間、12500 \times g) を行い、前記サンプルをエタノール (70% v/v、-20) で洗浄し、再度遠心し、最終的に沈殿した DNA を 60 μ L の滅菌水に溶解した。

【0162】

エレクトロポレーションのために、Gene Pulser (商標) II システム (BioRad 社) および 1.0 mm の電極間隔を有するキュベット (Biozym 社) を、4 の冷温室で使用した。前述の上記で得られた各溶液 3.5 μ L を用いて、エレクトロコンピテント E. coli XL1 Blue (Stratagene 社) を、メーカーの説明書に従って形質転換した。得られた細胞懸濁液を、LB/クロラムフェニコール培地の

50

アガープレート(20×20cm)5枚に蒔いた。これらのプレートを、16時間、37で培養し、生育したコロニーを計測した。それに伴い、構築したライブラリには、独立した 2.8×10^7 種類のクローンが含まれており、前記ライブラリにおいて通常の10,000倍である。それから、前記コロニーを、10%(v/v)グリセロール含有SOC培地(総量100mL)に採取し、そのうちの1.0mLを-80で保存した。得られたクローン(12のランダムに選択したクローン)から、Qiagen社より購入したDNA Miniprep kitを用いて、ファスミドベクターを単離し、DNA配列を、変異誘発されたユビキチン遺伝子の領域について分析した。これらのクローンの全てが、機能的な配列を示した。すなわち、挿入または欠損による読み枠シフトを示さず、変異誘発させた部位において、質的に完全に異なる置換を示した。変異誘発させた領域外におけるランダム置換は、存在しなかった。

10

【0163】

ヒトユビキチンに基づくこのライブラリの基礎において、選択は、実施例1と同様に、当業者に公知の前記ファージディスプレイシステム法により行った。小さな修飾は、単に、使用した抗生物質(アンピシリンの代わりにクロラムフェニコール)の選択に関して導入された。

【0164】

システインノットタンパク質のファミリー由来の成長因子を、標的として用いた。前記ユビキチンAffilin(商標)SPU11-3-A1は、ELISAにより決定されたように、nM範囲の解離定数を有し、前記BIACOREシステムにおけるカップリング研究に使用した。

20

【0165】

選択された変異体の1つであるSPU11-3-A1を、制限酵素部位NdeIおよびXhoIを用いて、pET20b発現ベクターにクローン化した。培養条件および精製工程は、実施例1において述べたSPCAffilin(商標)に用いたものと同様であった(IMAC、ゲルろ過)。結合特性の検出のために、濃度依存ELISAを行った。この目的のため、Affilin(商標)変異体を異なる濃度(10nM~1μM)で、前記標的分子でコートしたマイクロタイタープレート(以下、MTP)に添加し、ポリクローナル抗ユビキチン抗血清(Sigma社)を1次検出試薬として用いた。室温でインキュベーション(1時間)後、前記MTPのウェルをPBSで3回洗浄し、2次工程において、PODを有するモノクローナル抗体複合体(抗IgG、Sigma社)を検出抗体として用いた。試験したAffilin(商標)変異体は、ヒトNGFに対する特異的な結合を示すこと、および、BSAまたは前記マイクロタイタープレートに対する非特異的な結合が検出されないことがわかった。コントロールとして用いたヒト野生型ユビキチンは、NGF、BSAまたは前記マイクロタイタープレートへの結合を示さなかった。

30

【実施例3】

【0166】

異なる分子に対する選択的なカップリングのためのシステイン含有ペプチドリンカーとの、Affilin(商標)のC末端融合

【0167】

IgGFcに結合する前記Affilin(商標)変異体SPC1-A7が、C末端システインを介して異なる分子に選択的に結合できたことを、下記の実施例において説明する。

40

【0168】

7つのシステインが、前記タンパク質内部に局在することに加えて、使用したAffilin(商標)変異体SPC1-A7は、溶液-接近性(露出性)であり且つ遊離したシステインを可変性部位4において有している。まず、この部位を、QuickChange(商標)PCRを用いてセリンに置換した。この修飾Affilin(商標)(SPC1-A7BB)から開始して、2つのグリシンおよび1つのシステイン、ならびに、既に存在する6つのヒスチジンに加えて4つの別のヒスチジンを、QuickChange(商標

50

) PCR法により、C末端に挿入した。10個のヒスチジンを伸張した親和性タグの目的は、改良された精製を可能にすることである。E l l m a n n ' s 試薬を用いた滴定試験は、前記導入されたシステインが、A f f i l i n (商標) 変異体に存在する他のシステインによるシステイン混合現象のため、カップリング実験に不適切であることを示していた。この理由のために、前記システインを、DNAレベルでセリンに置換し(TCT)、この構築物から開始して、新たなシステインをG l y 4 S e r リンカーの後に導入した。このことは、前記タンパク質におけるシステインからの前記挿入システインの距離を長くし、且つ、システイン混合を抑制する。最終的に、得られた構築物を配列決定し、E l l m a n n ' s 試薬を用いた滴定試験がカップリング試験に適していることを示した。

【0169】

前記A f f i l i n (商標) 変異体S P C 1 - A 7の部位4におけるセリンによるシステインの置換のため、Q u i c k C h a g e (商標) PCR法(S t r a t a g e n 社、ラジヨラ、アメリカ)を、プライマーA 7 C y s 4 S e r __フォワードおよびA 7 C y s 4 S e r __リバースと共に用いた。PCR反応のため、5 μ Lの10 \times 反応バッファー(100mM KCl、100mM (NH₄)SO₄、200mM Tris-HCl、pH 8.8、20mM MgSO₄、1% Triton(商標)X-100、1mg/mL BSA)、各125ngの2種類のプライマー、1 μ LのPfu Turbo DNAポリメラーゼ、1 μ L dNTP混合物および水を、総容量50 μ Lで用いた。pET20bベクターのA f f i l i n (商標) 変異体S P C 1 - A 7の遺伝子を、テンプレートDNAとして用いた。95 $^{\circ}$ Cで3分間の1回目の変性工程により反応を開始し、変性、プライマーアニーリングおよび合成を18サイクル繰り返した。95 $^{\circ}$ Cでの変性を30秒間行い、前記プライマーアニーリングは、60 $^{\circ}$ Cで1分間行った。合成工程の時間を、68 $^{\circ}$ Cで5分間とした。PCRの最後に、68 $^{\circ}$ Cで5分間の最終合成を行った。増幅は、アガロースゲル電気泳動によりモニターした。増幅に成功した後、使用したテンプレートDNAの制限消化を、制限酵素DpnIにより行った。1 μ Lの前記酵素(10U/ μ L)を前記PCR試料にピペットで加えて混合し、1時間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。それから、前記ベクターを、エレクトロポレーション法により、コンピテント株(XL1-blue、Stratagene社)に導入した。この目的のため、1 μ LのDpnI処理制限試料(水中)を50 μ LのエレクトロコンピテントXL1-blue細胞にピペットで加えて混合し、氷冷したエレクトロポレーションキュベット(0.1mm)において、2.5kV、25 μ Fおよび200 Ω の条件でパルスした。細胞を1mLのSOC培地に再度懸濁し、60分間、500rpmの攪拌下、37 $^{\circ}$ Cで培養した。その後、細胞を選択培地(2 \times YT、100 μ g/mLアンピシリン)に蒔き、16時間、37 $^{\circ}$ Cで培養した。得られた12種類のクローンを、正しく挿入されているかを確認するために、pETTermプライマーを用いて、別々に配列決定した。前記正確なクローンのベクターを、C末端に2つのグリシンと1つのシステインと4つの付加的ヒスチジンを導入するために、次のQ u i c k C h a g e (商標) PCRのための鋳型DNAとして用いた。前述のように、2種類のプライマーA 7 G l y 2 C y s __フォワードおよびA 7 G l y 2 C y s __リバースを用いたQ u i c k C h a g e (商標) PCR後、DpnI消化およびエレクトロポレーション法によるXL1-blue株の形質転換を行った。正確な導入をコントロールするために、前記12種類のクローンのプラスミドを、再度配列決定した。前記正確なクローン(SPC-1A7JJ)のプラスミドを、プラスミドpUBS520を有するBL21発現株中に導入し、引き続いて、発現させた。さらに、前述のように(実施例1)、2回のクロマトグラフィー工程(Ni-NTAでの親和性クロマトグラフィーおよびSephadex 75でのゲルろ過)において、A f f i l i n (商標) 変異体S P C 1 - A 7 B Bを精製した。

【0170】

導入したシステイン残基の接触性を試験するため(Haber、1972)、全ての遊離SH基を、E l l m a n n ' s 試薬(DTNB溶液)法により滴定する。この目的のため、1mLのA f f i l i n (商標) 変異体S P C 1 - A 7 J Jのタンパク質溶液(10

10

20

30

40

50

0 mM Tris / HCl ; pH 8 . 0 中に 50 ~ 350 μ g のタンパク質) に、30 μ L の DTNB 溶液 (100 mM Tris / HCl ; pH 8 . 0 中に 4 mg / mL の DTNB) を添加した。30 μ L のバッファー (100 mM Tris / HCl ; pH 8 . 0) を加えた 1 mL のタンパク質溶液を、ブランク値 1 として用いた。30 μ L の DTNB 溶液を加えた 1 mL のバッファー (100 mM Tris / HCl ; pH 8 . 0) を、ブランク値 2 として用いた。前記試料を、15 分間、室温でインキュベートし、410 nm の吸光度を測定した。ブランク値 1 およびブランク値 2 の吸光度を、前記テストサンプルの吸光度から引き算した。得られた吸光度値から、遊離 SH 基のモル濃度を、DTNB - SH の吸光係数 ($\epsilon_{410}(\text{DTNB-SH}) = 13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いて計算し、使用したタンパク質濃度により割った。結果として、タンパク質分子当たりの遊離チオール基の数を得た。遊離システイン残基を、構築した Affilin (変異体) SPC1 - A7JJ 3 - 4 において、滴定できた。Affilin (商標) 変異体 SPC1 - A7__Cys4Ser を用いた滴定のコントロールにより証明されたように、前記タンパク質に存在するシステインが接触性でないため、1 つの遊離システイン残基が予測された。このことは、C 末端システインのシステイン混合が、タンパク質に埋められたシステインにより導入されたことを示し、そのため、タンパク質に導入されたシステインの距離が非常に短いことを示唆している。この理由のため、前記 Affilin (商標) 変異体 SPC - 1 - A7JJ の C 末端システインを、QuickChange (商標) PCR において、前述のプライマー A7Gly2Ser__フォワードおよび A7Gly2Ser__リバースを用いて、セリンに置換した。正確な導入の確認の後、この構築物を、システインに続いて Gly4Ser リンカーを導入するための PCR 用テンプレートとして用いた。プライマー Gly4SerCys HindIII および A7Cys4Ser Nde を用いて PCR を行った。PCR 反応のため、5 μ L の 10 x 反応バッファー (100 mM KCl、100 mM (NH₄)SO₄、200 mM Tris - HCl、pH 8 . 8、20 mM MgSO₄、1% Triton (商標) X - 100、1 mg / mL BSA)、各 125 ng の前記 2 種類のプライマー、1 μ L の Pfu Turbo DNA ポリメラーゼ、1 μ L dNTP 混合物および水を、総容量 50 μ L で用いた。さらに、前記プライマーの 2 次構造物を分離するために、2 μ L の DMSO を前記反応混合物に添加した。前述の手順と比較して、変性、プライマーアニーリングおよび合成の繰り返し工程を、プライマーアニーリング温度を 58 に代えて、25 回行った。この Affilin (商標) 変異体 (SPC1 - A7__Cys) の PCR 産物の増幅を、アガロースゲル電気泳動法により確認した。表 2 は、ここで述べた構築物の概要である (表 2)。プライマー A7Cys4Ser Nde は、酵素 Nde I 用の組み込まれた制限酵素部位を含んでおり、プライマー Gly4SerCys HindIII は、酵素 HindIII 用の組み込まれた制限酵素部位を含んでいる。そのことにより、精製、Nde I および HindIII で処理されるベクター pET20b 内の前記 2 酵素による制限の後、前記 PCR 産物の連結が可能となる。前記 2 種類の酵素による制限は、ダブルダイジェストで同時に行われる。この目的のため、約 1 μ g の Affilin (商標) 変異体 SPC1 - A7__Cys の PCR 産物、または、1 μ g のベクター pET20b を、それぞれ、1 μ L の前記制限酵素 Nde I (New England Biolabs 社、フランクフルト・アム・マイン、ドイツ、20 U / μ L) および 1 μ L の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社、フランクフルト・アム・マイン、ドイツ、20 U / μ L) ならびに 10 μ L の 10 x 反応バッファーである NEB バッファー 2 (50 mM NaCl、10 mM Tris - HCl、pH 7 . 9、10 mM MgCl₂、1 mM DTT) を用いて、総容量 100 μ L、4 時間、37 でインキュベートした。得られた断片を、調製用アガロースゲル電気泳動を介して別々に精製した。前記連結のため、20 ng の精製され Nde I / HindIII 処理されたベクター pET20 の断片、ならびに、120 ng の同様に処理された Affilin (商標) 変異体 SPC1 - A7__Cys の断片、2 μ L の 10 x 反応バッファー (300 mM Tris - HCl、pH 7 . 8、100 mM MgCl₂、100 mM DTT、10 mM ATP) および 0 . 5 μ L の T4 DNA リガ

ーゼ (Promega社、マンハイム、ドイツ、1~3 U/μL) を、総容量 20 μL で使用した。前記反応試料を、16時間、16 でインキュベートし、得られたベクターを、前述のように、XL-1 blue細胞にエレクトロポレーションにより導入した。遺伝子の正確な導入を、形質転換後に得られた12種類のクローンから、プライマー pET Termを用いた配列決定により検証した。引き続き、E. coli菌体 (BL21 (DE3)、+pUBS520) を、正確な配列を有する前記 Affilin (商標) 変異体 SPC1-A7__Cys のベクターを用いて形質転換した。前述のように、前記 Affilin (商標) 変異体 SPC1-A7__Cys の発現および精製の後 (実施例1)、前記遊離システイン残基を、Ellmann's 試薬の方法により、前記 Affilin (商標) 変異体 SPC1-A7__Cys について、再度滴定した。適切なパートナーに対する選択的なカップリングのため、タンパク質と十分な距離で、溶媒に接触可能なC末端システインの成功した導入の予測した確証として、1つのシステイン残基のみを検出することができた (表1)。この単一の接触可能なシステインの検出は、適切なカップリングパートナーおよびマトリクスに対する Affilin (商標) の選択的なカップリングのための基礎となる。

10

【0171】

C末端システインを有する Affilin (商標) SPU11-3-A1を提供するために、SPU11-3-A1遺伝子を、NcoIおよびXhoIの制限酵素部位を介して、Affilin (商標) SPC1-A7 (上記参照) のために修飾された pET20b にクローン化した。Affilin (商標) SPU11-3-A1__Cys の発現および精製は、SPC1-A7__Cys のための手順と同様である。

20

【実施例4】

【0172】

ペプチドリンカー (C末端システイン) を有する Affilin (商標) 変異体 SPC1-A7__Cys の結合特性の分析

【0173】

実施例3において精製した Affilin (商標) 変異体 SPC1-A7__Cys の結合特性を、濃度依存 ELISA で試験した。この目的のため、NUNCプレートのウェルを、100 μL の抗原溶液 (10 μg/mL ヒトモノクローナル IgG Fc 部位、Roche社) を用いて、4 で一晩コートした。翌日、ELISAプレートを、PBS (3% BSA、0.5% Tween 20) で、2時間、室温でブロッキングした。PBS (0.1% Tween 20) を用いてウェルを洗浄した後、前記修飾された Affilin (商標) を、濃度依存法 (濃度範囲: 10 μM ~ 0 μM) で、前記ウェルに添加し、1時間、室温でインキュベートした。PBS (0.1% Tween 20) を用いて別のウェルを洗浄した後、モノクローナル抗ヒトGC抗体 (POD-複合体; Biogenes社、ベルリン) を1:1000の希釈で添加し (50 μL/ウェル)、再度、1時間、室温でインキュベートした。その後、前記ウェルをPBS (0.1% Tween 20) で3回、およびPBSで3回洗浄し、TMB Plus (Kementec社、デンマーク) で呈色反応を開始した (50 μL/ウェル)。室温で20分間のインキュベート後、前記呈色反応を0.2 M 硫酸 50 μL/ウェル) の添加により停止した。得られた黄色を450 nm (参照波長: 620 nm) で検出し記録した (図4)。測定値の評価は、233 nMの見かけ K_D 値が明らかにした。この値は、非修飾の Affilin (商標) SPC1-A7 および SPC1-A7BB (280 nM) と、ほとんど同じである。従って、システインを含むペプチドリンカーを有する Affilin (商標) SPC1-A7 のC末端修飾は、変異体の結合能力に影響しなかった。

30

40

【実施例5】

【0174】

フィコエリスリン (PE) に対する IgG 結合 Affilin (商標) SPC1-A7__Cys の選択的なカップリング

【0175】

50

IgGにするAffilin(商標)SPC1-A7_Cysの活性化PEに対するカップリングを、下記のように行った。1mg/mLのSPC1-A7_Cys(PBS中)を、10mMDTTを用いて、30分間、室温で還元した。還元段階の間、PD-10カラム(Amersham Biosciences社製)を、カラムの5倍量のPBSで洗浄した。前記還元を行った後、過剰なDTTを分離するために、前記反応混合物を平衡化したPD-10カラムに添加した。この方法により、還元されたSPC1-A7_Cysを、マレイミド活性化フィコエリスリン(Prozyme社)に、5:1のモル比で加え、ゆるやかな攪拌下、1時間、室温でインキュベートした。その後、未反応の前記Affilin(商標)の遊離スルフヒドリル基を、NEM(N-ethylmaleimide)添加により、20分間、室温でブロックした。引き続き、前記反応混合物を、ゲルろ過(Sephadex S-200 HR)法により精製し、対応する画分を混合し、4℃で保存した。複合体の分析を分光学的に行った。この目的のため、250~750nmの範囲における吸光スペクトルを測定し、PEおよびAffilin(商標)の濃度を、決定または提供された吸光係数法により測定した。前記得られたAffilin(商標)とPEとの複合体(SPC1-A7_Cys_PE)について、IgG-Fcに対する結合特性を前記BIACOREで試験した。この目的のため、IgG-Fcに結合させたCM5チップを、ランニングバッファーとしてHBS-EPと共に、連続的な流れ30μ/Lで用いた。SPC1-A7_Cys_PEを異なる濃度で、次々に前記チップを通過させ、得られたセンサーグラムを、前記BIACORE evaluation Softwareを用いて分析した。肉眼的解離定数で $K_D = 10^{-7}$ Mから 10^{-8} Mに減少する結果となったカップリングにより、アビディティー効果が得られたことがわかった(図5)。

【実施例6】

【0176】

前記IgG結合Affilin(商標)SPC1-A7BBに対する蛍光染料Oyster(商標)556の非特異的なカップリング

【0177】

前記蛍光染料Oyster(商標)556(Molecular Probes社)を、前記IgG結合Affilin(商標)SPC1-A7BB(遊離システインを有さない)に結合させ、結合に関する試験を行った。

【0178】

カップリング工程を下記のように行った。10mMリン酸バッファー(pH8.5)中、1mg/mLのSPC1-A7BBを、前記蛍光染料Oyster(商標)556(20μLの無水DMFに溶解)に1:2のモル比で加え、30分間、室温でインキュベートした。前記カップリング反応を等量の10%グリセロール溶液の添加により停止し、前記試料をPD-10カラムと通して精製した。その後、カップリングの程度を分光学的に定量化した。この目的のために、複合体の濃度を280nmでの吸光法により決定し、提供された補正因子(Molecular Probes社)を用いて補正した。それから、カップリングの程度をOyster(商標)556および複合体の濃度の商(quotient)から求め、1分子Affilin(商標)/0.8分子Oyster(商標)であることを決定した。前記得られた複合体の結合能力の分析は、濃度依存ELISA(実施例1のように行った)およびBiacore測定により行った(図6)。Affilin(商標)SPC1-A7BBの結合能力が、前記蛍光染料Oyster(商標)へのカップリング後、影響されないことがわかった。

【実施例7】

【0179】

前記IgG結合Affilin(商標)SPC1-A7BBに対するホースラディッシュペルオキシダーゼ酵素(POD)の非特異的なカップリング

【0180】

Affilin(商標)変異体SPC1-A7BBは、非特異的に前記POD酵素に結

合された。結合試験は、A f f i l i n (商標)の結合活性およびP O Dの酵素活性を保持することを示した。前記複合体を、下記のプロトコールにより調製した。

【0181】

5 m gの凍結乾燥ホースラディッシュペルオキシダーゼ(P O D、S h g m a社)を250 μ Lの純水に溶解し、37.5 μ Lの0.1 M過ヨウ素酸ナトリウム溶液を加え、10分間、20 でインキュベートした。その後、25 μ Lのエチレングリコールを加え、さらに5分間、20 でインキュベートした。前記ペルオキシダーゼを、ゲルろ過(G 25、N A P - 5カラム)により純水で透析した。

【0182】

250 μ Lの精製A f f i l i n (商標)S P C 1 - A 7 B B (I M A C、ゲルろ過、4 m g / m L P B S)を、100 μ Lの0.1 M炭酸バッファー(p H 9.6)に加え、1 m gの活性化ペルオキシダーゼ(S i g m a社)を加えた(約100 μ L)。前記カップリング混合物を、攪拌下、2時間、20 でインキュベートした。その後、カップリング混合液1 m L当たり10 μ Lの0.5 M水素化ホウ素ナトリウムを加え、短時間で混合し、攪拌なしで、2時間、4 でインキュベートした。前記反応試料を、G 25カラムを用いて、P B Sに緩衝した。0.1%チオメルサル(R o t h)を保存のために添加した。ヒトI g Gに対する複合体の結合活性の試験を、以下のように行った。

10

【0183】

前記標識化A f f i l i n (商標)をP B S (0.5% B S A、0.05% T w e e n 20、0.01%チオメルサル)で希釈し、前記溶液を、ヒトI g G (10 μ g / m L、100 μ g / m L)でコートしたマイクタイタープレートに添加した。インキュベーション時間を、室温で1時間とした。その後、各ウェルを、それぞれ、250 μ LのP B S (0.1% T w e e n 20、0.01%チオメルサル)で3回洗浄し、100 μ LのT M Bを用いて10~20分間、室温で再度インキュベートした。反応は、100 μ Lの0.5 M硫酸の添加により停止させた。吸光(450 n m、参照として620 n m)をマイクロプレート測光器で測定した(図7)。P O D活性は、前記反応試料1:10,000の希釈まで検出でき、これはS P C 1 - A 7 B Bに対するP O Dの成功したカップリングを示す、コントロール測定により、シグナルを妨げる非結合P O Dを除外した。

20

【実施例8】

【0184】

マトリクスに対する - II クリスタリンおよびユビキチンに基づくA f f i l i n (商標)の特異的および非特異的なカップリング

30

【0185】

マトリクスに対するA f f i l i n (商標)のカップリングが、下記の方法により得られた。

- 1.) デキストランマトリクスに対するC末端システインを介したA f f i l i n (商標)S P U 3 - A 1 __ C y sのカップリング、
- 2.) B I A C O R Eシステムの前記デキストランマトリクスに対する第1級アミノ基を介したA f f i l i n (商標)S P C 7 - E 9のカップリング、および、
- 3.) E D C / N H Sによるポリメタクリル酸マトリクスに対するA f f i l i n (商標)S P C 7 - E 9の非特異的なカップリング。

40

【0186】

1.) B I A C O R Eシステムのデキストランマトリクスに対するS P U 3 - A 1 __ C y sのカップリングを、導入したC末端システインを介して、選択的に行った。この目的のため、デキストランマトリクスのカルボキシル基を、N H S / E D Cを用いて、接触時間2分間で活性化し、続いて、チオールカップリング試薬P D E A (0.1 Mホウ酸バッファーp H 8.5中に2-(2-ピリジニルジチオ)エタンアミン)を加えた。4分間の反応時間の後、精製されたS P U 3 - A 1 __ C y s (20 m Mリン酸バッファー、p H 6.0)を、この方法において修飾された前記デキストランチップに添加し、前記反応を7分間続けた。未反応P D E Aの不活性化を、50 m M L - システイン(1 M N a C l

50

)を用いて4分間行った。この方法により、350ユニット(RU)のSPU3-A1-Cysを前記チップ上に固定化でき、さらに反応速度分析に使用できた。反応速度測定の後、前記チップを、0.1グリシン(pH2.2)、6M Gua/HCl、6M尿素および20%エタノールを用いて再生した。この方法において、Affilin(商標)チップの結合活性は、20~30回の再生サイクル後でさえ変化しなかった(図8)。

【0187】

2.)さらに、以下の方法により、SPC7-E9を、前記BIACOREデキストランマトリクスのカルボキシル基に対して、NHS/EDC法により、表面に露出したアミノ基(リジン)を介して、非特異的に結合することができた。前記CM5チップを、7分間、NHS/EDCを用いて活性化し、その後、精製SPC7-E9(20mMリン酸ナトリウムバッファー、pH6.0)を、さらに、7分間、前記チップに通過させた。カップリングを行った後、残留した反応性基を、1Mエタノールアミン(pH8.5)を用いて7分間不活性化した。解離定数の分析のため、標的proNGFを異なる濃度で前記チップに通過させ、結合をオンラインでモニターし(図9)、続いて、曲線を前記BiaEvaluation Softwareを用いて評価した。この方法において、 K_D 値を1.4nMと決定できた。反応速度測定の後、前記チップを0.1グリシン(pH2.2)、10mM HCl、10mM NaOH、6M Gua/HCl、6M尿素および20%エタノールを用いて再生した。この方法において、前記Affilin(商標)チップの結合活性は、複数回の再生サイクル後でさえ変化しなかった。

10

【0188】

3.)精製SPC7-Eタンパク質(4mg)を、PD-10カラム(Amersham社)に通して、0.1Mホウ酸バッファー(0.5M Na₂SO₄、pH9)に緩衝させ、Fractogel(商標)EMD Epoxy(M)に結合させた。この目的のため、前記ゲル(0.5g)を、0.1Mホウ酸バッファー(0.5M Na₂SO₄、pH9)において、2時間、室温でインキュベートし、その後、このバッファーを用いて数回洗浄した。カップリング反応を前記エポキシマトリクスへのSPC7-E9の添加により開始し、24時間、室温で連続的に攪拌を続けた。コントロールとして、SPC7-E9を有しない標準カラムを用い、同様の方法で処理した。1Mエタノールアミン(pH9.5)により、前記反応を、48時間、室温で停止し、前記ゲルマトリクスを、酢酸ナトリウムバッファー(0.1M、pH4.0)、1M NaClおよびPBSを用いて(それぞれカラムの50倍量ずつ)洗浄した。この方法により産出された前記Affilin(商標)SPC7-E9親和性マトリクスをCカラム(Amersham Biosciences社、1x10cm)に充填し、クロマトグラフィシステム(Akta Explorer、Amersham Biosciences社)に連結した。全てのケースにおいて、PBS(0.5mM EDTA)を、ランニングバッファーとして、流速1mL/分で用いた。この方法において産出された前記Affilin(商標)カラムの結合能力を検査するために、精製proNGFを添加した。前記カラムを10~20倍量のランニングバッファーで洗浄した後、結合したproNGFを、0.1Mグリシン(pH2.0)を用いて溶出した(図10)。さらに、BSAの基質混合物およびE.coliの粗抽出液から、proNGFを分離することが可能であった。この目的のため、1mLのBSA溶液(5mg/mL、Sigma社)を、0.5mLのproNGF(1.3mg/mL)に混合し、前記Affilin(商標)カラムに添加した。前記カラムを、カラムの20倍量のランニングバッファーで洗浄した後、結合したproNGFをグリシン(0.1M、pH2.2)で溶出した。カラムの10倍量の6M Gua/HClで、前記カラムを再生した後、さらに、1mLのE.coli粗抽出液(50mLのBL21の一晚培養液の菌体ペレットの細胞破壊(リゾチーム/ベンゾナーゼ/超音波)後の可溶化上清)と0.5mLのproNGF(1.3mg/mL)との混合物を、前記Affilin(商標)カラムに添加した。前記カラムを、カラムの20倍量のランニングバッファーで洗浄した後、グリシン(0.1M、pH2.2)で、結合したproNGFを溶出した。続いて、前記カラムを、0.1Mグリシン(pH2.2)、10mM HCl、10

20

30

40

50

mM NaOH、6 M Gua/HCl、6 M 尿素および20%エタノールを用いて再生した。BSAおよびE.coli粗抽出液からのproNGFの分離からの前記溶出画分を、ゲル電気泳動法により分析した(図11)。10回のテストの後、前記SPC7-E9カラムに対するproNGFの未変化の結合が観測できた。

【0189】

【表1】

変異体	A ₄₁₀	ブランク	ブランク	相関	使用濃度	タンパク質	理論上の	接触可	滴定された
		値1	値2	A ₄₁₀	[μg/mL]	中のシステ	能なシステ	イン	イン数
						イン数	イン数		
SPC-1-	0.2142	0.0897	0.1232	0.0013	50	7	0	0	0
A7BB	0.2254	0.1003	0.1232	0.0019	100				
SPC-1-	0.3154	0.0832	0.1232	0.109	50	8	1	1	4
A7JJ	0.4412	0.0738	0.1232	0.2442	100				
SPC-1-	0.235	0.0834	0.1232	0.0286	50	8	1	1	1
A7_Cys	0.272	0.0966	0.1232	0.0522	100				

10

20

30

40

【0190】

【表 2】

SPC-1-A7

5'-ATGGGTCTGATCTGT γ-クリスタリン CTCGAGCACCACCACCACCACCAC -3'
 NH₂-M G L I C L E H H H H H H -COOH

SPC-1-A7BB

5'-ATGGGTCTGATCTCT γ-クリスタリン CTCGAGCACCACCACCACCACCAC -3'
 NH₂-M G L I S L E H H H H H H -COOH

SPC-1-A7JJ

5'-ATGGGTCTGATCTCT γ-クリスタリン CTCGAGTGGGGCGGCCATCACCATCACCACCACCACCACCACCAC -3'
 NH₂-M G L I S L E C G G H H H H H H H H -COOH

SPC-1-A7_Cys

5'-ATGGGTCTGATCTCT γ-クリスタリン CTCGAGTCCGGCGGGGGGGAGGATCTGCCATCACCATCACCACCACCACCACCACCAC
 NH₂-M G L I S L E S G G G G G S C H H H H H H H H -COOH

10

20

【 0 1 9 1 】

ヒト - II - クリスタリンライブラリの D N A 配列

CR20 (SEQ ID NO:1)

ATGGGTNNKATCANNKTTCCNNKGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTNNKTACNNKTGCNNKACCGACTGCCCGAACCTGCA
 GCCGTACTTCTCCCGTTGCAACTCCATCANNKGTNNKTCCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGAACTACCAGGGTC
 ACCgtcaccagtaacttcttgcggcgtggggagtaccccgactaccagcaatggatgggcctcagcgactccatccgctcc
 tgc tgcctcatccccccac tctggcgcttacagaatgaagatctacgacagagatgaattgaggggacaaatgtcaga
 gctcacagacgactgtctctctgttcaggaccgcttccacctcactgaaat

caactccctcaatgtgctggagggcagctggatcctctatgagatgcccactacagggggaggcagtatctgctgaggcc
 gggggagtacaggaggttcttgatggggggcctccaaatgccaaagtggctctcttagacgagtcattggatttgtacg
 cg

30

【 0 1 9 2 】

- II - クリスタリンに基づくAffilin (商標) の D N A 配列

SPC1-A1 (SEQ ID NO:2)

ATGGGTTTTATCTGGTTCATGGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTAGGTACGATTGCGGTACCGACTGCCCGAACCTGCA
 GCCGTACTTCTCCCGTTGCAACTCCATCAAGGTTAAGTCCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGAACTACCAGGGTC
 ACCgtcaccagtaacttcttgcggcgtggggagtaccccgactaccagcaatggatgggcctcagcgactccatccgctcc
 tgc tgcctcatccccccac tctggcgcttacagaatgaagatctacgacagagatgaattgaggggacaaatgtcaga
 gctcacagacgactgtctctctgttcaggaccgcttccacctcactgaaatcactccctcaatgtgctggagggcagct
 ggatcctctatgagatgcccactacagggggaggcagtatctgctgaggccgggggagtacaggaggttcttgatgg
 gggcctccaaatgccaaagtggctctcttagacgagtcattggatttgtacgcg

40

SPC1-A7 (SEQ ID NO:3)

ATGGGTCTGATCTGTTTCTCTGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTAGGTACATGTGCCTGACCGACTGCCCGAACCTGCA
 GCCGTACTTCTCCCGTTGCAACTCCATCAATGTTTGGTCCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGAACTACCAGGGTC
 ACCgtcaccagtaacttcttgcggcgtggggagtaccccgactaccagcaatggatgggcctcagcgactccatccgctcc
 tgc tgcctcatccccccac tctggcgcttacagaatgaagatctacgacagagatgaattgaggggacaaatgtcaga
 gctcacagacgactgtctctctgttcaggaccgcttccacctcactgaaatcactccctcaatgtgctggagggcagct
 ggatcctctatgagatgcccactacagggggaggcagtatctgctgaggccgggggagtacaggaggttcttgatgg

50

ggggctccaaatgccaaagt tggctctct tagacgagtc atggatt tgtacgcg

SPC1-G3 (SEQ ID NO:4)

ATGGGTTCTATCATTTTCTTGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTATTTACGGTTGCACTACCGACTGCCCGAACCTGCA
GCCGTACTTCTCCCGTTGCAACTCCATCGTGGTTCAGTCCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGAACCTACCAGGGTC
ACCgtcaccagta ct t cctgcggcgtggggag t accccgact accagcaat gga tgggcctcagcgactccatccgctcc
tgc tgcctcatccccccac tctggcgttacagaa tgaagatctacgacagagatgaat t gaggggacaaatgtcaga
gctcacagacgactgtctctctgt t caggaccgct tccacctcactgaaat t cactccctcaatgtgctggagggcagct
gga tcc tct at gaga t gccaact acagggggagggcag t at c t gct gaggccgggggag t acaggaggt t t c t t gatt gg
ggggctccaaatgccaaagt tggctctct tagacgagtc atggatt tgtacgcg

10

SPC1-A7BB (SEQ ID NO:5)

ATGGGTCTGATCTCTTTCTCTGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTAGGTACATGTgCCTGACCGACTGCCCGAaCCTGCA
GCCGTACTTCTCCCGTTGCAACTCCATCAATGTTTGGTCCGGTTGCTGGATGATCTACGaACGTCCGAACCTACCAGGGTC
ACCAGTACTTcCTGCGGCGTGGGGAGTACCCCGACTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCATCCGCTCCTGCTGC
CTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGACAGAGATGAATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCAC
AGACGACTGTCTCTCTGTTTCAGGACCGCTTCCACCTCACTGAAATTCCTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCC
TCTATGAGATGCCAACTACAGGGGGAGGCAGTATCTGCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGAGGTTTCTTGATTGGGGGGCT
CCAAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGAGTCATGGATTTgTACCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

20

SPC1-A7JJ (His10を含む) (SEQ ID NO:6)

ATGGGTCTGATCTCTTTCTCTGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTAGGTACATGTgCCTGACCGACTGCCCGAaCCTGCA
GCCGTACTTCTCCCGTTGCAACTCCATCAATGTTTGGTCCGGTTGCTGGATGATCTACGaACGTCCGAACCTACCAGGGTC
ACCAGTACTTcCTGCGGCGTGGGGAGTACCCCGACTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCATCCGCTCCTGCTGC
CTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGACAGAGATGAATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCAC
AGACGACTGTCTCTCTGTTTCAGGACCGCTTCCACCTCACTGAAATTCCTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCC
TCTATGAGATGCCAACTACAGGGGGAGGCAGTATCTGCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGAGGTTTCTTGATTGGGGGGCT
CCAAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGAGTCATGGATTTgTACCTCGAGTgCGGCGGCCATCACCATCACCACCACCA
CCACCACCAC

30

SPC1-A7_Cys (His10を含む) (SEQ ID NO:7)

ATGGGtCTGATCTCTtTcTcTGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTAGGtAcAtgTGCCTgAcCGacTgCccGAACCTGCA
GCCGTACTTcTcCCGTTGCAACTCCATCAATGTTTGGTCCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGAACCTACCAGGGTC
ACCAGTACTTcCTGCGGCGTGGGGAGTACCCCGaTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCATCCGCTCCtGCTGC
CTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGACAGAGATGAATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCAC
AGACGACTGTCTCTCTGTTTCAGGACCGCTTCCACCTCACTGAAATTCCTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCC
TCTATGAGATGCCAACTACAGGGGGAGGCAGTATCTGCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGAGGTTTCTTGATTGGGGGGCT
CCAAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGaGTCATgGATTTgTACCTCGAGTCCGGCGGCGGGGGGGAGGaTCTTgCCA
TCACCATCACCACCACCACCaCCACCaCACCAC

40

SPC7-E9 (His6を含む) (SEQ ID NO:8)

ATGGGTTTTATCTGTTTCTTGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTTCTTACGCTTTCGATACTGACTGCCCGAACCTGCA
GCCGTACTTCTCCCGTTGCAACTCCATCAGTGTCTGTCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGAACCTACCAGGGTC
ACCAGTACTTCTGCGGCGTGGGGAGTACCCCGACTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCATCCGCTCCTGCTGC
CTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGACAGAGATGAATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCAC
AGACGACTGTCTCTCTGTTTCAGGACCGCTTCCACCTCACTGAAATTCCTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCC
TCTATGAGATGCCAACTACAGGGGGAGGCAGTATCTgCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGAGGTTTCTTGATTGGGGGGCT
CCAAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGAGTCATGGATTTGTACCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

【 0 1 9 3 】

ヒトユビキチンライブラリの D N A 配列

50

Ubiquitin wildtype (SEQ ID NO:9)

ATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACCGGCAAGACCATCACTCTGGAGGTGGAGCCCAGTGACACCATCGAAAAATGTGAA
GGCCAAGATCCAAGATAAAGAAGGCATTCCCCCGACCAGCAGAGGCTCATCTTTGCAGGCAAGCAGCTGGAAGATGGCC
GCACTCTTTCTGACTACAACATCCAGAAAAGAGTCGACCCTGCACCTGGTCTCCGCCTGAGGGGCGGC

Modified ubiquitin (MUBI) (SEQ ID NO:10)

ATGCAAATCTTCGTAAAAACCCTGACGGGAAAGACTATCACCCCTGGAGGTAGAACCGTCCGACACCATCGAAAAATGTCAA
AGCTAAAAATCCAAGACAAAAGAAGGAATTCCACCTGACCAGCAACGCCTAGCTTTTCGCAGGACGACAACCTAGAGGACGGGC
TCACCCTGTCTGACTACAACATCCAAAAAGAATCCACCCTCCACCTGGCACTCCTCCTGCGGGCC

10

UB10 (library) (SEQ ID NO:11)

ATGNNKATCANNKGTNNKACCCTGACGGGAAAGACTATCACCCCTGGAGGTAGAACCGTCCGACACCATCGAAAAATGTCAA
AGCTAAAAATCCAAGACAAAAGAAGGAATTCCACCTGACCAGCAACGCCTAGCTTTTCGCAGGACGACAACCTAGAGGACGGGC
TCACCCTGTCTGACTACAACATCANNKNNKNNKNNKNNKCTCCACCTGGCACTCCTCCTGCGGGCC

【 0 1 9 4 】

ユビキチンに基づくAffilin(商標)のDNA配列

SPU11-3-A1 (His6を含む) (SEQ ID NO:12)

ATGCGGATCCGTGTTGCTACCCTGACGGGAAAGACTATCACCCCTGGaGGTAGAACCGTCCGACACCATCGAAAAATGTCAA
AGCTAAAAATCCAAGACAAAAGAAGGAATTCCACCTGACCAGCAACGCCTAGCTTTTCGCAGGACGACAACCTAGAGGACGGGC
TCACCCTGTCTGACTACGACATCCGTTCATGGTACGTGCTCCACCTGGcACTCCTCCTGCGGGCCCTCGAGCACCACCAC
CACCACCAC

20

SPU11-3-A1_Cys (His10を含む) (SEQ ID NO:13)

ATGCGGATCCGTGTTGCTACCCTGACGGGAAAGACTATCACCCCTGGaGGTAGAACCGTCCGACACCATCGAAAAATGTCAA
AGCTAAAAATCCAAGACAAAAGAAGGAATTCCACCTGACCAGCAACGCCTAGCTTTTCGCAGGACGACAACCTAGAGGACGGGC
TCACCCTGTCTGACTACGACATCCGTTCATGGTACGTGCTCCACCTGGcACTCCTCCTGCGGGCCCTCGAGTCCGGCGGC
GGGGGGGAGGATCTTGCCATCACCATCACCACCACCACCACCACCAC

【 0 1 9 5 】

プライマー

pCAN700 (SEQ ID NO:14)

(5' -CCA TGA TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC-3')

A7Cys4Ser_for (SEQ ID NO:15)

(5' -CCA TGG GTC TGA TCT CTT TCT CTG AAG ACC G-3')

A7Cys4Ser_rev (SEQ ID NO:16)

(5' -CGG TCT TCA GAG AAA GAG ATC AGA CCC ATG G-3')

pETTerm (SEQ ID NO:17)

(5' -GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG GC-3')

A7Gly2Cys_for (SEQ ID NO:18)

(5' -GGA TTT GTA CCT CGA GTG CGG CGG CCA TCA CCA TCA CCA CCA CCA
CCA CCA CCA CTG AGA TCC GGC-3')

40

A7Gly2Cys_rev (SEQ ID NO:19)

(5' -GCC GGA TCT CAG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGA TGG TGA TGG CCG
CCG CAC TCG AGG TAC AAA TCC-3')

A7Gly2Ser_for (SEQ ID NO:20)

(5' -GGA TTT GTA CCT CGA GTC CGG CGG CCA TCA CC-3')

A7Gly2Ser_rev (SEQ ID NO:21)

(5' -GGT GAT GGC CGC CGG ACT CGA GGT ACA AAT CC-3')

A7Gly2Ser_rev (SEQ ID NO:22)

(5' -GGT GAT GGC CGC CGG ACT CGA GGT ACA AAT CC-3')

Gly4SerCys_HindIII (SEQ ID NO:23)

50

(5' -GGG GGA AGC TTT TAT CAG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGA TGG TGA
TGG CAA GAT-3')

A7Cys4Ser_Nde (SEQ ID NO:24)

(5' -GGA GAT ATA CAAT ATG GGT CTG ATC TCT TTC TCT G-3')

【 0 1 9 6 】

SEQ ID NO: 25:

ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC CCAGCCGGCC 60
ATGGCCATGC AAATCTTCGT TAAAACCCTG ACGGGAAAAGA CTATCACCTT GGAGGTAGAA 120
CCGTCGGACA CCATCGAAAA TGTCAAAAGCT AAAATCCAAG ACAAAGAAGG AATTCCACCT 180
GACCAGCAAC GCCTAGCTTT CGCAGGACGA CAACTAGAGG ACGGGCTCAC CCTGTCTGAC 240
TACAACATCC AAAAAAATC CACCCTCCAC CTGGCACTCC TCCTGCGGGC C 291

10

SEQ ID NO: 26

ATGCAAATCT TCGTTAAAAC CCTGACGGGA AAGACTATCA CCCTGGAGGT 50

SEQ ID NO: 27

GGATTTTAGC TTTGACATTT TCGATGGTGT CGGACGGTTC TACCTCCAGG GTG 53

SEQ ID NO: 28

GTCAAAGCTA AAATCCAAGA CAAAGAAGGA ATTCCACCTG ACCAGCAACG CCT 53

SEQ ID NO: 29

GGGTGAGCCC GTCCTCTAGT TGTCGTCCTG CGAAAGCTAG GCGTTGCTGG 50

SEQ ID NO: 30

GACGGGCTCA CCCTGTCTGA CTACAACATC CAAAAAGAAT CCACCCTCCA 50

20

SEQ ID NO: 31

GAGTGCTCGC AGCAGGAGTG CCAGGTGGAG GGTGGATTC 39

SEQ ID NO: 32

GATATACATA TGCAAATCTT CG 22

SEQ ID NO: 33

GTGGTGCTCG AGTGCTCG 18

SEQ ID NO: 34

CCAGCCGGCC ATGGCCATGN NKATCNNKGT TNNKACCCTG ACGGGAAAAGA CTATC 55

SEQ ID NO: 35

CAGGAGGAGT GCCAGGTGGA GMNMMNMMN MNNMNGATG TTGTAGTCAG ACAGG 55

30

SEQ ID NO: 36

GTTATTACTC GCGGCCAGC CGGCCATGGC CATG 34

SEQ ID NO: 37

GAGTTTTTGT TCGGCCTCGA GGGCCCGCAG GAGGAGTGCC AGGTGGAG 48

【 0 1 9 7 】

参照文献

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1994): Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.

40

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. und Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. Nucleic Acid Res., 28, 235-242.

Blundell, T., Lindley, P., Miller, L., Moss, D., Slingsby, C., Tickle, I., Turnell, B., and Wistow, G. (1981). The molecular structure and stability of the eye lens: x-ray analysis of gamma-crystallin II. Nature 289, 771-777.

Buchberger A, Howard MJ, Proctor M, Bycroft M, National Library of Medicine, J Mol Biol. 2001 Mr 16; 307(1); 17-24.

Butt, T. R., Jonnalagadda, S., Monia, B. P., Sternberg, E. J., Mars

50

- h, J. A., Stadel, J. M., Ecker, D. J. and Crooke, S. T. (1989) Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in *Escherichia coli*. *PNAS* 86, 2540-2544.
- Finucane, M. D., Tuna, M., Lees, J. H., and Woolfson, D. N. (1999). Core-directed protein design. I. An experimental method for selecting stable proteins from combinatorial libraries. *Biochemistry* 38, 11604-11612.
- Finucane, M. D., and Woolfson, D. N. (1999). Core-directed protein design. II. Rescue of a multiply mutated and destabilized variant of ubiquitin. *Biochemistry* 38, 11613-11623. 10
- Haber, A. F. S. A. (1972). Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. In *Methods Enzymology*, C. H. Hirs, and S. N. Timasheff, eds., pp. 457-464.
- Hanes, J. et al. (1997): In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 4937-42.
- Hazes, B. and Hol, W. G. J. (1992): Comparison of the hemocyanin β -barrel with other greek key β -barrels: possible importance of the zipper in protein structure and folding. *Proteins: Struct., Funct. Gen.* 12, 278-298. 20
- Hemmingsen, J. M., Gernert, K. M., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (1994): The tyrosine corner: a feature of most greek key β -barrel proteins. *Prot. Science* 3, 1927-1937.
- Herrmann, J. E., and Morse, S. A. (1973) Coupling of peroxidase to poliovirus antibody: Characteristics of the conjugates and their use in virus detection. *Infection and Immunity*, 645-649.
- Jaenicke, R. (1994). Eye-lens proteins: structure, superstructure, stability, genetics. *Naturwissenschaften* 81, 423-429.
- Jaenicke, R. (1996). Stability and folding of ultrastable proteins: eye lens crystallins and enzymes from thermophiles. *Faseb J* 10, 84-92. 30
- Jaenicke, R., and Slingsby, C. (2001). Lens crystallins and their microbial homologs: structure, stability, and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36, 435-499.
- Kumaraswamy, V. S., Lindley, P. F., Slingsby, C., and Glover, I. D. (1996). An eye lens protein-water structure: 1.2 angstrom resolution structure of gamma B-crystallin at 150K. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, 611.
- Larsen CN, Wang H., National Library of Medicine ; *J Proteome Res.* 2002 Sep-Oct; 1(5): 411-9.
- Lazar, G. A., Desjarlais, J. R., and Handel, T. M. (1997). De novo design of the hydrophobic core of ubiquitin. *Protein Sci* 6, 1167-1178. 40
- Ling, M. M. (2003). Large antibody display libraries for isolation of high-affinity antibodies. *Comb Chem High Throughput Screen* 6, 421-432.
- Lottspeich, F., and Zorbas, H. (1998). *Bioanalytik* (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
- Mandal, K., Chakrabart, B., Thomson, J. and Siezen, R. J. (1987): Structure and stability of β -crystallins. Denaturation and proteolysis behaviour. *J. Biol. Chem.* 262, 8096-8102. 50

Mayr, E. M., Jaenicke, R., and Glockshuber, R. (1994). Domain interactions and connecting peptides in lens crystallins. *J Mol Biol* 235, 84-88.

Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T. und Chothia C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247, 536-540.

Najmudin, S., Nalini, V., Driessen, H. P., Slingsby, C., Blundell, T., Moss, D., and Lindley, P. (1993). Structure of bovine gB (g II)-crystalline at 1.47 angstrom. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49, 223-233.

10

Norledge, B. V., Mayr, E. M., Glockshuber, R., Bateman, O. A., Slingsby, C., Jaenicke, R., and Driessen, H. P. (1996). The X-ray structures of two mutant crystallin domains shed light on the evolution of multi-domain proteins. *Nat Struct Biol* 3, 267-274.

Reichlin, M. (1980) Use of glutaraldehyde as a coupling agent for proteins and peptides. *Methods Enzymol* 70, 159-165.

Richardson, J. S., Richardson, D. C., Tweedy, N. B., Gernert, K. M., Quinn, T. P., Hecht, M. H., Erickson, B. W., Yan, Y., McClain, R. D., Donlan, M. E. and Surlles, M. C. (1992): Looking at proteins: representations, folding, packing and design. *Biophys. J.* 63, 1186-1209.

20

Riddle, D. S., Santiago, J. V., Bray-Hall, S. T., Doshi, N., Grantcharova, Q. Y and Baker, D. (1997): Functional rapidly folding proteins from simplified amino acid sequences. *Nature structural biology* 4, 805-809.

Rudolph, R., Siebendritt, R., Nessler, G., Sharma, A. K., and Jaenicke, R. (1990). Folding of an all-beta protein: independent domain folding in gamma II-crystallin from calf eye lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4625-4629.

Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E.F. (1989): *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold spring Harbor. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

30

Sharma, A. K., Minke-Gogl, V., Gohl, P., Siebendritt, R., Jaenicke, R., and Rudolph, R. (1990). Limited proteolysis of gamma II-crystallin from calf eye lens. Physicochemical studies on the N-terminal domain and the intact two-domain protein. *Eur J Biochem* 194, 603-609.

Slingsby, C.(1985): Structural variation in lens crystallins. *TIBS* 10, 281-284.

Smith, G. P (1985): Filamentous Fusion Phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.

40

Stahl, S. and Uhlen, M. (1997): Bacterial surface display: trends and progress. *TIBTECH* 15, 185-192.

Takamiya, H., Shimizu, F., and Vogt, A. (1975) A two-stage method for cross-linking antibody globulin to ferritin by glutaraldehyde. III. Size and antibody activity of the conjugates. *J Immunol Methods* 8(4), 301-306.

Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., and Cook, W. J. (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8 A resolution. *J Mol Biol* 194, 531-544.

Voet, D., and Voet, J. G. (1995). *Biochemistry, Second Edition* edn (New York, John Wiley & Sons, Inc.).

50

Wistow, G., Turnell, B., Summers, L., Slingsby, C., Moss, D., Miller, L., Lindley, P., and Blundell, T. (1983). X-ray analysis of the eye lens protein gamma-II crystallin at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 170, 175-202.

Wistow, G. J., and Piatigorsky, J. (1988). Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu Rev Biochem* 57, 479-504.

【図面の簡単な説明】

【0198】

【図1】 -II-クリスタリンの空間的構造。N末端ドメインにおいて、新規に産出した結合表面を黄色で示す。前記結合表面の外側に局在したリジン残基のC末端部位を、赤の球により強調する。

10

【図2】固定化されたIgG Fcを有するCM5チップに対するAffilin(商標)変異体SPC1-A1(A)、SPC1-A7(B)およびSPC1-G3(C)の結合を競合させるための、Biacore試験のセンサーグラム。前記試験のため、180RUのポリクロナルIgG Fcを固定化した。結合競合のため、表示された濃度の変異体およびIgG Fcを用いた。HBS-EPを、流速30μL/分で、ランニングバッファとして用いた。

【図3】proNGFに対するSPC7-E9の結合の検出のための濃度依存ELISA。マイクロタイプレートを10μg/mLのproNGFでコートした。1:10000の希釈で抗ヒトの-II-クリスタリン抗体-POD複合体を、検出抗体として用いた。示された吸光度は、2つの同時測定の前平均値である。200nMの見かけ上のK_D値が計算された。

20

【図4】ヒトのIgG Fcに対するSPC1-A7_Cysの結合を検出するための濃度依存ELISA。マイクロタイプレートを10μg/mLのIgG Fcでコートした。1:10000の希釈で抗ヒト-II-クリスタリン抗体-POD複合体を、検出抗体として用いた。示された吸光度は、2つの同時測定の前平均値である。233nMの見かけ上のK_D値が計算された。

【図5】固定化されたIgG Fcを有するCM5チップに対するSPC1-A7BB-PE複合体の結合のためのBiacore試験のセンサーグラム。3000RUのIgG Fcを固定化し、121nM(赤)、75nM(緑)、6nM(青)濃度のSPC1-A7BB-PE複合体を、前記チップに通過させた。結合段階を1分間、続けて、解離段階を3分間とした。HBS-EPを、流速30μL/分で、ランニングバッファとして用いた。曲線から、肉眼でのK_D値15nMが計算された。

30

【図6】固定化されたIgG Fcを有するCM5チップに対するSPC1-A7Oyster556の結合を試験するためのBiacore試験のセンサーグラム。1000RUのIgG Fcを前記チップ上に固定化し、1μM(青)および5μM(赤)濃度のSPC1-A7Oyster556を、前記チップに通過させた。結合および解離段階をどちらも3分間とした。HBS-EPを、流速30μL/分で、ランニングバッファとして用いた。

40

【図7】ELISAによるIgGに対するAffilin(商標)-POD複合体の結合の検出。10μg/mLのヒトIgGをマイクロタイプレート上に固定化した。PBS中のAffilin(商標)-POD複合体の別の希釈液をマイクロタイプレート上で1時間インキュベートした。洗浄工程の後、結合したPODの活性をTMB基質溶液により検出した。

【図8】NGFに対するSPU11-3-A1_Cysの結合のためのBiacore試験のセンサーグラム。200RUのSPU11-3-A1_Cysを、PDEA法によりCM5チップに結合させ、異なる濃度のNGFを、前記チップに通過させた。結合および解離段階をどちらも3分間とした。PBS(1mM EDTA、0.005%界面活性剤P20含有)を、流速30μL/分で、ランニングバッファとして用いた。曲線から、

50

K_D 値 46 nM が計算された。

【図 9】 proNGF を有する CM5 チップに対する SPC7-E9 の結合のための Biacore 試験のセンサーグラム。280 RU の proNGF を、固定化し、異なる濃度の proNGF を、前記チップに通過させた。HBS-EP を、流速 30 μ L / 分で、ランニングバッファーとして用いた。曲線から、 K_D 値 1.4 nM が計算された。

【図 10】 SPC7-E9 親和性カラムからの proNGF の溶出。400 μ g の精製された proNGF を添加し（時間 0、ピンクの点線）、後の洗浄を、カラム体積の 20 倍量のランニングバッファーにより行った。前記溶出を、0.1 M グリシン pH 2.2（緑線）により行った。前記作業を、1 mL / 分の流速で行った。タンパク質の検出を、280 nm（青線）により行った。

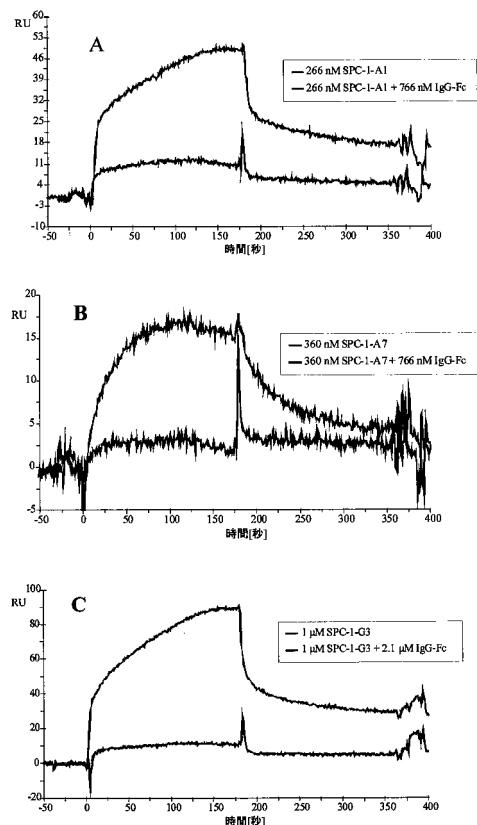
【図 11】 BSA 溶液および E. coli の粗抽出液からの proNGF 分離の SDS-PAGE。（左から右に向かって）レーン 1：マーカータンパク質、レーン 2：BSA 標準、レーン 3：proNGF 標準、レーン 4：BSA および proNGF 標準の混合物（開始）、レーン 5：フロースルー、レーン 6：0.2 M グリシン（pH 2.2）による溶出液、レーン 7：なし、レーン 8：E. coli の粗抽出液（B121）および proNGF 標準、レーン 9：フロースルー、レーン 10：0.2 M グリシン（pH 2.2）による溶出液。

10

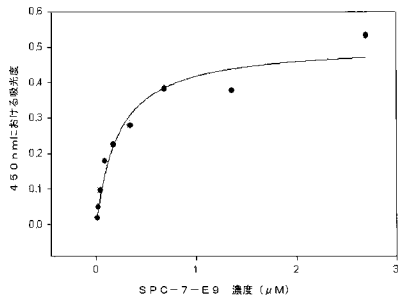
【図 1】



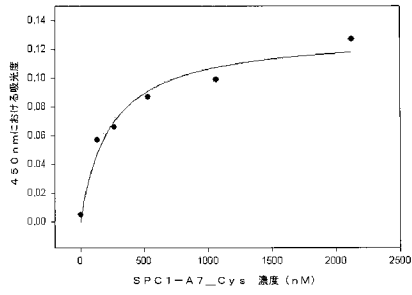
【図 2】



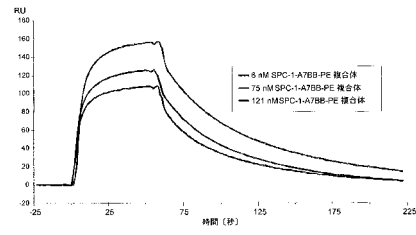
【 図 3 】



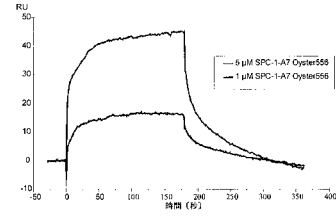
【 図 4 】



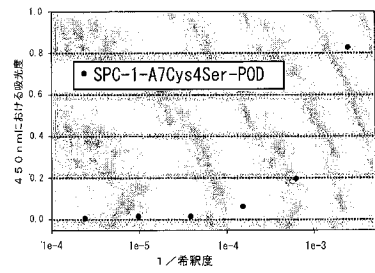
【 図 5 】



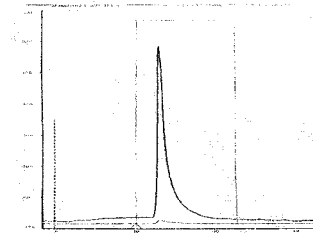
【 図 6 】



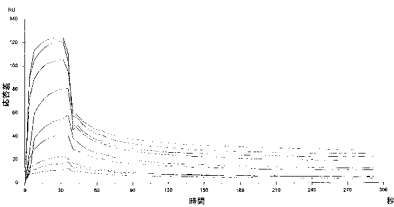
【 図 7 】



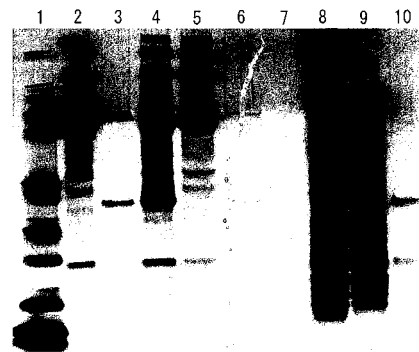
【 図 10 】



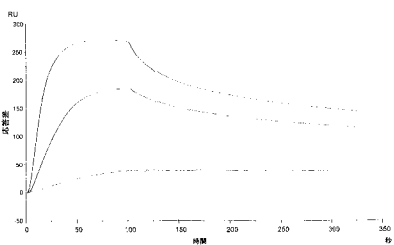
【 図 8 】



【 図 11 】



【 図 9 】



【配列表】

2008516210000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/010932

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/00 C12N9/00 C12N15/00 A61K48/00 A61K49/00		
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) C07K C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/04144 A (FIEDLER, ULRIKE; RUDOLPH, RAINER) 18 January 2001 (2001-01-18) page 9, line 8 - page 10, line 4	1
A	WO 99/16873 A (SKERRA, ARNE; BESTE, GERALD; SCHMIDT, FRANK; STIBORA, THOMAS) 8 April 1999 (1999-04-08) page 6, line 27 - page 25, line 12	1
A	YEH E T H ET AL: "Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 248, no. 1-2, May 2000 (2000-05), pages 1-14, XP004198791 ISSN: 0378-1119 page 2, right-hand column, paragraph 2 - page 3, right-hand column, paragraph 1	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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 4 April 2006		Date of mailing of the international search report 11/04/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nichogiannopoulou, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/010932

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 32 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/010932

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0104144	A	18-01-2001	AU 5827800	A 30-01-2001
			CA 2378871	A1 18-01-2001
			CN 1371415	A 25-09-2002
			DE 19932688	A1 18-01-2001
			EP 1200583	A2 02-05-2002
			JP 2003504081	T 04-02-2003
WO 9916873	A	08-04-1999	AT 226248	T 15-11-2002
			AU 1143799	A 23-04-1999
			DE 19742706	A1 15-04-1999
			DK 1017814	T3 17-02-2003
			EP 1017814	A1 12-07-2000
			US 2006058510	A1 16-03-2006

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/010932

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C07K14/00 C12N9/00 C12N15/00 A61K48/00 A61K49/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C07K C12N A61K		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, Sequence Search		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 01/04144 A (FIEDLER, ULRIKE; RUDOLPH, RAINER) 18. Januar 2001 (2001-01-18) Seite 9, Zeile 8 - Seite 10, Zeile 4	1
A	WO 99/16873 A (SKERRA, ARNE; BESTE, GERALD; SCHMIDT, FRANK; STIBORA, THOMAS) 8. April 1999 (1999-04-08) Seite 6, Zeile 27 - Seite 25, Zeile 12	1
A	YEH E T H ET AL: "Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 248, Nr. 1-2, Mai 2000 (2000-05), Seiten 1-14, XP004198791 ISSN: 0378-1119 Seite 2, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 3, rechte Spalte, Absatz 1	1
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
4. April 2006		11/04/2006
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Nichogiannopoulou, A

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen
 PCT/EP2005/010932

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
 Obwohl Anspruch 32 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr. _____
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. _____
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/010932

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0104144 A	18-01-2001	AU 5827800 A	30-01-2001
		CA 2378871 A1	18-01-2001
		CN 1371415 A	25-09-2002
		DE 19932688 A1	18-01-2001
		EP 1200583 A2	02-05-2002
		JP 2003504081 T	04-02-2003
WO 9916873 A	08-04-1999	AT 226248 T	15-11-2002
		AU 1143799 A	23-04-1999
		DE 19742706 A1	15-04-1999
		DK 1017814 T3	17-02-2003
		EP 1017814 A1	12-07-2000
		US 2006058510 A1	16-03-2006

フロントページの続き

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

(72)発明者 エバースパツハ、ヒルマー

スイス、8304 ヴァリセレン、ノイグットシュトラッセ 7ア

(72)発明者 ヘイ、トーマス

ドイツ、06120 ハレノザール、ドエラウアーシュトラッセ 56

(72)発明者 フィードラー、ウルリケ

ドイツ、06114 ハレノザール、ラフォンテーヌシュトラッセ 26

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA03 AA11 BA80 CA02 DA06 EA04 GA11 HA03

4C076 CC41 EE41 EE59