

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7229169号  
(P7229169)

(45)発行日 令和5年2月27日(2023.2.27)

(24)登録日 令和5年2月16日(2023.2.16)

(51)国際特許分類

C 07 K 14/315 (2006.01)  
C 07 K 1/22 (2006.01)

F I

C 07 K 14/315  
C 07 K 1/22

Z N A

請求項の数 6 (全28頁)

(21)出願番号 特願2019-553971(P2019-553971)  
 (86)(22)出願日 平成30年3月28日(2018.3.28)  
 (65)公表番号 特表2020-512385(P2020-512385  
 A)  
 (43)公表日 令和2年4月23日(2020.4.23)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2018/024721  
 (87)国際公開番号 WO2018/183417  
 (87)国際公開日 平成30年10月4日(2018.10.4)  
 審査請求日 令和3年3月26日(2021.3.26)  
 (31)優先権主張番号 62/478,886  
 (32)優先日 平成29年3月30日(2017.3.30)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)  
 前置審査

(73)特許権者 501335771  
 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティ  
 アメリカ合衆国 メリーランド州 21218 バルティモア - ノース・チャーチ・ストリート 3400  
 (73)特許権者 391015708  
 ブリストル -マイヤーズ スクイブ カンパニー  
 B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B B C O M P A N Y  
 アメリカ合衆国 08543 ニュージャージー州 プリンストン、ルート 206 アンド・プロビンス・ライン・ロード  
 (74)代理人 100147485

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体高分子の精製のための超分子高アフィニティタンパク質結合系

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

直鎖炭化水素鎖に結合した抗体結合ペプチドを含む免疫両親媒性物質であって、前記抗体結合ペプチドが黄色ブドウ球菌のプロテインAのZ33ペプチドの親水性アミノ酸配列を有し、

前記直鎖炭化水素鎖は、8から22個の炭素の長さであり、

前記Z33ペプチドの親水性アミノ酸の配列は、F N M Q Q Q R R F Y E A L H D P N L N E E Q R N A K I K S I R D D (配列番号1)を含み、

前記Z33ペプチドの親水性アミノ酸は、そのN末端でC12または2C8と結合する、免疫両親媒性物質。

## 【請求項2】

前記抗体結合ペプチドが生理的pHの水溶液中にあるときにヘリックス構造を有する、請求項1に記載の免疫両親媒性物質。

## 【請求項3】

蛍光色素に結合される、請求項1または2に記載の免疫両親媒性物質。

## 【請求項4】

前記蛍光色素がローダミンBである、請求項3に記載の免疫両親媒性物質。

## 【請求項5】

以下の工程を含む、抗体またはFc融合タンパク質の精製方法：

a) 請求項1～4のいずれか一項に記載の免疫両親媒性物質を生理的pHの水溶液に

溶解させ、該免疫両親媒性物質が免疫纖維（IF）に自己集合するように一晩熟成させる工程；

b) 抗体またはFc融合タンパク質を含む試料を前記IFと混合し、これにより、前記IFを抗体またはFc融合タンパク質のFc部分に結合させ、溶液中に免疫纖維-抗体複合体または免疫纖維-Fc融合タンパク質複合体を形成させる工程；

c) 塩を加えて遠心分離することにより、前記免疫纖維-抗体複合体または前記免疫纖維-Fc融合タンパク質複合体を溶液から分離する工程；ならびに

d) 前記IFを前記抗体またはFc融合タンパク質から解離させ、未結合の抗体またはFc融合タンパク質を収集する工程。

【請求項6】

10

前記pHを溶出条件に下げるのことおよび濾過または精密濾過により、前記IFを前記抗体またはFc融合タンパク質から分離する、請求項5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2017年3月30日に提出された国際特許出願第62/478,886号の利益を主張し、これは、本明細書に完全に記載されているかのように、あらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

20

（電子的に提出された資料の参照による組み込み）

本出願には、EFS-Webを介してASCII形式で送信された配列表が含まれており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2018年3月20日に作成された前記ASCIIの複写は、P14162-02\_ST25.txtと名付けられ、サイズは1,016バイトである。

【背景技術】

【0003】

合成または天然のペプチドおよびそれらの誘導体の自己集合によって形成された超分子一次元（1D）ナノ構造について、再生医療、薬物送達、および診断学におけるそれらの重要な応用のために、過去30年間で急速に関心が高まっている<sup>1-10</sup>。例えば、Suttippan研究所は、生理的条件下で超分子ナノ纖維に自己集合することができるシート形成配列に直鎖炭化水素を結合させることにより、一連のペプチド両親媒性物質（PA）を設計および合成した。<sup>2,11-16</sup> PA集合体に望ましい生物活性を持たせて生物学と関連させるために、細胞接着モチーフRGDや神経突起促進配列IKVAV（配列番号2）などのさまざまな生物活性エピトープが分子設計に組み込まれている。<sup>13,17-20</sup> 一例では、Webberらは、骨髄单核細胞（BMNC）の表面治療送達にRGDS（配列番号3）エピトープを表示する生物活性PAナノ纖維を調査し、生物学的接着の強化を示唆した。<sup>14</sup> 自己集合ペプチドモチーフのC末端またはN末端のいずれかに対する生物活性ペプチドのこの直接配置は、特定の生物医学的応用における生物活性材料を作製するための一般的な戦略になっている。ペプチド集合体の免疫原性を調整するために、Collieerと共同研究者らは自己集合ペプチドQ11を抗原OVAペプチドに共有結合させ、結果として生じる超分子OVA-Q11ナノ纖維では免疫原性が強化されていることを発見した。<sup>21</sup>

30

【0004】

40

高アフィニティ抗体結合粒子および材料について、生物学的治療薬に対するモノクローナル抗体の需要の増加により、製薬業界で急速に関心が高まっている。<sup>22-24</sup> プロテインAは、よく知られた抗体結合リガンドであり、ヒトを含むほとんどの哺乳動物種のIgGのFc部分に特異的に結合する能力を持っている。<sup>25-26</sup> しかしながら、プロテインAの大きなサイズによりその工業的応用が制限されているため、多くのプロテインAの合成ならびに最小化ドメインが設計および研究されている。<sup>27-29</sup> プロテインAのZドメインは59アミノ酸残基を持つ最初で最も有名な合成ドメインであり、IgG1に結合す

50

る場合、 $K_d$  は ~ 10 nM である。<sup>30 - 31</sup> プロテイン A の Z ドメインをさらに最小化するため、結合アフィニティを大幅に変化させることなく 2 ヘリックス誘導体 Z 3 3 が設計された ( $K_d = 43 \text{ nM}$ )。<sup>27</sup> 高アフィニティリガンドが同定されているが、所望の基質にリガンドを提示する方法は、抗体精製プロセスにも同様に不可欠である。製薬業界では、抗体精製は主に、高い選択性を備えた抗体結合リガンド（例えば、プロテイン A）の固定化に基づくアフィニティクロマトグラフィーに依存しているが、高いクロマトグラフィー媒体コストと限られた捕捉生産性とに悩まされている。<sup>32 - 34</sup> アフィニティ沈殿が、効果的な精製と比較的簡単なプロセスを使用して潜在的にボトルネックを解消するバッチスループットとを提供することにより従来のクロマトグラフィー法の魅力的な代替法になったのは、つい最近のことである。<sup>35 - 38</sup>

10

#### 【0005】

アフィニティ沈殿の典型的な例は、エラスチン様タンパク質 (ELP) 融合 Z ドメインを使用して、温度および塩が誘発する ELP の溶解度遷移により IgG を沈殿させる。<sup>39 - 40</sup> しかしながら、細菌によって発現される大量の ELP、各 ELP 融合リガンドの限定された結合部位、および高温での抗体の潜在的な変性は、抗体結合リガンドを提示する新しい基質を発見する関心を促す。

#### 【0006】

自己集合ペプチド両親媒性物質の見事な分子設計から着想を得て、本発明者らは、プロテイン A 模倣ペプチド Z 3 3 を自己集合免疫両親媒性物質 (IA) に組み込む方法を調査し、自己集合状態での標的抗体への結合能力を調査した。自己集合免疫纖維 (IF) と治療用 IgG 間の結合アフィニティは、等温滴定熱量測定 (ITC) を使用して調査され、IF を含む Z 3 3 が高い IgG 結合アフィニティを維持することが示唆された。

20

#### 【発明の概要】

#### 【0007】

多くの 1 次元 (1D) ナノ構造は、結果として生じる集合体の方向性、方向異方性成長を促進する分子間水素結合に不可欠なコアビルディングモチーフとして短いシート配列を含むペプチドまたはペプチド複合体の自己集合によって構築される。この分子設計戦略は、細胞とのインターフェイスのための生理活性糸状シート集合体の過剰生産に成功したが、アミロイドフィブリルを連想させる潜在的な毒性に関連する懸念は、-ヘリックスペプチドを用いる他の超分子作製戦略を促進している。

30

#### 【0008】

これまでに、生物活性ペプチドを、それらの生物活性を維持しながら超分子ペプチドナノ構造にうまく組み込むことができるることを実証した研究が数多く文献にあった。しかしながら、エピトープが生理活性であるために -ヘリックス構造を保持しなければならない場合、-シート形成配列の使用と -ヘリックスモチーフの提示との間に間隔の非両立性の問題があるようである。これに関連して、本発明者らは、2つの -ヘリックスを含むモチーフであるプロテイン A 模倣ペプチド Z 3 3 を直鎖炭化水素に直接結合させ、モノクローナル抗体に対して高い結合アフィニティを有する 2 つの自己集合免疫両親媒性物質が作製されることを示し、これらの発明の超分子免疫纖維 (IF) がモノクローナル抗体免疫グロブリン G (IgG) の沈殿と精製に利用され得ることを初めて実証した。

40

#### 【0009】

いくつかの実施形態によれば、本発明は、アミノ酸配列 F N M Q Q Q R R F Y E A L H D P N L N E E Q R N A K I K S I R D D (配列番号 1) を有し、2 つの -ヘリックスを含むモチーフである黄色ブドウ球菌のプロテイン A 模倣ペプチド Z 3 3 を直鎖炭化水素へ直接結合させ、自己集合免疫両親媒性物質を作製することを含む。結果は、得られた両親媒性ペプチドが、必須のシートセグメントを欠いているにも関わらず、生理学的条件下で、天然の -ヘリックス構造を維持しながら超分子免疫纖維 (IF) に効果的に結合することができるることを示す。等温滴定熱量測定により、これらの自己集合免疫纖維は pH 7.4 では高い特異性で免疫グロブリン G (IgG) 抗体に結合することができるが、溶出緩衝液 pH 2.8 では検出可能な結合は生じないことが確認された。

50

## 【0010】

いくつかのさらなる実施形態によれば、本発明のIFは、標的IgG抗体の沈殿および精製を可能にするpH依存性特異的結合を有することが実証された。

## 【0011】

したがって、いくつかの実施形態では、タンパク質結合ペプチドの纖維状集合体への超分子工学は、効果的なタンパク質精製に有用である。

## 【0012】

一実施形態によれば、本発明は、直鎖炭化水素鎖に結合した抗体結合ペプチドを含む免疫両親媒性物質を提供する。

## 【0013】

一実施形態によれば、本発明は、直鎖炭化水素鎖に結合した抗体結合ペプチドを含む免疫両親媒性物質を提供し、ペプチドは生理的pHの水溶液中にあるときに - ヘリックス構造を取る。

10

## 【0014】

一実施形態によれば、本発明は、直鎖炭化水素鎖に結合した抗体結合ペプチドを含む免疫両親媒性物質であって、抗体結合ペプチドが黄色ブドウ球菌のプロテインAのZ33ペプチドの親水性アミノ酸配列、またはその機能的部分もしくは断片もしくは誘導体を有する免疫両親媒性物質を提供する。

## 【0015】

別の実施形態によれば、本発明は、直鎖炭化水素鎖に結合した抗体結合ペプチドを含む免疫両親媒性物質であって、抗体結合ペプチドがアミノ酸配列FNMQQQRFRFYEA LHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD（配列番号1）、またはその機能的部分もしくは断片もしくは誘導体を有する免疫両親媒性物質を提供する。

20

## 【0016】

別の実施形態によれば、本発明は、以下の工程を含む、抗体またはFc融合タンパク質の精製方法を提供する：a)免疫両親媒性物質を生理的pHの水溶液に溶解させ、一晩熟成させて免疫纖維（IF）に自己集合させる工程；b)抗体またはFc融合タンパク質を含む試料をIFと混合し、IFを抗体またはFc融合タンパク質のFc部分に結合させ、溶液中に免疫纖維-抗体複合体または免疫纖維-Fc融合タンパク質複合体を形成させる工程；c)塩を加えて遠心分離することにより、免疫纖維-抗体複合体または免疫纖維-Fc融合タンパク質複合体を溶液から分離する工程；ならびにd)IFを抗体またはFc融合タンパク質から解離させ、未結合の抗体またはFc融合タンパク質を収集する工程。例えば、pHを溶出条件に下げることおよび濾過または精密濾過により、IFを抗体またはFc融合タンパク質から分離することができる。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0017】

【図1】(1A) IgGのFc部分に結合するZ33ペプチドの概略図。(1B) C12-Z33および2C8-Z33の配列。アルキル基とZ33は、それぞれ黄色と青色の斜線部分で示されている。Z33ペプチドの2つのヘリックスには下線が引かれている。

(1C) R-Z33 IFの自己集合およびIFとIgGとの結合の概略図。

40

【図2】(A) C12-Z33の自己集合の概略図。(B) Z33ペプチドおよびZ33-C12のそれぞれpH 7.4および2.8での正規化CDスペクトル。C12-Z33のpH 7.4(C,D)および2.8(E,F)でのTEM特性評価。TEM試料は、PBS(pH 7.4)およびIgG溶出緩衝液(pH 2.8)で個別に100μMの濃度で調製した。TEM試料は、2wt%酢酸ウラニルでネガティブ染色した。

【図3】15の以下の2μM IgG1溶液中への100μM C12-Z33の滴定のITCプロファイル：(A) PBS緩衝液、pH 7.4、および(B) IgG溶出緩衝液、pH 2.8。100μMの(C) Z33および(D) C12-SZ33の、15、pH 7.4のPBS中の2μM IgG1への滴定のITCプロファイル。

【図4】(A) 直径16.8±1.5nmのpH 7.4のPBSおよび(B) 直径17

50

.3 ± 1.9 nm の pH 2.8 の IgG 溶出緩衝液中の C12-Z33 の TEM 特性評価。TEM 試料の調製は、C12-Z33 の調製と同様であった。(C) pH 7.4 の PBS 中の 100 μM C12-Z33 の正規化 CD スペクトルは、ヘリックスの二次構造を示した。以下の 2 μM IgG1 溶液中への 100 μM の C12-Z33 の滴定の ITC プロファイル：(D) PBS 緩衝液、pH 7.4 および (E) IgG 溶出緩衝液、pH 2.8 中。

【図 5】0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液によって引き起こされる IgF-IgG 複合体の沈殿の概略図。(B) 0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の (i) 添加前および (ii) 添加後の C12-Z33 の 5 mM PBS 溶液ならびに (iii) 5 mM C12-Z33、(iv) 0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、および (v) 5 mM C12-Z33 と 0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含む IgG1 の 20 μM PBS 溶液の写真。(ii) と (v) とで沈殿が観察された。(C) 0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の添加前後の C12-Z33 および IgG1 + C12-Z33 複合体の吸光度スペクトル。純 IgG1 の上澄は、IgG1 + C12-Z33 の上澄から C12-Z33 の上澄を引いたものに由来する。(D) 0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の添加前後の 2 mM C12-SZ33 および IgG1 + C12-SZ33 複合体の吸光度スペクトル。

【図 6】PBS、pH 7.4 中での IgG コーティング Au ナノ粒子とのインキュベーション後の (A、C) 100 μM C12-Z33 および (B、D) 100 μM C12-SZ33 の TEM 画像。IgG 濃度：0.33 - 0.66 μM。

【図 7】C12-Z33 の CMC 測定。一連の濃度の C12-Z33 とインキュベートした後に Fluorolog 蛍光光度計 (Jobin Yvon、エジソン、ニュージャージー州) でモニターしたレポーター色素ナイルレッドの発光スペクトル。励起波長は 560 nm に固定した；580 ~ 720 nm で発光スペクトルをモニターした。C12-Z33 の CMC は、発光極大のブルーシフトによって決定され、遷移は、集合ナノ構造の疎水性コンパートメントへの色素の分配を示す。本明細書に示されている全てのスペクトルは、発光極大によって正規化されている。C12-Z33 の CMC 範囲：2 - 5 μM。

【図 8】RB-C12-Z33 の RP-HPLC (8A) および MALDI-TOF MS (8B) 特性評価。RP-HPLC スペクトルにより、生成物の純度が確認される (> 99%)。予想される質量は 4838.5 である。4840.2 のピークは [M + H]<sup>+</sup> に相当する。

【図 9】PBS、pH 7.4 中での 100 μM の (9A) C12-SZ33 および (9C) RB-C12-Z33 の TEM 画像。両方の分子は、それぞれ直径 1.1.5 ± 1.5 nm および 1.3.8 ± 1.8 nm のナノ纖維に自己集合した。pH 7.4 の PBS 中での 100 μM の (9B) C12-SZ33 および (9D) RB-C12-Z33 ナノ纖維の正規化 CD スペクトルは、それぞれ シートおよび ヘリックス構造を示した。

【図 10】PBS (pH 7.4) 中で 2 μM FITC-IgG とインキュベートした 100 μM RB-C12-Z33 の共焦点蛍光画像は、ローダミン B の蛍光シグナルと FITC の蛍光シグナルの共局在を示している。(A) ローダミン B 蛍光の画像。(B) FITC 蛍光の画像、および (C) (A) と (B) との合成画像。スケールバー：20 μm。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0018】

ブドウ球菌プロテイン A (SPA) は、黄色ブドウ球菌の細胞壁に元々見られるタンパク質である。3 ヘリックスバンドルに折り畳まれている 5 つの相同ドメインで構成されている。プロテイン A は、ヒトを含むほとんどの哺乳動物種の免疫グロブリン G (別名 IgG) の Fc 部分に特異的に結合するため、免疫学で重要な役割を果たす。プロテイン A の広範な構造的および生化学的研究が実施されている。SPA をコードする最初の遺伝子は、1984 年にクローニング、配列決定、および発現され、プロテイン A に基づく多数の合成および最小化された IgG 結合ドメインが続いた。このうち、Z-58 ドメインは、アフィニティクロマトグラフィーおよびアフィニティ沈殿で広く使用される最初で最も有名な合成ドメインである。別の最小化された結合ドメイン Z-33 が、分子の機能を大きく変えることなく、1996 年に得られた。

10

20

30

40

50

## 【0019】

いくつかの実施形態によれば、本発明は、SPAの抗体結合ドメインのアミノ酸配列を修飾および/または誘導体化してIFのビルディングユニットとして働く免疫両親媒性物質にする方法を提供する。本明細書に記載されるのは、IgG抗体またはその部分もしくは断片の結合に有用なIFの設計および作成の例である。生理的pH範囲の水溶液で免疫纖維が形成されると、表面に提示される露出した生理活性エピトープ（結合部位）は、IgGに特異的に結合することができる。

## 【0020】

一実施形態によれば、本発明は、直鎖炭化水素鎖に結合した抗体結合ペプチドを含む免疫両親媒性物質を提供する。

10

## 【0021】

一実施形態によれば、本発明は、直鎖炭化水素鎖に結合した抗体結合ペプチドを含む免疫両親媒性物質を提供し、免疫両親媒性物質は、生理的pHの水溶液中にあるときにヘリックス構造を有する。

## 【0022】

一実施形態によれば、本発明は、直鎖炭化水素鎖に結合した抗体結合ペプチドを含む免疫両親媒性物質であって、抗体結合ペプチドが黄色ブドウ球菌のプロテインAのZ33ペプチドの親水性アミノ酸配列、またはその機能的部分もしくは断片もしくは誘導体を有する免疫両親媒性物質を提供する。

20

## 【0023】

別の実施形態によれば、本発明は、直鎖炭化水素鎖に結合した抗体結合ペプチドを含む免疫両親媒性物質であって、抗体結合ペプチドがアミノ酸配列FNMQQQRFFYEALHDPNLNEEQRANKIKSIRDD（配列番号1）、またはその機能的部分もしくは断片もしくは誘導体を有する免疫両親媒性物質を提供する。

## 【0024】

本明細書で使用される場合、「免疫両親媒性物質」という用語は、「免疫纖維」と呼ばれる個々の安定した超分子ナノ構造に自発的に会合することができる分子を意味する。一般的に、IFは、約2.8～約7.5のpH範囲で集合することができる。しかしながら、結合特性はpHにも依存する。より正に帯電したIFは、より高いpHの溶液で会合しやすく、逆に、負に帯電したIFは、より低いpHの溶液中で会合しやすくなる。

30

## 【0025】

いくつかの実施形態では、親水性ペプチドは、8～22個の炭素を有する炭化水素尾部に結合しており、直線状であるか、分岐していてもよい。水溶液への溶解性を考慮すると、炭素数には上限がある。親水性ペプチドは、ナノ構造の水溶性を高め、円柱状または球状ミセル、中空ナノチューブ、トロイド、ディスクおよびベシクルを含むが、これらに限られない明確なナノ構造アーキテクチャの形成を、好ましい二次構造形成、例えばベータシート、アルファヘリックス、ポリプロリンタイプIIヘリックス、ベータターンを通じて促進することができる。

## 【0026】

本明細書で使用する場合、「抗体結合ペプチド」という用語は、抗体または抗体分子の特定の部分、例えばFc部分に高い特異性で結合する能力を有する、例えば約10<sup>-6</sup>M～約10<sup>-10</sup>MのK<sub>d</sub>を有するペプチドを意味する。

40

## 【0027】

いくつかの実施形態では、抗体結合ペプチドは、黄色ブドウ球菌のプロテインAのZドメインの2ヘリックス誘導体ペプチドZ33の親水性アミノ酸配列、またはその機能的部分もしくは断片もしくは誘導体である。

## 【0028】

本明細書で使用される場合、プロテインAのZ33ペプチドは、FNMQQQRFFYEALHDPNLNEEQRANKIKSIRDD（配列番号1）のアミノ酸配列を有する。

50

## 【0029】

「アミノ酸」という用語には、天然の - アミノ酸の残基（例えば、A l a、A r g、A s n、A s p、C y s、G l u、G l n、G l y、H i s、L y s、I l e、L e u、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、およびV a l）のDまたはL型、ならびに - アミノ酸、合成および非天然アミノ酸が含まれる。多くのタイプのアミノ酸残基がポリペプチドに有用であり、本発明は天然の遺伝的にコードされたアミノ酸に限定されない。本明細書に記載のペプチドに利用することができるアミノ酸の例は、例えば、F a s m a n, 1989, C R C P r a c t i c a l H a n d b o o k o f B i o c h e m i s t r y a n d M o l e c u l a r B i o l o g y, C R C P r e s s, I n c、およびその中に引用されている参考文献に見出すことができる。幅広いアミノ酸残基の別の供給源は、R S P A m i n o A c i d s L L C のW e b サイトで提供されている。10

## 【0030】

本明細書における「誘導体」への言及には、本発明の発明的抗体結合ペプチドの部位、断片、および部分が含まれる。誘導体には、单一もしくは複数のアミノ酸の置換、欠失、および/または付加も含まれる。相同体には、同じ種のヘビから、またはヘビの同じ属もしくはファミリーからの毒液からの機能的、構造的または立体化学的に類似したペプチドが含まれる。そのような相同体は全て、本発明によって企図される。

## 【0031】

類似体および模倣物には、非天然アミノ酸を含む分子、またはアミノ酸を含まないがそれでもペプチドと機能的に同じように振る舞う分子を含む分子が含まれる。天然物のスクリーニングは、類似体および模倣物を特定するための有用な戦略の1つである。20

## 【0032】

ペプチド合成中に非天然アミノ酸および誘導体を組み込む例には、ノルロイシン、4 - アミノ酪酸、4 - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 5 - フェニルペントン酸、6 - アミノヘキサン酸、t - ブチルグリシン、ノルバリン、フェニルグリシン、オルニチン、サルコシン、4 - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 6 - メチルヘプタン酸、2 - チエニルアラニンおよび/またはアミノ酸のD - 異性体の使用が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で企図される既知の非天然アミノ酸の部分的なリストを表1に示す。

## 【0033】

表1：非天然アミノ酸30

【表 1 - 1】

表 1 : 非天然アミノ酸

非従来型	コード	非従来型	コード
アミノ酸		アミノ酸	
$\alpha$ -アミノ酪酸	Abu	L-N-メチルアラニン	Nmala
$\alpha$ -アミノ- $\alpha$ -メチルブチレート	Mgabu	L-N-メチルアルギニン	Nmarg
アミノシクロプロパンー	Cpro	L-N-メチルアスパラギン	Nmasn
カルボキシレート		L-N-メチルアスパラギン酸	Nmasp
アミノイソ酪酸	Aib	L-N-メチルシスティン	Nmcys
アミノノルボミルー	Norb	L-N-メチルグルタミン	Nmgln
カルボキシレート		L-N-メチルグルタミン酸	Nmglu
シクロヘキシルアラニン	Chexa	L-N-メチルヒスチジン	Nmhis
シクロペンチルアラニン	Cpen	L-N-メチルイソロイシン	Nmile
D-アラニン	Dal	L-N-メチルロイシン	Nmleu
D-アルギニン	Darg	L-N-メチルリジン	Nmlys
D-アスパラギン酸	Dasp	L-N-メチルメチオニン	Nmmet
D-システイン	Dcys	L-N-メチルノルロイシン	Nmnele
D-グルタミン	Dgln	L-N-メチルノルバリン	Nmava
D-グルタミン酸	Dglu	L-N-メチルオルニチン	Nmorn
D-ヒスチジン	Dhis	L-N-メチルフェニルアラニン	Nmphe
D-イソロイシン	Dile	L-N-メチルプロリン	Nmpro
D-ロイシン	Dleu	L-N-メチルセリン	Nmser
D-リジン	Dlys	L-N-メチルスレオニン	Nmthr
D-メチオニン	Dmet	L-N-メチルトリプトファン	Nmtrp
D-オルニチン	Dorn	L-N-メチルチロシン	Nmtyr
D-フェニルアラニン	Dphe	L-N-メチルバリン	Nmval
D-プロリン	Dpro	L-N-メチルエチルグリシン	Nmetg
D-セリン	Dser	L-N-メチル- $\alpha$ -ブチルグリシン	Nntbug
D-スレオニン	Dthr	L-ノルロイシン	Nle
D-トリプトファン	Dtrp	L-ノルバリン	Nva
D-チロシン	Dtyr	$\alpha$ -メチル- $\alpha$ -アミノイソブチレート	Maib
D-バリン	Dval	$\alpha$ -メチル- $\gamma$ -アミノブチレート	Mgabu
D- $\alpha$ -メチルアラニン	Dmala	$\alpha$ -メチルシクロヘキシルアラニン	Mchexa
D- $\alpha$ -メチルアルギニン	Dmarg	$\alpha$ -メチルシクロペンチルアラニン	Mcpen
D- $\alpha$ -メチルアスパラギン	Dmasn	$\alpha$ -メチル- $\alpha$ -ナフチルアラニン	Manap
D- $\alpha$ -メチルアスパラギン酸	Dmasp	$\alpha$ -メチルペニシラミン	Mpen
D- $\alpha$ -メチルシスティン	Dmcys	N-(4-アミノブチル)グリシン	Nglu
D- $\alpha$ -メチルグルタミン	Dmgln	N-(2-アミノエチル)グリシン	Naeg
D- $\alpha$ -メチルヒスチジン	Dmhis	N-(3-アミノプロピル)グリシン	Norn
D- $\alpha$ -メチルイソロイシン	Dmile	N-アミノ- $\alpha$ -メチルブチレート	Nmaabu
D- $\alpha$ -メチルロイシン	Dmleu	$\alpha$ -ナフチルアラニン	Anap
D- $\alpha$ -メチルリジン	Dmlys	N-ペニジルグリシン	Nphe
D- $\alpha$ -メチルメチオニン	Dmmet	N-(2-カルバミルエチル)グリシン	Ngln
D- $\alpha$ -メチルオルニチン	Dmorn	N-(カルバミルメチル)グリシン	Nasn
D- $\alpha$ -メチルフェニルアラニン	Dmphe	N-(2-カルボキシエチル)グリシン	Nglu
D- $\alpha$ -メチルプロリン	Dmpro	N-(カルボキシメチル)グリシン	Nasp
D- $\alpha$ -メチルセリン	Dmser	N-シクロブチルグリシン	Ncbut
D- $\alpha$ -メチルスレオニン	Dmthr	N-シクロヘプチルグリシン	Nchep
D- $\alpha$ -メチルトリプトファン	Dmtrp	N-シクロヘキシルグリシン	Nchex
D- $\alpha$ -メチルチロシン	Dmty	N-シクロデシルグリシン	Ncdec
D- $\alpha$ -メチルバリン	Dmval	N-シクロドデシルグリシン	Ncdod
D-N-メチルアラニン	Dnmala	N-シクロオクチルグリシン	Ncoct
D-N-メチルアルギニン	Dnmarg	N-シクロプロピルグリシン	Ncpo
D-N-メチルアスパラギン	Dnmasn	N-シクロウニデシルグリシン	Ncund
D-N-メチルアスパラギン酸	Dnmasp	N-(2, 2-ジフェニルエチル)グリシン	Nbhm
D-N-メチルシスティン	Dnmcys	N-(3, 3-ジフェニルプロピル)グリシン	Nbhe
D-N-メチルグルタミン	Dnmgln	N-(3-グアニジノプロピル)グリシン	Narg
D-N-メチルグルタメート	Dnmglu	N-(1-ヒドロキシエチル)グリシン	Nthr
D-N-メチルヒスチジン	Dnmhis	N-(ヒドロキシエチル)グリシン	Nser

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

D-N-メチルイソロイシン	Dnmile	N-(イミダゾリルエチル)グリシン	Nhis
D-N-メチルロイシン	Dnmleu	N-(3-インドリルエチル)グリシン	Nhtrp
D-N-メチルリジン	Dnmlys	N-メチルルーチアミノブチレート	Nmgabu
N-メチルシクロヘキシルアラニン	Nmchexa	D-N-メチルメチオニン	Dnmmet
D-N-メチルオルニチン	Dnmorn	N-メチルシクロベンチルアラニン	Nmcpen
N-メチルグリシン	Nala	D-N-メチルフェニルアラニン	Dnmphe
N-メチルアミノイソブチレート	Nmaib	D-N-メチルプロリン	Dnmpro
N-(1-メチルプロピル)グリシン	Nile	D-N-メチルセリン	Dnmser
N-(2-メチルプロピル)グリシン	Nleu	D-N-メチルスレオニン	Dnmthr
D-N-メチルトリプトファン	Dnmtrp	N-(1-メチルエチル)グリシン	Nval
D-N-メチルチロシン	Dnmtyr	N-メチルナフチルアラニン	Nmanap
D-N-メチルバリン	Dnmval	N-メチルペニシラミン	Nmpen
γ-アミノ酪酸	Gabu	N-(p-ヒドロキシフェニル)グリシン	Nhtyr
L-t-ブチルグリシン	Tbug	N-(チオメチル)グリシン	Ncys
L-エチルグリシン	Etg	ペニシラミン	Pen
L-ホモフェニルアラニン	Hphe	L-α-メチルアラニン	Mala
L-α-メチルアルギニン	Marg	L-α-メチルアスパラギン	Masn
L-α-メチルアスパラギン酸	Masp	L-α-メチル-t-ブチルグリシン	Mtbug
L-α-メチルシステイン	Mcys	L-メチルエチルグリシン	Metg
L-α-メチルグルタミン	Mgln	L-α-メチルグルタミン酸	Mglu
L-α-メチルヒスチジン	Mhis	L-α-メチルホモフェニルアラニン	Mhphe
L-α-メチルイソロイシン	Mile	N-(2-メチルオキセチル)グリシン	Nmet
L-α-メチルロイシン	Mleu	L-α-メチルリジン	Mlys
L-α-メチルメチオニン	Mmet	L-α-メチルノルロイシン	Mnle
L-α-メチルノルバリン	Mnva	L-α-メチルオルニチン	Morn
L-α-メチルフェニルアラニン	Mphe	L-α-メチルプロリン	Mpro
L-α-メチルセリン	Mser	L-α-メチルスレオニン	Mthr
L-α-メチルトリプトファン	Mtrp	L-α-メチルチロシン	Mtyr
L-α-メチルバリン	Mval	L-N-メチルホモフェニルアラニン	Nmhphe
N-(N-(2,2-ジフェニルエチル)	Nnbhm	N-(N-(3,3-ジフェニルプロピル)	Nnbhe
カルバミルメチル)グリシン		カルバミルメチル)グリシン	
1-カルボキシ-1-(2,2-ジフェニル-エチルアミノ)シクロプロパン	Nmbo		

10

20

30

## 【0034】

本明細書で企図される対象ペプチドの類似体には、ペプチド合成中の側鎖への修飾、非天然アミノ酸および/またはそれらの誘導体の組み込み、および架橋剤の使用、ならびにペプチド分子またはそれらの類似体に立体構造上の制約を課す他の方法が含まれる。

## 【0035】

本発明により意図される側鎖修飾の例には以下が含まれる：アルデヒドとの反応による還元的アルキル化とそれに続くNaBH<sub>4</sub>での還元などによるアミノ基の修飾；メチルアセトイミデートによるアミジン化；無水酢酸によるアシル化；シアノ酸塩によるアミノ基のカルバモイル化；2、4、6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)によるアミノ基のトリニトロベンジル化；無水コハク酸およびテトラヒドロ無水フタル酸によるアミノ基のアシル化；リジンのピリドキサール-5-リン酸によるピリドキシル化とそれに続くNaBH<sub>4</sub>による還元。

## 【0036】

アルギニン残基のグアニジン基は、2,3-ブタンジオン、フェニルグリオキサールおよびグリオキサールなどの試薬との複素環縮合生成物の形成により修飾され得る。

## 【0037】

カルボキシル基は、O-アシルイソ尿素形成を介したカルボジイミド活性化とそれに続く、例えば対応するアミドへのその後の誘導体化により修飾され得る。

## 【0038】

スルフヒドリル基は、以下などの方法で修飾され得る：ヨード酢酸またはヨードアセト

40

50

アミドによるカルボキシメチル化；システイン酸への過ギ酸酸化；他のチオール化合物との混合ジスルフィドの形成；マレイミド、無水マレイン酸または他の置換マレイミドとの反応；4-クロロメルクリ安息香酸、4-クロロメルクリフェニルフェニルスルホン酸、塩化フェニル水銀、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノールおよびその他の水銀を使用した水銀誘導体の形成；アルカリ性pHでのシアノ酸塩によるカルバモイル化。

【0039】

トリプトファン残基は、例えば、N-ブロモスクシンイミドによる酸化または2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブロミドまたはハロゲン化スルフェニルによるインドール環のアルキル化によって修飾され得る。一方、チロシン残基は、テトラニトロメタンによるニトロ化により変更され、3-ニトロチロシン誘導体を形成し得る。

10

【0040】

ヒスチジン残基のイミダゾール環の修飾は、ヨード酢酸誘導体によるアルキル化またはジエチルピロカルボネートによるN-カルボエトキシリ化によって達成され得る。

【0041】

架橋剤を使用して、例えば3D構造を安定化することができ、 $n = 1 \sim n = 6$  の ( $\text{CH}_2$ ) $n$ スペーサー基を持つ二官能性イミドエステルなどのホモ二官能性架橋剤、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、および通常N-ヒドロキシスクシンイミドなどのアミノ反応性部分と、マレイミドまたはジチオ部位 (SH) またはカルボジイミド (COOH) などの別の基特異的反応性部位とを含むヘテロ二官能性試薬を使用する。さらに、ペプチドは以下によって立体構造的に制約され得る：例えば、C および N-メチルアミノ酸の取り込み、アミノ酸のC およびC 原子間の二重結合の導入、ならびにNおよびC末端間、2つの側鎖間、または側鎖およびNもしくはC末端間のアミド結合の形成などの共有結合を導入することによる環状ペプチドまたは類似体の形成。

20

【0042】

本明細書で使用される「ペプチド」という用語は、長さが4~100アミノ酸残基、好ましくは長さが約10~80残基、より好ましくは長さが15~65残基の配列を含み、ここで、1つのアミノ酸の - カルボキシル基は、隣接するアミノ酸の主鎖（または）アミノ基にアミド結合によって結合されている。

【0043】

いくつかの他の実施形態によれば、例えばダイアフィルトレーションなどのいくつかのろ過方法を使用して、結合した抗体から免疫纖維を分離することができる。

30

【0044】

いくつかの実施形態によれば、一般に、本発明は、試料中の抗体またはFc融合タンパク質を生理学的pHの水溶液中で本発明の免疫纖維と混合することにより、抗体またはFc融合タンパク質を精製する方法を提供し、免疫纖維が抗体またはFc融合タンパク質のFc部分に結合することができるようとする。いくつかの実施形態では、免疫纖維はプロテインAのZ33部分を含み、抗体のFc部分に特異的である。しばらくして免疫纖維が結合することができるようになると、免疫纖維は溶液中に免疫纖維-抗体または免疫纖維-Fc融合タンパク質複合体を形成する。次いで、形成された複合体を、例えば塩誘導沈殿および遠心分離を含む多くの既知分離手段により、試料中の非結合免疫纖維および抗体またはFc融合タンパク質ならびに他の成分から分離することができる。分離された複合体は、酸性pHの別の溶液に導入され、免疫纖維は抗体またはFc融合タンパク質に対する結合アフィニティを失う。次いで、ダイアフィルトレーションまたは他の手段などの濾過により、抗体またはFc融合タンパク質を解離した免疫纖維から分離することができ、解離したモノマーも同様に除去することができる。

40

【0045】

本明細書で使用される「試料」という用語は、本発明の免疫纖維を使用して結合することができる目的の抗体または目的のFc融合タンパク質を含む任意の試料または溶液もしくは液体もしくは混合物を意味する。いくつかの実施形態では、試料は生体試料であり得る。例えば、試料には、例えば、細胞培養物、細胞溶解物、および清澄化バルク（例えば

50

、清澄化細胞培養上澄)が含まれる。場合により、試料は、目的の抗体またはFc融合タンパク質を発現する宿主細胞または生物から(自然にまたは組換え的に)産生される。例えば、細胞培養物中の細胞には、目的の抗体またはFc融合タンパク質をコードする核酸を含む発現構成体でトランスフェクトされた宿主細胞が含まれる。これらの宿主細胞は、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、または好ましくは培養で増殖された動物細胞であり得る。細菌宿主細胞には大腸菌細胞が含まれるが、これに限定されない。適切な大腸菌株の例には以下が含まれる:HB101、DH5、GM2929、JM109、KW251、NM538、NM539、および外来DNAを切断できない任意の大腸菌株。使用され得る真菌宿主細胞には、サッカロマイセス・セレビシエ、ピキア・パストリスおよびアスペルギルス細胞が含まれるが、これらに限定されない。使用され得る昆虫細胞には、カイコガ、ヨトウガ、ツマジロクサヨトウ、イラクサギンウワバ、キイロショウジョウバエが含まれるが、これらに限定されない。多くの哺乳類細胞株が適切な宿主細胞であり、例えば、CHO、COS、PER.C6、TM4、VERO076、DXB11、MDCK、BRL-3A、W138、Hep G2、MMT、MRC-5、FS4、CHO、293T、A431、3T3、CV-1、C3H10T1/2、Colo205、293、HeLa、L細胞、BHK、HL-60、FRHL-2、U937、Hak、Jurkat細胞、Rat2、BaF3、32D、FDCP-1、PC12、M1x、マウス骨髄腫(例えば、SP2/0およびNS0)およびC2C12細胞、ならびに形質転換霊長類細胞株、ハイブリドーマ、正常な二倍体細胞、および初代組織と初代外植体のin vitro培養から得られた細胞株が含まれる。

#### 【0046】

本発明の1つ以上の実施形態によれば、「生体試料」または「生体液」という用語は、生存患者もしくは以前に生存していた患者または哺乳動物または培養細胞からの物質の任意量を含むが、これらに限定されないことが理解される。そのような物質には、血液、血清、血漿、尿、細胞、臓器、組織、骨、骨髄、リンパ、リンパ節、滑膜組織、軟骨細胞、滑膜マクロファージ、内皮細胞、皮膚、細胞培養、細胞溶解物、および清澄化バルク(例えば、清澄化細胞培養上澄)が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0047】

本発明のある特定の実施形態では、本発明を使用して精製されたタンパク質は抗体である。「抗体」という用語は、モノクローナル抗体(完全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、抗体断片、イムノアドヘシンおよび抗体-イムノアドヘシンキメラを包含する最も広い意味で使用される。

#### 【0048】

「抗体断片」には、少なくとも抗体のFc部分、および典型的にはその抗原結合または可変領域が含まれる。

#### 【0049】

「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同質な抗体の集団から得られる抗体であって、集団を構成する個々の抗体が、少量で存在する可能性のある自然発生突然変異を除いて同一であるような抗体を指す従来の意味で使用される。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、单一抗原部位指向性である。これは、典型的には抗原の様々な決定基(エピトープ)に対して指向性である多様な抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的であるが、モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して指向性である。抗体の説明における「モノクローナル」という用語は、抗体の実質的に同質な集団から得られるという抗体の特性を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明で使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 256:495 (1975)によって最初に記載された従来のハイブリドーマ技術を使用して産生することができ、または組換えDNA法を使用して作製することができる(例えば、米国特許第4,816,567号明細書を参照)。モノクローナル抗体は、例えば以下に記載されている技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから分離することもできる:Clackson et al., Nature 352

10

20

30

40

50

: 6 2 4 - 6 2 8 ( 1 9 9 1 ) ; Marks et al . , J . Mol . Bio l . 2 2 2 : 5 8 1 - 5 9 7 ( 1 9 9 1 ) ; ならびに米国特許第 5 , 2 2 3 , 4 0 9 ; 5 , 4 0 3 , 4 8 4 ; 5 , 5 7 1 , 6 9 8 ; 5 , 4 2 7 , 9 0 8 5 , 5 8 0 , 7 1 7 ; 5 , 9 6 9 , 1 0 8 ; 6 , 1 7 2 , 1 9 7 ; 5 , 8 8 5 , 7 9 3 ; 6 , 5 2 1 , 4 0 4 ; 6 , 5 4 4 , 7 3 1 ; 6 , 5 5 5 , 3 1 3 ; 6 , 5 8 2 , 9 1 5 ; および 6 , 5 9 3 , 0 8 1 号明細書 ) 。

【 0 0 5 0 】

本明細書に記載のモノクローナル抗体には、「キメラ」および「ヒト化」抗体が含まれ、その重鎖および／または軽鎖の一部は、特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同である一方、鎖（単数または複数）の残りの部分は、所望の生物活性を示す限り、別の種に由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、ならびにそのような抗体の断片の対応する配列と同一または相同である（米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号；および Morrison et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . USA 8 1 : 6 8 5 1 - 6 8 5 5 ( 1 9 8 4 ) ）。非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの超可変領域残基は、望ましい特異性、アフィニティ、および容量を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト靈長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域残基に置き換えられている。場合によっては、ヒト免疫グロブリンの Fv フレームワーク領域（ F R ）残基は、対応する非ヒト残基に置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの実質的に全ての可変ドメインを含み、全てまたは実質的に全ての超可変ループは非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てまたは実質的に全ての F R 領域はヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、任意に、免疫グロブリン定常領域（ Fc ）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部も含む。詳細については、 Jones et al . , Nature 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 ( 1 9 8 6 ) ； Riechmann et al . , Nature 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 9 ( 1 9 8 8 ) ；および Presta , Curr . Op . Struct . Biol . 2 : 5 9 3 - 5 9 6 ( 1 9 9 2 ) を参照。

【 0 0 5 1 】

本明細書に記載されるモノクローナル抗体には「ヒト」抗体も含まれ、これは、例えばヒト患者の血液またはトランスジェニック動物を使用して組換えにより調製されたものなど、様々な供給源から単離することができる。そのようなトランスジェニック動物の例には、ヒト重鎖トランス遺伝子およびヒト軽鎖トランス染色体を有する KM - M O U S E ( 登録商標 ) (( Medarex , Inc . 、プリンストン、ニュージャージー州 ) ( WO 0 2 / 4 3 4 7 8 を参照 ) 、 X E N O M O U S E ( 登録商標 ) ( Abgenix , Inc . 、フレモント、カリフォルニア州；例えば、 Kucherlapati らに対する米国特許第 5 , 9 3 9 , 5 9 8 ; 6 , 0 7 5 , 1 8 1 ; 6 , 1 1 4 , 5 9 8 ; 6 , 1 5 0 , 5 8 4 および 6 , 1 6 2 , 9 6 3 号明細書に記載 ) 、および H U M A B - M O U S E ( 登録商標 ) ( Medarex , Inc . ；例えば、以下に記載されている : Taylor , L . et al . ( 1 9 9 2 ) N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 2 0 : 6 2 8 7 - 6 2 9 5 ; Chen , J . et al . ( 1 9 9 3 ) I n t e r n a t i o n a l I m m u n o l o g y 5 : 6 4 7 - 6 5 6 ; T u a i l l o n et al . ( 1 9 9 3 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 9 0 : 3 7 2 0 - 3 7 2 4 ; Choi et al . ( 1 9 9 3 ) N a t u r e G e n e t i c s 4 : 1 1 7 - 1 2 3 ; Chen , J . et al . ( 1 9 9 3 ) E M BO J . 1 2 : 8 2 1 - 8 3 0 ; T u a i l l o n et al . ( 1 9 9 4 ) J . I m m u n o l . 1 5 2 : 2 9 1 2 - 2 9 2 0 ; Taylor , L . et a 50

1. (1994) International Immunology 6: 579 - 591; and Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845 - 851、米国特許5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; and 5,770,429; 5,545,807; およびKormanらに対するPCT公開番号WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 and WO 99/45962, WO 01/14424)。本発明のヒトモノクローナル抗体は、免疫時にヒト抗体応答が生成されるように、ヒト免疫細胞が再構成されたSCIDマウスを使用して調製することもできる。そのようなマウスは、例えば、Wilsonらの米国特許第5,476,996および5,698,767号明細書に記載されている。

【実施例】

【0052】

材料。全てのFmocアミノ酸および樹脂をAdvanced Automated Peptide Protein Technologies (APPTEC、ルイビル、ケンタッキー州、UXSA)から購入し、Fmoc-Lys (Fmoc)をNovabiochem (サンディエゴ、カリフォルニア州、USA)から入手した。治療用ヒトIgG1 (IgG1)をBristol-Myers Squibb (ボストン、マサチューセッツ州、USA)から入手し、IgG溶出緩衝液をThermo Fisher Scientific (ロックフォード、イリノイ州、USA)から調達した。全ての他の試薬をVWR (ラドナー、ペンシルベニア州、USA)から入手し、さらなる精製なしでそのまま使用した。

【0053】

分子合成。C12-Z33および2C8-Z33免疫両親媒性物質を、同様の方法を使用して合成した。簡単に説明すると、Z33ペプチドを最初に、標準的な9-フルオニルメトキシカルボニル (Fmoc) 固相合成プロトコルを使用して、Focus XC自動ペプチド合成機 (APPTEC、ルイビル、ケンタッキー州) で合成した。次に、C12 (または2C8) アルキル鎖を、Z33ペプチドのN末端 (Fmoc除去後) で、Z33ペプチドに対してラウリン酸 (またはオクタン酸) / HBTU/DIEAを4 (または8) : 4 : 6 の比率で手動でカップリングさせ、室温で一晩振とうした。Fmoc脱保護を、DMF溶液中の20%4-メチルピペリジンを使用して10分間実行し、もう1回繰り返した。全ての場合において、遊離アミンのニンヒドリン試験 (Anaspec Inc.、フレモント、カリフォルニア州) によって反応をモニターした。完成したペプチドを、2.5時間、92.5 : 5 : 2.5 の比率のTFA/TIS/H<sub>2</sub>Oの混合物を使用して、固体支持体から切断した。過剰のTFAを回転蒸発により除去し、冷ジエチルエーテルを加えてクルードペプチドを沈殿させた。遠心分離法により、沈殿したペプチドとジエチルエーテルを6000 rpmで3分間分離した。ペプチドをジエチルエーテルでさらに2回洗浄し、溶液を遠心分離により除去した。

【0054】

IAを、25°CでVarianポリマーカラム (PLRP-S、100、10 μm、150 × 25 mm) を使用する分取RP-HPLCで、フラクションコレクターを備えたVarian ProStar Model 325分取HPLC (Agilent Technologies、サンタクララ、カリフォルニア州)において精製した。0.1%v/v TFAを含む水/アセトニトリル勾配を、20 ml/分の流速で溶離液として使用した。Z33ペプチドセグメントの吸光度ピークを220 nmでモニターした。クルード物質を20 mlの0.1%TFA水溶液に溶解し、各精製実験を10 ml注入で実施した。収集した画分をMALDI-ToF分析し (Bruker Autoflex III MALDI-ToF機器、ビレリカ、マサチューセッツ州)、および所望の生成物を含むものを凍結乾燥し (FreeZone - 105 4.5 L凍結乾燥機、Labconc

10

20

30

40

50

o、カンザスシティ、ミズーリ州)、-30で保存した。

【0055】

免疫両親媒性物質の自己集合およびTEMイメージング。1 mM濃度の免疫両親媒性物質をHFIPで前処理した後、1×PBSまたは脱イオン水に溶解し、室温で一晩熟成させた; 10倍希釈した試料10 μlを400平方メッシュのカーボンフィルム銅グリッド(EMS: Electron Microscopy Sciencesから)にスポットし、フィルター紙で過剰分を除去し、グリッド上に試料の薄膜を残した。試料を5分間乾燥させた後、10 μlの2%酢酸ウラニルを試料グリッドに加え、30秒後に過剰分を除去した。全ての試料を、TEMイメージングの少なくとも3時間前に乾燥させた。

【0056】

円偏光二色性分光法(CD)。両方の自己集合試料のCD実験を、Jasco J-710分光偏光計(JASCO、イーストン、メリーランド州、USA)において、1mm経路長の石英UV-VIS吸収セル(Thermo Fisher Scientific、ピッツバーグ、ペンシルベニア州、USA)を使用して25で実施した。試料を、実験前に1 mMストック溶液から1×PBS中100 μMに即座に希釈した。3回のスキャンの平均として、190~280 nmの波長範囲でスペクトルを収集した。溶媒のバックグラウンドスペクトルを取得し、試料スペクトルから差し引いた。収集したデータを、試料濃度について正規化した。

【0057】

ITC実験。高精度VP-ITC滴定熱量測定システム(Microcal Inc.)を使用して、等温滴定熱量測定実験を実施した。IgG1溶液を、15の1×PBS(pH 7.4または2.8)中の免疫両親媒性物質で滴定した。IgG1濃度を、0.1%(1 mg/ml) IgG溶液の280 nmでの質量吸光係数1.4を使用して計算した。免疫両親媒性物質の濃度を、全窒素アッセイによって決定した(Anal. Biochem., 61.2 (1974): 623-627)。各注入後に発生する熱を、熱量測定信号の積分から得た。免疫両親媒性物質のIgG1への会合に伴う熱を、希釈熱を差し引くことにより得た。データの分析を、Microcal Origin TMパッケージを使用して実行した。

【0058】

(実施例1)

全長Z33免疫両親媒性物質の分子設計。ペプチド両親媒性物質、ペプチド-ポリマー複合体、ペプチド薬物複合体などのこの両親媒性ペプチド複合体の構築を広く使用して、様々な超分子ナノ構造が作製されている。親水性Z33ペプチド配列(FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNAAKIKSIRDD)(配列番号1)および疎水性アルキル鎖からなるIgG結合免疫両親媒性物質を、免疫纖維(IF)のビルディングモチーフとして機能するように設計した。Z33ペプチドは、高い結合アフィニティ( $K_d = 43 \text{ nM}$ )でIgGのFc部分に特異的に結合するプロテインAの2ヘリックス誘導体(図1A)である。28、41-42

【0059】

2つのIA、C12-Z33および2C8-Z33(図1B)は、ラウリン酸部位(C12)、または2つのオクタン酸部位(2C8)をZ33ペプチドのN末端に直接結合させることにより合成した。図1Cに示されているように、IAは自己集合してIFになり、抗体混合液からIgGに特異的に結合することが期待されていた。純粋なZ33ペプチドも合成し、Z33分子およびZ33含有IFの生物活性を比較した。別の対照分子C12-SZ33は、C12をZ33のN末端にスクランブル配列で結合させることにより設計した。全ての分子は、自動固相ペプチド合成(SPPS)方法およびRPP-HPLCを使用して合成および精製した。合成化合物の純度および予想される分子量を、分析HPLCおよび質量分析を使用して確認した。

【0060】

(実施例2)

10

20

30

40

50

全長 Z 3 3 免疫両親媒性物質の実施形態の分子自己集合および特性評価。2つの I A の自己集合は、2工程の操作で簡単に実現できる。まず、I A をヘキサフルオロイソプロパノール (H F I P) で個別に前処理し、溶解度と自己集合形態の均一性とに影響を与える既存のナノ構造を除去した。次に、H F I P を蒸発により除去した後、脱イオン水またはリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を添加し、最終濃度を 1 mM にした。疎水性相互作用によって I F のコアにトラップされたアルキルセグメントで形成された I F と、溶媒に面したシェルに提示される生理活性 Z 3 3 配列 (図 2 A)。室温で一晩熟成した後、透過型電子顕微鏡 (T E M) および円偏光二色性 (C D) を使用して、集合ナノ構造の形態を特性評価した。

## 【0061】

10

本発明の I g G 精製方法における pH 条件の重要な役割を考慮して、pH 変動に応じた C 1 2 - Z 3 3 の自己集合挙動を評価した。一般的に、中性 pH は結合条件として通常使用され、一方で酸性 pH はプロテイン A アフィニティカラムから抗体を溶出するために使用される。<sup>32, 34</sup> 中性および低 pH での自己集合挙動を研究するために、P B S (pH 7.4) および I g G 溶出緩衝液 (pH 2.8) を、C 1 2 - Z 3 3 の自己集合の水性環境として利用した。異なる pH での C 1 2 - Z 3 3 I F の形態を、T E M (図 2 C ~ 2 F) および C D (図 2 B) で調べた。C 1 2 - Z 3 3 分子は、上記の両方の pH 条件でよく溶解し、ナノ纖維に自己集合することができるとわかった。C 1 2 - Z 3 3 溶液 100 μM からの代表的な T E M 画像は、C 1 2 - Z 3 3 が生理学的条件と酸性条件の両方ににおいて、完全に伸長したペプチド分子の長さより小さい値 (シート構造で約 22.5 nm) である直径 16.0 ± 1.7 nm のナノ纖維構造に自己集合したことを明らかにした。ナノ纖維の長さはマイクロメートルスケールで示され、うまく制御できなかった。自己集合構造内の分子パッキングをさらに理解するため、円偏光二色性 (C D) を使用してペプチドの二次構造を試験した。C 1 2 - Z 3 3 では 222 nm (n - \*) および 208 nm ( - \*) 付近に強い負の信号が観察され、自己集合状態での Z 3 3 セグメントのヘリックス二次構造の形成が示唆され、純粋な Z 3 3 ペプチドで示された通りであった。C D スペクトルと I F の測定された直径に基づいて、I F にパッキングするときにペプチドはそのヘリックス二次構造を維持すると推測するのが合理的である。P B S 溶液または I g G 溶出緩衝液中の C 1 2 - Z 3 3 の C D スペクトルは、部分的なヘリックス信号のみを維持していたが、同じ緩衝液中の Z 3 3 ペプチドと比較して、222 nm および 208 nm 付近の 2 つの負のピークの橋円率が変化したことは注目に値する。C D スペクトルのシフトは、Z 3 3 セグメントの分子パッキングをその遊離状態から変更することができる I F の形成に起因する可能性があり、その結果、結合部位に必要な特定の構造のために I g G への結合アフィニティに影響を与える可能性がある。

## 【0062】

30

## (実施例 3)

I F の結合アフィニティを測定するための I T C 実験。I F への組み込み後の Z 3 3 ペプチドの二次構造の構造変化を考慮すると、C 1 2 - Z 3 3 I F の形成が元の Z 3 3 ペプチドに存在する I g G 結合能力に影響するかどうかを知ることに大きな関心が寄せられる。自己集合 C 1 2 - Z 3 3 I F の結合アフィニティを調べるために、I g G 1 への結合の熱力学的特性を等温滴定熱量測定 (I T C) で調べた。I T C は、多くのタンパク質およびリガンド間の結合事象をモニターするために広く採用されており、<sup>43-45</sup> これは、C 1 2 - Z 3 3 I F および I g G 1 間に結合が発生するかどうかを調べる優れた方法である。<sup>46-47</sup> 結合反応に関連する熱を段階的な注入中に記録し、熱力学的解離定数 (K<sub>d</sub>)、モルエンタルピー変化 (H°)、および化学量論 (N) を含む熱力学的パラメータを直接取得することができる。<sup>44</sup>

## 【0063】

40

テーブル 1. pH 7.4 のリン酸緩衝生理食塩水中 15 で Z 3 3 ベースのリガンドが I g G 1 に結合するための熱力学的パラメーター。データはリガンドごとに報告される。

50

## 【表 2】

リガンド	$K_d$ (nM)	$\Delta G^\circ$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$-T\Delta S^\circ$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )	N
Z33	60	-9.5	-23.1	13.6	2.31
C12-Z33	650	-8.1	-9.3	1.2	3.10
2C8-Z33	1115	-7.8	-2.8	-5.0	9.13

## 【0064】

テーブル2. pH 7.4のリン酸緩衝生理食塩水中15でZ33ベースのリガンドが IgG1に結合するための熱力学的パラメーター。データはIgG1ごとに報告される。

## 【表 3】

リガンド	$K_d$ (nM)	$\Delta G^\circ$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$-T\Delta S^\circ$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )
Z33	26	-10.0	-53.4	43.4
C12-Z33	209	-8.8	-28.9	20.1
2C8-Z33	122	-9.1	-25.9	16.8

## 【0065】

典型的なITC実験では、PBS緩衝液中の100 μM C12-Z33の溶液を一晩熟成させ、15、pH 7.4の同じ緩衝液中の2 μM IgG1の溶液に注入した。典型的なサーモグラムと結合等温線を図3Aに示し、リガンドごとに報告された熱力学的パラメーターをテーブル1にまとめた。IgG1へのC12-Z33 IFの結合のITC結果は、650のK<sub>d</sub>を特徴とするエンタルピー駆動結合事象を明らかにした。C12-Z33 IFの結合効率をさらに比較して、本発明者らは、表面プラズモン共鳴で測定した43nMのK<sub>d</sub>でIgG1にしっかりと結合することが証明されたZ33ペプチドを合成した。Z33ペプチドのIgG1への結合特性を、ITCによりpH 7.4のPBS中15で測定し、典型的なサーモグラムと結合等温線を図3Cに示した。100倍良好なアフィニティに加えて、Z33の化学量論は2.3であったが、C12-Z33の見掛けの化学量論は3.1であり、IFの全てのC12-Z33をIgG1分子への結合に利用することができるわけではないことが示された。IgG1に結合することができるC12-Z33分子の効率は、Z33の化学量論をC12-Z33の化学量論で割ることにより、74.2%と見積もることができる。

## 【0066】

リガンドごとの正規化により、結合の見かけの化学量論の決定が可能になるが、テーブル2に示すように、IgGのモルあたりの正規化後に熱力学的パラメーターの比較を行う必要がある。Z33のIgGへの結合は、大きくて不利なエントロピー変化とは対照的に、大きくて有利なエンタルピーによって特徴付けられた。エンタルピーおよびエントロピー変化の規模は小さかったが、C12-Z33の結合の熱力学的特性は類似していた。C12-Z33はZ33よりも不利ではないエントロピーで結合するが、有利なエンタルピーの損失はさらに大きく、全体的に低い結合アフィニティをもたらす。有利な結合エンタルピーの全体的な損失は、IFの崩壊に関連する不利なエンタルピーによって引き起こされる可能性がある。IFの制限により、IgG1との好ましい相互作用が制限される可能性もある。C12-Z33によるIgG1の滴定を、15のIgG溶出緩衝液(pH 2.8)でも行ったのは(図3B)、IFからの溶出に適するこの低pHでの結合アフィニティが著しく低いことを示すためである。

## 【0067】

IFとIgG1との間の非特異的結合を排除するために、スクランブルZ33ペプチド配列を有するC12-SZ33を陰性対照として使用した。このC12-SZ33 IA

10

20

30

40

50

は、TEMとCDとで特徴付けられた同様の自己集合特性および二次構造を示している（データは示していない）。ITC実験は、100 μM C12-Z33 IFをpH 7.4のPBS中15の2 μM IgG1溶液に注入して結合能を測定することにより実施した。図3Dのサーモグラムと結合等温線は、IgG1とZ33ペプチド間の特異的な相互作用を示唆している。

#### 【0068】

##### （実施例4）

IFの機能の普遍性をさらに証明するために、二重鎖アルキル化 IF 2C8-Z33も、自己集合特性から IgG1への結合アフィニティまで研究した（図4A-E）。均一な直径のナノスケール IF が TEM 画像で観察され、ヘリックスの二次構造が CD で確認された。ITCの結果から、2C8-Z33と IgG1の結合は pH 7.4 の PBS 中 15 で発生したが、pH 2.8 の溶出緩衝液中では検出可能な結合は発生しなかった。2C8-Z33の結合の見掛けの化学量論は 9.1 であり、結合の効率がさらに低いことを示している。2C8-Z33はC12-Z33よりも結合のエンタルピーが有利ではないが、エントロピーからの寄与は不利ではないため、わずかに良好な結合アフィニティをもたらす（テーブル2）。上記の結果から、表面に高密度の結合部位が提示されることにより、元のZ33ペプチドで示される通り、自己集合 IF は IgG1への有利な結合能力を維持することができると示された。それにもかかわらず、エンタルピー起源である IF について観察された全体的な結合アフィニティの損失がある。有利なエンタルピーの損失は、IFの制限による相互作用の損失と、粒子の崩壊に関連する不利なエンタルピーの寄与によって説明できる。IF内の分子レベルのパッキングは、生体活性の性能に大きく影響する可能性のある形態学的ならびに機能的特性を決定する。

10

20

30

#### 【0069】

##### （実施例5）

###### （IgG分子の精製への潜在用途）

構成アミノ酸の多様性は、水素結合、スタッキング、疎水性崩壊、および自己集合ペプチドナノ纖維間の静電相互作用を含む非共有相互作用の幅広い基盤を提供する。例えば、酸性および塩基性アミノ酸の溶解度は、イオン化の程度、pH およびイオン強度に依存する特性によって決まる。したがって、帯電ペプチドの自己集合プロセスは、pHを調整するか、または塩を添加して静電反発力を減らし、凝集を促進し、さらには沈殿を促進することによって容易にすることができる。Z33ペプチドに提示される多数の荷電アミノ酸残基を考慮すると、本発明の発明的免疫纖維系の魅力的な利点は、容易に調整可能な溶解度に頼る。いったん IgG が IF に結合すると、IgG - IF 複合体は、イオン強度の高い塩を添加することで沈殿する可能性が高くなる（図5A）。

30

#### 【0070】

C12-Z33 IF は、IgG1への結合アフィニティが比較的高いため、IgG1を沈殿させる可能性を研究するために選択された。図5B(i-iii)に示すように、5 mM C12-Z33 は PBS 溶液によく溶けるが、0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の PBS 溶液では沈殿する。PBS 溶液中の C12-Z33 のゼータ電位は 7.61 mV であり、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の添加により IF の表面の電荷が遮蔽され、沈殿が誘発される可能性がある。IgG1の場合、5 mM C12-Z33 ならびに 0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> によく溶解する。しかしながら、20 μM IgG1 と 5 mM C12-Z33 を 5 分間混合した後、0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加すると、沈殿が観察された。沈殿物の組成を決定するために、2つの並列実験を実行した。0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中の 5 mM C12-Z33 を遠心分離し、紫外可視 (UV-Vis) 分光法を使用して、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の添加前後の 280 nm での上澄の吸光度変化をモニターした。0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中の 5 mM C12-Z33 と 20 μM IgG1 との混合液で同じ手順を実施した。図5Cに示すように、ほとんどの C12-Z33 IF は 0.6 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で沈殿させることができた。IgG1-IF 複合系の場合、280 nm での吸光度は IgG1 の初期吸光度を下回るレベルまで低下し、溶液から IgG1 が除去されたことを示している。より明確に、青線から緑線の値

40

50

を引くことにより、純 IgG1 の上澄の吸光度がプロットされ、60% 以上の IgG1 が上澄から除去されたことを示唆している。これまでに、IF が新しいアフィニティ沈殿剤として機能する可能性が予備的に証明された。

【0071】

(実施例 6)

(本発明の IF への IgG 結合の確認。)

TEM で IgG 構造を特定することが困難なため、免疫纖維と IgG の結合を直接視覚化することは制限された。IgG が免疫纖維の表面に存在することを確認するために、事前に形成された C12-Z33 および C12-SZ33 免疫纖維を 10 nm の IgG 標識 Au ナノ粒子とともに 2 時間別個にインキュベートした。各溶液を TEM グリッドに滴下した後、グリッドをろ紙で吸い取り、自然乾燥させた。次に、試料を酢酸ウラニルで染色する前に、結合していない Au ナノ粒子を除去するために、PBS 緩衝液でグリッドを慎重に 3 回洗浄した。密領域と疎領域の両方で IgG コーティング Au ナノ粒子とインキュベートした C12-Z33 の TEM 画像 (図 6A および 6C) は、Z33 提示ナノ纖維の表面への IgG の結合を確認した。スクランブル Z33 配列を持つ対照ナノ纖維に付着する Au ナノ粒子はほとんど観察されなかった (図 6B および 6D)。この研究は、C12-Z33 免疫纖維と IgG コーティング Au ナノ粒子の共局在化は、実際に特異的結合の結果であることを示唆している。Au ナノ粒子の密度が長い免疫纖維で比較的低かったことに注意する必要があり、ナノ纖維への自己集合後の Z33 免疫両親媒性物質のタイトパッキングのアクセスが制限されているためである可能性が高い。別の可能性は、IgG コーティング Au ナノ粒子がモノマー状態で C12-Z33 に結合し、洗浄工程で取り除かれ得ることであり、これは IgG コーティング Au ナノ粒子の IgG 濃度 (0.33-0.66 μM) が、2~5 μM である C12-Z33 の臨界ミセル濃度値以下であったことが理由である (図 7)。

【0072】

(実施例 7)

(本発明の IF との IgG 相互作用の可視化。)

C12-Z33 免疫纖維と IgG の相互作用をよりよく視覚化するために、C12-Z33 を蛍光色素 (ローダミン B) で標識すると、共焦点レーザー走査顕微鏡下で蛍光免疫纖維と FITC-IgG を直接イメージングすることができる。ローダミン B は、生体材料の染色に広く使用されている。ローダミン B 標識 C12-Z33 (RB-C12-Z33) を、Z33 の N 末端にリジンを追加することにより合成し (図 8)、ローダミン B および C12 を、新たに追加したリジンの側鎖および主鎖のアミン基に個別に結合させた。蛍光標識は C12-Z33 の結合能力を妨げないと想定されたが、これは、C12 と共に免疫纖維に自己集合した後、色素が疎水性コアに留まり、それが結合配列 Z33 から離れて位置するためである。PBS での自己集合纖維形態は、TEM を使用して確認した (図 9C)。1 mM ストック溶液から希釈した 100 μM RB-C12-Z33 と 2 μM FITC-IgG を PBS 中に事前混合した。イメージングの直前に 30 μl の溶液をきれいな顕微鏡スライドにスポットし、カバースリップで覆って液体の薄層を得た。次に、蛍光画像 (図 10A-C) を共焦点レーザー走査顕微鏡で撮影し、RB-C12-Z33 (赤色) と FITC-IgG (緑色) との両方からの蛍光シグナルの共局在を示した。FITC-IgG は、純粋な FITC-IgG 溶液および同じ条件で C12-SZ33 とインキュベートした溶液では決して観察されない大きな明るい集合体を形成することがわかった (データは示していない)。RB-C12-Z33 とインキュベートした場合の FITC-IgG の明るい蛍光と比較して、低い蛍光シグナルが PBS 溶液中または C12-SZ33 とインキュベートした後に検出された。これは、RB-C12-Z33 と FITC-IgG の結合が FITC-IgG の凝集と強い蛍光を誘発する一方で、FITC-IgG が PBS 緩衝液または C12-SZ33 の存在下でよく分散することを示した。

【0073】

本明細書に引用される出版物、特許出願、および特許を含む全ての参考文献は、各参考

10

20

30

40

50

文献が個別におよび具体的に参照により組み込まれることが示され、その全体が本明細書に示されるのと同程度に、参照により組み込まれる。

【0074】

本発明を説明する文脈における（特に以下の特許請求の範囲における）用語「a」および「an」および「the」および類似の指示対象の使用は、本明細書で特に明記しない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、単数および複数の両方を包含すると解釈されるものとする。「含む」、「有する」、「含む」、「含有する」という用語は、特に断りのない限り、非限定的用語（つまり、「含むが、これに限定されない」を意味する）と解釈される。本明細書での値の範囲の列挙は、本明細書で特に明記しない限り、範囲内に入る各個別の値を個別に参照する略記法として機能することを単に意図しており、各個別の値は、本明細書で個別に列挙されているかのように明細書に組み込まれている。本明細書で説明される全ての方法は、本明細書で特に指示されない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実行することができる。本明細書で提供されるありとあらゆる例または例示的言葉（例えば「など」）の使用は、単に本発明をより良く説明することを意図しており、特に請求されない限り、本発明の範囲を限定するものではない。明細書中の言語は、特許請求されていない要素が本発明の実施に不可欠であることを示すと解釈されるべきではない。

10

【0075】

本発明を実施するために発明者に知られている最良の形態を含む、本発明の好ましい実施形態が本明細書に記載されている。これらの好ましい実施形態の変形形態は、前述の説明を読めば当業者に明らかになる可能性がある。本発明者は、当業者がそのような変形形態を適切に使用することを期待し、本発明は、本明細書に具体的に記載されている以外の方法で実施されることを意図している。したがって、本発明は、適用法で許可されるように、本明細書に添付された特許請求の範囲に列挙された主題の全ての修正および等価物を含む。さらに、その全ての可能な変形形態における上記要素の任意の組み合わせは、本明細書で特に明記しない限り、または文脈により明らかに矛盾しない限り、本発明に含まれる。

20

【0076】

（参考資料）

1. Altunbas, A.; Lee, S. J.; Rajasekaran, S. A.; Schneider, J. P.; Pochan, D. J., Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable drug delivery vehicles. *Biomaterials* 2011, 32 (25), 5906-14.
2. Chow, L. W.; Wang, L. J.; Kaufman, D. B.; Stupp, S. I., Self-assembling nanostructures to deliver angiogenic factors to pancreatic islets. *Biomaterials* 2010, 31 (24), 6154-61.
3. Koutsopoulos, S.; Zhang, S., Two-layered injectable self-assembling peptide scaffold hydrogels for long-term sustained release of human antibodies. *J Control Release* 2012, 160 (3), 451-8.
4. Lock, L. L.; Reyes, C. D.; Zhang, P. C.; Cui, H. G., Tuning Cellular Uptake of Molecular Probes by Rational Design of Their Assembly into Supramolecular Nanoprobes. *Journal of the American Chemical Society* 2

30

40

50

- 0 1 6 , 1 3 8 ( 1 0 ) , 3 5 3 3 - 3 5 4 0 .
- 5 . Cheetham , A . G . ; Zhang , P . C . ; Lin , Y . A . ; Lock , L . L . ; Cui , H . G . , Supramolecular Nanostructures Formed by Anticancer Drug Assembly . Journal of the American Chemical Society 2013 , 135 ( 8 ) , 2907 - 2910 .
- 6 . Hu , Y . ; Lin , R . ; Patel , K . ; Cheetham , A . G . ; Kan , C . Y . ; Cui , H . G . , Spatiotemporal control of the creation and immolation of peptide assemblies . Coordination Chemistry Reviews 2016 , 320 , 2 - 17 . 10
- 7 . Ma , W . ; Cheetham , A . G . ; Cui , H . G . , Building nanostructures with drugs . Nano Today 2016 , 11 ( 1 ) , 13 - 30 .
- 8 . Black , M . ; Trent , A . ; Kostenko , Y . ; Lee , J . S . ; Olive , C . ; Tirrell , M . , Self - Assembled Peptide Amphiphile Micelles Containing a Cytotoxic T - Cell Epitope Promote a Protective Immune Response In Vivo . Adv Mater 2012 , 24 ( 28 ) , 3845 - 3849 . 20
- 9 . Shimada , T . ; Lee , S . ; Bates , F . S . ; Hotta , A . ; Tirrell , M . , Wormlike micelle formation in peptide - lipid conjugates driven by secondary structure transformation of the headgroups . The journal of physical chemistry . B 2009 , 113 ( 42 ) , 13711 - 4 .
- 10 . Trent , A . ; Marullo , R . ; Lin , B . ; Black , M . ; Tirrell , M . , Structural properties of soluble peptide amphiphile micelles . Soft Matter 2011 , 7 ( 20 ) , 9572 - 9582 . 30
- 11 . Cui , H . ; Webber , M . J . ; Stupp , S . I . , Self - assembly of peptide amphiphiles : from molecules to nanostructures to biomaterials . Biopolymers 2010 , 94 ( 1 ) , 1 - 18 .
- 12 . Hartgerink , J . D . ; Beniash , E . ; Stupp , S . I . , Self - assembly and mineralization of peptide amphiphile nanofibers . Science 2001 , 294 ( 5547 ) , 1684 - 1688 .
- 13 . Niece , K . L . ; Hartgerink , J . D . ; Donners , J . J . ; Stupp , S . I . , Self - assembly combining two bioactive peptide - amphiphile molecules into nanofibers by electrostatic attraction . Journal of the American Chemical Society 2003 , 125 ( 24 ) , 7146 - 7147 . 40
- 14 . Webber , M . J . ; Tongers , J . ; Renault , M . A . ; Roncalli , J . G . ; Losordo , D . W . ; Stupp , S . I . , Development of bioactive peptide amphiphiles for therapeutic cell delivery . Acta Biomater 2010 , 6 ( 1 ) , 3 - 11 . 50

15. Cui, H. G.; Cheetham, A. G.; Pashuck, E. T.; Stupp, S. I., Amino Acid Sequence in Constitutionally Isomeric Tetrapeptide Amphiphiles Dictates Architecture of One-Dimensional Nanostructures. *Journal of the American Chemical Society* 2014, 136 (35), 12461-12468.
16. Moyer, T. J.; Finbloom, J. A.; Chen, F. ; Toft, D. J.; Cryns, V. L.; Stupp, S. I., pH and Amphiphilic Structure Direct Supramolecular Behavior in Biofunctional Assemblies. *Journal of the American Chemical Society* 2014, 136 (42), 14746-14752. 10
17. Webber, M. J.; Tongers, J.; Renault, M. -A.; Roncalli, J. G.; Losordo, D. W.; Stupp, S. I., Reprint of: Development of bioactive peptide amphiphiles for therapeutic cell delivery. *Acta biomaterialia* 2015, 23, S42-S51.
18. Yu, Y.; Sleep, E.; Stupp, S. I.; Qin, G. J., Novel Bioactive Peptide Amphiphiles Nanofibers for Enhancement of Human Cd34+ Cell Mediated Ischemic Tissue Repair. *Circulation* 2013, 128 (Suppl 22), A19043-A19043. 20
19. Arslan, E.; Garip, I. C.; Gulseren, G.; Tekinay, A. B.; Guler, M. O., Bioactive supramolecular peptide nanofibers for regenerative medicine. *Advanced healthcare materials* 2014, 3 (9), 1357-1376. 30
20. Kokkoli, E.; Mardilovich, A.; Wedekind, A.; Rexeisen, E. L.; Garg, A.; Craig, J. A., Self-assembly and applications of biomimetic and bioactive peptide-amphiphiles. *Soft Matter* 2006, 2 (12), 1015.
21. Rudra, J. S.; Sun, T.; Bird, K. C.; Daniels, M. D.; Gasirowski, J. Z.; Chong, A. S.; Collier, J. H., Modulating adaptive immune responses to peptide self-assemblies. *Ac Nano* 2012, 6 (2), 1557-1564. 40
22. Ecker, D. M.; Jones, S. D.; Levine, H. L., The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* 2015, 7 (1), 9-14.
23. Low, D.; O'Leary, R.; Pujar, N. S., Future of antibody purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 848 (1), 48-63. 50

24. Shukla, A. A.; Hubbard, B.; Tressel, T. .; Guhan, S.; Low, D., Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 848 (1), 28-39.
25. Deisenhofer, J., Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-. ANG resolution. *Biochemistry* 1981, 20 (9), 2361-2370. 10
26. Moks, T.; ABRAHMSEN, L.; NILSSON, B.; Hellman, U.; SJOQUIST, J.; Uhlen, M., Staphylococcal protein A consists of five IgG binding domains. *European Journal of Biochemistry* 1986, 156 (3), 637-643.
27. Braisted, A. C.; Wells, J. A., Minimizing a binding domain from protein A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996, 93 (12), 5688-5692. 20
28. Nilsson, B.; Moks, T.; Jansson, B.; Abrahmsen, L.; Elmlad, A.; Holmgren, E.; Henrichson, C.; Jones, T. A.; Uhlen, M., A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein engineering* 1987, 1 (2), 107-113.
29. Starovasnik, M. A.; Braisted, A. C.; Wells, J. A., Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997, 94 (19), 10080-10085. 30
30. Olszewski, K. A.; Kolinski, A.; Skolnick, J., Folding simulations and computer redesign of protein A three-helix bundle motifs. *Proteins* 1996, 25.
31. Bouteleje, J.; Karlstrom, A. R.; Hartmann, M. G.; Holmgren, E.; Sjogren, A.; Levine, R. L., Human immunodeficiency viral protease is catalytically active as a fusion protein: characterization of the fusion and native enzymes produced in *Escherichia coli*. *Archives of biochemistry and biophysics* 1990, 283 (1), 141-149. 40
32. Hober, S.; Nord, K.; Linhult, M., Protein A chromatography for antibody purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 848 (1), 40-7.
33. Guatrecasas, P., Protein purification 50

- by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 1970, 245(12), 3050.
34. Huse, K.; Bohme, H.-J.; Scholz, G. H., Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods* 2002, 51 (3), 217-231.
35. Hassouneh, W.; Christensen, T.; Chilkoti, A., Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci* 2010, Chapter 6, Unit 6.11. 10
36. Sheth, R. D.; Jin, M.; Bhut, B. V.; Li, Z.; Chen, W.; Cramer, S. M., Affinity precipitation of a monoclonal antibody from an industrial harvest feedstock using an ELP-Z stimuli responsive biopolymer. *Biotechnol Bioeng* 2014, 111 (8), 1595-603.
37. Handlogten, M. W.; Stefanick, J. F.; Alves, N. J.; Bilgicer, B., Nonchromatographic affinity precipitation method for the purification of bivalently active pharmaceutical antibodies from biological fluids. *Analytical chemistry* 2013, 85 (10), 5271-5278. 20
38. Eisen, H. N.; Siskind, G. W., Variations in Affinities of Antibodies during the Immune Response\*. *Biochemistry* 1964, 3 (7), 996-1008.
39. Madan, B.; Chaudhary, G.; Cramer, S. M.; Chen, W., ELP-z and ELP-zz capturing scaffolds for the purification of immunoglobulins by affinity precipitation. *J Biotechnol* 2013, 163 (1), 10-6. 30
40. Sheth, R. D.; Bhut, B. V.; Jin, M.; Li, Z.; Chen, W.; Cramer, S. M., Development of an ELP-Z based mAb affinity precipitation process using scaled-down filtration techniques. *J Biotechnol* 2014, 192 Pt A, 11-9. 40
41. Kawashima, R.; Abei, M.; Fukuda, K.; Nakamura, K.; Murata, T.; Wakayama, M.; Seo, E.; Hasegawa, N.; Mizuguchi, H.; Obata, Y.; Hyodo, I.; Hamada, H.; Yokoyama, K. K., EpCAM- and EGFR-targeted selective gene therapy for biliary cancers using Z33-fiber-modified adenovirus. *Int J Cancer* 2011, 129 (5), 1244-53.
42. Kickhoefer, V. A.; Han, M.; Raval-Fernandes, S.; Poderycki, M. J.; Moniz, R. J.; 50

- Vaccari, D.; Silvestry, M.; Stewart, P. L.; Kelly, K. A.; Rome, L. H., Targeting vault nanoparticles to specific cell surface receptors. *AcS Nano* 2008, 3 (1), 27-36.
43. Freire, E.; Kawasaki, Y.; Velazquez-Campoy, A.; Schon, A., Characterisation of ligand binding by calorimetry. In *Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets*, 2011; pp 275-299.
44. Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L.-N., Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical biochemistry* 1989, 179 (1), 131-137.
45. Demers, J.-P.; Mittermaier, A., Binding mechanism of an SH3 domain studied by NMR and ITC. *Journal of the American Chemical Society* 2009, 131 (12), 4355-4367.
46. van Eldijk, M. B.; Smits, F. C.; Thies, J. C.; Mecinovic, J.; van Hest, J. C., Thermodynamic investigation of Z33-antibody interaction leads to selective purification of human antibodies. *J Biotechnol* 2014, 179, 32-41.
47. Lund, L. N.; Christensen, T.; Toone, E.; Houen, G.; Staby, A.; St Hilaire, P. M., Exploring variation in binding of Protein A and Protein G to immunoglobulin type G by isothermal titration calorimetry. *J Mol Recognit* 2011, 24 (6), 945-52.

10

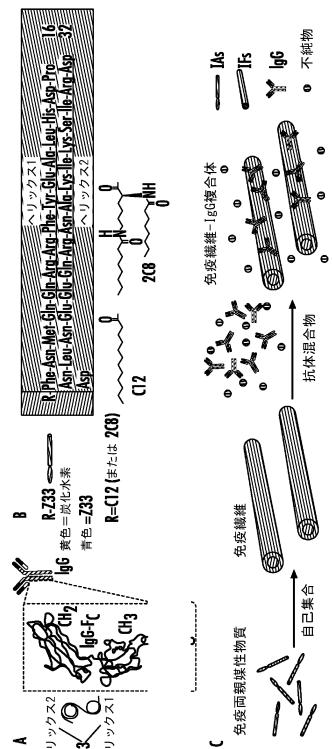
20

30

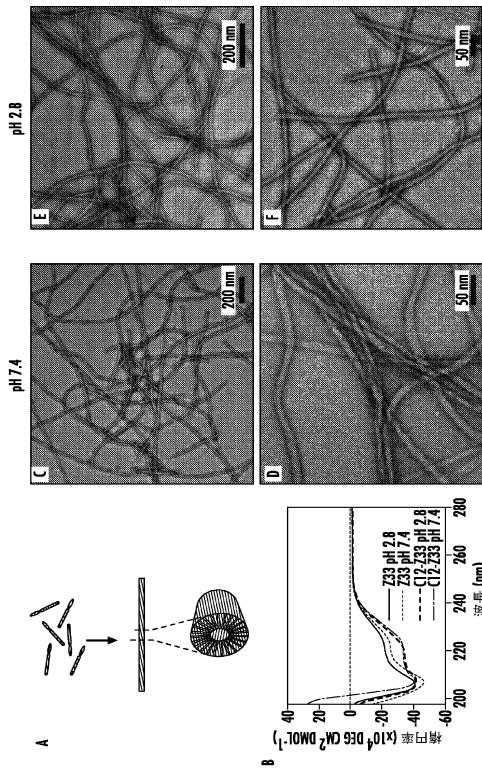
40

50

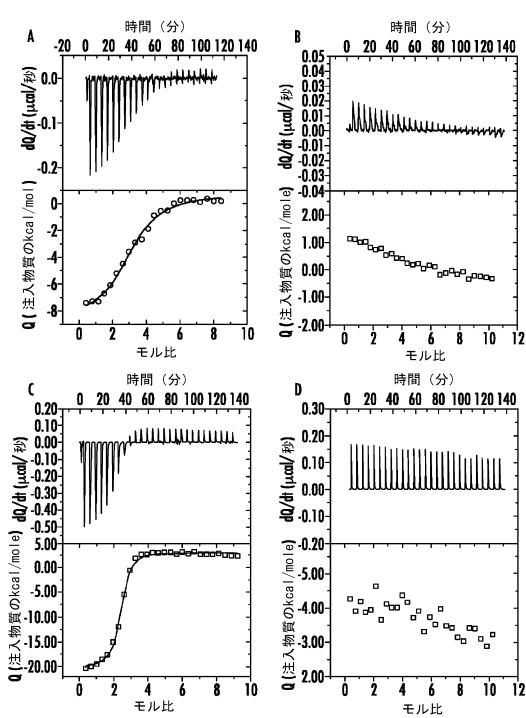
【図面】  
【図 1】



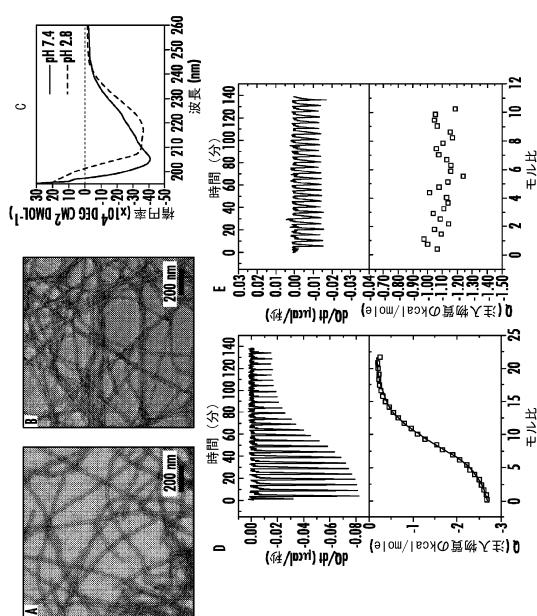
【 図 2 】



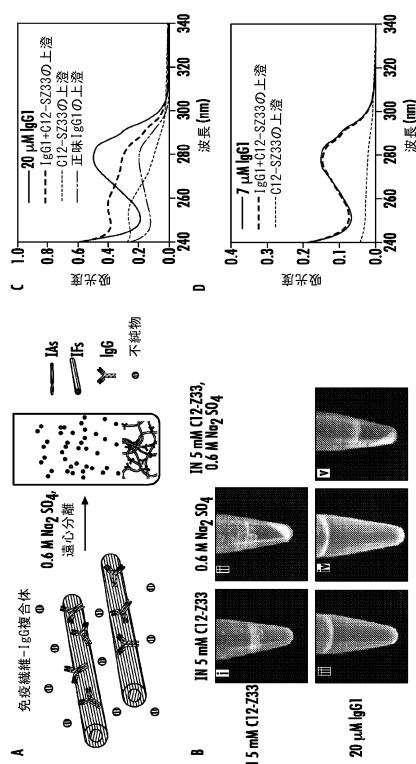
〔 3 〕



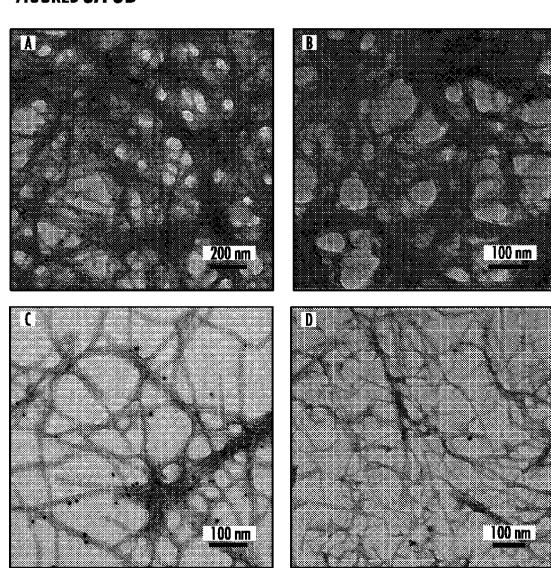
〔 四 4 〕



【図 5】



【図 6 A - 6 D】



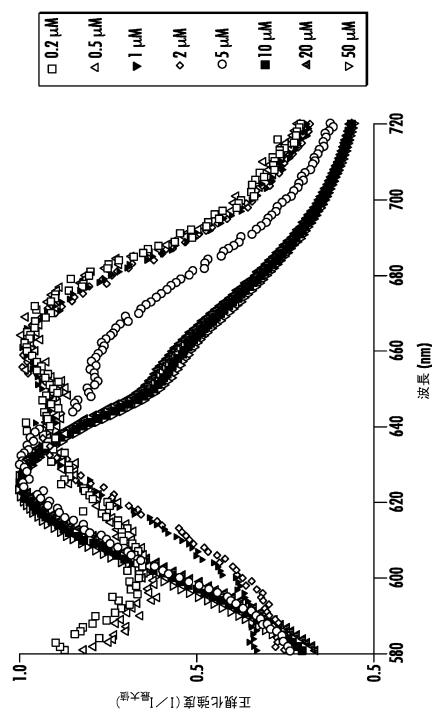
10

20

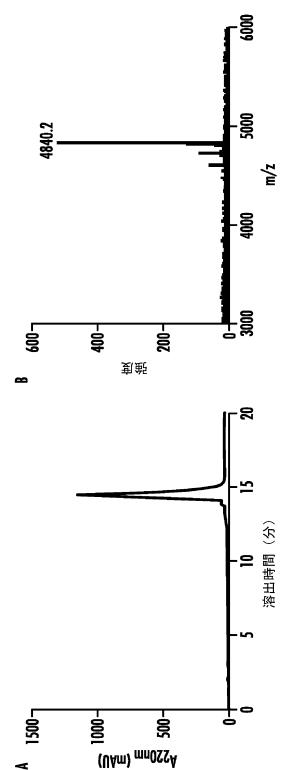
30

40

【図 7】

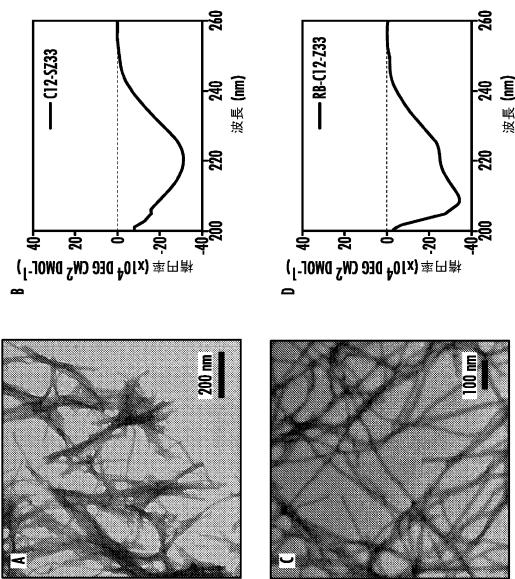


【図 8】

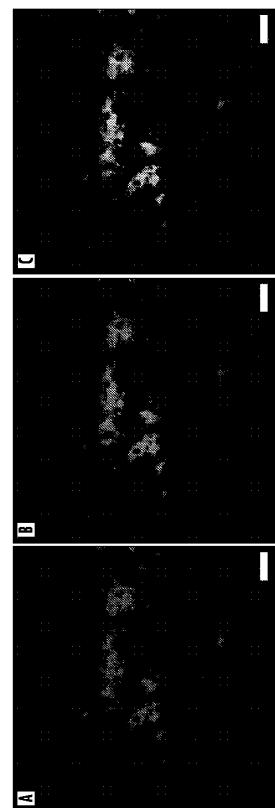


50

【図9】



【図10A-10C】



FIGURES 10A-10C

10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

弁理士 杉村 憲司

(72)発明者 ホンガン ツイ

アメリカ合衆国 メリーランド州 21093 ルーザービル パーツ コート 10

(72)発明者 イー リー

アメリカ合衆国 メリーランド州 21211 バルティモア ビーチ アベニュー 3925 アパートメント 411

(72)発明者 シュアンクオ シュー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01719 ポックスボロー コロニアル リッジ ドライブ 118

(72)発明者 リー リン ロック

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01754 メイナード パイン ストリート 15 ユニット 1ディー

(72)発明者 チョンジエン リー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01776 サドベリー ブルースター ロード 67

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 米国特許第06197927 (U.S., B1)

Biochemistry, 2009年, Vol.48, doi:10.1021/bi802356k

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K 14/315

C07K 1/22

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

CAPplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)