

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年4月21日(21.04.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/080486 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 14/36 (2006.01) *C12Q 1/00* (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2018.01)
C12N 15/31 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/038254

(22) 国際出願日: 2021年10月15日(15.10.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2020-174961 2020年10月16日(16.10.2020) JP

(71) 出願人: シスメックス株式会社 (SYSMEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 Hyogo (JP).

(72) 発明者: 菅沼 政俊 (SUGANUMA, Masatoshi); 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通

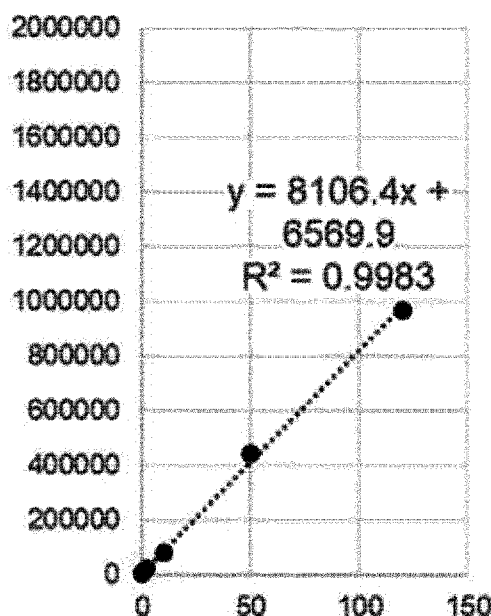
1丁目5番1号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 西川 洋一(NISHIKAWA, Youichi); 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 久保 卓也(KUBO, Takuya); 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜コニシビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) Title: POLYPEPTIDE, POLYMER, SOLID PHASE, MEASUREMENT METHOD FOR TEST SUBSTANCE, AND REAGENT KIT

(54) 発明の名称: ポリペプチド、多量体、固相、被検物質の測定方法および試薬キット



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a polypeptide with further reduced binding properties with respect to D-biotin, and which strongly binds to L-biotin. Provided is a polypeptide belonging to the avidin-streptavidin family, wherein of amino acid residues other than glycine in the polypeptide, not less than 90% of the amino acid residues include a D-amino acid residue, the polypeptide having binding capacity with respect to L-biotin and having substantially no binding capacity with respect to D-biotin.



WO 2022/080486 A1

MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）
-

(57) 要約：D-ビオチンに対する結合性をさらに低減し、L-ビオチンに対して強固に結合するポリペプチドを提供することを課題とする。アビジン-ストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドであって、前記ポリペプチドのグリシン以外のアミノ酸残基のうち、90%以上のアミノ酸残基にD-アミノ酸残基を含み、L-ビオチンに対する結合能を有し、D-ビオチンに対する結合能を実質的に有さないポリペプチドを提供する。

明 細 書

発明の名称：

ポリペプチド、多量体、固相、被検物質の測定方法および試薬キット

技術分野

[0001] 本発明は、ポリペプチド、多量体、固相、被検物質の測定方法および試薬キットに関する。

背景技術

[0002] アビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドと、ビオチンとの間の親和性は非常に強く、該ポリペプチドとビオチンは様々な分野で利用されている。たとえば、診断分野では、免疫学的測定方法において、プレートや粒子などの固相にストレプトアビジンおよびビオチンを介して捕捉体を固定し、これを用いて標的物質を測定することが行われる。また、治療分野では、アビジンを付加した抗体と、ビオチン基を付加した薬剤とを患者に投与するプレターゲットング療法が知られている（たとえば、非特許文献1）。

[0003] しかし、被検者の血液が天然型のD-ビオチンを含む場合、このD-ビオチン（内在性D-ビオチン）がアビジンやストレプトアビジンに結合し得る。特に被検者がビタミン剤などのサプリメントを摂取している場合は、D-ビオチンの血中濃度が高いことがある。このような場合、血液検体を用いる免疫学的測定方法においてはビオチン化した捕捉体と血中の内在性D-ビオチンとが競合し、一部の捕捉体を固相に固定することができず、測定精度が低下することがある。また、プレターゲットング療法においては、アビジンを結合した抗体を患者に投与すると、アビジンに血中の内在性D-ビオチンが結合することがある。この場合、該抗体にビオチン基を付加した薬剤が結合できず、患部に届く薬剤の量が低減するという問題が生じ得る。このような問題を解決するための手段として、たとえば特許文献1の技術が知られている。特許文献1には、D-ビオチンに対する親和性を低減させたストレプ

トアビジン変異体と、該変異体に結合可能なビオチン改変体が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：米国特許出願公開第2016/0137704号明細書

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Hnatowich et al., Journal of Nuclear Medicine 28, 8 (1987) : 1294-1302

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 特許文献1に記載のストレプトアビジン変異体は、依然としてD-ビオチンとの結合性を維持しており、また該変異体とビオチン改変体との親和性は十分ではない。本発明は、D-ビオチンと実質的に結合せず、L-ビオチンに対して強固に結合するポリペプチドを提供することを目的とする。また、本発明は、該ポリペプチドの多量体、該ポリペプチドが固定された固相、該固相を用いた被検物質の測定方法および該固相とL-ビオチンが結合した捕捉体を含む試薬キットを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] アビジン-ストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドであって、前記ポリペプチドのグリシン以外のアミノ酸残基のうち90%以上のアミノ酸残基にD-アミノ酸残基を含み、L-ビオチンに対する結合能を有し、D-ビオチンに対する結合能を実質的に有さないポリペプチド、を提供する。

[0008] 本発明は、前記ポリペプチドおよび前記ポリペプチドの多量体を提供する。本発明は、前記ポリペプチドおよび前記多量体が固定化された固相と、前記固相を用いた測定方法と、前記固相とL-ビオチンが結合した捕捉体を含

む試薬キットを提供する。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、D-ビオチンと実質的に結合せず、L-ビオチンに対して結合能を有するポリペプチドが提供される。また本発明によれば、前記ポリペプチドの多量体、前記ポリペプチドが結合した固相、前記固相を用いた測定方法および前記固相とL-ビオチンが結合した捕捉体を含む試薬キットが提供される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]本実施形態の測定方法の一例を示す概略図である。

[図2]本実施形態の試薬キットの一例を示す概略図である。

[図3]ゲルろ過クロマトグラフィーにおける波長280nmの吸光度推移を示すグラフである。

[図4A]実施例2のポリペプチドとL-ビオチンとの表面プラズモン共鳴（SPR）のセンサグラムである。

[図4B]実施例2のポリペプチドとD-ビオチンとの表面プラズモン共鳴（SPR）のセンサグラムである。

[図5]実施例2の天然体コアストレプトアビジンと、D-ビオチン標識アルブミンとの表面プラズモン共鳴（SPR）のセンサグラムである。

[図6]実施例3の結果を示すグラフである。

[図7]実施例4の結果を示すグラフである。

[図8A]実施例5の構造維持に関わる21番目のアミノ酸をL体に置換する前の構造モデルである。

[図8B]実施例5の構造維持に関わる21番目のアミノ酸をL体に置換した後の構造モデルである。

[図8C]実施例5の構造維持に関わる21番目のアミノ酸をL体に置換した後にClean Geometryによる構造最適化を行った構造モデルである。

[図9A]実施例7のD-タマビジン（商標）2と、L-ビオチン標識アルブミン

との表面プラズモン共鳴（SPR）のセンサグラムである。

[図9B]実施例7のD-タマビジン（商標）2と、D-ビオチン標識アルブミンとの表面プラズモン共鳴（SPR）のセンサグラムである。

[図10]実施例8の結果を示すグラフである。

[図11]実施例9の結果を示すグラフである。

[図12A]L-ビオチンの構造である。

[図12B]D-ビオチンの構造である。

発明を実施するための形態

[0011] 1. ポリペプチド

本実施形態のポリペプチドは、アビジンーストレプトアビジンファミリーに属する。このポリペプチドにおいてグリシン以外のアミノ酸残基のうち90%以上のアミノ酸残基が、D-アミノ酸残基である。このポリペプチドは、L-ビオチンに対する結合能を有し、D-ビオチンに対する結合能を実質的に有さないポリペプチドである。

[0012] アビジンーストレプトアビジンファミリーのポリペプチドは、光学異性体が存在しないグリシンを除き、天然ではL-アミノ酸残基で構成されている。本実施形態のポリペプチドは、L-アミノ酸残基を含んでいてもよいが、グリシン以外のアミノ酸残基のうち90%以上のアミノ酸残基がD-アミノ酸残基であることが好ましい。より好ましい実施形態のポリペプチドはグリシン以外のアミノ酸残基のうち95%以上のアミノ酸残基がD-アミノ酸残基であり、さらに好ましい実施形態のポリペプチドは、グリシン以外のすべてのアミノ酸残基がD-アミノ酸残基である。これにより少なくともD-ビオチンと結合する部位の立体構造が、鏡像異性体となると考えられる。その結果として天然型のD-ビオチンとの結合性が低下し、D-ビオチンの鏡像異性体であるL-ビオチンと結合可能となる。

[0013] 本実施形態のポリペプチドは、被検者の血中にD-ビオチンが存在したとしても、D-ビオチンとは実質的に結合しないため、免疫学的測定方法において内在性D-ビオチンの影響を低減することができる。また、プレターゲ

ティング療法において、内在性Dービオチンの影響が低減され、より適切に薬剤を患部に送達することができる。

[0014] 本明細書において、「ポリペプチド」は、タンパク質およびその断片を含む。本実施形態のポリペプチドのアミノ酸の長さは、Lービオチンとの結合能を有していれば特に限定されず、たとえば、数十～数百残基である。本実施形態のポリペプチドは、少なくともコア配列を有することが好ましい。ここで、「コア配列」とは、本実施形態のポリペプチドのアミノ酸配列のうち、ビオチンに結合するために必要なアミノ酸配列をいう。

[0015] 「アビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチド」は、アビジン、ストレプトアビジン、タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae*) 由来アビジン様タンパク質（以下、タマビジン（商標））、ブラダビジン (*Bradavidin*)、リザビジン (*Rhizavidin*)、それらのキメラ、改変体などを含む。本明細書では、D型のポリペプチド（たとえば、D型のアビジン（以下、「Dーアビジン」または「本実施形態のアビジン」という）、D型のストレプトアビジン（以下、「Dーストレプトアビジン」または「本実施形態のストレプトアビジン」という）、D型のタマビジン（商標）（以下、「Dータマビジン（商標）」または「本実施形態のタマビジン（商標）」という）、D型のブラダビジン（以下、「Dーブラダビジン」という）、およびD型のリザビジンも「アビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチド」に含まれる。

[0016] ポリペプチドの改変体は、たとえば、アミノ酸配列を改変したポリペプチドや、ポリペプチドを化学的処理したポリペプチドが挙げられる。アミノ酸配列の改変の例としては、アミノ酸残基の置換、欠損、付加などが挙げられる。化学的処理の例としては脱グリコシル化などが挙げられる。

[0017] ストレプトアビジンはストレプトマイセスアビジニ (*Streptomyces avidinii*) 由来のビオチン結合性タンパク質である。

[0018] 好ましい実施形態では、Dーストレプトアビジンは、配列番号1の19番目～133番目のアミノ酸配列を含む。19番目～133番目のアミノ酸配

列はD-ストレプトアビジンのコア配列として知られている。より好ましい実施形態では、D-ストレプトアビジンは13番目～133番目のアミノ酸配列または19番目～133番目のアミノ酸配列を含む。さらに好ましい実施形態では、D-ストレプトアビジンは13番目～139番目のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、D-ストレプトアビジンは配列番号1のアミノ酸配列全体を含む。本実施形態のストレプトアビジンは、グリシン以外のアミノ酸残基のうち90%以上のアミノ酸残基がD-アミノ酸残基により構成されているため、D-ビオチンとの結合性は低く、L-ビオチンとの結合性が高い。

[0019] アビジンは鳥類などで産生されるビオチン結合性タンパク質である。本発明の一実施形態であるD-アビジンは、配列番号2のアミノ酸配列を含み得る。好ましい実施形態では、D-アビジンは、配列番号2の2番目～128番目のアミノ酸配列を含む。2番目～128番目のアミノ酸配列はD-アビジンのコア配列と考えられる。別の実施形態では、D-アビジンは配列番号2のアミノ酸配列全体を含む。本実施形態のアビジンは、グリシン以外のアミノ酸残基のうち90%以上のアミノ酸残基がD-アミノ酸残基により構成されているため、D-ビオチンとの結合性は低く、L-ビオチンとの結合性が高い。

[0020] タマビジン（商標）はタモギタケから発見されたタンパク質である。ビオチンに対して高い親和性をもち、アビジンに比べて熱安定性に優れるなどの特徴をもつ（国際公開第2002/072817号）。タマビジン（商標）のアミノ酸配列は、たとえば配列番号3（タマビジン（商標）1）や配列番号4（タマビジン（商標）2）に示されるアミノ酸配列が挙げられる。

[0021] 好ましい実施形態では、D-タマビジン（商標）1は、配列番号3の4番目～129番目のアミノ酸配列を含む。4番目～129番目のアミノ酸配列はタマビジン（商標）1のコア配列と考えられる。D-タマビジン（商標）2は、配列番号4の4番目～127番目のアミノ酸配列を含む。4番目～127番目のアミノ酸配列はタマビジン（商標）2のコア配列と考えられる。

D-タマビジン（商標）1およびD-タマビジン（商標）2は、グリシン以外のアミノ酸残基のうち90%以上のアミノ酸残基がD-アミノ酸残基により構成されているため、D-ビオチンとの結合性は低く、L-ビオチンとの結合性が高い。

[0022] 本実施形態のポリペプチドのコア配列は、L-アミノ酸残基を含んでいてもよいが、グリシン以外のアミノ酸残基のうち90%以上のアミノ酸残基がD-アミノ酸残基であることが好ましい。より好ましい実施形態では、コア配列のグリシン以外のアミノ酸残基のうち95%以上のアミノ酸残基がD-アミノ酸残基であり、さらに好ましい実施形態では、グリシン以外のすべてのアミノ酸残基がD-アミノ酸残基である。

[0023] 本実施形態のポリペプチドは、上述のアミノ酸配列と比較して、置換、欠失または付加などのアミノ酸の改変を含むポリペプチドであってもよい。好ましい実施形態は上述のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するポリペプチドであり、より好ましい実施形態は上述のアミノ酸配列と95%以上の相同性を有するポリペプチドである。

[0024] アミノ酸配列を改変したポリペプチドの具体例として、Qureshi et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 276, No. 49, Issue of December 7, pp. 46422-46428, 2001 に記載のストレプトアビジン改変体（以下、「ストレプトアビジン改変体1」という）が挙げられる。ストレプトアビジン改変体1は、配列番号1のアミノ酸配列と比較してS45A、T90AおよびD128Aの置換変異を有する（配列番号5）。ストレプトアビジンのコア配列とストレプトアビジン改変体1のコア配列の相同性は、97.4%である。一実施形態のストレプトアビジンは、D体のストレプトアビジン改変体1（以下、「D-ストレプトアビジン改変体1」という）であって、配列番号5の19番目～133番目のアミノ酸配列を含む。19番目～133番目のアミノ酸配列はストレプトアビジン改変体1のコア配列として知られている。より好ましい実施形態では、D-

ストレプトアビジン改変体 1 は、13 番目～133 番目のアミノ酸配列または 19 番目～139 番目のアミノ酸配列を含む。さらに好ましい実施形態では、D-ストレプトアビジン改変体 1 は 13 番目～139 番目のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、D-ストレプトアビジン改変体 1 は配列番号 5 のアミノ酸配列全体を含む。

[0025] ストレプトアビジン改変体の他の例として、Wu et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 280, No. 24, Issue of June 17, pp. 23225-23231, 2005 に記載のストレプトアビジン改変体（以下、「ストレプトアビジン改変体 2」という）が挙げられる。ストレプトアビジン改変体 2 は、配列番号 1 のアミノ酸配列と比較して T76R、V125R、V55T および L109T の置換変異を有する（配列番号 6）。ストレプトアビジンのコア配列とストレプトアビジン改変体 2 のコア配列の相同性は、96.5% である。一実施形態のストレプトアビジンは、D 体のストレプトアビジン改変体 2（以下、「D-ストレプトアビジン改変体 2」という）であって、配列番号 6 の 19 番目～133 番目のアミノ酸配列を含む。19 番目～133 番目のアミノ酸配列はストレプトアビジン改変体 2 のコア配列として知られている。より好ましい実施形態では、D-ストレプトアビジン改変体 2 は、13 番目～133 番目のアミノ酸配列または 19 番目～139 番目のアミノ酸配列を含む。さらに好ましい実施形態では、D-ストレプトアビジン改変体 2 は 13 番目～139 番目のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、D-ストレプトアビジン改変体 2 は配列番号 6 のアミノ酸配列全体を含む。

[0026] ストレプトアビジン改変体の他の例として、Lim et al., BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2013 Jan; 110(1): 57-67 に記載のストレプトアビジン改変体（以下、「ストレプトアビジン改変体 3」という）が挙げられる。このタンパク質は、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する。一実施形態のストレプトア

ビジンは、D体のストレプトアビジン改変体3（以下、「D-ストレプトアビジン改変体3」という）であって、配列番号7のアミノ酸配列全体を含むことが好ましい。

[0027] ストレプトアビジン改変体の他の例として、Sano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94, pp. 6153-6158, June 1997に記載のストレプトアビジン改変体（以下、「ストレプトアビジン改変体4」という）が挙げられる。ストレプトアビジン改変体4は、配列番号1のアミノ酸配列と比較してH127Dの置換変異と、G113-W120の欠失変異を有する（配列番号8）。ストレプトアビジンのコア配列とストレプトアビジン改変体2のコア配列の相同性は、92.2%である。一実施形態のストレプトアビジンは、D体のストレプトアビジン改変体4（以下、「D-ストレプトアビジン改変体4」という）であって、配列番号8の19番目～125番目のアミノ酸配列を含む。19番目～125番目のアミノ酸配列はストレプトアビジン改変体4のコア配列として知られている。より好ましい実施形態では、D-ストレプトアビジン改変体4は、13番目～125番目のアミノ酸配列または19番目～131番目のアミノ酸配列を含む。さらに好ましい実施形態では、D-ストレプトアビジン改変体4は13番目～131番目のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、D-ストレプトアビジン改変体4は配列番号8のアミノ酸配列全体を含む。

[0028] ストレプトアビジン改変体の他の例として、国際公開第2006/058226号に記載のストレプトアビジン改変体（以下、「ストレプトアビジン改変体5」という）が挙げられる。ストレプトアビジン改変体5は、配列番号9のアミノ酸配列を有する。一実施形態のストレプトアビジンは、D体のストレプトアビジン改変体5（以下、「D-ストレプトアビジン改変体5」という）であって、配列番号9の1番目～20番目、35番目～196番目および213番目～261番目のアミノ酸配列を含む。1番目～20番目、35番目～196番目および213番目～261番目のアミノ酸配列はスト

レプトアビジン改変体5のコア配列に相当する配列として知られている。より好ましい実施形態では、D-ストレプトアビジン改変体5は、1番目～24番目、29番目～202番目および207番目～261番目を含む。別の実施形態では、D-ストレプトアビジン改変体5は配列番号9のアミノ酸配列全体を含む。

[0029] 本明細書におけるD-またはL-の表記はIUPAC命名法に基づいて化合物の立体配置を示す表記であり、d-グリセルアルデヒドを立体配置の基準として、この立体配置を崩さずにできる化合物をD体とし、その鏡像異性体をL体と表記する表記法に基づく。

[0030] 本実施形態のポリペプチドの結合パートナーであるL-ビオチンはD-ビオチンの鏡像異性体である。本明細書では、「L-ビオチン」は、遊離のL-ビオチンと、捕捉体など他の物質に付加されたL-ビオチン基とを含む概念である。L-ビオチンは、たとえば非特許文献(Journal of the American Chemical Society 1978、100、1558-1563)の方法などの公知の方法により合成され、キラルカラムクロマトグラフィーなどを用いて光学分割することで得ることができる。L-ビオチンは、D-ビオチンの鏡像異性体である限り、製造方法は特に限定されず、市販品を用いてもよい。

[0031] 本実施形態のポリペプチドのL-ビオチンやD-ビオチンに対する結合性は、たとえばビオチン化酵素とポリペプチド固定化プレートを用いたプレートアッセイにおけるシグナルや、表面プラズモン共鳴(SPR)におけるセンサグラムの変化、および解離定数(K_d値)を指標として確認することができる。解離定数の測定方法は、たとえば、SPR解析や等温滴定型カロリメトリ解析などを用いた公知の方法を用いることができる。測定装置としては、たとえばBiacore T200(Cytiva社)が例示される。

[0032] 本実施形態のポリペプチドとL-ビオチンとの解離定数は、好ましくは 10^{-7} M以下であり、より好ましくは 10^{-10} M以下であり、最も好ましくは 10^{-13} M以下である。

[0033] 「D-ビオチンに対する結合能を実質的に有さない」とは、たとえば、本実施形態のポリペプチドとD-ビオチンとの解離定数が、好ましくは 10^{-6} M以上であり、より好ましくは 10^{-4} M以上であり、さらに好ましくは 10^{-2} M以上となることである。最も好ましい実施形態では、本実施形態のポリペプチドと、L-ビオチンとの結合能をBiacore T200 (Cytiva社)を用いて測定した際に、アナライトの結合による特異的なセンサグラムの変化が確認されないことである。なお、「D-ビオチンに対する結合能を実質的に有さない」は、「D-ビオチンに実質的に結合しない」と同義である。

[0034] Biacore T200システムを用いた結合性の決定方法は、たとえば、以下のとおりである。Biacore T200システムのCM5センサーチップ (Cytiva製) のフローセル1および3に対して、ウシ血清アルブミンをアミンカップリングキット (Cytiva社)を用いたアミンカップリング法によりターゲットレベル400 RUで固定化する。さらにフローセル2、4に対して同様にアミンカップリング法によって、それぞれL-ビオチン標識アルブミン、D-ビオチン標識アルブミンをターゲットレベル400 RUで固定化する。各フローセルを1 M エタノールアミン溶液、pH 8.5 (Cytiva製) でブロッキングする。D-ビオチン標識アルブミンとしてはHABA法にてアルブミンあたりのD-ビオチン標識数が0.4と推定されたものを用い、L-ビオチン標識アルブミンとしては前記D-ビオチン標識アルブミンと同条件で調製することで同様のD-ビオチン標識数と推定されるものを用いる。

[0035] ランニングバッファーとしてHBS-EP+ (Cytiva製)を使用し、アビジン-ストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドをシングルサイクル法により、100 pMから100 nMの範囲で流速30 μ L/minで各フローセルに流し、Biacore T200 Evaluation Software (Cytiva製)によってD-ビオチン標識アルブミンまたはL-ビオチン標識アルブミンに対するSPRにおけるセンサグ

ラムの変化を示すデータを取得する。ウシ血清アルブミンを固定化したフローセルから取得したデータは、バックグラウンドの値を示すため、バックグラウンドの値を用いて、D-ビオチン標識アルブミンまたはL-ビオチン標識アルブミンに対するSPRにおけるセンサグラムの変化を示すデータを正規化しもよい。アビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドの結合性は、たとえば、[L-ビオチン標識アルブミンとアビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドとの結合性を示すデータ]（以下、「データL1」とする）と、[D-ビオチン標識アルブミンとアビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドとの結合性を示すデータ]（以下、「データD1」とする）とに基づいて決定することができる。

[0036] たとえば、データD1の値をデータL1の値で除した値が $1/10$ 以下、 $1/100$ 以下、または $1/1000$ であるとき、アビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドは「D-ビオチンと実質的に結合しない」と決定することができる。

[0037] たとえば、データL1の値をデータD1の値で除した値が 10 以上、 100 以上、または 1000 以上であるとき、アビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドは「D-ビオチンと実質的に結合しない」と決定することができる。

[0038] たとえば、データL1の値からデータD1の値をひいた値、若しくはデータD1の値からデータL1の値をひいた値の絶対値が、データL1の値の $1/10$ 以下、 $1/100$ 以下、または $1/1000$ であるとき、アビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドは「D-ビオチンと実質的に結合しない」と決定することができる。

[0039] ビオチン化酵素とポリペプチド固定化プレートを用いたプレートアッセイにおけるシグナルに基づく結合性の決定方法は、たとえば、後述する実施例3に基づいて、ELISA法を利用したビオチンの測定系を構築し、L-ビオチンを使用したときの酵素活性の値（データL2）と、D-ビオチンを使

用したときの酵素活性の値（データD2）を取得する。上記Biacore T200システムを使用した場合と同様に、データL2およびデータD2に基づいて、アビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドが、D-ビオチンと実質的に結合するかいなかを決定する。

[0040] 2. 多量体

別の実施形態は、上述のポリペプチドをモノマー単位とする多量体である。この多量体は、複数個の上述のポリペプチドが会合して形成され得る。この多量体において、モノマー単位の数は特に限定されない。たとえば、この多量体は、2量体、4量体または8量体である。

[0041] 3. ポリペプチドの合成方法

本実施形態のポリペプチドは公知のペプチドの合成方法により製造することができる。ペプチドの合成方法としては所望のポリペプチドが得られる限り、特に制限されない。たとえば、液相合成、固相合成、人工tRNAを用いた無細胞系による合成などが挙げられる。また生産物のポリペプチドのアミノ酸残基数が一定数以上（一般に30残基～50残基以上）の場合、2以上のペプチド断片を合成した後に公知のライゲーション反応を用いて、ポリペプチドを連結することで、製造することができる。

本実施形態のポリペプチドは、たとえば以下の固相合成法によって合成することができる。

（1）保護基を用いて、アミノ基の窒素原子を保護した1残基目のアミノ酸のカルボキシル基を樹脂へ結合させる。

（2）前記（1）または（3）の結合反応により得られた反応物の保護基を脱保護剤を用いて脱離した後、溶媒にて洗浄し遊離アミノ酸を形成させる。

（3）前記（2）で得られた遊離アミノ酸と、保護基によりアミノ基を保護した任意のアミノ酸とを、縮合剤を用いて縮合させる。

（4）前記（3）の生成物の保護基を脱保護剤を用いて脱離し、遊離アミノ酸を形成させる。

（5）（2）から（4）の工程を繰り返すことにより、C末端に樹脂が結合

した任意のアミノ酸が連結したポリペプチドを得ることができる。

(6) (5) の工程後の任意の時点、および所望のポリペプチドが結合した樹脂を製造した時点で溶媒を用いて洗浄する。

(7) (6) で洗浄した前記樹脂が結合したポリペプチドを保護基によって、N末端アミノ基を保護した後、酸を用いて樹脂を切断することで、保護基が結合した任意のポリペプチドを得ることができる。

[0042] 各工程は手合成でもよく、自動合成機などを用いてもよい。一部を手合成で行い、適宜自動合成機を用いてもよい。自動合成機の例としては、Liberty Blue (CEM製)、Multi pep 2 (CEM製)、Initiator+Alstra (Biotage製)、Syrill (Biotage製) などが挙げられるが、特に限定されない。

[0043] (1) において使用する樹脂としては、固相合成法で使用される公知の樹脂であればよい。C末端をアミド基として供給する樹脂としては、たとえば、アミノ基で官能化されたRink-Amide-レジン (Merck KGaA製)、Rink-Amide-PEGA-レジン (Merck KGaA製) および、Fmoc-NH-SAL-レジン (渡辺化学工業製) を用いることが好ましい。また、アミノ基で官能化されたAmino-PEGA-レジン (Merck KGaA製) などにFmoc-NH-SAL-レジン-リンカー (渡辺化学工業製) などを結合させてもよい。

[0044] また、C末端をカルボン酸にする場合の樹脂としては、たとえば、塩素で官能化された2-クロロトリチルクロリド樹脂 (Merck KGaA製) や、アミノ基で官能化されたAmino-PEGA-レジン (Merck KGaA製)、水酸基を有するNovaSyn TGTアルコール樹脂 (Merck KGaA製)、Wang-レジン (Merck KGaA製)、HMPA-PEGA-レジン (Merck KGaA製) などを用いることができる。また、Amino-PEGA-レジンとアミノ酸との間にリンカーを存在させてもよく、このようなリンカーとして、たとえば、4-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸 (HMPA)、4-(4-ヒドロキシメチル-3-メトキシ

フェノキシ)ーブチル酢酸 (HMPB) などを挙げることができる。C末端のアミノ酸が樹脂にあらかじめ結合したH-Cys (Trt)-Trityl NovaPEG樹脂 (Merck KGaA製) などを用いることができる。

[0045] 水酸基を有する樹脂または塩素で官能化された樹脂を使用する場合、樹脂とアミノ基の窒素原子が保護基により保護されたアミノ酸との結合はアミノ酸のカルボキシル基を樹脂へとエステル結合により結合させる。また、アミノ基で官能化された樹脂を使用する場合、該アミノ酸のカルボキシル基を樹脂へとアミド結合により結合させる。

[0046] 保護基としては公知の保護基であればよく、たとえば、9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基、t-ブチルオキシカルボニル (Boc) 基、ベンジル基、アリルオキシカルボニル基、アセチル基などの、カーボネート系またはアミド系の保護基を用いることができる。アミノ酸に保護基を導入する場合、たとえばFmoc基を導入する際には、9-フルオレニルメトキシカルボニル-N-スクシニミジルカーボネートと炭酸ナトリウムを加えて反応を行うことにより導入することができる。反応温度は0～50℃、好ましくは室温であり、反応時間は1～5時間、好ましくは3時間である。

[0047] 保護基を用いてアミノ基の窒素原子を保護したアミノ酸としては、市販のアミノ酸を用いてもよい。たとえば、Fmoc-Ser-OH、Fmoc-Asn-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys-OH、Fmoc-Arg-OH、Fmoc-His-OH、Fmoc-Asp-OH、Fmoc-Glu-OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Thr-OH、Fmoc-Cys-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-SeMet-OH、Fmoc-3-(Methylseleno)-Ala-OHが挙げられる。

[0048] また、保護基で保護したアミノ酸であって、側鎖に保護基を導入したアミノ酸を用いてもよい。たとえば、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asp(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OH、Fmoc-Cys(tBu)-OH、Fmoc-Cys(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Glu(tBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Sec(Trt)-OH、Fmoc-Sec(pMeOBzl)-OH、Fmoc-Sec(pMeBzl)-OH、Fmoc-HomoSec(pMeBzl)-OH、Fmoc-HomoSec(Mob)-OHを挙げられる。

[0049] 水酸基を有する樹脂を用いる場合、たとえば、HMPB樹脂であれば、エステル化触媒として用いることができる。その際、脱水縮合剤は、1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール(MSNT)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)などの公知の脱水縮合剤を用いることができる。アミノ酸と脱水縮合剤との使用割合は、前者1当量に対して、後者が、通常1~10当量、好ましくは1~5当量である。

[0050] エステル化反応は、たとえば、固相カラムに樹脂を供し、溶媒で洗浄し、アミノ酸溶液を加えることで行うことが好ましい。洗浄用溶媒としては、たとえばジメチルホルムアミド(DMF)、2-プロパノール、ジクロロメタン(DCM)等を挙げることができる。アミノ酸を溶解する溶媒としては、たとえばジメチルスルホキシド(DMSO)、DMF、DCM等を挙げることができる。エステル化反応の反応温度は0~50℃、好ましくは室温であり、反応時間は10分間~30時間程度、好ましくは15分間~24時間程度行う。

[0051] この時、固相上の未反応の官能基を、無水酢酸等を用いてアセチル化して

キャッピングすることが好ましい。

[0052] 脂溶性保護基の脱離は、たとえば塩基で処理することにより行うことができる。塩基としては、たとえばピペリジン、モルホリン等を挙げることができる。その際、溶媒の存在下で行うことが好ましい。溶媒としては、たとえばDMF、DMSO、メタノールなどが挙げられる。

[0053] 遊離アミノ基と、保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシ基とのアミド化反応は、活性化剤、塩基および溶媒の存在下で行うことが好ましい。

[0054] 活性化剤としては、たとえば、DIC、DCC、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩(WSC·HCl)、ジフェニルホスホリルアジド(DPPA)、カルボニルジイミダゾール(CDI)、ジエチルシアノホスホネート(DEPC)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、ヒドロキシスクシンイミド(HOSu)、ジメチルアミノピリジン(DMAP)、1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール(HOAt)、ヒドロキシフタルイミド(HOPht)、ペンタフルオロフェノール(Pfp-OH)、O-(1H-6-クロロベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HCTU)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスホネート(HATU)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート(TBTU)、3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシー-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン(DHBT)、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロライド(DMT-MM)などが挙げられる。

[0055] 活性化剤の使用量は、保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸に対して、1~20当量、好ましくは1~10当量、さらに好ましくは、1

～5当量とすることが好ましい。

[0056] 塩基としては、アルキル化反応と共存させることができる塩基が好ましい。たとえば、N-エチルジイソプロピルアミン (DIEA)、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン (DBU)、DMAP、1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン (DABCO)、2,6-ジメチルピリジン、トリエチルアミン (TEA)、1,5-ジアザビシクロ[4.3.0]ノナ-5-エン (DBN) などが挙げることができるが、特に限定されない。

[0057] 溶媒としては、たとえばDMF、DMSO、DCMなどを挙げることができる。反応温度は0～50℃、好ましくは室温であり、反応時間は10分～30時間程度、好ましくは15分～24時間程度行うことがよい。保護基の脱離は、上記と同様に行うことができる。

樹脂からペプチド鎖を切断するには酸で処理することが好ましい。酸としては、たとえば、トリフルオロ酢酸 (TFA) を挙げることができる。

[0058] 2以上のペプチド断片を連結させる公知のライゲーシオン反応としては、ネイティブケミカルライゲーシオン (NCL法) を利用することができる (Dawson et al., Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, Science, 266:776-779 (1994))。

[0059] NCL法はC末端に α カルボキシチオエステル部分を有するようにした第1のペプチドとN末端にシステイン残基を有する第2のペプチドとの化学選択反応であり、システインの側鎖のチオール基 (SH基、スルフヒドリル基ともいう) がチオエステル基のカルボニル炭素に選択的に反応し、チオール交換反応により、チオエステル結合初期中間体が生成する。この中間体は、自発的に分子内転位して、連結部位に天然アミド結合を与え、一方、システイン側鎖チオールを再生させる。

[0060] NCL法において、N末端にシステイン残基を有する第2のペプチドのシステイン結合部位はライゲーシオン反応後に脱硫反応 (Yan et al.,

, J. Am. Chem. Soc. 123, 526 (2001)) により、アラニンに置換することもできる。すなわち本来アラニンである部位をシステインに置換して合成を行い、ライゲーション反応の結合部位とすることができる。

[0061] ペプチドの合成反応またはライゲーション反応の前後の工程に分離および／または精製工程を含んでもよい。精製方法は公知の方法を用いればよく、カラムクロマトグラフィーなどが挙げられる。カラムクロマトグラフィーの例としては、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどが挙げられるが特に限定されない。分離精製を所望する対象物に応じて、溶媒、カラムの充填剤、分離対象物および精製対象物の検出方法、温度条件、圧力条件などは適宜選択することができる。

[0062] ペプチドの合成反応、ライゲーション反応または分離および／または精製工程の前後に適宜、公知の洗浄、乾燥、希釈、および濃縮工程などを含んでもよい。

[0063] ポリペプチドが正しくフォールディングされない場合、リフォールディングすることが好ましい。リフォールディングは、たとえば精製したポリペプチドを尿素、グアニジン塩酸塩などを含む変性バッファーなどに溶解させるか、融合ポリペプチドの粗精製液に尿素、グアニジン塩酸塩などの変性剤を添加して、融合ポリペプチドの凝集を溶解してから、たとえば、非特許文献 (Arakawa et al., Antibodies 232 (2014)) に記載される、希釈リフォールディング法、透析リフォールディング法、固相リフォールディング法、サイズ排除クロマトグラフィーリフォールディング法、界面活性剤リフォールディング法などにより行うことができる。好ましくは、透析リフォールディング法である。

[0064] 4. 測定方法

本実施形態の測定方法は、上述のポリペプチドまたはその多量体を固定した固相と、前記固相に固定した捕捉体とを用いて、検体中の被検物質をイン

ビトロで測定する方法である。

[0065] 捕捉体としては、被検物質に特異的に結合する物質を用いることができる。捕捉体はリービオチンやその改変体が直接的または間接的に付加されている。捕捉体の例としては、抗体、抗原、アプタマー、レクチン、核酸、酵素などを挙げることができるが特に限定されない。

[0066] 捕捉体または後述の検出体として用いられる「抗体」は、全長の抗体またはそのフラグメントであり得る。抗体のクラスは、IgG、IgA、IgM、IgDおよびIgEのいずれであってもよいが、好ましくはIgGである。IgGのサブクラスは特に限定されず、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4のいずれであってもよい。抗体のフラグメントとしては、たとえば還元型IgG (rIgG)、Fab、Fab'、F(ab')、F(ab')₂、Fv、一本鎖抗体 (scFv)、ダイアボディ、トリアボディなどが挙げられる。これらの抗体フラグメントを調製する方法自体は公知である。抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体のいずれであってもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト化抗体などであってもよい。また、抗体は、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ウマ、ラクダ、アルパカ、ニワトリなどのいずれの動物に由来する抗体であってもよい。

[0067] 被検物質は、本実施形態の測定方法の検出対象の物質であり、捕捉体によって捕捉可能な物質であればよい。被検物質の例としては、細胞、細胞外小胞、タンパク質、核酸、多糖類、糖タンパク質、リン脂質などを挙げることができるが特に限定されない。

[0068] 検体は、被検物質を含む試料または被検物質が含まれることが疑われる試料である。検体の例としては、生物由来の試料や環境サンプル、これらに前処理を施した試料などが挙げられる。生物由来の試料としては体液、排泄物が挙げられる。体液の例としては、生体から採取した試料であれば、特に限定されないが、血清、血漿、血液、髄液、精液、組織、組織液、リンパ液、唾液、鼻咽頭拭い液、喀痰、気管支肺胞洗浄液などが挙げられる。排泄物の

例としては、特に限定されないが、尿、糞便などが挙げられる。環境サンプルの例としては下水、河川水、海水、土壌などが挙げられる。

[0069] 上述のポリペプチドまたはその多量体は、固相に固定されている。該固定の態様は特に限定されない。たとえば、上述のポリペプチドまたはその多量体と固相とを直接結合してもよいし、間接的に結合してもよい。直接の結合としては、たとえば、物理的吸着などが挙げられる。間接的な結合とは、上述のポリペプチドまたはその多量体と固相との間に別の物質が介在する態様である。たとえば、固相表面がウシ血清アルブミンやポリエチレングリコールなどのブロッキング剤で被覆されている場合、上述のポリペプチドまたはその多量体と固相と該ブロッキング剤とを結合することによって上述のポリペプチドまたはその多量体を固相上に固定することができる。

[0070] 本実施形態の測定方法においては、捕捉体と固相とが別々にユーザに提供されてもよいし、捕捉体と固相とがあらかじめ固相に固定された状態でユーザに提供されてもよい。捕捉体と固相とが別々にユーザに提供される場合、本実施形態の測定方法は、検体と固相と捕捉体とを接触する工程を含んでもよい。該工程においては、検体と固相と捕捉体との接触の順序は特に限定されない。好ましくは、検体と捕捉体とを接触させて検体中の被検物質と捕捉体との複合体を形成し、その後該複合体と固相とを接触させて複合体を固相上に形成する。この場合、検体にDービオチンが含まれていても、固相上に固定されている上述ポリペプチドまたは多量体は、Dービオチンとは実質的に結合せず、Lービオチン基を含む捕捉体と結合することができる。

本実施形態の測定方法は捕捉体と固相とが別々にユーザに提供されることは、複数種の被検物質に対して固相を共通化できる点で好ましい。

[0071] 本実施形態の測定方法は、固相上に、捕捉体と被検物質と検出体とを含む複合体（以下、「サンドイッチ複合体」ともいう）を形成する工程（以下、「複合体形成工程」ともいう）と、この複合体に含まれる検出体に基づくシグナルを測定する工程（以下、「測定工程」ともいう）と、を含んでもよい。

[0072] 複合体形成工程では、固相と捕捉体と被検物質を含む検体と検出体とを接触することにより、固相上にサンドイッチ複合体を形成することができる。固相と捕捉体と検体と検出体との接触順序は特に限定されない。好ましくは、検体と捕捉体とを接触させて検体中の被検物質と捕捉体との複合体を形成し、その後該複合体と固相とを接触させて複合体を固相上に形成し、その後該複合体と検出体とを接触させてサンドイッチ複合体を固相上に形成する。この場合、検体にDービオチンが含まれていても、固相上に固定されている上述のポリペプチドまたは多量体は、Dービオチンとは実質的に結合せず、Lービオチン基を含む捕捉体と結合することができる。被検物質と捕捉体との複合体を固相上に形成した後、検出体を接触させる前に未反応の成分を除去するB/F分離を行うことが好ましい。複合体形成工程における各成分の反応条件（たとえば、溶媒、温度、圧力、反応時間など）は当業者が適宜選択しうる。

[0073] 検出体は、被検物質に結合する物質と、標識物質とを含むことが好ましい。被検物質に結合する物質は、たとえば抗体、抗原、アプタマー、レクチン、核酸などが挙げられる。また、検出体は、被検物質に結合する一次物質と、標識物質を含み一次物質に結合する二次物質とを含んでいてもよい。一次物質および二次物質は、たとえば抗体、抗原、アプタマー、レクチン、核酸などが挙げられる。一次物質および二次物質がいずれも抗体の場合、それぞれ一次抗体および二次抗体と呼ばれ、当業界において広く使用されている。一次抗体および二次抗体を用いる場合は、被検物質に一次抗体を結合し、該一次抗体に二次抗体を結合することにより、標識物質を含むサンドイッチ複合体を形成することができる。具体例としては、一次物質は、マウス、ウサギなどの動物由来であって、被検物質に特異的に結合する一次抗体であり、二次物質は、標識物質を含み、該動物の抗体に特異的に結合する二次抗体である。

[0074] 標識物質は、特に限定されないが、たとえば、それ自体がシグナルを発生する物質（以下、「シグナル発生物質」ともいう）、および、他の物質の反応

を触媒してシグナルを発生させる物質が挙げられる。シグナル発生物質としては、蛍光物質、放射性同位元素、発色物質などが挙げられる。他の物質の反応を触媒して検出可能なシグナルを発生させる物質としては、たとえば酵素が挙げられる。蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、Alexa Fluor（登録商標）などの蛍光色素、GFPなどの蛍光タンパク質などが挙げられる。放射性同位元素としては、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{32}P などが挙げられる。発色物質としては、金ナノコロイドなどの金属コロイドが挙げられる。酵素としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、チロシナーゼ、酸性ホスファターゼ、ルシフェラーゼなどが挙げられる。好ましい標識物質は酵素であり、アルカリホスファターゼが特に好ましい。

[0075] 測定工程において、検出体に基づくシグナルを測定することによって、被検物質を測定することができる。測定工程によって得られた値に基づき、被検物質の定量、定性的検出または半定量的検出を行うことができる。ここで、半定量的検出とは、シグナルの強度を、「シグナル発生せず」、「弱」、「中」、「強」などのように段階的に示すことをいう。

[0076] シグナルを検出する方法自体は、該技術において公知である。本実施形態では、上記の標識物質に由来するシグナルの種類に応じた方法を適宜選択すればよい。シグナルの検出装置は、たとえば、吸光度計、分光光度計、蛍光光度計、赤外光光度計、ラマン分光光度計、SPR測定装置、化学発光酵素免疫測定装置などを用いることができるが、特に限定されない。

[0077] 一実施形態では、検体中の被検物質を免疫学的に測定する。免疫学的測定法としてELISA法、免疫クロマトグラフ法、特開平1-254868号公報に記載の免疫複合体転移法などが挙げられる。

[0078] 別の実施形態では、被検物質として検体中の標的核酸を測定する。たとえば、上述のポリペプチドまたは多量体を固定した固相と、捕捉体として標的核酸にハイブリダイズする核酸プローブとを用いることができる。該核酸プ

ローブは、Ｌービオチンにより標識されており、固相上の本実施形態のポリペプチドまたは多量体と結合する。固相と標的核酸と検体とを接触させることによって、検体中の標的核酸が固相上に固定される。固相上で標的核酸を鋳型とし、核酸プローブをプライマーとして、DNAポリメラーゼおよびdNPTsによりDNAの伸長反応を行う。DNAの検出は、公知の方法により行うことができる。たとえば、合成されたアンプリコンに検出体としてインターカレーター（たとえばSYBR（商標）Green I色素、エチジウムブロマイドなど）で標識し、蛍光を測定することができる。あるいは、検出体として伸長鎖に結合可能な蛍光プローブを結合し、蛍光を測定することができる。また、TaqMan（商標）法を用いてもよい。

図1を参照して、本実施形態の測定方法の一例を説明する。

[0079] まず、容器90に被検物質81を含む検体とR1試薬とが分注される。第1試薬分注部551により、R1試薬が容器90中に分注され、検体分注部530により、容器90中に検体が分注される。R1試薬は、Ｌービオチンが付加された捕捉体84を含有し、被検物質81と反応して結合する。検体とR1試薬とを分注後、反応部580において容器90内の試料が所定温度に加温されることにより、捕捉体84と被検物質81とが結合する

[0080] 次に、第2試薬分注部552により、容器90にR2試薬が分注される。R2試薬は、固相82を含有する。固相82は、本実施形態のポリペプチドまたはその多量体が固定されている。R2試薬の分注後、反応部580において容器90内の試料が所定温度に加温される。この結果、前記Ｌービオチンと、前記固相上の本実施形態のポリペプチドまたはその多量体とが結合することにより、被検物質81と捕捉体84とが固相82に固定される。

[0081] 固相82上に形成された被検物質81および捕捉体84と、未反応の捕捉体84と、をBF分離装置100による1次BF分離処理によって分離してもよい。1次BF分離処理によって、未反応の捕捉体84などの不要成分が、容器90中から除去される。

[0082] 次に、第3試薬分注部553により、容器90にR3試薬が分注される。

R 3 試薬は、検出体 8 3 を含有し、被検物質 8 1 と反応して結合する。R 3 試薬の分注後、反応部 5 8 0 において容器 9 0 内の試料が所定温度に加温される。この結果、固相 8 2 上に、被検物質 8 1 と、検出体 8 3 と、捕捉体 8 4 とを含むサンドイッチ複合体 8 5 が形成される。図 1 の例では、検出体 8 3 は、酵素標識抗体である。

[0083] 固相 8 2 上に形成されたサンドイッチ複合体 8 5 と、未反応の標識物質 8 3 とは、B F 分離装置 1 0 0 による 2 次 B F 分離処理によって分離される。2 次 B F 分離処理によって、未反応の検出体 8 3 などの不要成分が、容器 9 0 中から除去される。

[0084] その後、第 4 試薬分注部 5 5 4 および第 5 試薬分注部 5 5 5 の各々により、容器 9 0 に R 4 試薬および R 5 試薬が分注される。R 4 試薬は、緩衝液を含有する。固相 8 2 と結合したサンドイッチ複合体 8 5 が緩衝液中に分散される。図 1 の例では R 5 試薬は、化学発光基質を含有する。R 4 試薬に含有される緩衝液は、サンドイッチ複合体 8 5 に含まれる検出体 8 3 に標識されている酵素と、R 5 試薬に含まれる化学発光基質との反応を促進する組成を有する。R 4、R 5 試薬の分注後、反応部 5 8 0 において容器 9 0 内の試料が所定温度に加温される。検出体 8 3 に対して基質を反応させることによって光が発生し、発生する光を検出部 5 2 0 の光検出器 5 2 1 により検出する。検出された光の強度に基づき被検物質 8 1 を測定する。

[0085] なお、本測定方法では R 1 試薬と R 2 試薬とが容器 9 0 に別々に分注されているが、R 1 試薬と R 2 試薬とをあらかじめ混合し、捕捉体 8 4 が固相 8 2 に固定された状態で容器 9 0 に分注してもよい。

[0086] 5. 固相および固相を含む試薬キット

本実施形態の固相は、上述のポリペプチドまたはその多量体を固定した固相である。

[0087] 本実施形態の固相とは、捕捉体を固定するための不溶性の担体である。上述のポリペプチドまたはその多量体の、固相への固定の態様は上で述べた通りである。固相は公知の固相から目的に応じて選択することができる。固相

の素材としては、たとえば高分子化合物、無機物などから選択することができる。固相の素材は複数の素材を適宜組み合わせてもよい。

[0088] 高分子化合物は、有機高分子化合物、無機高分子化合物、半有機化合物を含む。高分子化合物は、たとえばラテックス、ゴム、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、スチレンーブタジエン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、スチレンーメタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレインーエチレングリコールジメタクリレート共重合体、ポリビニリデンジフルオライド（P V D F）、シリコーン、不溶性アガロース、不溶性デキストランなどが挙げられる。

[0089] 無機物は無機化合物および金属を含む。無機化合物としては、たとえば磁性体（酸化鉄、酸化クロム、コバルト、ニッケル、フェライト、マグネタイトなど）、ガラス、シリカ、アルミナなどが挙げられる。金属はたとえば金、銀およびそれらを含む物質などが挙げられる。

本実施形態の試薬キットは上述のポリペプチドまたはその多量体が結合した固相と、Ｌービオチンが付加された捕捉体と、を含む。

[0090] 本実施形態の試薬キットの一例を、図２に示す。図２において、１１は、試薬キットを示し、１２は、上述のポリペプチドまたはその多量体を結合した粒子を含む試薬を収容した第１容器を示し、１３は、Ｌービオチンが付加された捕捉体を含む試薬を収容した第２容器を示し、１４は、梱包箱を示し、１５は、添付文書を示す。添付文書には、各試薬の組成、使用方法、保存方法などが記載されてもよい。試薬キットにはその他の試薬が含まれていてもよく、たとえば緩衝溶液、キャリブレーター、検出体などが挙げられる。

実施例

[0091] 以下に実施例を示して本発明についてより詳細に説明する。しかし、本発明は実施例に限定して解釈されるものではない。

１．実施例１：Ｄーストレプトアビジンの調製

１－１．方法

- [0092] 配列番号1に示されるポリペプチドの13番目から139番目のアミノ酸からなるポリペプチド(D-コアストレプトアビジン)を合成すべく、配列番号1の13番目から71番目のアミノ酸からなるペプチドチオエステル、および72番目アラニン残基をシステインに置換したポリペプチドから139番目のアミノ酸からなるポリペプチドを合成した。
- [0093] (1) HMPB-ChemMatrix樹脂(0.49mmol/g、Biotage製)(820mg、400μmol)にDCMを加え1時間以上室温で膨潤させた。次にDCM(12mL)に保護基で側鎖を保護したアミノ酸であるFmoc-D-Thr(tBu)-OH(795mg、2.0mmol)、縮合剤としてMSNT(593mg、2.0mmol)、5'末端ヒドロキシ基のキャッピング剤として1-メチルイミダゾール(160μL、2.0mmol)を加え、混合した。この混合溶液を膨潤させた樹脂に加え、室温で3時間攪拌した。
- [0094] (2) 反応溶液を除いた後、DCM、DMFで樹脂を十分に洗浄した。次にDMF(12mL)に無水酢酸(2.0mL、20mmol)とピリジン(1.6mL、20mmol)を加え、よく混合し、これを樹脂と混ぜて室温で攪拌した。30分後、溶液を除き樹脂をDMFで十分に洗浄した。
- [0095] (3) Fmoc-D-Thr(tBu)-OHを縮合させた樹脂(100μmol)に対して、Fmoc-Gly-OH(500μmol)、活性化剤のDIC(500μmol)、エピ化防止剤のOxyma Pure(商標)(500μmol)(Merck KGaA製)、溶媒のN-メチルピロリドン(NMP)(4mL)を加えて縮合させた。同様の手順で保護基で側鎖を保護したアミノ酸をFmoc-D-Ser(tBu)-OH(500μmol)、Fmoc-D-Asp(OtBu)-(Hmb)-Gly-OH(1回目:150μmol、2回目:100μmol)に変更して、手合成により縮合した。Fmoc-D-Asp(OtBu)-(Hmb)-Gly-OHはダブルカップリングにより縮合した。
- [0096] (4) マイクロ波支援自動ペプチド合成機(LibertyBlue、CE

M製)を用いて39L-66Tまでの28残基を伸長した。マイクロ波支援自動ペプチド合成機ではFmoc-D-アミノ酸(500 μ mol)、DIC(500 μ mol)、Oxyma Pure(商標)(500 μ mol)およびDIPEA(50 μ mol)が用いられ、縮合反応および樹脂の洗浄にはDMF、Fmoc基の除去には20%ピペリジン/DMFを使用した。縮合反応とFmoc基の除去反応時にはマイクロ波を照射することで反応を促進させた。

[0097] (5) 樹脂を回収し、再び手合成によりFmoc-D-Ala-OH、Fmoc-D-Asp(OtBu)-(Hmb)-Gly-OHを(3)と同様の反応条件で、ペプチドを伸長した。ここではFmoc-D-Asp(OtBu)-(Hmb)-Gly-OHのダブルカップリングを100 μ molで2回行った。樹脂の結合したポリペプチドにNMP(7 mL)に無水酢酸(167 μ L、1.8 mmol)、DIPEA(78.8 μ L、0.45 mmol)およびOxyma Pure(商標)(5.3 mg、37 μ mol)を加え、混合し、室温で15分間攪拌した後にNMPで十分に洗浄した。

[0098] (6) マイクロ波支援自動ペプチド合成機を用いて13A-35Aまでの23残基を伸長し、最終的に樹脂が結合した13A-71Tの59残基のポリペプチドを調製した。

[0099] (7) 樹脂が結合した59残基のポリペプチドをN末端のFmoc基が除去された状態で合成機から回収した。回収した樹脂(100 μ mol)にBoc₂O(115 μ L、500 μ mol)、DIPEA(87 μ L、500 μ mol)、NMP(3 mL)を加え、室温で攪拌した。1時間後、溶液を除きNMPで樹脂を十分に洗浄した。このBoc化の操作を2度繰り返した。

[0100] (8) 樹脂が結合した59残基のポリペプチド(100 μ mol)に1%TFFA/DCM溶液(3 mL)を加え、5分間攪拌した後、ピリジン(585 μ L)を入れたナスフラスコに濾液を回収した。この操作を13回繰り返した後、トリフルオロエタノール/DCM(3:5)溶液(3 mL)で樹脂を3回洗浄し、洗液を同じナスフラスコに回収した。溶媒を減圧留去した後、

得られた固体に H_2O (40 mL)を加え撹拌した。10分間遠心 (10000 rpm) し、上澄みを除去。この操作を3回繰り返し、個体を洗浄した後、得られた固体を凍結乾燥することにより保護ペプチド (171 mg、20 μmol) を得た。

[0101] (9) 得られた保護ペプチド (116 mg、13.5 μmol) を NMP (5 mL) に溶かし、撹拌しながら -15°C に冷却した。これにチオフェノール (42 μL 、405 μmol)、PyBOP (36.7 mg、67.5 μmol)、DIPEA (12 μL 、67.5 μmol) を加え、一晩撹拌した。反応完結後、反応溶液を氷冷したジエチルエーテル (40 mL) に注ぎ撹拌した。10分間遠心 (10000 rpm) し、上澄みを除去した。この操作を3回繰り返した後、生じた沈殿を風乾することにより保護粗生成ペプチドチオエステル (チオフェニルエステル体) (113 mg) を得た。得られた粗生成物に TFA : H_2O : トリイソプロピルシラン (TIPS) : エタンジチオール (EDT) (92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5、v/v/v/v) 混合液 (3 mL) を加え、室温で撹拌した。3時間後、反応液を氷冷したジエチルエーテル (40 mL) に加え、生じた沈殿を風乾させて脱保護粗生成ペプチド (85.6 mg) を得た。得られた脱保護粗生成ペプチドに 8M のグアニジン塩酸塩、0.2M の 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (MESNA) を含む 0.2M のリン酸バッファー (pH 7.0) (3 mL) を加え室温で撹拌した。1時間以上撹拌の後、RP-HPLC (Proteonavi C1、4.6×250mm、Linear gradient of B: 17.5–21.5、1.0 mL/min、12 min、60°C、220 nm、A: aqueous solution containing 0.1% TFA、B: 90% MeCN、10% H_2O containing 0.09% TFA、資生堂製) により精製し、59 残基のペプチドチオエステル (13A–71T、MESNAチオエステル体) (6.6 mg、1.09 μmol) を得た。

[0102] (システインを含むポリペプチドの合成)

(1) HMPB-ChemMatrix樹脂 (0.49 mmol/g) (612 mg、300 μ mol) にDCMを加え1時間以上室温で膨潤させた。次にDCM (9 mL) にFmoc-D-Ser(tBu)-OH (575 mg、1.5 mmol)、MSNT (444 mg、1.5 mmol) および1-メチルイミダゾール (120 μ L、1.5 mmol) を加え、よく混合した。この混合溶液を膨潤させた樹脂に加え、室温で一晩攪拌した。反応溶液を除き、DCMおよびDMFで樹脂を十分に洗浄した。次にDMF (9 mL) に無水酢酸 (1.5 mL、15 mmol) とピリジン (1.2 mL、15 mmol) を加え、樹脂と混合し、室温で30分間攪拌した。その後、樹脂をDMFで十分に洗浄した。

[0103] (2) マイクロ波支援自動ペプチド合成機を用いて、Fmoc-D-Ser(tBu)-OHを縮合させた樹脂 (100 μ mol) を、72°C-139 Sでの68残基を伸長した。縮合反応で使用した各試薬の量はFmoc-D-アミノ酸 (500 μ mol)、DIC (500 μ mol)、Oxyma Pure (商標) (500 μ mol)、DIPEA (50 μ mol) であった。縮合反応および樹脂の洗浄にはDMF、Fmoc基の除去には20%ピペリジン/DMFを使用し、縮合およびFmoc基の除去反応の際にはマイクロ波を照射することで反応を促進させた。

[0104] (3) 樹脂が結合した68残基のポリペプチドを (100 μ mol) にTFA:H₂O:TIPS:EDT (92.5:2.5:2.5:2.5、v/v/v/v) 混合液 (10 mL) を加え、室温で攪拌した。3時間後、反応液を氷冷したジエチルエーテル (80 mL) に加え、生じた沈殿を風乾させて脱保護粗生成ペプチド (396 mg) を得た。

[0105] (4) RP-HPLC (Triart-C18、20×250 mm、Linear gradient of B:30-45、9.9 mL/min、30 min、60°C、220 nm、A:aqueous solution containing 0.1% TFA、B:90% MeCN、10% H₂O containing 0.09% TFA、YMC製) により精製し、68残

基のペプチドセグメント (72C-139S) (37.2 mg、5.03 μ mol) を得た。

[0106] (ポリペプチドのライゲーション)

0.2 M のリン酸バッファー (8 M のグアニジン塩酸塩、40 mM の 4-メルカプト酢酸、40 mM のアスコルビン酸ナトリウム、40 mM のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) を含む、pH 7.1) (546 μ L) にペプチドチオエステル (13A-71T) (6.0 mg、0.933 μ mol)、ペプチドセグメント (72C-139S) (9.3 mg、1.26 μ mol) を加え、室温で終夜撹拌した。反応完結後、0.2 M のリン酸バッファー (8 M のグアニジン塩酸塩、0.2 M の 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウムを含む、pH 7.0) で2倍に希釈し、室温で撹拌した。1時間以上の撹拌の後、RP-HPLC (Proteonavi C1、4.6×250 mm、Linear gradient of B: 15-35、1.0 mL/min、30 min、60°C、220 nm、A: aqueous solution containing 0.1% TFA、B: 90% MeCN、10% H₂O containing 0.09% TFA、資生堂製) により精製し、全長127残基の [Cys60] - (1-127) ペプチド (6.7 mg、0.504 μ mol) を得た。

[0107] (脱硫反応)

[Cys60] - (1-127) ペプチド (4.7 mg、0.354 μ mol) を8 M のグアニジン塩酸塩、0.25 M のTCEPを含む0.2 M のリン酸バッファー (pH 7.1) 707 μ Lに溶解し、tert-ブタンチオール (40 μ L)、VA-044/H₂O (250 mg/mL、27 μ L) を順次加えた後、容器を遮光し室温で撹拌した。4時間後、1.4 mLの8 M のグアニジン塩酸塩、0.25 M のTCEPを含む0.2 M のリン酸バッファー (pH 7.1) を加えてよく混ぜた。この混合液にジエチルエーテル (1.7 mL) を加え、よく撹拌した後に静置し、水相を回収した。これを3回繰り返して回収した水相からジエチルエーテルを十分に飛ばした後、R

P-HPLC (Proteonavi C1、4.6×250 mm、Linear gradient of B:15–45、1.0 mL/min、30 min、60℃、220 nm、A:aqueous solution containing 0.1% TFA、B:90% MeCN、10% H₂O containing 0.09% TFA、資生堂製) により精製し、全長127残基のポリペプチド (2.6 mg、0.196 μmol) を得た。

[0108] (4量体の調製)

全長127残基のポリペプチドを変性バッファー (50 mM Tris-HCl、6 M グアニジン-HCl、1 mM EDTA、200 mM NaCl、pH 8.0 (4℃)) に1 mg/mLとなるよう溶解し、85℃で45分間加熱した。加熱した溶液5 mLを3 MのグアニジンHClを含むバッファー1 (50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、200 mM NaCl、pH 8.0) にて4℃で12時間透析した。次に2 MのグアニジンHClを含むバッファー1にて4℃で36時間透析した。0.4 MのL-アルギニンHClと1 MのグアニジンHClを含むバッファー1にて4℃で12時間透析した。0.4 MのL-アルギニンHClと0.5 MのグアニジンHClを含むバッファー1にて4℃で36時間透析した。最後にバッファー1にて4℃で4時間の透析を2回繰り返し、バッファー1にて室温で一晩透析を行った。

[0109] (ゲルろ過クロマトグラフィー解析)

透析後のポリペプチドをアミコンウルトラ-15 10K 遠心式フィルターデバイス (Merck KGaA製) で濃縮後、AKTA Primeシステム (Cytiva製) を用いてSuperdex 200 10/300 GL (Cytiva製) に500 μLずつ供し、バッファー1を流速0.4 mL/分で流し、波長280 nmの吸光度の経時変化を溶出性の指標とするゲルろ過クロマトグラフィーを行った。さらに分子量の推定のために市販の4量体の天然体コアストレプトアビジン (ロシュ製) についても同様にゲルろ過クロマトグラフィーを行った。

[0110] 1-2. 結果

上記で調製したポリペプチドのゲルろ過クロマトグラフィーの、波長280nmの吸光度の経時変化を図3に示す。画分8は凝集体のピークである。画分14から画分18は市販の4量体コアストレプトアビジンにおいても、同様のピークが見られた画分であることから、4量体ポリペプチドのピークであると推定される。この画分14から画分18までを回収し、アミコンウルトラ-15 10K 遠心式フィルターデバイス（Merck KGaA製）を用いて濃縮を行い、D-アミノ酸残基で構成される4量体のD-ストレプトアビジン（以下、便宜上実施例では単に「D-ストレプトアビジン」と称する）を調製した。

[0111] 2. 実施例2：SPR解析によるD-ストレプトアビジンのビオチン結合性評価

2-1. 方法

実施例1で得たD-ストレプトアビジンについて、天然型であるD-ビオチンおよびD-ビオチンの光学異性体であるL-ビオチンに対する結合能を、SPRを測定原理とした分子間相互作用解析装置（Biacore T200）により評価した。

[0112] L-ビオチンは非特許文献（Journal of the American Chemical Society 1978、100、1558-1563）に記載の方法によりD-ビオチンとL-ビオチンの混和物を合成したのち、液体クロマトグラフィーによる光学分割をダイセル社に委託して調製した。カラムはCHIRALPAK IG（ダイセル製、Φ46×50mm）を用い、移動相にメタノール：酢酸混合溶媒（100：0.1（v/v））として流速1.0mL/分、カラム温度40℃、検出波長205nmの条件下で光学分割を行った。

[0113] （1）ビオチン標識アルブミンの調製

50mg/mLのウシ血清アルブミン/0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.5）2.8mLに10mg/mLのD-ビオチン-AC5-OSu（同仁

化学社製)を含むN, N-ジメチルホルムアミド溶液(16.3 μ L)を加え、攪拌後、35℃、1時間静置した。その後、0.1Mのリン酸バッファ(pH7.5)で平衡化したPD-10(Cytiva製、17085101)により脱塩を実施し、D-ビオチン標識アルブミンを回収した。HABA法によるアルブミン1分子あたりのD-ビオチン標識数は0.4であった。

同様にL-ビオチン-AC5-OSu[前記実施例3に記載の(L-ビオチンのアミド化)を参照]を用いてL-ビオチン標識アルブミンを調製した。

[0114] (2) センサーチップへの固定

Biacore T200システムのCM5センサーチップ(Cytiva製)のフローセル1および3に対して、ウシ血清アルブミンをアミンカップリングキット(Cytiva社)によるアミンカップリング法によりターゲットレベル400RUで固定化した。さらにフローセル2、4に対して同様にアミンカップリング法によって、それぞれL-ビオチン標識アルブミン、D-ビオチン標識アルブミンをターゲットレベル400RUで固定化した。いずれのフローセルも1Mエタノールアミン溶液、pH8.5(Cytiva製)でブロッキングを実施した。

[0115] (ビオチンとの相互作用測定)

ランニングバッファとしてHBS-EP+(Cytiva製)を使用し、アナライトとして実施例1で調製したD-ストレプトアビジンをシングルサイクル法により、10pMから100nMの範囲で流速30 μ L/minで各フローセルに流した。

[0116] 2-2. 結果

D-ストレプトアビジンとL-ビオチン標識アルブミンとの分子間相互作用のセンサグラムを図4Aに、D-ストレプトアビジンとD-ビオチン標識アルブミンとの分子間相互作用のセンサグラムを図4B示す。天然体コアストレプトアビジンとD-ビオチン標識アルブミンとの分子間相互作用のセンサグラムを図5に示した。

[0117] 天然体コアストレプトアビジンとD-ビオチン標識アルブミンとのセンサグラムと、D-ストレプトアビジンとL-ビオチン標識アルブミンとのセンサグラムの比較から本実施例のD-ストレプトアビジンとL-ビオチン標識アルブミンとが、天然体コアストレプトアビジンとD-ビオチン標識アルブミンの組み合わせと同様に非常に強固に結合していることがわかった。

[0118] 図4において、D-ストレプトアビジンとD-ビオチン標識アルブミンとはアナライトであるD-ストレプトアビジンの結合による特異的なセンサグラムの変化が確認されなかった。特許文献1に示されるストレプトアビジン変異体と天然型のD-ビオチン標識アルブミンとの解離定数 $K_d = 3.48 \times 10^{-7}$ を考慮すると、本実施例のD-ストレプトアビジンとD-ビオチンとの結合性が極めて低く、実質的に結合しないといえることができる。

[0119] 3. 実施例3：ELISA法におけるD-ビオチンの測定系に対する影響の評価

3-1. 方法

(ストレプトアビジン結合固相の作製)

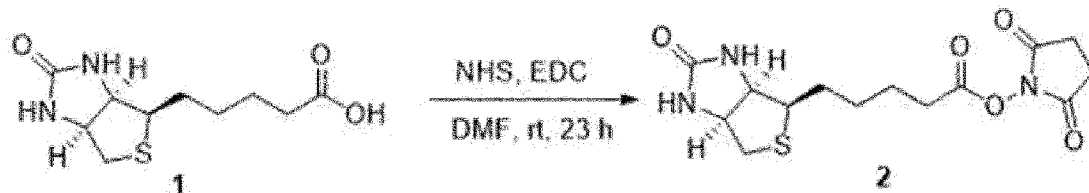
96ウェルELISAプレート(Thermo Fisher Scientific製)をPBSで3回洗浄したのち、実施例1で調製したD-ストレプトアビジン($1 \mu\text{g/mL}$ 、PBS、 $100 \mu\text{L}$)を加え、 4°C で一晩静置した。PBSで3回洗浄した後、2%ウシ血清アルブミンを含むPBSバッファ($200 \mu\text{L}$)を添加し 25°C 、回転速度 600 rpm で2時間振とう攪拌を行い、D-ストレプトアビジン固定化プレートを作製した。L-ストレプトアビジン(ロシュ製)についても同様の処理を行いL-ストレプトアビジン固定化プレートを作製した。

[0120] (L-ビオチンのアミド化)

ビオチン(43 mg)とN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(24.3 mg)をDMF(1.2 mL)に溶解し、エチル(ジメチルアミノプロピル)カルボキシジイミド(EDC)(40.5 mg)を加え室温にて23時間攪拌した。溶媒を留去して得られる残留物をエタノール：酢酸：水(9

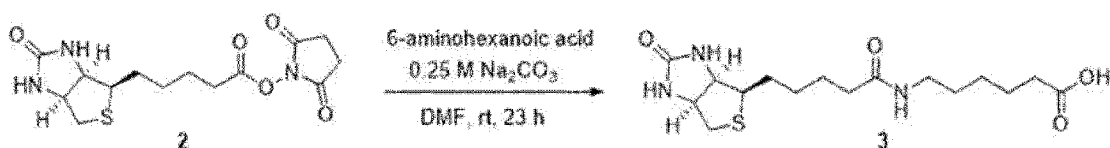
5 : 5 : 1) から再結晶し、6 - (5 - ((3 a R, 4 R, 6 a S) - 2 - オキソヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3, 4 - d] イミダゾール - 4 - イル) ペンタンアミド) ヘキサン酸 6 - アミノヘキサン酸 (化合物 2) (63.9 mg) を得た。

[化1]



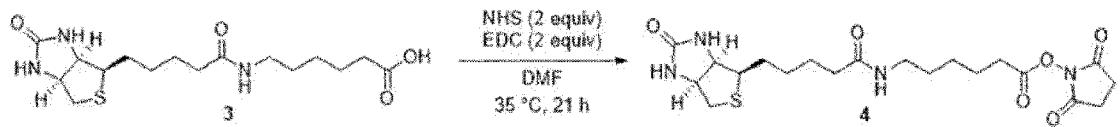
[0121] 6 - アミノヘキサン酸 (24.2 mg) を 0.25 M の炭酸ナトリウム水溶液 (0.4 mL) に溶解した。この溶液を、化合物 2 の DMF (1 mL) 溶液に加え、室温にて 23 時間攪拌した。溶媒を留去後、残留物を水洗した。4 M 塩酸にて酸性にし、生成した固体を濾取して 6 - (5 - ((3 a R, 4 R, 6 a S) - 2 - オキソヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3, 4 - d] イミダゾール - 4 - イル) ペンタンアミド) ヘキサン酸 (化合物 3) (68.5 mg) を得た。

[化2]



[0122] 化合物 3 (68.5 mg) と NHS (40.5 mg) を DMF (3.3 mL) に溶解し、EDC (67.5 mg) を室温にて加え、35℃にて 21 時間攪拌した。溶媒を留去して得られる残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、DCM - メタノール溶出部より 2 - ジオキソピロリジソン - 1 - イル 5 - ((3 a R, 4 R, 6 a S) - 2 - オキソヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3, 4 - d] イミダゾール - 4 - イル) ペンタンアミド (化合物 4) (47.6 mg) を得た。

[化3]



[0123] (ビオチン標識抗体の調製)

5. 1 mg/mLの甲状腺刺激ホルモン抗体 (TSH抗体) (T2-194) (北山ラベス製) (25 μ L) に 16.7 mg/mLのL-ビオチン-AC5-OSuを含むDMSO溶液 (1.3 μ L) 加え、攪拌後、35℃、1時間静置した。その後、0.1 Mのリン酸バッファー (pH 7.5) で平衡化したPD-10 (Cytiva製、17085101) に供し、500 μ Lずつの画分を分取し、280 nm波長の吸収ピーク画分を回収し、L-ビオチン標識TSH抗体を作製した。D-ビオチン-AC5-OSu (同仁化学製) についても同様の処理を行い、D-ビオチン標識TSH抗体を作製した。

[0124] (D-ビオチン存在下における、測定系への影響の評価)

(1) 1.5 mL tubeに検体としてHISCL (商標) TSH calibrator C3 (シスメックス製) 400 μ Lおよび、HISCL (商標) TSH R1試薬 (シスメックス製) を400 μ L添加し、37℃、600 rpmの条件で30分反応させた。なお、検体についてはD-ビオチン影響度を評価するため、0 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mLまたは100 ng/mLのD-ビオチンを添加してR1試薬と反応させた。

[0125] (2) ブロッキング後のD-ストレプトアビジン固定化プレートについて、HISCL (商標) wash solution (シスメックス製) で3回洗浄し、各wellに1.5 mL tubeで反応済みの溶液を60 μ Lずつ添加した。37℃、600 rpmの条件で20分反応させた。上記で作製したL-ビオチン標識TSH抗体を添加し、37℃、600 rpmの条件で30分反応させた。

[0126] (3) 反応後はプレートをHISC L (商標) wash solution (シスメックス製) で5回洗浄し、HISC L (商標) R4試薬 (シスメックス製) を50 μ Lずつ添加し、続けてHISC L (商標) R5試薬 (シスメックス製) を100 μ Lずつ添加し、37℃、600 rpmの条件下で30分反応させた。反応後はマイクロプレートリーダー (TECAN製、Infinite 200 PRO) にて発光検出を行った。また、ブロッキング後のL-ストレプトアビジン固定化プレートとD-ビオチン標識TSH抗体についても同様に測定を行った。

[0127] 3-2. 結果

D-ビオチン存在下におけるELISA法によるTSHの検出結果を図6に示す。図6には、各測定系においてD-ビオチン濃度が0 ng/mLの検体を測定したときのシグナル測定値を100%としたときの、各検体のシグナル測定値の百分率を示す。検体中にD-ビオチンが存在する場合、D-ビオチン/L-ストレプトアビジンの測定系ではD-ビオチンの添加濃度に依存してシグナルが減少した。一方、L-ビオチン/D-ストレプトアビジンの測定系ではD-ビオチン添加による影響がほとんど見られなかった。

D-ストレプトアビジン/L-ビオチンの測定系は、実質的に検体に存在する内在性のD-ビオチンの影響を受けなかった。

[0128] 4. 実施例4：測定系の定量性の確認

4-1. 方法

(1) 1.5 mLのtubeに検体としてHISC L (商標) TSH calibrator C0~C5 (シスメックス製) を0 μ IU/mL、2 μ IU/mL、10 μ IU/mL、50 μ IU/mL、120 μ IU/mLまたは200 μ IU/mLになるよう添加した。その後、HISC L (商標) TSH calibrator C0~C5 (シスメックス製) を添加したHISC L (商標) TSH R1試薬 (シスメックス製) を400 μ L添加し、37℃、600 rpmの条件で30分反応させた。

[0129] (2) 実施例3と同様に作成したブロッキング後のD-ストレプトアビジン

固定化プレートについて、H I S C L（商標） wash solution（シスメックス製）で3回洗浄し、各wellに1.5mL tubeで反応済みの溶液を60 μ Lずつ添加した。37℃、600rpmの条件で20分反応させた。上記で作製したレービオチン標識TSH抗体を添加し、37℃、600rpmの条件で30分反応させた。

[0130] (3) 反応後はプレートをH I S C L（商標） wash solution（シスメックス製）で5回洗浄し、H I S C L（商標） R4試薬（シスメックス製）を50 μ Lずつ添加し、続けてH I S C L（商標） R5試薬（シスメックス製）を100 μ Lずつ添加し、37℃、600rpmの条件下で30分反応させた。反応後はマイクロプレートリーダー（Infinite 200 PRO）にて発光検出を行った。

[0131] 4-2. 結果

実施例4で測定した結果を表1および図7に示す。図7は、TSH濃度0～120 μ IU/mLのカウント値を示すグラフである。図7に示される通り、レービオチン/D-ストレプトアビジンの系は $R^2=0.998$ と良好な相関性を示した。TSHの参考基準範囲が0.34～4.22 μ IU/mLであることから、測定範囲において良好な直線性を有する系であることがわかった。

[0132] [表1]

TSH濃度 (μ IU/mL)	キャリブプレート	カウント値
0	C0	1,010
2	C1	17,272
10	C2	80,448
50	C3	442,005
120	C4	967,485
200	C5	1,264,387

[0133] また、TSH濃度50 μ IU/mL試料を5つ用意し、それぞれについてTSH濃度の測定を行った。その結果を表2に示す。変動係数が約5%であった。本実施例の測定系は、再現性の観点でも問題ないことが分かった。

[0134]

[表2]

	カウント値
平均	409652.4
標準偏差	20773.11
変動係数	5.07

[0135] 5. 実施例5：構造維持に関わるアミノ酸残基のLーアミノ酸残基置換

5-1. 方法

配列番号1に示すDーストレプトアビジンのアミノ酸配列のうち、一部のアミノ酸残基をL体に変更することによる立体構造への影響を検討した。検討の際には、Discovery Studio（ダッソー社製）によるインシリコ解析を行った。

[0136] まず天然型コアストレプトアビジン四量体の結晶構造（PDB ID：3RY2）をプロテインデータバンク（PDB）より取得し、四量体から一つの単量体構造を抽出した。抽出した構造を元にDiscovery Studio上において全アミノ酸残基をDーアミノ酸残基に変換することで、Dーストレプトアビジンの単量体構造を構築した。その後、Dーストレプトアビジン単量体構造を構成するアミノ酸残基の溶媒接触度を確認した。Dーストレプトアビジンのコア配列のアミノ酸残基のうち、グリシン以外のアミノ酸残基であって、溶媒接触度25%以下のアミノ酸残基を特定した。その結果、該アミノ酸残基は溶媒接触度が低い順に、配列番号1の21、29、77、104、130、54、56、39、43、27、75、31、92、90、128、102、33、79、71、73、106、23、60、96、81、122、28、86、88、50、45、108、38、110、132および42番目の計36個のアミノ酸残基であった。これらのアミノ酸残基は、Dーストレプトアビジンの単量体内部にある構造維持に特に関わっていると考えられる。上記のアミノ酸残基のうちの1つをLーアミノ酸残基に置換した場合、置換したアミノ酸残基と、置換したアミノ酸残基のN側に隣接するアミノ酸残基と、C側に隣接するアミノ酸残基と、に関して、Clean Geometry機能を利用して化合物の構造最適化を行った。そ

の後、D-ストレプトアビジンの内部における原子間の衝突の有無を立体構造から確認した。

[0137] 5-2. 結果

実施例5の結果、36個のアミノ酸残基のいずれのアミノ酸残基についても、D-アミノ酸残基からL-アミノ酸残基に置換した際に生じる原子間の衝突が、Clean Geometry機能を利用して構造最適化を行うことで解消した。その1例として、21番目のアミノ酸残基であるD-トリプトファン残基をL-トリプトファン残基に置換したときに生じる原子の衝突が解消される様子を図8A~Cに示す。21番目のD-トリプトファン残基をL体に置換する前の構造を図8Aで示す。21番目のD-トリプトファン残基をL-トリプトファン残基に置換した際に、D-ストレプトアビジン内で原子間の衝突が生じる様子を図8Bに示す（楕円で強調した円柱が原子間の衝突を表す）。Clean Geometry機能を利用して構造最適化を行うことで、D-ストレプトアビジン内の原子間の衝突が解消される様子を図8Cに示す。

[0138] インシリコ解析において、構造維持に関わるアミノ酸残基のいずれのアミノ酸残基についても、D-アミノ酸残基からL-アミノ酸残基に置換した際に生じる原子間の衝突が解消されることがわかった。インビトロの状態においても、構造維持に関わるアミノ酸残基の一部をL-アミノ酸残基に置換した際に、D-ストレプトアビジン内の原子が移動して原子間の衝突が解消した構造が存在すると考えられる。

したがって、単量体の構造維持に関わるアミノ酸残基の一部がL-アミノ酸残基に変わったとしても、ビオチンに結合可能な構造が維持されと考えられる。

[0139] 6. 実施例6：Dアミノ酸からなるタモギタケ（*Pleurotus cornucopiae*）由来アビジン様タンパク質の合成

Dアミノ酸からなるタモギタケ（*Pleurotus cornucopiae*）由来アビジン様タンパク質（以下、D-タマビジン（商標）2）を

合成した。配列番号4の2番目～141番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドを、5つのペプチドセグメントに分け、それぞれをペプチド自動合成機（Prelude、Protein Technologies, Inc.）により合成した。当該5つのセグメントは、配列番号4の2～23番目の配列を含むセグメント1、24～49番目の配列を含むセグメント2、50～76番目の配列を含むセグメント3、77～105番目の配列を含むセグメント4、および106～141番目の配列を含むセグメント5であった。次に、セグメント1と2を化学ライゲーションにより連結してセグメント1-2を調製し、セグメント3と4を化学ライゲーションにより連結してセグメント3-4を調製し、セグメント3-4にセグメント5を化学ライゲーションにより連結してセグメント3-4-5を調製し、セグメント1-2とセグメント3-4-5とを化学ライゲーションにより連結することにより、配列番号4の2番目～141番目のアミノ酸配列を有するD-タマビジン（商標）2を生成した。

（4量体の調製）

[0140] D-タマビジン（商標）2を変性バッファー（80mM Tris-HCl、6M グアニジン-HCl、1mM DTT、pH8.0）に20mg/mLとなるよう溶解し、85℃で45分間加熱した。加熱した溶液に対してバッファー（80mM Tris-HCl、1mM DTT、pH8.0）を5倍量添加し、室温30分静置した。次にその溶液をバッファー（80mM Tris-HCl、1mM DTT、pH8.0）で50倍希釈した後、4℃ O/N静置した。その後、溶液をアミコンウルトラ-4（30k）（メルクミリポア社）で濃縮を行った後、D-タマビジン（商標）2タンパク質溶液として回収した。

[0141] 7. 実施例7：SPR解析によるD-タマビジン（商標）2のビオチン結合性評価

7-1. 方法

（1）ビオチン標識アルブミンの調製

50 mg/mLのウシ血清アルブミン/0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.5) 2.8 mLに10 mg/mLのD-ビオチン-AC5-OSu (同仁化学社製)を含むN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (16.3 μ L)を加え、攪拌後、35℃、1時間静置した。その後、0.1 Mのリン酸バッファ (pH 7.5)で平衡化したPD-10 (Cytiva製、17085101)により脱塩を実施し、D-ビオチン標識アルブミンを回収した。HABA法によるアルブミン1分子あたりのD-ビオチン標識数は0.4であった。

同様にL-ビオチン-AC5-OSu [前記実施例3に記載の (L-ビオチンのアミド化)を参照]を用いてL-ビオチン標識アルブミンを調製した。

[0142] (2) センサーチップへの固定

Biacore T200システムのCM5センサーチップ (Cytiva製)のフローセル1および3に対して、ウシ血清アルブミンをアミンカップリングキット (Cytiva社)によるアミンカップリング法によりターゲットレベル400 RUで固定化した。さらにフローセル2、4に対して同様にアミンカップリング法によって、それぞれL-ビオチン標識アルブミン、D-ビオチン標識アルブミンをターゲットレベル400 RUで固定化した。いずれのフローセルも1 M エタノールアミン溶液、pH 8.5 (Cytiva製)でブロッキングを実施した。

[0143] (3) ビオチンとの相互作用測定

ランニングバッファとしてHBS-EP+ (Cytiva製)を使用し、調製した D-タマビジン (商標) 2をシングルサイクル法により、100 pMから100 nMの範囲で流速30 μ L/minで各フローセルに流し、Biacore T200 Evaluation Software (Cytiva製)によってD-ビオチンまたはL-ビオチンに対する結合および解離を評価した。

[0144] 7-2. 結果

D-タマビジン (商標) 2と、L-ビオチン標識アルブミンとの分子間相

相互作用のSPRシグナルの変化を図9Aに示す。D-タマビジン（商標）2の添加量に応じて、SPRシグナルの上昇が認められた。

[0145] D-タマビジン（商標）2と、D-ビオチン標識アルブミンとの分子間相互作用のSPRシグナル変化を図9Bに示す。D-タマビジン（商標）2の添加に依存するSPRシグナルの上昇は認められなかった。

これらの結果からD-タマビジン（商標）2はD-ビオチン標識アルブミンとは実質的に結合せず、L-ビオチン標識アルブミンと結合することが示された。

[0146] 8. 実施例8：D-タマビジン（商標）2固定化プレートを用いたELISA法におけるD-ビオチンの測定系に対する影響の評価

8-1. 方法

(1) 1.5 mL tubeに検体としてHISCL（商標）TSH calibrator C3（シスメックス製）200 μ Lおよび、HISCL（商標）TSH R1試薬（シスメックス製）を200 μ L添加し、37℃、600 rpmの条件で30分反応させた。なお、検体についてはD-ビオチン影響度を評価するため、0 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mLまたは100 ng/mLのD-ビオチンを添加してR1試薬と反応させた。

[0147] 96 well ELISAプレート（Thermo Fisher社）にD-タマビジン（商標）2（1 μ g/mL、PBS、50 μ L）を4℃一晩で静置して固相化し、2% BSA/PBSでブロッキングを実施した。

[0148] (2) (1)で作成した、ブロッキング後のD-タマビジン（商標）2固定化プレートについて、HISCL（商標）wash solution（シスメックス製）で3回洗浄し、各wellに1.5 mL tubeで反応済みの溶液を60 μ Lずつ添加した。37℃、600 rpmの条件で20分反応させた。前記実施例3に記載の（ビオチン標識抗体の調製）を参照]で作製したL-ビオチン標識TSH抗体を添加し、37℃、600 rpmの条件で30分反応させた。

[0149] (3) 反応後はプレートをHISC L (商標) wash solution (シスメックス製) で5回洗浄し、HISC L (商標) R4 試薬 (シスメックス製) を50 μ L ずつ添加し、続けてHISC L (商標) R5 試薬 (シスメックス製) を100 μ L ずつ添加し、37℃、600 rpm の条件下で30分反応させた。反応後はマイクロプレートリーダー (Spectra MAX i D3 モレキュラーデバイス社) にて発光検出を行った。

[0150] 8-2. 結果

D-ビオチン存在下におけるELISA法によるTSHの検出結果を図10に示す。図10には、各測定系においてD-ビオチン濃度が0 ng/mL の検体を測定したときのシグナル測定値を100%としたときの、各検体のシグナル測定値の百分率を示す。L-ビオチン/D-タマビジン (商標) 2 の測定系ではD-ビオチン添加による影響がほとんど見られなかった。

[0151] D-タマビジン (商標) 2/L-ビオチンの測定系は、実質的に検体に存在する内在性のD-ビオチンの影響を受けないことが示唆された。

[0152] 9. 実施例9：D-タマビジン (商標) 2 固定化プレートを用いた測定系の定量性確認

9-1. 方法

(1) 1.5 mL のtube に検体としてHISC L (商標) TSH calibrator C0~C5 (シスメックス製) を0 μ IU/mL、2 μ IU/mL、10 μ IU/mL、50 μ IU/mL、120 μ IU/mL または200 μ IU/mL になるよう200 μ L 添加した。その後、HISC L (商標) TSH calibrator C0~C5 (シスメックス製) を添加したHISC L (商標) TSH R1 試薬 (シスメックス製) を200 μ L 添加し、37℃、600 rpm の条件で30分反応させた。

[0153] (2) 実施例8 (1) で作成した、ブロッキング後のD-タマビジン (商標) 2 固定化プレートについて、HISC L (商標) wash solution (シスメックス製) で3回洗浄し、各well に1.5 mL tube で反応済みの溶液を60 μ L ずつ添加した。37℃、600 rpm の条件

で20分反応させた。上記で作製したレービオチン標識TSH抗体を添加し、37℃、600rpmの条件で30分反応させた。

[0154] (3) 反応後はプレートをHISCL (商標) wash solution (シスメックス製) で5回洗浄し、HISCL (商標) R4試薬 (シスメックス製) を50μLずつ添加し、続けてHISCL (商標) R5試薬 (シスメックス製) を100μLずつ添加し、37℃、600rpmの条件下で30分反応させた。反応後はマイクロプレートリーダー (SpectraMAX iD3 モレキュラーデバイス社) にて発光検出を行った。

[0155] 9-2. 結果

測定した結果を表3および図11に示す。濃度依存的なシグナル変化が見られた。

[0156] [表3]

TSH濃度 (μIU/mL)	キャリブレーション	カウント値
0	C0	363
2	C1	35344
10	C2	149809
50	C3	699577
120	C4	1315798
200	C5	1576566

[0157] また、TSH濃度50μIU/mL試料を5つ用意し、それぞれについてTSH濃度の測定を行った。その結果を表4に示す。変動係数が約5%であった。本実施例の測定系は、再現性の観点でも問題ないことが明らかとなった。

[0158] [表4]

	カウント値
平均	667878.6
標準偏差	32615.67
変動係数	4.88

[0159] 10. 実施例10：インシリコ解析

D-ブラダビジン、およびD-アビジンのそれぞれについて、レービオチンまたはD-ビオチンに対する結合性を、インシリコ解析によって検討した

。

10-1. 方法

[0160] 解析に使用したL-ビオチンの構造を図12Aに、D-ビオチンの構造を図12Bに示す。L-ビオチンまたはD-ビオチンの構造の準備、および計算にはDiscovery Studio 2018を使用した。解析においては、天然体ストレプトアビジン-D-ビオチン複合体結晶構造データ (PDB ID: 3RY2 Biological Assembly 1)、天然体ブラダビジン-D-ビオチン複合体結晶構造データ (PDB ID: 4BBO Biological Assembly 1)、または天然体アビジン-D-ビオチン複合体結晶構造データ (PDB ID: 2AVI Biological Assembly 1) に対して、4量体の状態で、D-ビオチン以外のリガンドを除去した。その後、Prepare protein コマンドを使用して水素原子を付与し、D-ビオチンを構造より除いた。それぞれの構造について、L/D Conversion コマンドによって、D-アミノ酸によって構成された光学異性体タンパク質の構造をそれぞれ生成し、天然体におけるビオチン結合サイトに相当とする座標に半径12 Åの結合サイトを設定して、D-ビオチン、L-ビオチンのリガンドドッキング予測に用いた。

[0161] Discovery Studio 上でCDOCKER機能によってリガンドドッキング構造の予測を行うとともに、相互作用スコア (CDOCKER ENERGY) の数値を得た。天然体ストレプトアビジンと各ビオチンの光学異性体との間の相互作用スコアは、結合性の基準となる。

[0162] 10-2. 結果

結果は下記の通りであった。いずれも単位はkcal/molである。

a. D-ストレプトアビジン

L-ビオチン -33.5867

D-ビオチン -29.2717

b. D-ブラダビジン

L-ビオチン −30.6423

D-ビオチン −25.9508

c. D-アビジン

L-ビオチン −31.5848

D-ビオチン −27.6185

[0163] いずれの光学異性体も、D-ビオチンとの結合性を示すスコアと比較してL-ビオチンとの結合性を示すスコアが3.9~4.7 kcal/mol程度低かった。この結果から、D-ブラダビジンおよびD-アビジンは、D-ストレプトアビジンと同様に、D-ビオチンには実質的に結合せず、L-ビオチンに対して強力に結合することが示唆された。

請求の範囲

- [請求項1] アビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドであって、前記ポリペプチドのグリシン以外のアミノ酸残基のうち90%以上のアミノ酸残基にD-アミノ酸残基を含み、
L-ビオチンに対する結合能を有し、
D-ビオチンに対する結合能を実質的に有さない
ポリペプチド。
- [請求項2] 配列番号1に示されたアミノ酸配列の19番目から133番目の配列、
、
配列番号2に示されたアミノ酸配列の2番目から128番目の配列、
配列番号3に示されたアミノ酸配列の4番目から129番目の配列および
配列番号4に示されたアミノ酸配列の4番目から127番目の配列
のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含む、
請求項1に記載のポリペプチド。
- [請求項3] アビジンーストレプトアビジンファミリーに属するポリペプチドであって、前記ポリペプチドのグリシン以外のアミノ酸残基がD-アミノ酸残基のみで構成されるポリペプチド。
- [請求項4] 配列番号1に示されたアミノ酸配列の19番目から133番目の配列、
、
配列番号2に示されたアミノ酸配列の2番目から128番目の配列、
配列番号3に示されたアミノ酸配列の4番目から129番目の配列および
配列番号4に示されたアミノ酸配列の4番目から127番目の配列
のいずれかのアミノ酸配列を含む、
請求項3に記載のポリペプチド。
- [請求項5] 配列番号1に示されたアミノ酸配列の19番目から133番目のアミ

- ノ酸残基を含む、
請求項 1 ～ 4 いずれかに記載のポリペプチド。
- [請求項6] 配列番号 1 に示されたアミノ酸配列の 13 番目から 139 番目のアミノ酸残基を含む、
請求項 1 ～ 5 いずれかに記載のポリペプチド。
- [請求項7] 請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のポリペプチドをモノマー単位とする多量体。
- [請求項8] 前記多量体が四量体である請求項 7 に記載の多量体。
- [請求項9] 請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のポリペプチドおよび／または請求項 7 または 8 に記載の多量体が固定された固相。
- [請求項10] ポリペプチドおよび／または多量体が固定された固相と、検体中の被検物質と結合する捕捉体とを用いて被検物質を測定する方法であって、
前記ポリペプチドは、
アビジンーストレプトアビジンファミリーに属し、
グリシン以外のアミノ酸残基のうち 90% 以上のアミノ酸残基に D-アミノ酸残基を含み、
L-ビオチンに対する結合能を有し、
D-ビオチンに対する結合能を実質的に有さないポリペプチドであり、
前記多量体は前記ポリペプチドをモノマー単位とする多量体であり、
前記捕捉体は、L-ビオチンが付加されており、
前記 L-ビオチンと前記固相上の前記ポリペプチドまたは前記多量体が結合することにより、前記被検物質の検出時において、前記捕捉体が前記固相に固定されている、被検物質の測定方法。
- [請求項11] 前記捕捉体が、抗体、抗原、レクチン、核酸、酵素、または基質を含む、請求項 10 に記載の測定方法。
- [請求項12] 前記固相と、前記捕捉体と、前記被検物質に結合する検出体と、前記

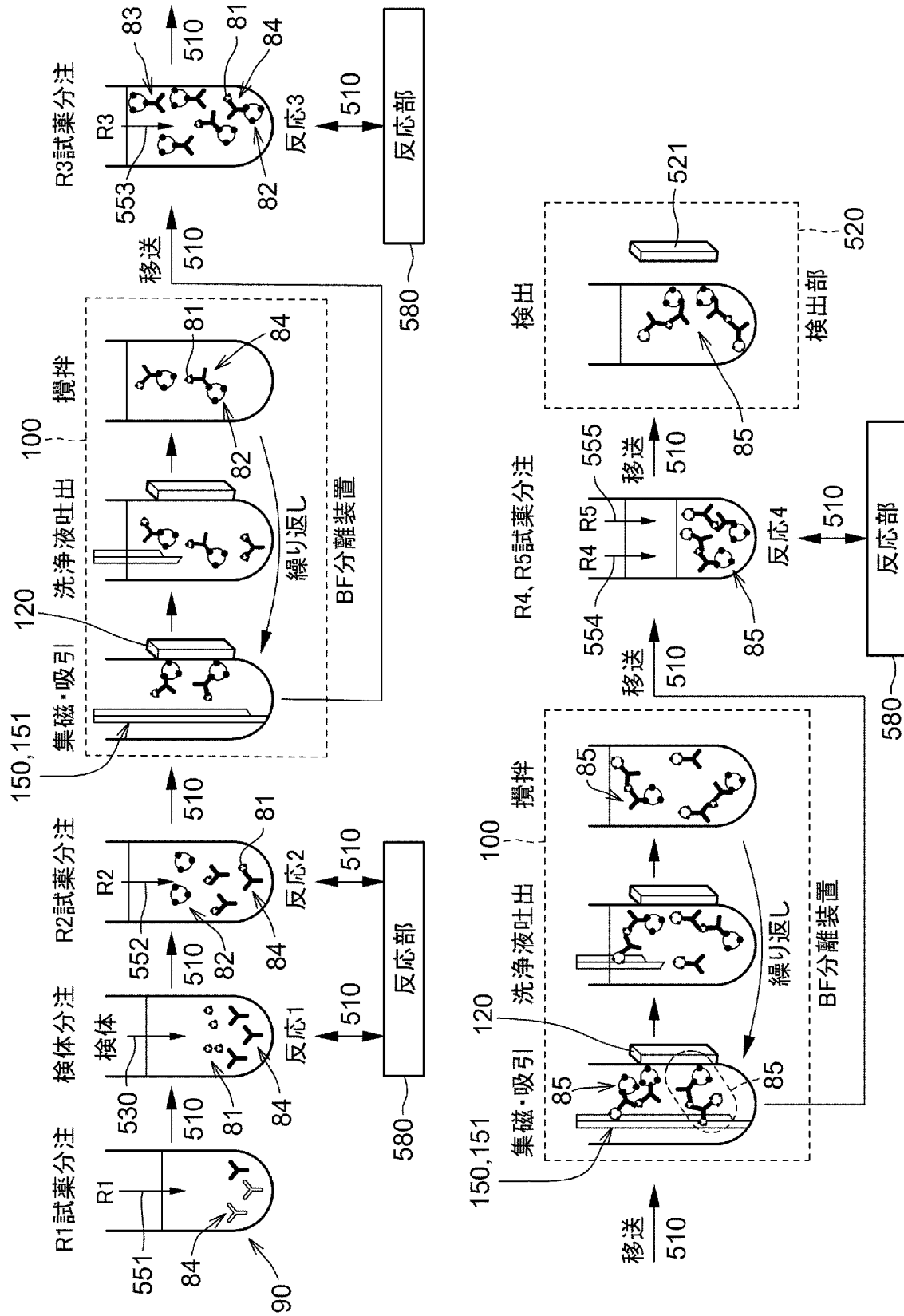
被検物質と、を接触させ、前記固相と前記捕捉体と前記検出体と前記被検物質とを含む複合体を形成する工程、および
前記複合体に含まれる前記検出体に基づき、前記被検物質を測定する工程を含む、
請求項 10 または 11 に記載の測定方法。

[請求項13] 前記検出体が、蛍光物質または酵素を含む、請求項 12 に記載の測定方法。

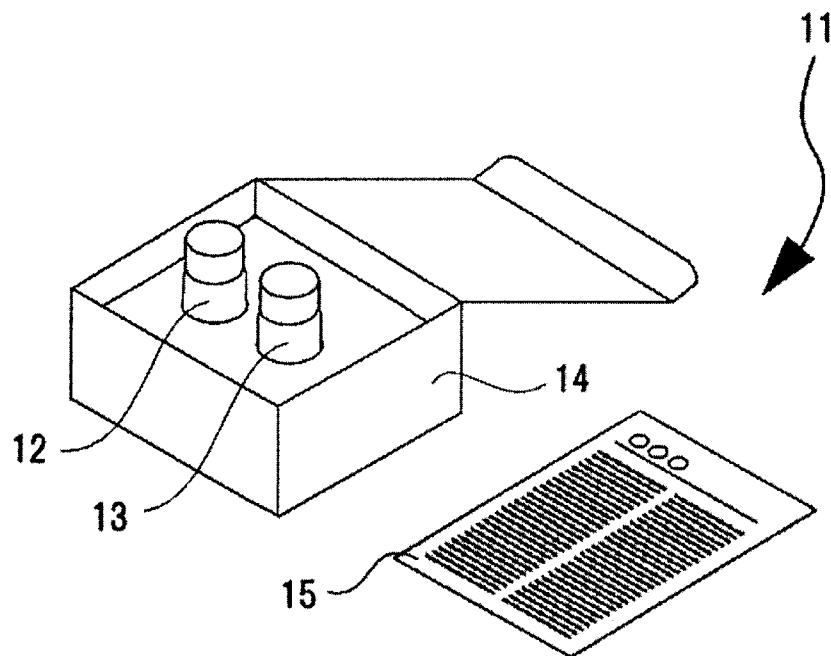
[請求項14] ポリペプチドおよび/または多量体が固定された固相、およびレービオチンが付加された捕捉体を含む、被検物質測定用の試薬キットであって、
前記ポリペプチドは、
アビジンーストレプトアビジンファミリーに属し、
グリシン以外のアミノ酸残基のうち90%以上のアミノ酸残基にD-アミノ酸残基を含み、
レービオチンに対する結合能を有し、
D-ビオチンに対する結合能を実質的に有さない、
ポリペプチドであり、
前記多量体は前記ポリペプチドをモノマー単位とする多量体である、
被検物質測定用の試薬キット。

[請求項15] 請求項 10～13 のいずれかに記載の測定方法に用いられる、請求項 14 に記載の試薬キット。

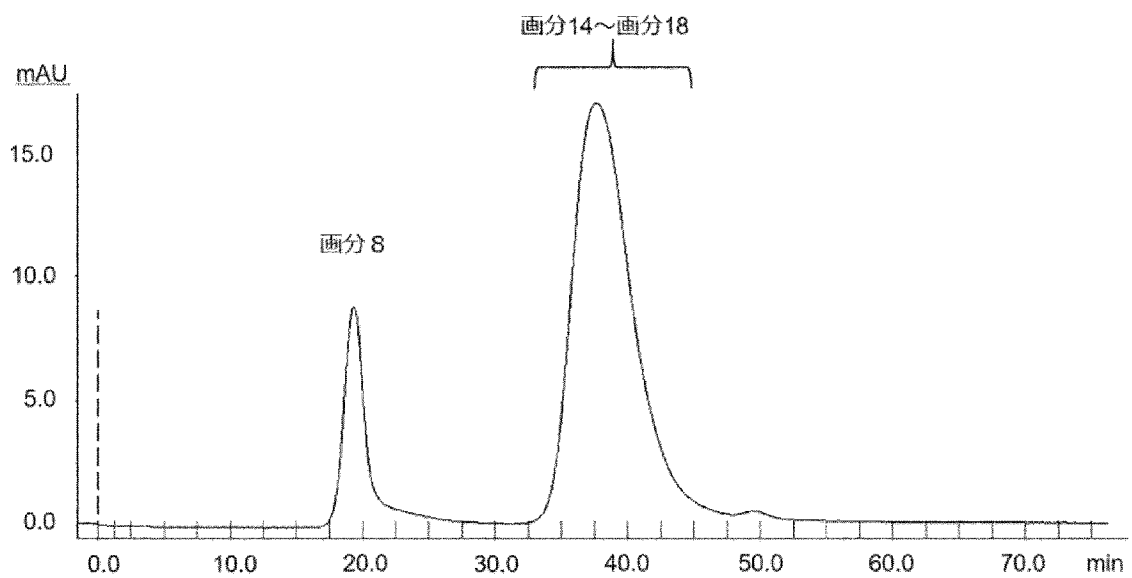
[図1]



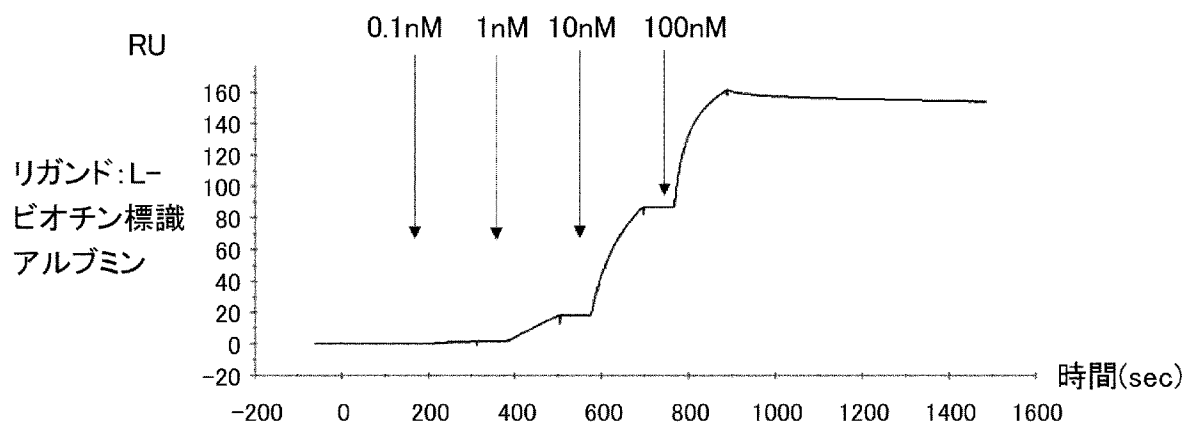
[図2]



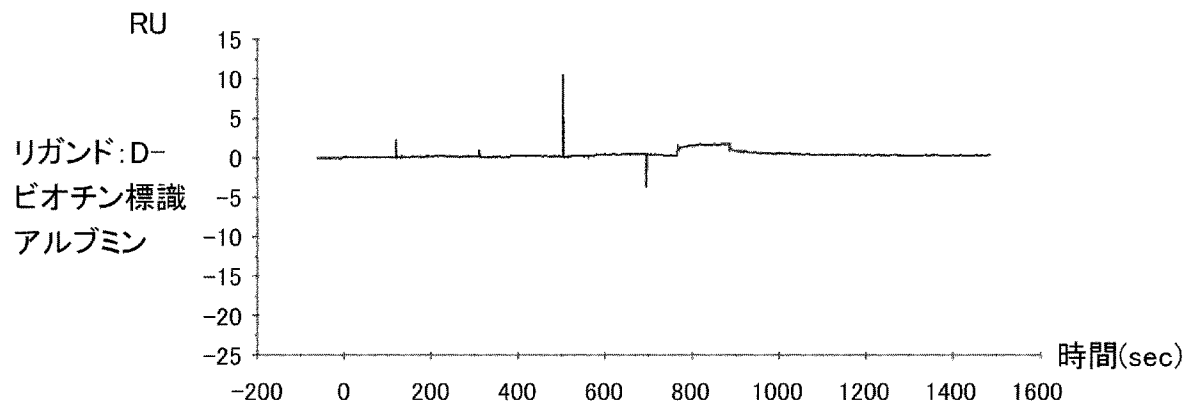
[図3]



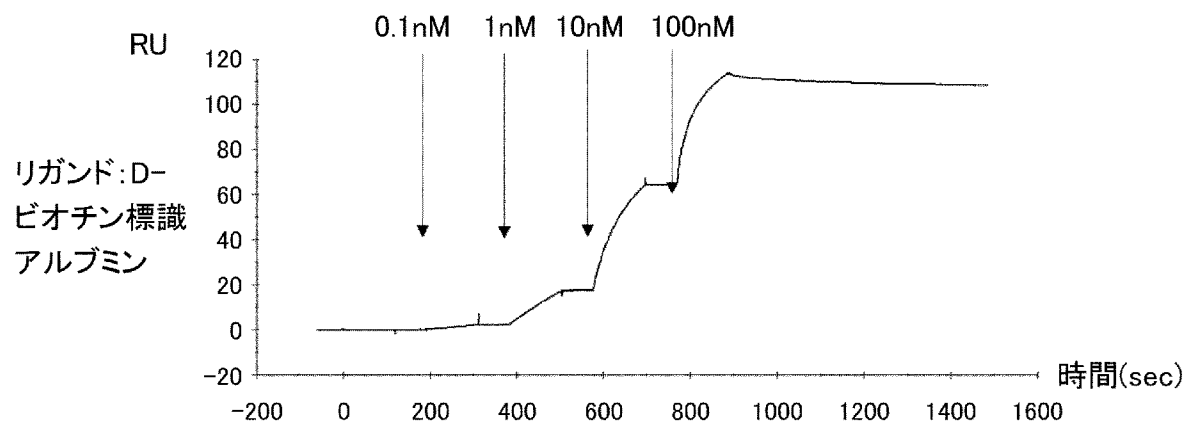
[図4A]



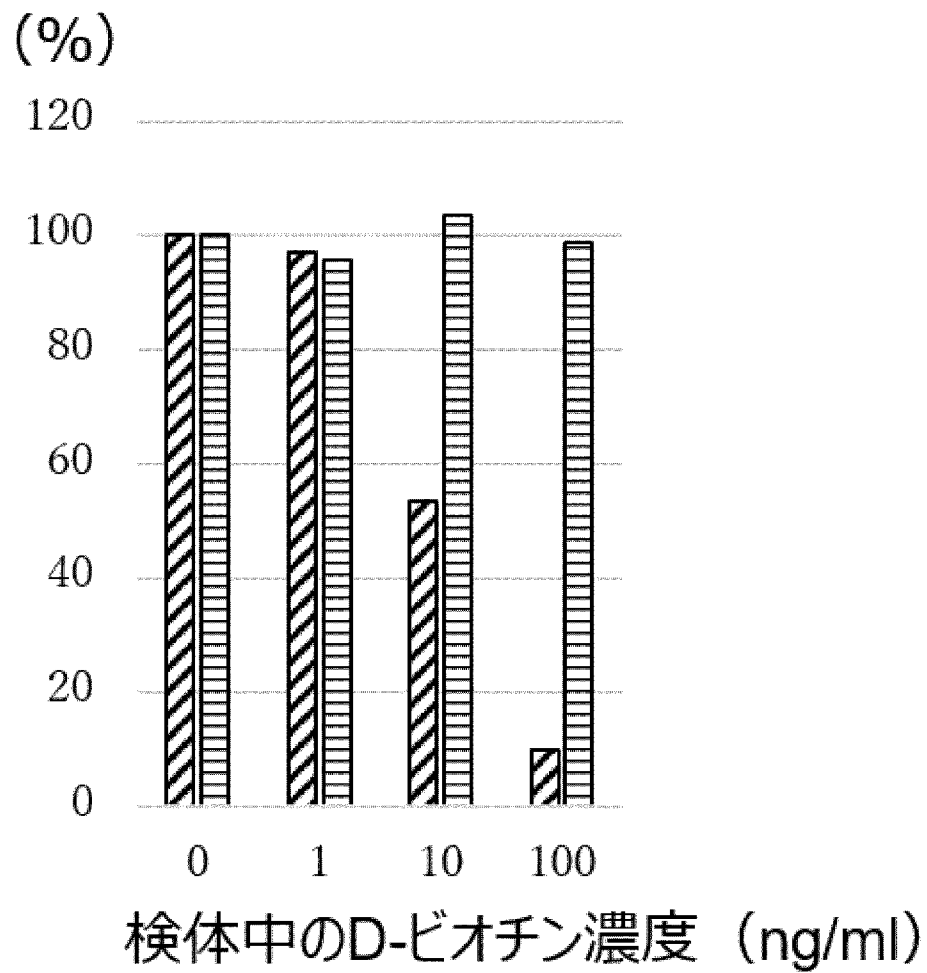
[図4B]



[図5]

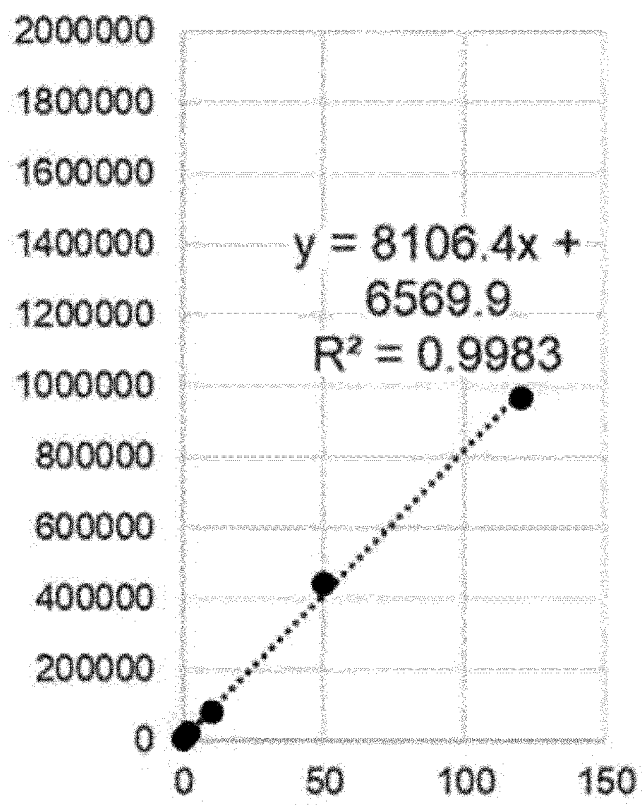


[図6]

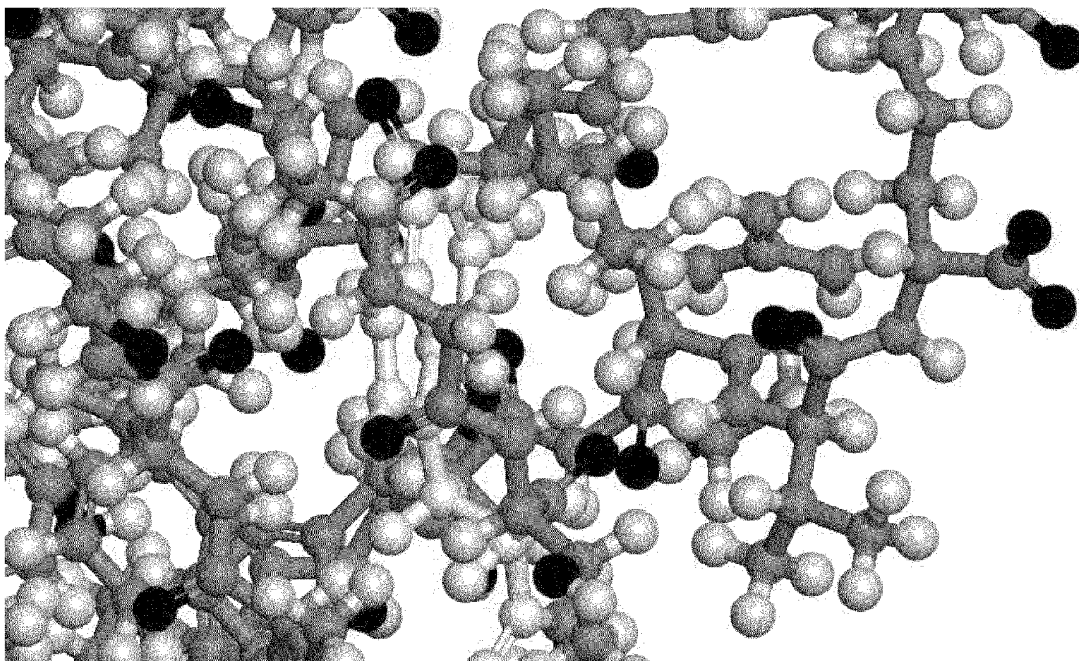


- ▨ D-ビオチン/L-ストレプトアビジン測定系
- ▤ L-ビオチン/D-ストレプトアビジン測定系

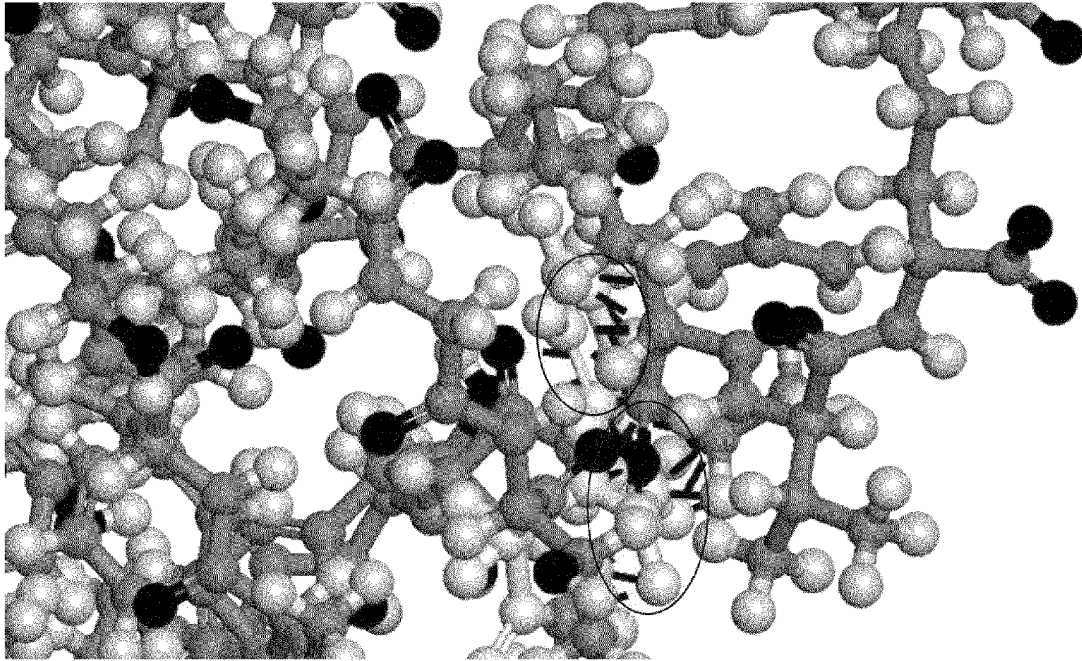
[図7]



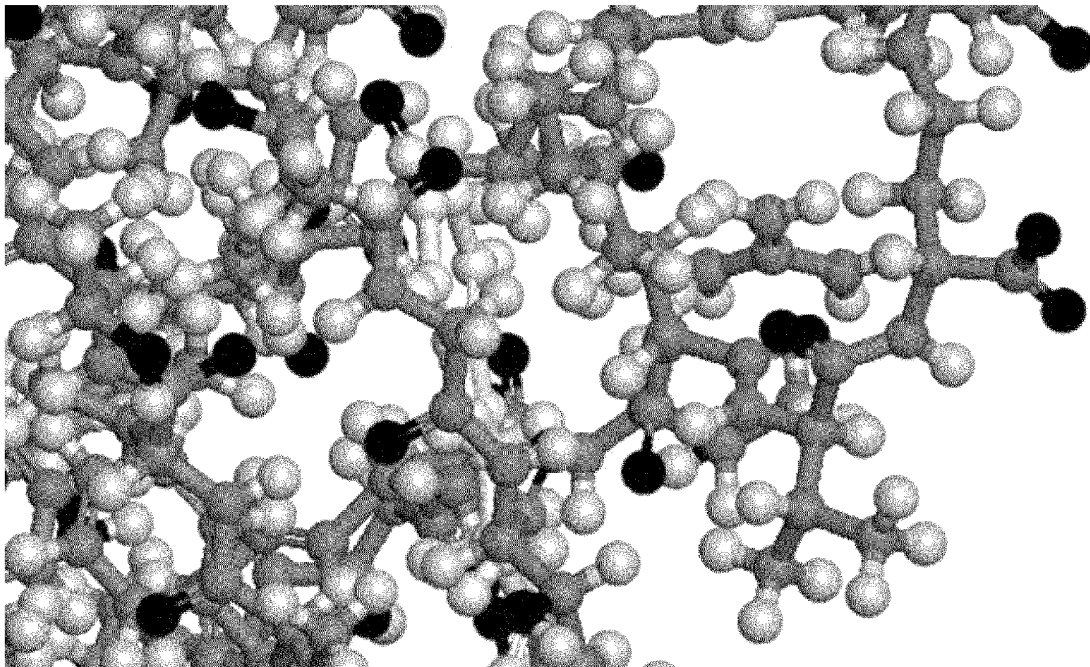
[図8A]



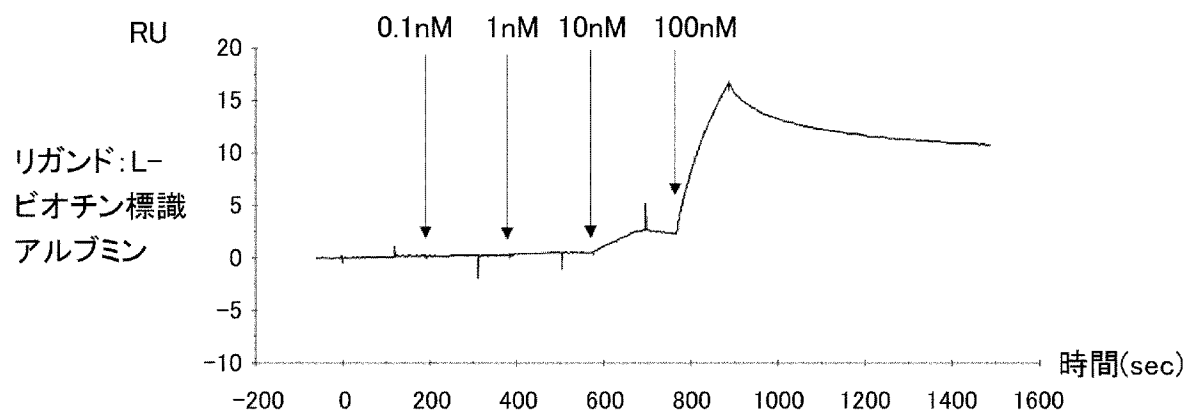
[図8B]



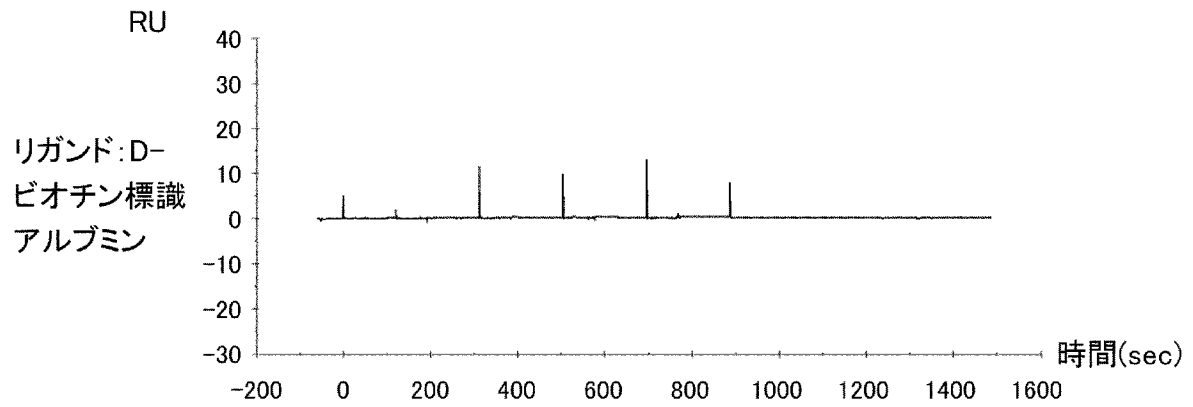
[図8C]



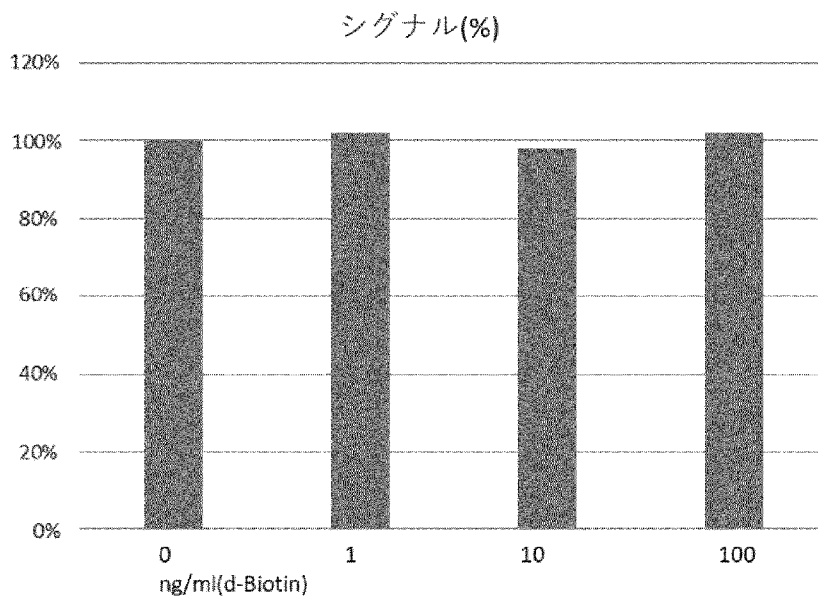
[図9A]



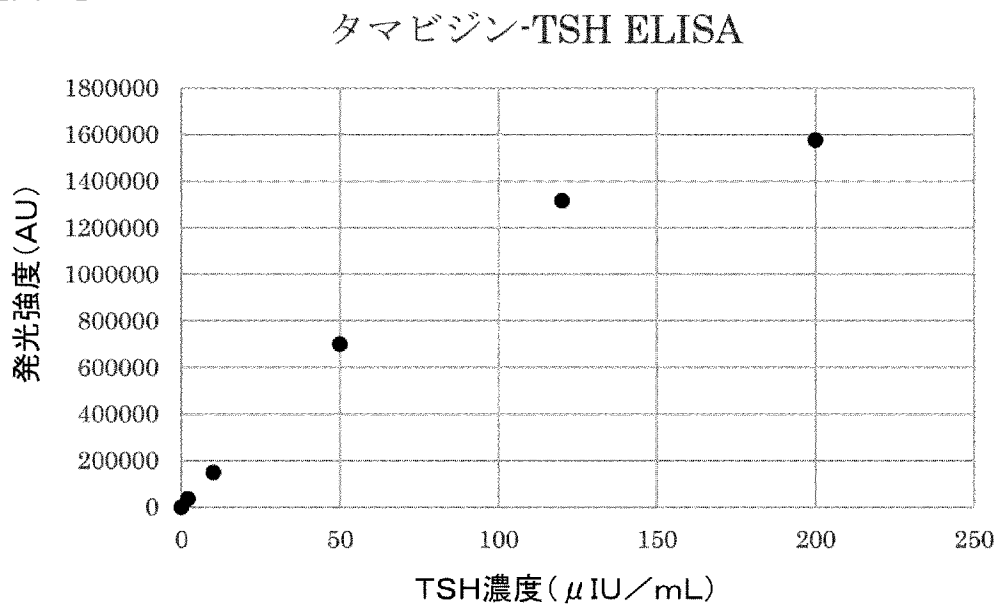
[図9B]



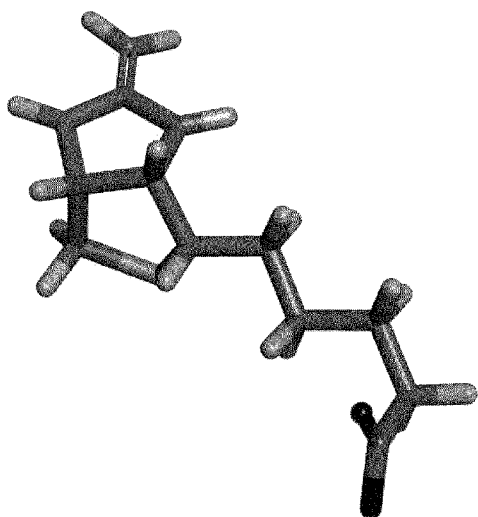
[図10]



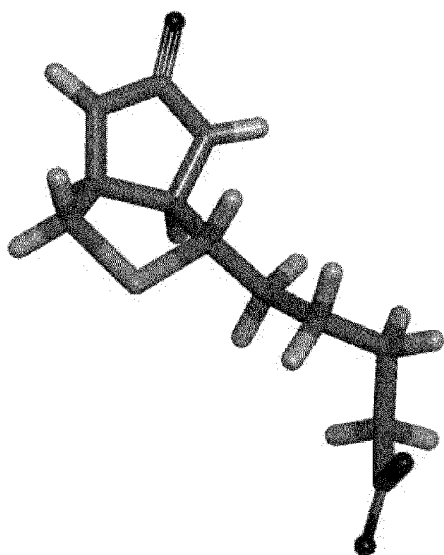
[図11]



[図12A]



[図12B]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/038254

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/36(2006.01)i; **C07K 17/00**(2006.01)i; **C12N 15/31**(2006.01)i; **C12Q 1/00**(2006.01)i; **C12Q 1/68**(2018.01)i;
G01N 33/53(2006.01)i

FI: C07K14/36; C07K17/00; C12Q1/00 C; C12Q1/68; G01N33/53 U; C12N15/31 ZNA

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)

C07K14/36; C07K17/00; C12N15/31; C12Q1/00; C12Q1/68; G01N33/53

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq;
 UniProt/GeneSeq; SwissProt/GeneSeq; PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHAO, Le et al. Mirror image proteins. Current Opinion in Chemical Biology. 2014, vol. 22, pp. 56-61	1-5, 7-15
A	abstract, page 56, right column, paragraph [0002], conclusion	6
Y	JP 7-289264 A (KIKKOMAN CORP) 07 November 1995 (1995-11-07)	1-5, 7-15
A	paragraphs [0002], [0031], examples	6
Y	JP 2004-357568 A (NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE) 24 December 2004 (2004-12-24)	1-5, 7-15
A	claim 1, paragraph [0004], sequence tables	6
Y	US 2014/0242620 A1 (JAPAN TOBACCO INC.) 28 August 2014 (2014-08-28)	1-5, 7-15
A	claim 7, paragraph [0006], sequence tables	6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November 2021

Date of mailing of the international search report

14 December 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/038254

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/038254

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	7-289264	A	07 November 1995	(Family: none)	
JP	2004-357568	A	24 December 2004	(Family: none)	
US	2014/0242620	A1	28 August 2014	WO 2013/018836 A1	
				claim 7, paragraph [0005], sequence tables	
				EP 2755029 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 14/36(2006.01)i; C07K 17/00(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12Q 1/00(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; G01N 33/53(2006.01)i FI: C07K14/36; C07K17/00; C12Q1/00 C; C12Q1/68; G01N33/53 U; C12N15/31 ZNA		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K14/36; C07K17/00; C12N15/31; C12Q1/00; C12Q1/68; G01N33/53		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq; SwissProt/GeneSeq; PubMed		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ZHAO, Le et al., "Mirror image proteins", Current Opinion in Chemical Biology, 2014, Vol.22, pp.56-61 要約, p.56 右列第2段落、結論	1-5, 7-15
A	要約, p.56 右列第2段落、結論	6
Y	JP 7-289264 A (キッコーマン株式会社) 07.11.1995 (1995-11-07) [0002]、[0031]、実施例	1-5, 7-15
A	[0002]、[0031]、実施例	6
Y	JP 2004-357568 A (独立行政法人食品総合研究所) 24.12.2004 (2004-12-24) 請求項1、[0004]、配列表	1-5, 7-15
A	請求項1、[0004]、配列表	6
Y	US 2014/0242620 A1 (JAPAN TOBACCO INC.) 28.08.2014 (2014-08-28) 請求項7、[0006]、配列表	1-5, 7-15
A	請求項7、[0006]、配列表	6
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー "A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの "E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの "L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） "O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 "P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 "T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの "X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの "Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの "&" 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 30.11.2021		国際調査報告の発送日 14.12.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 玉井 真人 4B 1585 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- ☐ 紙形式又はイメージファイル形式 (PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/038254

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	7-289264	A	07.11.1995	(ファミリーなし)	
JP	2004-357568	A	24.12.2004	(ファミリーなし)	
US	2014/0242620	A1	28.08.2014	W0 2013/018836 A1	
				請求項7、[0005]、配	
				列表	
				EP 2755029 A1	