

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-1987

(P2017-1987A)

(43) 公開日 平成29年1月5日(2017.1.5)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
C O 7 K 14/245 (2006.01)		C O 7 K	14/245	Z N A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N	33/53	N	4 H O 4 5
C O 7 K 16/12 (2006.01)		C O 7 K	16/12		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00	A	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)		C 1 2 N	15/00	B	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2015-117946 (P2015-117946)	(71) 出願人	503303466
(22) 出願日	平成27年6月11日 (2015.6.11)		学校法人関西文理総合学園
			滋賀県長浜市田村町1266番地
		(74) 代理人	110000796
			特許業務法人三枝国際特許事務所
		(72) 発明者	新藏 礼子
			滋賀県長浜市田村町1266番地 学校法人関西文理総合学園 長浜バイオ大学内
		(72) 発明者	岡井 晋作
			滋賀県長浜市田村町1266番地 学校法人関西文理総合学園 長浜バイオ大学内
		(72) 発明者	臼井 文人
			滋賀県長浜市田村町1266番地 学校法人関西文理総合学園 長浜バイオ大学内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 医薬組成物、特に腸内疾患の治療または予防剤の有効成分とできる抗体をスクリーニングまたは精製するために有用なポリペプチドの提供。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び、該ポリペプチドのN末端またはC末端に、アミノ酸残基またはペプチド残基を介して、B S A、K L H、O V A、M A P、H S A、およびT Gからなる群より選択されるポリペプチドが結合してなる、ポリペプチド。該ペプチドを用いた抗体のスクリーニング方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 169～180 のいずれかに示すアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 169～180 のいずれかに示すアミノ酸配列からなるペプチドを表面に露呈した状態で有することを特徴とする、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 1～168 および配列番号 181～192 からなる群より選択されるいずれかのアミノ酸配列からなる、ポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号 169～180 のいずれかに示すアミノ酸配列からなるペプチドを表面に露呈した状態で有することを特徴とする、請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの N 末端または C 末端に、アミノ酸残基またはペプチド残基を介して、BSA、KLH、OVA、MAP、HSA、および TG からなる群より選択されるポリペプチドが結合してなる、ポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号 195 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 7】

抗体のスクリーニングまたは精製のために用いられる、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 9】

抗体をスクリーニングする方法であって、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドに結合し、かつ配列番号 193 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドに結合しないことを基準に選択することを特徴とするスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はポリペプチドに関する。さらに斯かるポリペプチドの用途に関する。

【背景技術】

【0002】

特許文献 1 には、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの 11～333 番目のアミノ酸配列をエピトープとするモノクローナル IgA 抗体が開示されている。特許文献 1 には、このようなモノクローナル IgA 抗体が 2 種以上の腸内細菌に特異的に結合し、それらの増殖阻害活性を有することが開示され、医薬組成物、特に腸内疾患の治療または予防剤の有効成分とできることが開示されている。

【0003】

特許文献 1 には、このような特定のモノクローナル IgA 抗体が開示されているものの、この抗体を高度に精製することの重要性どころかその具体的な方法については何ら記載されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】 WO 2014 / 142084

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明者らは IgA の精製度が低い場合、IgA が有する機能が大きく減衰することを

10

20

30

40

50

確認している。例えば、I g G抗体をアフィニティー精製する際に用いられるプロテイン A、プロテイン G、プロテイン Lなどの抗体結合タンパク質に対する I g Aへの親和性は、I g Gほど高くないので、これらの抗体結合タンパク質を用いて I g Aを精製することは非常に困難である。

【0006】

本発明の課題は、医薬組成物、特に腸内疾患の治療または予防剤の有効成分とできる抗体をスクリーニングまたは精製するために有用なポリペプチドを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上述の課題を解決すべく、鋭意検討したところ、特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドが、上記課題を解決できることを見出した。

【0008】

本発明は、この様な知見に基づいて完成したものであり、以下に示す態様の発明を包含するものである。

【0009】

(I) ポリペプチド

本発明のポリペプチド(I)は、以下の態様を含む。

(I-1) 配列番号169～180のいずれかに示すアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(I-2) 配列番号169～180に示すアミノ酸配列からなるペプチドを表面に露呈した状態で有することを特徴とする、(I-1)に記載のポリペプチド。

(I-3) 配列番号1～168および配列番号181～192からなる群より選択されるいずれかのアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(I-4) 配列番号169～180に示すアミノ酸配列からなるペプチドを表面に露呈した状態で有することを特徴とする、(I-3)に記載のポリペプチド。

(I-5) (I-1)～(I-4)のいずれか1項に記載のポリペプチドのN末端またはC末端に、アミノ酸残基またはペプチド残基を介して、BSA、KLH、OVA、MAP、HSA、およびTGからなる群より選択されるポリペプチドが結合してなる、ポリペプチド。

(I-6) 配列番号195に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【0010】

(II) ポリペプチドの用途

本発明のポリペプチド(I)の用途は、以下に示す態様を含む。

(II-1) 抗体のスクリーニングまたは精製のために用いられる、ポリペプチド(I)。

(II-2) 前記抗体が異なる2種類以上の腸内細菌に特異的に結合する、(II-1)に記載のポリペプチド(I)。

(II-3) 前記抗体が異なる2種類以上の腸内細菌の成長を阻害する、(II-1)または(II-2)に記載のポリペプチド(I)。

(II-4) 前記異なる2種類以上の腸内細菌が

*Prevotella*属に属する細菌、

*Bacteroides*属に属する細菌、

*Megamonas*属に属する細菌、

*Bifidobacterium*属に属する細菌、

*Faecalibacterium*属に属する細菌、

*Coproccoccus*属に属する細菌、

*Ruminococcus*属に属する細菌、

*Blautia*属に属する細菌、

*Eubacterium*属に属する細菌、

*Roseburia*属に属する細菌、

*Lactobacillus*属に属する細菌、

*Clostridium*属に属する細菌、

*Escherichia*属に属する細菌、

10

20

30

40

50

Staphylococcus 属に属する細菌、
Enterococcus 属に属する細菌、
Pseudomonas 属に属する細菌、および
Enterorhabdus 属に属する細菌
 からなる群に属する細菌より選択される、(II-2)または(II-3)に記載のポリペプチド(I)
 。

(II-5) 前記異なる2種類以上の腸内細菌が

Prevotella melaninogenica、
Bacteroides vulgatus、
Megamonas funiformis、
Faecalibacterium prausnitzii、
Coprococcus eutactus、
Ruminococcus obeum、
Blautia productus、
Eubacterium rectale、
Roseburia intestinalis、
Clostridium difficile、
Escherichia coli、
Staphylococcus aureus、
Lactobacillus murinus、
Enterococcus faecalis、
Pseudomonas fulva、および
Enterorhabdus mucosicola

からなる群より選択される、(II-3)または(II-4)に記載のポリペプチド(I)。

(II-5) 前記抗体が

配列番号203、213、223、233、または243の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、

配列番号204、214、224、234、または244の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および／または

配列番号205、215、225、235、または245の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；ならびに／あるいは

配列番号208、218、228、238、または248の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、

配列番号209、219、229、239、または249の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、および／または

配列番号210、220、230、240、または250の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3

を含むものである、(II-1)～(II-4)のいずれかに記載のポリペプチド(I)。

(II-6) 前記抗体が

配列番号203に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、

配列番号204に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および

配列番号205に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

配列番号208に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、

配列番号209に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、および

配列番号210に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3

をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；

配列番号213に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、

配列番号214に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および

配列番号215に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは
 配列番号 218 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、
 配列番号 219 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および
 配列番号 220 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3
 をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；

配列番号 223 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、
 配列番号 224 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および
 配列番号 225 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3
 をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは
 配列番号 228 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、
 配列番号 229 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および
 配列番号 230 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3
 をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；

配列番号 233 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、
 配列番号 234 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および
 配列番号 235 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3
 をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは
 配列番号 238 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、
 配列番号 239 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および
 配列番号 240 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3
 をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；または

配列番号 243 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、
 配列番号 244 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および
 配列番号 245 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3
 をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは
 配列番号 248 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、
 配列番号 249 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および
 配列番号 250 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3
 をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域を含むものである、(II-1)～(II-5)のいずれかに
 記載のポリペプチド(I)。

(II-7) 前記抗体が

配列番号 202、212、222、232、または 242 の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および／または
 配列番号 207、217、227、237、または 247 の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、(II-1)～(II-6)のいずれかに記載のポリペプチド(I)。

(II-8) 前記抗体が定常領域を含むものである、(II-1)～(II-7)のいずれかに記載のポリペプチド(I)。

(II-9) 前記抗体がキメラ抗体である、(II-1)～(II-8)のいずれかに記載のポリペプチド(I)。

(II-10) 前記抗体がヒト化抗体である、(II-1)～(II-8)のいずれかに記載のポリペプチド(I)。

(II-11) 前記抗体が配列番号 201、211、221、231、または 241 の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖および／または配列番号 206、216、226、236、または 246 の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖を含むものである、(II-1)～(II-10)のいずれかに記載のポリペプチド(I)。

(II-12) 前記抗体が

配列番号 201 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 206 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；
 配列番号 211 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 216 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；

配列番号 2 2 1 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 2 2 6 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；

配列番号 2 3 1 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 2 3 6 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；または

配列番号 2 4 1 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 2 4 6 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖

を含むものである、(II-1)～(II-11)のいずれかに記載のポリペプチド(I)。

(II-13) 抗体が F v、s c F v、トリアボディー (T r i a b o d y)、テトラボディー (T e t r a b o d y)、免疫グロブリン、F (a b ')₂、F a b、ミニボディー (M i n i b o d y)、s c F v－F c からなる群より選択される構造である、(II-1)～(I 10 I-12)のいずれかに記載のポリペプチド(I)。

(II-14) 抗体が I g A、I g D、I g G、I g M、I g Y、および I g W からなる群より選択される、(II-1)～(II-13)のいずれかに記載のポリペプチド(I)。

(II-15) 抗体が I g A であって、且つ分泌因子を有する、(II-1)～(II-14)のいずれかに記載のポリペプチド(I)。

(II-16) 前記抗体がセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼに対して特異的に結合する抗体である、(II-1)～(II-15)のいずれか 1 項に記載のポリペプチド(I)。

(II-17) 前記抗体がセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの 1 1 番目から 3 3 3 番目のアミノ酸配列を結合エピトープとする、(II-1)～(II-16)のいずれか 1 項に記載のポリペプチド(I)。 20

(II-18) 前記抗体がセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの 2 5 番目から 3 7 番目のアミノ酸配列を結合エピトープとする、(II-1)～(II-17)のいずれか 1 項に記載のポリペプチド(I)。

(II-19) 前記抗体がセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの 2 7 番目から 3 0 番目のアミノ酸配列を結合エピトープとする、(II-1)～(II-18)のいずれか 1 項に記載のポリペプチド(I)。

(II-20) 前記抗体がセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの 2 5 番目～4 5 番目のアミノ酸配列を結合エピトープとする、(II-1)～(II-19)のいずれか 1 項に記載のポリペプチド(I)。

(II-21) 前記抗体が医薬組成物の有効成分である、(II-1)～(II-20)のいずれか 1 項に記載のポリペプチド(I)。 30

(II-22) 前記医薬組成物が腸内疾患の治療または予防用である、上記(II-21)に記載のポリペプチド(I)。

(II-23) 前記腸内疾患が腸内細菌の異常増殖または腸内細菌叢の病的変化により発症する疾患である、(II-22)に記載のポリペプチド(I)。

(II-24) 前記腸内細菌の異常増殖または腸内細菌叢の病的変化により発症する疾患が炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、アレルギー、喘息、肥満、および自己免疫疾患からなる群より選択される、(II-23)に記載のポリペプチド(I)。

(II-25) 前記抗体が経口または経腸組成物の有効成分である、(II-1)～(II-20)のいずれか 1 項に記載のポリペプチド(I)。 40

(II-26) 前記経口または経腸組成物が飲食品組成物または飼料組成物である(II-25)記載のポリペプチド(I)。

(II-27) 前記経口または経腸組成物が腸内環境改善用、腸内環境最適化用、または腸内腐敗防止用である、(II-25)または(II-26)に記載のポリペプチド(I)。

【0 0 1 1】

(III) 抗体

本発明の抗体(III)は、以下の態様を含む。

(III-1) ポリペプチド(I)に特異的に結合する抗体(III)。

(III-2) 異なる 2 種類以上の腸内細菌に特異的に結合する、(III-1)に記載の抗体(III)

。

(III-3) 異なる２種類以上の腸内細菌の成長を阻害する、(III-1)または(III-2)に記載の抗体(III)。

(III-4) 前記異なる２種類以上の腸内細菌が、

*Prevotella*属に属する細菌、

*Bacteroides*属に属する細菌、

*Megamonas*属に属する細菌、

*Bifidobacterium*属に属する細菌、

*Faecalibacterium*属に属する細菌、

*Coprococcus*属に属する細菌、

*Ruminococcus*属に属する細菌、

*Blautia*属に属する細菌、

*Eubacterium*属に属する細菌、

*Roseburia*属に属する細菌、

*Lactobacillus*属に属する細菌、

*Clostridium*属に属する細菌、

*Escherichia*属に属する細菌、

*Staphylococcus*属に属する細菌、

*Enterococcus*属に属する細菌、

*Pseudomonas*属に属する細菌、および

*Enterorhabdus*属に属する細菌

からなる群に属する細菌より選択される、(III-2)または(III-3)に記載の抗体(III)。

(III-5) 前記異なる２種類以上の腸内細菌が、

Prevotella melaninogenica、

Bacteroidetes vulgatus、

Megamonas funiformis、

Faecalibacterium prausnitzii、

Coprococcus eutactus、

Ruminococcus obeum、

Blautia productus、

Eubacterium rectale、

Roseburia intestinalis、

Clostridium difficile、

Escherichia coli、

Staphylococcus aureus、

Lactobacillus murinus、

Enterococcus faecalis、

Pseudomonas fulva、および

Enterorhabdus mucosicola

からなる群より選択される、(III-3)または(III-4)に記載の抗体(III)。

(III-5)

配列番号 203、213、223、233、または243の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、

配列番号 204、214、224、234、または244の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および／または

配列番号 205、215、225、235、または245の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；ならびに／あるいは

配列番号 208、218、228、238、または248の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、

配列番号 209、219、229、239、または249の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、および／または

配列番号 210、220、230、240、または 250 の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

を含む、(III-1)～(III-4)のいずれかに記載の抗体(III)。

(III-6)

配列番号 203 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、

配列番号 204 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および

配列番号 205 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

配列番号 208 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、

配列番号 209 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および

配列番号 210 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；

配列番号 213 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、

配列番号 214 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および

配列番号 215 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

配列番号 218 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、

配列番号 219 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および

配列番号 220 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；

配列番号 223 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、

配列番号 224 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および

配列番号 225 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

配列番号 228 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、

配列番号 229 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および

配列番号 230 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；

配列番号 233 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、

配列番号 234 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および

配列番号 235 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

配列番号 238 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、

配列番号 239 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および

配列番号 240 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；または

配列番号 243 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、

配列番号 244 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および

配列番号 245 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

配列番号 248 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、

配列番号 249 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および

配列番号 250 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域を含む、(III-1)～(III-5)のいずれかに記載の抗体(III)。

(III-7)

配列番号 202、212、222、232、または 242 の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および／または

配列番号 207、217、227、237、または 247 の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、(III-1)～(III-6)のいずれかに記載の抗体(III)。

- (III-8) 定常領域を含む、(III-1)～(III-7)のいずれかに記載の抗体(III)。
 (III-9) キメラ抗体である、(III-1)～(III-8)のいずれかに記載の抗体(III)。
 (III-10) ヒト化抗体である、(III-1)～(III-8)のいずれかに記載の抗体(III)。
 (III-11) 配列番号 201、211、221、231、または 241 の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖および／または配列番号 206、216、226、236、または 246 の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、(III-1)～(III-10)のいずれかに記載の抗体(III)。

(III-12)

配列番号 201 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 206 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；

配列番号 211 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 216 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；

配列番号 221 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 226 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；

配列番号 231 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 236 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；または

配列番号 241 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 246 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖

を含む、(III-1)～(III-11)のいずれかに記載の抗体(III)。

(III-13) Fv、scFv、トリアボディー (Triabody)、テトラボディー (Tetrabody)、免疫グロブリン、F(ab')₂、Fab、ミニボディー (Minibody)、scFv-Fc からなる群より選択される構造である、(III-1)～(III-12)のいずれかに記載の抗体(III)。

(III-14) IgA、IgD、IgG、IgM、IgY、および IgW からなる群より選択される、(III-1)～(III-13)のいずれかに記載の抗体(III)。

(III-15) IgA であって、且つ分泌因子を有する、(II-1)～(II-14)のいずれかに記載の抗体(III)。

(III-16) 医薬組成物の有効成分である、(III-1)～(III-15)のいずれか 1 項に記載の抗体(III)。

(III-17) 前記医薬組成物が、腸内疾患の治療または予防用である、(III-16)に記載の抗体(III)。

(III-18) 前記腸内疾患が、腸内細菌の異常増殖または腸内細菌叢の病的変化により発症する疾患である、(III-17)に記載の抗体(III)。

(III-19) 前記腸内細菌の異常増殖または腸内細菌叢の病的変化により発症する疾患が、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、アレルギー、喘息、肥満、および自己免疫疾患からなる群より選択される、(III-18)に記載の抗体(III)。

(III-20) 経口または経腸組成物の有効成分である、(III-1)～(III-19)のいずれか 1 項に記載の抗体(III)。

(III-21) 前記経口または経腸組成物が、飲食品組成物または飼料組成物である (III-20) 記載の抗体(III)。

(III-22) 前記経口または経腸組成物が、腸内環境改善用、腸内環境最適化用、または腸内腐敗防止用である、(III-20)または(III-21)に記載の抗体(III)。

【0012】

(IV) スクリーニング方法

本発明のスクリーニング方法(IV)は、抗体をスクリーニングする方法であって、以下の態様を含む。

(IV-1) 抗体をスクリーニングする方法であって、ペプチド(I)に結合し、かつ配列番号 193 に示すアミノ酸配列からなるペプチドに結合しないことを基準に選択することの特徴とするスクリーニング方法(IV)。

(IV-2) 前記抗体が異なる 2 種類以上の腸内細菌に特異的に結合する、(IV-1)に記載のス

10

20

30

40

50

クリーニング方法(IV)。

(IV-3) 前記抗体が異なる２種類以上の腸内細菌の成長を阻害する、(IV-1)または(IV-2)に記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-4) 前記異なる２種類以上の腸内細菌が

*Prevotella*属に属する細菌、

*Bacteroides*属に属する細菌、

*Megamonas*属に属する細菌、

*Bifidobacterium*属に属する細菌、

*Faecalibacterium*属に属する細菌、

*Coproccoccus*属に属する細菌、

*Ruminococcus*属に属する細菌、

*Blautia*属に属する細菌、

*Eubacterium*属に属する細菌、

*Roseburia*属に属する細菌、

*Lactobacillus*属に属する細菌、

*Clostridium*属に属する細菌、

*Escherichia*属に属する細菌、

*Staphylococcus*属に属する細菌、

*Enterococcus*属に属する細菌、

*Pseudomonas*属に属する細菌、および

*Enterorhabdus*属に属する細菌

からなる群に属する細菌より選択される、(IV-2)または(IV-3)に記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-5) 前記異なる２種類以上の腸内細菌が

Prevotella melaninogenica、

Bacteroidetes vulgaris、

Megamonas funiformis、

Faecalibacterium prausnitzii、

Coproccoccus eutactus、

Ruminococcus obeum、

Blautia productus、

Eubacterium rectale、

Roseburia intestinalis、

Clostridium difficile、

Escherichia coli、

Staphylococcus aureus、

Lactobacillus murinus、

Enterococcus faecalis、

Pseudomonas fulva、および

Enterorhabdus mucosicola

からなる群より選択される、(IV-3)または(IV-4)に記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-5)前記抗体が

配列番号203、213、223、233、または243の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、

配列番号204、214、224、234、または244の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および／または

配列番号205、215、225、235、または245の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；ならびに／あるいは

配列番号208、218、228、238、または248の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、

配列番号 209、219、229、239、または 249 の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および／または

配列番号 210、220、230、240、または 250 の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

を含むものである、(IV-1)～(IV-4)のいずれかに記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-6)前記抗体が

配列番号 203 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、

配列番号 204 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および

配列番号 205 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

配列番号 208 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、

配列番号 209 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および

配列番号 210 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；

配列番号 213 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、

配列番号 214 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および

配列番号 215 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

配列番号 218 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、

配列番号 219 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および

配列番号 220 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；

配列番号 223 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、

配列番号 224 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および

配列番号 225 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

配列番号 228 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、

配列番号 229 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および

配列番号 230 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；

配列番号 233 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、

配列番号 234 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および

配列番号 235 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

配列番号 238 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、

配列番号 239 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および

配列番号 240 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；または

配列番号 243 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR1、

配列番号 244 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR2、および

配列番号 245 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

配列番号 248 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR1、

配列番号 249 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR2、および

配列番号 250 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR3

をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域を含むものである、(IV-1)～(IV-5)のいずれかに記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-7)前記抗体が

配列番号 202、212、222、232、または 242 の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および／または

配列番号 207、217、227、237、または 247 の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むものである、(IV-1)～(IV-6)のいずれかに記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-8) 前記抗体が定常領域を含む、(IV-1)～(IV-7)のいずれかに記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-9) 前記抗体がキメラ抗体である、(IV-1)～(IV-8)のいずれかに記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-10) 前記抗体がヒト化抗体である、(IV-1)～(IV-8)のいずれかに記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-11) 前記抗体が配列番号 201、211、221、231、または 241 の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖および／または配列番号 206、216、226、236、または 246 の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖を含むものである、(IV-1)～(IV-10)のいずれかに記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-12) 前記抗体が

配列番号 201 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 206 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；

配列番号 211 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 216 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；

配列番号 221 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 226 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；

配列番号 231 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 236 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖；または

配列番号 241 に示すアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 246 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖

を含むものである、(IV-1)～(IV-11)のいずれかに記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-13) 前記抗体が Fv、scFv、トリアボディー (Triabody)、テトラボディー (Tetrabody)、免疫グロブリン、F(ab')₂、Fab、ミニボディー (Minibody)、scFv-Fc からなる群より選択される構造である、(IV-1)～(IV-12)のいずれかに記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-14) 前記抗体が IgA、IgD、IgG、IgM、IgY、および IgW からなる群より選択される、(IV-1)～(IV-13)のいずれかに記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-15) 前記抗体が IgA であって、且つ分泌因子を有する、(IV-1)～(IV-14)のいずれかに記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-16) 前記抗体が医薬組成物の有効成分である、(IV-1)～(IV-15)のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-17) 前記医薬組成物が腸内疾患の治療または予防用である、上記(IV-16)に記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-18) 前記腸内疾患が腸内細菌の異常増殖または腸内細菌叢の病的変化により発症する疾患である、(IV-17)に記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-19) 前記腸内細菌の異常増殖または腸内細菌叢の病的変化により発症する疾患が炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、アレルギー、喘息、肥満、および自己免疫疾患からなる群より選択される、(IV-18)に記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-20) 前記抗体が経口または経腸組成物の有効成分である、(IV-1)～(IV-19)のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-21) 前記経口または経腸組成物が飲食品組成物または飼料組成物である(IV-20)記載のスクリーニング方法(IV)。

(IV-22) 前記経口または経腸組成物が腸内環境改善用、腸内環境最適化用、または腸内腐敗防止用である、(IV-20)または(IV-21)に記載のスクリーニング方法(IV)。

【発明の効果】

【0013】

本発明のポリペプチドは、医薬組成物または経口組成物の有効成分となる抗体のスクリーニングまたは精製に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】実験例1による実験結果を示す図。図中のグラフの縦軸は405nmの吸光度を示し、横軸は使用した抗体の濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）を示す。

【図2】実験例2による実験結果を示す図。

【図3】実験例3による実験結果を示す図。

【図4】実験例4による実験結果を示す図。図中のグラフ縦軸は、大腸菌（DH5 α ）の菌体数を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0015】

〔ポリペプチド〕

本発明のポリペプチド(I)は、配列番号169～180のいずれかに示すアミノ酸配列を有する。

【0016】

配列番号169～180に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドは、全て4アミノ酸からなるペプチド断片に相当する。よって、本発明のポリペプチド(I)は上記の4アミノ酸からなるペプチド断片さえ含んでいればよい。このような4アミノ酸からなるペプチド断片の本発明のポリペプチド(I)中の位置は、特に限定はされない。

20

【0017】

例えば、立体構造的な観点から、上記4アミノ酸からなる（配列番号169～180のいずれかに示すアミノ酸配列からなる。）ペプチド断片が、本発明のポリペプチド(I)の表面に露呈した状態で配置されていることが好ましい。このように配置されることを確認するには、本発明のポリペプチド(I)を結晶化してX線構造解析に供する方法、溶液のままNMRに供するなどといった慣用のポリペプチドの立体構造を解析する方法により、容易に成し得ることができる。

【0018】

本発明のポリペプチド(I)は、例えば、配列番号1～168のいずれかに示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号181～192のいずれかに示すアミノ酸配列からなるポリペプチドなどを挙げることができる。更に好ましくは、配列番号181～192に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

30

【0019】

本発明のポリペプチド(I)のN末端またはC末端には、アミノ酸残基またはペプチド残基を介して、BSA（Bovine serum albumin）、KLH（Keyhole limpet hemocyanin）、OVA（Ovalbumin）、MAP（Multiple antigen peptide）、HSA（Human serum albumin）、TG（Throglobulin）などのポリペプチドが更に結合してなるものとすることができる。好ましくはBSAである。

【0020】

上記のポリペプチド(I)と上述のBSAなどのポリペプチドとの結合は、特に限定はされず、公知のタンパク質修飾用の架橋剤に用いられる基を介して結合する結合態様を挙げることができる。このような基として、マレイイミド基、N-ヒドロキシスクシンイミジル基、m-マレイイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミジル基（MBS基）などを挙げることができる。好ましくは、MBS基である。

40

【0021】

本発明のポリペプチド(I)の最も好ましい態様は、配列番号195に示すアミノ酸配列からなるペプチドである。

【0022】

本発明のポリペプチド(I)には、後述する本発明のポリペプチド(I)が有する機能、効果

50

などを減衰させない範囲に限り、適宜変異が施されてなるものとすることもできる。このような変異は、少なくとも上記4アミノ酸からなるペプチド断片以外のアミノ酸残基に対して施されることが好ましい。

【0023】

具体的な変異導入の数は、特に限定はされない。通常は変異前のアミノ酸配列と85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有する変異体となるような変異導入数とすることができる。なお、ここで言う同一性とは、上述の4アミノ酸からなるペプチド断片を除いて比較した結果を示す。

【0024】

上記用語『同一性』とは、2以上の対比可能なアミノ酸配列または塩基配列の、お互いに対する同一のアミノ酸配列または塩基配列の程度をいう。従って、ある2つのアミノ酸配列または塩基配列の同一性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。アミノ酸配列または塩基配列の同一性のレベルは、通常は、配列分析用ツールであるFASTAを用い、デフォルトパラメーターを用いて決定される。

【0025】

若しくは、KarlinおよびAltschulによるアルゴリズムBLAST（例えば、Karlin S, Altschul SF. Proc. Natl Acad Sci USA. 87:2264-2268 (1990)、Karlin S, Altschul SF. Natl Acad Sci USA. 90:5873-7 (1993)など）を用いて決定できる。このようなBLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTPやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている（例えば、Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. J Mol Biol. 215:403-10 (1990)など）。これらの解析方法の具体的な手法は公知であり、NCBIのウェブサイトなどを参照すればよい。

【0026】

上述の変異導入とは、置換、欠失、挿入などを挙げることができる。具体的な変異導入については、公知の方法を採用することができ、特に限定はされない。例えば置換であれば保存的な置換技術を採用することができる。

【0027】

用語『保存的な置換技術』とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置換される技術を意味する。

【0028】

例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジンなどといった塩基性側鎖を有するアミノ酸残基同士で置換されることが保存的な置換技術にあたる。その他、アスパラギン酸、グルタミン酸などといった酸性側鎖を有するアミノ酸残基同士；グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システインなどといった非帯電性極性側鎖を有するアミノ酸残基同士；アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンなどといった非極性側鎖を有するアミノ酸残基同士；スレオニン、バリン、イソロイシンなどといったβ-分枝側鎖を有するアミノ酸残基同士；チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジンなどといった芳香族側鎖を有するアミノ酸残基同士での置換も同様に保存的な置換技術にあたる。

【0029】

本発明のポリペプチド(I)は、公知のペプチド合成方法によって製造することができる。例えばFmoc、Boc保護基などを採用した固相合成法が挙げられる。また、合成する所望のポリペプチドが比較的長いアミノ酸配列からなる場合、インシリコで所望のポリペプチドをコードする塩基配列情報を入手し、これを有する核酸を合成し、斯かる核酸を組み換えタンパク質を製造するのに適した宿主細胞に導入して生合成し、必要に応じて精製工程に供して本発明のポリペプチド(I)を作製することもできる。なお、上記核酸も、公知の方法を用いることで、当業者であれば容易に製造することができる。

【0030】

更に、本発明のポリペプチド(I)には、変異以外に修飾が施されてなるものとする事もできる。例えば、N末端の主鎖アミド基のアセチル化、メチル化、またはホルミル化、N末端の主鎖アミド基とミリスチン酸がエステル結合してなるミリストイル化、N末端の主鎖アミド基とN末端グルタミン酸残基の側鎖カルボキシル基が分子内縮合によりラクタム基を形成してなるピログルタミン酸化；C末端の主鎖カルボキシル基のアミド化；リジン残基の側鎖グアニジル基のメチル化、アセチル化、アシル化またはヒドロキシル化；システイン残基の側鎖チオール基同士によるジスルフィド結合の形成、プレニル化、またはパルミトイル化；セリン残基またはスレオニン残基の側鎖水酸基のリン酸化またはグリコシル化；チロシン残基の側鎖水酸基の硫酸化（スルホ基の付与）、リン酸化、またはポルフィリン化合物或いはリボフラビンの付与などを挙げることができる。

10

【0031】

〔ポリペプチドの用途〕

本発明のポリペプチド(I)は、抗体のスクリーニングまたは精製のために好適に用いることができる。具体的なスクリーニング方法または精製方法は、特に限定はされない。

【0032】

このようなスクリーニング方法は、例えば、後述の〔スクリーニング方法〕を参照することで、容易に実施することができる。

【0033】

また精製方法は、本発明のポリペプチド(I)を用いたアフィニティ精製法が挙げることができる。具体的には、本発明のポリペプチド(I)をセルロース、アガロースなどの当該分野で慣用される公知の樹脂に化学的に結合させたものを用いる方法を挙げることができる。目的物となる抗体を溶出する方法は特に限定されず、例えば酸を用いる方法を挙げることができる。

20

【0034】

本発明のポリペプチド(I)によってスクリーニングまたは精製される抗体は、特に限定はされない。

【0035】

具体的な抗体の一つの態様として、例えば、異なる2種類以上の腸内細菌に特異的に結合する抗体を挙げることができる。好ましくは、異なる2種類以上の腸内細菌の成長を阻害する抗体である。このような抗体が発揮する機能は、特許文献1に記載の方法を採用することによって確認することができる。

30

【0036】

上記腸内細菌は生体内で腸内細菌叢を形成し、腸内免疫系の恒常性の維持に関与する細菌である限り特に限定はされない。

【0037】

具体的な腸内細菌として、例えば

Prevotella属に属する細菌、
Bacteroides属に属する細菌、
Megamonas属に属する細菌、
Bifidobacterium属に属する細菌、
Faecalibacterium属に属する細菌、
Coprococcus属に属する細菌、
Ruminococcus属に属する細菌、
Blautia属に属する細菌、
Eubacterium属に属する細菌、
Roseburia属に属する細菌、
Lactobacillus属に属する細菌、
Clostridium属に属する細菌、
Escherichia属に属する細菌、
Staphylococcus属に属する細菌、

40

50

Enterococcus 属に属する細菌、
Pseudomonas 属に属する細菌、
Enterorhabdus 属に属する細菌
 などを挙げることができ、これらの中の 2 種以上を適宜選択することができる。

【0038】

より好ましくは、
Prevotella melaninogenica、
Bacteroides vulgatus、
Megamonas funiformis、
Faecalibacterium prausnitzii、
Coprococcus eutactus、
Ruminococcus obeum、
Blautia productus、
Eubacterium rectale、
Roseburia intestinalis、
Clostridium difficile、
Escherichia coli、
Staphylococcus aureus、
Lactobacillus murinus、
Enterococcus faecalis、
Pseudomonas fulva、
Enterorhabdus mucosicola
 などが挙げることができ、これらの中の 2 種以上を適宜選択することができる。

【0039】

上記抗体の具体的な他の態様として、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼに対して特異的に結合する抗体であることを挙げることができる。抗体が特異的に結合するアミノ酸配列またはその領域を、本明細書において、「結合エピトープ」または単に「エピトープ」と呼ぶことがある。

【0040】

用語「特異的」とは、用語「選択的」とは区別される。すなわち、特異的に結合するとは、2 以上の結合する可能性のある対象に対して、ある 1 つの対象に対して結合しやすい傾向であることを意味し、他の対象には結合しないことを意味するものではない。本発明で特定する「2 種類以上の腸内細菌に特異的に結合する」とは、1 種のための腸内細菌に特異的に結合することを排除するものである。

【0041】

上記抗体の結合エピトープとして、より具体的にはセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの 11 番目から 333 番目のアミノ酸配列が挙げることができる。更に好ましくはセリンヒドロキシトランスフェラーゼの 11 番目、25 番目、または 27 番目のいずれかから、セリンヒドロキシトランスフェラーゼの 30 番目、37 番目、44 番目、45 番目、250 番目、または 333 番目のアミノ酸配列が挙げられる。好ましくは 25 番目～45 番目のアミノ酸配列であり、更に好ましくは 27～30 番目のアミノ酸配列を結合エピトープとする抗体である。

【0042】

これらのアミノ酸配列は、配列番号 1、13、25、37、49、61、73、85、97、109、121、133、145、157、169、または 181 の何れかに示すアミノ酸配列に相当する。

【0043】

また、E E H I の中でも 1 番目のグルタミン酸残基が、アスパラギン残基、ロイシン残基、セリン残基、グルタミン残基、アルギニン残基、メチオニン残基、またはリジン残基の何れかに；2 番目のグルタミン酸残基が、セリン残基、リジン残基、アスパラギン残基

、アスパラギン酸残基、またはヒスチジン残基のいずれかに；3番目のヒスチジン残基が、アスパラギン残基、4番目のイソロイシン残基がロイシン残基に置換されたアミノ酸配列も、上記抗体のエピトープとすることができる。

【0044】

このような置換後のアミノ酸配列は、配列番号2、14、26、38、50、62、74、86、98、110、122、134、146、158、170、または182番目の何れかに示すアミノ酸配列が相当する。ただし、EEHIが、EHNIあるいはNSHIに置換される場合を除く。

【0045】

更に、上記アミノ酸配列に含まれるEEHIが、NSHI、NSNI、LKGI、SSVI、QNNI、RDTL、NNNL、MH SI、KH SI、またはKESIに挙げられる他のアミノ酸配列に置換された上記アミノ酸配列も、上記抗体のエピトープとすることができる。

10

【0046】

このような置換後のアミノ酸配列は、配列番号3～12、15～24、27～36、39～48、51～60、63～72、75～84、87～96、99～108、111～120、123～132、135～144、147～156、159～168、171～180、または183～192の何れかに示すアミノ酸配列が相当する。

【0047】

上記セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼとは、特に限定はされない。

20

【0048】

具体的なセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼとして、例えば、大腸菌に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼであれば、NCBIのウェブサイトに掲載される、ACCESSION No. J01620 J01621; VERSION J01620.1 GI:146216に示されるアミノ酸配列などを有するタンパク質を挙げることができる（配列番号194）。

【0049】

このタンパク質は、L-セリンをL-グリシンに、そして同時にテトラヒドロ葉酸を5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸に可逆的に変換する触媒作用を有する酵素で、大腸菌から哺乳動物に至るまで、アミノ酸配列が非常に保存された酵素である。

30

【0050】

したがって、上記触媒作用を有する範囲において、大腸菌とホモログまたはオルソログと判断できる大腸菌以外の種に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列に基づいて、上記抗体の結合エピトープを適宜設定することができる。

【0051】

このようなホモログまたはオルソログとして、例えば、*Coprococcus eutactus*、*Bordetella parapertussis*、*Saccharomyces cerevisiae*（出芽酵母）、*Schizosaccharomyces pompe*（分裂酵母）、*Eubacterium rectale*、*Pseudomonas fulva*、*Staphylococcus aureus*、*Bacteroides fragilis*、*Haemophilus influenzae*、*Klebsiella pneumoniae*、*Legionella pneumophila*、*Rickettsia rickettsii*、*Salmonella paratyphi A*、*Salmonella typhimurium*、*Shigella flexneri*、*Streptococcus pneumoniae*、*Yersinia pestis* bv. Antiquem、*Mycobacterium tuberculosis*などといった、腸内で生息可能な菌種に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを挙げることができる。これらの菌種に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列は、上述のNCBIのウェブサイトから適宜入手することができる。

40

50

【0052】

以下の表1に上記ホモログを含む各種生物に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の比較を示す。

【0053】

【表1】

Origin	(start aa)	-----sequence-----	(end aa)
<i>Escherichia coli</i>	21 QEKV RQ EEHI	ELIASEN YTSPRVM	44
<i>Eubacterium rectale</i>	20 DEFE RQ NSHI	ELIASEN WVSPAVM	43
<i>Pseudomonas fulva</i>	21 QEAL RQ EEHI	ELIASEN YTSPAVM	44
<i>Staphylococcus aureus</i>	17 REFQ RQ NSNI	ELIASEN FVSEAVM	40
<i>Bacteroides fragilis</i>	13 KEHQ RQ LKGI	ELIASEN FVSDQVM	36
<i>Haemophilus influenzae</i>	21 DENR RQ EEHI	ELIASEN YASPRVM	44
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21 QEKV RQ EEHI	ELIASEN YTSPRVM	44
<i>Legionella pneumophila</i>	21 DEKR RQ EEHI	ELIASEN YVSPRVL	44
<i>Rickettsia rickettsii</i>	21 HEKL RQ SSVI	ELIASEN FVSPAVL	44
<i>Salmonella paratyphi A</i>	21 QEKV RQ EEHI	ELIASEN YTSPRVM	44
<i>Salmonella typhimurium</i>	21 QEKV RQ EEHI	ELIASEN YTSPRVM	44
<i>Shigella flexneri</i>	21 QEKV RQ EEHI	ELIASEN YTSPRVM	44
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	21 KEEE RQ QNNI	ELIASEN VVSKAVM	44
<i>Yersinia pestis</i> bv. AntiqueM	21 QEVV RQ EEHI	ELIASEN YTSPRVM	44
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18 KELG RQ RDTL	EMIASEN FVPRAVL	41
<i>Burkholderia mallei</i>	22 QENV RQ EEHI	ELIASEN YTSPAVM	45
<i>Lactobacillus casei</i>	16 NEEE RQ EHNI	ELIASEN IVSPAVR	39
<i>Coprococcus eutactus</i>	20 DELN RQ NNNL	ELIASEN IVSKAVM	43
<i>Bordetella parapertussis</i>	32 AERQ RQ MHSI	ELIASEN FVSQAVL	55
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46 QERH RQ KHSI	TLIPSEN FTSKAVM	69
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	47 SEKS RQ KESI	ALIASEN FTSRAVM	70
<i>Arabidopsis thaliana</i>	96 KEKD RQ FRSL	ELIASEN FTSRAVM	119
Rabbit	62 REKD RQ CRGL	ELIASEN FCIRAAL	85
Mouse	33 KESN RQ RVGL	ELIASEN FASRAVL	56
Human	62 REKD RQ CRGL	ELIASEN FCSRAAL	85

【0054】

上記大腸菌由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの25番目～37番目のアミノ酸配列は、RQEEHIELIASEN（配列番号：97）である。ここで、出芽酵母に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを、大腸菌に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼのホモログとするのであれば、出芽酵母由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの50番目～62番目のアミノ酸配列が、大腸菌に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの25～37番目のアミノ酸配列に相当するので、RQKHSITLIPSEN（配列番号198）を上記抗体の結合エピトープとすることができる。

【0055】

また、分裂酵母に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを、大腸菌由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼのホモログとするのであれば、分裂酵母由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの51番目～63番目のアミノ酸配列が大腸菌由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの25～37番目のアミノ酸配列に相当するので、RQKESIALIASEN（配列番号199）を上記抗体の結合エピトープとすることができる。

10

20

30

40

50

【0056】

なお、大腸菌由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼのホモログを上記抗体の結合エピトープとする場合、大腸菌由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの27番目～30番目に位置する4つのアミノ酸配列を、EEHIに置換してなるアミノ酸配列を、上記抗体の結合エピトープとすることもできる。

【0057】

例えば、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼホモログとして配列番号198に示す出芽酵母に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを選択した場合、出芽酵母由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの52番目～55番目のKHSIからなる4つのアミノ酸配列が大腸菌に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの27番目～30番目のEEHIに相当するので、RQEEHITLIPSEN（配列番号200）を上記抗体の結合エピトープとすることもできる。

10

【0058】

上記抗体の他の態様として、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を有する態様の抗体を挙げることができる。中でも、定常領域を含む、重鎖および／または軽鎖を有する態様の抗体がより好ましい。更に好ましくは、重鎖および軽鎖を有する態様の抗体である。

【0059】

上述の可変領域の中には、より抗原を認識する部位として特定される、それぞれCDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれる部位をアミノ末端から順に有する。なお、これらのCDR1～3は、より詳細には、それぞれ重鎖CDR1、重鎖CDR2、および重鎖CDR3；ならびに軽鎖CDR1、軽鎖CDR2、および軽鎖CDR3とも呼ばれる。

20

【0060】

そして、重鎖および軽鎖のCDR1～3以外の領域は、アミノ末端から順に、それぞれ重鎖FR1、重鎖FR2、重鎖FR3、および重鎖FR4；ならびに軽鎖FR1、軽鎖FR2、軽鎖FR3、軽鎖FR4と呼ばれる。

【0061】

上記抗体における可変領域には、上述のような重鎖可変領域および軽鎖可変領域にそれぞれCDR1～3の全てを必ずしも含んでいる必要はなく、CDR1～3のうちの少なくとも1つのCDRを含む態様とすることができる。中でもCDR3を含んでいることが好ましい。

30

【0062】

このような、重鎖CDR1～3および軽鎖CDR1～3を構成するポリペプチドのアミノ酸配列は、特に限定はされない。

【0063】

具体的には、

重鎖CDR1として、配列番号203、213、223、233、または243の何れかに示すアミノ酸配列など；

重鎖CDR2として、配列番号204、214、224、234、または244の何れかに示すアミノ酸配列など；

重鎖CDR3として、配列番号205、215、225、235、または245の何れかに示すアミノ酸配列など；

軽鎖CDR1として、配列番号208、218、228、238、または248の何れかに示すアミノ酸配列など；

軽鎖CDR2として、配列番号209、219、229、239、または249の何れかに示すアミノ酸配列など；

軽鎖CDR3として、配列番号210、220、230、240、または250の何れかに示すアミノ酸配列などが挙げられる。

40

【0064】

上記抗体の重鎖可変領域は特に限定はされない。

50

【0065】

具体的には、例えば重鎖CDR1～3を含む態様の重鎖可変領域であれば、上述の配列番号203、213、223、233、または243の何れかに示すアミノ酸配列からなる、重鎖CDR1；
配列番号204、214、224、234、または244の何れかに示すアミノ酸配列からなる、重鎖CDR2；および
配列番号205、215、225、235、または245の何れかに示すアミノ酸配列からなる、重鎖CDR3
が、アミノ末端から順に含まれている重鎖可変領域を挙げることができる。

【0066】

また、上記抗体の軽鎖可変領域も特に限定はされない。

【0067】

具体的には、例えば軽鎖CDR1～3を含む態様の軽鎖可変領域であれば、上述の配列番号208、218、228、238、または248の何れかに示すアミノ酸配列からなる、軽鎖CDR1；
配列番号209、219、229、239、または249の何れかに示すアミノ酸配列からなる、軽鎖CDR2；および
配列番号210、220、230、240、または250の何れかに示すアミノ酸配列からなる、軽鎖CDR3
が、アミノ末端から順に含まれている軽鎖可変領域を挙げることができる。

【0068】

より好ましい重鎖CDR1～3を含む態様の重鎖可変領域としては、
配列番号203に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号204に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および配列番号205に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域；
配列番号213に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号214に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および配列番号215に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域；
配列番号223に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号224に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および配列番号225に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域；
配列番号233に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号234に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および配列番号235に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域；または
配列番号243に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号244に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および配列番号245に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域
を挙げることができる。

【0069】

さらに好ましくは、配列番号203に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号204に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、および配列番号205に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3をアミノ末端から順に含む重鎖可変領域を挙げることができる。

【0070】

また、より好ましい軽鎖CDR1～3を含む態様の軽鎖可変領域としては、
配列番号208に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号209に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、および配列番号210に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；
配列番号218に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号219に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、および配列番号220に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；
配列番号228に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号229に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、および配列番号230に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；または
配列番号238に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号239に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、および配列番号240に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域
を挙げることができる。

D R 3 をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；

配列番号 2 2 8 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1、配列番号 2 2 9 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2、および配列番号 2 3 0 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；

配列番号 2 3 8 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1、配列番号 2 3 9 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2、および配列番号 2 4 0 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域；または

配列番号 2 4 8 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1、配列番号 2 4 9 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2、および配列番号 2 5 0 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域

を挙げることができる。

【0071】

さらに好ましくは、配列番号 2 0 8 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1、配列番号 2 0 9 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2、および配列番号 2 1 0 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 をアミノ末端から順に含む軽鎖可変領域を挙げることができる。

【0072】

上述の重鎖可変領域の中でもさらに好ましい態様として、配列番号 2 0 2、2 1 2、2 2 2、2 3 2、または 2 4 2 の何れかに示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であり、最も好ましくは配列番号 2 0 2 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を挙げることができる。

【0073】

また、上述の軽鎖可変領域の中でもさらに好ましいのは、配列番号 2 0 7、2 1 7、2 2 7、2 3 7、または 2 4 7 の何れかに示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域であり、最も好ましくは配列番号 2 0 7 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を挙げることができる。

【0074】

上記抗体は、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を適宜組み合わせた構造の態様とすることもできる。このような態様の抗体として、例えば、F v、s c F v、トリアボディー (T r i a b o d y)、テトラボディー (T e t r a b o d y) などと呼ばれる構造を有する抗体が挙げられる。また、ディアボディー (D i a b o d y)、s c D b、タンデム s c F v、d s F v－d s F v などと呼ばれる二重特異性を発揮する構造の抗体を挙げることができる。

【0075】

上記抗体のさらに好ましい態様として、上述のような重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域と、さらに定常領域とを有する重鎖および／または軽鎖を含む態様の抗体を挙げることができる。

【0076】

定常領域とは、通常イムノグロブリンにて特定される C H 1、C H 2、および C H 3 の各ドメインを含む重鎖定常領域、C L ドメインを含む軽鎖定常領域が挙げられる。

【0077】

しかしながら、上記抗体にて含み得る定常領域とは、イムノグロブリンの場合に詳述した重鎖定常領域または軽鎖定常領域の全てを含む必要はなく、これらのうちの一部のドメインを含む場合も定常領域とすることができる。

【0078】

具体的な重鎖および／または軽鎖を含む態様の抗体として、例えば、配列番号 2 0 1、2 1 1、2 2 1、2 3 1、または 2 4 1 の何れかに示すアミノ酸配列を含む重鎖および／または配列番号 2 0 6、2 1 6、2 2 6、2 3 6、または 2 4 6 の何れかに示すアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体を挙げることができる。

【0079】

10

20

30

40

50

より好ましくは、配列番号 201、211、221、231、または 241 の何れかに示すアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 206、216、226、236、または 246 の何れかに示すアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体を挙げることができる。

【0080】

さらに好ましい態様として、

配列番号 201 に示すアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 206 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体；

配列番号 211 に示すアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 216 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体；

配列番号 221 に示すアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 226 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体；

配列番号 231 に示すアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 236 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体；または

配列番号 241 に示すアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 246 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体を挙げることができる。

【0081】

より好ましくは、配列番号 201 に示すアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 206 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体を挙げることができる。

【0082】

具体的な上記抗体の構造は特に限定はされない。このような定常領域を有する抗体として、例えば免疫グロブリンのみならず、 $F(ab')_2$ 、Fab、ミニボディー (Minibody)、scFv-Fc などの構造を有する抗体を挙げることができる。さらに、scFv-Fc、scFv-Fc-scFv、scDb-Fc といった二重特異性を有する多価化抗体の構造を有する抗体も挙げることができる。好ましくは、免疫グロブリンの構造を有する抗体である。

【0083】

具体的な免疫グロブリンの種類は特に限定されない。このような免疫グロブリンとして、例えば、IgA (IgA₁ または IgA₂ を含む。)、IgD、IgG (IgG₁、IgG₂ [IgG_{2a} または IgG_{2b}]、IgG₃、または IgG₄ を含む。)、IgM、IgY、IgW (IgW₁ または IgW₂ を含む。)などを挙げることができる。好ましくは、IgA である。

【0084】

上記抗体が IgA の構造を有する場合、J 鎖とそれぞれの重鎖を介してホモ 2 量体を形成してなる構造とすることが好ましい。

【0085】

上記 J 鎖とは、抗原認識部位を有さないアミノ酸配列を含むペプチドであり、上記の重鎖とも軽鎖とも異なるアミノ酸配列を有するペプチドである。当該アミノ酸配列として、具体的には、マウス由来であれば、National Center of Biotechnology Information (NCBI) ウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に収載される、ACCESSION No. AAA38673; VERSION AAA38673.1 GI:196379 に示されるアミノ酸配列などが挙げられ、ヒト由来であれば、同じく NCBI ウェブサイトに収載される、ACCESSION No. NP_653247; VERSION NP_653247.1 GI:21489959 に示されるアミノ酸配列などが挙げられる。

【0086】

上記抗体が IgA の構造を有し、且つ、J 鎖を介してホモ 2 量体を形成する場合、更に分泌因子を含んでなるものとすることもできる。分泌因子とは、上述の J 鎖と同様に抗原認識部位を有さないアミノ酸配列を含むペプチドであり、通常は糖鎖が修飾されてなる、上記の重鎖とも軽鎖とも異なるアミノ酸配列を有するペプチドである。

【0087】

当該分泌因子のアミノ酸配列として、例えばマウス由来であれば、NCBIのウェブサイトに掲載される、ACCESSION No. O70570; VERSION O70570.1 GI: 6225856に示されるポリイムノグロブリンレセプターのアミノ酸配列などのうちの、細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列などが挙げられる。上記の例であれば、19～638番目のアミノ酸配列が分泌因子に相当する。

【0088】

例えばヒト由来であれば、同じくNCBIウェブサイトに掲載される、ACCESSION No. P01833; VERSION P01833.4 GI: 150421625に示されるポリイムノグロブリンレセプターのアミノ酸配列のうちの、細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列などが挙げられる。上記の例であれば、19～645番目のアミノ酸配列が分泌因子に相当する。

10

【0089】

上述する抗体を定義するアミノ酸配列には、適宜変異が施されてなるものとすることもできる。具体的には、上記の本発明のポリペプチド(I)にて詳述した手段を適宜改変することができる。

【0090】

上記抗体の具体的な他の態様として、医薬組成物の有効成分となる抗体を挙げることができる。具体的な医薬組成物の対象疾患は特に限定はされない。例えば、対象疾患として腸内疾患を挙げることができる。

20

【0091】

具体的な腸内疾患は特に限定されない。例えば、腸内疾患として、腸内細菌の異常増殖および／または腸内細菌叢の病的変化により発症する疾患を挙げることができる。

【0092】

具体的な腸内細菌の異常増殖とは特に限定はされない。例えば、腸管内に生息する細菌数が異常に増加する状態をを挙げることができる。

【0093】

具体的に腸内細菌叢の病的変化とは、特に限定はされない。例えば、腸内細菌叢を構成する腸内細菌の種類と、それぞれの腸内細菌の割合が変化することで、腸内細菌と宿主との間の共生関係の恒常性保持に異常をきたす状態となることをを挙げることができる。なお、腸内細菌とは上述の通りとすればよい。

30

【0094】

具体的な腸内細菌の異常増殖および／または腸内細菌叢の病的変化により発症する疾患として、例えば、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、アレルギー、喘息、肥満、自己免疫疾患などを挙げることができる。

【0095】

上記、本発明のポリペプチド(I)によってスクリーニングまたは精製される抗体は、経口または経腸組成物の有効成分とすることもできる。

【0096】

具体的な経口または経腸組成物は特に限定はされない。例えば、経口または経腸組成物は飲食品組成物または飼料組成物を挙げることができる。

40

【0097】

具体的な飲食品組成物または飼料組成物は特に限定はされない。例えば、飲食品組成物または飼料組成物は、腸内環境改善用、腸内環境最適化用、または腸内腐敗防止用に好ましく用いることができる。

【0098】

〔抗体〕

本発明の抗体は、配列番号1～192または195のいずれかに示すアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合する。

【0099】

50

このような抗体は、本発明のポリペプチド(I)による精製方法またはスクリーニング方法の対象とする抗体として詳述したものとすることができる。

【0100】

〔抗体のスクリーニング方法〕

本発明の抗体のスクリーニング方法は、配列番号1～192のいずれかに示すアミノ酸配列に結合し、配列番号193に結合しないことを基準に選択することの特徴とする方法である。

【0101】

具体的なスクリーニング方法は、特に限定はされないが、例えば、ELISA、FACS、セルソーティングなどといった慣用の免疫学的測定法を採用し、上記基準を基に抗体を選択することによって実施できる。

10

【0102】

具体的に、本発明のスクリーニング方法によって得られる抗体は、上述の通りである。

【実施例】

【0103】

以下に、本発明をさらに説明する。但し、本発明が以下に示す実施例に限定されないの
は言うまでもない。

【0104】

特許文献1に記載の方法によって得られたIgAであるW2抗体およびW27抗体を用いた各種実験を行った。

20

【0105】

＜実験例1＞

特許文献1には、W2抗体はマウスに経口投与しても腸内細菌叢の変化を誘導することができないことが実証されているのに対して、W27抗体は腸内細菌叢の変化を誘導することが実証されている。これに基づいて、引用文献1ではW27抗体が腸内疾患の治療のために用いられる医薬組成物の有効成分とできることが示されている。

【0106】

なお、W27抗体と同様にW30抗体、W34抗体、W43抗体、およびW11抗体も2種類以上の腸内細菌に結合できることが明らかになっている。このような増殖抑制が期待される腸内細菌として、*E. rectale*、*S. aureus*、*B. fragilis*、*R. rickettsii*、*S. pneumoniae*、*M. tuberculosis*、*C. eutactus*、*B. parapertussis*、*S. cerevisiae*、*S. pompe*などを挙げる
ことができる。

30

【0107】

一方で、腸内細菌のなかでも、いわゆる善玉菌として知られる*L. casei*には、W27をはじめとする各種抗体は非特異的な弱い結合がELISAやFACSで見られるが、ウェスタン解析で*L. casei*由来の蛋白質を特異的に認識しないことが明らかとなっており、斯かる菌体への増殖抑制効果は期待できないことも知られている。

【0108】

W27抗体、W30抗体、W34抗体、W43抗体、およびW11抗体のアミノ酸配列は以下の表2に示すとおりである。

40

【0109】

【表 2】

以下、配列番号 X X X の「X X X」を表記する。

		W 2 7	W 3 0	W 3 4	W 4 3	W 1 1
重鎖	全長	2 0 1	2 1 1	2 2 1	2 3 1	2 4 1
	可変領域	2 0 2	2 1 2	2 2 2	2 3 2	2 4 2
	C D R 1	2 0 3	2 1 3	2 2 3	2 3 3	2 4 3
	C D R 2	2 0 4	2 1 4	2 2 4	2 3 4	2 4 4
	C D R 3	2 0 5	2 1 5	2 2 5	2 3 5	2 4 5
軽鎖	全長	2 0 6	2 1 6	2 2 6	2 3 6	2 4 6
	可変領域	2 0 7	2 1 7	2 2 7	2 3 7	2 4 7
	C D R 1	2 0 8	2 1 8	2 2 8	2 3 8	2 4 8
	C D R 2	2 0 9	2 1 9	2 2 9	2 3 9	2 4 9
	C D R 3	2 1 0	2 2 0	2 3 0	2 4 0	2 5 0

10

【0 1 1 0】

そこで、W 2 7 をはじめとする腸内疾患の治療のために用いられる医薬組成物の有効成分となり得る抗体のエピトープを検討するために、以下の表 3 に示すアミノ酸配列を有する 3 種類のペプチドを合成した。

20

【0 1 1 1】

【表 3】

	25	30	35	40	45	50	55	60	65	
E.coli	RQ	<u>EEHI</u>	ELIAS	ENYTS	PRVMQ	AQGSQ	LTNKY	AE	GYPGKRY	YGG
SHMT-P1-BSA	RQ	<u>EEHI</u>	ELIAS	ENYTS	PRVMQ	<u>C</u>				
SHMT-P2-BSA				YTSPRVMQ	AQGSQ	LTNKY	AE	<u>C</u>		
SHMT-P3-BSA						AQGSQ	LTNKY	AE	GYPGKRY	YGGC

30

【0 1 1 2】

S H M T - P 1 - B S A (配列番号 1 9 5)、S H M T - P 2 - B S A (配列番号 1 9 6)、および S H M T - P 3 - B S A (配列番号 1 9 7) の C 末端のシステイン残基側鎖のチオール基は、それぞれ B S A (B o v i n e s e r u m a l b u m i n) と m - マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミジル基を介して結合している。

【0 1 1 3】

S H M T - 1 - B S A の N 末端のアルギニン残基は、大腸菌に由来するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの 2 5 番目のアミノ酸残基に相当し、B S A に隣接するシステイン残基の隣に位置するグルタミン残基はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの 4 5 番目のアミノ酸残基に相当する。なお、システイン残基は、S H M T - 1 に B S A

40

【0 1 1 4】

<実験>

上記の 3 種類の合成ペプチドを E L I S A 測定用プレートの各ウェルに固相化し、上述の本発明の I g A 抗体に相当し大腸菌生育阻害活性を有する W 2 7 抗体と、大腸菌の生育阻害活性を有さない W 2 抗体をそれぞれ所定濃度でこれらのウェルに添加した。

【0 1 1 5】

次いで、これらのウェルを適宜ブロッキングおよび洗浄処理した後に、アルカリホスファターゼ標識(酵素標識)された I g A 抗体に特異的な抗体をウェルに加え、最後に斯かる酵素の基質をウェルに添加して基質反応後の吸光度を測定した。

50

【0116】

<結果>

図1に示すように、W27抗体はSHMT-1-BSAに結合するものの、W2抗体はSHMT-1-BSAには結合しないことが明らかとなった。なお、SHMT-2-BSAおよびSHMT-3-BSAには、W2抗体もW27抗体も共に結合しないことも明らかとなった。

【0117】

SHMT-P1-BSAとSHMT-P2-BSAおよびSHMT-P3-BSAとのアミノ酸配列の違いは、SHMT-P1-BSAが、そのN末端領域にアミノ酸配列：RQEEHIELIASEN（配列番号97）を有するところである。また、上述のようにW2抗体とW27抗体の違いは、インビボで腸内細菌の増殖を抑制できるかどうかである。

10

【0118】

したがって、アミノ酸配列：RQEEHIELIASEN（配列番号97）を有するポリペプチドは、W27抗体が有するような生理活性を有する抗体をスクリーニングまたは精製する際に有用であることが示唆される。

【0119】

<実験例2>

上記実験例1にて明らかとなった配列番号97に示すアミノ酸配列内のW27抗体のエピトープをより詳細に検討するための実験を行った。

20

【0120】

上述のように、W27抗体はL. caseiには結合しないことが明らかとなっている。上記表1に示すようにL. casei由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの22番目～25番目のEHNIは、E. coli由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの27番目～30番目のEEHI（配列番号169）に相当する。

【0121】

そこで、L. casei由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの22番目～25番目のEHNIをEEHIに置換した変異体（C末端にはmycタグを付加した。）を293T細胞を用いて作製し、W27抗体を用いてウェスタンブロッティングに供した。また、逆にE. coli由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの27番目～30番目のEEHIをEHNIに置換した変異体（C末端にはmycタグを付加した。）変異体も作製し、ウェスタンブロッティングに供した。結果を図2に示す。

30

【0122】

この結果、W27抗体は野生型のE. coli由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを認識したにもかかわらず、EEHIをEHNIに置換した変異体は認識しなかった。逆に、W27抗体は野生型のL. casei由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを認識しないにもかかわらず、EHNIをEEHIに置換した変異体は認識した。

【0123】

この結果から、W27抗体はEEHI（配列番号169）に示すアミノ酸配列、すなわちE. coli由来のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの27番目～30番目のアミノ酸配列をエピトープとすることが強く示唆された。

40

【0124】

<実験例3>

W27抗体を精製工程に供した。W27抗体を産生するハイブリドーマの培養上清を回収し、これに飽和硫酸アンモニウム溶液を等量混和することにより塩析精製に供した。次いで、これによって得られた粗精製物をゲル濾過精製またはアフィニティー精製に供した。

【0125】

通常は、IgGを精製するにプロテインG、プロテインA、プロテインLなどの工程の

50

定常領域に親和性を有するタンパク質を用いたアフィニティ精製を採用されるが、W27抗体はIgAでありこれらのタンパク質との親和性は極めて低いために、通常に用いられる方法を採用しがたい。

【0126】

そこで、W27抗体は2量体のIgAでありおよそ360kDaの分子量であるため、16/60 SephacrylTM S-300 HR (GEヘルスケア)を用いたゲル濾過精製を採用した。なお、アフィニティ精製には、上記SHMT-P1-BSAをセファロースレジン(HiTrap NHS-activated HP Column: GEヘルスケア)に結合させたものを作製して精製を行った。なお、溶出条件はpH2.5の0.1Mグリシンバッファーを用いた。溶出後のサンプルには、直ちにpH9.0のTrisバッファーを加えて処理した。

10

【0127】

これらの各種精製法にて得られたサンプルを非還元SDS-PAGEに供した結果を図3に示す。

【0128】

硫酸アンモニウムを用いた精製した粗精製物のバンドは幾つかのメジャーバンドが呈されているのに対して、アフィニティ精製後のサンプルおよびゲル濾過後のサンプルでは、ほぼ同様のパターンにて250kDa以上にバンドを確認することができた。

【0129】

<実施例4>

20

これらの精製後のサンプルを大腸菌の生育抑制実験に供した。比較例として、PBSおよびマウスIgA(Immunology Consultants Laboratory)を用いた。なお、マウスIgAの市販品には防腐剤としてアジ化ナトリウムが含まれているため、これを除去するためにゲル濾過カラム(PD-10)に供した後に使用した。

【0130】

Brain Heart Infusion Broth (Fluka Analytical)を用い、37℃で一晩培養した大腸菌株(DH5α)を200~300細胞程度準備し、これを5μLのPBSに懸濁した。

【0131】

30

次いで、上記の精製抗体、PBS、および処理後のマウス由来IgAをそれぞれ25μLずつ加え、37℃で3時間インキュベートした。さらに、Brain Heart Infusion Brothを15μLずつ加え、7時間インキュベートした。

【0132】

その後、菌体を回収し、菌体内のDNAを単離した。単離したDNAを定量PCR法に供し、7時間のインキュベーション後の細胞数を測定した。具体的には、KAPA SYBR (登録商標) FAST qPCR Kit Optimized for Light Cycler (登録商標) 480 (KAPABIOSYSTEMS)を用いた。PCR反応に用いたプライマーの塩基配列は以下のとおりである。

【0133】

40

F: 5'-ACCTTCGGGCTCTTGCC-3' (配列番号251)

R: 5'-TTCCTCCCCGCTGAAGAAGTAC-3' (配列番号252)

結果を図4に示す。コントロールのPBSおよびマウスIgAと比べ、アフィニティ精製を行って得られたサンプルは顕著に大腸菌の生育を阻害したものの、ゲル濾過精製を行って得られたサンプルではコントロールとほぼ同数の大腸菌数が測定され、生育阻害は全く示さなかった。

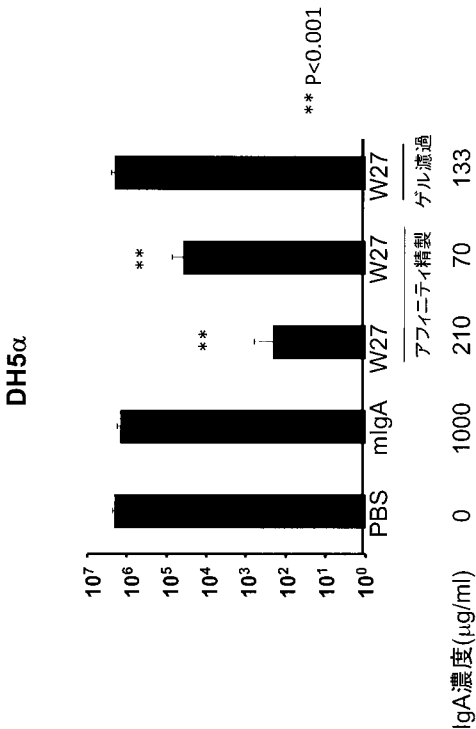
【0134】

図3に示す結果では、塩析による粗精製物のゲル濾過精製物は、同じく粗精製物を更にアフィニティ精製に供した後の精製物とほぼ同様のバンドパターンであったにもかかわらず、大腸菌阻害活性を全く示さない結果が明らかとなった。このことは、種々の抗体の

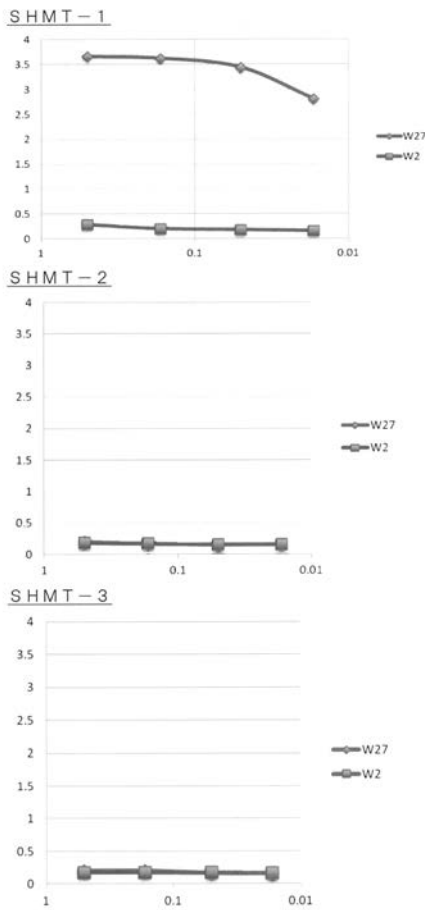
50

精製手段のなかでもアフィニティー精製を行うことが重要であることを示唆している。特に、本実施例にて用いた配列番号195番目のアミノ酸配列からなるペプチドが顕著に優れた大腸菌への生育阻害活性を発揮する抗体を精製することに有用であることを示した。

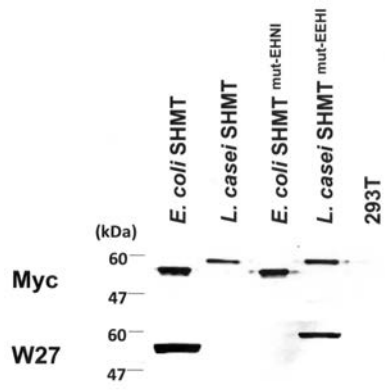
【図 4】



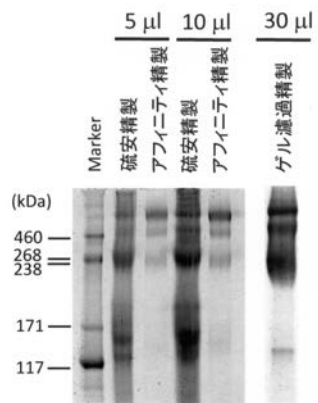
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

2017001987000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA10 BA61 CA01 DA06 EA04 GA01 GA11 HA03
HA08
4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 BA40 CA11 CA40 DA70 DA75 DA89
EA29 EA50 FA10 FA74 GA22 GA26