



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101952432 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 01

(21) 申请号 200980105137. 0

*C12N 11/00* (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 02. 12

*G01N 33/53* (2006. 01)

*G01N 33/543* (2006. 01)

(30) 优先权数据

2008-033135 2008. 02. 14 JP

2008-246068 2008. 09. 25 JP

(56) 对比文件

CN 1825117 A, 2006. 08. 30, 全文.

CN 101016340 A, 2007. 08. 15, 全文.

Yoichi KUMADA 等. Polystyrene

Koshinwasei Peptide o Mochiita

Tanpakushitsu Jinsoku Men'eki Sokuteiho no

Kaihatsu. 《Bioscience & Industry》. 2007, 第 65 卷 (第 9 期), 第 460-462 页.

Merchan, S.

S. 等. ED097222. 1. 《GenBank》. 2007, 第 1 页.

审查员 代月函

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 08. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2009/000555 2009. 02. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/101807 JA 2009. 08. 20

(73) 专利权人 国立大学法人京都工艺纤维大学

地址 日本京都府

专利权人 恩普乐股份有限公司

(72) 发明人 熊田阳一 岸本通雅 尻谷优希

滨崎今日子 大濑琢人 小池充烈

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

公司 11243

代理人 钟晶

(51) Int. Cl.

*C12N 15/09* (2006. 01)

*C07K 7/06* (2006. 01)

*C07K 17/02* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书26页

序列表17页 附图15页

(54) 发明名称

肽、该肽的用途和生产方法以及固定有该肽的固相和其生产方法

(57) 摘要

本发明提供一种包含可变区的肽,其能提高生产效率。该肽包含能形成抗原结合部位的可变区,在比重链的可变区靠近C末端一侧或比轻链的可变区靠近C末端一侧,具有对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列。

1. 一种肽,其特征在于,包含形成抗原结合部位的可变区,在至少包含可变区的重链的C末端或至少包含可变区的轻链的C末端,具有对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列,所述氨基酸序列为序列表中的序列号2至10所示的氨基酸序列中的任意一个序列。

2. 根据权利要求1所述的肽,其特征在于,所述氨基酸序列对经过亲水化处理的树脂表面的固相表现出特异性吸附功能。

3. 根据权利要求2所述的肽,其特征在于,所述树脂表面为亲水性的聚苯乙烯表面。

4. 一种肽,其特征在于,包含形成抗原结合部位的可变区,在至少包含可变区的重链的C末端和至少包含可变区的轻链的C末端的两者中,具有对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列的单链抗体(scFv)、多价单链抗体(sc(Fv)<sub>n</sub>)、恒定区融合型单链抗体(scFv-Fc)、Fab片段或F(ab')<sub>2</sub>片段,所述氨基酸序列为序列表中的序列号2至10所示的氨基酸序列中的任意一个序列。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的肽,其特征在于,所述氨基酸序列为免疫测定法中固定在固相上的肽。

6. 根据权利要求5所述的肽,其特征在于,所述免疫测定法为酶联免疫测定。

7. 一种固定有肽的经过亲水化处理的树脂表面的固相,其特征在于,所述经过亲水化处理的树脂表面的固相表面直接吸附有权利要求2所述的包含可变区的肽。

8. 一种基因,所述基因编码权利要求1所述的肽。

9. 一种基因,所述基因编码对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列,所述氨基酸序列为序列表中的序列号2至10所示氨基酸序列中任意一个序列。

10. 利用权利要求8或9所述的基因制得的载体。

11. 导入有权利要求8或9所述的基因的宿主。

12. 一种固定化酶,其特征在于,在原肽的C末端导入对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列,所述氨基酸序列为序列表中的序列号2至10所示氨基酸序列中的任意一个序列。

13. 一种肽标签,其特征在于,其对固相表现出特异性吸附功能,由序列表中的序列号2至10所示的氨基酸序列中任意一个序列构成。

## 肽、该肽的用途和生产方法以及固定有该肽的固相和其生产方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型肽、该肽的用途和生产方法,尤其涉及对亲水性的固相表现出特异性结合功能的肽、该肽的用途和生产方法。此外,本发明涉及能够用于使用固相化法检出或测定化合物的肽、和利用该肽检出或测定化合物的方法。此外,本发明涉及包含形成抗原结合部位的可变区的肽,涉及免疫球蛋白分子、以及包含可变区的单链抗体(scFv)、多价单链抗体(sc(Fv)<sub>n</sub>)、恒定区融合型单链抗体(scFv-Fc)、Fab片段或F(ab')<sub>2</sub>片段以及固定有这些肽的固相和该固相的生产方法。

### 背景技术

[0002] 抗体(免疫球蛋白)是与抗原特异性结合的蛋白质,是生物体内的体液免疫中的主角。图6的(a)为表示抗体(免疫球蛋白)基本结构的示意图。抗体分子61是2条分子量5万~7万的重链(H链)62和2条分子量2.3万的轻链(L链)63这4条链状多肽通过二硫键和非共价键结合而成的,整体呈Y字型。重链(H链)62由4或5个结构域构成,N末端侧配置有可变区(V<sub>H</sub>)的结构域,朝向C末端侧配置有3~4个恒定区(C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub>、C<sub>H4</sub>)的结构域。图6的(a)中,示出由4个结构域(V<sub>H</sub>、C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub>)构成的重链62。轻链(L链)63由2个结构域构成,N末端侧配置有可变区(V<sub>L</sub>)的结构域,C末端侧配置有恒定区(C<sub>L</sub>)的结构域。

[0003] 重链62和轻链63的可变区(V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>)被配置于N末端侧的2处,两者一体化,形成与抗原特异性结合的立体抗原结合部位。因此,抗体的特异性取决于重链和轻链的可变区(V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>)的氨基酸序列和组合,可变区(V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>)的氨基酸序列、组合根据所对应的抗原不同而不同。在各类型或亚型中,重链和轻链的恒定区(C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub>、C<sub>H4</sub>和C<sub>L</sub>)为几乎恒定的结构。

[0004] 抗体分子61被蛋白酶中的木瓜蛋白酶在重链的C<sub>H1</sub>和C<sub>H2</sub>结构域之间的铰链部64处分解,如图6的(b)所示,被分解为2个Fab片段65和一个Fc片段66。通过另一种蛋白酶胃蛋白酶分解抗体分子61时,如图6的(c)所示,能获得的是2个Fab片段65在铰链部64通过二硫键连接而成的结构即F(ab')<sub>2</sub>片段67。Fab片段65、F(ab')<sub>2</sub>片段67具有由重链和轻链的可变区(V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>)形成的抗原结合部位,因此,具有针对抗原的特异性,能够用于抗原抗体反应。

[0005] 进而,将重链的可变区(V<sub>H</sub>)和轻链的可变区(V<sub>L</sub>)通过连接肽69连接而成的结构即单链抗体(scFv)68,也能形成由重链和轻链的可变区(V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>)形成的立体抗原结合部位,因此,具有针对抗原的特异性,能够用于抗原抗体反应。图6的(d)是表示单链抗体(scFv)68的基本结构的示意图。图6的(d)中,重链的可变区(V<sub>H</sub>)的C末端通过链状的连接肽69而连接到轻链的可变区(V<sub>L</sub>)的N末端。

[0006] 由于抗原抗体反应中抗原和抗体的特异性强,如果抗原结合部位发生变化则对应的抗原也会变化,因此需要对100万种以上的重链和轻链的可变区(V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>)的组合进行基

基础性实验以验证其显示何种抗原抗体反应。此外,利用抗原和抗体的特异性强这一点,可将抗原抗体反应用于各种用途和领域中。

[0007] 一直以来,作为检出或测定微量物质的方法,已知有利用了抗原和抗体间的特异性亲和力的免疫测定法 (immunoassay)。免疫测定法由于抗原抗体反应的多样性而能够分析各种生物体成分,已被用于广阔的领域。进而,已知的是,为了提高免疫测定法的测定灵敏度而使用放射性化合物、荧光物质、酶等标记的各种方法,根据各自的标记而分别称为放射免疫测定法 (radioimmuno assay :RIA)、免疫荧光测定法 (fluorescence immunoassay :FIA)、酶免疫测定法 (ELISA :Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ;也称为酶联免疫测定) 等。尤其是,ELISA 灵敏度高且定量性优异,无需纯化和前处理这些复杂步骤,是一种通用性高的检出发法,因此被用于医疗诊断、环境激素和残留农药的定量、疯牛病 (BSE) 检查、蛋白质组解析等各种分析中。

[0008] 这些免疫测定法中的微量测定中,利用了如下的固相化法:利用物理吸附、化学结合而将抗原、抗体或酶等蛋白质固定在试管、微孔板 (microplate) 等固相上。固相通常使用疏水性的塑料。疏水性的固相由于能通过疏水性相互作用而牢固结合蛋白质,因此能够应用于多种蛋白质,从这点来看其是优异的。目前,疏水性的塑料多用疏水性的聚苯乙烯 (PS)。

[0009] 此外,任意一种免疫测定法中均需要多次进行吸附 / 反应处理和洗涤处理,至检出目标物质为止需要较长时间。在验证抗原抗体反应的实验中,通常也将抗体等固定在试管、微孔板等固相上进行实验,也利用了固相化法。

[0010] 例如,ELISA 大体分为直接吸附法、夹心法和竞争法,夹心法的 ELISA 的情况下,专利文献 1 公开了如下内容。第一,使针对目标物质的抗体结合在固相上,然后多次洗涤固相。第二,使固相上残留的未结合部位与不参与抗原抗体反应和酶反应的试剂 (以下称为“封闭剂”。) 结合而进行封闭,使得其它试剂不会结合在固相表面,然后多次洗涤固相。第三,使包含目标物质的试样和固相上所结合的抗体反应,然后多次洗涤固相。第四,使二抗和目标物质反应,然后多次洗涤固相。第五,使二抗和酶标记反应,然后多次洗涤固相。第六,使酶标记和底物反应,测定吸光度,检出试样中的目标物质或测定浓度 (参照专利文献 1 的段落 0039)。第四处理中用于反应的二抗如果使用的是经过酶标记后的抗体,则不需第五处理。

[0011] 专利文献 1 :日本特表 2002-526777 号公报

## 发明内容

[0012] 发明要解决的课题

[0013] 如上所述,重链和轻链的可变区 ( $V_H$  和  $V_L$ ) 的组合甚至存在 100 万种以上,为了验证抗原抗体反应,需要进行海量的实验。然而,抗体分子的分子量很大,为了生产抗体需要动物细胞,生产成本高。

[0014] 此外,验证实验、免疫测定法等固相化法中,通常使用疏水性的塑料,是一种利用疏水性相互作用的结合,因此无法对抗原、抗体或酶等蛋白质的何种部位与固相结合进行限定,与固相结合的部位会导致结构变化、失活。例如,酶中的 O-乙酰丝氨酸硫化氢解酶 A (O-acetyl serine sulphydryrase-A) 与疏水性聚苯乙烯结合的话,几乎完全失活。进而,

蛋白质和固相的这种无序结合会导致测定灵敏度降低,测定精度也变差。

[0015] 如图 6 所示,抗体分子 61 整体呈 Y 字形,在其上侧的 2 个 N 末端侧形成有由重链和轻链的可变区 ( $V_H$  和  $V_L$ ) 形成的立体抗原结合部位。固定抗体时,如果 C 末端侧垂直地接合在固相表面则抗原结合部位朝向外侧,且立体上为正常的配置,因此,能够进行抗原抗体反应。然而,如果 N 末端侧与固相结合的话,至少发生结合的 N 末端侧所配置的抗原结合部位无法与抗原反应。此外,在与固相结合时,抗原结合部位的立体结构发生变化,使得抗体变性,导致有时无法表现出抗原抗体反应。

[0016] Fab 片段 65、 $F(ab')_2$  片段 67 与抗体分子 61 相比分子量小,它们本身是能够用大肠杆菌、酵母等生产的,但抗原结合部位所占的比例高,因此无序地结合于固相表面的情况下,无法表现出抗原抗体反应的可能性很高。至于单链抗体 (scFv) 68,由于其基本仅由抗原结合部位构成,能够排除 Fc 区域、恒定区的影响,因此是一种优选的作为用于研究抗原抗体反应的抗体方面的物质形态,但对于固定是极不利的,即使以其本身的状态固定在疏水性的基板上也几乎不显示抗原抗体反应。

[0017] 此外,通过通常公知的克隆化技术制造的蛋白质,在分离、纯化从而回收制造物即目的蛋白质的工序中需要花费大量的时间和功夫。例如,使用大肠杆菌作为宿主的情况下,大肠杆菌内不仅存在目的蛋白,而且存在各种杂质。因此,培养大肠杆菌后,需要将大肠杆菌的菌体破碎并进行离心分离,从而获取菌体内可溶性组分,用柱对其纯化而回收目的蛋白质。

[0018] 此外,通过导入重组 DNA 而在宿主内大量表达异种基因的情况下,为了避免生成的蛋白质对宿主的不良影响,有时生成不溶且无活性的聚集物也就是包涵体 (inclusion body)。该包涵体 (inclusion body) 在通过离心分离而回收后,即使增溶也维持原状没有活性,因此,需要进行称为重折叠的操作,以使蛋白质活化、使蛋白质的折叠结构恢复正常状态。

[0019] 进而,如上所述,免疫测定法需要进行多次吸附 / 反应处理和洗涤处理,检出目标物质需要较长时间,期望开发出能在短时间内检出或测定微量物质的方法。

[0020] 本发明是为了解决上述课题和问题中的一个或几个而进行的,提供一种能用于抗原抗体反应的包含可变区的肽、固定有这些肽的固相和该固相的生产方法。此外,本发明目的在于提供:使生产效率提高的包含可变区的肽;即使进行固定也不易发生结构变化和失活的包含可变区的肽;能更好地维持被固定的蛋白质的结构、更好地保持活性且能够用于免疫测定法的包含可变区的肽;使测定灵敏度提高且具有稳定的测定精度并能够用于免疫测定法的包含可变区的肽,或能够用于与以前相比能够在短时间内检出或测定微量物质的方法的包含可变区的肽;以及固定有这些肽的固相和所述固相的生产方法。

[0021] 本说明书中还公开了新型的、有用的肽和该肽的用途。此外,本发明还公开了对亲水性的固相表现出特异性结合功能的肽和该肽的用途。进而,本发明还公开了能够用于使用固相化法检出或测定化合物的肽和该肽的用途。

[0022] 用于解决问题的手段

[0023] 为了达到前述目的,所述肽包含能形成抗原结合部位的可变区,在比重链的可变区靠近 C 末端一侧或比轻链的可变区靠近 C 末端一侧,具有对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列。此外,本发明的肽包含能形成抗原结合部位的可变区,在比重链的可变区靠

近 C 末端一侧或比轻链的可变区靠近 C 末端一侧,具有序列列表中的序列号 1 ~ 20 所示的氨基酸序列中的任意一个序列。进而,本发明的肽优选为单链抗体 (scFv)、多价单链抗体 (sc(Fv)<sub>n</sub>)、恒定区融合型单链抗体 (scFv-Fc)、Fab 片段或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

[0024] 本发明的肽中,优选前述氨基酸序列对亲水性的树脂表面表现出特异性吸附功能,前述树脂表面可以是亲水性的聚苯乙烯表面。

[0025] 进而,更优选的是,所述肽为前述重链和轻链这两者具有前述氨基酸序列的单链抗体 (scFv)、多价单链抗体 (sc(Fv)<sub>n</sub>)、恒定区融合型单链抗体 (scFv-Fc)、Fab 片段或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。本发明的肽具有用于连接前述重链可变区和前述轻链可变区的连接肽,在前述连接肽和前述可变区之间或在前述连接肽内具有前述氨基酸序列。

[0026] 此外,在本发明的得以纯化的肽的生产方法中,使包含具有对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列的肽和杂质的溶液接触前述固相表面,从而使前述肽直接吸附在前述固相表面,而将前述肽纯化。

[0027] 进而,在本发明的得以复性的肽的生产方法中,使包含具有对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列的变性的肽和变性剂的溶液接触前述固相表面,从而使前述肽直接吸附在前述固相表面,而使前述变性的肽复性。在此,前述变性的肽可以是包涵体。

[0028] 在上述肽的生产方法中,前述肽包含能形成抗原结合部位的可变区,在比重链的可变区靠近 C 末端一侧或比轻链的可变区靠近 C 末端一侧,可以具有前述氨基酸序列。此外,前述溶液可以包含生成了前述肽的宿主的破碎物、培养基或分泌物。并且,前述氨基酸序列可以使用序列列表中的序列号 1 ~ 20 所示的氨基酸序列。

[0029] 此外,本发明中,也可以将下述基因导入宿主中形成转化体,并使包含其生成物的溶液与前述固相表面接触,从而使前述肽直接吸附在前述固相表面,而生产固定有肽的固相,所述基因包含编码具有对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列的肽的碱基序列。在此,前述肽包含能形成抗原结合部位的可变区,在比重链的可变区靠近 C 末端一侧或比轻链的可变区靠近 C 末端一侧具有对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列,前述包含生成物的溶液可以包含前述宿主的破碎物,也可以包含前述宿主的培养基,还可以包含酵母分泌产生的分泌物。

[0030] 此外,本发明的对象也可以是包含编码下述肽的碱基序列的基因、利用该基因制得的载体或导入有该基因的宿主,所述肽包含能形成抗原结合部位的可变区,在比重链的可变区靠近 C 末端一侧或比轻链的可变区靠近 C 末端一侧,具有对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列。

[0031] 此外,本发明的肽优选为包含序列列表中的序列号 1 所示的氨基酸序列的肽。此外,也可以是固定在免疫测定法中的固相且包含序列列表中的序列号 1 所示的氨基酸序列的肽。这些序列号 1 所示的氨基酸序列也可以是序列列表中的序列号 2 ~ 10 所示的氨基酸序列。

[0032] 前述固相可以具有亲水性的树脂表面,前述固相可以具有亲水性的聚苯乙烯表面。前述免疫测定法可以是酶联免疫测定。

[0033] 此外,本发明还公开了:包含序列列表中的序列号 1 所示的氨基酸序列的固定化酶、包含编码序列列表中的序列号 1 所示的氨基酸序列的碱基序列的基因、利用该基因制得的载体或导入有该基因的宿主。并且,这些序列号 1 所示的氨基酸序列也可以是序列列表中的序列号 2 ~ 10 所示的氨基酸序列。

**[0034] 发明效果**

[0035] 本发明的肽对特定的固相表面显示出优异的结合性能,能够直接固定在特定的固相,因此,能够容易地分离、纯化本发明的肽。即,本发明的肽在生产之后,即使不进行充分的纯化,而仅使包含本发明的肽的溶液与特定的固相接触,就能使本发明的肽直接结合在固相,能够同时进行从溶液分离、纯化本发明的肽和将其固定在固相。其结果是,能够省去以前需要较长时间的分离、纯化工序(例如,使用亲和柱进行的纯化工序),能够大幅缩短本发明的肽从生产到固定在固相所需要的时间,因此,本发明的肽极大提高了生产效率。并且,在该过程中,生成的包涵体(inclusion body)状态的蛋白质、变性的蛋白质还能进行重折叠。

[0036] 此外,本发明的肽能够用于使用固相化法检出或测定化合物。尤其是,免疫测定法中,与以前相比,能通过特异性吸附功能而缩短测定时间,并且能以保持原肽活性的状态进行固定,能够提高测定灵敏度、获得稳定的测定精度。

**附图说明**

[0037] 图1是表示BSA存在下对亲水性的聚苯乙烯表面的固定率的图表;

[0038] 图2的(a)~(d)分别是表示Tween20的添加量为0、0.1、1、10%的条件下对亲水性的聚苯乙烯板的结合性能的图表;

[0039] 图3的(a)~(d)分别是表示Tween20的添加量为0、0.1、1、10%的条件下对疏水性聚苯乙烯板的结合性能的图表;

[0040] 图4的(a)~(f)是表示多种杂质存在下对亲水性的聚苯乙烯板和疏水性聚苯乙烯板的结合性能的图表;

[0041] 图5的(a)~(f)是表示多种杂质存在下对亲水性的聚苯乙烯板和疏水性聚苯乙烯板的活性值的图表;

[0042] 图6的(a)是表示抗体的基本结构的示意图,(b)是表示Fab片段和Fc片段的结构的示意图,(c)是表示F(ab')<sub>2</sub>片段的结构的示意图,(d)是表示单链抗体(scFv)的基本结构的示意图;

[0043] 图7是表示BSA存在下对亲水性的聚苯乙烯表面的固定率的图表;

[0044] 图8的(a)和(b)是表示多种杂质存在下对亲水性的聚苯乙烯板的活性值的图表;

[0045] 图9是表示BSA存在下对亲水性的聚苯乙烯表面的固定率的图表;

[0046] 图10的(a)和(b)是表示多种杂质存在下对亲水性的聚苯乙烯板的活性值的图表;

[0047] 图11的(a)和(b)分别是表示培养本发明的肽和原肽而得的菌落中的菌体浓度,(c)和(d)分别是表示本发明的肽和原肽的结合性能的图表;

[0048] 图12是表示添加各种培养基作为杂质的状态下对亲水性的聚苯乙烯表面的结合性能的图表;

[0049] 图13是表示将本发明的氨基酸序列导入单链抗体时的活性值的图表;

[0050] 图14是表示本发明的氨基酸序列在单链抗体中的导入位置和活性值间的关系的图表;

[0051] 图 15 是表示本发明的氨基酸序列在单链抗体中的导入位置和活性值间的关系的图表；

[0052] 图 16 是表示单链抗体的量和对亲水性的聚苯乙烯基板的活性值间的关系的图表；

[0053] 图 17 是表示未纯化的变性状态的本发明的肽对聚苯乙烯基板的结合性能和活性值的图表。

### 具体实施方式

[0054] 下面详细说明本发明。本发明的肽具有对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列（以下称为“本发明的氨基酸序列”）。本发明的氨基酸序列为例如列表中的序列号 1～20 所示的氨基酸序列（以下，分别称为“本发明的氨基酸序列 1”～“本发明的氨基酸序列 20”）。将具有本发明的氨基酸序列的肽称为“本发明的肽”。

[0055] 本发明的氨基酸序列对特定的固相（例如，具有亲水性的树脂表面的固相）表现出特异性吸附功能，因此本发明的肽对特定的固相表面显示出优异的结合性能，能够直接固定在特定的固相，因此能够容易地分离、纯化本发明的肽。即，本发明的肽在生产之后，即使不进行充分的纯化，而仅使包含本发明的肽的溶液与特定的固相接触，就能使本发明的肽直接结合在固相，能够同时进行从溶液分离、纯化本发明的肽和将其固定在固相的工序。其结果是，能够省去以前需要较长时间的分离、纯化工序（例如，使用亲和柱进行的纯化工序），能够大幅缩短本发明的肽从生产到固定在固相所需要的时间，因此，本发明的肽极大提高了生产效率。并且，在该过程中，生成的包涵体 (inclusion body) 状态的蛋白质、变性的蛋白质还能进行重折叠。

[0056] 此外，本发明的肽还能够用于使用固相化法检出或测定化合物。对化合物的检出或测定中所利用的抗原、抗体或酶导入本发明的氨基酸序列，从而能够将抗原、抗体或酶直接固定在特定的固相，能够进行化合物的检出或测定。尤其是，本发明的肽优选用于利用免疫测定法进行的微量物质的检出或测定中。进而，本发明的肽即使在杂质存在下也能特异性地且本发明的氨基酸序列的导入位置优先直接结合在特定的固相上，因此能够在控制取向和结构的状态下固定在特定的固相上，因此与以前相比，能够在保持原肽活性的状态下进行固定，能够提高测定灵敏度，获得稳定的测定精度。

[0057] 例如，应用于夹心法 ELISA 时，对与目标物质显示特异性抗原抗体反应的抗体导入本发明的氨基酸序列的肽，准备作为本发明的肽的抗体。第一，将该抗体直接络合在特定的固相后，多次洗涤固相。第二，使固相上残留的未结合部位与封闭剂结合进行封闭后，多次洗涤固相。第三，使包含目标物质的试样与固相上所结合的作为本发明的肽的抗体反应后，多次洗涤固相。第四，使并非作为本发明的肽的二抗与目标物质反应后，多次洗涤固相。第五，使二抗与酶标记反应后，多次洗涤固相。第六，使酶标记与底物反应，测定吸光度来检出试样中的目标物质或测定其浓度。

[0058] 这样，利用本发明的肽通过免疫测定法能够进行化合物的检出或测定。若作为第四处理中反应的二抗使用经酶标记过的抗体，则不需要第五处理。此外，本发明的肽即使在封闭剂存在下也能特异性结合，因此上述第一处理中，通过使特定的固相与作为本发明的肽的抗体和封闭剂同时结合，能够省略第二处理，能够缩短化合物的检出或测定时间。

[0059] 进而,最初在溶液中使作为本发明的肽的抗体与目标物质进行抗原抗体反应形成免疫复合物后,将免疫复合物固定在特定的固相上,从而能够实现一种化合物的检出或测定的新方法,其能够显著缩短化合物的检出或测定时间。即,能够通过一次处理来实现上述夹心法中的第一处理和第三处理。若溶液中还预先添加了封闭剂,则能够通过一次处理来实现上述第一、第二和第三处理。更优选的是,在作为本发明的肽的抗体和目标物质形成免疫复合物之后,在溶液中再与酶标记过的二抗进行抗原抗体反应,以形成更大的免疫复合物,将其固定在特定的固相上,则能够通过一次处理来实现上述第一~第五处理。

[0060] 本发明的肽即使在杂质存在下也能特异性地且能在控制取向和结构的状态下直接固定在特定的固相上,因此,即使存在封闭剂、即使为免疫复合物的状态,也能将免疫复合物固定,进行目标物质的检出或测定。加之,在溶液中不存在空间位阻,能极迅速地进行抗原抗体反应,因此与以前的固定状态下的抗原抗体反应相比,能极大增加反应速度、提高测定灵敏度,能获得稳定的测定精度。

[0061] 此外,本发明的肽的其它用途是,使用酶作为本发明的肽的话,能够以亲水性的树脂表面的固定化酶形式加以利用。通常,酶为水溶性的,因此利用时是一次性的,但通过将酶结合在固相而将其固定则能够与水溶性的反应产物分离,能够连续且反复地进行反应。

[0062] 如序列表中的序列号 1 所示,本发明的氨基酸序列 1 的序列如下:从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RXXXRRXRR(R:精氨酸,X:异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、缬氨酸(V)、丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、甲硫氨酸(M)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T)中的一个或多个的组合)。因此,本发明的氨基酸序列 1 中至少包括本发明的氨基酸序列 2~10。

[0063] 本发明的氨基酸序列 2 是本发明的氨基酸序列 1 中的 X 全部为异亮氨酸(I)的序列,是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RIIIRRIIR(R:精氨酸、I:异亮氨酸)的序列。本发明的氨基酸序列 3 是本发明的氨基酸序列 1 中的 X 为丙氨酸(A)和异亮氨酸(I)的组合的序列,是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RAIARRIR(R:精氨酸、A:丙氨酸、I:异亮氨酸)的序列。本发明的氨基酸序列 4 是本发明的氨基酸序列 1 中的 X 全部为亮氨酸(L)的序列,是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RLLLRRLR(R:精氨酸、L:亮氨酸)的序列。本发明的氨基酸序列 5 是本发明的氨基酸序列 1 中的 X 全部为缬氨酸(V)的序列,是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RVVVRVRR(R:精氨酸、V:缬氨酸)的序列。本发明的氨基酸序列 6 是本发明的氨基酸序列 1 中的 X 全部为丙氨酸(A)的序列,是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RAAARRARR(R:精氨酸、A:丙氨酸)的序列。本发明的氨基酸序列 7 是本发明的氨基酸序列 1 中的 X 全部为甘氨酸(G)的序列,是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RGGRRGR(R:精氨酸、G:甘氨酸)的序列。

[0064] 如后述的实施例 1~6 所示,能够确认的是,具有本发明的氨基酸序列 2~7 的肽均对特定的固相表面表现出特异性吸附功能。本发明的氨基酸序列 2~7 均为:精氨酸(R)的配置为从 N 末端侧起第 1、5、6、8、9 位,这是共通的,配置于其间的氨基酸(本发明的氨基酸序列 1 中的 X)发生改变。本发明的氨基酸序列 2、4~7 配置了单一的氨基酸,本发明的氨基酸序列 3 则组合配置了丙氨酸(A)和异亮氨酸(I)。这些全部都显示了共通的性质,因此,可预测出,通过使本发明的氨基酸序列 1 中的 X 为异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、缬氨酸(V)、丙氨酸(A)或甘氨酸(G)中的一个或组合,能够使其对特定的固相表面表现出特异性吸附功能。

[0065] 进而,本发明的氨基酸序列 8 是本发明的氨基酸序列 1 中的 X 全部为甲硫氨酸 (M) 的序列,是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RMMMRRMRR (R:精氨酸、M:甲硫氨酸) 的序列。本发明的氨基酸序列 9 是本发明的氨基酸序列 1 中的 X 全部为丝氨酸 (S) 的序列,是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RSSRRRSRR (R:精氨酸、S:丝氨酸) 的序列。本发明的氨基酸序列 10 是本发明的氨基酸序列 1 中的 X 全部为苏氨酸 (T) 的序列,是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RTTTRRTRR (R:精氨酸、T:苏氨酸) 的序列。

[0066] 如后述的实施例 7~9 所示,能够确认的是,具有本发明的氨基酸序列 8~10 的肽均对特定的固相表面表现出特异性吸附功能。甲硫氨酸 (M)、丝氨酸 (S) 或苏氨酸 (T) 是在氨基酸 (R-CH(NH<sub>2</sub>)-COOH) 的 R 基中包含硫、羟基 (OH) 的氨基酸,但在部分具有链状饱和烃、为中性氨基酸这点上,与 R 基由链状的饱和烃构成的异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、缬氨酸 (V) 和丙氨酸 (A) 是共通的。此外,甲硫氨酸 (M)、丝氨酸 (S) 和苏氨酸 (T) 是在 R 基中不含环状结构、芳香族化合物且在立体结构方面体积较小的氨基酸,这一点上是共通的。因此,可以预测出,选择甲硫氨酸 (M)、丝氨酸 (S) 或苏氨酸 (T) 作为本发明的氨基酸序列 1 中的 X 能够获得同样的效果。

[0067] 进而,如列表中的序列号 11 所示,本发明的氨基酸序列 11 是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 KGLRGWREMISL (赖氨酸 (K)、甘氨酸 (G)、亮氨酸 (L)、精氨酸 (R)、甘氨酸 (G)、色氨酸 (W)、精氨酸 (R)、谷氨酸 (E)、甲硫氨酸 (M)、异亮氨酸 (I)、丝氨酸 (S)、亮氨酸 (L)) 的序列。

[0068] 如列表中的序列号 12 所示,本发明的氨基酸序列 12 是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 ADYLSRWGSIRN (丙氨酸 (A)、天冬氨酸 (D)、酪氨酸 (Y)、亮氨酸 (L)、丝氨酸 (S)、精氨酸 (R)、色氨酸 (W)、甘氨酸 (G)、丝氨酸 (S)、异亮氨酸 (I)、精氨酸 (R)、天冬酰胺 (N)) 的序列。

[0069] 如列表中的序列号 13 所示,本发明的氨基酸序列 13 是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 SRVHRAVLNGVS (丝氨酸 (S)、精氨酸 (R)、缬氨酸 (V)、组氨酸 (H)、精氨酸 (R)、丙氨酸 (A)、缬氨酸 (V)、亮氨酸 (L)、天冬酰胺 (N)、甘氨酸 (G)、缬氨酸 (V)、丝氨酸 (S)) 的序列。

[0070] 如列表中的序列号 14 所示,本发明的氨基酸序列 14 是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RPPGVVRRYALG (精氨酸 (R)、脯氨酸 (P)、脯氨酸 (P)、甘氨酸 (G)、缬氨酸 (V)、缬氨酸 (V)、精氨酸 (R)、精氨酸 (R)、酪氨酸 (Y)、丙氨酸 (A)、亮氨酸 (L)、甘氨酸 (G)) 的序列。

[0071] 如列表中的序列号 15 所示,本发明的氨基酸序列 15 是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 VRSWEEQARVTT (缬氨酸 (V)、精氨酸 (R)、丝氨酸 (S)、色氨酸 (W)、谷氨酸 (E)、谷氨酸 (E)、谷氨酰胺 (Q)、丙氨酸 (A)、精氨酸 (R)、缬氨酸 (V)、苏氨酸 (T)、苏氨酸 (T)) 的序列。

[0072] 如列表中的序列号 16 所示,本发明的氨基酸序列 16 是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RAFIASRRIKRP (精氨酸 (R)、丙氨酸 (A)、苯丙氨酸 (F)、异亮氨酸 (I)、丙氨酸 (A)、丝氨酸 (S)、精氨酸 (R)、精氨酸 (R)、异亮氨酸 (I)、赖氨酸 (K)、精氨酸 (R)、脯氨酸 (P)) 的序列。

[0073] 如列表中的序列号 17 所示,本发明的氨基酸序列 17 是从 N 末端侧起向着 C 末

端侧依次为 RESTLKGTSRAV(精氨酸(R)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、甘氨酸(G)、苏氨酸(T)、丝氨酸(S)、精氨酸(R)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V))的序列。

[0074] 如序列表中的序列号 18 所示,本发明的氨基酸序列 18 是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 AGLRLKKAIIHR(丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、精氨酸(R)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、赖氨酸(K)、丙氨酸(A)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、组氨酸(H)、精氨酸(R))的序列。

[0075] 如序列表中的序列号 19 所示,本发明的氨基酸序列 19 是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 SLLRAVPEPTG(丝氨酸(S)、丝氨酸(S)、亮氨酸(L)、亮氨酸(L)、精氨酸(R)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、脯氨酸(P)、苏氨酸(T)、甘氨酸(G))的序列。

[0076] 如序列表中的序列号 20 所示,本发明的氨基酸序列 20 是从 N 末端侧起向着 C 末端侧依次为 RAFIASRRIRRP(精氨酸(R)、丙氨酸(A)、苯丙氨酸(F)、异亮氨酸(I)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、精氨酸(R)、精氨酸(R)、异亮氨酸(I)、精氨酸(R)、精氨酸(R)、脯氨酸(P))的序列。

[0077] 本发明的氨基酸序列 1~20 对特定的固相能表现出特异性吸附功能。在目前能够确认的范围内,特定的固相是指具有亲水性的树脂表面的固相。即,与原肽相比,本发明的肽对亲水性的树脂表面的结合性能得到提高。尤其是,本发明的肽对亲水性的聚苯乙烯表面显示出优异的结合性能。结合性能是与和其竞争的杂质相比优先结合的性能,可通过在与其竞争的杂质例如其它肽、高分子化合物、表面活性剂等存在下,比较与固相结合的本发明的肽的量来进行评价。

[0078] 具有亲水性的树脂表面的固相可使用对聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚丙烯、聚乙烯、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)等塑料树脂表面进行改性而实现亲水化处理的固相。通常,所制造的塑料树脂表面为疏水性,但通过对该表面进行各种亲水化处理,能够制得具有亲水性的树脂表面的固相。例如,可通过对聚苯乙烯表面进行 UV+O<sub>3</sub> 处理、等离子体氧化处理,来准备具有亲水性的聚苯乙烯表面的固相。

[0079] 固相的形态既可以为板状(包括容器、孔的壁面和底面)也可以为粒状。如日本特开 2007-279018 号公报所述,如果在微孔板的流体处理部(各孔)内填充表面经亲水化处理过的粒状塑料基板,则通过仅向孔内注入包含本发明的肽的溶液,即能将本发明的肽固定在粒状塑料基板表面。

[0080] 本说明书中,“肽”是指 2 个以上氨基酸通过肽键连接而成的物质,包括寡肽、多肽、蛋白质、同聚肽和杂聚肽。此外,本发明的肽有时在电场下呈中性的形态、或呈成盐的形态,其可以是:仅由序列表中的本发明的氨基酸序列构成的形态,将本发明的肽融合到特定蛋白质的末端部或内部而成的融合蛋白形态,添加有糖、聚乙二醇、NCS 基(isothiocyanate, 异硫氰酸酯)、NHS 基(N-Hydroxy succinimide ester, N-羟基琥珀酰亚胺酯)、马来酰亚胺基、硫醇基、生物素、荧光染料等而获得的复合体形态,以及将肽乙酰化、酰胺化和/或通过多官能试验进行交联聚合而得的衍生物或聚合物形态。

[0081] 序列表中的序列号 21 所示的碱基序列是编码本发明的氨基酸序列 2 的碱基序列的一例。即,其为包含从 5' 末端侧起向着 3' 末端侧依次为 cgt atc atc atc cga agg att

cga cga(a:腺嘌呤、g:鸟嘌呤、c:胞嘧啶、t:胸腺嘧啶)的碱基序列的DNA。序列号22所示的碱基序列是编码本发明的氨基酸序列3的碱基序列的一例。即,其为包含从5'末端侧起向着3'末端侧依次为cgt gcg att gcg cga agg att cga cga(a:腺嘌呤、g:鸟嘌呤、c:胞嘧啶、t:胸腺嘧啶)的碱基序列的DNA。编码本发明的氨基酸序列2或3的碱基序列并非限定于序列号21或22所示的碱基序列,此外也可以采用与本发明的氨基酸序列2或3的各氨基酸对应的各密码子的序列。可通过利用噬菌体、质粒等载体,使包含编码本发明的氨基酸序列的碱基序列的基因在宿主内表达,或通过向宿主的基因组DNA中导入包含编码本发明的氨基酸序列的碱基序列的基因,使其在宿主内表达,从而能够生物合成本发明的肽。

[0082] 本发明的肽能够利用各种蛋白质,能够用于多种抗原、抗体、凝集素、酶或受体蛋白质等中。例如,能够用于:谷胱甘肽S-转移酶(GST:GlutathioneS-Transferase)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、碱性磷酸酶(ALP)、过氧化物酶(POD)、荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -Gal)、胰蛋白酶、糜蛋白酶、凝血酶、Factor Xa、血管紧张肽素转化酶、酪氨酸激酶、胰岛素受体、EGF受体、链霉亲和素(SA)、单克隆抗体(Mab)、多克隆抗体(Pab)、单链抗体(scFv)、多价单链抗体( $sc(Fv)_n$ ) (例如,双价单链抗体( $sc(Fv)_2$ ))、恒定区融合型单链抗体(scFv-Fc)、Fab片段以及 $F(ab')_2$ 片段(包含抗原结合部位的抗体片段)、补体系统蛋白C1q、伴刀豆球蛋白A(ConA)、扁小扁豆凝集素(LCA)、抗体结合蛋白质(Protein A、ZZ、Protein G、Protein L等)等。本说明书中,为了与本发明的肽进行比较,以下将从本发明的肽中除去本发明的氨基酸序列的肽(包括导入本发明的氨基酸序列前的肽在内)称为“原肽”。

[0083] 当本发明的肽为包含能形成抗原结合部位的可变区的肽时,还包括抗体分子自身,优选为能够通过大肠杆菌、酵母生产的单链抗体(scFv)、多价单链抗体( $sc(Fv)_n$ )、恒定区融合型单链抗体(scFv-Fc)、Fab片段、 $F(ab')_2$ 片段。多价单链抗体( $sc(Fv)_n$ )是通过连接肽将多个单链抗体(scFv)连接而成的抗体,是分子内具有多个抗原结合部位(重链可变区( $V_H$ )和轻链可变区( $V_L$ )结构域)的肽的总称。多个抗原结合部位可以相同也可以不同。 $2$ 价单链抗体( $sc(Fv)_2$ )是将2个单链抗体(scFv)用连接肽连接而成的抗体。恒定区融合型单链抗体(scFv-Fc)是单链抗体(scFv)的C末端侧具有Fc结构域的融合蛋白质的总称。Fab片段是指:将抗体分子用木瓜蛋白酶消化而得的片段中,由 $V_L$ 、 $C_L$ 构成的轻链和由 $V_H$ 、 $C_H1$ 结构域构成的重链缔合而成的部分,但也可通过基因重组技术制作。 $F(ab')_2$ 片段是指抗体分子被胃蛋白酶消化后获得的片段中的一个,是2分子的Fab通过铰链部的二硫键连接而成的,但也可通过基因重组技术制作。

[0084] 本发明的肽中,本发明的氨基酸序列的导入部位为不妨碍原肽原本具有的生理活性的部位,例如,为抗原时,导入部位为抗原决定簇以外的部位,为抗体时,导入部位为起到抗体活性的部位的以外的部位。尤其是,为了以维持原肽的立体结构的状态固定在固相,优选在原肽的C末端或N末端附近的部位导入本发明的氨基酸序列。本发明的肽中,除了本发明的氨基酸序列以外,还可另外导入标记用的亲和标签等。

[0085] 尤其是,在本发明的肽为包含能形成抗原结合部位的可变区的肽时,在比重链的可变区靠近C末端一侧或比轻链的可变区靠近C末端一侧(包括两者)导入本发明的氨基酸序列。比可变区靠近C末端一侧是指从重链或轻链可变区中的C末端起直至本发明的肽整体的C末端为止的位置,指不妨碍可变区的结合抗原的全部位置。

[0086] 在为抗体分子的情况下（参照图 6 的 (a)），优选在下述位置中的一处或多处进行导入：位于比重链（H 链）62 的可变区（ $V_H$ ）靠近 C 末端一侧的恒定区（ $C_H1$ 、 $C_H2$ 、 $C_H3$ 、 $C_H4$ ）的结构域中的 N 末端、C 末端，轻链（L 链）63 的恒定区（ $C_L$ ）的结构域中的 N 末端、C 末端；尤其优选在下述位置中的一处或多处进行导入：重链 62 的 Fc 区域的恒定区（ $C_H2$ 、 $C_H3$ 、 $C_H4$ ）的结构域中的 N 末端、C 末端、轻链 63 的 C 末端。

[0087] 在为 Fab 片段或  $F(ab')_2$  片段的情况下（参照图 6 的 (b) 和 (c)），优选在下述位置中的一处或多处进行导入：重链 62 或轻链 63 的可变区的结构域（ $V_H$  和  $V_L$ ）中的 C 末端、恒定区（ $C_H1$  和  $C_L$ ）的域中的 N 末端、C 末端，尤其优选在下述位置中的一处或多处进行导入：重链 62 的 C 末端或轻链 63 的 C 末端。

[0088] 此外，在为例如单链抗体（scFv）、多价单链抗体（ $(sc(Fv))_n$ ）、恒定区融合型单链抗体（scFv-Fc）这类具有用于连接重链和轻链的连接肽的情况下，可以将本发明的氨基酸序列导入到连接肽和重链或轻链之间、或连接肽内部。在此，连接肽连接重链或轻链中一者的 C 末端以及另一者的 N 末端，重链或轻链的 C 末端侧包括了连接肽整体、即从与重链或轻链的 C 末端相连的部分起至另一者的 N 末端为止的区域。也可以在连接肽和重链或轻链之间、或连接肽内部另外导入本发明的氨基酸序列外的标记用亲和标签等。在为图 6 的 (d) 的单链抗体（scFv）的情况下，在轻链的可变区（ $V_L$ ）的 C 末端侧或从重链的可变区（ $V_H$ ）的 C 末端起直至包含连接肽 69 的内部的轻链的可变区（ $V_L$ ）的 N 末端为止之间一者或两者中导入本发明的氨基酸序列。

[0089] 通过在多个位置导入本发明的氨基酸序列，能够进一步将本发明的肽的立体结构维持在正常状态。例如，在 Fab 片段或  $F(ab')_2$  片段的重链和轻链的 C 末端侧分别导入本发明的氨基酸序列，或者在单链抗体（scFv）的重链和轻链的 C 末端侧分别导入本发明的氨基酸序列，则由于该部位容易与固相表面结合，因此抗原结合部位朝向外侧，容易进行抗原抗体反应。

[0090] 本发明的肽可通过公知的克隆技术、化学合成法制造。例如，利用克隆技术的话，制备编码本发明的氨基酸序列的 DNA，将其插入到能自主复制的载体中获得重组 DNA，将其导入大肠杆菌、枯草杆菌、放线菌、酵母、糸状菌（filamentous bacterium）、植物细胞、昆虫细胞、动物细胞等合适的宿主中获得转化体，从其培养物能获得包含本发明的氨基酸序列的肽。此外，还可以制备编码本发明的氨基酸序列的 DNA，使用小麦胚芽、大肠杆菌细胞提取液等，通过无细胞蛋白质合成体系合成本发明的肽。此外，利用“固相法”或“液相法”等常用的肽化学合成法，依次使本发明的氨基酸序列所示的氨基酸脱水缩合、延伸，能够合成由本发明的氨基酸序列构成的本发明的肽。进而，使该由本发明的氨基酸序列构成的本发明的肽连接到期望的原肽上，从而可合成包含本发明的氨基酸序列的更大分子的本发明的肽。

[0091] 本发明的肽由于具有本发明的氨基酸序列，因此，通过使来自转化体的包含生成物的溶液与固相表面接触，能够使本发明的肽直接吸附在固相表面而进行分离纯化。包含生成物的溶液是指包含作为目标的本发明的肽且还存在来源于宿主的多余的杂质的整个溶液，包括例如破碎菌体液、将破碎菌体液离心分离而得的可溶性组分、对将破碎菌体液离心分离而得的不溶性组分进行增溶后的溶液、细胞膜组分、细胞壁组分、细胞分泌产生的分泌物、体液、或这些的不完全纯化物等。

[0092] 进而,通过导入重组 DNA 而在宿主内大量表达异种基因时,为了避免生成的蛋白质对宿主产生不良影响,有时生成不溶且无活性的聚集物也就是包涵体 (inclusion body),本发明的肽即使被生成成为包涵体 (inclusion body) 形式,也能够通过变性剂对包涵体 (inclusion body) 增溶后直接固定在固相表面,并且,通过在被固定的状态下除去变性剂,有时本发明的肽还能进行重折叠。

[0093] 此外,不仅是包涵体,其它任何原因导致的立体结构变性的情况下,只要是本发明的肽,都能直接固定在固相表面,并且,在固定的状态下加入适当的重折叠缓冲液,从而有时能将本发明的肽重折叠。变性的原因包括加热、冷冻、高压、超声波、紫外线、X 射线、搅拌、吸附、稀释等物理原因,以及极端的酸性或碱性、有机溶剂、重金属盐、变性剂、表面活性剂等化学原因。

[0094] 如上所述,本发明的氨基酸序列 1 ~ 20 对亲水性的树脂表面显示优异的结合性能,因此,具有本发明的氨基酸序列 1 ~ 20 的本发明的肽能够直接固定在具有亲水性的树脂表面的固相,因此能容易地进行分离、纯化。即,使包含具有本发明的氨基酸序列 1 ~ 20 的本发明的肽的溶液,通过填充了具有亲水性的树脂表面的固相的柱,从而能够使具有本发明的氨基酸序列 1 ~ 20 的本发明的肽直接结合于固相,能够将其从溶液分离、纯化。

[0095] 以下通过实施例更具体地说明本发明,但本发明只要不超出其主旨特定即可,并不受这些实施例的限定。实施例 1 ~ 19 是将本发明的氨基酸序列导入到谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 中的例子,实施例 20 是将本发明的氨基酸序列导入到抗体中的例子,实施例 21 ~ 28 是将本发明的氨基酸序列导入到单链抗体中的例子。在以下实施例中,本发明的肽的浓度如下求得:使用来自牛血清的白蛋白 (BSA) 作为标准蛋白通过 Lowry 法进行定量。

[0096] [ 实施例 1 ] ( 具有本发明的氨基酸序列 2 的 GST 的生物合成 )

[0097] 首先,在重组有编码谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 的基因的质粒 (GE Healthcare Biosciences 有限公司制造的“pGEX-3X”、数据库登录号:U13852) 中的限制酶 BamHI 识别的碱基序列部位和限制酶 EcoRI 识别的碱基序列部位之间,导入编码本发明的氨基酸序列 2 的基因 ( 序列表的序列号 21 所示的碱基序列 ), 将其作为载体。

[0098] 接着,使用大肠杆菌 (BL21) 作为宿主,将导入了编码本发明的氨基酸序列 2 的基因的载体导入宿主,对宿主进行转化,在包含氨苄青霉素的琼脂培养基上进行筛选。然后,在 50ml 2xYT 培养基中培养大肠杆菌,加入作为诱导表达物质的异丙基-β-D- 硫代半乳糖苷 (IPTG :Isopropyl-1-thio-β -D(-)-galactoside) 使终浓度达到 0.1mM, 表达包含本发明的氨基酸序列 2 的 GST ( 本发明的肽 )。

[0099] 然后,破碎菌体后,用纯化用凝胶 (GSH-Sepharose 6B) 来纯化菌体内可溶性组分,在磷酸缓冲生理盐水 (PBS :Phosphate Buffered Saline) 中透析 1 夜,通过灭菌过滤器除去聚集物。这样,生物合成了作为本发明的肽的 C 末端导入有本发明的氨基酸序列 2 的谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST)。下面,将实施例 1 中生物合成的具有本发明的氨基酸序列 2 的 GST 称为本发明的肽 1。

[0100] [ 实施例 2 ] ( 具有本发明的氨基酸序列 3 的 GST 的生物合成 )

[0101] 在质粒“pGEX-3X”的限制酶 BamHI 识别的碱基序列部位和限制酶 EcoRI 识别的碱基序列部位之间,导入编码本发明的氨基酸序列 3 的基因 ( 序列表的序列号 22 所示的碱基序列 ), 除此以外,与实施例 1 同样处理,生物合成了作为本发明的肽的在 C 末端导入有本发

明的氨基酸序列 3 的谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST)。下面, 将实施例 2 中生物合成的具有本发明的氨基酸序列 3 的 GST 称为本发明的肽 2。

[0102] [ 实施例 3 ~ 6 ] ( 具有本发明的氨基酸序列 4 ~ 7 的 GST 的生物合成 )

[0103] 在质粒“pGEX-3X”的限制酶 BamHI 识别的碱基序列部位和限制酶 EcoRI 识别的碱基序列部位之间, 导入编码本发明的氨基酸序列 4 ~ 7 的基因, 除此以外, 与实施例 1 同样处理, 分别生物合成了作为本发明的肽的在 C 末端导入有本发明的氨基酸序列 4 ~ 7 的谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST)。实施例 3 中生物合成了具有本发明的氨基酸序列 4 的 GST, 实施例 4 中生物合成了具有本发明的氨基酸序列 5 的 GST, 实施例 5 中生物合成了具有本发明的氨基酸序列 6 的 GST, 实施例 6 中生物合成了具有本发明的氨基酸序列 7 的 GST。下面, 将实施例 3 ~ 6 中生物合成的具有本发明的氨基酸序列 4 ~ 7 的 GST 分别称为本发明的肽 3 ~ 6。

[0104] [ 实施例 7 ~ 9 ] ( 具有本发明的氨基酸序列 8 ~ 10 的 GST 的生物合成 )

[0105] 在质粒“pGEX-3X”的限制酶 BamHI 识别的碱基序列部位和限制酶 EcoRI 识别的碱基序列部位之间, 导入编码本发明的氨基酸序列 8 ~ 10 的基因, 除此以外, 与实施例 1 同样处理, 分别生物合成了作为本发明的肽的在 C 末端导入有本发明的氨基酸序列 8 ~ 10 的谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST)。实施例 7 中生物合成了具有本发明的氨基酸序列 8 的 GST, 实施例 8 中生物合成了具有本发明的氨基酸序列 9 的 GST, 实施例 9 中生物合成了具有本发明的氨基酸序列 10 的 GST。下面, 将实施例 7 ~ 9 中生物合成的具有本发明的氨基酸序列 8 ~ 10 的 GST 分别称为本发明的肽 7 ~ 9。

[0106] [ 实施例 10 ] ( 本发明的肽 1 和 2 对亲水性的聚苯乙烯表面的结合性能的评价, 杂质 :BSA)

[0107] 为评价本发明的肽对亲水性的聚苯乙烯表面的结合性能, 在作为杂质的来自牛血清的白蛋白 (BSA) 存在的状态下, 测定实施例 1 的本发明的肽 1、实施例 2 的本发明的肽 2 和原肽即 GST 对亲水性的聚苯乙烯表面的固定率。

[0108] 首先, 准备未添加 BSA 的 PBS 和 BSA 浓度为 0.003 ~ 50mg/ml 的 PBS, 在各溶液中添加本发明的肽 1, 使其终浓度达到 5  $\mu$ g/ml, 从而制备试样。接着, 将 100  $\mu$ l 的各试样加入到亲水性的聚苯乙烯板 (AGC Techno Glass 株式会社制造的“IWAKI 微孔板 #3860-096”) 中, 在室温下孵育 1 小时, 将本发明的肽 1 固定, 用包含 0.1% 的 Tween20 的 PBS (以下称为“0.1PBST”) 洗涤 5 次。进而, 加入 300  $\mu$ l 包含 2% BSA 的 0.1PBST 作为封闭剂, 在室温下孵育 1 小时, 封闭聚苯乙烯板表面的未结合部位, 用 0.1PBST 洗涤 5 次。然后, 加入 100  $\mu$ l 用包含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 4000 倍的抗 GST 抗体作为抗体, 在室温下孵育 1 小时, 使本发明的肽 1 中所含的 GST 和抗 GST 抗体进行抗原抗体反应, 用 0.1PBST 洗涤 5 次。然后, 加入 100  $\mu$ l 用包含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 1000 倍的 HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (HRP 标记的抗兔 IgG 抗体) 作为酶标记的二抗, 在室温下孵育 1 小时, 再次使其进行抗原抗体反应, 用 0.1PBST 洗涤 5 次。最后加入 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)) 作为显色底物, 孵育, 使用酶标仪 (TECAN 制“SUNRISE Remote”), 测定 405nm 下的吸光度。对本发明的肽 2 和 GST 进行同样的处理并测定吸光度。

[0109] 图 1 表示的是实施例 10 的测定结果。图 1 中的黑色圆点 (●) 为本发明的肽 1

的结果,黑色三角为本发明的肽 2 的结果,白色圆圈(○)是原肽 GST 的结果。在图 1 中,纵轴为固定率(%),横轴为 BSA 浓度,固定率是以未添加 BSA 的 PBS 的吸光度(结合的量)为基准(100%)而将其它吸光度标准化获得的。

[0110] 由图 1 能够确认,原肽 GST 在杂质 BSA 存在时,固定率急剧降低,结合量也减少,而本发明的肽 1 和 2 即使存在 10mg/ml 这样高浓度的 BSA,固定率也几乎不变,可确认其特异性地与亲水性的聚苯乙烯板结合。

[0111] [实施例 11](本发明的肽 1 对亲水性的聚苯乙烯表面的结合性能评价,杂质:BSA 和 Tween20)

[0112] 为更详细地评价实施例 1 的本发明的肽 1 的结合性能,在杂质 Tween20 存在的状态下,测定对疏水性的聚苯乙烯表面和亲水性的聚苯乙烯表面的结合量(吸光度)。

[0113] 首先,准备未添加 Tween20 的 PBS 和 Tween20 浓度为 0.1、1、10% 的 PBS,向各溶液中添加本发明的肽 1,使得终浓度达到 0~1 μg/ml,从而制备试样。接着,将 100 μl 的各试样加入亲水性的聚苯乙烯板(AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”)和疏水性的聚苯乙烯板(贝克顿-迪金森公司制“BD Falcon 微孔板 #351172”),在室温下孵育 1 小时,将本发明的肽 1 固定,用 0.1PBST 洗涤 5 次。然后,在与实施例 10 相同的条件下,添加封闭剂、抗体、酶标记的二抗和显色底物并进行洗涤处理,测定吸光度。对原肽 GST 也进行同样的处理并测定吸光度。

[0114] 图 2 的(a)~(d)表示实施例 11 的在亲水性的聚苯乙烯板中的测定结果,图 3 的(a)~(d)表示实施例 11 的在疏水性的聚苯乙烯板中的测定结果。图 2 和图 3 的(a)~(d)为 Tween20 的添加量分别为 0、0.1、1、10% 的条件下的测定结果。图 2 和图 3 中的黑色圆点(●)为本发明的肽 1 的结果,白色圆圈(○)为原肽 GST 的结果。图 2 和 3 中,纵轴为 405nm 下的吸光度,横轴为本发明的肽 1 和 GST 的浓度。图 2 和 3 中,GST 的结果和本发明的肽 1 的结果相同时,GST 的结果即白色圆圈(○)与本发明的肽 1 的黑色圆点(●)重叠而无法确认。例如,图 3 的(b)~(d)中,GST 的白色圆圈(○)全部与本发明的肽 1 的黑色圆点(●)重叠。

[0115] 由图 2 的(a)~(d)可以确认,本发明的肽 1 和 GST 中的任意一种在添加浓度增大时,结合于亲水性的聚苯乙烯板的量均增加。此外,本发明的肽 1 即使添加有杂质 Tween20,结合于亲水性的聚苯乙烯板的量也不减少,反而有若干增加。GST 在添加有杂质 Tween20 时,结合于亲水性的聚苯乙烯板的量稍有减少。

[0116] 此外,根据图 3 的(a)可知,本发明的肽 1 和 GST 中任意一种在不存在杂质 Tween20 的情况下,均与疏水性的聚苯乙烯板结合。然而,如图 3 的(b)~(d)所示,本发明的肽 1 和 GST 中的任意一种在杂质 Tween20 存在时,均几乎不与疏水性的聚苯乙烯板结合。这样,本发明的肽的结合性能对具有亲水性的树脂表面的固相是特异性的。

[0117] [实施例 12](本发明的肽 1 对亲水性的聚苯乙烯表面的结合性能评价,杂质:BSA 和 Tween20)

[0118] 为更详细地评价实施例 1 的本发明的肽 1 的结合性能,分别在杂质 Tween20 存在的状态以及 Tween20 和 BSA 存在的状态下,改变本发明的肽 1 的添加量,测定对疏水性的聚苯乙烯表面和亲水性的聚苯乙烯表面结合的量(吸光度)。

[0119] 首先,准备 PBS、0.1PBST、包含 20mg/ml 的 BSA 的 0.1PBST,添加本发明的肽 1 使得

各溶液中终浓度达到  $0 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ , 从而制备试样。接着, 将  $100 \mu\text{l}$  的各试样加入到亲水性的聚苯乙烯板 (AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”) 和疏水性的聚苯乙烯板 (贝克顿-迪金森公司制“BD Falcon 微孔板 #351172”), 在室温下孵育 2 小时, 将本发明的肽 1 固定, 用  $0.1\text{PBST}$  洗涤 5 次。然后, 在与实施例 10 相同的条件下, 添加封闭剂、抗体、酶标记的二抗和显色底物并进行洗涤处理, 测定吸光度。对原肽 GST 也进行同样的处理并测定吸光度。

[0120] 图 4 表示实施例 12 的测定结果。图 4 的 (a) ~ (c) 分别为 PBS、 $0.1\text{PBST}$  和包含 BSA 的  $0.1\text{PBST}$  的对亲水性的聚苯乙烯板的测定结果, 图 4 的 (d) ~ (f) 分别为 PBS、 $0.1\text{PBST}$  和包含 BSA 的  $0.1\text{PBST}$  的对疏水性的聚苯乙烯板的测定结果。此外, 图 4 中的黑色圆点 (●) 为本发明的肽 1 的结果, 白色圆圈 (○) 为原肽 GST 的结果。图 4 中, 纵轴为  $405\text{nm}$  下的吸光度, 横轴为本发明的肽 1 和 GST 的浓度。图 4 中, GST 的结果和本发明的肽 1 的结果相同时, GST 的结果即白色圆圈 (○) 与本发明的肽 1 的黑色圆点 (●) 重叠而无法确认。例如, 图 4 的 (e) 和 (f) 中, GST 的白色圆圈 (○) 全部与本发明的肽 1 的黑色圆点 (●) 重叠。

[0121] 由图 4 的 (a) ~ (c) 可确认, 本发明的肽 1 添加有杂质 Tween20 时 (图 4 的 (b))、添加有杂质 Tween20 和 BSA 时 (图 4 的 (c)), 结合于亲水性的聚苯乙烯板的量几乎不变 (图 4 的 (b) 和 (c) 的黑色圆点)。与此相对, GST 在添加杂质 Tween20 时, 结合于亲水性的聚苯乙烯板的量稍有减少 (图 4 的 (b) 的白色圆圈), 在还添加 BSA 时几乎不结合 (图 4 的 (c) 的白色圆圈)。这样, 通过导入本发明的氨基酸序列 2, 对亲水性的聚苯乙烯板的结合性能得到提高。

[0122] 此外, 根据图 4 的 (d) ~ (f), 本发明的肽 1 和 GST 中的任意一种在杂质 Tween20 不存在时, 均与疏水性的聚苯乙烯板结合, 但在杂质 Tween20、BSA 存在时, 则几乎不与疏水性的聚苯乙烯板结合。

[0123] [实施例 13] (本发明的肽 1 的活性值评价)

[0124] 为了评价实施例 1 的本发明的肽 1 在固定状态下的活性值, 分别在杂质 Tween20 存在的状态以及 Tween20 和 BSA 存在的状态下, 测定对疏水性的聚苯乙烯表面和亲水性的聚苯乙烯表面结合而被固定的 GST 作为酶的活性值。

[0125] 首先, 准备 PBS、 $0.1\text{PBST}$ 、包含  $20\text{mg/ml}$  的 BSA 的  $0.1\text{PBST}$ , 向各溶液中添加本发明的肽 1, 使得终浓度达到  $10, 20, 40 \mu\text{g/ml}$ , 从而制备试样。接着, 将  $100 \mu\text{l}$  的各试样加入到亲水性的聚苯乙烯板 (AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”) 和疏水性的聚苯乙烯板 (贝克顿-迪金森公司制“BD Falcon 微孔板 #351172”), 在室温下孵育 2 小时, 将本发明的肽 1 固定, 用  $0.1\text{PBST}$  洗涤 5 次。然后, 加入  $200 \mu\text{l}$  包含  $0.1\%$  Tween20、 $1\text{mM}$  的还原型谷胱甘肽和  $1\text{mM}$  的作为 GST 底物的 CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene (1-氯-2,4-二硝基苯)) 的  $0.1\text{M}$  磷酸钾缓冲液 ( $\text{pH}6.5$ ), 边在室温下搅拌 30 分钟, 边每 30 秒测定  $340\text{nm}$  下的吸光度。对原肽 GST 进行同样的处理, 测定吸光度。

[0126] 图 5 表示实施例 13 的测定结果。图 5 的 (a) ~ (c) 分别为 PBS、 $0.1\text{PBST}$  和包含 BSA 的  $0.1\text{PBST}$  的对亲水性的聚苯乙烯板的测定结果, 图 5 的 (d) ~ (f) 分别为 PBS、 $0.1\text{PBST}$  和包含 BSA 的  $0.1\text{PBST}$  的对疏水性的聚苯乙烯板的测定结果。此外, 图 5 中的黑色圆点 (●) 为本发明的肽 1 的结果, 白色圆圈 (○) 为原肽 GST 的结果。在图 5 中, 纵轴为活性值 (吸

光度的变化率),横轴为本发明的肽 1 和 GST 的浓度。图 5 中, GST 的结果和本发明的肽 1 的结果相同时, GST 的结果即白色圆圈(○)与本发明的肽 1 的黑色圆点(●)重叠而无法确认。例如,例如,图 5 的(e)和(f)中, GST 的白色圆圈(○)全部与本发明的肽 1 的黑色圆点(●)重叠。

[0127] 由图 5 的(a)~(c)可确认,固定在亲水性的聚苯乙烯板的本发明的肽 1 的 GST 在添加有杂质 Tween20 时(图 5 的(b))、添加有杂质 Tween20 和 BSA 时(图 5 的(c)),酶活性也非常高。与此相对,如实施例 12 中的图 4 的(a)和(b)的白色圆圈所示, GST 在未添加杂质时和添加杂质 Tween20 时,结合于亲水性的聚苯乙烯板,但如图 5 的(a)和(b)所示,完全不显示酶活性。这意味着原肽 GST 虽固定在亲水性的聚苯乙烯板,但发生了结构变化、失去活性。GST 在图 5 的(c)中完全不显示酶活性,如图 4 的(c)所示,这是由于本来在 Tween20 和 BSA 存在下, GST 几乎不与亲水性的聚苯乙烯板结合。

[0128] 此外,由图 5 的(d)可知,固定在疏水性的聚苯乙烯板的本发明的肽 1 的 GST 几乎不显示酶活性。由实施例 12 中的图 4 的(d)所示,可确认:在杂质不存在的状态下,本发明的肽 1 能与疏水性的聚苯乙烯板结合,但由于结构变化、失活,而失去活性。即,可确认:本发明的氨基酸序列 2 的结合性能对亲水性的聚苯乙烯板为特异性的,与以前利用疏水性的聚苯乙烯板的固定相比,将本发明的肽 1 固定在亲水性的聚苯乙烯板能够维持活性。在图 5 的(e)和(f)中,本发明的肽 1 和 GST 中的任意一种均完全不显示酶活性,这是由于,当杂质 Tween20、BSA 存在时,几乎不与疏水性的聚苯乙烯板结合。

[0129] [实施例 14](本发明的肽 3~6 对亲水性的聚苯乙烯表面的结合性能评价,杂质: BSA 和 Tween20)

[0130] 为了评价本发明的肽 3~6 对亲水性的聚苯乙烯表面的结合性能,在杂质 BSA 和 Tween20 存在的状态下,对实施例 3~6 的本发明的肽 3~6 以及用于评价的本发明的肽 1 和原肽 GST 对亲水性的聚苯乙烯表面的固定率进行测定。

[0131] 首先,准备未添加 BSA 的 0.1PBST、BSA 浓度为 0.003~50mg/ml 的 0.1PBST,在各溶液中添加本发明的肽 3,使得终浓度达到 5 $\mu$ g/ml,从而制备试样。接着,将 100 $\mu$ l 的各试样加入到亲水性的聚苯乙烯板(AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”),25 $^{\circ}$ C 下孵育 3 小时,将本发明的肽 3 固定,用 0.1% PBS 洗涤 6 次。进而,加入 300 $\mu$ l 包含 2% BSA 的 0.1PBST 作为封闭剂,在 25 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时,将聚苯乙烯板表面的未结合部位封闭,用 0.1PBST 洗涤 6 次。然后,加入 100 $\mu$ l 用包含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 5000 倍的抗 GST 抗体作为抗体,在 25 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时,使本发明的肽 3 中所含的 GST 和抗 GST 抗体进行抗原抗体反应,用 0.1PBST 洗涤 6 次。然后,加入 100 $\mu$ l 用包含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 5000 倍的 HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody(HRP 标记的抗兔 IgG 抗体)作为酶标记的二抗,在 25 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时,进行抗原抗体反应,再用 0.1PBST 洗涤 6 次。最后,加入 ABTS(2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid),2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸))作为显色底物,孵育,用酶标仪(TECAN 制“SUNRISE Remote”)测定 405nm 下的吸光度。对本发明的肽 4~6、本发明的肽 1 和 GST 进行同样的处理,测定吸光度。

[0132] 图 7 表示实施例 14 的测定结果。图 7 中的黑色三角为本发明的肽 3 的结果,空心三角( $\Delta$ )为本发明的肽 4 的结果,黑色正方形为本发明的肽 5 的结果,空心正方形( $\square$ )

为本发明的肽 6 的结果,黑色圆点(●)为本发明的肽 1 的结果,白色圆圈(○)为原肽 GST 的结果。图 7 中,纵轴为固定率(%),横轴为 BSA 浓度,固定率是以未添加 BSA 的 PBST 中的吸光度(结合的量)为基准(100%)而将其它吸光度标准化获得的。图 7 中,本发明的肽 1、3~6 的结果类似,存在重叠的部分。

[0133] 由图 7 能够确认:原肽 GST 在杂质 BSA 和 Tween20 存在时,固定率急剧降低,结合量也减少,而本发明的肽 3~6 即使存在 10mg/ml 这样高浓度的 BSA,固定率也几乎不变,可确认其与本发明的肽 1 以同等水平特异性地与亲水性的聚苯乙烯板结合。

[0134] [实施例 15](本发明的肽 3~6 在聚苯乙烯表面的活性值评价,杂质:BSA 和 Tween20)

[0135] 为评价本发明的肽 3~6 在固定在亲水性的聚苯乙烯表面的状态下的活性值,分别在杂质 Tween20 存在的状态下以及 Tween20 和 BSA 存在的状态下,测定被固定的 GST 的作为酶的活性值。

[0136] 首先,准备 PBS 和 0.1PBST,向各溶液中分别添加本发明的肽 1、3~6,使得终浓度达到 0.5、10、20、40  $\mu$ g/ml,从而制备试样。接着,将 100  $\mu$ l 的各试样加入到亲水性的聚苯乙烯板(AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”),在 25°C 下孵育 2 小时,将本发明的肽固定,用 0.1PBST 洗涤 6 次,再用包含 0.1% Tween20 的 0.1M 磷酸钾溶液(pH6.5)洗涤 1 次。然后,加入 200  $\mu$ l 包含 0.1% Tween20、1mM 的还原型谷胱甘肽和 1mM 的作为 GST 底物的 CDNB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene(1-氯-2,4-二硝基苯))的 0.1M 磷酸钾缓冲液(pH6.5),边在室温下搅拌 30 分钟,边每 30 秒测定 340nm 下的吸光度。对原肽 GST 进行同样的处理,测定吸光度。

[0137] 图 8 表示实施例 15 的测定结果。图 8 的(a)为 PBS 中的测定结果,(b)为 0.1PBST 中的测定结果。此外,图 8 中的黑色三角为本发明的肽 3 的结果,空心三角( $\Delta$ )为本发明的肽 4 的结果,黑色正方形为本发明的肽 5 的结果,空心正方形( $\square$ )为本发明的肽 6 的结果,黑色圆点(●)为本发明的肽 1 的结果,白色圆圈(○)为原肽 GST 的结果。图 8 中,纵轴为活性值(吸光度的变化率),横轴为本发明的肽和 GST 的浓度。图 8 中,本发明的肽 1、3~6 的结果类似,存在重叠的部分。

[0138] 由图 8 的(a)和(b)能够确认,固定在亲水性的聚苯乙烯板的本发明的肽 1、3~6 的 GST 无论是以原有状态(图 8 的(a))、还是添加有杂质 Tween20(图 8 的(b)),都具有很高的酶活性。

[0139] [实施例 16](本发明的肽 7~9 对亲水性的聚苯乙烯表面的结合性能评价,杂质:BSA 和 Tween20)

[0140] 为评价实施例 7~9 中生物合成的本发明的肽 7~9 对亲水性的聚苯乙烯表面的结合性能,对本发明的肽 7~9 以及原肽 GST,进行与实施例 14 同样的处理并测定吸光度,评价对亲水性的聚苯乙烯表面的固定率。

[0141] 图 9 表示实施例 16 的测定结果。图 9 中的黑色圆形为本发明的肽 7 的结果,黑色菱形为本发明的肽 8 的结果,空心三角( $\Delta$ )为本发明的肽 9 的结果,白色圆圈(○)为原肽 GST 的结果。图 9 中,纵轴为固定率(%),横轴为 BSA 浓度,固定率是以未添加 BSA 的 PBST 中的吸光度(结合的量)为基准(100%)而将其它吸光度标准化获得的。

[0142] 由图 9 能够确认,原肽 GST 在杂质 BSA 和 Tween20 存在时,固定率急剧降低,结合

量也减少,而本发明的肽 7~9 即使存在 10mg/ml 这样高浓度的 BSA,固定率也几乎不变,可确认其与亲水性的聚苯乙烯板特异性地结合。

[0143] [实施例 17] (本发明的肽 7~9 在聚苯乙烯表面的活性值评价,杂质:BSA 和 Tween20)

[0144] 为评价本发明的肽 7~9 在固定在亲水性的聚苯乙烯表面的状态下的活性值,对本发明的肽 7~9 以及原肽 GST 进行与实施例 15 同样的处理,测定活性值。

[0145] 图 10 表示实施例 17 的测定结果。图 10 的 (a) 为 PBS 中的测定结果, (b) 为 0.1PBST 中的测定结果。此外,图 10 中的黑色圆形为本发明的肽 7 的结果,黑色菱形为本发明的肽 8 的结果,空心三角 ( $\Delta$ ) 为本发明的肽 9 的结果,白色圆圈 ( $\circ$ ) 为原肽 GST 的结果。图 10 中,纵轴为活性值 (吸光度的变化率),横轴为本发明的肽和 GST 的浓度。

[0146] 由图 10 的 (a) 和 (b) 能够确认,固定在亲水性的聚苯乙烯板的本发明的肽 7~9 的 GST 无论是以原有状态 (图 10 的 (a))、还是添加有杂质 Tween20 (图 10 的 (b)) 时,都具有很高的酶活性。

[0147] [实施例 18] (本发明的肽 1 在生产中的分离纯化工序中的应用例,杂质:破碎菌体液)

[0148] 在本实施例中,为评价将本发明的肽的特异性吸附功能应用于生产中的分离纯化工序的可能性,对使用大肠杆菌表达的包含本发明的氨基酸序列 2 的 GST,不进行特别的纯化工序,直接将破碎菌体液固定在亲水性的聚苯乙烯表面,测定此时的结合量 (吸光度)。为进行比较,对原肽同样测定结合量 (吸光度)。

[0149] 首先,使用每列设有 8 个培养容器 (孔) 的孔板中的 5 列,向 39 个培养容器 (孔) 内添加 200  $\mu$  l 的 2xYT 培养基,在各孔中接种大肠杆菌 (BL21),形成菌落,在 37 $^{\circ}$ C、200rpm 下培养一夜,所述大肠杆菌 (BL21) 通过导入有导入了编码与实施例 1 同样的本发明的氨基酸序列 2 的基因的载体进行转化。原肽 GST 也同样制备 40 个菌落并培养。为确认各菌落的培养程度,各回收 100  $\mu$  l 培养液,测定菌体浓度。图 11 的 (a) 为培养本发明的肽的 39 个菌落的菌体浓度 (630nm 下的吸光度),图 11 的 (b) 为培养原肽的 40 集落的菌体浓度。图 11 中,横轴为孔板的列号,表示每列中的 8 个孔的结果。由图 11 的 (a) 和 (b) 能够确认的是,所有菌落得到同等程度的培养。

[0150] 接着,破碎菌体后,回收破碎菌体液 10  $\mu$  l,与 90ml 包含 1% 的 10mg/ml BSA 的 PBS 混合,加入到亲水性的聚苯乙烯板 (AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”),在室温下孵育 1 小时,将肽固定在固相上。然后,在与实施例 7 相同的条件下,添加封闭剂、抗体、酶标记的二抗和显色底物并进行洗涤处理,测定吸光度。对原肽 GST 进行同样处理并测定吸光度。

[0151] 图 11 的 (c) 和 (d) 表示实施例 18 的测定结果。图 11 的 (c) 为培养本发明的肽的 39 个菌落的吸光度 (405nm),图 11 的 (d) 为培养原肽的 40 个菌落的吸光度 (405nm)。如图 11 的 (d) 所示,原肽 GST 的吸光度为背景程度,几乎未固定在固相表面。与此相对,由图 11 的 (c) 能够确认,本发明的肽即使以包含于大肠杆菌的破碎菌体液的状态与固相表面接触,也能特异性固定在固相表面。在大肠杆菌的破碎菌体液中,作为杂质,除了各种大小不确定的蛋白质外,还存在蛋白质以外的低分子化合物、脂质等。能够确认:即使存在这些杂质,本发明的肽也特异性地与亲水性的聚苯乙烯板结合,因此能够用于生产中的分离纯化

工序。

[0152] [实施例 19] (本发明的肽 1 在生产中的分离纯化工序中的应用例, 杂质: 培养基)

[0153] 在本实施例中, 为评价将本发明的肽的特异性吸附功能应用于生产中的分离纯化工序的可能性, 在向本发明的肽 1 加入作为杂质的各种培养基 (YPD、BMMY、2xTY、LB) 的状态下, 测定对亲水性的聚苯乙烯表面的结合量 (吸光度)。为进行比较, 对原肽 GST 同样测定结合量 (吸光度)。YPD 为通常的酵母培养培养基, BMMY 为 *P. pastoris* 专用培养基, 2xTY 和 LB 为大肠杆菌专用培养基。

[0154] 首先, 准备 YPD、BMMY、2xTY 和 LB 这 4 种培养基, 对原液~稀释至 10000 倍的溶液, 分别添加本发明的肽 1 达到  $5 \mu\text{g/ml}$ , 从而制备试样。将各试样加入到亲水性的聚苯乙烯板 (AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”), 在室温下孵育 1 小时, 将肽固定在固相上。然后, 在与实施例 7 相同的条件下添加封闭剂、抗体、酶标记的二抗和显色底物并进行洗涤处理, 测定吸光度。对原肽 GST 同样进行处理, 测定吸光度。对原肽 GST 同样测定吸光度。

[0155] 图 12 表示实施例 19 的测定结果。图 12 中的黑色圆点 (●) 为本发明的肽 1 和培养基 YPD 的混合试样的结果, 白色圆圈 (○) 为原肽 GST 和培养基 YPD 的混合试样的结果, 黑色三角为本发明的肽 1 和培养基 BMMY 的混合试样的结果, 空心三角 (△) 为原肽 GST 和培养基 BMMY 的混合试样的结果, 黑色正方形为本发明的肽 1 和培养基 2xYT 的混合试样的结果, 空心正方形 (□) 为原肽 GST 和培养基 2xYT 的混合试样的结果, 菱形 (◆) 为本发明的肽 1 和培养基 LB 的混合试样的结果, 空心菱形 (◇) 为原肽 GST 和培养基 LB 的混合试样的结果。图 12 中, 纵轴为吸光度 (405nm), 横轴为培养基的相对浓度 (稀释率) (右端的 1 为原液)。如图 12 所示, 结合于固相表面的原肽 GST (白色圆圈、空心三角、空心正方形、空心菱形) 量均随着培养基的变浓而减少。与此相对, 本发明的肽 1 (黑色圆点、黑色三角、黑色正方形、黑色菱形) 即使在培养基变浓时也有相当多的量被固定、结合于固相表面, 没有受到培养基浓度的很大影响, 能够确认特异性地固定在固相表面。

[0156] 尤其是, 酵母使用的培养基即 YPD 和 BMMY 中也表现出特异性吸附性能, 因此能够用于酵母分泌生产中。即, 通过使酵母的分泌液直接与固相表面接触, 能够将分泌液中的本发明的肽固定并分离纯化。

[0157] 进而, 在单链抗体 (scFv) 的生产中有效的培养基即 BMMY 和 2xYT 中也表现出特异性吸附性能, 因此以本发明的肽形式生产单链抗体 (scFv) 时, 也能够从酵母的分泌液、大肠杆菌的破碎液直接分离纯化单链抗体 (scFv)。

[0158] [实施例 20] (用由本发明的氨基酸序列 2 构成的本发明的肽标记的抗体的生产)

[0159] 首先, 通过固相法, 合成在由本发明的氨基酸序列 2 构成的本发明的肽的 N 末端侧具有赖氨酸 (K) 的肽 (KRITIRIRR)。接着, 用  $100 \mu\text{l}$  的 25% 戊二醛溶液溶解 0.5mg 的由本发明的氨基酸序列 2 构成的本发明的肽, 在室温下孵育 10 分钟。然后, 加入 9ml 的二乙醚和 1ml 的乙醇, 让用戊二醛标记的本发明的肽析出, 通过离心分离回收该肽。

[0160] 进而, 在溶解有 0.5mg 的小鼠单克隆抗人 CRP 抗体 (ORIENTAL 酵母社制、#4715500) 的 0.5ml PBS 中, 溶解用戊二醛标记的本发明的肽, 在  $25^\circ\text{C}$  下孵育 1 小时。然后, 加入  $100 \mu\text{l}$  的 2M Tris-HCl (pH8.0) 使反应停止, 通过超滤法纯化作为本发明的肽的由本发明的氨基酸序列 2 构成的抗 CRP 抗体。下面, 将实施例 20 中生成的包含本发明的氨基酸

序列 2 的抗 CRP 体称为“本发明的肽 20”，将其原肽称为“原肽 20”。

[0161] [实施例 21] (C 末端侧具有本发明的氨基酸序列 2 的单链抗体的生成)

[0162] 本实施例中,在序列表的序列号 23、24、25 所示的 3 种单链抗体 (scFv) 的 C 末端侧导入本发明的氨基酸序列 2,生成 3 种单链抗体。下面,将序列表的序列号 23、24 和 25 所示的 3 种单链抗体 (原肽) 分别称为“原肽 21-1”、“原肽 21-2”和“原肽 21-3”,将本实施例中生成的在原肽 21-1、原肽 21-2 和原肽 21-3 中导入了本发明的氨基酸序列 2 的 3 种单链抗体 (本发明的肽) 分别称为“本发明的肽 21-1”、“本发明的肽 21-2”和“本发明的肽 21-3”。这些单链抗体的任意一种均具有对 C 反应蛋白 (C-Reactive Protein:CRP) 显示出特异性抗原抗体反应的抗原结合部位。原肽 21-1 ~ 21-3 为通过链状的连接肽连接重链的可变区 ( $V_H$ ) 的 C 末端和轻链的可变区 ( $V_L$ ) 的 N 末端而成的结构,所述连接肽为 3 组由 4 个甘氨酸 (G) 和丝氨酸 (S) 的组合连接而成的 ( $G_4S$ )<sub>3</sub> 结构。在原肽 21-1 ~ 21-3 中,在轻链的可变区 ( $V_L$ ) 的 C 末端还导入了组氨酸标签。实施例 22 和 23 的原肽为序列号 23 的单链抗体 (原肽 21-1)。

[0163] 首先,合成 5' 末端侧被磷酸化的包含编码本发明的氨基酸序列 2 的基因的正义链 (PStag-sense) 和反义链 (PStag-antisense) 的寡 DNA,退火后导入到用限制酶 NotI 和 XhoI 消化得到的 pET22b(+) 载体 (Novagen 制),制得包含编码本发明的氨基酸序列 2 的基因的 pET-PStag 载体 (pET22b(+) 中导入有 PStag 的载体)。“PStag”是指表达本发明的氨基酸序列 2 的基因。以下也同样。

[0164] 接着,合成包含编码重链的可变区 ( $V_H$ ) 的基因的正义链 ( $V_H$ -sense) 的寡 DNA 和包含编码轻链的可变区 ( $V_L$ ) 的基因的反义链 ( $V_L$ -antisense) 的寡 DNA。以这些合成寡 DNA 为引物,分别以表达序列号 23,24,25 所示的 3 种单链抗体的载体 pET-scFv (pET22b(+) 中导入有 scFv 的基因的载体) 为模板,通过 PCR 法扩增 3 种单链抗体 (scFv) 的基因。将扩增得到的 scFv 基因用限制酶 NdeI 和 NotI 消化,导入到用限制酶 NdeI 和 NotI 消化过的包含编码本发明的氨基酸序列 2 的基因的 pET-PStag 载体,制得 C 末端侧包含编码本发明的氨基酸序列 2 的基因的 3 种单链抗体的表达载体 (pET-scFv-PStag 载体)。

[0165] 使用大肠杆菌 (BL21 (DE3) Rosetta (Novagen)) 作为宿主,将上述 pET-scFv-PStag 载体导入宿主,对宿主进行转化,在包含氨苄青霉素的琼脂培养基上筛选。然后,在 2xYT 培养基 50ml 中培养大肠杆菌,加入诱导表达物质异丙基-硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG: Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D(-)-galactoside) 至终浓度达到 1mM,使其表达 C 末端包含本发明的氨基酸序列 2 的单链抗体 (scFv-PStag)。

[0166] 然后,破碎菌体后,用包含 6M 盐酸胍 (变性剂) 和 10mM 巯基乙醇 (还原剂) 的增溶溶液溶解菌体内不溶性组分。这样能够获得未纯化的变性的在 C 末端包含本发明的氨基酸序列 2 的单链抗体。下面,将该状态的实施例 21 的单链抗体称为“未纯化的变性的本发明的肽 21-1”~“未纯化的变性的本发明的肽 21-3”。

[0167] 进而,将未纯化的变性的本发明的肽 21-1 ~ 21-3 在变性状态下,通过使用 HisTrap HP (GE HealthCare) 的 Ni 螯合亲和层析柱 (IMAC) 纯化,生产在 C 末端侧包含本发明氨基酸序列 2 的变性的单链抗体。下面,将该状态的实施例 21 的单链抗体称为“纯化后的变性的本发明的肽 21-1”~“纯化后的变性的本发明的肽 21-3”。本发明的肽 21-1 的氨基酸序列在序列表的序列号 26 中示出,本发明的肽 21-2 的氨基酸序列在序列表的序列号 27

中示出,本发明的肽 21-3 的氨基酸序列在序列表的序列号 28 中示出。本发明的肽 21-1 ~ 21-3 在轻链的可变区 ( $V_L$ ) 的 C 末端侧具有本发明的氨基酸序列 2,本发明的氨基酸序列 2 的 C 末端侧还连接有组氨酸标签。氨基酸序列自身无论是在纯化前后还是变性前后均保持不变,均为序列号 26、27、28 所示那样。

[0168] [实施例 22] (在重链可变区 ( $V_H$ ) 和连接肽之间具有本发明的氨基酸序列 2 的单链抗体的生成)

[0169] 本实施例中,生成的是,在对原肽 21-1 (序列号 23) 和原肽 21-2 (序列号 24) 的重链的可变区 ( $V_H$ ) 和轻链的可变区 ( $V_L$ ) 进行连接的连接肽中导入有本发明的氨基酸序列 2 的单链抗体 (以下将生成的肽分别称为“本发明的肽 22-1”和“本发明的肽 22-2”)。首先,合成包含编码重链的可变区 ( $V_H$ ) 的基因的正义链 ( $V_H$ -sense) 的寡 DNA 和反义链 ( $V_H$ -antisense) 的寡 DNA,以这些合成寡 DNA 为引物,以表达序列号 23 的单链抗体的 pET-scFv 载体为模板,通过 PCR 法扩增重链的可变区 ( $V_H$ ) 的基因。

[0170] 接着,合成包含编码轻链的可变区 ( $V_L$ ) 的基因的正义链 ( $V_L$ -sense) 的寡 DNA 和反义链 ( $V_L$ -antisense) 的寡 DNA,同样地扩增轻链的可变区 ( $V_L$ ) 的基因。

[0171] 进而,合成具有依次编码重链的可变区 ( $V_H$ ) 的 C 末端部、本发明的氨基酸序列 2 和连接肽的基因的正义链 ( $V_H$ -Pst $ag$ -( $G_4S$ ) $_3$ -sense) 的寡 DNA 和包含依次编码本发明的氨基酸序列 2、连接肽和轻链的可变区 ( $V_L$ ) 的 N 末端部分的基因的反义链 (PSt $ag$ -( $G_4S$ ) $_3$ - $V_L$ -antisense) 的寡 DNA。

[0172] 使用重链的可变区 ( $V_H$ ) 的基因、轻链的可变区 ( $V_L$ ) 的基因、正义链 ( $V_H$ -PSt $ag$ -( $G_4S$ ) $_3$ -sense) 的寡 DNA、反义链 (PSt $ag$ -( $G_4S$ ) $_3$ - $V_L$ -antisense) 的寡 DNA、正义链 ( $V_H$ -sense) 的寡 DNA 和反义链 ( $V_L$ -antisense) 的寡 DNA,通过 Overlapping PCR 法,制得在重链可变区 ( $V_H$ ) 和连接肽 ( $G_4S$ ) $_3$  之间具有本发明的氨基酸序列 2 的单链抗体的基因 (scFv-(PSt $ag$ ))。将该基因用限制酶 NdeI 和 NotI 消化,导入到用限制酶 NdeI 和 NotI 消化过的 pET22b(+) 中,制得在连接肽 ( $G_4S$ ) $_3$  中包含编码本发明的氨基酸序列 2 的基因的单链抗体的表达载体 (pET-scFv-(PSt $ag$ ) 载体)。“(PSt $ag$ )”是指在单链抗体中即重链可变区 ( $V_H$ ) 和连接肽 ( $G_4S$ ) $_3$  之间导入 PSt $ag$ 。以下也相同。

[0173] 然后,与实施例 21 同样地将该 pET-scFv-(PSt $ag$ ) 载体导入到宿主中并培养,破碎菌体后,用包含 6M 盐酸胍 (变性剂) 和 10mM 巯基乙醇 (还原剂) 的增溶溶液溶解菌体内不溶性组分,能够获得未纯化的变性的在连接肽 ( $G_4S$ ) $_3$  中具有本发明的氨基酸序列 2 的单链抗体。进而,通过与实施例 21 同样的方法纯化,生产出纯化的变性状态的本发明的肽 22-1 (以下称为“纯化后的变性的本发明的肽 22-1”)。本发明的肽 22-1 的氨基酸序列在序列表的序列号 29 中示出。本发明的肽 22-1 在重链的可变区 ( $V_H$ ) 的结构域和连接肽 ( $G_4S$ ) $_3$  之间配置有本发明的氨基酸序列 2。

[0174] 此外,通过同样的方法,生产在原肽 21-2 (序列号 24) 的重链的可变区 ( $V_H$ ) 的结构域和连接肽 ( $G_4S$ ) $_3$  之间配置有本发明的氨基酸序列 2 的纯化后的变性的本发明的肽 22-2。本发明的肽 22-2 的氨基酸序列在序列表的序列号 30 中示出。

[0175] [实施例 23] (在 C 末端和重链可变区 ( $V_H$ ) 与连接肽之间两处具有本发明的氨基酸序列 2 的单链抗体的生成)

[0176] 本实施例中,生成在原肽 21-1 以及原肽 21-2 的单链抗体的 C 末端侧 (即轻链的

可变区 ( $V_L$ ) 的 C 末端侧) 和重链可变区 ( $V_H$ ) 与连接肽之间 (即重链的可变区 ( $V_H$ ) 的 C 末端侧) 的两处导入有本发明的氨基酸序列 2 的单链抗体 (以下, 将生成的肽分别称为“本发明的肽 23-1”和“本发明的肽 23-2”)。首先, 与实施例 22 同样地制备在重链可变区 ( $V_H$ ) 和连接肽 ( $G_4S$ )<sub>3</sub> 之间具有本发明的氨基酸序列 2 的单链抗体的基因 (scFv-(PStag))。实施例 22 中将该基因导入了 pET22b(+), 但本实施例中, 将其导入实施例 21 中使用的包含编码本发明的氨基酸序列 2 的基因的 pET-PStag 载体, 制作在 C 末端侧和重链可变区 ( $V_H$ ) 与连接肽 ( $G_4S$ )<sub>3</sub> 之间两处包含编码本发明的氨基酸序列 2 的基因的单链抗体的表达载体 (pET-scFv-(PStag)-PStag 载体)。

[0177] 然后, 与实施例 21 同样地将该 pET-scFv-(PStag)-PStag 载体导入宿主, 培养, 破碎菌体后, 用包含 6M 盐酸胍 (变性剂) 和 10mM 巯基乙醇 (还原剂) 的增溶溶液溶解菌体内不溶性组分, 能够获得未纯化的变性的在 C 末端侧和连接肽两处具有本发明的氨基酸序列 2 的单链抗体 (scFv)。进而, 与实施例 21 同样地进行纯化, 生产出纯化后的变性状态的本发明的肽 23-1 (以下称为“纯化后的变性的本发明的肽 23-1”)。本发明的肽 23-1 的氨基酸序列在序列表的序列号 31 中示出。本发明的肽 23-1 与本发明的肽 21-1 同样地在轻链的可变区 ( $V_L$ ) 的 C 末端侧具有本发明的氨基酸序列 2, 在本发明的氨基酸序列 2 的 C 末端侧还连接有组氨酸标签。进而, 与本发明的肽 22-1 同样地在重链的可变区 ( $V_H$ ) 的结构域和连接肽 ( $G_4S$ )<sub>3</sub> 之间具有本发明的氨基酸序列 2。

[0178] 此外, 通过同样的方法, 生产在原肽 21-2 (序列号 24) 的轻链的可变区 ( $V_L$ ) 的 C 末端侧和重链的可变区 ( $V_H$ ) 的结构域与连接肽 ( $G_4S$ )<sub>3</sub> 之间配置有本发明的氨基酸序列 2 的纯化后的变性的本发明的肽 23-2。本发明的肽 23-2 的氨基酸序列在序列表的序列号 32 中示出。

[0179] [实施例 24] (本发明的肽 21-1 ~ 21-3 的固定后活性值的评价)

[0180] 本实施例中, 为了评价本发明的肽 21-1 ~ 21-3 (序列号 26 ~ 28) 在固定状态下的活性值, 使纯化后的变性的本发明的肽 21-1 ~ 21-3 在液相中重折叠后, 使这些肽与亲水性的聚苯乙烯表面结合, 测定抗原抗体反应的活性值。为了进行比较, 对原肽 21-1 ~ 21-3 (序列号 23 ~ 25) 和并非单链抗体的抗体分子的本发明的肽 20 和原肽 20, 也使其与亲水性的聚苯乙烯表面结合, 测定活性值。进而, 为了与以前进行比较, 使原肽 20 (抗体分子) 与疏水性的聚苯乙烯表面结合, 测定活性值。

[0181] 首先, 将纯化后的变性的本发明的肽 21-1 ~ 21-3 (序列号 26 ~ 28) 稀释到包含 375  $\mu$ M 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 的 PBS 中, 使得变性剂尿素为 80mM, 在室温下孵育 3 小时, 进行重折叠。通过离心分离除去聚集物后, 通过使用 HisTrap HP (GE HealthCare) 的 Ni 螯合亲和层析柱 (IMAC) 纯化, 用 PBS 透析, 从而生成 3 种可溶性的本发明的肽 21-1 ~ 21-3。

[0182] 接着, 将本发明的肽 21-1 ~ 21-3 用 0.1PBST 稀释至 5  $\mu$ g/ml 的浓度, 将 100  $\mu$ l 该液体加入到亲水性的聚苯乙烯板 (AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”), 在室温下孵育 2 小时, 将本发明的肽固定。用 0.1PBST 洗涤 6 次后, 通过包含 2% BSA 的 0.1PBST (封闭剂) 封闭聚苯乙烯板表面的未结合部位。进而, 用 0.1PBST 洗涤 6 次后, 加入 100  $\mu$ l 的用含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 1 ~ 5000ng/ml 的 biotin-CRP (抗原), 在室温下孵育 1 小时, 使其与本发明的肽进行抗原抗体反应。进而, 用 0.1PBST 洗涤 6 次后, 加入 100  $\mu$ l 用包含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 5000 倍的 HRP 标记链霉亲和素, 在

室温下孵育 30 分钟,用 0.1PBST 洗涤 6 次后,加入显色底物显色 30 分钟。30 分钟后,用酶标仪 (TECAN 制“SUNRISE Remote”) 测定 405nm 下的吸光度,对序列号 23 ~ 25 所示的原肽即 21-1 ~ 21-3 单链抗体、实施例 20 中的用本发明的氨基酸序列 2 标记的本发明的肽 20、原肽 20 也进行同样的处理,测定吸光度。进而,在 PBS 中将 5  $\mu$ g/ml 的原肽 20 固定在疏水性的聚苯乙烯板 (贝克顿-迪金森公司制“BD Falcon 微孔板 #351172”),然后测定吸光度。

[0183] 图 13 表示实施例 24 的测定结果。图 13 中,黑色圆点 (●)、黑色三角和黑色正方形分别为序列号 26、27、28 所示的本发明的肽 21-1、21-2、21-3 的结果,白色圆圈 (○)、空心的三角 (△) 和空心的方形 (□) 分别为序列号 23、24、25 所示的原肽 21-1、21-2、21-3 的结果。进而,黑色菱形 (◆) 为本发明的肽 20 的结果,空心的菱形 (◇) 为原肽 20 小鼠单克隆抗人 CRP 抗体 (ORIENTAL 酵母社制、#4715500) 的结果。× 形记号为原肽 20 固定在疏水性的聚苯乙烯板进行实验的结果。图 11 中,纵轴为吸光度 (405nm),横轴为 biotin-CRP 的浓度 (ng/ml)。

[0184] 由图 13 能够确认的是,原肽 21-1、21-2、21-3 (○、△、□) 以及原肽 20 (◇) 在亲水性的聚苯乙烯表面几乎未被活化,而本发明的肽 21-1、21-2、21-3 (黑色圆点、黑色三角、黑色正方形) 尽管单链抗体的氨基酸序列不同但都维持了高的抗原结合活性。此外,用本发明的氨基酸序列 2 标记的本发明的肽 20 (◆) 选择性固定在亲水性的聚苯乙烯板上,也显示出高的抗原结合活性。与以前用于 ELISA 的固定在疏水性聚苯乙烯板上的小鼠单克隆抗体 (原肽 20) 的结果 (×) 相比,具有本发明的氨基酸序列 2 的本发明的肽 20 以及 21-1、21-2 和 21-3 获得了相同或更高的信号。由以上结果能够确认的是,通过生产在各种单链抗体的 C 末端侧导入有本发明的氨基酸序列 2 的本发明的肽 21-1、21-2、21-3,能够以维持较高抗原结合活性的状态固定在亲水性的聚苯乙烯板。此外,能够确认的是,通过用本发明的氨基酸序列 2 标记单克隆抗体,能够以维持较高抗原结合活性的状态固定在亲水性的聚苯乙烯板。

[0185] [ 实施例 25] ( 纯化后的变性的本发明的肽 21-1, 22-1 和 23-1 的固相重折叠以及活性值评价 )

[0186] 本实施例中,为了评价纯化后的变性的本发明的肽 21-1, 22-1 和 23-1 在固定状态下的重折叠和活性值,使这些肽与亲水性的聚苯乙烯表面结合,测定抗原抗体反应的活性值。

[0187] 首先,制备各纯化后的变性的本发明的肽 21-1 ( 序列号 26 ), 22-1 ( 序列号 29 ) 和 23-1 ( 序列号 31 ), 使得变性剂尿素的终浓度为 4M, 从而制作试样。接着,将 20  $\mu$ l 的各试样加入到亲水性的聚苯乙烯板 (AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”), 用搅拌机搅拌后,在室温下孵育 1 小时,将本发明的肽固定 ( 每孔的 scFv 的重量为 0.5  $\mu$ g/ 孔 )。用 0.1PBST 洗涤 6 次后,通过含 2% BSA 的 0.1PBST ( 封闭剂 ) 封闭聚苯乙烯板表面的未结合部位。进而,用 0.1PBST 洗涤 6 次后,加入 100  $\mu$ l 用包含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 1 ~ 5000ng/ml 的 biotin-CRP ( 抗原 ), 在室温下孵育 1 小时,使其与本发明的肽进行抗原抗体反应。进而,用 0.1PBST 洗涤 6 次后,加入 100  $\mu$ l 用包含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 5000 倍的 HRP 标记链霉亲和素,在室温下孵育 30 分钟,用 0.1PBST 洗涤 6 次后,加入显色底物显色 30 分钟。30 分钟后,使用酶标仪 (TECAN 制“SUNRISE Remote”) 测定 405nm 下的吸光度。对原肽 21-1 ( 序列号 23 ) 进行同样的处理,测定吸光度。

[0188] 图 14 表示实施例 25 的测定结果。图 14 中,黑色圆点 (●) 为纯化后的变性的本发明的肽 21-1 的结果,黑色三角为纯化后的变性的本发明的肽 22-1 的结果,黑色正方形为纯化后的变性的本发明的肽 23-1 的结果,白色圆圈 (○) 为原肽 21-1 的结果。图 14 中,纵轴为吸光度 (405nm),横轴为 biotin-CRP 的浓度 (ng/ml)。

[0189] 由图 14 能够确认的是,原肽 21-1 单链抗体 (○) 几乎未被活化,纯化后的变性的本发明的肽 21-1、22-1 和 23-1 均被活化。即,通过使用本发明的氨基酸序列,使变性的本发明的肽 21-1、22-1 和 23-1 与固相接触,从而在固定的同时进行使变性复性的重折叠。

[0190] 进而,能够确认的是,在 C 末端侧导入有本发明的氨基酸序列 2 的本发明的肽 21-1、在重链可变区和连接肽之间导入有本发明的氨基酸序列 2 的本发明的肽 22-1 均为同等程度的活性,相对于此,在 C 末端侧和重链可变区与连接肽之间两处导入有本发明的氨基酸序列 2 的本发明的肽 23-1 获得了更高的活性。

[0191] [实施例 26] (纯化后的变性的本发明的肽 21-2、22-2 和 23-2 的固相重折叠以及活性值评价)

[0192] 本实施例中,为了评价纯化后的变性的本发明的肽 21-2、22-2 和 23-2 在固定状态下的重折叠和活性值,使这些肽与亲水性的聚苯乙烯表面结合,测定抗原抗体反应的活性值。本实施例的基本操作与实施例 25 相同,为慎重起见将若干变更的条件记载如下。

[0193] 首先,通过包含 1% 的 Tween20 的 PBS 来制备溶液,使得变性剂尿素的终浓度为 4M、各纯化后的变性的本发明的肽 21-2 (序列号 27)、22-2 (序列号 30) 和 23-2 (序列号 32) 为 10 μg/ml,从而制作试样。接着,将 100 μl 各试样加入到亲水性的聚苯乙烯板 (AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”),用搅拌机搅拌后,在室温下孵育 3 小时,将本发明的肽固定。用 0.1PBST 洗涤 6 次后,加入 300 μl 包含 2% BSA 的 0.1PBST (封闭剂),在室温下孵育 1 小时,封闭聚苯乙烯板表面的未结合部位。进而,用 0.1PBST 洗涤 6 次后,加入 100 μl 用包含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 1 ~ 5000ng/ml 的 biotin-CRP (抗原),在室温下孵育 1 小时,使其与本发明的肽进行抗原抗体反应。进而,用 0.1PBST 洗涤 6 次后,加入 100 μl 用包含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 5000 倍的 HRP 标记链霉亲和素,在室温下孵育 1 小时。进而,用 0.1PBST 洗涤后 6 次后,加入 100 μl 显色底物,显色 30 分钟。30 分钟后,使用酶标仪 (TECAN 制“SUNRISE Remote”) 测定 405nm 下的吸光度。对原肽 21-2 (序列号 24) 也进行同样的处理,测定吸光度。

[0194] 图 15 表示实施例 26 的测定结果。图 15 中,黑色圆点 (●) 为纯化后的变性的本发明的肽 21-2 的结果,黑色三角为纯化后的变性的本发明的肽 22-2 的结果,黑色正方形为纯化后的变性的本发明的肽 23-2 的结果,白色圆圈 (○) 为原肽 21-2 的结果。图 15 中,纵轴为吸光度 (405nm),横轴为 biotin-CRP 的浓度 (ng/ml)。

[0195] 由图 15 能够确定的是,原肽 21-2 单链抗体 (○) 几乎未被活化,纯化后的变性的本发明的肽 21-2、22-2 和 23-2 均被活化。即,与实施例 25 同样地,本实施例也能够确认:通过使用本发明的氨基酸序列,使变性的本发明的肽 21-2、22-2 和 23-2 与固相接触,从而在固定的同时对变性进行复性并进行重折叠。

[0196] 进而,能够确认的是,在 C 末端侧导入有本发明的氨基酸序列 2 的本发明的肽 21-2 的活性,比在重链可变区和连接肽之间导入有本发明的氨基酸序列 2 的本发明的肽 22-2 的活性高,但在此之上,在 C 末端侧和重链可变区与连接肽之间两处导入有本发明的氨基酸

序列 2 的本发明的肽 23-2 获得了更高的活性。

[0197] [ 实施例 27] ( 纯化后的变性的本发明的肽 21-1 对固相的结合性能以及活性值评价 )

[0198] 本实施例中, 评价纯化后的变性的本发明的肽 21-1 ( 序列号 26 ) 的量与对亲水性的聚苯乙烯表面的结合性能和活性值的关系。

[0199] 首先, 用 8M 尿素进行调整, 使得纯化后的变性的本发明的肽 21-1 浓度分别达到 3.2  $\mu$ g/ml、32  $\mu$ g/ml 和 320  $\mu$ g/ml, 从而制成试样。接着, 将 10  $\mu$ l 的各试样分别加入到亲水性的聚苯乙烯板 (AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”), 再向各孔加入 90  $\mu$ l 0.1PBST 稀释至 10 倍, 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育一夜, 将本发明的肽 21-1 固定。用 0.1PBST 洗涤 6 次后, 通过含 2% BSA 的 0.1PBST ( 封闭剂 ) 封闭聚苯乙烯板表面的未结合部位。进而, 用 0.1PBST 洗涤 6 次后, 加入 100  $\mu$ l 用含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 1 ~ 5000ng/ml 的 biotin-CRP ( 抗原 ), 在室温下孵育 1 小时, 使其与本发明的肽进行抗原抗体反应。进而, 用 0.1PBST 洗涤 6 次后, 加入 100  $\mu$ l 用含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 1000 倍的 HRP 标记链霉亲和素, 在室温下孵育 30 分钟, 用 0.1PBST 洗涤 6 次后, 加入显色底物显色 30 分钟。30 分钟后, 使用酶标仪 (TECAN 制“SUNRISE Remote”) 测定 405nm 下的吸光度。

[0200] 图 16 表示实施例 27 的测定结果。图 16 中, 黑色圆点 (●) 是纯化后的变性的本发明的肽 21-1 的量在每孔中为 0.032  $\mu$ g 时的结果, 黑色三角是每孔中为 0.32  $\mu$ g 时的结果, 黑色正方形是每孔中为 3.2  $\mu$ g 时的结果。图 16 中, 纵轴为吸光度 (405nm), 横轴为 biotin-CRP 的浓度 (ng/ml)。

[0201] 由图 16 能够确认的是, 纯化后的变性的本发明的肽 21-1 在亲水性的聚苯乙烯表面被活化。即, 通过使用本发明的氨基酸序列, 对亲水性的聚苯乙烯基板显示出特异性结合性能, 从而在固定的同时也能够进行对变性复性的重折叠。

[0202] [ 实施例 28] ( 利用固定未纯化的变性的本发明的肽 21-1 ~ 21-3 进行的分离纯化以及活性值评价 )

[0203] 本实施例中, 评价利用将未纯化的变性的本发明的肽 21-1 ~ 21-3 ( 序列号 26、27、28 ) 固定在亲水性的聚苯乙烯表面进行分离纯化的可能性和在固定状态下的活性值。

[0204] 首先, 用 0.1PBST, 对未纯化的变性的本发明的肽 21-1 ~ 21-3 以及 3.2mg/ml 的纯化后的变性的本发明的肽 21-1 进行稀释, 获得稀释至 10 倍的试样以及稀释至 100 倍的试样, 将上述试样分别以 200  $\mu$ l 的量加入到亲水性的聚苯乙烯板 (AGC Techno Glass 株式会社制“IWAKI 微孔板 #3860-096”), 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育一夜, 将本发明的肽固定。用 0.1PBST 洗涤 6 次后, 通过含 2% BSA 的 0.1PBST ( 封闭剂 ) 封闭聚苯乙烯板表面的未结合部位。进而, 用 0.1PBST 洗涤 6 次后, 加入 100  $\mu$ l 用含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 1 ~ 5000ng/ml 的 biotin-CRP ( 抗原 ), 在室温下孵育 1 小时, 使其与本发明的肽进行抗原抗体反应。进而, 用 0.1PBST 洗涤 6 次后, 加入 100  $\mu$ l 用含 0.2% BSA 的 0.1PBST 稀释至 1000 倍的 HRP 标记链霉亲和素, 在室温下孵育 30 分钟, 用 0.1PBST 洗涤 6 次后, 加入显色底物显色 30 分钟。30 分钟后, 使用酶标仪 (TECAN 制造“SUNRISE Remote”) 测定 405nm 下的吸光度。

[0205] 图 17 的 (a) 为稀释至 10 倍时的测定结果, 图 17 的 (b) 为稀释至 100 倍时的测定结果。图 17 的 (a) 和 (b) 中, 黑色圆点 (●) 为未纯化的变性的本发明的肽 21-1 的结果, 黑色三角为未纯化的变性的本发明的肽 21-2 的结果, 黑色正方形为未纯化的变性的本

发明的肽 21-3 的结果,白色圆圈 (○) 为纯化后的变性的本发明的肽 21-1 的结果。图 17 的 (a) 和 (b) 中,纵轴为吸光度 (405nm),横轴为 biotin-CRP 的浓度 (ng/ml)。

[0206] 由图 17 能够确认的是,即使是未纯化的状态也能固定在亲水性的聚苯乙烯表面并被活化。即,通过使用本发明的氨基酸序列,本发明的肽与亲水性的聚苯乙烯板特异性结合,因此能够作为生产中的分离纯化工序来利用,并且,由于能被活化,因此还能进行重折叠。

[0207] 序列表自由文本

[0208] 序列号 1 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0209] 序列号 2 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0210] 序列号 3 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0211] 序列号 4 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0212] 序列号 5 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0213] 序列号 6 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0214] 序列号 7 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0215] 序列号 8 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0216] 序列号 9 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0217] 序列号 10 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0218] 序列号 11 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0219] 序列号 12 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0220] 序列号 13 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0221] 序列号 14 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0222] 序列号 15 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0223] 序列号 16 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0224] 序列号 17 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0225] 序列号 18 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0226] 序列号 19 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0227] 序列号 20 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽。

[0228] 序列号 21 :合成 DNA。

[0229] 序列号 22 :合成 DNA。

[0230] 序列号 23 :单链抗体。

[0231] 序列号 24 :单链抗体。

[0232] 序列号 25 :单链抗体。

[0233] 序列号 26 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体。

[0234] 序列号 27 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体。

[0235] 序列号 28 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体。

[0236] 序列号 29 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体。

[0237] 序列号 30 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体。

[0238] 序列号 31 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体。

[0239] 序列号 32 :对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体。

[0001]

## 序列表

<110> 国立大学法人京都工艺纤维大学 (Kyoto Institute of Technology )

恩普乐股份有限公司 (Enplas Corporation)

<120> 肽、该肽的用途和生产方法以及固定有该肽的固相和其生产方法

<130> 08P00020-PC

<150> JP 2008-33135

<151> 2008-02-14

<150> JP 2008-246068

<151> 2008-09-25

<160> 32

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽

<220>

<221> 变异

<222> 2

<223> Xaa= Ile, Leu, Val, Ala, Gly, Met, Ser or Thr

<220>

<221> 变异

<222> 3

<223> Xaa= Ile, Leu, Val, Ala, Gly, Met, Ser or Thr

<220>

<221> 变异

<222> 4

<223> Xaa= Ile, Leu, Val, Ala, Gly, Met, Ser or Thr

<220>

<221> 变异

<222> 7

<223> Xaa= Ile, Leu, Val, Ala, Gly, Met, Ser or Thr

<400> 1

Arg Xaa Xaa Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽

<400> 2

[0002]

Arg Ile Ile Ile Arg Arg Ile Arg Arg  
1 5

<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽  
<400> 3

Arg Ala Ile Ala Arg Arg Ile Arg Arg  
1 5

<210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽  
<400> 4

Arg Leu Leu Leu Arg Arg Leu Arg Arg  
1 5

<210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽  
<400> 5

Arg Val Val Val Arg Arg Val Arg Arg  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽  
<400> 6

Arg Ala Ala Ala Arg Arg Ala Arg Arg  
1 5

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽

[0003]

<400> 7

Arg Gly Gly Gly Arg Arg Gly Arg Arg  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽

<400> 8

Arg Met Met Met Arg Arg Met Arg Arg  
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽

<400> 9

Arg Ser Ser Ser Arg Arg Ser Arg Arg  
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽

<400> 10

Arg Thr Thr Thr Arg Arg Thr Arg Arg  
1 5

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽

<300>

<301> Sakiyama 等人,

<302> 利用细菌随机肽库选择的新型亲和标签在提高吸附于聚苯乙烯表面的谷胱甘肽S-转移酶的活性保持率中的应用 (Use of a novel affinity tag selected with a bacterial random peptide library for improving activity retention of glutathione S-transferase adsorbed on a polystyrene surface )

<303> 分子催化杂志, B辑: 酶催化 (Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic)

[0004]

<304> 28  
 <305> 4-6  
 <306> 207-214  
 <400> 11  
 Lys Gly Leu Arg Gly Trp Arg Glu Met Ile Ser Leu  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽  
 <300>  
 <301> kumada 等人,  
 <302> 对用于定向固定化蛋白的聚苯乙烯支持体具有特异亲和性的肽标签的筛选及特征分析 (Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of proteins)  
 <303> 生物技术进展 (Biotechnology Progress)  
 <304> 22  
 <305> 2  
 <306> 401-405  
 <400> 12  
 Ala Asp Tyr Leu Ser Arg Trp Gly Ser Ile Arg Asn  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽  
 <300>  
 <301> kumada 等人,  
 <302> 对用于定向固定化蛋白的聚苯乙烯支持体具有特异亲和性的肽标签的筛选及特征分析 (Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of proteins)  
 <303> 生物技术进展 (Biotechnology Progress)  
 <304> 22  
 <305> 2  
 <306> 401-405  
 <400> 13  
 Ser Arg Val His Arg Ala Val Leu Asn Gly Val Ser  
 1 5 10

<210> 14  
 <211> 12

[0005]

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽  
 <300>  
 <301> kumada 等人,  
 <302> 对用于定向固定化蛋白的聚苯乙烯支持体具有特异亲和性的肽标签的筛选及特征分析 (Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of proteins)  
 <303> 生物技术进展 (Biotechnology Progress)  
 <304> 22  
 <305> 2  
 <306> 401-405  
 <400> 14  
 Arg Pro Pro Gly Val Val Arg Arg Tyr Ala Leu Gly  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽  
 <300>  
 <301> kumada 等人,  
 <302> 对用于定向固定化蛋白的聚苯乙烯支持体具有特异亲和性的肽标签的筛选及特征分析 (Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of proteins)  
 <303> 生物技术进展 (Biotechnology Progress)  
 <304> 22  
 <305> 2  
 <306> 401-405  
 <400> 15  
 Val Arg Ser Trp Glu Glu Gln Ala Arg Val Thr Thr  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽  
 <300>  
 <301> kumada 等人,  
 <302> 对用于定向固定化蛋白的聚苯乙烯支持体具有特异亲和性的肽标签的筛选及特征分析 (Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of  
 [0006]

proteins)

<303> 生物技术进展 (Biotechnology Progress)

<304> 22

<305> 2

<306> 401-405

<400> 16

Arg Ala Phe Ile Ala Ser Arg Arg Ile Lys Arg Pro

1

5

10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽

<300>

<301> kumada 等人,

<302> 对用于定向固定化蛋白的聚苯乙烯支持体具有特异亲和性的肽标签的筛选及特征分析 (Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of proteins)

<303> 生物技术进展 (Biotechnology Progress)

<304> 22

<305> 2

<306> 401-405

<400> 17

Arg Glu Ser Thr Leu Lys Gly Thr Ser Arg Ala Val

1

5

10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽

<300>

<301> kumada 等人,

<302> 对用于定向固定化蛋白的聚苯乙烯支持体具有特异亲和性的肽标签的筛选及特征分析 (Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of proteins)

<303> 生物技术进展 (Biotechnology Progress)

<304> 22

<305> 2

<306> 401-405

<400> 18

Ala Gly Leu Arg Leu Lys Lys Ala Ala Ile His Arg

1

5

10

[0007]

<210> 19  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽  
 <300>  
 <301> kumada 等人,  
 <302> 对用于定向固定化蛋白的聚苯乙烯支持体具有特异亲和性的肽标签的筛选及特征分析 (Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of proteins)  
 <303> 生物技术进展 (Biotechnology Progress)  
 <304> 22  
 <305> 2  
 <306> 401-405  
 <400> 19  
 Ser Ser Leu Leu Arg Ala Val Pro Glu Pro Thr Gly  
 1 5 10

<210> 20  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的肽  
 <300>  
 <301> kumada 等人,  
 <302> 使用对亲水性聚苯乙烯表面具有特异亲和性的肽标签的一步ELISA法的发展 (Development of a one-step ELISA method using an affinity peptide tag specific to a hydrophilic polystyrene surface)  
 <303> 生物技术杂志 (Journal of Biotechnology)  
 <304> 127  
 <305> 2  
 <306> 288-299  
 <400> 20  
 Arg Ala Phe Ile Ala Ser Arg Arg Ile Arg Arg Pro  
 1 5 10

<210> 21  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220> CDS  
 <223> 合成DNA  
 <400> 21  
 cgt atc atc atc cga agg att cga cga  
 Arg Ile Ile Ile Arg Arg Ile Arg Arg

[0008]

<210> 22  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220> CDS  
 <223> 合成DNA  
 <400> 22

cgt gcg att gcg cga agg att cga cga  
 Arg Ala Ile Ala Arg Arg Ile Arg Arg

<210> 23  
 <211> 265  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 单链抗体  
 <400> 23

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Ser | Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Leu | Ser | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Phe | Asn | Ile |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Lys | Asp | Tyr | Tyr | Met | His | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Thr | Glu | Gln | Gly | Leu |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Glu | Trp | Ile | Gly | Arg | Ile | Asp | Pro | Glu | Asp | Gly | Glu | Thr | Lys | Tyr | Ala |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Pro | Lys | Phe | Gln | Gly | Lys | Ala | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Thr | Ser | Ser | Asn |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Tyr | Tyr | Gly | Ser | Glu | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Ser | Leu | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Thr | Gly | Ser | Ile | Val | Met | Thr |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Gln | Ser | His | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Ser | Ile |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Thr | Cys | Lys | Ala | Ser | Gln | Asp | Val | Asn | Thr | Ala | Val | Ala | Trp | Tyr | Gln |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Trp | Ala | Ser | Thr |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Arg | His | Thr | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly | Ser | Gly | Phe | Gly | Thr |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Asp | Tyr | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Gln | Ala | Glu | Asp | Leu | Ala | Leu |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | His | Tyr | Ser | Thr | Pro | Trp | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | Ala | Asp | Ala | Ala | Pro | Thr | Val | Ala | Ala |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |

[0009]

Ala Leu Glu His His His His His His  
260 265

<210> 24  
<211> 269  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 单链抗体  
<400> 24

Met Ala Ser Glu Val Lys Leu Met Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
1 5 10 15  
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
20 25 30  
Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu  
35 40 45  
Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro  
50 55 60  
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
65 70 75 80  
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met  
85 90 95  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp  
100 105 110  
Gly Ala Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
115 120 125  
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Met Ser  
130 135 140  
Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile  
145 150 155 160  
Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met  
165 170 175  
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys  
180 185 190  
Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
195 200 205  
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu  
210 215 220  
Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr  
225 230 235 240  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
245 250 255  
Thr Val Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His  
260 265

<210> 25  
<211> 265  
<212> PRT  
<213> 人工序列

[0010]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 单链抗体

&lt;400&gt; 25

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Ser | Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Leu | Ser | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Phe | Asn | Ile |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Lys | Asp | Tyr | Tyr | Met | His | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Thr | Glu | Gln | Gly | Leu |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Glu | Trp | Ile | Gly | Arg | Ile | Asp | Pro | Glu | Asp | Gly | Glu | Thr | Lys | Tyr | Ala |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Pro | Lys | Phe | Gln | Gly | Lys | Ala | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Thr | Ser | Ser | Asn |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asn | Thr | Ala | Val |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Tyr | Tyr | Gly | Ser | Glu | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Arg | Gly | Gly | Ser | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Thr | Gly | Asp | Ile | Leu | Met | Thr |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Gln | Ser | His | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Ser | Ile |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Thr | Cys | Lys | Ala | Ser | Gln | Asp | Val | Ser | Thr | Ala | Val | Ala | Trp | Tyr | Gln |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Trp | Ala | Ser | Thr |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Arg | His | Thr | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Asp | Tyr | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Gln | Ala | Glu | Asp | Leu | Ala | Leu |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | His | Tyr | Ser | Thr | Pro | Trp | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | Ala | Asp | Ala | Ala | Pro | Thr | Val | Ala | Ala |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ala | Leu | Glu | His | His | His | His | His | His | His |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体

&lt;400&gt; 26

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Ser | Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Leu | Ser | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Phe | Asn | Ile |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

[0011]

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Ala  
 50 55 60  
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Glu Ala Met Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Gly Ser Ile Val Met Thr  
 130 135 140  
 Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile  
 145 150 155 160  
 Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln  
 165 170 175  
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr  
 180 185 190  
 Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Phe Gly Thr  
 195 200 205  
 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu  
 210 215 220  
 Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ala Ala  
 245 250 255  
 Ala Arg Ile Ile Ile Arg Arg Ile Arg Arg Ile Glu His His His His  
 260 265 270  
 His His

<210> 27

<211> 278

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体

<400> 27

Met Ala Ser Glu Val Lys Leu Met Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 1 5 10 15  
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 20 25 30  
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu  
 35 40 45  
 Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro  
 50 55 60  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

[0012]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Ser | Ser | Leu | Lys | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Met |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Gly | Arg | Leu | Arg | Leu | Tyr | Phe | Asp | Val | Trp |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Ala | Gly | Thr | Ser | Leu | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Thr | Gly | Asp | Ile | Val | Met | Ser |
|     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Gln | Ser | Pro | Ala | Ser | Leu | Ala | Val | Ser | Leu | Gly | Gln | Arg | Ala | Thr | Ile |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ser | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Ser | Val | Ser | Thr | Ser | Ser | Tyr | Ser | Tyr | Met |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| His | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Pro | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Lys |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |
| Tyr | Ala | Ser | Asn | Leu | Glu | Ser | Gly | Val | Pro | Ala | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Asn | Ile | His | Pro | Val | Glu | Glu | Glu |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Asp | Thr | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | His | Ser | Trp | Glu | Ile | Pro | Tyr | Thr |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | Ala | Asp | Ala | Ala | Pro |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Thr | Val | Ala | Ala | Ala | Arg | Ile | Ile | Ile | Arg | Arg | Ile | Arg | Arg | Ile | Glu |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| His | His | His | His | His | His |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     | 275 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体

&lt;400&gt; 28

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Ser | Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Leu | Ser | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Phe | Asn | Ile |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Lys | Asp | Tyr | Tyr | Met | His | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Thr | Glu | Gln | Gly | Leu |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Glu | Trp | Ile | Gly | Arg | Ile | Asp | Pro | Glu | Asp | Gly | Glu | Thr | Lys | Tyr | Ala |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Pro | Lys | Phe | Gln | Gly | Lys | Ala | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Thr | Ser | Ser | Asn |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asn | Thr | Ala | Val |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Tyr | Tyr | Gly | Ser | Glu | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp |

[0013]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Arg | Gly | Gly | Ser | Gly |  |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |  |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Thr | Gly | Asp | Ile | Leu | Met | Thr |  |
|     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |  |
| Gln | Ser | His | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Ser | Ile |  |
|     |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |  |
| Thr | Cys | Lys | Ala | Ser | Gln | Asp | Val | Ser | Thr | Ala | Val | Ala | Trp | Tyr | Gln |  |
|     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |  |
| Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Trp | Ala | Ser | Thr |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     |     | 190 |  |
| Arg | His | Thr | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr |  |
|     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |  |
| Asp | Tyr | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Gln | Ala | Glu | Asp | Leu | Ala | Leu |  |
|     |     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |  |
| Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | His | Tyr | Ser | Thr | Pro | Trp | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly |  |
|     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |  |
| Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | Ala | Asp | Ala | Ala | Pro | Thr | Val | Ala | Ala |  |
|     |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |  |
| Ala | Arg | Ile | Ile | Ile | Arg | Arg | Ile | Arg | Arg | Ile | Glu | His | His | His | His |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |  |
| His | His |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体

&lt;400&gt; 29

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Met | Ala | Ser | Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Lys |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
| Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Leu | Ser | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Phe | Asn | Ile |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
| Lys | Asp | Tyr | Tyr | Met | His | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Thr | Glu | Gln | Gly | Leu |  |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
| Glu | Trp | Ile | Gly | Arg | Ile | Asp | Pro | Glu | Asp | Gly | Glu | Thr | Lys | Tyr | Ala |  |
|     |     |     | 50  |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| Pro | Lys | Phe | Gln | Gly | Lys | Ala | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Thr | Ser | Ser | Asn |  |
|     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |  |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Tyr | Tyr | Gly | Ser | Glu | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Ser | Leu | Thr | Val | Ser | Ser | Arg | Ile | Ile | Ile | Arg | Arg |  |
|     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |  |
| Ile | Arg | Arg | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly |  |

[0014]



Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 180 185 190  
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 195 200 205  
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 210 215 220  
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 225 230 235 240  
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 245 250 255  
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ala Ala Ala Leu Glu  
 260 265 270  
 His His His His His  
 275

<210> 31

<211> 283

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体

<400> 31

Met Ala Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys  
 1 5 10 15  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
 20 25 30  
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Ala  
 50 55 60  
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Glu Ala Met Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser Arg Ile Ile Ile Arg Arg  
 115 120 125  
 Ile Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Ser Thr Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 165 170 175  
 Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 180 185 190  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
 195 200 205

[0016]

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser  
 210 215 220  
 Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 245 250 255  
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ala Ala Ala Arg Ile Ile Ile Arg Arg  
 260 265 270  
 Ile Arg Arg Ile Glu His His His His His  
 275 280

<210> 32

<211> 287

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对亲水性的固体表面具有特异亲和性的单链抗体

<400> 32

Met Ala Ser Glu Val Lys Leu Met Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 1 5 10 15  
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 20 25 30  
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu  
 35 40 45  
 Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro  
 50 55 60  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 65 70 75 80  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp  
 100 105 110  
 Gly Ala Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser Arg Ile Ile Ile Arg Arg  
 115 120 125  
 Ile Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala  
 145 150 155 160  
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 165 170 175  
 Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 180 185 190  
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 195 200 205  
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 210 215 220  
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 225 230 235 240  
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

[0017]

---

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Glu | Ile | Lys | Arg | Ala | Asp | Ala | Ala | Pro | Thr | Val | Ala | Ala | Ala | Arg | Ile |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Ile | Ile | Arg | Arg | Ile | Arg | Arg | Ile | Glu | His | His | His | His | His | His | His |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |

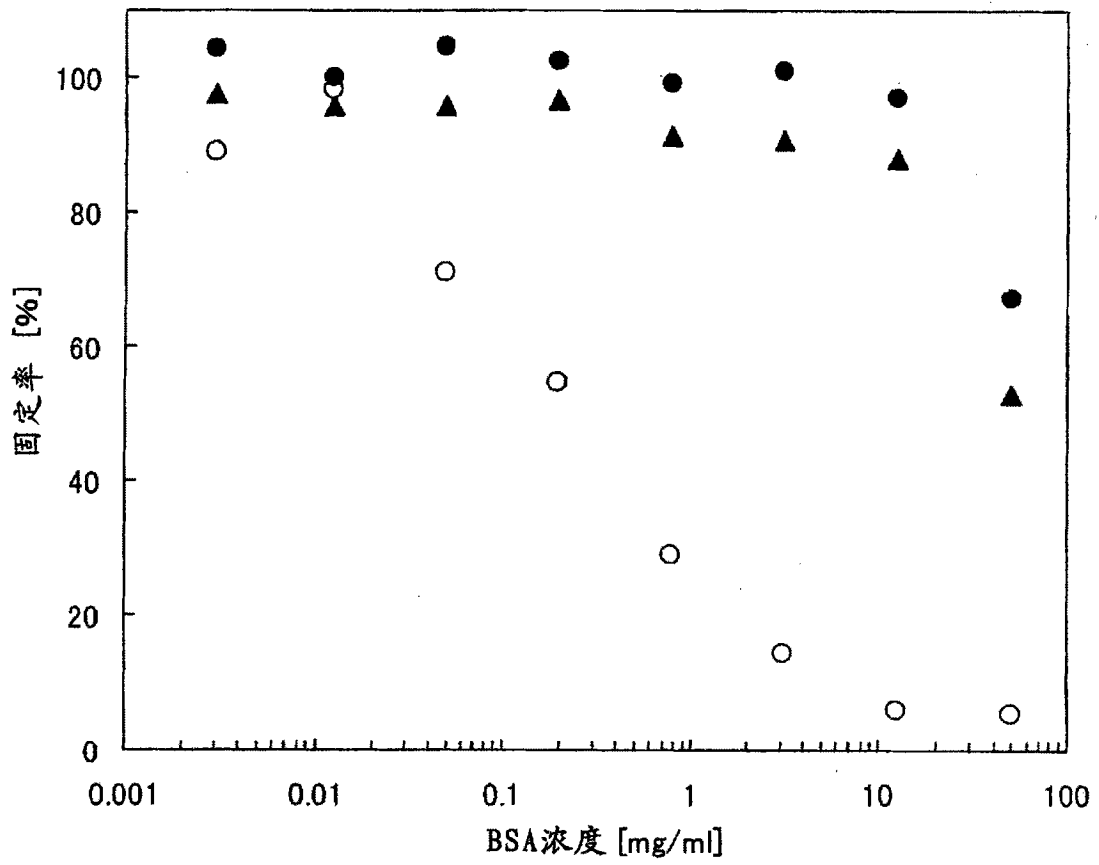


图 1

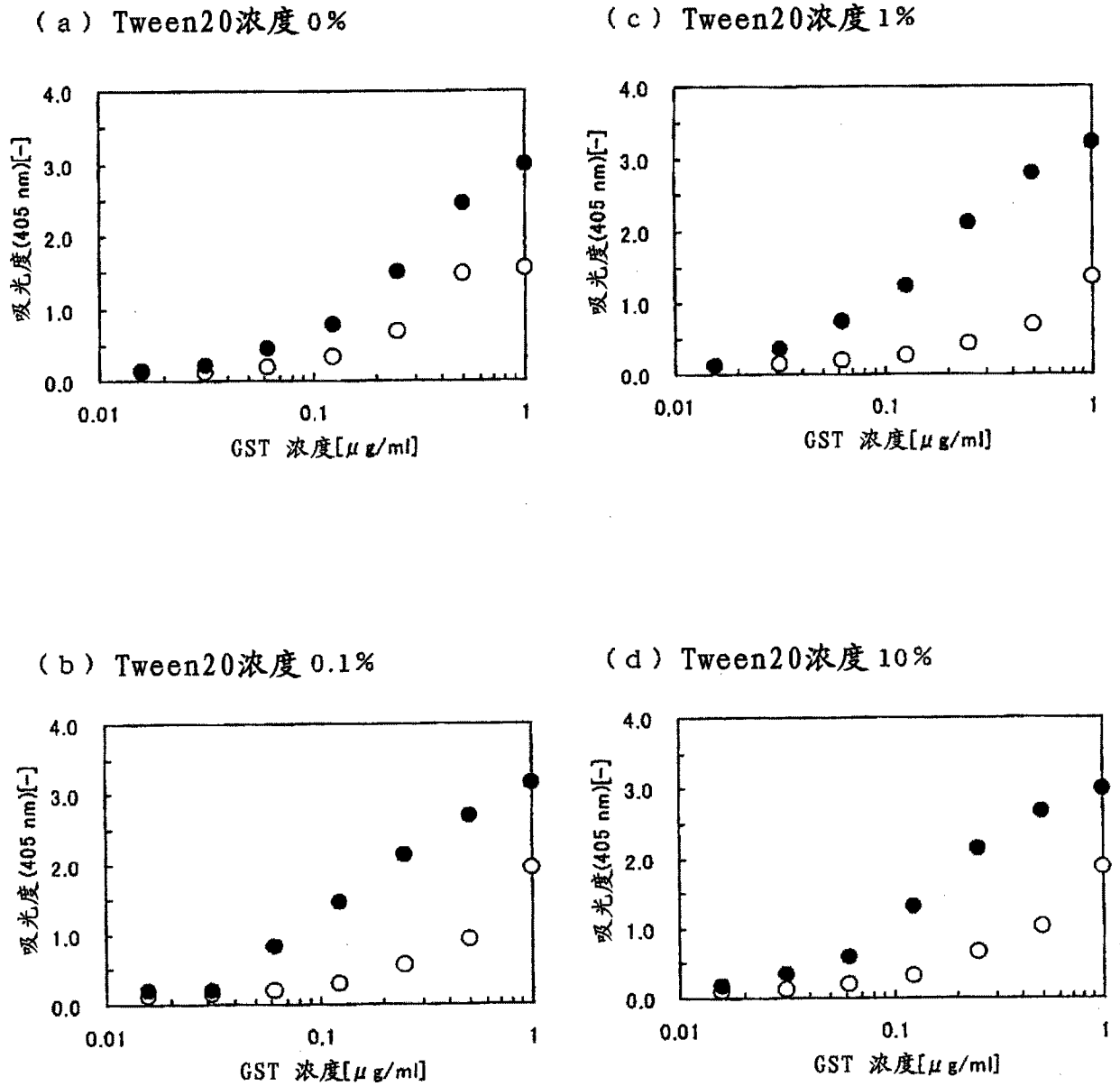


图 2

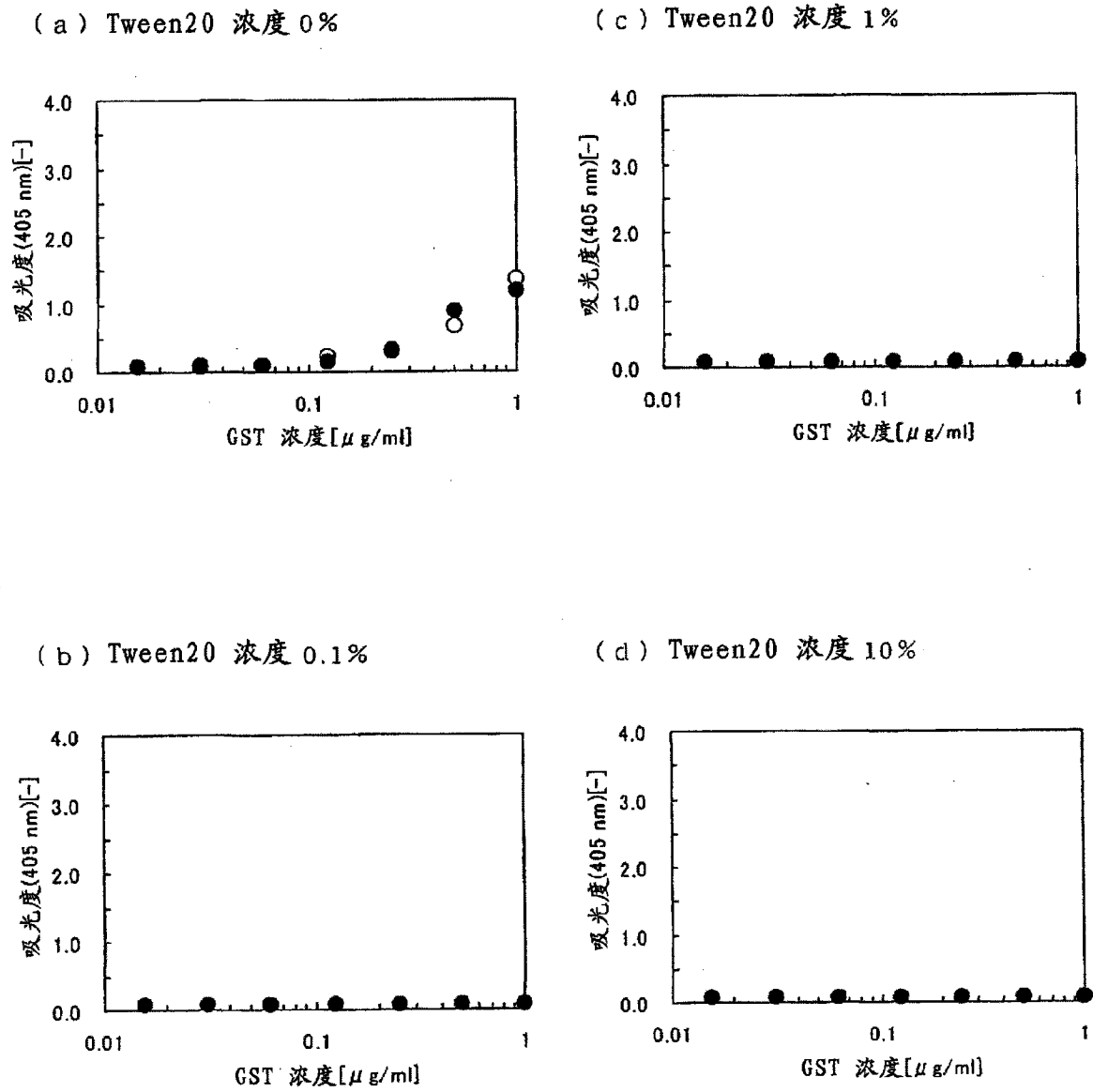


图 3

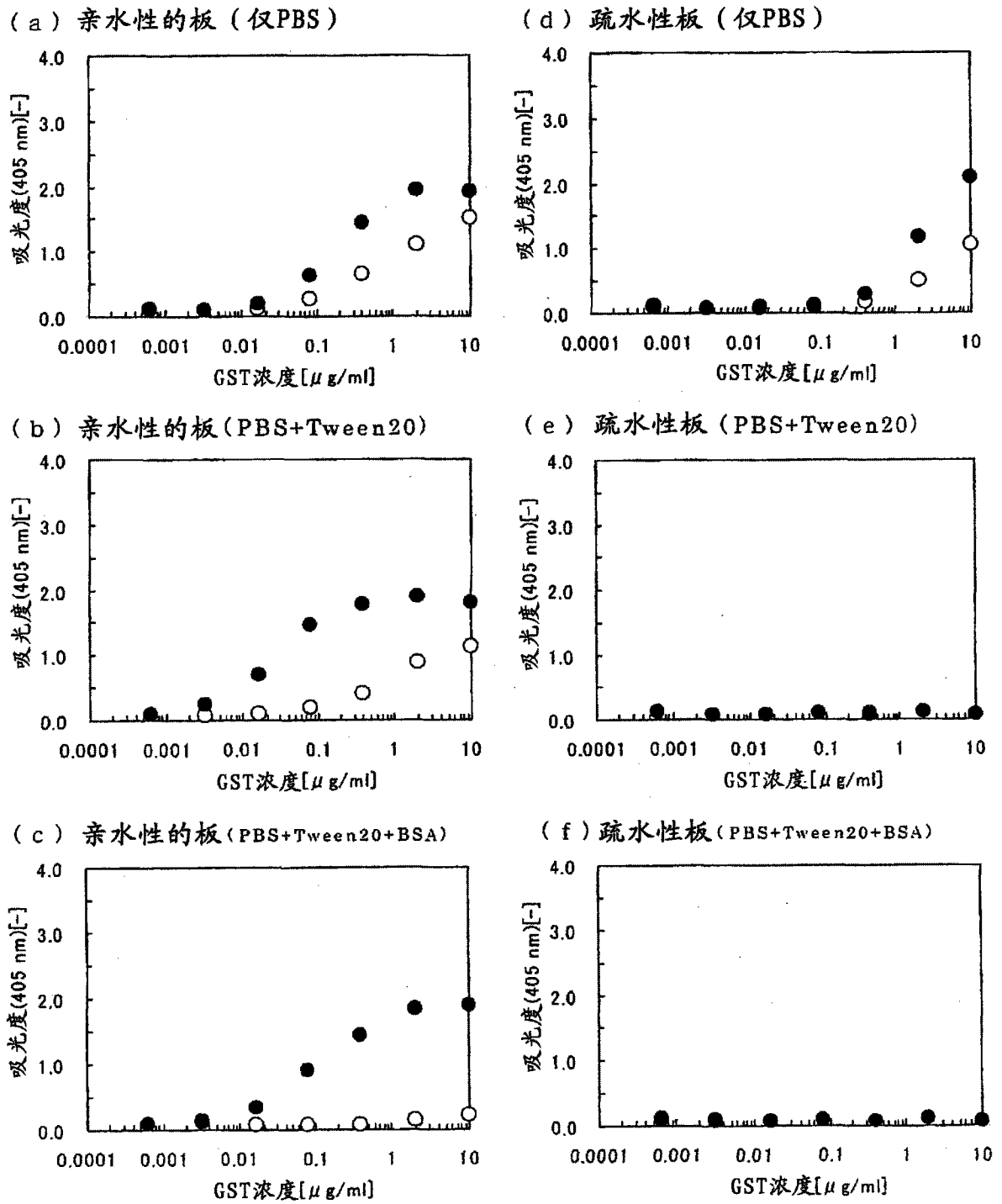
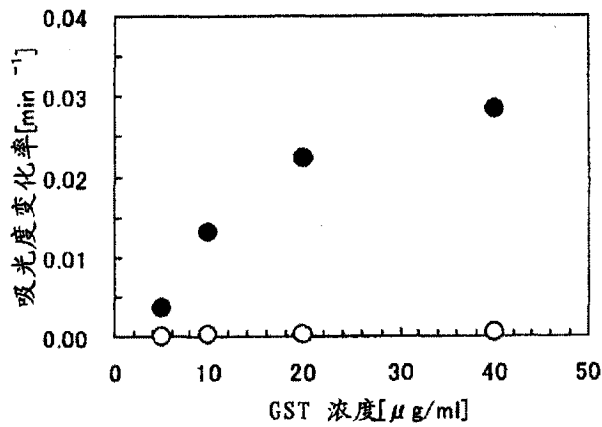
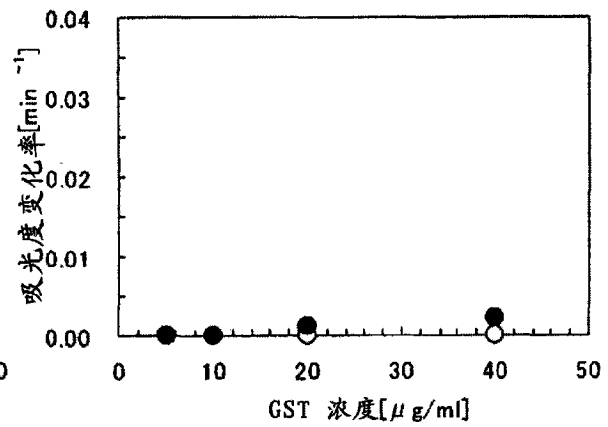


图 4

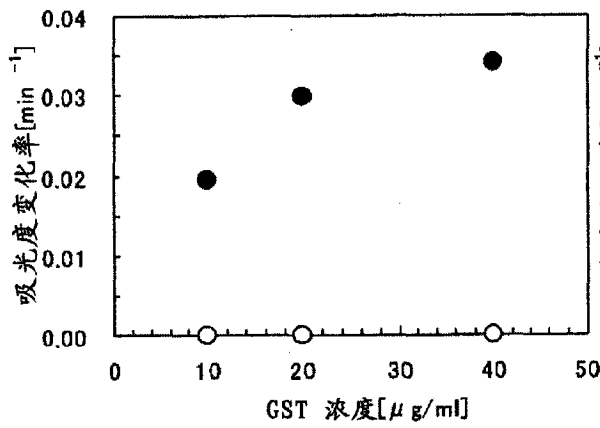
(a) 亲水性的板 (仅PBS)



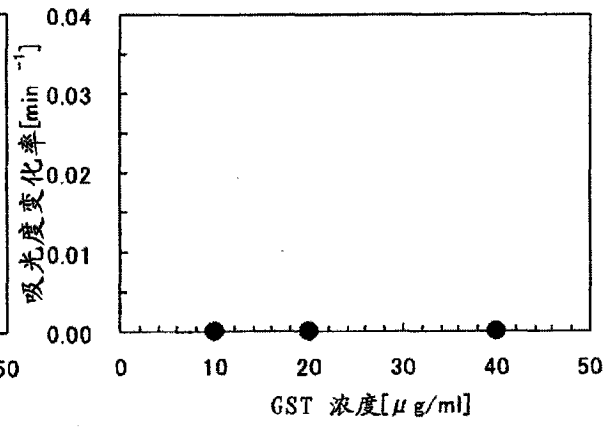
(d) 疏水性板 (仅PBS)



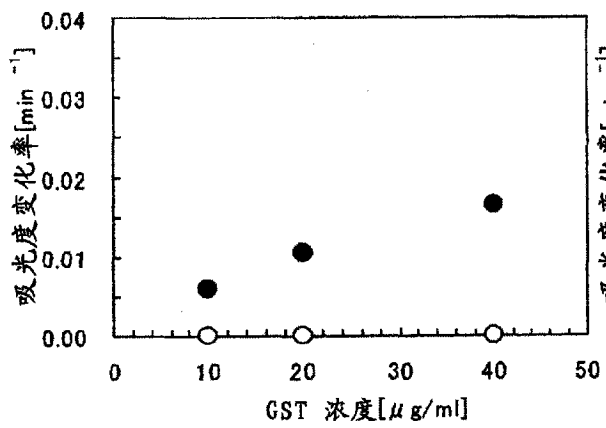
(b) 亲水性的板 (PBS+Tween20)



(e) 疏水性板 (PBS+Tween20)



(c) 亲水性的板 (PBS+Tween20+BSA)



(f) 疏水性板 (PBS+Tween20+BSA)

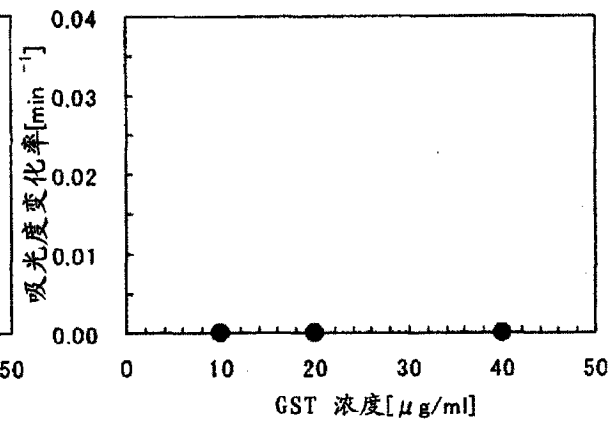


图 5

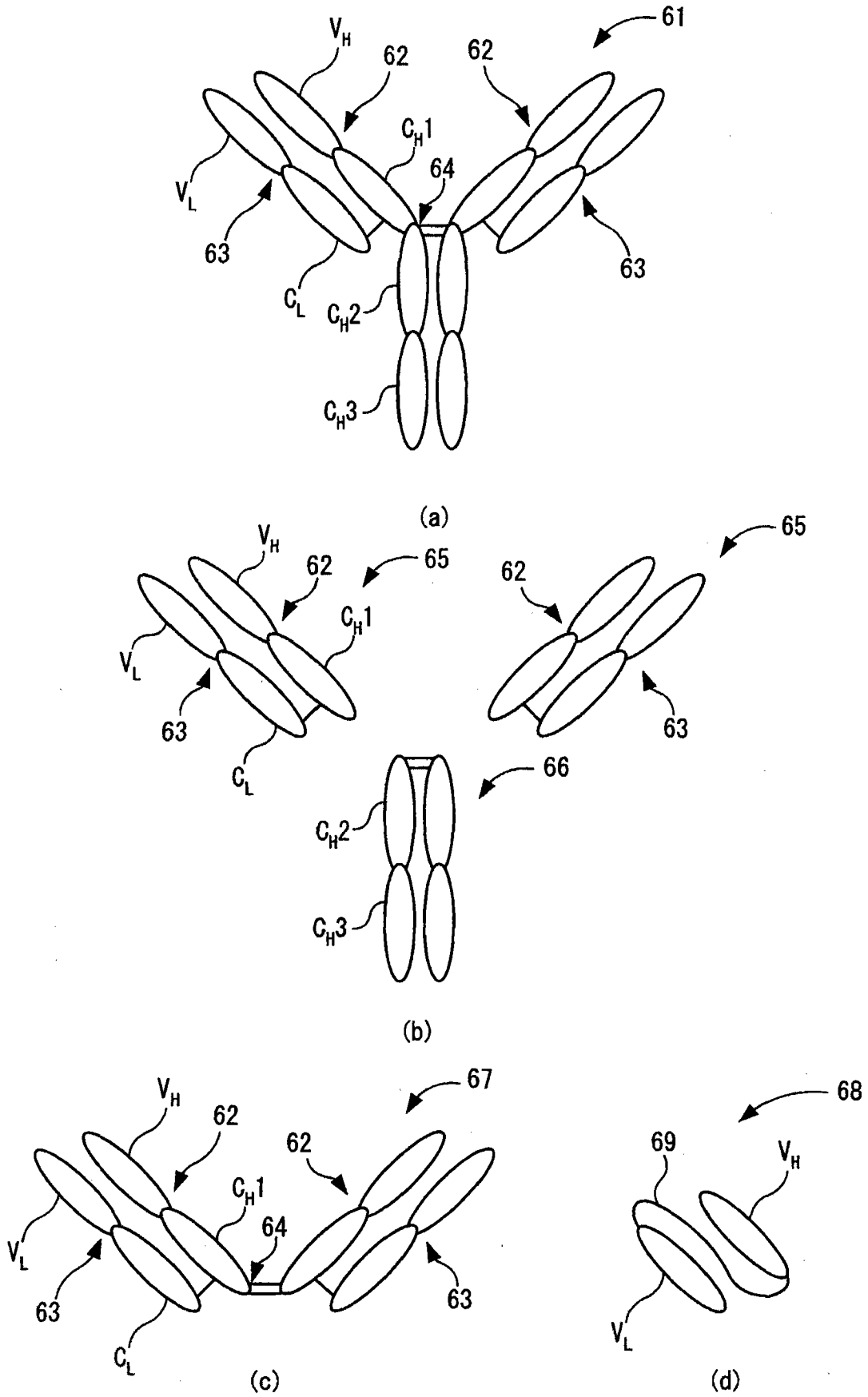


图 6

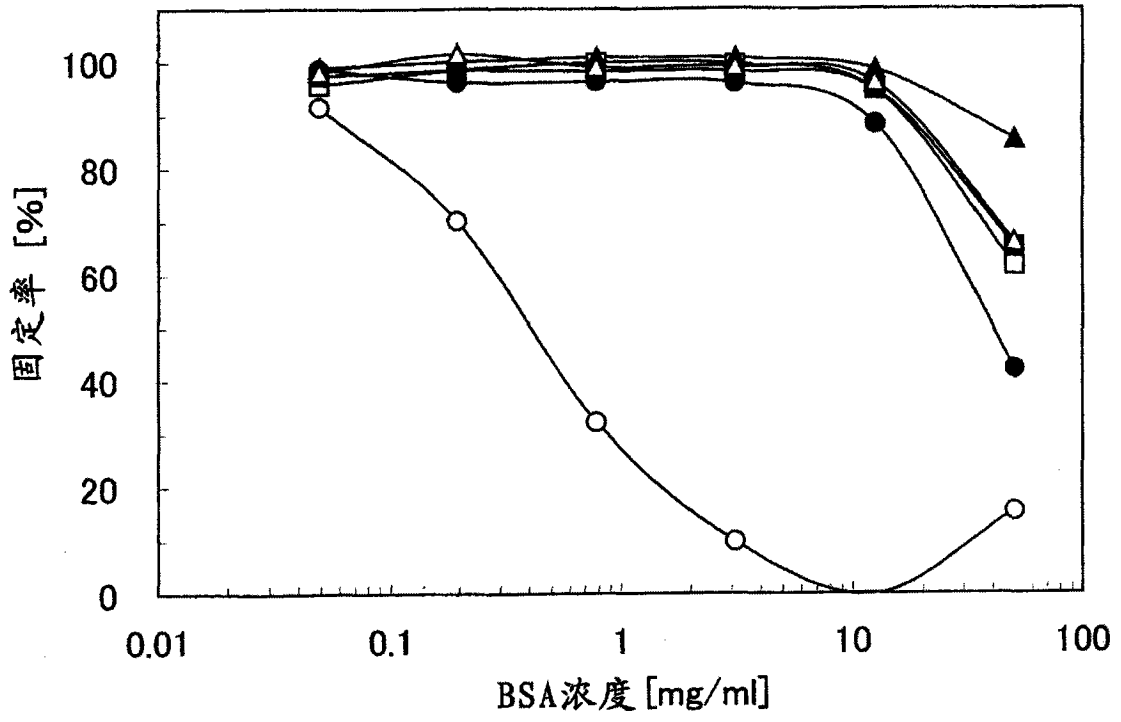


图 7

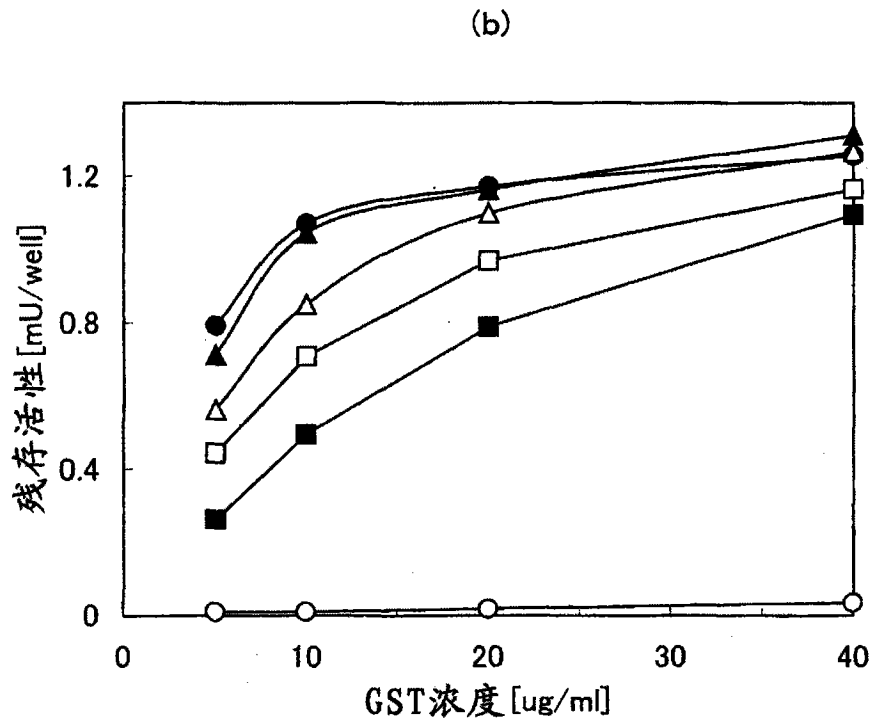
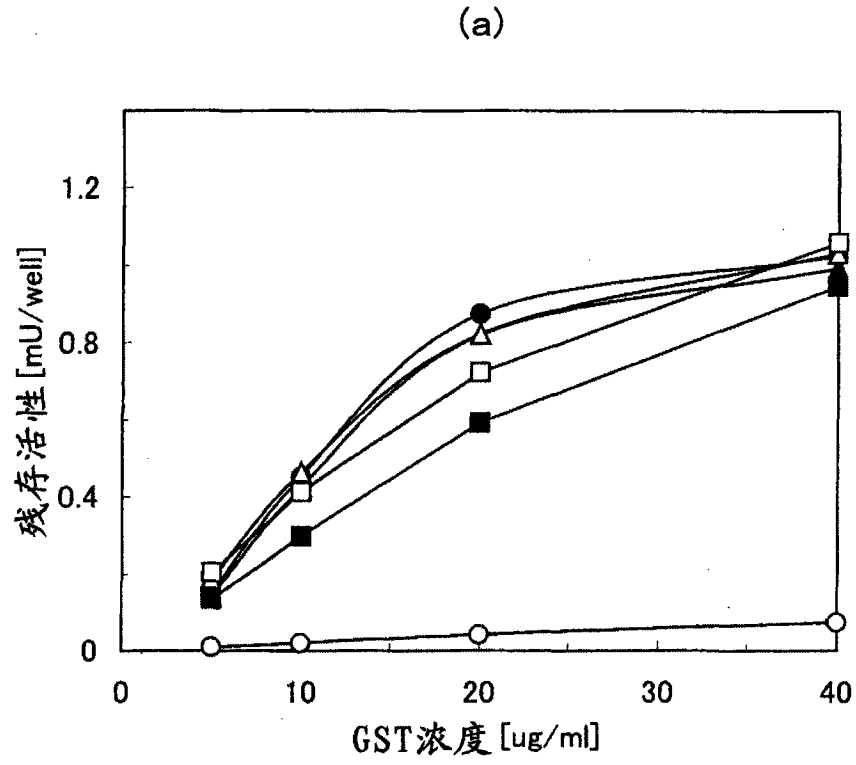


图 8

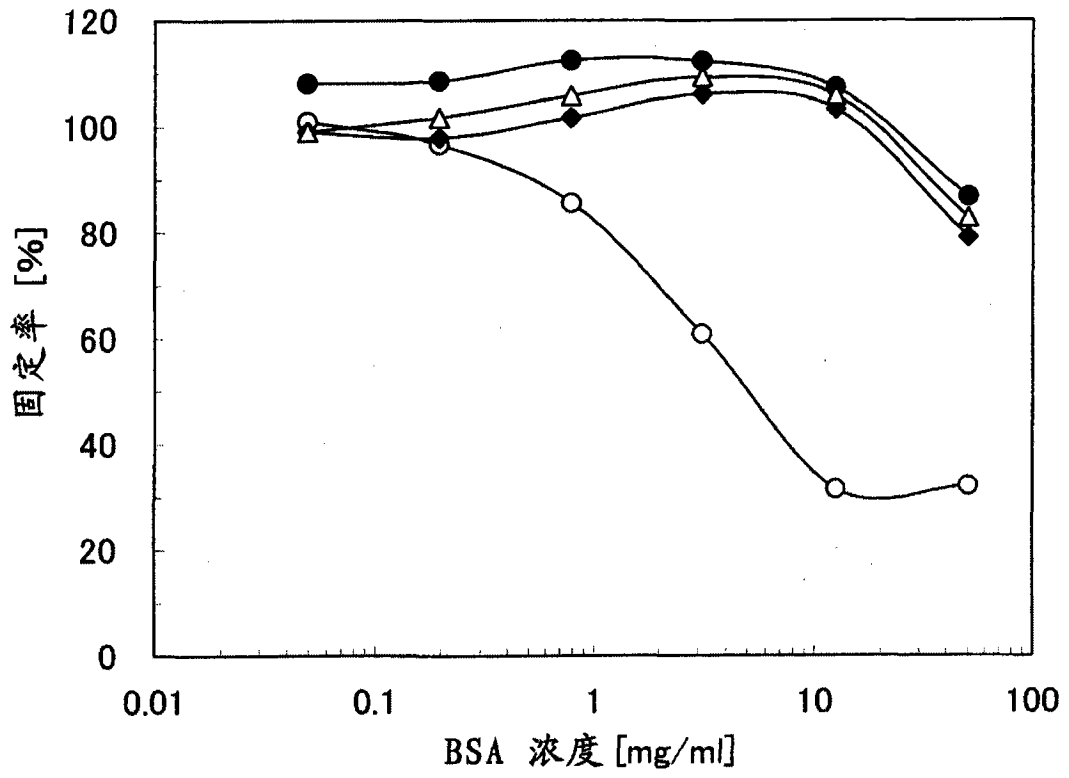


图 9

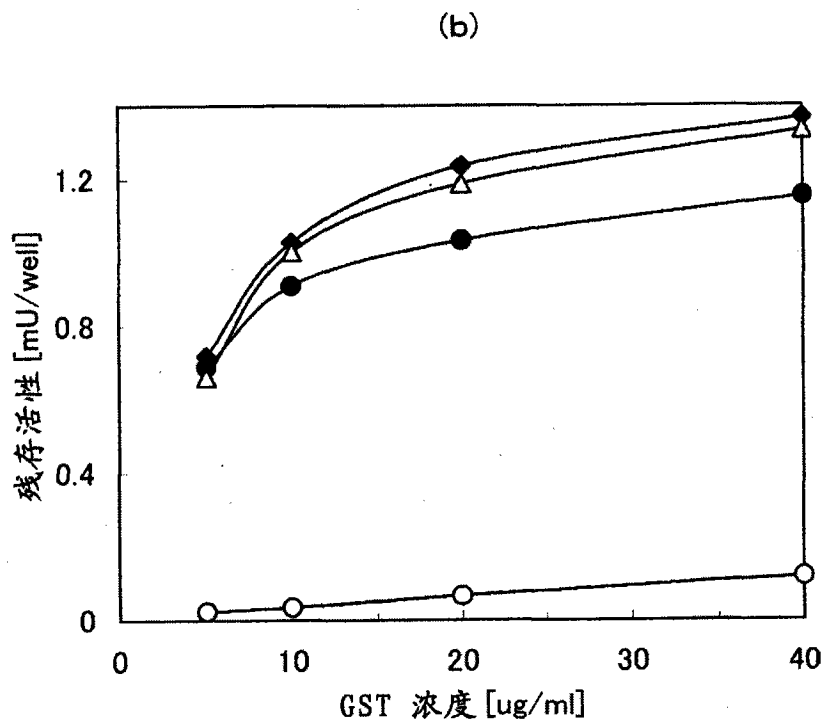
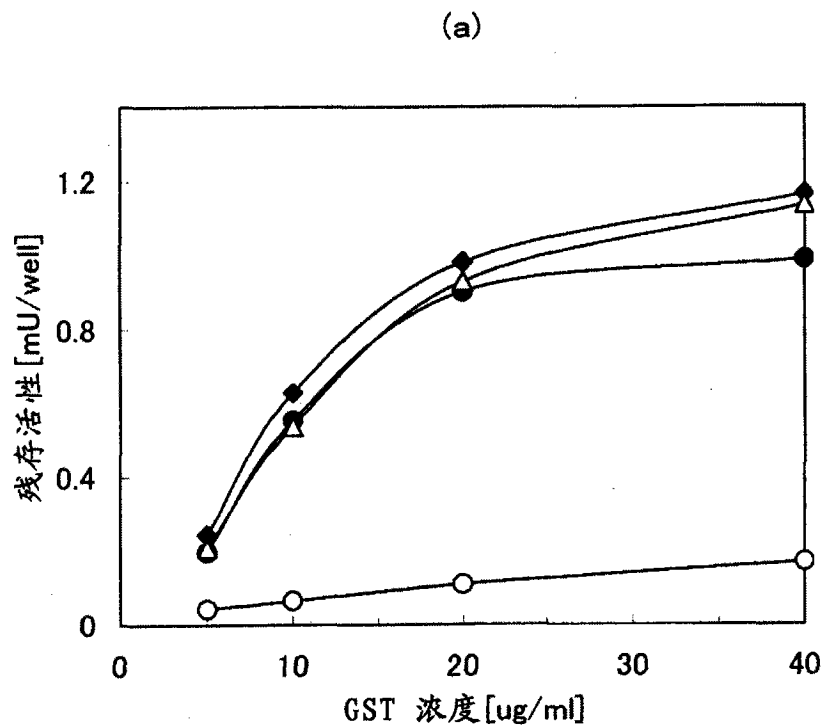


图 10

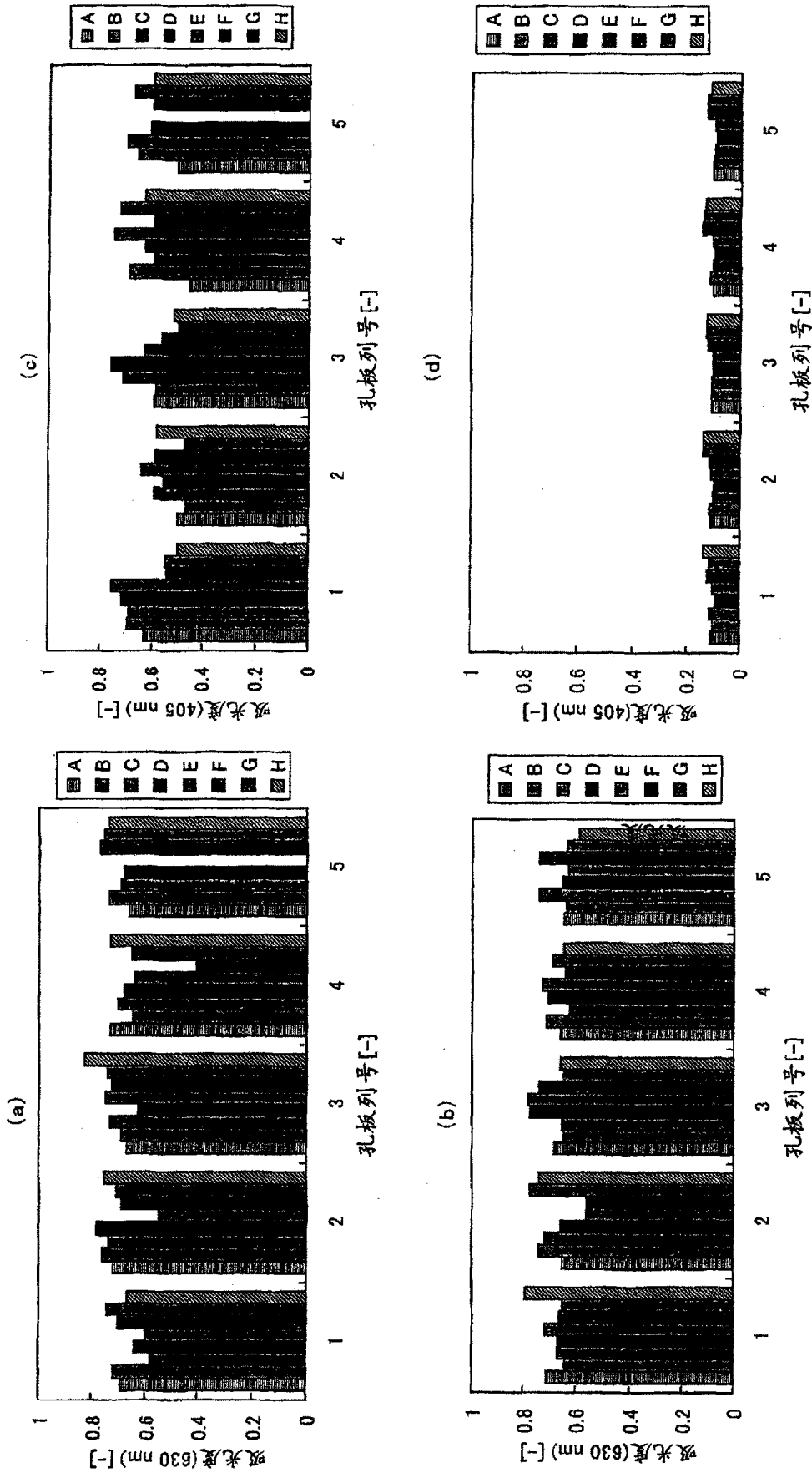


图 11

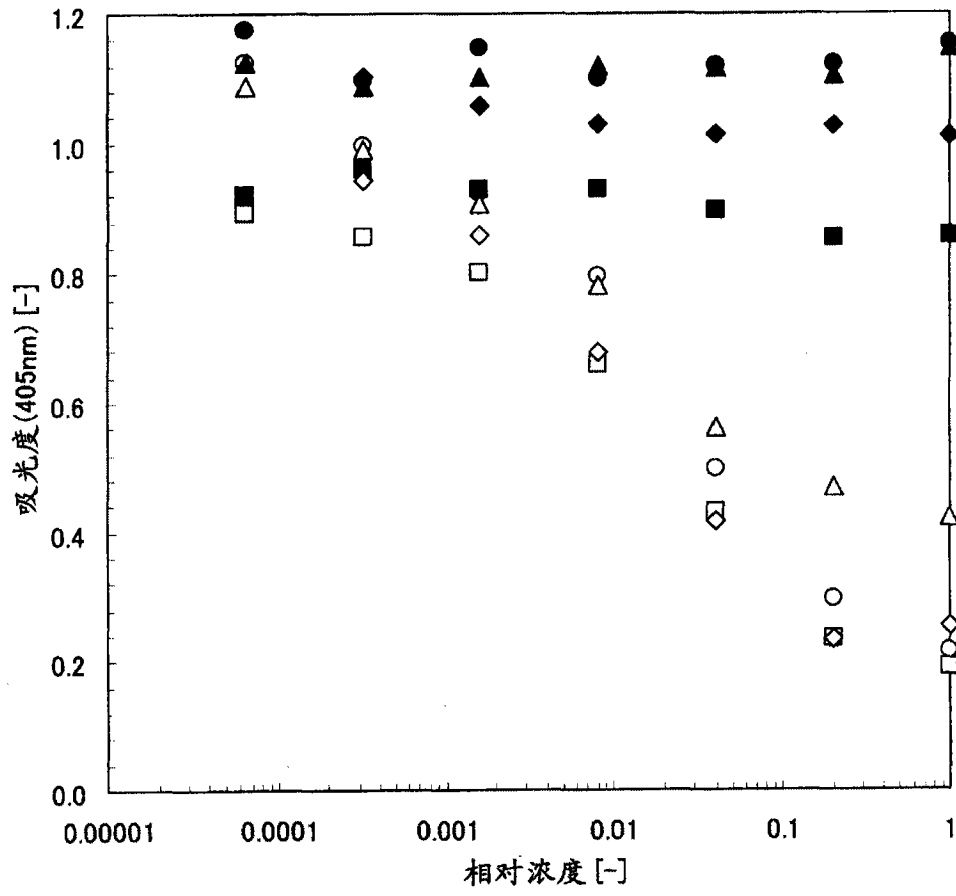


图 12

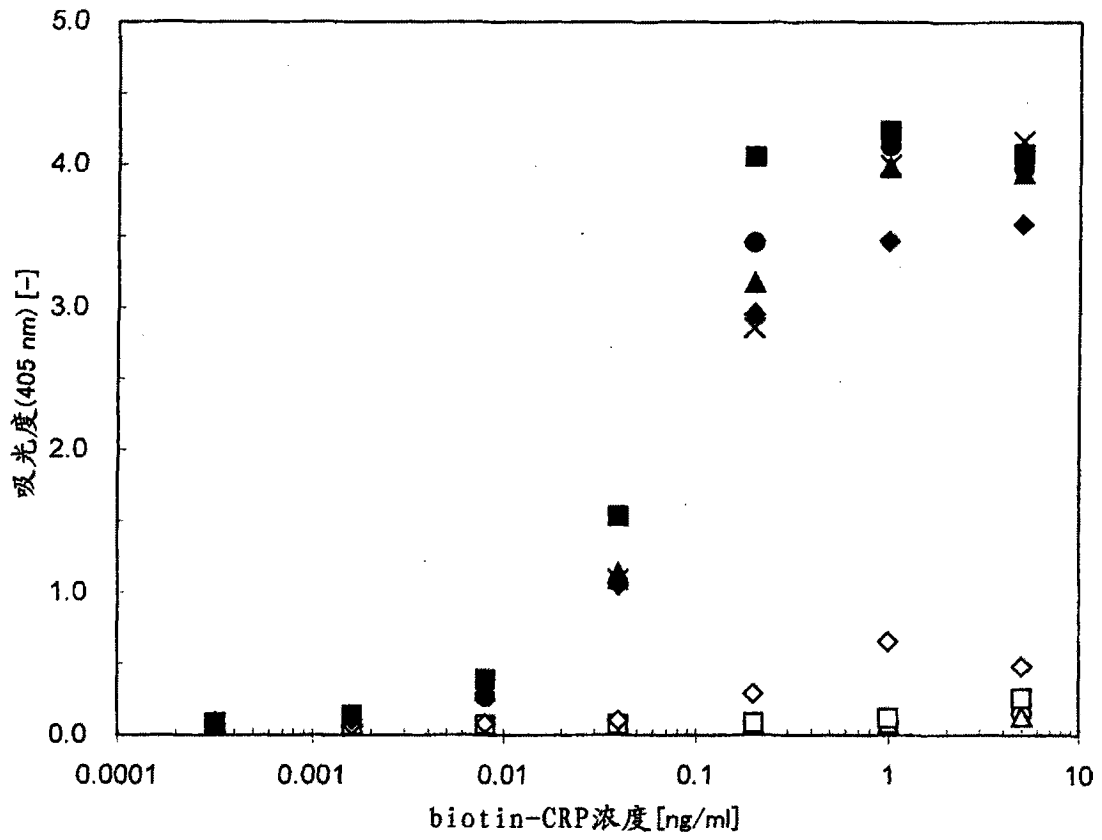


图 13

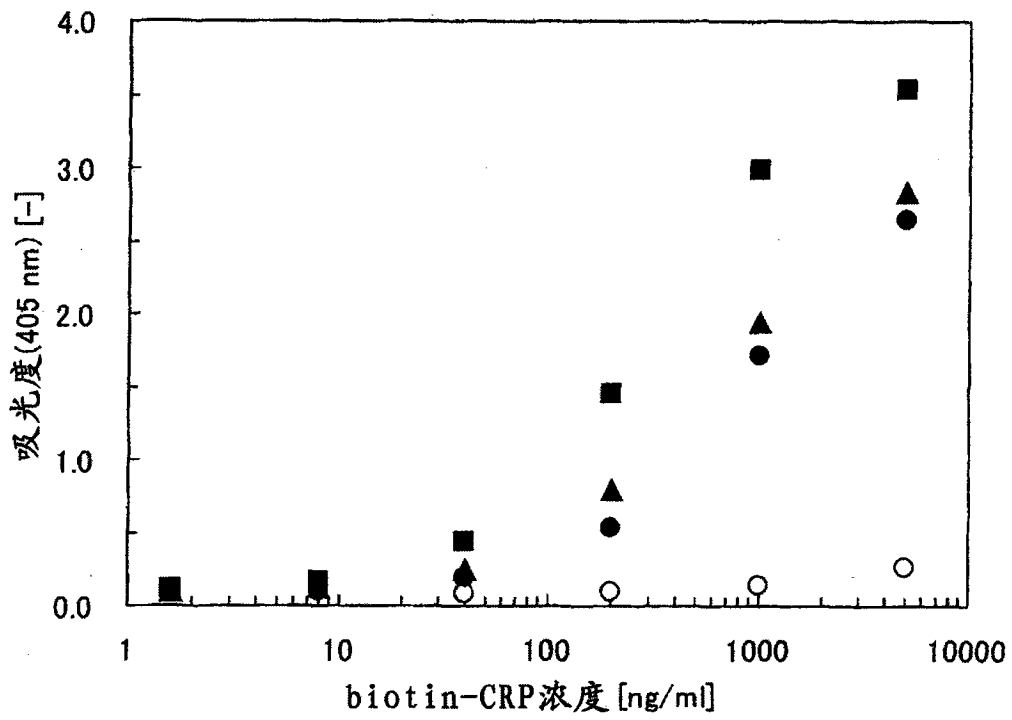


图 14

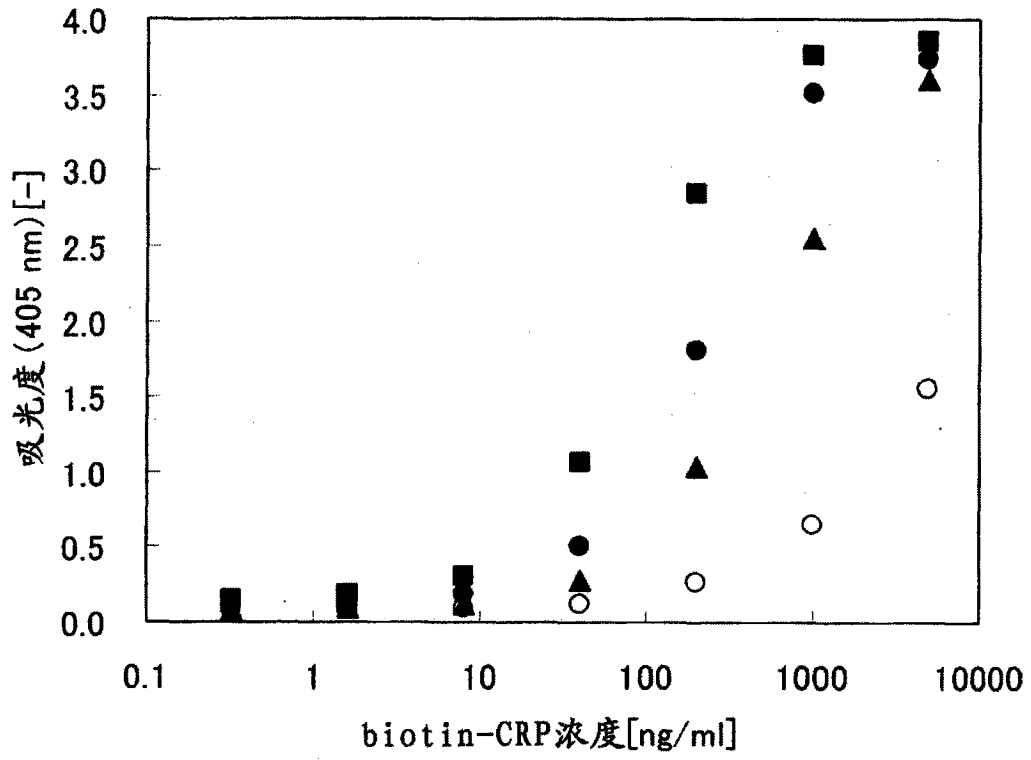


图 15

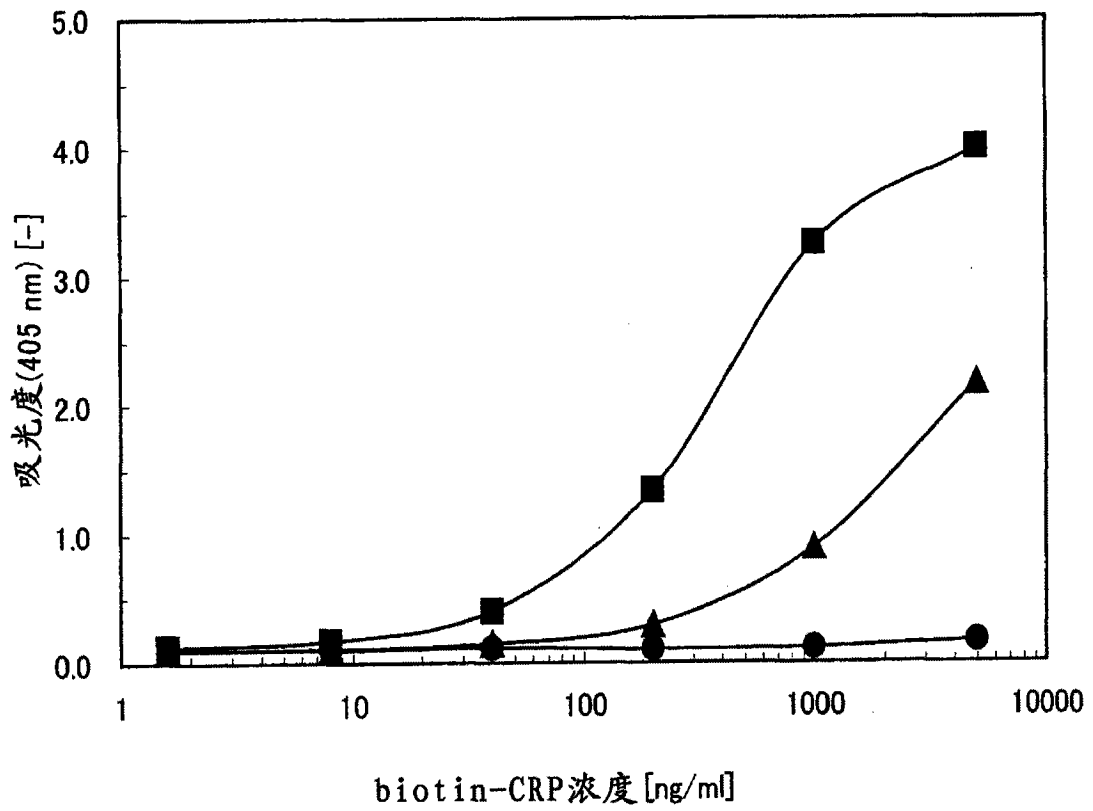


图 16

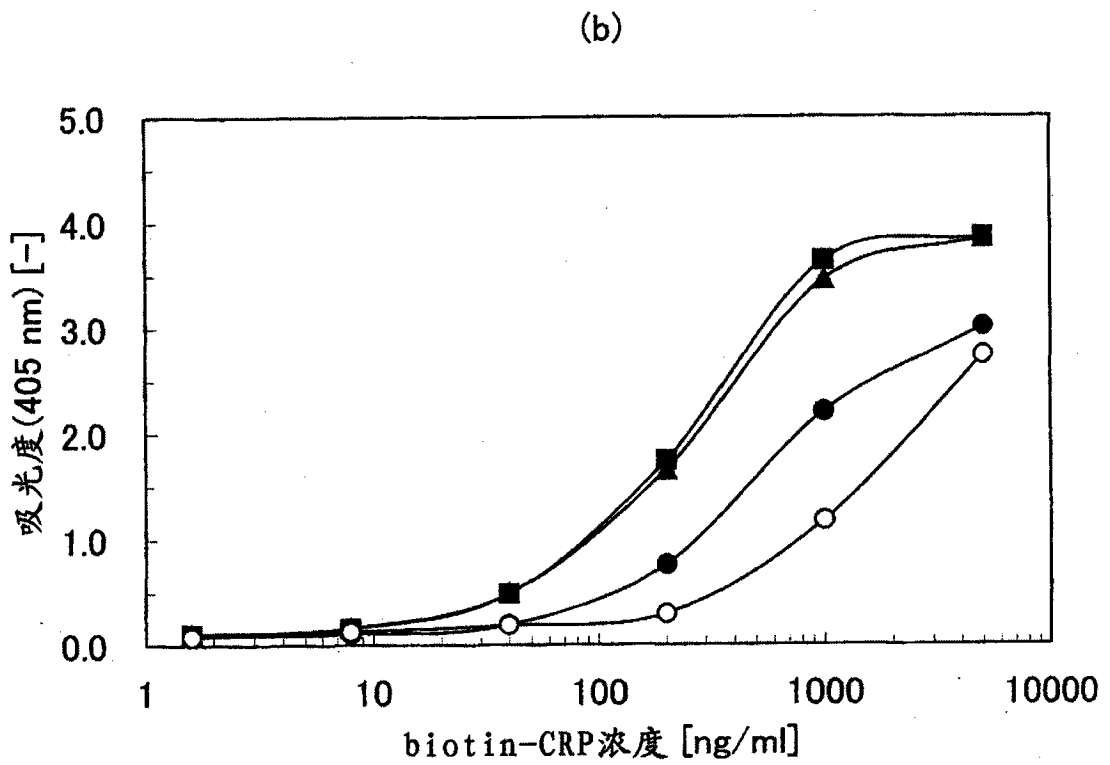
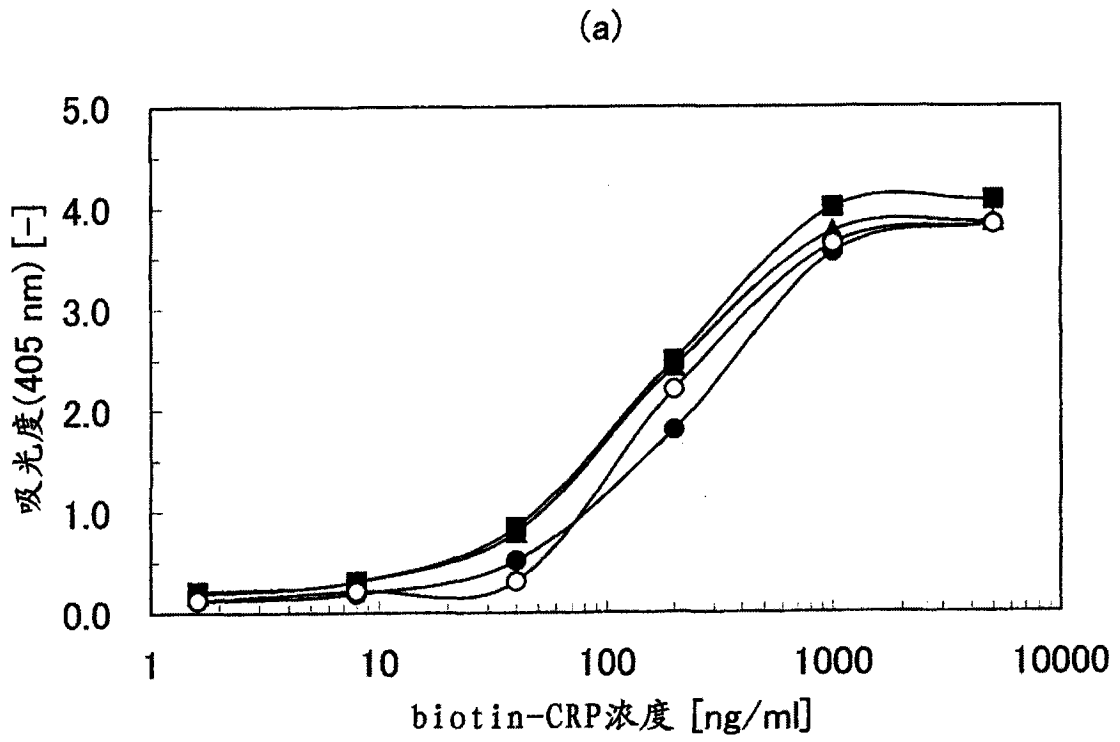


图 17

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 肽、该肽的用途和生产方法以及固定有该肽的固相和其生产方法  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101952432B</a>  | 公开(公告)日 | 2014-01-01 |
| 申请号            | CN200980105137.0  | 申请日     | 2009-02-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 恩普乐股份有限公司   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 国立大学法人京都工艺纤维大学<br>恩普乐股份有限公司   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 国立大学法人京都工艺纤维大学<br>恩普乐股份有限公司   |         |            |
| [标]发明人         | 熊田阳一<br>岸本通雅<br>尻谷优希<br>滨崎今日子<br>大濑琢人<br>小池充烈                                     |         |            |
| 发明人            | 熊田阳一<br>岸本通雅<br>尻谷优希<br>滨崎今日子<br>大濑琢人<br>小池充烈                                     |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 C07K7/06 C07K17/02 C12N11/00 G01N33/53 G01N33/543                       |         |            |
| CPC分类号         | C07K17/02 C12N11/08 G01N33/6857 C12N11/06 C07K7/06 C07K17/08 C07K2319/20 C07K7/08 |         |            |
| 代理人(译)         | 钟晶  |         |            |
| 优先权            | 2008033135 2008-02-14 JP<br>2008246068 2008-09-25 JP                              |         |            |
| 其他公开文献         | CN101952432A  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                    |         |            |

摘要(译)

本发明提供一种包含可变区的肽，其能提高生产效率。该肽包含能形成抗原结合部位的可变区，在比重链的可变区靠近C末端一侧或比轻链的可变区靠近C末端一侧，具有对固相表现出特异性吸附功能的氨基酸序列。

