

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-544508

(P2013-544508A)

(43) 公表日 平成25年12月19日(2013.12.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4B064
C07K 14/31 (2006.01)	C07K 14/31	4B065
C12N 5/071 (2010.01)	C12N 5/00 2O2A	4H045
C12N 5/07 (2010.01)	C12N 5/00 2O2Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-535399 (P2013-535399)
 (86) (22) 出願日 平成23年10月25日 (2011.10.25)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年6月21日 (2013.6.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/068626
 (87) 国際公開番号 W02012/055854
 (87) 国際公開日 平成24年5月3日 (2012.5.3)
 (31) 優先権主張番号 10189059.8
 (32) 優先日 平成22年10月27日 (2010.10.27)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 511250345
 スパイバー テクノロジーズ アーバー
 SPIBER TECHNOLOGIES
 AB
 スウェーデン国 ウプスラ エスー751
 23, フーサガータン 3, ボック
 ス 575
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 ヘドハンマル, ミュー
 スウェーデン国 ストックホルム エスー
 113 51, オーデンガタン 40

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有機ターゲットに結合するためのクモ糸融合タンパク質構造

(57) 【要約】

有機ターゲットとの選択的相互作用が可能であるタンパク質構造が提供される。タンパク質構造は、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である組換え融合タンパク質を反復構造単位として含むポリマーである。融合タンパク質は部分B、REP及びCT、及び任意でNTを含んでいる。Bは30アミノ酸残基を超える非スピドリン部分であり、有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を提供する。REPは70から300アミノ酸残基からなる部分で、クモ糸タンパク質の反復断片に由来する。CTは70から120アミノ酸残基からなる部分で、クモ糸タンパク質のC末端断片に由来する。NTは100から160アミノ酸残基からなる任意の部分で、クモ糸タンパク質のN末端断片に由来する。融合タンパク質とそのタンパク質構造は親和性培地及び細胞足場材料として有用である。

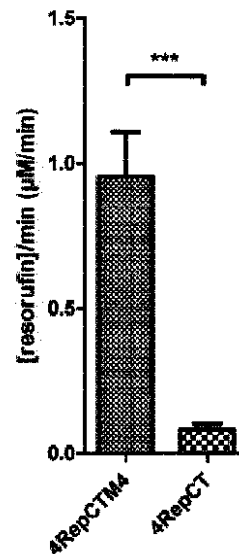


Fig 22

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫グロブリン及び免疫グロブリン又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される有機ターゲットと選択的相互作用が可能なタンパク質構造であって、前記タンパク質構造が、反復構造単位として、有機ターゲットと選択的相互作用が可能である、部分 B、REP 及び CT を含む組換え融合タンパク質を含むポリマーであり、

B は 30 アミノ酸残基を超える非スピドロイン部分であり、有機ターゲットとの相互作用の能力を提供し、B 部分が、ブドウ球菌プロテイン A に由来する Z ドメイン、ブドウ球菌プロテイン A 及びその E、D、A、B 及び C ドメイン；及びこれらのアミノ酸配列の何れかに対して少なくとも 70% の同一性を有するタンパク質断片から選択され；

REP は 70 から 300 アミノ酸残基からなる部分で、クモ系タンパク質の反復断片に由来し；及び

CT は 70 から 120 アミノ酸残基からなる部分で、クモ系タンパク質の C 末端断片に由来するタンパク質構造。

【請求項 2】

B 部分が、ブドウ球菌プロテイン A に由来する Z ドメイン、及びブドウ球菌プロテイン A に由来する Z ドメインに対して少なくとも 70% の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される、請求項 1 に記載のタンパク質構造。

【請求項 3】

有機ターゲットと選択的相互作用が可能なタンパク質構造であって、前記タンパク質構造が、反復構造単位として、有機ターゲットと選択的相互作用が可能であり、部分 B、REP 及び CT、及び任意で NT を含む組換え融合タンパク質を含むポリマーであり、

B は 30 アミノ酸残基を超える非スピドロイン部分であり、有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を提供し；

REP は 70 から 300 アミノ酸残基からなる部分で、クモ系タンパク質の反復断片に由来し；及び

CT は 70 から 120 アミノ酸残基からなる部分で、クモ系タンパク質の C 末端断片に由来し；及び

NT は 100 から 160 アミノ酸残基からなる部分で、クモ系タンパク質の N 末端断片に由来するタンパク質構造。

【請求項 4】

前記組換え融合タンパク質が式

$B_x - REP - B_y - CT - B_z$ 及び $B_x - CT - B_y - REP - B_z$ により定められるタンパク質の群から選択され、

x、y 及び z は 0 から 5 の整数であり；

かつ $x + y + z = 1$

である請求項 3 に記載のタンパク質構造。

【請求項 5】

前記組換え融合タンパク質が式

$B_x - REP - CT$ 、 $B_x - CT - REP$ 、 $REP - CT - B_z$ 及び $CT - REP - B_z$ により定められるタンパク質の群から選択され、

x 及び z は 1 から 5 の整数である

請求項 4 に記載のタンパク質構造。

【請求項 6】

前記組換え融合タンパク質が式

$B - REP - CT$ 、 $B - CT - REP$ 、 $REP - CT - B$ 及び $CT - REP - B$ により定められるタンパク質の群から選択される、請求項 5 に記載のタンパク質構造。

【請求項 7】

B 部分が、配列番号 6 から 10 の何れかに 30% 未満の同一性を有する、請求項 1 から 6 の何れかに記載のタンパク質構造。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

有機ターゲットが、免疫グロブリン及び免疫グロブリン又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される、請求項 3 から 7 の何れか一項に記載のタンパク質構造。

【請求項 9】

免疫グロブリンがヒト由来の免疫グロブリンのサブクラスの I g G 1、I g G 2、I g G 4、I g A 及び I G M から選択される、請求項 8 に記載のタンパク質構造。

【請求項 10】

B 部分が、ブドウ球菌プロテイン A に由来する Z ドメイン、ブドウ球菌プロテイン A に由来する Z ドメイン、及びその E、D、A、B 及び C ドメイン、連鎖球菌プロテイン G、及びその C 1、C 2 及び C 3 ドメイン；及びこれらのアミノ酸配列の何れかに対して少なくとも 70% の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される、請求項 3 から 9 の何れか一項に記載のタンパク質構造。

10

【請求項 11】

B 部分が、ブドウ球菌プロテイン A に由来する Z ドメイン、ブドウ球菌プロテイン A の B ドメイン、及び連鎖球菌プロテイン G の C 2 ドメイン；及びこれらのアミノ酸配列の何れかに対して少なくとも 70% の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される、請求項 10 に記載のタンパク質構造。

【請求項 12】

B 部分が、ブドウ球菌プロテイン A に由来する Z ドメイン、及び連鎖球菌プロテイン G の C 2 ドメインからなる群から選択される、請求項 11 に記載のタンパク質構造。

20

【請求項 13】

有機ターゲットが、アルブミン及びアルブミン又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される、請求項 3 から 7 の何れか一項に記載のタンパク質構造。

【請求項 14】

B 部分が、連鎖球菌プロテイン G、連鎖球菌プロテイン G のアルブミン結合ドメイン、*Fin ego l d i a m a g n a* 由来の G A モジュール；及びこれらのアミノ酸配列のいずれかに対して少なくとも 70% の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される、請求項 13 に記載のタンパク質構造。

【請求項 15】

B 部分が、連鎖球菌プロテイン G のアルブミン結合ドメイン、及びこれに対して少なくとも 70% の同一性を有するタンパク質断片を含む、請求項 13 から 14 に記載のタンパク質構造。

30

【請求項 16】

B 部分が、連鎖球菌プロテイン G のアルブミン結合ドメインである、請求項 15 に記載のタンパク質構造。

【請求項 17】

有機ターゲットが、ビオチン及びビオチン又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される、請求項 3 から 7 の何れか一項に記載のタンパク質構造。

【請求項 18】

B 部分が、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン (M 4)；及びこれらのアミノ酸配列の何れかに対して少なくとも 70% の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される、請求項 17 に記載のタンパク質構造。

40

【請求項 19】

B 部分が、単量体ストレプトアビジン (M 4) である、請求項 18 に記載のタンパク質構造。

【請求項 20】

前記タンパク質構造が少なくとも 2 次元で少なくとも 0.1 μ m の大きさを有する、請求項 1 から 19 の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項 21】

前記タンパク質構造が、繊維、薄膜、発泡体、網、メッシュ、球及びカプセルからなる

50

群から選択される物理的形態である、請求項 1 から 20 の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項 22】

REP 部分が $L(A G)_n L$ 、 $L(A G)_n A L$ 、 $L(G A)_n L$ 、 $L(G A)_n G L$ の群から選択され、

n は 2 から 10 の整数であり；

各個々の A セグメントは 8 から 18 アミノ酸残基のアミノ酸配列であり、アミノ酸残基の 0 から 3 は Ala ではなく、残りのアミノ酸残基が Ala であり；

各個々の G セグメントは 12 から 30 アミノ酸残基のアミノ酸配列であり、少なくとも 40% のアミノ酸残基が Gly であり；

各個々の L セグメントは、0 から 20 アミノ酸残基のリンカーアミノ酸配列である、請求項 1 から 21 の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項 23】

CT 部分が、配列番号 9 に対して少なくとも 50% の同一性、又は配列番号 7 に対して少なくとも 80% の同一性を有する、請求項 1 から 22 の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項 24】

CT 部分が、配列番号 9 に対して少なくとも 50% の同一性、又は配列番号 7 に対して少なくとも 80% の同一性を有する、請求項 23 に記載のタンパク質構造。

【請求項 25】

NT 部分が、配列番号 8 に対して少なくとも 50% の同一性、又は配列番号 6 に対して少なくとも 80% の同一性を有する、請求項 1 から 24 の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項 26】

NT 部分が、配列番号 8 に対して少なくとも 50% の同一性、及び配列番号 6 に対して少なくとも 80% の同一性を有する、請求項 25 に記載のタンパク質構造。

【請求項 27】

融合タンパク質がオリゴペプチド細胞結合モチーフを含む、請求項 1 から 26 の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項 28】

融合タンパク質が、配列番号 14、16、18、22、24、及び 26、及びこれらの配列の何れかに対して少なくとも 80% の同一性を有するタンパク質からなる群から選択される、請求項 1 から 27 の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項 29】

(a) 請求項 1 から 28 の何れか一項に記載の融合タンパク質を提供し；

(b) 融合タンパク質を組換え融合タンパク質を含むポリマーの形成を達成するための条件にさらす工程を含み、有機ターゲットに対する結合活性を示す、請求項 1 から 28 の何れか一項に記載のタンパク質構造を提供する方法。

【請求項 30】

有機ターゲットの固定化のための親和性培地であって、該親和性培地が請求項 1 から 28 の何れか一項に記載の融合タンパク質を含み、その B 部分が有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である親和性培地。

【請求項 31】

前記親和性培地が請求項 1 から 28 の何れか一項に記載のタンパク質構造を含み、該タンパク質構造が組換え融合タンパク質を含むポリマーである請求項 30 に記載の親和性培地。

【請求項 32】

前記タンパク質構造が請求項 8 から 19 の何れか一項に記載される、請求項 31 に記載の親和性培地。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

前記有機ターゲットを更に含み、B部分が該有機ターゲットと選択的相互作用が可能であり該有機ターゲットに結合する、請求項30から32の何れか一項に記載される親和性培地。

【請求項34】

前記有機ターゲットが第二有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、請求項33に記載の親和性培地。

【請求項35】

前記タンパク質構造が薄膜の物理的形態である、請求項31から34の何れか一項に記載の親和性培地。

【請求項36】

細胞表面に存在する有機ターゲットを有する細胞の培養のための細胞足場材料であって、該細胞足場材料が請求項1から28の何れか一項に記載のタンパク質構造を含む細胞足場材料。

【請求項37】

B部分が、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、請求項36に記載の細胞足場材料。

【請求項38】

前記細胞足場材料が中間体有機ターゲットを更に含み、B部分が、前記中間体有機ターゲットとの選択的相互作用が可能であり前記中間体有機ターゲットに結合し、かつ前記中間体有機ターゲットが細胞表面に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、請求項36に記載の細胞足場材料。

【請求項39】

前記タンパク質構造が請求項8から19の何れか一項に記載される、請求項38に記載の細胞足場材料。

【請求項40】

前記タンパク質構造が薄膜の物理的形態である、請求項36から40の何れか一項に記載の細胞足場材料。

【請求項41】

請求項36から40の何れか一項に記載の細胞と細胞足場材料の組み合わせ。

【請求項42】

サンプルからの有機ターゲットの分離における請求項1から28の何れか一項に記載のタンパク質構造の使用。

【請求項43】

細胞の培養における請求項1から28の何れか一項に記載のタンパク質構造の使用。

【請求項44】

有機ターゲットを含むサンプルを提供し；

前記親和性培地が有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、請求項30から35の何れか一項に記載の親和性培地を提供し；

前記親和性培地を、親和性培地と有機ターゲット間の結合を達成するのに適した条件下で前記サンプルと接触させ；及び

非結合サンプルを除去する

工程を含む、サンプルからの有機ターゲットの分離のための方法。

【請求項45】

第一有機ターゲットと第二有機ターゲット間の結合を達成するために適した条件下で、第一の有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、第二の有機ターゲットと、前記親和性培地及び固定化有機ターゲットを接触させる工程を更に含む、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

親和性培地と有機ターゲット間の結合を達成するために、前記親和性培地と前記サンプルを接触させると、親和性培地中の融合タンパク質が、請求項1から28の何れか一項に

10

20

30

40

50

記載のタンパク質構造として存在する、請求項 4 4 又は 4 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

親和性培地と有機ターゲットの間の結合を達成するために、前記親和性培地と前記サンプルを接触させると、親和性培地中の融合タンパク質が溶解して存在し、有機ターゲットに結合した融合タンパク質の複合体に、請求項 1 から 2 8 の何れか一項に記載の融合タンパク質構造を形成させる、請求項 4 4 又は 4 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記親和性培地上で固定化ターゲットの存在を検出し、かつ任意で定量する工程を更に含む、請求項 4 4 から 4 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記親和性培地から有機ターゲットを放出し、及び回収する工程を更に含む、請求項 4 4 から 4 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

化学的処理及び / 又は滅菌加熱処理により親和性培地を再生する最終工程を更に含む、請求項 4 4 から 4 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

化学的処理が NaOH 及び / 又は尿素による処理を含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

目的の細胞を含むサンプルを提供し；

前記サンプルを請求項 3 6 から 4 0 の何れか一項に記載の細胞足場材料に適用し、前記細胞足場材料が細胞表面に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能であり；

前記細胞を、細胞表面の有機ターゲットと前記細胞足場材料との間の結合により、前記細胞足場材料に対して固定化させる、細胞を固定化するための方法。

【請求項 5 3】

請求項 5 2 に記載の細胞足場材料に目的の細胞を固定化し；及び

それに適用された細胞を有する前記細胞足場材料を細胞培養に適した条件下で維持することを含む細胞を培養するための方法。

【請求項 5 4】

前記タンパク質構造が薄膜、繊維又は発泡体の物理的形態である、請求項 4 4 から 5 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、請求項 1 から 2 8 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 5 6】

請求項 5 5 に記載の融合タンパク質をコードする単離されたポリ核酸。

【請求項 5 7】

請求項 2 8 に記載の融合タンパク質をコードする核酸からなる群、及び配列番号 1 5、1 7、1 9、2 3、2 5 及び 2 7 からなる群から選択される、請求項 5 6 に記載の単離されたポリ核酸。

【請求項 5 8】

a) 適切な宿主において、請求項 1 から 2 8 の何れか一項に記載の融合タンパク質を発現し；及び

b) 融合タンパク質を含む混合物を得て、任意で融合タンパク質を単離する工程を含む、融合タンパク質を生産する方法。

【請求項 5 9】

タンパク質構造が組換え融合タンパク質を含むポリマーであり、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である該タンパク質構造の生産のための、請求項 1 から 2 8 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質の使用。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

発明の技術分野

本発明は組換え融合タンパク質の分野、より具体的にはクモ系タンパク質（スピドロイン）に由来する部分を含む融合タンパク質に関する。本発明は、スピドロインに由来する部分を含む組換え融合タンパク質を含むポリマーであるタンパク質構造を提供する方法を与える。また、有機ターゲットに結合するための新規なタンパク質構造を与える。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

応用タンパク質化学において、活性、典型的には生物活性ペプチドを、活性に関連する部位、典型的には有機ターゲット、例えば、核酸、タンパク質、タンパク質の複合体、タンパク質及び/又は脂質及び/又は糖質及び/又は核酸などに対していかに調製又は提示するかは一般的な問題である。最も簡単な解決策は、生物活性ペプチド又はタンパク質の水溶液を提供することである。しかしながら、多くの適用が所望の目標を達成するために幾つかの更なる手段を要求する。例えば、ペプチド/タンパク質は、脂質混合物と会合するか又は支持構造体に化学的に固定化されてもよい。

【0003】

支持構造体に固定化されたペプチド/タンパク質の適用は、バイオプロセス、クロマトグラフィー、細胞捕獲及び培養、アクティブ・フィルタ、及び診断などの調製用及び分析的分離操作が含まれる。細胞外マトリックスタンパク質に基づく構造体、例えばコラーゲンは、欧州特許第704532号及び欧州特許第985732号に開示されている。

【0004】

また、支持する構造体にクモ系タンパク質を使用することが提案されている。クモ系タンパク質は、強度と弾性の組み合わせにより、並外れた靱性と伸展性を獲得している天然の高性能ポリマーである。クモは異なる機械的性質と機能を有する様々なタイプの糸を産生する最大7つの異なる腺を持っている。大瓶状腺 (major ampullate gland) により生産されるしおり糸は最も強靱な繊維である。それは2つの主要なポリペプチドからなり、これらはほとんどの場合大瓶状腺スピドロイン (MaSp) 1および2と称され、例えばニワオニグモ (*Araneus diadematus*) においては ADF-3 及び ADF-4 と称される。これらのタンパク質は、200から720 kDa の範囲の分子量を有する。クモのしおり糸タンパク質、又は MaSp は3つの成分を有する；非反復N末端ドメイン、多くの反復 poly-Ala/Gly セグメントからなる中央領域、及び非反復C末端ドメイン。一般に、反復領域は糸の繊維で分子間接触を形成すると考えられているが、末端ドメインの正確な機能は良く分かっていない。繊維形成を伴う会合において、反復領域はランダムコイルとヘリックス構造からシート構造への構造変換を受ける。スピドロインのC末端領域はクモの種と糸のタイプ間に一般的に保存されている。

【0005】

国際公開第07/078239号と Stark, M. et al., *Biomacromolecules* 8: 1695-1701, (2007) は、Ala と Gly の高含量を持つ反復性断片とタンパク質のC末端断片、並びにクモ系タンパク質を含む可溶性融合タンパク質からなる微小クモ系タンパク質を開示している。クモ系タンパク質の繊維はその融合パートナーからのクモ系タンパク質の遊離の際に自発的に得られる。

【0006】

Rising, A. et al., *CMLS* 68(2): 169-184 (2010) はクモ系タンパク質の生産における進展を総説している。

【0007】

米国特許出願公開第2009/0263430号は酵素 - galactosidase の微小クモ系タンパク質の膜に対する化学的結合を開示している。しかし、化学的結合

10

20

30

40

50

はタンパク質の安定性及び／又は機能において好ましくない条件を必要とし得る。クモ糸タンパク質の反復領域に由来するセグメントの複数の反復は、RGD細胞結合セグメント(Bini, E et al., Biomacromolecules 7:3139-3145 (2006))及び／又はR5ペプチド(Wong Po Foo, C et al., Proc Natl Acad Sci 103 (25): 9428-9433 (2006))又はミネラル化(mineralization)に関する別のタンパク質セグメント(Huang, J et al., Biomaterials 28: 2358-2367 (2007); 国際公開第2006/076711号)を含むように設計されている。これらの先行技術文献では、膜は有機溶媒変性ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)中に融合タンパク質を可溶化し、乾燥することにより形成されている。

【0008】

米国特許出願公開第2005/261479 A1号は、糸タンパク質繊維又は他のポリマー構造を形成することなく、複合体混合物からの個々の糸タンパク質の磁気親和性分離を含む、親和性タグを持つ組換え糸タンパク質の精製のための方法を開示している。

【0009】

既知の支持構造と関連技術は、例えば経済性、効率性、安定性、再生能力、生物活性及び生体適合性に関していくつかの欠点を持っている。

【発明の概要】

【0010】

有機ターゲットとの選択的相互作用が可能な新規なタンパク質構造を提供することを本発明の目的とする。

【0011】

有機ターゲットとの選択的相互作用が可能なタンパク質構造を提供することも本発明の目的であって、2次構造に予測できない影響をもち及び／又はそのタンパク質構造に残り得るであろう過酷な溶媒(harsh solvents)を用いることなく形成されることを特徴とする。

【0012】

有機ターゲットとの選択的相互作用が可能な安定なタンパク質構造を提供することは本発明の一つの目的であって、そのタンパク質構造は、例えば化学的処理により、使用後に容易に再生可能である。

【0013】

生体適合性で細胞培養及び移植組織として適している安定なタンパク質構造を提供することは本発明の別の目的である。

【0014】

有機ターゲットとの選択的相互作用が可能な高密度の等間隔の機能性を持つタンパク質構造を提供することは本発明のさらに別の目的である。

【0015】

何ヶ月間も4 又は室温での貯蔵の際にその選択的結合能を維持するタンパク質構造を提供することは本発明の更なる目的である。

【0016】

オートクレーブ可能、即ち加熱処理後にその選択的結合能を維持するタンパク質構造を提供することも本発明の目的である。

【0017】

これらの目的及び以下の開示から自明であろう他の目的のために、本発明は第一態様に従って、融合タンパク質と、反復構造単位として本請求項に記載の融合タンパク質を含むポリマーからなるタンパク質構造を提供する。

【0018】

関連する態様に従って、本発明は融合タンパク質をコードする単離されたポリ核酸及び本請求項に記載の融合タンパク質を生産する方法を提供する。

【0019】

別の態様に従って、本発明は本請求項に記載のタンパク質構造を提供するための方法を

10

20

30

40

50

提供する。

【0020】

更なる態様に従って、本発明は本請求項に記載の親和性培地を提供する。

【0021】

一態様に従って、本発明は本請求項に記載の細胞足場材料を提供する。関連する態様に従って、本発明はまた細胞と本請求項に記載の細胞足場材料の組み合わせを提供する。

【0022】

一態様に従って、本発明は本請求項に記載のタンパク質構造及び融合タンパク質の新規な使用を提供する。

【0023】

別の態様に従って、本発明は本請求項に記載のサンプルからの有機ターゲットの分離の方法を提供する。

【0024】

更なる態様に従って、本発明は本請求項に記載の細胞の固定化及び任意で培養の方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1は、スピドロインC末端ドメインの配列アラインメントを示す。

【図2】図2は、スピドロインN末端ドメインの配列アラインメントを示す。

【図3】図3は、Zドメインを含む融合タンパク質の巨視的な繊維を示す。

【図4】図4は、Zドメインを含む融合タンパク質の精製及び分析からのSDS-PAGEゲルを示す。

【図5】図5は、融合タンパク質のZドメインの機能性を示す融合タンパク質で作られた繊維とコントロール繊維を示す。

【図6】図6は、組織培養プレートの底での融合タンパク質で作られた成形膜の部分を示す。

【図7-12】図7-12は、融合タンパク質構造のZドメインの機能性を示す非還元SDS-PAGEゲルを示す。

【図13-15】図13-15は、市販のプロテインAマトリックスに比べた融合タンパク質構造のZドメインのIgG結合能を示す非還元SDS-PAGEゲルを示す。

【図16-17】図16-17は、市販のプロテインAマトリックスに比べた融合タンパク質構造の定置洗浄(Cleaning In Place)(CIP)手順の非還元SDS-PAGEゲルを示す。

【図18】図18は、ビオチン化Atto-565に浸したタンパク質膜からの蛍光強度を示す。

【図19】図19は、融合タンパク質膜に結合の際のビオチン化Atto-565の異なる濃度に対する蛍光強度値のグラフと線形フィットを示す。

【図20】図20は、融合タンパク質で作られた膜又はコントロールによるビオチン化Atto-565の添加前(-)と後(+)の蛍光強度のグラフを示す。

【図21】図21は、溶液でビオチン化HRP無しでの触媒作用における標準曲線と得られた反応速度の線形フィットを示すグラフである。

【図22】図22は、コントロールに比べて融合タンパク質膜に固定化されたビオチン化HRPによる触媒作用における反応速度を示すグラフである。

【図23】図23は、可溶化した融合タンパク質構造の還元SDS-PAGEゲルを示す。

【図24-26】図24-26は、Zドメインを含む融合タンパク質膜へのIgG-HRPの結合を示すグラフを示す。

【図27】図27は、Zドメインを含む融合タンパク質膜へのIgG-Alexa Fluor 633の結合を示すグラフを示す。

【図28】図28は、オートクレーブ後の融合タンパク質構造のZドメインの機能性を示

10

20

30

40

50

す非還元 SDS - PAGE ゲルを示す。

【図 29】図 29 は、Z ドメインを含む融合タンパク質のプロテアーゼ 3 C 処理からの開裂生成物の SDS - PAGE ゲルを示す。

【図 30】図 30 は、有機ターゲット (I g G) の存在下で形成される融合タンパク質構造中の Z ドメインの機能性を示す非還元 SDS - PAGE ゲルを示す。

【図 31 - 32】図 31 - 32 は、融合タンパク質構造の A b d ドメインの機能性を示す非還元 SDS - PAGE ゲルを示す。

【図 33 - 34】図 33 - 34 は、融合タンパク質構造の C 2 ドメインの機能性を示す非還元 SDS - PAGE ゲルを示す。

【 0 0 2 6 】

追加された配列のリスト

配列番号

1	4Rep	
2	4RepCT	
3	NT4Rep	
4	NT5Rep	
5	NT4RepCTHis	10
6	NT	
7	CT	
8	コンセンサス NT 配列	
9	コンセンサス CT 配列	
10	<i>Euprosthénops australis</i> MaSp1 由来の反復配列	
11	コンセンサス G セグメント配列 1	20
12	コンセンサス G セグメント配列 2	
13	コンセンサス G セグメント配列 3	
14	HisZQG4Rep4CT	
15	HisZQG4Rep4CT (DNA)	
16	HisAbdQG4RepCT	
17	HisAbdQG4RepCT (DNA)	
18	HisC2QG4RepCT	30
19	HisC2QG4RepCT (DNA)	
20	4RepCT 2	
21	4RepCT 2 (DNA)	
22	M44RepCT	
23	M44RepCT (DNA)	
24	modM44RepCT	
25	modM44RepCT (DNA)	40
26	4RepCTM4	
27	4RepCTM4 (DNA)	

【発明を実施するための形態】

【0027】

発明の詳細な記述

本発明は、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能な固体タンパク質構造が、反復構造単位として組換え融合タンパク質のポリマーの形態で調製できる見識に一般的に基づいている。融合タンパク質は、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能な30アミノ酸残基以上の少なくとも一の非スピドロイン部分と、クモ系タンパク質の少なくとも反復

性のC末端断片に対応する部分を含んでいる。驚くべきことに、クモ系タンパク質に由来する部分は、構造的に再配置するために誘導することができ、その結果、ポリマー性の固体構造を形成するが、非スピドロイン部分は構造的に再配置されず、その所望の構造と機能、即ち、有機ターゲットと選択的相互作用する能力を維持する。タンパク質構造は、化学的結合工程又は変性法による工程無しで得ることができ、これは、特に機能がその部分の2次構造に依存しているときに、その部分の維持された機能性を持つ融合タンパク質を得る手順を促進し、かつその可能性を向上する。これらの融合タンパク質ポリマーの形成は厳しく管理され、この見識は、更なる新規タンパク質構造、タンパク質構造を作り出す方法、及び様々な応用と方法におけるタンパク質構造の用途へと発展している。

【0028】

従って、本発明による融合タンパク質は、所望の選択的相互作用活性と、生理学的条件下でタンパク質構造に用いられる内部の固体支持体活性の両方を与える。スピドロイン部分がポリマー性の固体構造を形成するために構造的に再配置されるときに、非スピドロイン部分はスピドロイン部分に共有結合しているが、融合タンパク質の結合活性が維持されていることは驚くべきこととして考慮されねばならない。実際、選択的相互作用活性を与えるその部分の熱及び/又は化学的安定性及び/又は結合活性は、本発明の融合タンパク質構造に組み込まれるときに増大し得る。タンパク質構造はまた、有機ターゲットに対する選択的相互作用活性の予測可能な高い密度を提供する。全ての発現タンパク質部分は固体支持体に結合しているため、選択的相互作用活性を持つ有用なタンパク質部分の損失は最小化される。

【0029】

本発明による融合タンパク質から形成されるポリマーは固体構造であり、それらの物理特性において、特に高強度、弾力性と軽量化の有用な組み合わせにおいて有用である。特に有用な特徴は、融合タンパク質のスピドロイン由来部分は、生化学的に堅牢であり、例えば酸、塩基又はカオトロピック剤による再生に適しており、かつ加熱滅菌、例えば120で20分のオートクレーブに適している。ポリマーはまた、細胞接着および増殖を支援するその能力において有用である。しおり系に由来する特性は、医療又は技術的目的において新しい材料の開発において魅力的である。特に、本発明によるタンパク質構造は、クロマトグラフィー、細胞捕獲、選択及び培養、アクティブ・フィルタ、及び診断などの調整的かつ分析的分離操作において有用である。本発明によるタンパク質構造はまた、移植片などの医療機器、及び、創傷閉鎖システム、バンドエイド、縫合糸、創傷包帯などの医療用品、及び細胞固定化のための足場、細胞培養、組織工学及び誘導細胞の再生において有用である。

【0030】

本発明は、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である組換え融合タンパク質を提供し、その融合タンパク質はB、REP、及びCT部分、及び任意でNT部分を含んでいる。本発明はまた、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である組換え融合タンパク質を提供し、該タンパク質構造は、本発明による組換え融合タンパク質を含み、かつ任意で該タンパク質からなり、即ち、B、REP、及びCT部分、及び任意でNT部分を含み、かつ任意で該タンパク質からなる。

【0031】

実施例の融合タンパク質のREPとCT部分は必然的に特定のタンパク質、例えばユープロステノプス オーストラリス (*Euprosthenops australis*) 由来の主要スピドロイン1 (Maspl) に関するが、本開示は本発明による融合タンパク質構造を生産する目的において任意の構造的に類似する部分に対して適用可能であると考えられる。更に、実施例の融合タンパク質の選択的相互作用活性を提供するB部分は必然的に特定のタンパク質部分、例えば、プロテインA、プロテインG及びストレプトアビジンに由来する部分に関するが、本開示は本発明による融合タンパク質構造を生産する目的において、任意の構造的及び/又は機能的に類似するB部分に対して適用可能であると考えられる。

10

20

30

40

50

【0032】

本発明による特定の融合タンパク質は、式 $B_x - REP - B_y - CT - B_z$ 及び $B_x - CT - B_y - REP - B_z$ により定義され、ここで x 、 y 、 z は 0 から 5 の整数； $x + y + z = 1$ であり、融合タンパク質のどちらかの端又は融合タンパク質の任意の 2 つのタンパク質部分の間に一つの NT 部分を任意で更に含有する。もし、 $x + y + z > 1$ である場合、もし 2 つ以上の B 部分がある場合、それらは同一であるか又は異なっても良い。2 つ以上の B 部分が同じ有機ターゲット又は異なる有機ターゲットと選択的相互作用の能力を有し得る。2 つ以上の B 部分が実質的に同一であり、各々が同一の有機ターゲットとの選択的相互作用の能力を有するのが好ましい。

【0033】

本発明による融合タンパク質は、 x 、 y 及び z は 0 から 2 の整数、好ましくは 0 から 1 の整数である。本発明による所定の好ましい融合タンパク質では、 $y = 0$ 。より好ましい特定の融合タンパク質では、 $y = 0$ で x 又は z の何れかが 0、即ち、融合タンパク質は式 $B_x - REP - CT$ 、 $B_x - CT - REP$ 、 $REP - CT - B_z$ 及び $CT - REP - B_z$ で定義され、ここで x と z は 1 から 5 の整数である。本発明による融合タンパク質は、 $y = 0$ で、 x 及び z は 0 から 1 の整数；及び $x + z = 1$ である。従って、本発明による所定の好ましい融合タンパク質は、式 $B - REP - CT$ 、 $B - CT - REP$ 、 $REP - CT - B$ 及び $CT - REP - B$ により定義される。本発明による好ましい融合タンパク質では、任意の NT 部分が無い。

【0034】

用語「融合タンパク質」は、ここでは、組換え核酸、すなわち、通常は一緒に生じるであろう二つ以上の核酸を組み合わせるにより人工的に創られる、DNA 又は RNA からの発現により作成されるタンパク質を意味する（遺伝子操作）。本発明による融合タンパク質は、組み合せタンパク質であり、従って、天然に生じるタンパク質に同一ではない。特に、野生型スピドロインは、上記に定めた組換え核酸から発現されないため、本発明による融合タンパク質ではない。結合された核酸配列は、特定の機能的特性を持つ異なるタンパク質、部分的なタンパク質又はポリペプチドをコードしている。得られる融合タンパク質、又は組換え融合タンパク質は、もとのタンパク質、部分的タンパク質又はポリペプチドの各々から由来した機能特性を持つ単一タンパク質である。更に、本発明及び対応する遺伝子による融合タンパク質は、キメラであり、すなわち、タンパク質 / 遺伝子部分は、少なくとも 2 つの異なる種に由来する。REP と CT 部分、並びに任意で NT 部分は全てクモ系タンパク質から由来する。誤解を避けるために、本発明による B 部分は非スピドロインタンパク質又はポリペプチドであり、即ちクモ系タンパク質に由来しない。特に、本発明による B 部分は、スパイダーシルクタンパク質の C 末端断片、反復性断片、又は N 末端断片からは由来しない。

【0035】

融合タンパク質は、典型的には 170 から 2000 アミノ酸残基、例えば 170 から 1000 アミノ酸残基、例えば 170 から 600 アミノ酸残基、例えば 170 から 500 アミノ酸残基、例えば 170 から 400 アミノ酸残基からなる。クモ系タンパク質断片を含む長いタンパク質が、可溶化及び重合のための過酷な溶剤の使用を必要とする非晶質の凝集体を形成する傾向があるので、小さいサイズが有利である。組換え融合タンパク質は、特にクモ系タンパク質が一以上の B 部分である場合において及び / 又はそれが NT 部分を含むとき、2000 残基以上を含み得る。

【0036】

用語「スピドロイン」及び「クモ系タンパク質」は、本記述を通して同義に用いられ、全ての既知のクモ系タンパク質を包含し、典型的には「MasP」、ニワオニグモ (*Araneus diadematus*) の場合「ADF」と略される大瓶状腺クモ系タンパク質を含む。これらの大瓶状腺クモ系タンパク質は一般に 1 と 2 の 2 つのタイプがある。これらの用語は、既知のクモ系タンパク質に対して高度の同一性及び / 又は類似性を持つ非天然タンパク質を包含する。

10

20

30

40

50

【0037】

その結果、用語「非スピドロイン」はクモ系タンパク質から由来しないタンパク質、即ちクモ系タンパク質に対して程度（又は全く）同一性及び/又は類似性を持たないタンパク質を意味する。

【0038】

本発明によるタンパク質構造は、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。この能力は本発明による融合タンパク質にあり、より具体的には融合タンパク質のB部分にある。REPとCT部分、並びに任意でNT部分の、有機分子との任意の相互作用は、「有機ターゲットとの選択的相互作用が可能」なる語句により包含されない。誤解を避けるために、「有機ターゲットとの選択的相互作用が可能」なる語句は、REPとCT部分、並びに任意でNT部分の関与する相互作用に依存する本発明による融合タンパク質の二量体化、オリゴマー化または重合を包含していない。

10

【0039】

「有機ターゲット」なる用語は、当業者により無機分子と伝統的に考えられるもの、例えばカーボネート、炭素の単純酸化物、シアン、ダイヤモンド及びグラファイトの例外を除いて、炭素を含む全化学分子を包含する。誤解を避けるために、例えば、シリカ及び塩化カルシウムのような無機分子、塩およびイオンは、有機ではない。有機ターゲットは、有機分子、例えば細胞表面上の受容体複合体を含むか又はからなる複合体であり得る。有機ターゲットは、共有結合又は他の型の会合により結合され得る、一つ以上の有機分子の種類モノマー、ダイマー、オリゴマーまたはポリマーであり得る。もちろん単に単一有機分子であっても良い。本発明による好ましい有機ターゲットは、限定されないが、核酸、タンパク質及びポリペプチド、脂質及び炭水化物、ならびにこれらの組み合わせが挙げられる。本発明による好ましい有機ターゲットは、限定されないが、免疫グロブリン、免疫グロブリン分子またはその誘導体を含む分子、アルブミン、アルブミンまたはその誘導体を含む分子、ビオチン、ビオチンまたはその誘導体またはその類似体を含む分子を包含する。

20

【0040】

本発明の関連において、例えば本発明による融合タンパク質のB部分などのリガンドとそのターゲットとの「特異的」又は「選択的」相互作用とは、特異的及び非特異的相互作用間又は選択的及び非選択的相互作用間の違いが有意義になるようなものである相互作用を意味する。2つのタンパク質間の相互作用はときには解離定数により測定される。解離定数は2つの分子間の結合（又は親和性）の強度を記述する。典型的には、抗体とその抗原の間の解離定数は 10^{-7} から 10^{-11} Mである。しかし、高い特異性は必ずしも高い親和性を必要としない。そのカウンターパートに対して低親和性（モルの範囲内で）を持つ分子は、はるかに高い親和性を有する分子と同程度に特異的であることが示されている。本発明の場合、特異的又は選択的相互作用とは、天然に生じるか又は処理された生物学的又は生化学的液体のサンプル中で他のタンパク質が存在する所定の条件下で、特定の方法が、特定のタンパク質、標的タンパク質又はその断片の存在及び/又は量を決定するために用いることができる範囲を指す。言い換えれば、特異性又は選択性は、関連するタンパク質を区別する能力である。特異的及び選択的とは時には本記述において同義的に用いられる。

30

40

【0041】

本発明による融合タンパク質はまた、一以上のリンカーペプチドを含む。リンカーペプチドは、融合タンパク質の任意の部分間、例えばCT部分とREP部分間、2つのB部分間、B部分とCT部分間、及びB部分とREP部分間に配置され得るか又は融合タンパク質の何れかの末端に配置され得る。融合タンパク質が2つ以上のB部分を含有する場合、リンカーペプチドはまた2つのB部分との間に配置され得る。リンカーは、融合タンパク質の機能単位の間スペースを提供することができるが、融合タンパク質の同定及び精製のためのハンドル、例えばHis及び/又はTrxタグ、を構成し得る。融合タンパク質が、融合タンパク質の同定と精製のために2つ以上のリンカーペプチドを含む場合、そ

50

れらはスペーサー配列、例えば、His₆-スペーサー-His₆-、などのスペーサー配列により隔てられているのが望まれる。リンカーはまた、シグナル認識粒子などのシグナルペプチドをも構成し得、それは融合タンパク質を膜へと導き、及び/又は宿主細胞から周囲の培地への融合タンパク質の分泌を引き起こす、融合タンパク質はまた、そのアミノ酸配列中に、リンカー及び/又は他の関連部分、典型的にはB部分又は部分(複数)の切断及び除去を可能にする、開裂部位を含み得る。様々な開裂部位が、例えば、化学試薬、例えばCNBrによるMet残基の後ろの開裂部位、及びヒドロキシルアミンによるAsn-Gly残基間の開裂部位、トロンピン又はプロテアーゼ3Cなどのプロテアーゼの開裂部位、及びインテイン自己スプライシング配列などの自己スプライシング配列が、当業者に知られている。

10

【0042】

REP、CT及びB部分は、互いに直接または間接的に連結されている。直接的結合は、リンカーなどの介在配列の無い、部分間の直接共有結合を意味する。間接的な結合はまた、部分が共有結合で結合されているが、リンカー及び/又は一以上の更なる部分、例えばNT部分などの介在配列があることを意味する。

【0043】

B部分又は部分(複数)は、融合タンパク質の内部的に又は何れかの末端に配置され得、即ちC末端に配置されるか又はN末端に配置される。B部分又は部分(複数)は、融合タンパク質のN末端に配置されることが好まれる。仮に融合タンパク質が、融合タンパク質の同定と精製のために一つ以上のリンカー、例えばHis又はTrxタグを含む場合、融合タンパク質のN末端に配置されることが好まれる。

20

【0044】

好ましい融合タンパク質は、N末端にB部分が配置された形態を有し、1から30アミノ酸残基、例えば1から10アミノ酸残基のリンカーペプチドによって、C末端に配置されたREP部分とCT部分へ結合している。リンカーペプチドは開裂部位を含み得る。任意で、融合タンパク質はN末端又はC末端に、Hisタグ、及び開裂部位などの精製タグを含み得るリンカーペプチドを有する。

【0045】

その他の好ましい融合タンパク質は、C末端に配置されたREP部分とCT部分へ直接結合したB部分をN末端に配置した形態を有する。任意で、融合タンパク質はN末端又はC末端に、Hisタグ、及び開裂部位などの精製タグを含み得るリンカーペプチドを有する。

30

【0046】

本発明によるタンパク質構造は、本発明による組換え融合タンパク質を反復構造単位として含むポリマーであり、それは整列した複数の融合タンパク質、典型的には100融合タンパク質単位を軽く超える、例えば1000融合タンパク質単位又はそれ以上を含むことを意味する。任意で、ポリマーは更なる反復構造単位として、B部分の無い相補性タンパク質、好ましくはクモ系に由来するタンパク質を含み得る。このことは、融合タンパク質のB部分が、大きい及び/又は嵩高い場合に有利であり得る。これらの相補性タンパク質は、典型的にはREP部分とCT部分、及び任意でNT部分を含む。本発明による好ましい相補性タンパク質は、B部分が欠失した本明細書に記載の構造の何れかを持つことができる。相補性融合タンパク質は、B部分が欠失した融合タンパク質に実質的に同一であることが望ましい。しかしながら、本発明によるタンパク質構造は、反復構造単位として本発明による組換え融合タンパク質からなるポリマーであること、即ち本発明によるタンパク質構造は本発明による組換え融合タンパク質のポリマーであることが望ましい。

40

【0047】

ポリマーの融合単位の規模は、タンパク質構造が有意な大きさを得たことを意味する。好ましい実施態様にて、タンパク質構造は少なくとも2次元で少なくとも0.1µmの大きさを有する。従って、本明細書で使用する「タンパク質構造」なる用語は、少なくとも0.1µmの厚さの融合タンパク質ポリマー、好ましくはヒトの目に見える、即ち少なく

50

とも $1\ \mu\text{m}$ の厚さを持つ巨視的ポリマーを指す。「タンパク質構造」なる用語は、構造をとらない凝集体又は沈殿を包含しない。融合タンパク質のモノマーは水溶性であるが、本発明に係るタンパク質構造は、固体構造、即ち水に溶けない。タンパク質構造は、本発明に係る組換え融合タンパク質のモノマーを反復構造単位として含有するポリマーである。

【0048】

本発明に係るタンパク質構造は、繊維、薄膜、発泡体、網、メッシュ、球及びカプセルからなる群から選択される物理的形態であることが望ましい。

【0049】

本発明に係るタンパク質構造は、少なくとも $0.1\ \mu\text{m}$ 、好ましくは少なくとも $1\ \mu\text{m}$ の厚さの繊維又は薄膜であることが望ましい。繊維又は薄膜は、 $1 - 400\ \mu\text{m}$ 、好ましくは $60 - 120\ \mu\text{m}$ の範囲の厚さを持つことが望ましい。繊維又は薄膜は、 $0.5 - 300\ \text{cm}$ 、好ましくは $1 - 100\ \text{cm}$ の範囲の長さを有することが望ましい。他の好ましい範囲は $0.5 - 30\ \text{cm}$ 及び $1 - 20\ \text{cm}$ である。繊維は物理的操作中に無傷のままである能力を有し、即ち、紡績製織、撚糸、かぎ針編み及び同様の手順で用いることができる。薄膜は、可干渉性で、固体構造、例えばマイクロタイタープレートのプラスチックへ付着するという点で有利である。薄膜のこの特性は、洗浄と再生手順を容易にし、分離の目的に非常に有用である。特に有用なタンパク質構造は、薄膜または繊維であり、B部分
10
はブドウ球菌プロテインAに由来するZドメイン又はそれに対して少なくとも70%同一性を有するタンパク質断片であり、例えば実施例1-6を参照。

【0050】

また、本発明に係るタンパク質構造は、 $1\ \text{MPa}$ を超えた、好ましくは $2\ \text{MPa}$ を超えた、より好ましくは $10\ \text{MPa}$ 以上の引張強度を有することが好ましい。本発明に係るタンパク質構造は、 $100\ \text{MPa}$ を超えた、より好ましくは $200\ \text{MPa}$ 以上の引張強度を有することが好ましい。
20

【0051】

REP部分は70から300アミノ酸残基を含むタンパク質断片で、クモ糸タンパク質の反復断片から由来する。REP部分は、アラニンリッチストレッチとグリシンリッチストレッチを交互に反復特性を有することを意味する。REP部分は、一般に、70を上回る、例えば140を上回り、かつ300未満、好ましくは240未満、例えば200のアミノ酸残基を含み、下記により詳細に説明されるように、それ自身を幾つかのL(リンカー)セグメント、A(アラニンリッチ)セグメント及びG(グリシンリッチ)セグメントに分割することができる。典型的には、前記リンカーセグメントは任意であって、REP部分の末端に位置しており、一方残りのセグメントは順にアラニンリッチ及びグリシンリッチである。従って、REP部分は一般的に以下の構造のどちらかを有することができ、ここでnは整数である。
30

$L(AG)_nL$ 、例えば $LA_1G_1A_2G_2A_3G_3A_4G_4A_5G_5L$;

$L(AG)_nAL$ 、例えば $LA_1G_1A_2G_2A_3G_3A_4G_4A_5G_5A_6L$;

$L(GA)_nL$ 、例えば $LG_1A_1G_2A_2G_3A_3G_4A_4G_5A_5L$; 又は

$L(GA)_nGL$ 、例えば $LG_1A_1G_2A_2G_3A_3G_4A_4G_5A_5G_6L$ 。

当然、アラニンリッチセグメント又はグリシンリッチセグメントは、N末端またはC末端のリンカーセグメントに隣接しているかどうかは重要ではないということになる。nは2から10の整数、好ましくは2から8、好ましくは4から8、より好まれるのは4から6であり、すなわち $n = 4$ 、 $n = 5$ 、又は $n = 6$ である。
40

【0052】

好ましい実施態様では、本発明によるREP部分のアラニン含有量は、20%を超え、好ましくは25%を超え、より好ましくは30%を超え、かつ50%未満、好ましくは40%未満、より好ましくは35%未満である。アラニンの高い含有量は、硬く、及び/又は強力な、及び/又はより少ない伸展性構造を提供することが想定されるので、このことは有利である。

【0053】

10

20

30

40

50

所定の実施態様において、R E P 部分はプロリン残基を欠いており、すなわち、R E P 部分には P r o 残基は無い。

【 0 0 5 4 】

次に、本発明による R E P 部分を構成するセグメントに目を向けると、各々のセグメントは個別であり、すなわち、特定の R E P 部分の任意の 2 つの A セグメント、任意の 2 つの G セグメント、又は任意の 2 つの L セグメントは同一であるか又は同一でない場合がある。従って、セグメントの各タイプが特定の R E P 部分内で同一であることは、本発明の一般的特徴ではない。むしろ、以下の開示は、個々のセグメントを設計し、R E P 部分にそれらを集める方法のガイドラインを当業者に提供し、そのことにより、それはクモ系タンパク質の反復断片に由来すると考えられ、かつ、それは本発明に係る機能性融合タンパク質の一部の構成要素となる。

10

【 0 0 5 5 】

各個々の A 断片は、8 から 18 アミノ酸残基を有するアミノ酸配列である。個々の A セグメントは 13 から 15 アミノ酸残基を含有することが好ましい。また、A セグメントの大半、又は 2 つ以上が、13 から 15 個のアミノ酸残基を含有し、そして A セグメントの少数、例えば 1 つ又は 2 つが、8 から 18 アミノ酸残基、例えば 8 から 12、又は 16 から 18 アミノ酸残基を含有することが可能である。これらのアミノ酸残基の大部分はアラニン残基である。より具体的には、アミノ酸残基の 0 から 3 はアラニン残基ではなく、残りのアミノ酸残基がアラニン残基である。従って、各個別の A セグメントの全てのアミノ酸残基は、例外なく、又は 1 つ、2 つ又は 3 つのアミノ酸残基が任意のアミノ酸であって良い例外を除き、アラニン残基である。アラニン置換アミノ酸は天然のアミノ酸であり、好ましくは、セリン、グルタミン酸、システイン、及びグリシン、より好ましくはセリンから個別に選択される。もちろん、一以上の A セグメントが全てアラニンセグメントであり、一方、残りの A セグメントが 1 から 3 の非アラニン残基、例えばセリン、グルタミン酸、システイン又はグリシンなどを含有することは可能である。

20

【 0 0 5 6 】

好ましい実施態様において、各 A セグメントは、上に開示されたように 10 から 15 のアラニン残基、及び 0 から 3 の非アラニン残基を含む、13 から 15 のアミノ酸残基を含む。より好ましい実施態様において、各 A セグメントは、上に開示されたように 12 から 15 のアラニン残基、及び 0 から 1 の非アラニン残基を含む、13 から 15 のアミノ酸残基を含む。

30

【 0 0 5 7 】

各個々の A セグメントは、配列番号 10 のアミノ酸残基 7 - 19 , 43 - 56 , 71 - 83 , 107 - 120 , 135 - 147 , 171 - 183 , 198 - 211 , 235 - 248 , 266 - 279 , 294 - 306 , 330 - 342 , 357 - 370 , 394 - 406 , 421 - 434 , 458 - 470 , 489 - 502 , 517 - 529 , 553 - 566 , 581 - 594 , 618 - 630 , 648 - 661 , 676 - 688 , 712 - 725 , 740 - 752 , 776 - 789 , 804 - 816 , 840 - 853 , 868 - 880 , 904 - 917 , 932 - 945 , 969 - 981 , 999 - 1013 , 1028 - 1042 及び 1060 - 1073 の群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは 95 %、最も好ましくは 100 % の同一性を有する。この群の各配列は、ユープロステノプス オーストラリス (*Euprosthenops australis*) MaSp1 タンパク質の天然に生じる配列のセグメントに対応し、これは対応する cDNA のクローニングから推定される。国際公開第 2007/078239 号を参照。あるいは、各個々の A セグメントは、配列番号 3 のアミノ酸残基 143 - 152 , 174 - 186 , 204 - 218 , 233 - 247 及び 265 - 278 の群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは 95 %、最も好ましくは 100 % の同一性を有する。この群の各配列は、発現された、非天然クモ系タンパク質のセグメントに対応し、そのタンパク質は適切な条件下で絹構造を形成する能力を有する。従って、本発明による所定

40

50

の実施態様において、各個々のAセグメントは、上述のアミノ酸セグメントから選択されたアミノ酸配列に対して同一である。いかなる特定の理論に束縛されることを望むことなく、本発明によるAセグメントは、らせん構造又はシートを形成することが想定される。

【0058】

用語「%同一性」は、本明細書と添付された特許請求の範囲の全体を通して使用されるように、以下のように計算される。クエリ配列は、CLUSTAL Wアルゴリズムを使用して、標的配列にアラインされる(Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680 (1994))。比較は、整列された配列の最短に対応するウィンドウを介して行われる。各位置でアミノ酸配列が比較され、標的配列において同一対応を有するクエリ配列における位置の割合が、%同一性として報告される。

10

【0059】

「%類似性」は、本明細書と添付された特許請求の範囲の全体を通して使用されるように、疎水性残基のAla, Val, Phe, Pro, Leu, Ile, Trp, Met及びCysは類似し；塩基残基のLys, Arg及びHisは類似し、；酸性残基のGluとAspは類似し；親水性残基、無電荷残基のGln, Asn, Ser, Thr及びTyrは類似していることを例外として、「%同一性」について説明されるように計算される。残りの天然アミノ酸のGlyはこれに関連する他の何れのアミノ酸に対して似ていない。

20

【0060】

この説明全体を通して、本発明による他の代替の実施態様は、明記された同一性の割合の代わりに、対応する類似の割合を実行する。別の代替の実施態様は、明記された同一性の割合並びに、各配列について好ましい同一性の割合の群から選択された、その他のより高い割合の類似性を実行する。例えば、配列はその他の配列に70%類似している可能性があり；又はそれはその他の配列に70%同一であり得；又はそれはその他の配列に70%同一で90%類似であり得る。

【0061】

更に、実験データから、各個々のGセグメントは12から30アミノ酸残基のアミノ酸配列であることが結論付けられている。個々のGセグメントは14から23アミノ酸残基から成ることが好ましい。各Gセグメントの少なくとも40%のアミノ酸残基はグリシン残基である。典型的には、各個々のGセグメントのグリシン含量は、40から60%の範囲にある。

30

【0062】

各個々のGセグメントは、配列番号10のアミノ酸残基20-42, 57-70, 84-106, 121-134, 148-170, 184-197, 212-234, 249-265, 280-293, 307-329, 343-356, 371-393, 407-420, 435-457, 471-488, 503-516, 530-552, 567-580, 595-617, 631-647, 662-675, 689-711, 726-739, 753-775, 790-803, 817-839, 854-867, 881-903, 918-931, 946-968, 982-998, 1014-1027, 1043-1059及び1074-1092の群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは95%、最も好ましくは100%の同一性を有する。この群の各配列は、ユープロステノプス オーストラリス(*Euprosthenops australis*) MaSp1タンパク質の天然に生じる配列のセグメントに対応し、これは対応するcDNAのクローニングから推定される。国際公開第2007/078239号を参照。あるいは、各個々のGセグメントは、配列番号3のアミノ酸残基153-173, 187-203, 219-232, 248-264及び279-296の群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは95%、最も好ましくは100%の同一性を有する。この群の各配列は、発現された、非天然クモ糸タンパク質のセグメントに対応し

40

50

、そのタンパク質は適切な条件下で絹構造を形成する能力を有する。従って、本発明による所定の実施態様において、各個々のGセグメントは、上述のアミノ酸セグメントから選択されたアミノ酸配列に対して同一である。

【0063】

所定の実施態様において、本発明による各Gセグメントのアミノ酸残基は、-Gln-Gln-ではない。

【0064】

本発明によれば、Gセグメント3つのサブタイプがある。この分類は、ユープロステノプス オーストラリス (*Euprosthenops australis*) MaSp1タンパク質配列 (国際公開第2007/078239号) の注意深い解析に基づいており、その情報は、新規な非天然スパイダーシルクタンパク質の構築において用いられ検証されている。

10

【0065】

本発明によるGセグメントの第一のサブタイプは、アミノ酸の一文字コンセンサス配列GQG(G/S)QGG(Q/Y)GG(L/Q)GQGGYGQGA GSS (配列番号11)により表わされる。この第一の、そして一般的に最長のGセグメントサブタイプは、典型的には、23アミノ酸残基を含むが、わずか17アミノ酸残基しか含まない場合もあり、荷電残基を欠損するか又は一つの荷電残基を含む。従って、この第一のGセグメントサブタイプは、17から23アミノ酸残基を含むことが望まれるが、わずか12又は30ものアミノ酸残基を含み得ることが意図されている。いかなる特定の理論に束縛されることを望むことなく、このサブタイプは、コイル構造又は 3_1 -ヘリックス構造を形成することが想定される。この第一のサブタイプの代表的なGセグメントは、アミノ酸配列10のアミノ酸残基20-42, 84-106, 148-170, 212-234, 307-329, 371-393, 435-457, 530-552, 595-617, 689-711, 753-775, 817-839, 881-903, 946-968, 1043-1059及び1074-1092である。所定の実施態様において、本発明によるこの第一のサブタイプの各Gセグメントの最初の2つのアミノ酸残基は、-Gln-Gln-ではない。

20

【0066】

本発明によるGセグメントの第二のサブタイプは、アミノ酸の一文字コンセンサス配列GQGGQGG(G/R)Y GQG(A/S)G(S/G)S (配列番号12)により表わされる。この第二の、一般には中規模の、Gセグメントサブタイプは、典型的には17アミノ酸残基を含み、荷電残基を欠損するか又は一つの荷電残基を含む。この第二のGセグメントサブタイプは、14から20アミノ酸残基を含むことが望まれるが、わずか12又は30ものアミノ酸残基を含み得ることが意図されている。いかなる特定の理論に束縛されることを望むことなく、このサブタイプは、コイル構造を形成することが想定される。この第二のサブタイプはの代表的なGセグメントは、配列番号10のアミノ酸残基249-265, 471-488, 631-647及び982-998、及び配列番号3のアミノ酸残基187-203である。

30

【0067】

本発明によるGセグメントの第三のサブタイプは、アミノ酸の一文字コンセンサス配列G(R/Q)GQG(G/R)Y GQG(A/S/V)GGN (配列番号13)により表わされる。この第三のGセグメントサブタイプは、典型的には14アミノ酸残基を含み、一般的には本発明によるGセグメントサブタイプの最短である。この第三のGセグメントサブタイプは、12から17アミノ酸残基を含むことが望まれるが、23ものアミノ酸残基を含み得ることが意図されている。いかなる特定の理論に束縛されることを望むことなく、このサブタイプは、ターン構造を形成することが想定される。この第一のサブタイプの代表的なGセグメントは、アミノ酸配列10のアミノ酸残基57-70, 121-134, 184-197, 280-293, 343-356, 407-420, 503-516, 567-580, 662-675, 726-739, 790-803, 854-8

40

50

67, 918 - 931, 1014 - 1027; 及び配列番号3のアミノ酸残基219 - 232である。

【0068】

従って、好ましい実施態様において、各個々のGセグメントは、配列番号11、配列番号12、及び配列番号13から選択されたアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する。

【0069】

REP部分のAセグメントとGセグメントの交互配列の好ましい実施態様において、全ての第二のGセグメントは第一のサブタイプであり、一方残りのGセグメントは第三のサブタイプ、例えば、 $\dots A_1 G_{\text{短い}} A_2 G_{\text{長い}} A_3 G_{\text{短い}} A_4 G_{\text{長い}} A_5 G_{\text{短い}} \dots$ である。REP部分のその他の好ましい実施態様において、第二のサブタイプの一つのGセグメントが、挿入、例えば $\dots A_1 G_{\text{短い}} A_2 G_{\text{長い}} A_3 G_{\text{中間}} A_4 G_{\text{短い}} A_5 G_{\text{長い}} \dots$ を介して規則的にGセグメントを中断する。

10

【0070】

各個々のLセグメントは、任意のリンカーアミノ酸配列を表わし、0から20アミノ酸残基、例えば0から10アミノ酸残基を包含しうる。このセグメントは任意であって、クモ系タンパク質にとって機能的に重要ではないが、その存在は完全に機能的なクモ系タンパク質をさらに可能とし、本発明によるタンパク質構造を形成する。また、ユープロステノプス オーストラリス (*Euprosthenops australis*) 由来のMasp1タンパク質の推定アミノ酸配列の反復部分(配列番号10)に存在するリンカーアミノ酸配列もある。特に、リンカーセグメントのアミノ酸配列は、記載されたAセグメント又はGセグメントの何れかに似ている可能性があるが、一般的には、本明細書で定義されるような基準を満たすには十分でない。

20

【0071】

国際公開第2007/078239号に示されるように、REP部分のC末端部分に配置されたリンカーセグメントは、アミノ酸の1文字コンセンサス配列ASASAASA ASTVANSVS及びASASAAAAにより表わされ、それらはアラニンに富んでいる。実は、第二の配列は本発明によるAセグメントであると考えことができ、一方、第一の配列は本発明によるAセグメントに高度な類似性を有する。本発明によるリンカーセグメントのその他の例では、1文字アミノ酸配列GSAMGQGSを有し、グリシンに富み、本発明によるGセグメントに高度な類似性を有する。リンカーセグメントのその他の例はSASAGである。

30

【0072】

代表的なLセグメントは、配列番号10のアミノ酸残基1 - 6及び1093 - 1110; 配列番号3のアミノ酸残基138 - 142であるが、当業者は、これらのセグメントについて多くの適切な代替アミノ酸配列があることを容易に認識するであろう。本発明によるREP部分の一実施態様において、Lセグメントの一つは0アミノ酸を含む、すなわちLセグメントの一つを欠いている。本発明によるREP部分のその他の実施態様において、両方のLセグメントが0アミノ酸を含む、すなわち両方のLセグメントの一つを欠いている。従って、本発明によるREP部分のこれらの実施態様は、以下のように模式的に表わすことができる; $(AG)_n L$, $(AG)_n AL$, $(GA)_n L$, $(GA)_n GL$; $L(AG)_n$, $L(AG)_n A$, $L(GA)_n$, $L(GA)_n G$; 及び $(AG)_n$, $(AG)_n A$, $(GA)_n$, $(GA)_n G$. 任意のこれらのREP部分は、以下に定められるように、任意のCT部分との使用に適している。

40

【0073】

CT部分は70から120アミノ酸残基を含むタンパク質断片で、クモ系タンパク質のC末端断片から由来する。「に由来する」なる表現は、本発明によるCT部分の関連において、クモ系タンパク質のC末端アミノ酸配列に高度の類似性を有することを意味する。図1に示されるように、このアミノ酸配列はMasp1及びMasp2を含む、様々な種及びスパイダーシルクタンパク質のあいだで良く保存されている。Masp1及びMas

50

p 2 の C 末端領域のコンセンサス配列は、配列番号 9 として提供される。図 1 において、以下の M a S p タンパク質がアラインされ、必要に応じ G e n B a n k の受託エントリで表示されている。

【 0 0 7 4 】

表 1 – スピドロイン CT 部分

種及びスピドロインタンパク質	エントリー	
ユープロステノプス エスピー (<i>Euprosthops sp</i>) MaSp1 (Pouchkina-Stantcheva, NN & McQueen-Mason, SJ, 同書)	Cthyb_Esp	10
ユープロステノプス オーストラリス (<i>Euprosthops australis</i>) MaSp1	CTnat_Eau	
コガネグモ属トリファスキアタ (<i>Argiope trifasciata</i>) MaSp1	AF350266_At1	
スズミグモ (<i>Cyrtophora moluccensis</i>) Sp1	AY666062_Cm1	
ハイロゴケグモ (<i>Latrodectus geometricus</i>) MaSp1	AF350273_Lg1	20
クロゴケグモ (<i>Latrodectus hesperus</i>) MaSp1	AY953074_Lh1	
ホルストジョウゴグモ (<i>Macrothele holsti</i>) Sp1	AY666068_Mh1	
アメリカジョロウグモ (<i>Nephila clavipes</i>) MaSp1	U20329_Nc1	
オオジョロウグモ (<i>Nephila pilipes</i>) MaSp1	AY666076_Np1	
マダガスカルジョロウグモ (<i>Nephila madagascariensis</i>) MaSp1	AF350277_Nm1	
セネガルジョロウグモ (<i>Nephila senegalensis</i>) MaSp1	AF350279_Ns1	30
ウズグモ (<i>Octonoba varians</i>) Sp1	AY666057_Ov1	
ボロアミグモ属シネンシス (<i>Psechrus sinensis</i>) Sp1	AY666064_Ps1	
カウアイアシナガグモ (<i>Tetragnatha kauaiensis</i>) MaSp1	AF350285_Tk1	
アシナガグモ属ベルシココル (<i>Tetragnatha versicolor</i>) MaSp1	AF350286_Tv1	
オニグモ属ビケンテナリウス (<i>Araneus bicentenarius</i>) Sp2	ABU20328_Ab2	40
コガネグモ (<i>Argiope amoena</i>) MaSp2	AY365016_Aam2	
キマダラコガネグモ (<i>Argiope aurantia</i>) MaSp2	AF350263_Aau2	
コガネグモ属トリファスキアタ (<i>Argiope trifasciata</i>) MaSp2	AF350267_At2	

種及びスピドロインタンパク質	<u>エントリー</u>	
チブサトゲグモ(<i>Gasteracantha mammosa</i>) MaSp2	AF350272_Gm2	
ハイロゴケグモ(<i>Latrodectus geometricus</i>) MaSp2	AF350275_Lg2	
クロゴケグモ(<i>Latrodectus hesperus</i>) MaSp2	AY953075_Lh2	
アメリカジョロウグモ(<i>Nephila clavipes</i>) MaSp2	AY654293_Nc2	
マダガスカルジョロウグモ(<i>Nephila madagascariensis</i>) MaSp2	AF350278_Nm2	10
セネガルジョロウグモ(<i>Nephila senegalensis</i>) MaSp2	AF350280_Ns2	
ドロメデス テネブロスス(<i>Dolomedes tenebrosus</i>) Fb1	AF350269_DtFb1	
ドロメデス テネブロスス(<i>Dolomedes tenebrosus</i>) Fb2	AF350270_DtFb2	
ニワオニグモ(<i>Araneus diadematus</i>) ADF-1	U47853_ADF1	20
ニワオニグモ(<i>Araneus diadematus</i>) ADF-2	U47854_ADF2	
ニワオニグモ(<i>Araneus diadematus</i>) ADF-3	U47855_ADF3	
ニワオニグモ(<i>Araneus diadematus</i>) ADF-4	U47856_ADF4	

【0075】

CT部分が完全には欠失していない限り、本発明によるクモ系タンパク質において、どの特異的CT部分が存在するかは重大ではない。従って、本発明によるCT部分は、図1及び表1に示されたアミノ酸配列又は高度な類似性を持つ配列の何れかから選択することができる。様々なC末端配列が、本発明によるスパイダーシルクタンパク質に使用することができる。

30

【0076】

本発明によるCT断片の配列は、図1のアミノ酸配列に基づいて、コンセンサスアミノ酸配列の配列番号9に対して、少なくとも50%同一性、好ましくは少なくとも60%同一性、より好ましくは少なくとも65%の同一性、又は実に少なくとも70%の同一性を有する。

【0077】

本発明による代表的なCT部分は、ユープロステノプス オーストラリス(*Euprosthenops australis*)配列の配列番号7である。従って、本発明による好ましい態様によれば、CT部分は、配列番号7又は図1及び表1の個々の何れかのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%の同一性を有する。本発明の好ましい実施態様において、CT部分は配列番号7又は図1及び表1の個々の何れかのアミノ酸配列に対して同一である。

40

【0078】

CT部分は70から120アミノ酸残基からなる。CT部分は、少なくとも70、又は80を上回る、好ましくは90を上回るアミノ酸残基を含むことが望まれる。また、CT部分は、多くても120、又は110未満のアミノ酸残基を含むことが望まれる。典型的なCT部分は約100アミノ酸残基を含む。

【0079】

NT部分は100から160アミノ酸残基を含むタンパク質断片で、クモ系タンパク質

50

のN末端断片に由来する。「に由来する」なる表現は、本発明によるNT部分の関連において、クモ糸タンパク質のN末端アミノ酸配列に高度の類似性を有することを意味する。図2に示されるように、このアミノ酸配列はMaSp1及びMaSp2を含む、様々な種及びスパイダーシルクタンパク質のあいだで良く保存されている。図2において、以下のスピドロインNT部分がアラインされ、必要に応じGenBankの受託エントリーで表示されている。

【0080】

表 2 - スピドロイン NT 部分

<u>コード</u>	<u>種及びスピドロインタンパク質</u>	<u>GenBank</u> <u>受入番号</u>	
Ea MaSp1	ユープロステノプス オーストラリス (<i>Euprosthops australis</i>) MaSp 1	AM259067	
Lg MaSp1	ハイイロゴケグモ (<i>Latrodectus geometricus</i>) MaSp 1	ABY67420	10
Lh MaSp1	クロゴケグモ (<i>Latrodectus hesperus</i>) MaSp 1	ABY67414	
Nc MaSp1	アメリカジョロウグモ (<i>Nephila clavipes</i>) MaSp 1	ACF19411	
At MaSp2	コガネグモ属トリファスキアタ (<i>Argiope trifasciata</i>) MaSp 2	AAZ15371	
Lg MaSp2	ハイイロゴケグモ (<i>Latrodectus geometricus</i>) MaSp 2	ABY67417	20
Lh MaSp2	クロゴケグモ (<i>Latrodectus hesperus</i>) MaSp 2	ABR68855	
Nim MaSp2	マダガスカルジョロウグモ (<i>Nephila inaurata</i> <i>madagascariensis</i>) MaSp 2	AAZ15322	
Nc MaSp2	アメリカジョロウグモ (<i>Nephila clavipes</i>) MaSp 2	ACF19413	30
Ab CySp1	ナガコガネグモシリンダー状スピドロイン1 (<i>Argiope bruennichi</i> cylindriform spidroin 1)	BAE86855	
Ncl CySp1	ジョロウグモシリンダー状スピドロイン1 (<i>Nephila clavata</i> cylindriform spidroin 1)	BAE54451	
Lh TuSp1	クロゴケグモ小管状スピドロイン (<i>Latrodectus hesperus</i> tubuliform spidroin)	ABD24296	40
Nc Flag	ジョロウグモ鞭毛状系タンパク質 (<i>Nephila clavipes</i> flagelliform silk protein)	AF027972	
Nim Flag	マダガスカルジョロウグモ鞭毛状系タンパク質 (<i>Nephila inaurata</i> madagascariensis flagelliform silk protein)	AF218623 (翻訳された)	

【 0 0 8 1 】

N 末端部分に対応する部分のみが、シグナルペプチドを除いて、各配列について示され

50

ている。NcフラッグとN1mフラッグが、Rising A. et al. Biomacromolecules 7, 3120-3124 (2006)に従って翻訳され編集された。

【0082】

本発明によるクモ系タンパク質において、どの特定のNT部分が存在しているかは重大ではない。従って、本発明によるNT部分は、図2に示されたアミノ酸配列又は高度な類似性を持つ配列の何れかから選択することができる。様々なN末端配列を、本発明によるクモ系タンパク質に使用することができる。図2の相同配列に基づいて、以下の配列が、コンセンサスNTアミノ酸配列を構成する：QANTPWSSPNLADAFINSF(M/L)SA(A/I)SSSGAFSADQLDDMSTIG(D/N/Q)TLMAMD(N/S/K)MGRSG(K/R)STKSKLQALNMAFASSMAEI
AAAESGG(G/Q)SVGVKTNAISDALSSAFYQTTGSVNPQFV(N/S)EIRSLI(G/N)M(F/L)(A/S)QASANEV(配列番号8)。

10

【0083】

好ましい実施態様において、本発明によるNT断片の配列は、図2のアミノ酸配列に基づいて、コンセンサスアミノ酸配列の配列番号8に対して、少なくとも50%同一性、好ましくは少なくとも60%同一性を有する。好ましい実施態様において、本発明によるNT部分の配列は、コンセンサスアミノ酸配列の配列番号8に対して、少なくとも65%同一性、好ましくは少なくとも70%同一性を有する。好ましい実施態様において、本発明によるNT部分は、コンセンサスアミノ酸配列の配列番号8に対して、更に70%、好ましくは80%の類似性を有する。

20

【0084】

本発明による代表的なNT部分は、ユープロステノプス オーストラリス(Euprosthénops australis)配列の配列番号6である。本発明の好ましい実施態様によれば、NT部分は、配列番号6又は図1の個々の何れかのアミノ酸配列に対して、少なくとも80%の同一性を有する。本発明の好ましい実施態様において、NT部分は、配列番号6又は図2の個々の何れかのアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、例えば少なくとも95%の同一性を有する。本発明の好ましい実施態様において、NT部分は配列番号6又は図1の個々の何れかのアミノ酸配列に対して、特にEaMaSp1に対して同一である。

30

【0085】

NT部分は100から160アミノ酸残基を含む。NT部分は、少なくとも100、又は110を上回る、好ましくは120を上回るアミノ酸残基を含むことが望まれる。また、NT部分は、多くても160、又は140未満のアミノ酸残基を含むことが望まれる。典型的なNT部分は約130から140アミノ酸残基を含む。

【0086】

B部分は、30アミノ酸残基以上を含むタンパク質又はポリペプチド断片である。B部分は、好ましくは40アミノ酸残基以上、例えば50アミノ酸残基以上を含んでいる。B部分は、好ましくは500アミノ酸残基未満、例えば200アミノ酸残基未満、より好ましくは100アミノ酸残基未満、例えば100アミノ酸残基未満を含んでいる。それは有機ターゲットと選択的相互作用することができ、有機ターゲットと選択的相互作用する能力を与えるのは融合タンパク質のB部分である。

40

【0087】

B部分は非スピドロイン部分である。このことは、それがクモ系タンパク質から由来しない、即ちクモ系タンパク質に対して低程度の同一性及び/又は類似性を持つか、或いは全く同一性及び/又は類似性を持たないことを意味する。本発明によるB部分の配列は、ここで開示されたスピドロインアミノ酸配列の何れか、特に配列番号6から10の何れかに対して、30%未満の同一性、例えば20%未満の同一性、好ましくは10%未満の同一性を有する。

【0088】

50

B部分を選択することは当業者の能力の範囲内と見なされる。にもかかわらず、B部分として有用であると証明され得る親和性リガンドの例、並びに検出及び/又は定量化のための形態と条件の例が説明の目的で下に与えられる。

【0089】

親和性リガンドの選択に必要とされる生物分子の多様性は、複数の可能性のある足場分子の一つの組み合わせ操作により生成することができ、次いで、特異的及び/又は選択的親和性リガンドが適切な選択プラットフォームを用いて選択される。有機ターゲットに対する親和性リガンドを生成するために有用なそのような構造の非限定的な例として、ブドウ球菌タンパク質およびそれらのドメイン及びZドメイン等のこれらのドメインの誘導體 (Nord K et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:772-777); リボカリン (Beste G et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:1898-1903); アンキリンリピートドメイン (Binz HK et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 332:489-503); セルロース結合ドメイン (CBD) (Smith GP et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 277:317-332; Lehtio J et al. (2000) *Proteins* 41:316-322); クリスタリン (Fiedler U and Rudolph R, 国際公開第01/04144号); 緑色蛍光タンパク質 (GFP) (Peelle B et al. (2001) *Chem. Biol.* 8:521-534); ヒトの細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4 (CTLA-4) (Hufton SE et al. (2000) *FEBS Lett.* 475:225-231; Irving RA et al. (2001) *J. Immunol. Meth.* 248:31-45); ノッティン (knottin) タンパク質などのプロテアーゼ阻害剤、(Wentzel A et al. (2001) *J. Bacteriol.* 183:7273-7284; Baggio R et al. (2002) *J. Mol. Recognit.* 15:126-134) 及びクニツドメイン (Roberts BL et al. (1992) *Gene* 121:9-15; Dennis MS and Lazarus RA (1994) *J. Biol. Chem.* 269:22137-22144); PDZドメイン (Schneider S et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:170-175); オレドキシシンなどペプチドアプタマー (Lu Z et al. (1995) *Biotechnology* 13:366-372; Klevenz B et al. (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1993-1998); ブドウ球菌ヌクレアーゼ (Norman TC et al. (1999) *Science* 285:591-595); テンダミスタット (McConell SJ and Hoess RH (1995) *J. Mol. Biol.* 250:460-479; Li R et al. (2003) *Protein Eng.* 16:65-72); フィブロネクチン III型ドメインに基づくトリネクチン (Koide A et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 284:1141-1151; Xu L et al. (2002) *Chem. Biol.* 9:933-942); 及び垂鉛フィンガー (Bianchi E et al. (1995) *J. Mol. Biol.* 247:154-160; Klug A (1999) *J. Mol. Biol.* 293:215-218; Segal DJ et al. (2003) *Biochemistry* 42:2137-2148) があげられる。

【0090】

上記の例は、新規の結合特異性の生成に使用される単一のランダム化されたループを提示する足場タンパク質、タンパク質表面から突出する側鎖が、新規の結合特異性を生成するためのランダム化される剛性の二次構造を有するタンパク質の足場、及び新規結合特異性の生成のために使用される非連続的な超可変ループ領域を示す足場を含む。

【0091】

オリゴヌクレオチドはまた親和性リガンドとして使用することができる。アプタマーもしくはデコイと呼ばれる一本鎖核酸は、明確に定義された三次元構造にフォールドし、高い親和性と特異性でそれらのターゲットに結合する。(Ellington AD and Szostak JW (1990) *Nature* 346:818-822; Brody EN and Gold L (2000) *J. Biotechnol.* 74:5-13; Mayer G and Jenne A (2004) *BioDrugs* 18:351-359)。オリゴヌクレオチドリガンドは、RNAまたはDNAのいずれかとなることができ、ターゲット分子のクラスの広い範囲に結合することができる。

【0092】

上述の足場構造体の任意の変異体のプールからの所望の親和性リガンドの選択において、多くの選択プラットフォームが、選択した標的タンパク質に対する特異的新規リガンドの単離のために利用することができる。選択プラットフォームは、限定されないが、フェージディスプレイ (Smith GP (1985) *Science* 228:1315-1317), リボソームディスプレイ (Hanes J and Plueckthun A (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4937-4942), 酵母2-ハイブリッド系 (Fields S and Song O (1989) *Nature* 340:245-246), 酵母ディス

10

20

30

40

50

プレイ(Gai SA and Wittrup KD (2007) Curr Opin Struct Biol 17:467-473), mRNAディスプレイ(Roberts RW and Szostak JW (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12297-12302), 細菌ディスプレイ(Daugherty PS (2007) Curr Opin Struct Biol 17:474-480, Kronqvist N et al. (2008) Protein Eng Des Sel 1-9, Harvey BR et al. (2004) PNAS 101(25):913-9198), マイクロビーズディスプレイ(Nord O et al. (2003) J Biotechnol 106:1-13, 国際公開第01/05808号), SELEX(System Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)(Tuerk C and Gold L (1990) Science 249:505-510)およびタンパク質断片相補アッセイ(PCAA)(Remy I and Michnick SW (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:5394-5399)を含む。免疫グロブリン、アルブミン、又は他の有機ターゲットに対する親和性を持つB部分の好ましい群は、細菌レセプチンドメイン又はその誘導体である。

10

【0093】

B部分の好ましい群は、免疫グロブリン及び免疫グロブリン又はその誘導体を含む分子と選択的相互作用することができる。免疫グロブリンサブクラスの好ましい群は、ブドウ球菌プロテインAに由来するZドメインによって認識されるサブクラスである。即ち、ヒト由来のIgG1、IgG2、IgG4、IgAおよびIgM、ウサギと牛由来の全Igサブクラス、モルモット由来のIgG1とIgG2、及びマウス由来のIgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3及びIgM(Hober, S. et al., J. Chromatogr B. 848:40-47 (2007)を参照)、より好ましくはヒト由来の免疫グロブリンサブクラスのIgG1, IgG2, IgG4, IgA及びIgMである。免疫グロブリンサブクラスの別の好ましい群は、C2ドメイン連鎖球菌プロテインGによって認識されるサブクラス、即ち、IgG3を含む全ヒトサブクラス、及びマウス、ウサギ及び羊を含む数種の動物由来のIgGである。

20

【0094】

好ましいB部分の一群は、ブドウ球菌プロテインAに由来するZドメイン、ブドウ球菌タンパク質およびそのドメイン、好ましくはE、D、A、B及びCドメイン、連鎖球菌プロテインG及びそのドメイン、好ましくはC1、C2及びC3ドメイン;及びこれらのアミノ酸配列のいずれかに対して、少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、又は少なくとも90%の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される。好ましくは、B部分は、ブドウ球菌プロテインAに由来するZドメイン、ブドウ球菌タンパク質のBドメイン、及び連鎖球菌プロテインGのC2ドメイン;及びこれらのアミノ酸配列のいずれかに対して、少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、又は少なくとも90%の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される。好ましくは、B部分は、ブドウ球菌プロテインAに由来するZドメイン、及びこのアミノ酸配列に対して、少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、又は少なくとも90%の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される。B部分はブドウ球菌プロテインAに由来するZドメインおよび連鎖球菌プロテインGのC2ドメインからなる群から選択されるのが望ましい。例えば実施例1-6及び8を参照。免疫グロブリンに対する親和性を持つB部分の好ましい群は、細菌レセプチンドメイン又はその誘導体である。

30

40

【0095】

好ましいB部分の別の群は、アルブミン及びアルブミン又はその誘導体を含む分子と選択的相互作用することができる。アルブミンに対する親和性を持つB部分の好ましい群は、細菌レセプチンドメイン又はその誘導体である。好ましいB部分は、連鎖球菌プロテインG、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメイン、Finegoldia magna由来のGAモジュール;及びこれらのアミノ酸配列のいずれかに対して、少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、又は少なくとも90%の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される。好ましくは、B部分は、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメイン、及びこのアミノ酸配列に対して、少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、又は少なくとも90%の同一性を有するタン

50

パク質断片からなる群から選択される。B部分は連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメインであることが望ましい。例えば実施例7を参照。

【0096】

好ましいB部分の更なる群は、ビオチン及びビオチン又はその誘導体又はその類似体を含む分子と選択的相互作用が可能である。好ましいB部分は、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン(M4)；及びこれらのアミノ酸配列のいずれかに対して、少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、又は少なくとも90%の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される。B部分は単量体ストレプトアビジン(M4)であることが望ましく、例えば実施例10-12を参照。

【0097】

本発明に係る具体的な融合タンパク質およびタンパク質構造は実施例に与えられる。これらの好ましい融合タンパク質は配列番号14, 16, 18, 22, 24及び26からなる群を形成する。更なる好ましい融合タンパク質は、これらのアミノ酸配列の何れかに対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の同一性を有している。

【0098】

本発明は、本発明による融合タンパク質をコードする単離されたポリ核酸を更に提供する。特に、具体的なポリ核酸が実施例及び付加配列リスト、例えば配列番号15, 17, 19, 23, 25及び27に与えられる。さらに好ましいポリ核酸は、配列番号14, 16, 18, 22, 24及び26の何れかに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%同一性を有する融合タンパク質をコードする。

【0099】

本発明に係るポリ核酸は、本発明の融合タンパク質を産生するのに有用である。本発明は、融合タンパク質の生産方法を提供する。第一の工程は、本発明に係る融合タンパク質を適切な宿主で発現することを含む。適切な宿主は、当業者に周知であり、例えば、細菌細胞及び真核細胞、例えば、酵母、昆虫細胞株及び哺乳動物細胞株などを含む。典型的には、この工程は、大腸菌中で融合タンパク質をコードするポリ核酸分子の発現を含む。

【0100】

第二の方法の工程では、融合タンパク質を含有する混合物を得ることを含む。混合物は、例えば、宿主細胞を溶解又は機械的に破壊することによって得ることができる。融合タンパク質が宿主細胞によって分泌される場合に、混合物はまた、細胞培養培地を収集することによって得ることができる。このようにして得られたタンパク質は、標準的な手順を用いて単離することができる。必要であれば、この混合物を遠心分離にかけて、適切な画分(沈殿物又は上清)を収集することができる。融合タンパク質を含有する混合物はまた、分離させるために、ゲルろ過クロマトグラフィー、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー、透析法、相分離又は濾過に供することができる。任意で、リポ多糖及び他の発熱物質がこの段階で積極的に除去される。必要ならば、リンカーペプチドは、この工程で切断することによって除去することができる。

【0101】

本発明によるタンパク質構造は、適切な条件下で、本発明に係る融合タンパク質から自発的に構築され、ポリマーへの集合は、剪断力の存在、及び/又は2つの異なる相の間、例えば固体と液体相との間、空気と液相との間の界面、又は疎水性/親水性界面、例えば、鉱物油-水界面によって促進される。得られた界面の存在は、界面において又は界面周囲の領域における重合を刺激し、その領域は前記重合が前記界面又は前記界面領域で開始するように、液体培地に広がっている。種々のタンパク質構造が、構築の最中に条件を適合させることにより生成することができる。例えば、その構築を軽く左右に振られる容器中で生じさせる場合、繊維が、空気-水界面に形成される。混合物を静置する場合、薄膜が空気-水界面に形成される。混合物を蒸発させる場合、薄膜は容器の底部に形成される。油が水性混合物に添加される場合、静置した場合又は振った場合に、薄膜が、油-水界

10

20

30

40

50

面に形成される。この混合物を例えば空気のバブリング又は泡立てにより発泡させる場合、発泡体は安定し、乾燥させた場合に固化する。

【0102】

従って、本発明は、有機ターゲットに対する結合親和性を示すタンパク質構造を与えるための方法を提供する。第一の方法工程にて、本発明による組換え融合タンパク質が与えられる。融合タンパク質は、本発明によるポリ核酸から、適切な宿主中でそれを発現させることにより与えられ得る。第二の方法工程にて、融合タンパク質は組換え融合タンパク質を含むポリマーの形成を達成するための条件にさらされる。特に、自発的に構築されたタンパク質構造はヘキサフルオロイソプロパノールに可溶化することができるが、可溶化された融合タンパク質は、その後自発的に、例えば繊維に、再構築できない。

10

【0103】

タンパク質構造は、有機ターゲットの固定化用の親和性培地の一部として有用であり、ここでB部分は有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。サンプル、例えば生物学的サンプルは、生物学的サンプルに存在する有機ターゲットに結合することができる本発明による融合タンパク質又はタンパク質構造に適用することができ、その融合タンパク質又はタンパク質構造はその後サンプルからの有機ターゲットの分離に有用である。生物学的サンプル、例えば被験体から除去された血液、血清又は血漿などは、有機ターゲットの検出、分離及び/又は定量化を受ける。

【0104】

従って本発明はサンプルからの有機ターゲットの分離のための方法を与える。サンプル、例えば、有機ターゲットを含む血液、血清又は血漿が与えられる。生物学的サンプルは、前に得られた試料である場合がある。もし以前に得たサンプルを方法で用いる場合、本方法の工程はヒト又は動物の体で実施されない。

20

【0105】

本発明による親和性培地は、本発明による融合タンパク質又はタンパク質構造を含んで与えられる。所定の実施態様にて、親和性培地は、本発明による融合タンパク質又はタンパク質構造を含有している。親和性培地は、本発明による融合タンパク質のB部分を用いて、有機ターゲットと選択的相互作用することができる。親和性培地は、親和性培地と有機ターゲット間の結合を達成するのに適した条件下でサンプルと接触される。結合しないサンプルは、親和性培地と有機ターゲット間の選択的結合を維持するのに適した条件下で除去される。本方法は親和性培地、特に本発明による融合タンパク質に固定化した有機ターゲットを生じる。

30

【0106】

本発明による好ましい方法にて、親和性培地中の融合タンパク質は、親和性培地と有機ターゲット間の結合を達成するために親和性培地とサンプルを接触させると、本発明によるタンパク質構造として存在する。

【0107】

この点において特に有用なタンパク質構造は、薄膜または繊維であり、B部分はブドウ球菌プロテインAに由来するZドメイン又はそれに対して少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、又は少なくとも90%の同一性を有するタンパク質断片であり、例えば実施例1-6を参照。薄膜は、固体構造、例えばマイクロタイタープレートのプラスチックへ付着するという点で有利である。薄膜のこの特性は、洗浄と再生手順を容易にし、分離の目的に非常に有用である。

40

【0108】

Zドメインのアルカリ安定性は、本発明によるタンパク質構造中で本発明による融合タンパク質の部分であるときに更に拡張することができることが驚くべきことに観察されている。この特性は洗浄及び再生目的に非常に有用であり得、例えば高濃度のNaOH、例えば0.1M、0.5M、1M又は1M以上、例えば2Mを許容し、及び/又は高濃度の尿素、例えば6~8Mを許容する。この化学的安定性はまた、アフィニティー精製のためのZドメインの使用の反復サイクルを可能にするために有用であり得る。このアルカリ安

50

定性は、Zドメインの安定化変異体を利用することによって更に増加させることができる。更に、Zドメインを含む本発明による融合タンパク質は熱に安定であることが有利に示されている。このことは結合活性を維持して熱による滅菌を可能とする。

【0109】

Zドメインを含む従来の親和性マトリックスの既知の問題は、親和性マトリックスからのZドメインの漏出である。ペプチド結合によるZドメインの本発明の融合タンパク質への安定した導入のため、本発明のタンパク質構造からのZドメインの望ましくない漏出は低いか又は存在しないことが考慮される。本発明による融合タンパク質の別の利点は、得られたタンパク質構造が高密度のZドメイン（又は他のB部分）を有することである。この高密度が高い結合能を与えることが熟慮される。要するに、融合タンパク質のこれらの特性は様々なB部分に対して、特に生産に無駄のないタンパク質Zを用いる親和性精製に非常に魅力的である。またこれらの特性は、従来のゲルビーズアフィニティーカラム、例えば濾過様形式よりも他の形式において有用である。

10

【0110】

固定化有機ターゲットは第二の有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。本方法は次いで、第一有機ターゲットと第二有機ターゲット間の選択的相互作用を達成するために適した条件下で、第一の有機ターゲットとの選択的相互作用を可能とする、前記親和性培地と固定化有機ターゲットを第二の有機ターゲットと接触させる工程を更に含む。

【0111】

固定化有機ターゲットは検出可能であるか及び/又は定量可能である。有機ターゲットの検出及び/又は定量化は、様々な生物学的又は非生物学的相互作用に基づくアッセイにおける結合試薬の検出及び/又は定量的ための当業者に既知の任意の方法で達成され得る。有機ターゲットは様々なマーカでそれ自身が標識され得るか、或いは、検出、可視化及び/又は定量化を可能にする2次標識親和性リガンドにより同様に検出され得る。これは、当業者に既知の多くの技術の任意の1以上を使用して、任意の過度の実験を包含せずに、有機ターゲット又は任意の2次親和性リガンドに結合され得る多数の標識の任意の1以上を用いて達成することができる。有機ターゲットおよび/または二次親和性リガンドに結合させることができる標識の非限定的な例は、蛍光色素または金属（例えば、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン、カミン）、発色色素（例えば、ロドプシン）、化学発光化合物（例えば、腔、イミダゾール）及び生物発光タンパク質（例えば、ルシフェリン、ルシフェラーゼ）、ハプテン（例えば、ビオチン）が挙げられる。様々な他の有用な蛍光剤と発色が、Stryer L (1968) Science 162:526-533 and Brand L and Gohlke J R (1972) Annu. Rev. Biochem. 41:843-868に記載されている。有機ターゲットおよび/または二次親和性リガンドはまた、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ラクタマーゼ）、放射性同位元素（例えば ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S 又は ^{125}I ）及び粒子（例えば金）で標識することができる。本開示の関連において、「粒子」とは分子の標識に適した金属粒子などの粒子を指す。更に、親和性リガンドは、蛍光半導体ナノ結晶（量子ドット）で標識することができる。量子ドットは、優れた量子収率を有し、有機蛍光色素に比べて光安定であり、したがって、より容易に検出される(Chan et al. (2002) Curr Opin Biotech. 13: 40-46)。異なるタイプの標識が、様々な化学、例えばアミン反応又はチオール反応を用いて有機ターゲット又は2次親和性リガンドに結合することができる。しかし、アミンとチオール以外の他の反応基、例えば、アルデヒド、カルボン酸およびグルタミンを用いることができる。

20

30

40

【0112】

検出及び/又は定量化が2次有機ターゲット又は2次親和性リガンドへの曝露を含む場合には、親和性培地は非結合親和性リガンドを除去するためにバッファーでもう一度洗浄される。例として、2次親和性リガンドは抗体又は断片又はその誘導体であり得る。その後、有機ターゲットは従来の方法で検出及び/又は定量化することができる。2次親和性リガンドに対する結合特性は変わることがあるが、当業者は日常の実験による各々の決定について、操作的で最適なアッセイ条件を決定することができるべきである。

50

【0113】

標識分子の検出、局在化および/または定量は、例えば光学顕微鏡又は免疫蛍光顕微鏡などの可視化技術を含んでも良い。他の方法は、フローサイトメトリー又は発光測定を介した検出を含むことができる。標識の可視化の方法としては、限定されるものではないが、蛍光、発光測定および/または酵素的技術を含むことができる。蛍光は、特定の波長の光に蛍光標識を露光し、その後、特定の波長領域で放射された光を検出及び/又は定量化することによって検出及び/又は定量化される。発光タグ付けされた分子の存在は、化学反応の最中に生じた発光により検出及び/又は定量化され得る。酵素反応の検出は、化学反応から生じるサンプル中の色ずれによるものである。当業者は、様々な異なるプロトコルが適切な検出及び/又は定量化するために変更可能であることを認識している。

10

【0114】

有機ターゲットの検出及び/又は定量化のための一つの利用可能な方法は、それ或いは2次親和性リガンドを、後に酵素免疫測定法(例えば、EIA又はELISAなど)で検出及び/又は定量化可能である酵素に結合させることによる。そうした技術は十分に確立されており、その実現には当業者に不当な困難を提示しない。そうした方法において、生物学的サンプルは、有機標的に結合する本発明に係るタンパク質構造と接触させられ、その後酵素的に標識された二次親和性リガンドで検出及び/又は定量化される。この後、適切な基質を適切な緩衝液中で酵素標識と反応させ化学的部分を生成し、それは例えば分光光度計、蛍光光度計、ルミノメーターを使用するか又は視覚的な手段により検出及び/又は定量化される。

20

【0115】

有機ターゲット又は二次親和性リガンドは、検出及び/又は定量化を可能にするために放射性同位体で標識することができる。本開示の適切な放射性標識の非限定的な例は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 又は ^{125}I である。標識した親和性リガンドの特異的活性は、放射性標識の半減期、同位体の純度、及びどのように標識が親和性リガンドに組み込まれているのかに依存する。親和性リガンドは、好ましくは、周知の技術を用いて標識される(Wensel TG and Meares CF (1983) in: Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy (Burchiel SW and Rhodes BA eds.) Elsevier, New York, pp 185-196)。このように放射性標識された親和性リガンドは、放射能の検出による有機ターゲットを視覚化するために使用することができる。放射性核種のスキャンは、例えばガンマカメラ、磁気共鳴分光法、放射トモグラフィー、ガンマ/ベータカウンター、シンチレーションカウンター及びラジオグラフ(radiographies)で行うことができる。

30

【0116】

従って、サンプルは、有機ターゲットの検出、分離及び/又は定量化のためのタンパク質構造に適用することができる。この手順は有機ターゲットの検出を可能にするだけでなく、その分布とその発現の相対的水準を更に示し得る。任意で、有機ターゲットは親和性培地から遊離され回収することができる。従って、本用途は有機ターゲットが固定化されている親和性培地上での親和性精製を含んでも良い。タンパク質構造は、カラム又はウェルプレート(例えば、96ウェルプレートなど)中又は磁気ビーズ、アガロースビーズ又はセファロースビーズに例えば配置されても良い。更に、本用途は、例えばデキストランマトリックスを用いる水溶性マトリックス上でのタンパク質構造の使用、又は、BiacoreTM機器などの表面プラズモン共鳴装置での使用を含んでも良く、その分析は、例えば固定化された有機ターゲット又は数多くの潜在的な親和性リガンドに対する親和性をモニタリングすることを含んでもよい。

40

【0117】

本発明に係るタンパク質構造は、酸、塩基及びカオトロピック剤を含む様々な洗浄剤で洗浄し、再生することができる。特に有用な洗浄剤は、例えば、0.1、0.5、1MのNaOHのような水酸化ナトリウム又は例えば6-8M尿素などの尿素を含む。本発明に係るタンパク質構造は、驚くべきことに、化学処理及び/又は滅菌加熱処理に対して耐性であるため、本タンパク質構造の使用を伴う本発明による方法は、タンパク質構造の再生の

50

最終工程を含み得る。本方法は、好ましくは、化学的処理及び／又は滅菌熱処理による親和性培地の再生の最終工程を含む。化学的処理は例えば、0.1、0.5、1 MのNaOHのよう水酸化ナトリウム又は例えば6 - 8 M尿素などの尿素による処理を含む。

【0118】

本発明に係る融合タンパク質はまた、融合タンパク質を重合させ、例えば、薄膜、発泡体又は繊維などのタンパク質構造を形成することができるようにする前に、溶液中の有機ターゲットに結合させることができる。そのようなスピドロイン由来部分（例えばREP-CT）及びB部分を組み込んだ対応する融合タンパク質は両方とも、夾雑タンパク質の存在下においてさえも、材料中に感知できるほどの夾雑物を取り込まれることなく、固体構造に重合し、その機能性（B）部位はそれらの期待される結合特性を保持する。従って、B部分の結合特性は周囲の溶液由来の化合物又は細胞を捕捉し、その捕捉された化合物又は細胞を本発明によるタンパク質構造の中に組み込むために用いることができる。

10

【0119】

従って、本発明による別の好ましい方法にて、親和性培地中の融合タンパク質は、親和性培地と有機ターゲット間の結合を達成するために親和性培地とサンプルを接触させると溶液中に存在する。有機ターゲットに結合した融合タンパク質の複合体は、その後、本発明による融合タンパク質を形成させられる。

【0120】

この方法は、その目的が、溶液から特定の分子や細胞を「取り出す」こと、例えば標的タンパク質が分泌されるときに、大規模な真核細胞生産系の培地から標的分子を得ることであるときに特に有用である。スピドロイン由来部分による標的分子の結合と固体構造の形成を生理学的条件下で行うことができるため、及びスピドロイン由来部分が細胞適合性（cytocompatible）であるゆえ、本方法は、継続的な生産工程に対して繰り返し適用することができる。

20

【0121】

本発明によるタンパク質構造はまた細胞の分離、固定化、及び／又は培養に有用である。この点で特に有用なタンパク質構造は、薄膜、繊維又は発泡体である。例えば実施例14と23を参照。薄膜は、固体構造、例えばマイクロタイタープレートのプラスチックへ附着するという点で有利である。薄膜のこの特性は、洗浄と再生手順を容易にし、分離の目的に非常に有用である。

30

【0122】

従って、本発明は、細胞表面上に存在する有機ターゲットを有する細胞の培養のための細胞足場材料を提供する。細胞足場材料は、本発明に係るタンパク質構造を含んでいる。所定の実施態様にて、細胞足場材料は、本発明によるタンパク質構造からなる。

【0123】

本発明の融合タンパク質を含む、及び任意で該タンパク質からなるポリマーを含む細胞足場材料は、様々な異なる環境設定下で、細胞、好ましくは真核細胞のの培養のために有益な環境を提供することが本発明者らによって見いだされている。更に、この環境は、それ以外の場合には非常に難しい、実験室で培養するには非常に費用がかかるか又は不可能でさえある細胞の培養の確立及び、組織工学及び／又は移植に有用な材料を含有する細胞の樹立について可能としている。

40

【0124】

本発明はまた、細胞、好ましくは真核細胞と本発明による細胞足場材料の組み合わせを提供する。本発明によるそうした組み合わせは、様々な異なる形態において提示され得、かつ特定の状況の必要性に合わせて調整され得る。例えば、本発明の組み合わせは、損傷又は疾患組織での細胞の置換のための細胞含有移植片として有用であり得ることを意図している。

【0125】

細胞足場材料は、直接的または間接的に細胞を捕捉するために利用することができる。直接捕捉において、B部分は、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用

50

が可能である。あるいは、B部分は、中間体有機ターゲットと選択的相互作用が可能で、中間体有機ターゲットに結合し、その中間体有機ターゲットは、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。従って、間接的な捕捉において、細胞足場材料は、中間体有機ターゲットを更に含んでおり、B部分は、選択的相互作用が可能であり、該中間体有機ターゲットに結合される。中間体有機ターゲットは、同様に、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。

【0126】

本明細書に開示される細胞足場材料の一実施態様において、融合タンパク質は、さらに、オリゴペプチド細胞結合モチーフを含んでいる。特定の状況で特定の細胞の培養に関連して、オリゴペプチド細胞結合モチーフの存在は、細胞生存率を改善するか又は維持することが観察されており、クモ系タンパク質の一部として、細胞足場材料へのそのようなモチーフの包含は更なる利点を提供すると考えられる。細胞結合モチーフは、少なくとも1つのペプチド結合を介して融合タンパク質の残りの部分に結合されたオリゴペプチドである。例えば、融合タンパク質の残りのN末端又はC末端、又はクモ系タンパク質の残りの部分のアミノ酸配列内の任意の位置に結合され得る。オリゴペプチド細胞結合モチーフの選択に関して、当業者は、いくつかの選択肢を知っている。該オリゴペプチドは、例えば、RGD、IKVAV、YIGSR、EPDIM及びNKDILからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み得る。RGD、IKVAV及びYIGSRは、一般的な細胞結合モチーフであり、一方EPDIMとNKDILはケラチノサイトの栽培との関連で特に有用であるケラチノサイト固有のモチーフとして知られている。他の有用な細胞結合モチーフは、トロポエラスチンからのGRKRK、KYGAASIKVAVSADR（ラミニン由来）、NGEPRGDTYRAY（骨シアロタンパク由来）、PQVTRGDVFTMP（ピトロネクチン由来）、およびAVTGRGDSPASS（フィブロネクチン由来）を含む。クモ系タンパク質の残りの部分へのオリゴペプチド細胞結合モチーフの結合は、標準的遺伝子工学又は化学結合技術を用いて当業者によって容易に達成される。従って、幾つかの実施態様において、細胞結合モチーフは、遺伝子工学、すなわち、融合タンパク質をコードする核酸と細胞結合モチーフとの間の遺伝子融合の一部を形成することを介して導入される。そうした実施態様のさらなる有益な特徴として、細胞結合モチーフは、細胞足場材料を構成するポリマー中で融合タンパク質の単量体に対して1：1の比率で存在するであろう。

10

20

30

【0127】

本明細書に記載の方法または組合せで使用される細胞足場材料中のポリマーは、様々な物理的形態をとることができ、特定の物理的形態の用途は、異なる特定の状況において更なる利点を供与することができる。例えば、本方法または組合せの実施態様において、細胞足場材料は、薄膜、発泡体、繊維及び繊維メッシュからなる群から選択される物理的形態である。

【0128】

従って、本発明は、細胞の固定化のための方法を提供する。サンプル、例えば関心のある含む細胞を含有する血液などの生体試料が提供される。生物学的サンプルは、前に得られた試料である場合がある。もし以前に得たサンプルを方法で用いる場合、本方法の工程はヒト又は動物の体で実施されない。

40

【0129】

サンプルは、細胞足場材料および目的の細胞の表面に存在する有機ターゲットとの間の選択的相互作用を可能にする適切な条件下で、本発明に係る細胞足場材料に対して適用される。細胞は、細胞表面の有機ターゲットと前記細胞足場材料との間の結合により、前記細胞足場材料に対して固定化される。結合しないサンプルは、細胞足場材料と有機ターゲット間の選択的結合を維持するのに適した条件下で除去される。本方法は細胞足場材料、特に本発明によるタンパク質の構造に固定化されるた有機ターゲットを提示する細胞を生じる。

【0130】

50

前述に定められたように、細胞足場材料は、直接的または間接的に細胞を捕捉するために利用することができる。直接捕捉において、B部分は、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。あるいは、B部分は、中間体有機ターゲットと選択的相互作用が可能で、中間体有機ターゲットに結合し、その中間体有機ターゲットは、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。従って、間接的な捕捉において、細胞足場材料は、中間体有機ターゲットを更に含んでおり、B部分は、選択的相互作用が可能であり、該中間体有機ターゲットに結合される。中間体有機ターゲットは、同様に、細胞表面上に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である。

【0131】

捕捉方法に関わらず、捕捉された細胞は、細胞足場材料から細胞捕獲に関与する部分を解放するために、融合タンパク質の切断により融合タンパク質から放出されてもよい。上述のように、融合タンパク質は、そのアミノ酸配列中に、関連部分、典型的にはB部分又は細胞結合モチーフの切断及び除去を可能にする、開裂部位を含み得る。様々な開裂部位が、例えば、化学試薬、例えばC N B rによるM e t残基の後ろの開裂部位、及びヒドロキシルアミンによるA s n - G l y残基間の開裂部位、トロンピン又はプロテアーゼ3 Cなどのプロテアーゼの開裂部位、及びインティン自己スプライシング配列などの自己スプライシング配列が、当業者に知られている。

【0132】

また、本発明は、細胞の培養の方法を提供する。目的の細胞は、上記に開示された方法を用いて細胞骨格材料に固定されている。細胞足場材料及び固定化細胞の組合せは、細胞培養に適した条件下で維持される。

【0133】

本発明の関連において、細胞の「培養」、「細胞培養」等の用語は、例えば、それらが、細胞が分裂及び/又は増殖した状況、細胞が、その自然環境に存在する場合、細胞型によって提示される少なくとも一つの機能特性を保持した分化状態に維持される状況、及び幹細胞が未分化状態で維持される状況を包含するように、広義に解釈されるべきである。

【0134】

本発明は、以下の非限定的実施例により、以下に更に説明されるであろう。

【実施例】

【0135】

実施例1 - I g G結合融合タンパク質のクローニング、発現および繊維形成

融合タンパク質の概念を証明するために、R e p 4 C Tタンパク質(4回の内部反復とC T部分を持つR E P部分)がZタンパク質ドメイン(B部分)との融合物で生成された。Zドメインは、ブドウ球菌タンパク質の免疫グロブリンG(I g G)結合ドメインBの改変版であり、I g Gの結晶化(F c)領域断片に結合する58アミノ酸長の三重らせんモチーフである。我々の目標は、R e p 4 C T(H i s 6 Z Q G R e p 4 C Tを示す;配列番号14)に融合したZドメインからなる融合タンパク質から、例えば、繊維、薄膜および膜などの構造体を作成し、かつドメインZのI g G結合能力、並びにR e p 4 C Tの特性を形成する構造をなお保持することが可能であるかどうかを探索することであった。そのために、R e p 4 C TのN末端Zドメインからなる融合タンパク質をクローニングした。

【0136】

クローニング

H i s 6 Z Q G R e p 4 C T融合タンパク質(配列番号:14-15)をコードする遺伝子を以下のように構築した。プライマーは、そのようなZ配列を含むベクターからドメインZのP C R断片を生成するために設計された。また、プライマーはZとR e p 4 C T間のプロテアーゼ3 C切断(L E A L F Q G P、Q Gを示す)の認識部位を含んでいた。得られたP C R生成物は、その後、標的ベクター(カナマイシン耐性遺伝子を有するp T 7 H i s 6 T r x H i s 6 Q G R e p 4 C Tを示す)のように、制限エンドヌクレアーゼ

10

20

30

40

50

Nde I及びEcoRIで処理した。ターゲットベクターの制限切断に際し、TrxHis₆QG部分が切断された。切断されたPCR断片と目標ベクターを、T4 DNAリガーゼを用いて互いに連結し、そして、得られた正しく連結されたベクター(pT7His₆ZQGR_{ep4}CT)は、カナマイシン(70 µg/ml)を補充した寒天プレート上に増殖させた化学形質転換受容性大腸菌(E. coli)BL21(DE3)細胞に形質転換された。コロニーをその後採取し、正しい挿入のためにPCR検査をし、その後、標的ベクター中にZQGが挿入されたDNA配列を確認するために配列決定した。

【0137】

産生

pT7His₆ZQGR_{ep4}CTベクターを有する大腸菌BL21(DE3)細胞を、カナマイシン(70 µg/ml)を補充したルリア-ベルターニ培地(全6リットル)で、30°Cで1-1.5のOD₆₀₀値まで増殖させ、次に、300 µMのIPTG(イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド)でHis₆ZQGR_{ep4}CT発現を誘導し、約2時間、20°Cでさらにインキュベートした。次に、細胞を4700 rpmで20分間の遠心分離により回収し、得られた細胞ペレットを、20 mMトリス(pH 8.0)中に溶解した。

【0138】

精製

20 mMトリス(pH 8.0)中に溶解させた細胞ペレットは、細菌細胞を溶解するために、リゾチームおよびDNアーゼIが補充され、細胞溶解物を30分間15000回転の遠心後に回収した。次に、回収した細胞溶解物を分割し、合計4つのキレートセファロースファーストフロー-Zn²⁺カラムにロードし、His₆ZQGR_{ep4}CT蛋白質がHis₆をタグを介してカラムマトリックスに結合するように保った。洗浄後、結合したタンパク質を20 mM Tris/300 mMイミダゾール(pH 8.0)で溶出した。プールされた溶出画分は、A₂₈₀の測定によると27 mgのHis₆ZQGR_{ep4}CTタンパク質が含まれていた。次に、プールされた溶出液を2等分し(各13.5 mgのHis₆ZQGR_{ep4}CT)、最初の半分は、一晚20 mMトリス(pH 8.0)の5リットルに対して透析し、1.07 mg/mlに濃縮され、最終的に繊維を形成させた。図3は、巨視的His₆ZQGR_{ep4}CT繊維を示す。この融合タンパク質(配列番号14)からの繊維の形成は、Zドメイン(B部分)がRep₄CT(REPとCT部分)の繊維成形特性と干渉しないことを示している。プロテアーゼ3Cによる切断の前にHis₆ZQGR_{ep4}CTタンパク質の量は、透析および濃縮後に10 mgであった(図4)。

【0139】

溶出プールの2番目の半分は1.34 mgのプロテアーゼ3Cで切断し、1 mMのジチオスレイトール(DTT)を補充し、Rep₄CTからHis₆Zを分離した。切断は、20 mMトリス(pH 8.0)に対する透析で一晩実施し、この後、タンパク質溶液を、ニッケル-NTAアガロースカラムを通過させ、Rep₄CTを含有する画分を通過する流量は回収され、0.79 mg/mlに濃縮され、繊維を形成させた。切断後のRep₄CTの最終量は6 mgであった(図4)。

【0140】

図4は融合タンパク質His₆ZQGR_{ep4}CT(配列番号14)と続くプロテアーゼ3C切断生成物のRep₄CT(配列番号14の残基81から339)の精製からのSDS-PAGEゲルを示す。ゲルは以下の順番でロードされた。

(1) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas

(2) 細胞溶解物

(3) キレートセファロースファーストフロー-Zn²⁺カラムにロードした細胞溶解物からのフロー

(4) キレートセファロースファーストフロー-Zn²⁺カラムからのHis₆ZQGR_{ep4}CT

10

20

30

40

50

p₄CTの溶出プール

(5) プロテアーゼ3Cで切断されたHis₆ZQGR_{ep4}CT

(6) Ni-NTAアガロースカラムにロードされた切断されたHis₆ZQGR_{ep4}CTのフロースルー

(7) 20mMのTris/500mMイミダゾール(pH8.0)を5mlによるNi-NTAアガロースカラムの再生。

His₆ZQGR_{ep3}CT、His₆Z、Rep₄CT及びプロテアーゼ3Cの分子量はそれぞれ32kDa、9kDa、23kDa、30kDaである。

【0141】

Rep₄CTが別のタンパク質、即ちIgGに対する結合親和性を有する58アミノ酸長のZドメインに融合されているが、His₆ZQGR_{ep4}CT(配列番号14)の巨視的な繊維を得ることができたという事実は、Zドメイン(配列番号14の残基13-70)に融合しているにもかかわらず、Rep₄CTがなおその繊維形成特性を保持していることを示している。さらに融合タンパク質のZドメインはHis₆ZQGR_{ep4}CTに対する良好な溶解性を与えるように思われる。

10

【0142】

実施例2 - 融合蛋白質繊維へのビオチン化IgGの結合

融合タンパク質の概念を更に証明するために、融合タンパク質構造におけるB部分が有機ターゲットと選択的に相互作用の能力を保持しているかどうかを研究した。この研究では、融合タンパク質His₆ZQGR_{ep4}CT(配列番号14)の繊維のZドメイン(B部分)のIgGに対する結合能力を評価した。ビオチン化ウサギIgGの溶液を、His₆ZQGR_{ep4}CT繊維とともにインキュベートし、この後、同じ繊維をストレプトアビジン官能化ビーズとともに溶液中でインキュベートし、続いてその繊維を光学顕微鏡で可視化した。ウサギで作成されたIgGを用いる選択は、ウサギ由来のIgGがZドメインに非常に強い親和性で結合するという事実に頼っている。

20

【0143】

実施例1に記載したように調製した約50mm長のHis₆ZQGR_{ep4}CT繊維を、1xPBS/0.5%ウシ血清アルブミンを50μl、及びウサギ(抗ラットIgG(H+L)、マウス吸着、Vector Laboratories, Inc)で産生された0.5mg/mlのビオチン化IgGを10μl含有する結合溶液中に浸漬し、軽く振とうしながら室温で75分間インキュベートした。上清を捨てて、繊維を60μlの1xPBS/0.07%Tween20で3回洗浄した。次に、繊維を1xPBS/0.5%ウシ血清アルブミンを40μlと10mg/mlのダイナビーズM-280ストレプトアビジン(Dynal AS)を20μl含む溶液に浸漬し、再び軽く振とうしながら室温で75分間インキュベートした。上清を捨てて、繊維を60μlの1xPBS/0.07%Tween20で3回洗浄した。

30

【0144】

繊維に対するダイナビーズ(Dynabeads)の非特異的結合の指標を得るべく、他のHis₆ZQGR_{ep4}CT繊維を、ビオチン化IgGとの事前のインキュベーションなしで、上述したようにダイナビーズ溶液にのみ浸漬した。His₆ZQGR_{ep4}CTについて上述したのと同じ手順をRep₄CTタイプの繊維と行い、すべての繊維を固定した500倍の倍率によりUSB顕微鏡で可視化した。

40

【0145】

図5は、ビオチン化ウサギIgG、その後のストレプトアビジン官能ダイナビーズの結合後のHis₆ZQGR_{ep4}CT及びRep₄CT繊維の可視化である。パネル(A、B)は、最初にビオチン化IgG抗体(ウサギで生産)とインキュベートし、続いてダイナビーズM-280ストレプトアビジン(2.8μm)とインキュベーションしたHis₆ZQGR_{ep4}CT繊維の、繊維に沿った異なる位置で撮影された2つの代表的な写真を示す。パネル(C、D)は、事前にIgGとインキュベーションすることなく、ダイナビーズM-280ストレプトアビジン溶液に浸漬されただけの別のHis₆ZQGR_{ep}

50

p₄CT繊維の2つの代表的な写真を示す。Rep₄CT繊維の対応する写真は、パネル(E、F)及び(G、H)にそれぞれ示されている。すべての写真は、USB顕微鏡で固定した500倍の倍率で撮影し、ダイナビーズは暗い灰色の点として写真に現れている。

【0146】

図5において、これらの写真の両方ともビオチン化IgGにさらされ、続いてストレプトアビジン官能ダイナビーズにさらされたHis₆ZQGR_{ep4}CT繊維を示しており、ダイナビーズは、パネルのAとBにおいてほとんど唯一見られているように思われる。この結果は、融合タンパク質中のZドメインのかなりの割合は、繊維形成後His₆ZQGR_{ep4}CTでのIgG結合能を保持していることを意味する。

【0147】

実施例3 - 融合タンパク質繊維と薄膜に対する純粋な血清IgGの結合

有機ターゲットとの選択的相互作用の融合タンパク質構造におけるB部分の能力を更に探索するために、融合タンパク質His₆ZQGR_{ep4}CT(配列番号14)のZドメインのIgGに結合する能力を試験した。この融合タンパク質の繊維と薄膜を精製したIgG及び血清からのIgGの結合について用い、その後溶出し続いてSDS-PAGEで分析し、ここでIgGは非還元条件下で~146kDaとして現れている。血清は、血液凝固後の残液相であり、血清の2つの主な成分は、アルブミンおよびIgGである。ウサギ血清においては、例えば、IgGの濃度は5-10mg/mlであり、アルブミンのそれはもっと高い。精製IgG及び血清は両方ともウサギ起源のものであった。

【0148】

His₆ZQGR_{ep4}Cの薄膜は、24ウェル組織培養プレートの各ウェルの底部で、タンパク質溶液100µl(0.96mg/ml)を室温で一晩空気乾燥することにより調製した。鑄造された薄膜は、その後18日間+4で保存し、20mMのトリス(pH8.0)に浸漬させて「T薄膜」と称したか、又は液体に浸漬させずに「A薄膜」と称した。図6は、親水性の24ウェル組織培養プレートのウェルの底で鑄造されたHis₆ZQGR_{ep4}CT薄膜の一部を示す。画像をとるために、倒立光学顕微鏡を2倍の倍率で用いた。実施例1に記載したように融合タンパク質の繊維を製造し、使用するまで4で20mMトリス(pH8.0)中に保存した。

【0149】

二つの平行する実験のセットアップを行った。最初のセットアップでは、His₆ZQGR_{ep4}CTで作られたT薄膜、A薄膜、及び繊維の三つぞろいは、50µg/mlの精製ウサギIgG(プールされたウサギ血清から精製、Vector Laboratories, Inc.)の500µlの中に軽く振とうしながら室温で1時間、浸漬した。別のセットアップでは、His₆ZQGR_{ep4}CTの薄膜と繊維の同じタイプの三つぞろいは、かわりに加熱で不活性化し遠心したウサギ血清(National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden)の5回希釈の500µlに、同様に穏やかに振とうしながら室温で1時間浸漬した。上清は全ての繊維および薄膜から廃棄され、500µlの20mMのトリス(pH8.0)中で3回洗浄した。精製したIgG又は血清に由来する結合したIgGを、0.5Mの酢酸/1Mの尿素/100mMのNaCl(pH2.7)の500µl中で30分間のインキュベーションにより溶出した。His₆ZQGR_{ep4}CT繊維とA薄膜について上述したのと同じ手順を、コントロールとしてHis₆TrxHis₆QGR_{ep4}CT及びRep₄CTの薄膜と繊維についても実施した。溶出した画分を、非還元条件下でのSDS-PAGEで分析した(図7-9)。

【0150】

図7は、非還元SDS-PAGEゲルを示す。溶出画分は、次のようにレーンにロードされた:

(1-3)ウサギIgGとインキュベートしたHis₆TrxHis₆QGR_{ep4}CT, A薄膜。

(4-6)ウサギ血清とインキュベートしたHis₆TrxHis₆QGR_{ep4}CT,

10

20

30

40

50

A 薄膜。

(7 - 8) ウサギ IgG とインキュベートした His₆ Trx His₆ QG Rep₄ CT, 繊維。

(9) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas

(10 - 11) ウサギ血清とインキュベートした His₆ Trx His₆ QG Rep₄ CT, 繊維。

(12 - 14) ウサギ IgG とインキュベートした His₆ ZQ G Rep₄ CT, T 薄膜。

(15 - 17) ウサギ血清とインキュベートした His₆ ZQ G Rep₄ CT, T 薄膜。

【0151】

図8は、別の非還元 SDS - PAGE ゲルを示す。溶出画分は以下に従ってロードされた：

(1 - 3) ウサギ IgG とインキュベートした His₆ ZQ G Rep₄ CT, A 薄膜。

(4 - 6) ウサギ血清とインキュベートした His₆ ZQ G Rep₄ CT, A 薄膜。

(7 - 9) ウサギ IgG とインキュベートした His₆ ZQ G Rep₄ CT, 繊維。

(10) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas

(11 - 13) ウサギ血清とインキュベートした His₆ ZQ G Rep₄ CT, 繊維。

(14 - 16) ウサギ IgG とインキュベートした Rep₄ CT, A 薄膜。

【0152】

図9は、追加の非還元 SDS - PAGE ゲルを示す。溶出画分は以下に従ってロードされた：

(1 - 3) ウサギ血清とインキュベートした Rep₄ CT, A 薄膜。

(4 - 6) ウサギ IgG とインキュベートした Rep₄ CT, 繊維。

(7) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas

(8 - 10) ウサギ血清とインキュベートした Rep₄ CT, 繊維。

(11) インキュベーションに用いられた精製されたウサギ IgG (50 μg/ml)。

(12) インキュベーションに用いられたウサギ血清 (1:50 希釈)。

【0153】

図7 - 9の結果は、全ての種類の His₆ ZQ G Rep₄ CT マトリックス、即ち薄膜 (A型とT型の両方) と繊維は、Zドメインを介して (精製されたか又は血清由来の) IgG に結合する能力を持っていることを示している。さらに、ウサギ血清に曝された His₆ ZQ G Rep₄ CT マトリックスは、IgG 以外では血清画分の他の何にも結合していないように見える。用いた他の2つのタンパク質変異体のマトリックス (即ち His₆ Trx His₆ QG Rep₄ CT 及び Rep₄ CT) は、血清に曝された Rep₄ CT の繊維を除いて、何かに結合するようには全くみえず、IgG (~146 kDa) 及びアルブミン (~70 kDa) の領域内に弱いバンドを示している。融合タンパク質 His₆ ZQ G Rep₄ CT (配列番号14) 内のZドメインのIgG結合能力を評価するこのアプローチは、Zドメインが融合タンパク質の繊維および薄膜の両方のバージョンで活性であることを強く示している。IgG 以外のウサギ血清の他の画分では His₆ ZQ G Rep₄ CT に対する結合は観察されていない。

【0154】

実施例4 - 融合タンパク質繊維と薄膜に対する純粋な血清 IgG の結合の再現性

融合タンパク質 His₆ ZQ G Rep₄ CT (配列番号14) の薄膜及び繊維に対する IgG 結合の再現性を探求するため、実施例3における実験を再度実施した。実施例3で用いられた His₆ ZQ G Rep₄ CT, His₆ Trx His₆ QG Rep₄ CT 及び Rep₄ CT と同じ繊維と薄膜を再び使用した。全ての繊維と薄膜の材料は、前回の実験が実施された後で、20 mM の Tris (pH 8.0) に4 で70日間浸漬させた。実

10

20

30

40

50

験は実施例 3 に記載のように行った。溶出した画分を、非還元条件下での SDS - PAGE で分析した (図 10 - 12)。

【 0 1 5 5 】

図 10 は、非還元 SDS - PAGE ゲルを示す。溶出画分は以下に従ってロードされた：

(1 - 3) ウサギ Ig G とインキュベートした His₆ Tr x His₆ Q G R e p₄ C T , A 薄膜。

(4 - 6) ウサギ血清とインキュベートした His₆ Tr x His₆ Q G R e p₄ C T , A 薄膜。

(7 - 8) ウサギ Ig G とインキュベートした His₆ Tr x His₆ Q G R e p₄ C T , 繊維。 10

(9) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder , Fermentas

(10 - 11) ウサギ血清とインキュベートした His₆ Tr x His₆ Q G R e p₄ C T , 繊維。

(12 - 14) ウサギ Ig G とインキュベートした His₆ Z Q G R e p₄ C T , T 薄膜。

(15 - 17) ウサギ血清とインキュベートした His₆ Z Q G R e p₄ C T , T 薄膜。

【 0 1 5 6 】

図 11 は、別の非還元 SDS - PAGE ゲルを示す。溶出画分は以下に従ってロードされた： 20

(1 - 3) ウサギ Ig G とインキュベートした His₆ Z Q G R e p₄ C T , A 薄膜。

(4 - 6) ウサギ血清とインキュベートした His₆ Z Q G R e p₄ C T , A 薄膜。

(7 - 9) ウサギ Ig G とインキュベートした His₆ Z Q G R e p₄ C T , 繊維。

(10) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder , Fermentas

(11 - 13) ウサギ血清とインキュベートした His₆ Z Q G R e p₄ C T , 繊維。

(14 - 16) ウサギ Ig G とインキュベートした R e p₄ C T , A 薄膜。

【 0 1 5 7 】

図 12 は、非還元 SDS - PAGE ゲルを示す。溶出画分は以下に従ってロードされた 30

(1 - 3) ウサギ血清とインキュベートした R e p₄ C T , タイプ A の薄膜。

(4 - 6) ウサギ Ig G とインキュベートした R e p₄ C T , 繊維。

(7) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder , Fermentas

(8 - 10) ウサギ血清とインキュベートした R e p₄ C T , 繊維。

(11) 空のウエル。

(12) インキュベーションに用いられた精製されたウサギ Ig G (50 μ g / m l) 。

(13) インキュベーションに用いられたウサギ血清 (1 : 50 希釈) 。

【 0 1 5 8 】 40

全 3 つのタンパク質マトリックスの Ig G 結合パターン (即ち、 His₆ Z Q G R e p₄ C T , His₆ Tr x His₆ Q G R e p₄ C T 及び R e p₄ C T) は実施例 3 で観察されたものに対応するが、アルブミン (~ 70 k D a) に対応するやや弱いバンドがウサギ血清でインキュベートした His₆ Z Q G R e p₄ C T 繊維について見られた。この最初の Ig G 結合再現性試験は、 His₆ Z Q G R e p₄ C T の繊維および薄膜の両方とも、精製及び血清 Ig G の結合と溶出について少なくとも 2 回用いることができることを示している。再現性の更なる試験は実施例 19 で報告される。

【 0 1 5 9 】

実施例 5 - 融合タンパク質マトリックス及び市販のプロテイン A マトリックスに対する Ig G 結合 50

His₆ZQGR_{ep4}CT融合タンパク質構造のIgG結合能は、市販で入手可能なプロテインAマトリックスと比較して評価した(Protein A Sepharose CL-4B, GE Healthcare)。His₆ZQGR_{ep4}CT(配列番号14)の繊維および膜をスピンカラム内部に調製した。プロテインAマトリックスはまた、マトリックスに結合したプロテインA分子の総数がHis₆ZQGR_{ep4}CT薄膜内のZ分子の総数に等しくなるようにスピンカラムに添加された。His₆ZQGR_{ep4}CTの薄膜と繊維、並びにプロテインAマトリックスに対する精製IgGと血清由来IgGの結合を生じさせ、その後溶出し、続いてSDS-PAGEで分析した。

【0160】

His₆ZQGR_{ep4}CTの薄膜はスピンカラム内部のポリエチレンフリットの下部で、100 μ lのタンパク質溶液(1.05mg/ml)を室温で3日間空気乾燥することにより調製し、薄膜あたり総計 3×10^{-9} モルのHis₆ZQGR_{ep4}CTを与えた。また、His₆ZQGR_{ep4}CTの繊維を、同じタイプのスピンカラムの内側のフリット上に配置した。同じ手順を、Rep₄CTの薄膜と繊維に対して実施し、ここでは薄膜は膜あたり総計 4×10^{-9} モルのRep₄CTを含有していた。市販のプロテインAマトリックスに対しては、 3×10^{-9} モルのプロテインAに対応する排液マトリックス体積がスピンカラムごとにフリットに移され、そのマトリックスは $1 \times 500 \mu$ lプラス $2 \times 150 \mu$ lの脱イオン水を用いて、1.5分間の400rcfでのスピンカラムの遠心分離により洗浄した。

【0161】

二つの平行実験のセットアップが、His₆ZQGR_{ep4}CT及びRep₄CTの繊維と薄膜について、並びにプロテインAマトリックスで実施された。第一のセットアップにおいて、すべての3つの異なるマトリックスの重複を50 μ g/mlの精製IgG(ウサギ血清から精製IgG, Sigma)の500 μ lに室温で1時間浸漬させた。他のセットアップにおいて、すべての3つの異なるマトリックスの重複はそのかわりに遠心分離したウサギ血清(正常ウサギ血清, Invitrogen)の5倍希釈の500 μ l中にやはり室温で1時間浸漬させた。

【0162】

上清は単純なペッチングにより全ての繊維と薄膜から捨てられ、プロテインAマトリックスに対しては遠心分離(400rcf、1.5分)により捨てられ、その後500 μ lの20mMのトリス(pH8.0)で3回洗浄した。精製したIgG又は血清に由来する結合したIgGを、0.5Mの酢酸/1Mの尿素/100mMのNaCl(pH2.7)の500 μ l中で30分間のインキュベーションにより溶出した。溶出画分を非還元条件下でSDS-PAGEで分析し(図13-15)、実行1からきたものとして示す。溶出後直ちに、全マトリックスを $3 \times 500 \mu$ lの20mMトリス(pH8.0)で洗浄し、その後、IgG結合の再現性を評価するために説明した実験をもう一回繰り返した。反復実験からの溶出画分を実行2からきたものとして示す。記：非還元SDS-PAGE条件下で、IgGの分子量は146kDa程度である。

【0163】

図13は、実行1からの溶出画分の非還元SDS-PAGEを示し、以下に従ってロードされた：

- (1) インキュベーションに用いられた精製されたウサギIgG(50 μ g/ml)。
- (2) インキュベーションに用いられたウサギ血清(1:50希釈)。
- (3-4) ウサギIgGとインキュベートしたHis₆ZQGR_{ep4}CT, 薄膜。
- (5-6) ウサギ血清とインキュベートしたHis₆ZQGR_{ep4}CT, 薄膜。
- (7-8) ウサギIgGとインキュベートしたRep₄CT, 薄膜。
- (9) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas
- (10-11) ウサギ血清とインキュベートしたRep₄CT, 薄膜。
- (12-13) ウサギIgGとインキュベートしたプロテインAセファローズCL-4B

10

20

30

40

50

マトリックス。

(14 - 15) ウサギ血清とインキュベートしたプロテインAセファロースCL - 4 Bマトリックス。

(16 - 17) ウサギIgGとインキュベートしたHis₆ZQGR_{ep4}CT, 繊維。
【0164】

図14は、実行1及び実行2の両方からの溶出画分の非還元SDS - PAGEを示し、以下に従ってロードされた：

(1 - 2) ウサギ血清とインキュベートしたHis₆ZQGR_{ep4}CT, 繊維、実行1。

(3 - 4) ウサギIgGとインキュベートしたR_{ep4}CT, 繊維の重複、実行1。 10

(5 - 6) ウサギ血清とインキュベートしたR_{ep4}CT, 繊維の重複、実行1。

(7) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas

(8) インキュベーションに用いられた精製されたウサギIgG (50 μg/ml)。

(9) インキュベーションに用いられたウサギ血清 (1 : 50 希釈)。

(10 - 11) ウサギIgGとインキュベートしたHis₆ZQGR_{ep4}CT, 薄膜、実行2。

(12 - 13) ウサギ血清とインキュベートしたHis₆ZQGR_{ep4}CT, 薄膜、実行2。

(14 - 15) ウサギIgGとインキュベートしたR_{ep4}CT, 薄膜、実行2。 20

(16 - 17) ウサギ血清とインキュベートしたR_{ep4}CT, 薄膜、実行2。

【0165】

図15は、溶出画分の非還元SDS - PAGEを示し、全ては実行2からきたもので、以下に従ってロードされた：

(1 - 2) ウサギIgGとインキュベートしたプロテインAセファロースCL - 4 Bマトリックス。

(3 - 4) ウサギ血清とインキュベートしたプロテインAセファロースCL - 4 Bマトリックス。

(5 - 6) ウサギIgGとインキュベートしたHis₆ZQGR_{ep4}CT, 繊維。

(7) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas 30

(8 - 9) ウサギ血清とインキュベートしたHis₆ZQGR_{ep4}CT, 繊維。

(10 - 11) ウサギIgGとインキュベートしたR_{ep4}CT, 繊維。

(12 - 13) ウサギ血清とインキュベートしたR_{ep4}CT, 繊維。

【0166】

図13 - 15の結果は、マトリックスは選択的に血清からのIgGを結合することを示している。全タイプのHis₆ZQGR_{ep4}CTマトリックス、例えば薄膜と繊維のIgG結合能は市販のプロテインAマトリックスと同じ範囲にある。市販のプロテインAマトリックスと老幼に、融合タンパク質の構造は結合能を維持することで再生可能である。

【0167】

実施例6 - 融合タンパク質マトリックス及び市販のプロテインAマトリックスの定置洗浄 (Cleaning In Place) (CIP)

沈殿または変性した物質が、溶出後に、His₆ZQGR_{ep4}CT (配列番号14) 及びR_{ep4}CTからなるタンパク質の構造と市販のプロテインAマトリックス (プロテインAセファロースCL - 4 B, GE Healthcare) に付着したままであるかどうかを評価するために、8Mの尿素による定置洗浄 (CIP) が、実施例4 - 5の実験で使用されたウサギ血清に曝された全てのマトリックスに対して実施された。

【0168】

実施例4と実施例5からのHis₆ZQGR_{ep4}CTとR_{ep4}CTからなる繊維と薄膜、及び実施例5からの市販のプロテインAマトリックスは、全て以前にウサギ血清に 40

10

20

30

40

50

対して曝されており、上清の除去の前に 8 M の尿素の 200 μ l に室温で 20 分間浸し、続いて非還元条件下で SDS - PAGE の尿素画分が分析された (図 16 - 17) 。

【 0 1 6 9 】

図 16 は、ウサギ血清に 2 回曝されたマトリックスの 8 M の尿素による定置洗浄からの非還元 SDS - PAGE を示す。ゲルは以下に従ってロードされた：

- (1) ウサギ血清 (1 : 50 希釈) 。
- (2) 空のウエル。
- (3 - 5) 実施例 4 からの His₆ Z Q G R e p₄ C T , T 薄膜。
- (6 - 8) 実施例 4 からの His₆ Z Q G R e p₄ C T , A 薄膜。
- (9) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder , Fermentas 10
- (10 - 12) 実施例 4 からの His₆ Z Q G R e p₄ C T , 薄膜。
- (13 - 15) 実施例 4 からの R e p₄ C T , A 薄膜。
- (16 - 15) 実施例 4 からの R e p₄ C T , 繊維。
- (17) 空のウエル。

【 0 1 7 0 】

図 17 は、ウサギ血清に 2 回曝されたマトリックスの 8 M の尿素による定置洗浄からの 2 回目の非還元 SDS - PAGE を示す。ゲルは以下に従ってロードされた：

- (1) ウサギ血清 (1 : 50 希釈) 。
- (2) 空のウエル。 20
- (3 - 4) 実施例 4 からの R e p₄ C T , 繊維。
- (5 - 6) 実施例 5 からの His₆ Z Q G R e p₄ C T , 薄膜。
- (7) 実施例 5 からの R e p₄ C T , 薄膜。
- (8) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder , Fermentas
- (9) 実施例 5 からの R e p₄ C T , 薄膜。
- (10 - 11) 実施例 5 からの His₆ Z Q G R e p₄ C T , 繊維。
- (12 - 13) 実施例 5 からの R e p₄ C T , 繊維。
- (14 - 15) 実施例 5 からのプロテイン A セファロース CL - 4 B マトリックス。
- (16 - 17) 空のウエル。 30

【 0 1 7 1 】

図 16 - 17 の結果は、ほんの少量の沈殿又は変性物質が、溶出又は洗浄後の融合タンパク質の構造に付着したままであることを示している。特に、ほんの少量の沈殿又は変性物質が、市販のプロテイン A マトリックスと同じ範囲で、His₆ Z Q G R e p₄ C T 融合タンパク質の薄膜に付着したままである。

【 0 1 7 2 】

実施例 7 - アルブミン結合融合タンパク質のクローニング、発現および繊維形成

融合タンパク質の概念を更に証明するために、R e p₄ C T が連鎖球菌プロテイン G 由来のアルブミン結合ドメイン (A b d) との融合で生成された。A b d はアルブミンと結合する 5 k D a の三重らせんモチーフである。そのために、R e p₄ C T の N 末端の A b d ドメイン (His₆ A b d Q G R e p₄ C T と称す) からなる融合タンパク質をクローニングした (配列番号 16 - 17) 。

【 0 1 7 3 】

クローニング

プライマーは、そのような配列を含むベクターから A b d の P C R 断片を生成するために設計された。また、プライマーは A b d と R e p₄ C T 間に G Q と表されるプロテアーゼ 3 C 切断部位を含んでいた。得られた P C R 生成物は、標的ベクターと同様に、その後制限エンドヌクレアーゼ N d e I 及び E c o R I で処理され、(カナマイシン耐性遺伝子を有する) p T 7 His₆ T r x His₆ Q G R e p₄ C T を示した。ターゲットベクターの制限切断に際し、T r x His₆ Q G 部分が切断された。切断された P C R 断片 50

と目標ベクターを、T4 DNAリガーゼを用いて互いに連結し、そして、得られた正しく連結されたベクター (pT7His₆AbdQGR_{ep}₄CT) は、カナマイシンを補充した寒天プレート上に増殖させた化学形質転換受容性 E. coli BL21 (DE3) 細胞に形質転換された。コロニーをその後採取し、正しい挿入のために PCR 検査をし、その後また配列決定した。

【0174】

産生

pT7His₆AbdQGR_{ep}₄CTベクターを有する E. coli BL21 (DE3) 細胞を、カナマイシンを補充したルリア-ベルターニ培地 (全6リットル) で、30°C で 1 - 1.5 の OD₆₀₀ 値まで増殖させ、次に、IPTG で His₆AbdQGR_{ep}₄CT 発現を誘導し、約2時間、20°C でさらにインキュベートした。次に、細胞を遠心分離により回収し、得られた細胞ペレットを、20 mM トリス (pH 8.0) 中に溶解した。

10

【0175】

精製

20 mM トリス (pH 8.0) 中に溶解した細胞ペレットに、細菌細胞を完全に溶解するためにリゾチームと DNase I を補充し、15000 rpm での遠心分離後に上清を回収した。次に、回収した上清をニッケル IMAC カラムまたはキレートセファロースファストフロー ZN カラムにロードし、His₆ タグを介して His₆AbdQGR_{ep}₄CT タンパク質がマトリックスに結合するように保った。洗浄後、結合したタンパク質を 20 mM Tris / 300 mM イミダゾール (pH 8.0) で溶出した。His₆AbdQGR_{ep}₄CT (配列番号 16) を含有するプールされた溶出画分を 20 mM トリス (pH 8.0) の 5 リットルに対して透析し、濃縮し、4 mg の最終量のタンパク質が得られた。

20

【0176】

繊維と薄膜の形成

精製された、可溶性 Abd-Rep₄CT タンパク質から、繊維と薄膜の両方とも 0.87 mg/ml のタンパク質濃度で首尾良く作成された。

【0177】

Rep₄CT は別のタンパク質、つまりアルブミン結合ドメイン (Abd) に融合していたものの Abd-Rep₄CT の巨視的な繊維と薄膜が得られたという事実は、Abd ドメインに融合しているにも関わらず、Rep₄CT はその繊維形成特性を保持することを実証している。次に、本目的は、Abd ドメインは Rep₄CT に融合したときにそのアルブミン結合能を保持していたかどうかを明らかにすることであった。実施例 24 と 25 を参照。

30

【0178】

実施例 8 - IgG 結合融合タンパク質のクローニング、発現および繊維形成

融合タンパク質の概念を更に証明するために、Rep₄CT は連鎖球菌プロテイン G からの IgG 結合ドメイン C2 との融合で生産された。C2 は、55 個のアミノ酸を含み、その構造は、シート的一方の面を横切って横たわっている α -ヘリックスを有する 4 本鎖の混合逆平行 / 平行 β -シートを形成するために結合している 2 つの α -ヘアピンで構成されている。そのために、Rep₄CT の N 末端の C2 ドメイン (His₆C2QGR_{ep}₄CT と称す) からなる融合タンパク質をクローニングした (配列番号 18 - 19)。

40

【0179】

クローニング

プライマーは、そのような配列を含むベクターから C2 の PCR 断片を生成するために設計された。また、プライマーは C2 と Rep₄CT 間に GQ と表されるプロテアーゼ 3 C 切断部位を含んでいた。得られた PCR 生成物は、標的ベクターと同様に、その後制限エンドヌクレアーゼ Nde I 及び EcoRI で処理され、(カナマイシン耐性遺伝子を有する) pT7His₆TrxHis₆QGR_{ep}₄CT を示した。ターゲットベクタ

50

一の制限切断に際し、 $TrxHis_6QG$ 部分が切断された。切断されたPCR断片と目標ベクターを、 $T4DNA$ リガーゼを用いて互いに連結し、そして、得られた正しく連結されたベクター ($pT7His_6C2QGRRep_4CT$) は、カナマイシンを補充した寒天プレート上に増殖させた化学形質転換受容性 $E. coli BL21(DE3)$ 細胞に形質転換された。コロニーをその後採取し、正しい挿入のためにPCR検査をし、その後また配列決定した。

【0180】

産生

$pT7His_6C2QGRRep_4CT$ ベクターを有する $E. coli BL21(DE3)$ 細胞を、カナマイシンを補充したルリア-ベルターニ培地 (全6リットル) で、30で1-1.5の OD_{600} 値まで増殖させ、次に、IPTGで $His_6C2QGRRep_4CT$ 発現を誘導し、約2時間、20でさらにインキュベートした。次に、細胞を遠心分離により回収し、得られた細胞ペレットを、20mMトリス (pH8.0) 中に溶解した。

10

【0181】

精製

20mMトリス (pH8.0) 中に溶解した細胞ペレットに、細菌細胞を完全に溶解するためにリゾチームとDNase Iを補充し、15000rpmでの遠心分離後に上清を回収した。次に、回収した上清をニッケルIMACカラムにロードし、 His_6 タグを介して $His_6C2QGRRep_4CT$ タンパク質がマトリックスに結合するように保った。洗浄後、結合したタンパク質を20mM Tris / 300mMイミダゾール (pH8.0) で溶出した。 $His_6C2QGRRep_4CT$ を含有するプールされた溶出画分を20mMトリス (pH8.0) の5リットルに対して透析し、濃縮し、6mgの最終量のタンパク質が得られた。

20

【0182】

繊維と薄膜の形成

精製された、可溶性 $C2-Rep_4CT$ タンパク質から、繊維と薄膜の両方とも0.87mg/mlのタンパク質濃度で首尾良く作成された。 Rep_4CT は別のタンパク質、つまりIgG結合ドメイン $C2$ に融合していたものの $C2-Rep_4CT$ の巨視的な繊維と薄膜が得られたという事実は、 $C2$ ドメインに融合しているにも関わらず、 Rep_4CT はその繊維形成特性を保持することを実証している。次に、本目的は、 $C2$ ドメインは Rep_4CT に融合したときにそのIgG結合能を保持していたかどうかを明らかにすることであった。実施例26と27を参照。

30

【0183】

実施例9 - ビオチン結合融合タンパク質のクローニング、発現および薄膜と繊維の形成

ストレプトアビジンは、モノマーあたり一つの結合部位を有する4つの同一の単量体の四量体である。それはビオチン (ビタミンH) に高い親和性を示し、解離定数 K_d は $\sim 10^{-15}M$ に達し、これを本質的に不可逆的結合事象とならしめている。ストレプトアビジンはまた、プロテアーゼの存在下、高温で、および変性剤、及び極端なpH値で、高い安定性を示す (Wilchek, M. et al., Anal. Biochem. 171: 1-32 (1988))。従って、この相互作用は、タンパク質の標識化、分離およびターゲティングを含む多くの用途において魅力的である。実際には、ビオチン化は、今日では、攻撃するいくつかの反応性有機分子のうちの一つを収容し、異なる生体分子、例えばタンパク質及びDNAに対してビオチンを架橋するビオチン化されたリンカー分子を利用して容易である。しかし、ストレプトアビジンでコーティングされた高密度機能性表面の生産は達成することが困難であることが判明しており、例えば表4を参照。結合における可逆性が不可欠である (精製中などの) 用途での結合力を低減させ、かつ首尾良く大腸菌で可溶性タンパク質を発現できるように、ストレプトアビジンの単量体変異体、M4が開発された (Wu, S.-C. et al., Protein Expr. Purif. 46, 268-273 (2006))。野生型四量体ストレプトアビジンの単量体に比べ

40

50

て、M4は4アミノ酸置換（V55T、T76R、L109T及びV125R）を有し、これは、活性な単量体の形にM4を保っている。

【0184】

M4は、組換え技術により、N末端又はC末端がRep₄CT（配列番号20-21）に融合していた。得られたタンパク質とそれをコードする遺伝子はM4Rep₄CT（配列番号22-23）、modM4Rep₄CT（配列番号24-25）及びRep₄CTM4（配列番号26-27）とそれぞれ命名された。M4Rep₄CTとmodM4Rep₄CTの違いはM4とRep₄CT間のリンカー領域内のGlyのArg-Ala-Argへの置換である。全てのタンパク質は切断されたHis₆-Trx-His₆に融合して発現され、精製中に除去された。

【0185】

全てのタンパク質の生産と精製は、Stark, M. et al., Biomacromolecules 8, 1695-1701 (2007)及びHedhammar M. et al., Biochemistry 47, 3407-3417 (2008)に記載されるように本質的に実施された。Rep₄CTM4、M4Rep₄CT及びmodM4Rep₄CTのタンパク質の濃度は53860 M⁻¹ cm⁻¹のモル吸光係数を使用して280 nmで測定した。精製されたタンパク質サンプルを還元SDS-PAGEに供し、タンパク質の純度は、クーマシーブリリアントブルーR-250によるゲルの染色後に決定した。全ての精製されたタンパク質の理論分子量および他の関連する物理的性質を表3に示す。

【0186】

表3-発現されたタンパク質の物理的パラメーター

タンパク質	配列番号	アミノ酸 (#)	分子量* (g/mol)	モル吸光係数* (M ⁻¹ cm ⁻¹)
Rep ₄ CT	20	263	23053	11920
Rep ₄ CTM4	26	428	40157	53860
M4Rep ₄ CT	22	427	40100	53860
modM4Rep ₄ CT	24	429	40427	53860

* 理論値

【0187】

Rep₄CTM4、M4Rep₄CT及びmodM4Rep₄CT融合タンパク質の各々から、薄膜と繊維の両方が形成された。これらの結果は、Rep₄CTはM4に融合されたものの、固体構造に自己会合する能力を保持していることを確認する。このことはまた、異なる長さのリンカーを用いて、M4がRep₄CTに融合している繊維と薄膜を得ることが可能であることを確認する。

【0188】

実施例10 - 融合タンパク質繊維と薄膜に対するビオチン含有ターゲットの結合

(A) Rep₄CTM4薄膜に対するビオチン化Atto-565の結合。

Rep₄CTM4（配列番号26）及びRep₄CT（配列番号20、コントロール）は、透明または黒色96ウェルマイクロタイタープレート中のウェルの底部において室温で25 μlのタンパク質溶液を乾燥させることにより薄膜を形成させた。プレートは使用前に1~2週間室温で保存した。ウェルは、非特異的結合を回避するために室温で1時間以上、PBS（pH7.4）中の1%のBSAの100 μlとともにインキュベートした。バックグラウンドの値は、ビオチン化Atto-565の添加前に、50 μlのリン酸緩衝食塩水（PBS）中のRep₄CT又はRep₄CTM4の各タンパク質の薄膜を含

10

20

30

40

50

むウェル内の蛍光強度を測定して得られた。PBS (pH 7.4) 中の1% BSAに溶解したビオチン化Atto-565 (Sigma Aldrich, Germany) の80 μ M溶液を50 μ lとともにウェルをさらに培養した。混合物を2~3時間室温で放置した後に、0.05% Tween-20 (PBS-T)を含むPBSで2回及びPBSで1回洗浄した。生じた蛍光強度は、Tecan InfiniteのM200マイクロプレートリーダーにおいてウェルに50 μ lのPBSを追加した後に記録された ($\lambda_{ex} = 565$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm)。

【0189】

希釈系列をPBSで調製し、異なる濃度のビオチン化Atto-565のサンプル50 μ lを各々の膜を含むウェルに三連で添加し、その後ウェルからの蛍光強度を記録した。

図18において、ビオチン化Atto-565に浸漬させて洗浄後にタンパク質の薄膜からの蛍光強度をニコンのEclipseのTi-S蛍光顕微鏡を用いて2倍の拡大で観察する ($\lambda_{ex} = 509 - 550$ nm及び $\lambda_{em} = 570 - 614$ nm)。ビオチン化Atto-565の添加後のRep₄CTM4薄膜 (パネルA) とRep₄CT薄膜 (パネルB) の間の蛍光強度の違いは明白である。

【0190】

Rep₄CTM4薄膜に対するビオチン化Atto-565の総量を確立するために、ビオチン化Atto-565の既知量の希釈系列を用いて蛍光強度を記録した。このようにして、既知量 (モル) のビオチン化Atto-565を含むサンプルからの蛍光強度 (Rep₄CTM4を含むウェルに、三連で) を標準曲線を得るために使用した。バックグラウンド値に対応する得られた蛍光強度の値 (ビオチン化Atto-565を含まないRep₄CTM4薄膜) 及びウェルに添加したビオチン化Atto-565の3つの濃度に相関するデータ点を図19のグラフに示す。図19のグラフ下の表は、同じビオチン化Atto-565濃度を持つn=3のウェル中の測定からの標準偏差とともに、蛍光強度値に対する線形回帰から取得した値を示す。

【0191】

Rep₄CTM4の薄膜に対するビオチン化Atto-565の結合実験から得られた蛍光強度値から出発して (図20)、これらの値が得られた蛍光強度に対応するビオチン化Atto-565のモル量を計算するために使用された。得られた蛍光値を、図20に、Rep₄CT (A) とRep₄CTM4 (B) の薄膜を含むウェルに対するビオチン化Atto-565の添加前 (-) と後 (+) の値を表示するパネルA及びBによりプロットする。パネルCは、Rep₄CT又はRep₄CTM4の薄膜に対するビオチン化Atto-565の添加後に生じた蛍光強度の比較を示す。Rep₄CT薄膜については前の値と後の値の間で有意な違いは無かった (ns) (パネルA)。Rep₄CTM4を含むビオチン化Atto-565の添加前と後の有意な違い (パネルB; P < 0.01) 及びタンパク質間の有意な違い (パネルC; P < 0.0001) は統計試験により確認された。図20中のバーは、n=10の薄膜の蛍光強度値の間の標準偏差を示している。

【0192】

結合実験から得られたビオチン化フルオロフォア/表面積の比率を計算した。およそ28 mm²、2.1 pmolのビオチン化Atto-565の表面積がRep₄CTM4薄膜に結合していた。これは0.073 pmol/mm²の結合ビオチン/表面積をもたらす (表5)。

【0193】

(B) Rep₄CTM4薄膜に対するビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の結合

比較的高い安定性と非発色基質および過酸化物の変換における発色生成物の生産に起因して、HRPは、ELISA、ウェスタンブロット及び免疫組織化学などの用途で、一般に二次抗体または結合分子 (例えば、ビオチン) に結合されて使用される。Rep₄CTM4 (配列番号26) 及びRep₄CT (配列番号20; コントロール) からなる薄膜に対するビオチン化HRPの全結合量を確率するために、ビオチン化HRPをそれぞれの薄

10

20

30

40

50

膜に結合させた。生成物の形成の速度は、基質の既知量を用いて570nmで記録した。生成物のレゾルフィンに対するモル吸光係数はメーカー (Invitrogen) から入手し、 $54000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ と定められた。

【0194】

Rep₄CTM4とRep₄CTのタンパク質溶液(25μl)を透明な96ウェルマイクロタイタープレート内のウェルの底で完全に乾燥させ、こうして薄膜を形成した。ウェルはPBS(pH7.4)中の1%のBSAの100μlとともに1時間以上インキュベートし、その後PBS(pH7.4)中の1%のBSA中の0.3mg/mlのビオチン化HRP(Invitrogen, Camarillo, CA)の50μlとともに1時間以上インキュベートした。続いてウェルをPBS-Tで2回、PBSで1回洗浄した。反応は0.2%BSA, 28mM NaCl, 0.54mM KCl, 0.3mM KH₂PO₄, 42mM Na₂HPO₄(pH7.4)に溶解した2mMの過酸化水素を含む50μMのAmplex red溶液(Invitrogen)を室温にて添加することにより開始した。速度論的測定はTecan InfiniteのM200マイクロプレートリーダーで行った。

10

【0195】

ビオチン化HRP(溶液中に遊離)の既知量が、薄膜におけるビオチン化HRPによる測定の場合と同様の速度を生じるHRPの量を確立するために使用された。50μMのAmplex red及び2mMの過酸化水素の溶液(pH7.4)中で、ビオチン化HRP無しによる触媒反応で、生成物のレゾルフィンに対して得られた反応速度を図21のグラフに示す。データポイントは、同じ濃度でのビオチン化HRPによる三連の測定値に相関する。図21のグラフ下の表は、データに対する線形回帰から得られた値を示す。図21のグラフのバーは、同じ濃度のビオチン化HRPによるn=3のウェルの測定値からの標準偏差を示す。図21の得られた標準曲線と勾配が、融合タンパク質膜に結合させたビオチン化HRP量の算出に用いられた。

20

【0196】

融合タンパク質の薄膜及びコントロールの薄膜がビオチン化HRPとインキュベートされるウェル内での50μMのAmplex redと2mMのH₂O₂の触媒反応における反応速度を図22に示す。図21と22における反応速度は、Invitrogenにより提供された吸光係数を用いて計算された($54000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$)、分あたりのμM単位でのレゾルフィンの形成として表される。バーは、n=8ウェルで測定された反応についての標準偏差を示している。図22は、Rep₄CTM4でコーティングされたウェルとコントロールであるRep₄CTでコーティングされたウェルの間の生成物形成(それゆえ結合したビオチン化HRP)の速度の有意な違いを示している。0.2pmol HRP/mm²がRep₄CTM4薄膜に結合することが決定された(表5)。

30

【0197】

(C)市販製品との比較

ストレプトアビジンでコーティングされた高密度機能性表面の生産は達成することが困難であることが判明している。市販のプレートのビオチン結合能が表4に記載される。

表 4 -市販されているプレートのビオチン結合能

会社	プレート	ビオチン ^a (pmol)	被覆 面積 ^b (mm ²)	ビオチン/ 被覆面積 (pmol/mm ²)
Nunc/Thermo scientific	受動的被覆プレート (Passively Coated plates)	13	150	0.087
Pierce/Thermo scientific	HBC ^c	0.78 ^d - 125	90	0.008 - 1.4
Pierce/Thermo scientific	標準能力 (Standard Capacity)	5	90	0.055
Grenier bio-one	C-ボトム (c-bottom)	20	210	0.096
R&D systems	EvenCoat	7 ^e	150	0.047
Sigma screen / Sigma Aldrich	S6940 (HBCc)	300	150	2.0

^a 製造業者が定めたビオチン結合能

^b 製造業者が定めた被覆体積にもとづいて計算された。

^c HBC = 高結合能.

^d 限界は 8 k Da のビオチン化分子の定められた検出範囲にもとづいて計算された。

^e 計算は MW = 120 kDa を用いたビオチン化抗体の定められた結合にもとづく。

【 0 1 9 8 】

実施例 10 A でビオチン化 Atto - 565 及び実施例 10 B でのビオチン化 HRP による結合実験から得られたビオチン化フルオロフォア / 表面積の比率が表 5 に要約される。Rep₄CTM4 (配列番号 26) の薄膜上における 2 つの異なるビオチン化分子の密度は 0.073 - 0.2 pmol / mm² である。

【 0 1 9 9 】

表 5 - M4 融合タンパク質の薄膜のビオチン結合能

ビオチン化 生成物	Rep ₄ CTM4 (nmol)	ビオチン化 分子(pmol)	表面積 (mm ²)	ビオチン化 分子 / 表面積 (pmol/mm ²)	ビオチン化 Rep ₄ CTM4 (%)
Atto-565	0.082	2.1	28	0.073	2.6
HRP	0.082	5.1	28	0.2	6.2

10

20

30

40

50

【0200】

表4-5の結果は、ビオチンが小さな(フルオロフォア)または大きな(タンパク質)分子に結合されているかどうかに関わらず、M4部分との融合タンパク質からなる薄膜は、商業的な代替物と同じ範囲のビオチン結合密度を提供することを示している。

【0201】

統計

GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) をデータの統計分析のために使用した。実施例10Aにおいて、ノンパラメトリック対ウィルコクソン検定が、Rep₄CT又はRep₄CTM₄の何れかから形成される薄膜に対するビオチン化Atto-565の添加前と後での蛍光値の比較に用いられた。更に、ノンパラメトリック対マンホイットニーU検定が、Rep₄CT又はRep₄CTM₄の薄膜を用いるビオチン化Atto-565のインキュベーション後におけるウェル内の蛍光強度を比較するために、また実施例10Bでビオチン化HRPとインキュベートされた薄膜上での測定から得られた[レゾルフィン]/分の値の比較のために用いられた。P値<0.05を有意とみなした。

10

【0202】

実施例11 - 融合タンパク質の繊維と薄膜に対するビオチン化抗体と二次抗体の結合
Rep₄CT(配列番号20, コントロール)及びmodM₄Rep₄CT(配列番号24)の薄膜と繊維がウサギ起源のビオチン化抗体に対する結合能について試験された。薄膜は、8x1又は12x1ウェルストリップ(96ウェルマイクロプレートのフォーマットと同じ大きさのウェル)に形成されている。

20

【0203】

PBS(pH7.4)中の1%のBSAによる薄膜と繊維のプレインキュベーション後に、ビオチン化抗体(ウサギ)はタンパク質構造(薄膜/繊維)と1時間以上インキュベートされ、その後¹²⁵Iで放射活性標識された二次抗ウサギ抗体が添加される。薄膜と繊維を洗浄する。ガンマ線の検出は、ガンマカウンターで個々の薄膜又は個々の繊維上で行われる。¹²⁵I-標識抗体の既知量の希釈系列が調製され、標準曲線を得るために放射能が測定され、それから融合タンパク質薄膜と繊維に対する結合ビオチン化抗体の量を計算することができる。

30

【0204】

実施例12 - 融合タンパク質の純粋な薄膜の調製

薄膜は10~20µMの濃度で25µlのRepCT₄M₄(配列番号26)を使用して鑄造された。100µlのPBS(pH7.4)を、1時間ウェル中で薄膜とインキュベートした。この溶液を除去し、50µlのヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)が添加され、薄膜を破壊し、タンパク質を可溶化させた。更なる薄膜に対して、事前にPBSで洗浄することなく、同量のHFIPが添加された。HFIPは、3.5時間、4つの薄膜上で作用させ、生じた透明なHFIP溶液を50µlの20%SDSを含むエツペンドルフチューブに移した。チューブ中の水を蒸発させ、残った含量を10mMのトリスHCl(pH8.0)の60µl中に溶解し、還元SDS-PAGEに供した。

40

【0205】

その結果を図23に示す。レーン1はSpectra^TM Multicolor Broad Range Protein Ladder(Fermentas)のタンパク質に相当する。数字はタンパク質の大きさに対応する。レーン2はHFIPを添加する前にPBSに浸漬していない精製されたRep₄CTM₄の薄膜に対応する。レーン3はPBSに1時間浸漬させてその後この溶液を除去しその後HFIPを添加したRep₄CTM₄の薄膜に対応する。

【0206】

幾つかのタンパク質はRep₄CTM₄タンパク質とともに共精製されるが(レーン2、図23)、100µlのPBSで1時間インキュベーションして汚染タンパク質を溶解し、還元SDS-PAGEにより判断されるようにRep₄CTM₄タンパク質のみから

50

なる薄膜を残した（レーン3、図23）。従って、最も汚染されたタンパク質がそのような重合法により除去され、そして融合タンパク質からなるタンパク質構造内の残りの任意の不純物は水性緩衝液で穏やかに洗浄することによって容易に除去することができる。

【0207】

実施例13 - 溶液中の有機ターゲットの捕捉

ZRep₄CTタンパク質の溶液（～1mg/ml）を、血清からなるサンプルに添加し、サンプル中のIgG分子を溶液中で融合タンパク質のZ部分に結合させる。混合物を疎水性/親水性界面に曝し、融合タンパク質/IgG複合体のRep₄CT部分が薄膜又は発泡体を形成するようにし、溶液中の他の血清タンパク質を残して、固体構造上でIgGを捕捉する。

10

【0208】

別法として、混合物を固体支持体上で乾燥させ、固定化したIgGによる薄膜を形成する。この薄膜をPBSなどの緩衝液で洗浄して溶解し、汚染タンパク質を除去する。

【0209】

あるいは、疎水性-親水性の界面を提供することで繊維が形成され、その混合物にせん断力を施す。融合タンパク質/IgG複合体のRep₄CT部分は巨視的繊維に重合化し、溶液中には他のタンパク質を残す。

【0210】

形成される固体構造（薄膜、発泡体又は繊維）が収集され、IgGは適切な溶出緩衝液中で（例えばpHを2.7に下げることにより）回収することができる。溶出タンパク質はSDS-PAGEで同定される。実施例22も参照。

20

【0211】

実施例14 - 細胞捕獲のための融合タンパク質の足場

(A) 眼の前房内の非付着細胞のインビボ試験

ZRep₄CT繊維/薄膜/発泡体をCD45又はCD34に対するIgGとともにインキュベートさせる。白血球がCD45に対するIgGによりZRep₄CT足場に対して捕捉され、肥満細胞がCD34に対するIgGによりZRep₄CT足場で捕捉される。細胞を足場の上に固定化されるようにする。細胞と融合タンパク質足場をネイキッドマウスの前眼房内に移植する。細胞は、目の窓を通して、インビボで検査される。

30

【0212】

(B) 非接着細胞のインビボ試験

肥満細胞と白血球をそれぞれCD34とCD45に対するIgGとともにZRep₄CT足場上で成長させ、次いでインビボで監視する。一部の細胞は、発達中の段階で、例えばクラスタで成長できる神経幹細胞など非接着性である。神経クラスタにおいて、細胞は、非分化型を保っている。神経幹細胞は、神経幹細胞上の細胞受容体に対するIgGとZRep₄CT足場上のクラスタで成長する。

【0213】

(C) 特定細胞の選択

ZRep₄CT足場（薄膜/発泡体/繊維）が特定の抗体による細胞の選択に用いられる。肥満細胞は、2つの工程手順で選択される。工程1：CD34に対するIgGによるZRep₄CT足場に対する細胞の結合。工程2：C-kit受容体に対するIgGによるZRep₄CT足場上での肥満細胞の選択。

40

【0214】

(D) ZRep₄CT上で成長する真核細胞におけるタンパク質の生産。

タンパク質の生産のために使用される多くの細胞が、非接着細胞株に由来する。しかし、付着細胞を用いるときには、物理的分離が促進されるので、多くの方法で大規模な生産が容易である。細胞受容体に対するIgGによるZRep₄CT足場の使用により、非接着細胞の成長は接着様式でなされ得る。

【0215】

実施例15 - ZRep₄CTに対するIgG結合における尿素処理の影響の調査

50

I g G 結合における Z - R e p ₄ C T 薄膜と繊維の尿素処理の影響をここで評価した。Z - R e p ₄ C T の薄膜と繊維をウサギ血清からの I g G の結合の前に尿素で処理した。結合した I g G を溶出し、S D S - P A G E により分析した。

【 0 2 1 6 】

実施例 6 でウサギ血清からの I g G に結合することが観察され、8 M の尿素で処理された (2 0 0 μ l の 8 M 尿素、2 0 分、室温) Z - R e p ₄ C T の繊維と薄膜を、5 0 0 μ l のウサギ血清 (1 : 5 希釈) とともに室温で 1 時間インキュベートした。R e p ₄ C T (配列番号 2 0) の薄膜と繊維がコントロール材料として使用され、同じ方法で処理された。6 0 0 μ l の P B S で 3 回洗浄した後、結合した I g G を、溶出緩衝液 (0 . 5 M 酢酸、1 M 尿素、1 0 0 m M の N a C l) で約 2 . 7 まで p H を下げることによって 5 0 0 μ l で溶出し、その後溶出画分を非還元 S D S - P A G E により分析した (非表示) 。

10

【 0 2 1 7 】

Z - R e p ₄ C T の薄膜と繊維は 8 M の尿素による処理の後で I g G に対するその結合能を保持していることが結論された。R e p ₄ C T のコントロールの薄膜と繊維は I g G の結合を全く示さなかった。

【 0 2 1 8 】

実施例 1 6 - Z - R e p ₄ C T に対する I g G 結合における N a O H 処理の影響の調査

洗浄条件に対する耐久性を更に評価するため、I g G 結合における Z - R e p ₄ C T (配列番号 1 4) の薄膜と繊維の N a O H 処理の影響が評価された。実施例 6 でウサギ血清からの I g G に結合することが観察され、8 M の尿素で処理された (2 0 0 μ l の 8 M 尿素、2 0 分、室温) 実施例 4 及び 5 からの Z - R e p ₄ C T の繊維と薄膜を 1 M の N a O H で更に処理した (5 0 0 μ l の 1 M の N a O H 、2 0 分、室温) 。R e p ₄ C T (配列番号 2 0) の薄膜と繊維がコントロール材料として使用され、同じ方法で処理された。N a O H 処理の後、薄膜と繊維は 5 0 0 μ l のウサギ血清 (1 : 5 希釈) とともに室温で 1 時間インキュベートした。6 0 0 μ l の P B S で 3 回洗浄した後、結合した I g G を、溶出緩衝液 (0 . 5 M 酢酸、1 M 尿素、1 0 0 m M の N a C l) で約 2 . 7 まで p H を下げることによって 5 0 0 μ l で溶出し、その後溶出画分を非還元 S D S - P A G E により分析した (非表示) 。

20

【 0 2 1 9 】

Z - R e p ₄ C T の薄膜と繊維は 1 M の N a O H による処理の後で I g G に対するその結合能を保持していることが結論された。R e p ₄ C T のコントロールの薄膜と繊維は I g G の結合を全く示さなかった。

30

【 0 2 2 0 】

実施例 1 7 - Z - R e p ₄ C T 薄膜に対する I g G - H R P 結合の定量化

(A) Z - R e p ₄ C T 薄膜に対する I g G - H R P 結合

Z - R e p ₄ C T に対する I g G の結合を定量化するため、I g G にコンジュゲートした西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) (I g G - H R P) を Z - R e p ₄ C T 薄膜に結合させた。Z - R e p ₄ C T (配列番号 1 4) 及び R e p ₄ C T (コントロール、配列番号 2 0) の薄膜が異なる濃度 (0 . 0 1 1 - 8 9 0 p m o l e s) で 9 6 ウェルプレート中に鑄造された。薄膜を室温で 1 時間、1 0 0 μ l の 1 % B S A でブロックした。次いで、薄膜を 5 0 μ l の I g G - H R P (すなわち、3 4 p m o l の I g G - H R P 、ウサギ起源の I g G) 中で室温で 1 時間インキュベートし、その薄膜を 1 0 0 μ l の 0 . 0 5 % の T w e e n で 2 回洗浄し、1 0 0 μ l の P B S で最終洗浄を行った。薄膜に対して結合した I g G - H R P を測定するために、5 0 μ M A m p l e x R e d / 2 m M H ₂ O の 5 0 μ l が一度に一つの薄膜に添加され、T e c a n P l a t e R e a d e r で 3 分間 5 7 0 n m で吸光度をモニタリングした。可溶性 I g G - H R P の希釈系列 (0 . 0 5 - 0 . 5 p m o l e) もまた薄膜のと同型のプレート中で、1 0 0 μ l の 1 % ウシ用血清アルブミン (B S A) により 1 時間ウェルをブロックすることによって測定され、その後 2 0 μ l の水溶性の I g G - H R P 、2 0 μ l の 1 2 5 μ M の A m p l e x R e d 及

40

50

び $10 \mu\text{l}$ の 9.79 mM の H_2O_2 を添加した。三連の測定を薄膜および希釈系列に対して行った。

【0221】

線形回帰フィットが、個々の測定に対してテカンソフトウェアを使用して作成され、時間に対する 570 nm での吸光度の生データプロットの線形領域 ($\text{Abs } 570 / \text{min}$) に相当する。その勾配は、無職の基質から色付きの生成物への HRP の変換速度に対応し、結合した $\text{IgG} - \text{HRP}$ 分子の数に比例する。

【0222】

各個々の三つ組において、結合した IgG 抗体 - HRP (ピコモル) の量の平均値と標準偏差を算出した。図 24 A は、異なるタンパク質濃度の $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ 及び Rep_4CT の薄膜に結合した $\text{IgG} - \text{HRP}$ の量を示し、図 24 B は $\text{IgG} - \text{HRP}$ に結合した異なるタンパク質濃度の薄膜における $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ 及び Rep_4CT の画分を示す。

10

【0223】

1.1 pmole のタンパク質又はそれ以上を含有する薄膜において、 $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ の薄膜は対応する Rep_4CT コントロール薄膜よりも有意に多く $\text{IgG} - \text{HRP}$ に結合する。 $\text{IgG} - \text{HRP}$ に結合したこれらの薄膜中の $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ 分子の画分はおよそ $\sim 7\%$ 未満である。

【0224】

(B) NaOH 処理後の $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ 薄膜に対する $\text{IgG} - \text{HRP}$ 結合

$\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ の薄膜に結合した IgG における NaOH 処理の影響を調べるために、 $\text{IgG} - \text{HRP}$ を NaOH 処理した薄膜に結合させ、結合した $\text{IgG} - \text{HRP}$ の量が検出された。

20

【0225】

実施例 17 (A) の $\text{IgG} - \text{HRP}$ を結合した $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ (配列番号 14 ; $1.1 - 890 \text{ pmole}$) 及び Rep_4CT (配列番号 20 , 108 pmole) の薄膜を、結合した $\text{IgG} - \text{HRP}$ を除去するために、 $100 \mu\text{l}$ の溶出緩衝液 ($\text{pH } 2.7$) で 1 時間室温でインキュベートした。次に、薄膜を $100 \mu\text{l}$ の 1 M の NaOH で $20 \sim 30$ 分間室温でインキュベートし、その後 $150 \mu\text{l}$ の PBS で 2 回洗浄した。薄膜を含むウェルは 1% の BSA でブロックされ、 $\text{IgG} - \text{HRP}$ (34 pmol) でインキュベートし、3 回洗浄し、 $50 \mu\text{M}$ の $\text{Amplex Red} / 2 \text{ mM}$ H_2O_2 を添加し、続いて上記 (A) に示したように 570 nm で吸光度をモニタリングした。各個々の三つ組において、結合した IgG 抗体 - HRP (ピコモル) の量の平均値と標準偏差を算出した。

30

【0226】

図 25 A は、異なるタンパク質濃度の $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ 及び Rep_4CT の薄膜に結合した $\text{IgG} - \text{HRP}$ の量を示し、図 25 B は $\text{IgG} - \text{HRP}$ に結合した異なるタンパク質濃度の薄膜における $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ 及び Rep_4CT の画分を示す。図 26 は NaOH 処理の前後において、 $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ 及び Rep_4CT の薄膜に対しての結合した $\text{IgG} - \text{HRP}$ の量を可視化している。

【0227】

108 pmole の $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ の薄膜は対応する Rep_4CT の薄膜よりも有意に多い結合を示し、 NaOH 処理した薄膜に対する $\text{IgG} - \text{HRP}$ の $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ 結合の量は、薄膜のタンパク質濃度が増加するにつれて増加する傾向を示している。 $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ 薄膜に対する $\text{IgG} - \text{HRP}$ の量は、未処理の薄膜に比べて、過酷な 1 M の NaOH 処理によっておよそ $2 \sim 4$ 倍減少する。

40

【0228】

実施例 18 - $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ 薄膜に対する $\text{IgG} - \text{フルオロフォア}$ 結合の定量化
フルオロフォアにコンジュゲートした IgG の結合が、異なる量のタンパク質を含む $\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ 及び Rep_4CT の薄膜に対して行われた。

【0229】

$\text{Z-Rep}_4\text{CT}$ (配列番号 14) 及び Rep_4CT (コントロール, 配列番号 20)

50

の薄膜が異なる濃度 (0.011 - 890 pmol/L) で調製され実施例 17 に示したようにブロックされた。次いで、薄膜を 50 μ l の IgG - フルオロフォア (100 pmol/L の IgG - フルオロフォア、ウサギ起源の IgG、フルオロフォア: Alexa Fluor 633) 中で室温で 1 時間インキュベートし、その薄膜を 100 μ l の 0.05% の Tween で 2 回洗浄し、100 μ l の PBS で最終洗浄を行った。傾向測定の前に、100 μ l の PBS を各薄膜に対して添加した。

【0230】

可溶性 IgG - フルオロフォアの希釈系列 (0 - 1 pmol/L) もまた薄膜のと同型のプレート中で、100 μ l の 1% ウシ用血清アルブミン (BSA) により 1 時間ウェルをブロックすることによって測定され、その後 100 μ l の水溶性の IgG - フルオロフォアが添加された。蛍光を薄膜について三つ組として測定し、希釈系列は Tecan Plate Reader 機器上で測定された (励起: 632 nm、発光: 660 nm、ゲイン: 200)。

10

【0231】

各個々の三つ組に対して、結合した IgG - フルオロフォアの平均値と標準偏差 (pmol/L) が、0.011 - 55 pmol/L のタンパク質を含む薄膜に対して計算された (図 27A)。IgG - フルオロフォアに結合する Z-Rep₄CT 及び Rep₄CT 分子の画分もまた計算された (図 27B)。

【0232】

Z-Rep₄CT 薄膜に対する IgG - Alexa Fluor 633 の結合は対応する Rep₄CT コントロール薄膜よりも有意に多いと結論づけることができる。0.011 - 11 pmol/L の Z-Rep₄CT の薄膜の間において IgG - フルオロフォア結合の有意な違いは観察されず、このことはこの波長での Z-Rep₄CT の薄膜だけの自己蛍光に起因しているようには見えない (データ非表示)。55 pmol/L 以上のタンパク質を含有する Z-Rep₄CT 薄膜に対する IgG - フルオロフォアの結合はいかなる信頼ある方法でも計算することはできず、それはこれらに由来する蛍光シグナルが校正曲線の外側であったためである。

20

【0233】

Z-Rep₄CT 薄膜による結合 IgG - フルオロフォアの量を実施例 17 の IgG - HRP の対応する量と比較することにより、Z-Rep₄CT は IgG - HRP よりも多くの IgG - フルオロフォアに結合するよう見え (例えば 55 pmol/L の薄膜と 1.1 pmol/L の薄膜に対してそれぞれ ~4 倍及び ~6 倍の違い)、これはフルオロフォアと HRP の間の大きさの違いに起因する可能性がある。更に、IgG - フルオロフォアに結合する Z-Rep₄CT 分子の画分もまた、IgG - HRP 結合のものとは比べて増加したように見える。

30

【0234】

実施例 19 - ヒト血漿からの IgG の Z-Rep₄CT 薄膜への結合

この実験において、Z-Rep₄CT (配列番号 14) の 3 つの薄膜が実施例 3 で示したように調製された。全ての薄膜が、鑄造後に、保管の最中にいかなる液体にも浸漬されることなく +4 で 8 ヶ月間保管された。各 Z-Rep₄CT 薄膜を 500 μ l のヒト血漿 (1:5 希釈) と共に室温で 1 時間インキュベートした。600 μ l の PBS で 3 回洗浄した後、結合した IgG を、溶出緩衝液 (0.5 M 酢酸、1 M 尿素、100 mM の NaCl) で約 2.7 まで pH を下げることによって 500 μ l で溶出し、その後溶出画分を非還元 SDS-PAGE により分析した (非表示)。Rep₄CT (配列番号 20) の薄膜がコントロール材料として使用され、同じ方法で処理された。

40

【0235】

ゲルから、IgG (~146 kDa) は Z-Rep₄CT 薄膜からの溶出画分にあるように見えることが自明であり、Z-Rep₄CT の薄膜は、いかなる液体にも浸漬されることのない +4 での 8 ヶ月の保管後に、ヒト血漿からの IgG に結合する能力を保持していることを示している。Rep₄CT のコントロール薄膜は、溶出画分で少しも IgG

50

を示さない。これらの知見は、本発明による構造を使用するとき、実施例 4 で報告された実験再現性の観察を拡張し、またそのタンパク質構造がヒト I g G に結合することができることを示している。

【0236】

実施例 20 - ヒト血漿からの I g G のオートクレーブ処理した Z - R e p ₄ C T 繊維への結合

オートクレーブ処理により滅菌後の I g G に結合する Z - R e p ₄ C T の能力が調査された。Z - R e p ₄ C T 繊維のオートクレーブ処理後に、繊維をヒト血漿からの I g G に結合させた。オートクレーブ処理した繊維の I g G 結合をオートクレーブ処理していない繊維のそれと比較した。

10

【0237】

2 つのほぼ等しい大きさの Z - R e p ₄ C T (配列番号 14) 繊維を 20 m M のトリス (p H 8 . 0) を含有する 2 本のチューブに移した。次に繊維の一つを 121 で 20 分間オートクレーブ処理した。2 つの R e p ₄ C T (配列番号 20) 繊維がコントロール材料として使用され同じ方法で処理された。

【0238】

繊維を 500 μ l のヒト血漿 (1 : 5 希釈) と共に室温で 1 時間インキュベートした。600 μ l の P B S で 3 回洗浄した後、結合した I g G を、溶出緩衝液 (0 . 5 M 酢酸、1 M 尿素、100 m M の N a C l) で約 2 . 7 まで p H を下げることによって 500 μ l で溶出し、その後溶出画分を非還元 S D S - P A G E により分析した (図 28) 。

20

【0239】

図 28 に示すゲルは以下に従ってロードされた：

- (1) 1 . 4 μ l ロードされたヒト血漿 (1 : 5)
- (2) 14 μ l ロードされた Z - R e p ₄ C T、オートクレーブしていない繊維
- (3) 14 μ l ロードされた Z - R e p ₄ C T、オートクレーブした繊維
- (4) 14 μ l ロードされた R e p ₄ C T、オートクレーブしていない繊維
- (5) 14 μ l ロードされた R e p ₄ C T、オートクレーブした繊維
- (6) 分子量マーカー。

【0240】

オートクレーブしていない及びオートクレーブした Z - R e p ₄ C T 繊維の両方とも 146 k D a 周辺に明らかな I g G のバンドを示している。これらの I g G のバンドの強度には明らかな差がなく、オートクレーブ処理は、I g G 結合能力にほとんど影響を及ぼさないことを示唆している。オートクレーブしていない及びオートクレーブした R e p ₄ C T の繊維のどちらも溶出画分に I g G を示していない。全ての繊維は、付加的な、もっと弱い、アルブミンのバンド (~ 50 - 60 k D a) を示している。

30

【0241】

実施例 21 - Z - R e p ₄ C T 繊維のプロテアーゼ 3 C 切断

Z - R e p ₄ C T タンパク質 (全タンパク質構造は H i s ₆ - Z - L E A L F Q G P - R e p ₄ C T ; 配列番号 14) はプロテアーゼ 3 C 認識部位 (L E A L F Q G P , アミノ酸 Q と G の間でのプロテアーゼ 3 C 切断) を Z ドメインと R e p ₄ C T の間に含んでいる。

40

【0242】

任意の大きさの Z - R e p ₄ C T 繊維をエッペンドルフチューブに移し、プロテアーゼによる切断が 9 . 6 μ g のプロテアーゼ 3 C と 0 . 35 μ l の 1 M の D T T を総体積が 350 μ l まで添加することによって開始された。切断は + 4 で 24 時間進行させ、その後 S D S - P A G E 用にサンプルを切断上清から抜き取った。S D S - P A G E 用にサンプルを切断上清から抜き取って、別に 24 時間切断を進行させた (+ 4) 。次いで 2 つの抜き取られたサンプルを S D S - P A G E により分析した (図 29) 。

【0243】

図 29 に示すゲルは以下に従ってロードされた：

50

(1) 分子量マーカー

(2) プロテアーゼ3Cで24時間切断されたZ-Rep₄CT繊維の上清

(3) プロテアーゼ3Cで48時間切断されたZ-Rep₄CT繊維の上清。

図29から、プロテアーゼ3CによるZ-Rep₄CT繊維の切断後の上清の両方が2つの異なるバンドを含んでいたことが見て取れる。第一のバンドは、わずかに35kDa未満であり、プロテアーゼ3C(～31kDa)に対応し、第二のバンドは10kDaの真上に位置していた。プロテアーゼ3CによるZ-Rep₄CTの切断は、(i)His₆-Z-LEALFQ(～9kDa)及び(ii)GP-Rep₄CT(～23kDa)に対応する2つのオリゴペプチドセグメントを生成するため、第二のバンドは切断されたHZフラグメント(9kDa)に対応する。従って、プロテアーゼ3Cによる切断部位はZ-Rep₄CT繊維の切断に対して得ることができ、それゆえ、HZ部分は除去することができる。

10

【0244】

実施例22 - IgGの存在下での可溶性Z-Rep₄CTの繊維形成

溶性Z-Rep₄CTをIgGと混合すると、Zドメインに対するIgG結合の動力学はZ-Rep₄CT繊維の形成よりも早くなるはずである。Zドメインの大半がIgGで占有されている場合の繊維を形成する可能性が研究された。

【0245】

IgGの存在下での繊維の形成

Z-Rep₄CT(配列番号14)の精製が前述と同様に行われ、精製されたタンパク質溶液は2.2mg/mlまで濃縮された。繊維の形成は4つの異なる条件で行われ、全て、総繊維形成体積は3mlで、71nmolの可溶性Z-Rep₄CTタンパク質を含んでいた。第一条件はZ-Rep₄CTのみ含んでおり；第二条件は精製されたウサギIgGを混合したZ-Rep₄CTであり(IgGに比べて8倍超のZ-Rep₄CT)；第三条件はウサギ血清を混合したZ-Rep₄CTであり(Z-Rep₄CTに比べて～1.5倍超の血清IgG)；及び第四条件はウサギ血清を混合したZ-Rep₄CTであった(血清IgGに比べて～7倍超のZ-Rep₄CT)。繊維の形成は室温で3日間進行させた。

20

【0246】

繊維形成の3日後に、条件1、2及び4に対して繊維が形成された。条件4の形成された繊維に加えて、かなりの量のZ-Rep₄CTタンパク質凝集体もまた形成された。条件3においては繊維又は凝集体は全く目視できなかった。

30

【0247】

これからの一つの結論は、数多くの他の生物分子の存在が、個々のRep₄CT分子がお互いに相互作用することを遮蔽する場合に、繊維の形成が損なわれるということであろう。このことの別の態様は、条件3の場合でありうるように、非常に多くのIgGが存在する場合、Z-Rep₄CT中の多くのZドメインがIgGと結合し、IgGと結合したZ-Rep₄CTの大きな画分が繊維の形成を妨げ得るということであろう。

【0248】

Z-Rep₄CT繊維からの結合したIgGの除去

条件1、2及び4で作成された薄膜は、条件4からの凝集体と一緒に回収され、20mMのトリス(pH8)で洗浄される。次に、全ての繊維と凝集体は等しい半分に分割され、一つの半分はpHを下げることによる結合IgGの溶出用であり、他の半分はプロテアーゼ3Cによる切断用である。

40

【0249】

繊維と凝集体の第一の群はエッペンドルフチューブへ移され、144μlの溶出緩衝液(0.5M酢酸、1M尿素、100mMのNaCl)、pH2.7が各チューブに添加された。IgGの溶出を室温で30分間進行させ、その後溶出上清を回収しSDS-PAGEで解析した(図30)。

【0250】

50

繊維と凝集体の第二の群に対して、DTTを含有する144 μ lのプロテアーゼ3C（即ち110 μ gのプロテアーゼ3C）が添加された。プロテアーゼ3Cによる切断を+4で一晩進行させ、その後切断上清を回収しSDS-PAGEで解析した（図30）。

【0251】

図30は、Z-Rep₄CT繊維から除去されたIgGと可溶性Z-Rep₄CTとIgGを混合することにより形成された凝集体の非還元SDS-PAGEゲルを示す。ゲルは以下に従ってロードされた：

- (1) 精製された可溶性Z-Rep₄CT (2.2 mg/ml)
- (2) Z-Rep₄CT繊維の低pH溶出 (条件1)
- (3) Z-Rep₄CT繊維の低pH溶出 (条件2)
- (4) Z-Rep₄CT繊維の低pH溶出 (条件4)
- (5) Z-Rep₄CT凝集体の低pH溶出 (条件4)
- (6) 分子量マーカー
- (7) Z-Rep₄CT繊維のプロテアーゼ3Cによる切断 (条件1)
- (8) Z-Rep₄CT繊維のプロテアーゼ3Cによる切断 (条件2)
- (9) Z-Rep₄CT繊維のプロテアーゼ3Cによる切断 (条件4)
- (10) Z-Rep₄CT凝集体のプロテアーゼ3Cによる切断 (条件4)

[記：His₆Z、プロテアーゼ3C及びウサギIgGの分子量はそれぞれ9,30及び~146 kDaである。]

【0252】

図30から、どの条件下で形成されたかにかかわらず、IgGは全ての試験された繊維と凝集体から回収されることが自明である。実施例13も参照。

【0253】

実施例23 - 抗体結合を用いたZ-Rep₄CTへのリンパ球の捕捉

IgGのFc部分に結合するために、Z-Rep₄CTマトリックス、例えば繊維と薄膜を用いることは、捕捉されたIgGが特異的に指向するものの更なる結合の可能性を開く。一つの魅力的な考え方は、細胞親和性リガンドとして、Z-Rep₄CTマトリックス上で捕捉したIgGを用いて、多くの異なる細胞型を含む生物学的サンプルからある種の細胞型を単離することであろう。この細胞捕捉アプローチを試験するために、Z-Rep₄CT繊維と薄膜を、ヒトTリンパ球の細胞表面でCD3分子に特異的に指向したIgGに結合させた。捕捉された細胞を、蛍光顕微鏡によって分析した。

【0254】

Z-Rep₄CT (配列番号14)のタンパク質の発現および精製は、前述したように行った。精製されたタンパク質は、約1 mg/mlに濃縮し、この後繊維および薄膜を前述した手順に従って作成した（薄膜は24ウェルの組織培養プレート中で作成された）。更に、Rep₄CT (配列番号20)コントロール繊維および薄膜を約1 mg/mlのタンパク質溶液から同様にして調製した。

【0255】

マトリックス上でヒトリンパ球のCD3分子に指向したIgGを捕捉するため、繊維と薄膜をフルオロフォアがコンジュゲートした抗ヒトCD3 IgG (ヒトCD3抗原に対するマウスモノクローナルIgG_{2a}、ラベリング：Alexa Fluor 488)の1:20希釈no150 μ lに室温で1時間浸漬させた。繊維と薄膜は300 μ lのPBS (pH7.4)で3回洗浄し、その後それらを倒立ニコンエクリプスTiの蛍光顕微鏡 (455から490 nmで励起、500から540 nmで検出)でIgG結合について分析した。Z-Rep₄CTの繊維と薄膜は両方ともAlexa Fluor 488にコンジュゲートしたIgG抗体を結合し、従ってZ-Rep₄CTのZドメインがIgGに結合する能力を確認している。IgGに曝露していないZ-Rep₄CTマトリックスはこの選択された領域で蛍光シグナルを示さず、Rep₄CTのコントロールの繊維と薄膜はIgGに曝露した場合でさえも蛍光を示さない。

【0256】

単核細胞（即ち、リンパ球と単球）を、F i c o l l - P a q u e密度勾配分離培地中で室温での勾配遠心分離により（30分、400×g）新たに収集したヒト末梢血から分離した；。遠心分離後に単核細胞画分を回収し、PBSで2回洗浄し、その後細胞を20mlのRPMI/10%FCS培地に再懸濁した。単球枯渇は、T-75組織培養フラスコに細胞懸濁液を転送し、続いて37℃で90分間インキュベートすることによって達成された。単球枯渇後に、懸濁液中の細胞は回収され、リンパ球の総数は 1.1×10^6 と数えられた。

【0257】

リンパ球をZ-Rep₄CT（配列番号14）マトリックスに結合させるために、リンパ球（1ml、 $\sim 0.37 \times 10^6$ 細胞/ml）が繊維と薄膜に適用され、続いて+4℃で30分間インキュベートした（穏やかに揺らしながら）。次に、繊維と薄膜はPBS/2%FCS（pH7.4）の3mlで3回洗浄した。結合した細胞は、4℃で15分間、2%PFA（パラホルムアルデヒド）に固定された。細胞核は、200μlのDAPI（1μg/ml）染色溶液中に、室温で5分間、結合した細胞を有する繊維および薄膜を浸漬することによって染色し、その後300μlのPBSで3回洗浄した。300μlの体積のPBSが各繊維と薄膜に添加され、その後倒立ニコンエクリプスTi機器（380から395nmで励起、415から475nmで検出）を用いる蛍光顕微鏡分析した。

10

【0258】

Z-Rep₄CT繊維の写真（非表示）は、抗ヒトCD3 IgG抗体に曝されていない繊維に対していくつか結合したリンパ球を示しているが、一方、IgGに曝されている繊維はより多くのリンパ球に結合しているように見える。Z-Rep₄CT薄膜の場合、IgGに曝された薄膜のみならずIgGに曝されていない薄膜においても染色された細胞が明らかに目に見える。しかし、薄膜においてもまた、細胞の結合前に抗ヒトCD3 IgGに曝された薄膜は細胞の結合前にIgGに曝されていない薄膜よりもより多くの細胞が結合しているように見える。更に、Rep₄CT（配列番号20）のコントロールの繊維と薄膜は全くリンパ球の結合を示していない。

20

【0259】

この実験において、蛍光顕微鏡によって、Z-Rep₄CTの繊維と薄膜は、Rep₄CTのものとは対照的に、蛍光標識されたIgG抗体、つまりマウス抗ヒトCD3 IgGに結合する能力を有することが示されている。更に、Z-Rep₄CT繊維と薄膜の両方とも、ヒトTリンパ球を特異的に認識するIgG抗体を保有するか又は保有しないに関わらず、リンパ球に結合する能力を有する。これは、Zドメイン自体がヒトリンパ球のための多少の親和性を有することを示唆し得る。しかし、Z-Rep₄CTマトリックスに対する結合細胞の数は、細胞結合の前にIgGでコーティングたときにわずかに増加しているように見える。結合した細胞がT型のリンパ球であるかどうかを知ることができるように、他の型のリンパ球（例えば、Bリンパ球およびNK細胞）からTリンパ球を区別するために、ヒトCD3分子に指向した二次抗体を適用することが必要である。

30

【0260】

実施例24 - ヒト血漿からのアルブミンのAbd-Rep₄CT薄膜への結合

薄膜中でのAbdドメイン（配列番号16の残基13から58）の接近性、及びAbd-Rep₄CT薄膜のアルブミン結合する能力を評価するために、ヒト血漿をアルブミン源として使用した。結合したアルブミンを溶出し、SDS-PAGEにより分析した。

40

【0261】

実施例7で調製したAbd-Rep₄CT（配列番号16）の6つの薄膜を、500μlのヒト血漿（1:5希釈）とともに室温で1時間インキュベートした。600μlのPBSで3回洗浄した後、結合したアルブミンを、溶出緩衝液（0.5M酢酸、1M尿素、100mMのNaCl）で約2.7までpHを下げることによって500μlで溶出し、その後溶出画分を非還元SDS-PAGEにより分析した（図31）。また実施例7で調製されたRep₄CT（配列番号20）の薄膜がコントロール材料として使用され、同じ方法で処理された。

50

【0262】

図31に示すゲルは以下に従ってロードされた：

- (1) 0.7 μ l ロードされたヒト血漿 (1 : 50)
- (2 - 7) 14 μ l ロードされた A b d - R e p₄ C T、薄膜の六つ組 (H e x a p l i c a t e)
- (8) 14 μ l ロードされたヒト血漿とインキュベートした空のウェル
- (9) 分子量マーカー
- (10 - 12) 14 μ l ロードされた R e p₄ C T、薄膜の三つ組。

【0263】

A b d - R e p₄ C Tの全6つの薄膜はヒト血漿からのアルブミンに結合している (レ- ン2 - 7)。これらの A b d - R e p₄ C T薄膜の溶出画分において単一のアルブミンのバンド (~60 kDa)のみが現れるため、それらはヒト血漿からはいかなるものにも非特異的には結合しないように見える。R e p₄ C Tの薄膜は、溶出画分で少しもアルブミンを示していない (レ- ン10 - 12)。

10

【0264】

薄膜の安定性を調べるために、以前に一回使用され、P B Sで29日間保管 (+4) されていた A b d - R e p₄ C T薄膜のアルブミン結合能を再び試験した。A b d - R e p₄ C Tの6つの繊維を500 μ lのヒト血漿 (1 : 5希釈)と共に室温で1時間インキュベートした。600 μ lのP B Sで3回洗浄した後、結合したアルブミンを、溶出緩衝液 (0.5 M酢酸、1 M尿素、100 mMのN a C l)で約2.7までpHを下げるこ- 20
とによって500 μ lで溶出し、その後溶出画分を非還元S D S - P A G Eにより分析した (非表示)。R e p₄ C Tの薄膜がコントロール材料として使用され、同じ方法で処理された。

20

【0265】

A b d - R e p₄ C Tの全6つの薄膜はP B Sで29日間保存した後、ヒト血漿からのアルブミンに結合する能力を保持していた。R e p₄ C Tの薄膜は、溶出画分で少しもアルブミンを示さなかった。

【0266】

実施例25 - A b d - R e p₄ C T薄膜の洗浄

(A) A b d - R e p₄ C T薄膜の尿素処理

30

A b d - R e p₄ C T (配列番号16)の薄膜 (合計6つの薄膜、以前実施例24で使用)を室温で20分間8 Mの尿素を500 μ lとともにインキュベートし、その後それらを600 μ lのP B Sで3回洗浄した。次に繊維を500 μ lのヒト血漿 (1 : 5希釈)中で室温で1時間インキュベートした。600 μ lのP B Sで3回洗浄した後、結合したアルブミンを、溶出緩衝液 (即ち、0.5 M酢酸、1 M尿素、100 mMのN a C l)で約2.7までpHを下げるこ- 40
とによって500 μ lで溶出し、その後溶出画分を非還元S D S - P A G Eにより分析した (非表示)。A b d - R e p₄ C Tの全6つの薄膜は8 Mの尿素で処理した後、ヒト血漿からのアルブミンになお結合できる。

【0267】

(B) A b d - R e p₄ C T繊維と薄膜のN a O H処理

40

A b d - R e p₄ C T (配列番号16)の6つの薄膜を、最初に500 μ lのヒト血漿 (1 : 5希釈)中で室温で1時間インキュベートした。600 μ lのP B Sで3回洗浄した後、結合したアルブミンを、溶出緩衝液 (0.5 M酢酸、1 M尿素、100 mMのN a C l)で約2.7までpHを下げるこ- 50
とによって500 μ lで溶出し、その後溶出画分を非還元S D S - P A G Eにより分析した。同じ手順をR e p₄ C T (配列番号20)コントロール薄膜に実施した。

【0268】

N a O Hによる処理において、A b d - R e p₄ C T (配列番号16)薄膜の3つのセットの三つ組を用いた：(i) 8 Mの尿素で以前に処理された薄膜 (上の(A)を参照)を1 MのN a O Hで処理し、その後アルブミンに結合させる；(ii) 以前に未使用の薄

50

膜を1MのNaOHで処理し、その後アルブミンに結合させる；(iii)以前に未使用の薄膜をアルブミン結合について分析だけ行う。アルブミンの結合について上で使用されるAbd-Rep₄CT繊維は、1MのNaOHで処理され、その後再びアルブミンに結合させる。

【0269】

NaOHによる処理において、Abd-Rep₄CTの繊維と薄膜〔薄膜セット(i)と(ii)〕は室温で~20分間、500μlの1MのNaOHとインキュベートし、その後、それらを600μlのPBSで3回洗浄した。次に繊維と全3セットの薄膜を500μlのヒト血漿(1:5希釈)中で室温で1時間インキュベートした。600μlのPBSで3回洗浄した後、結合したアルブミンを、溶出緩衝液(0.5M酢酸、1M尿素、100mMのNaCl)で約2.7までpHを下げることによって500μlで溶出し、その後溶出画分を非還元SDS-PAGEにより分析した(図32)。

10

【0270】

図32のゲルは以下に従ってロードされた：

- (1) 1.4μlロードされたヒト血漿(1:5)
- (2-3, 5) 8Mの尿素と1MのNaOHで処理され、アルブミン結合させて、14μlロードされたAbd-Rep₄CT薄膜の三つ組。
- (4) 分子量マーカー
- (6-8) アルブミン結合の前に未処理であって14μlロードされたAbd-Rep₄CT薄膜の三つ組。
- (9-11) アルブミン結合の前に1MのNaOHで処理され、14μlロードされたAbd-Rep₄CT薄膜の三つ組。
- (12) アルブミン結合の前に未処理であって14μlロードされたAbd-Rep₄CT繊維。
- (13) アルブミン結合の前に1MのNaOHで処理され、14μlロードされたAbd-Rep₄CT繊維。
- (14) アルブミン結合の前に未処理であって14μlロードされたRep₄CT繊維。

20

【0271】

Abd-Rep₄CT繊維は1MのNaOHによる処理の前と後の両方で明らかにアルブミン(~60kDa)に結合するが(それぞれレーン12と13)、一方対応する未処理のRep₄CT繊維は少しもアルブミン結合を示さない(レーン14)。全てのAbd-Rep₄CT薄膜は、アルブミン結合の前に、1MのNaOHにより処理されない薄膜と処理された薄膜の間で、バンド強度に明らかな相違は示していない(それぞれレーン6-8及びレーン9-11)。更に、アルブミン結合の前に、8Mの尿素と1MのNaOHの両方で処理された薄膜は、別の2組の薄膜と比較して、溶出アルブミンのバンド(レーン2、3、及び5)の強度に減少を示している。

30

【0272】

実施例26 - ウサギ及びマウスIgGのC2-Rep₄CT薄膜と繊維に対する結合
C2-Rep₄CT繊維と薄膜のC2ドメイン(配列番号18の残基13-67)の接近性は以下のように分析される。室温で1時間、C2-Rep₄CT(配列番号18)の2つの薄膜と一つの繊維を500μlのウサギ血清(1:5希釈)とインキュベートし、一方C2-Rep₄CT(配列番号18)の別の2つの薄膜と一つの繊維を~50μg/mlのマウスIgG₁(モノクローナル抗ウサギ免疫グロブリン、マウスIgG₁アイソタイプ、マウス腹水)の500μlとともにインキュベートした。600μlのPBSで3回洗浄した後、結合したIgGを、溶出緩衝液(0.5M酢酸、1M尿素、100mMのNaCl)で約2.7までpHを下げることによって500μlで溶出し、その後溶出画分を非還元SDS-PAGEにより分析した(図33)。Rep₄CT(配列番号20)の薄膜と繊維がコントロール材料として使用され、同じ方法で処理された。

40

【0273】

図33のゲルは以下に従ってロードされた：

50

- (1) マウス腹水 (I g G₁ のアイソタイプ)
- (2) ウサギ血清 (1 : 50)
- (3 - 4) C2 - Rep₄ CT、薄膜、マウス I g G₁ の二つ組
- (5、7) C2 - Rep₄ CT、薄膜、ウサギ血清の二つ組
- (6) 分子量マーカー
- (8) C2 - Rep₄ CT、繊維、マウス I g G₁
- (9) C2 - Rep₄ CT、繊維、ウサギ血清
- (10 - 11) Rep₄ CT、薄膜、マウス I g G₁ の二つ組
- (12) Rep₄ CT、薄膜、ウサギ血清
- (13) Rep₄ CT、繊維、ウサギ血清
- (14) Rep₄ CT、繊維、マウス I g G₁

10

[記 : 非還元 SDS - PAGE 条件下で、ウサギ I g G は ~ 146 kDa でマウス I g G は ~ 160 kDa である。]

【0274】

腹水からのマウス I g G₁ の C2 - Rep₄ CT 薄膜に対する結合は SDS - PAGE の溶出画分に検出可能な I g G のバンドを与えなかったが (レーン 3 - 4)、C2 - Rep₄ CT 繊維はマウス I g G₁ と結合したように見える (レーン 8、マウス I g G は ~ 160 kDa である)。しかし、C2 - Rep₄ CT の薄膜 (レーン 5 及び 7) と繊維 (レーン 9) はウサギ血清からの I g G の結合を示している。マウス I g G₁ の起源がここが腹水の形態にあるので、この液体中で何かがどういうわけか薄膜における C2 と I g G 1 の間の結合を乱している事例である可能性がある。Rep₄ CT のコントロールの薄膜と繊維は、溶出画分で少しも I g G を示さなかった (レーン 10 - 14)。

20

【0275】

実施例 27 - ヒト血漿からの I g G の C2 - Rep₄ CT 薄膜への結合

C2 - Rep₄ CT の I g G に結合する能力をさらに調べるため、C2 - Rep₄ CT (配列番号 18)、Z - Rep₄ CT (配列番号 14) 及び Rep₄ CT (配列番号 20) の各々の 2 つの薄膜を、ヒト血漿 (1 : 5 希釈) の 500 μl とともに室温で 1 時間インキュベートした。600 μl の PBS で 3 回洗浄した後、結合した I g G を、溶出緩衝液 (0.5 M 酢酸、1 M 尿素、100 mM の NaCl) で約 2.7 まで pH を下げることによって 500 μl で溶出し、その後溶出画分を非還元 SDS - PAGE により分析した (図 34)。

30

【0276】

図 34 のゲルは以下に従ってロードされた :

- (1) 1.4 μl ロードされたヒト血漿 (1 : 5)
- (2) 分子量マーカー
- (3 - 4) 14 μl ロードされた C2 - Rep₄ CT、薄膜の二つ組。
- (5 - 6) 14 μl ロードされた Z - Rep₄ CT、薄膜の二つ組。
- (7 - 8) 14 μl ロードされた Rep₄ CT、薄膜の二つ組。

【0277】

図 34 において、Z - Rep₄ CT 薄膜はヒト血漿からの I g G に明らかに結合していることが見てとれる (レーン 5 - 6)。C2 - Rep₄ CT 薄膜はまた、溶出画分 (レーン 3 - 4) に弱い I g G のバンドを示す。Rep₄ CT のコントロール薄膜はヒト血漿からのアルブミンに結合しないことを示している (レーン 7 - 8)。

40

【0278】

実施例 28 - ATR - FTIR を用いた Z - Rep₄ CT 及び Rep₄ CT の繊維と薄膜の二次構造の比較

Z ドメインの二次構造はその活性なコンフォメーションにおいて ヘリックスであり、一方 Rep₄ CT の二次構造は主に シート型である。Z - Rep₄ CT 繊維と薄膜の Z ドメインが正しくフォールドした場合、Rep₄ CT 薄膜と繊維のと比較してそれらのマトリックスに高い ヘリックス含量を期待することができよう。二次構造の違いを調べ

50

るために、Z - Rep₄CTとRep₄CTの繊維と薄膜を分光学的方法である減衰全反射型フーリエ変換赤外分光光度計 (ATR - FTIR) により分析し、それによりシート構造 (バンド位置: 1623 - 1641, 1674 - 1695 cm⁻¹) からヘリックス (バンド位置: 1648 - 1657 cm⁻¹) を識別することが可能である。

【0279】

Z - Rep₄CT (配列番号14) の一つの薄膜及びRep₄CT (配列番号20) の一つを、15 μl のタンパク質溶液を室温で一晩空気乾燥させることにより作成した。Z - Rep₄CTとRep₄CTについて繊維が作成され、その後張力下で、室温で~30分間空気乾燥した。ATR - FTIRは、その後、BrukerのプラチナATRユニットを用いて記録した。繊維と薄膜の両方のIRスペクトル (非表示) は、Z - Rep₄CTがRep₄CTよりも高いヘリックス含量を有することを示し、これは正しくフォールドしたZドメインの存在を示している。このことは、本発明によるZ - Rep₄CT構造中のZドメインの維持された機能に合致しており、例えば実施例2 - 5、17 - 19及び22 - 23を参照。

10

【図1 - 1】

CThyb_Esp	SRLSSPEASS	RVSSAVSNLV	SSG-PTNSAA	LSSTISHVVS	QIGASNPGLS
CTnat_Eau	SRLSSPSAVS	RVSSAVSSLV	SNG-QVNMAA	LNLIISNISS	SVSASAPGAS
AF350266_At1	SRLSSPGAAS	RVSSAVTSLV	SSGGPTNSAA	LSMTISHVVS	QISSSNPGLS
AY666062_Cm1	SHLSSPEASS	RVSSAVSNLV	SSG-STNSAA	LPNTISHVVS	QISSSNPGLS
AF350273_Lg1	SALAAPATSA	RISSHASTLL	SNG-PTNPAS	ISNVISNAVS	QISSSNPGAS
AY953074_Lh1	SALSAPATSA	RISSHASALL	SSG-PTNPAS	ISNVISNAVS	QISSSNPGAS
AY666068_Mh1	SHLSSPEASS	RVSSAVSNLV	SSG-STNSAA	LPNTISHVVS	QISSSNPGLS
U20329_Nc1	SRLSSPQASS	RVSSAVSNLV	ASG-PTNSAA	LSSTISHVVS	QIGASNPGLS
AY666076_Np1	SRLSSPEASS	RVSSAVSNLV	SSG-PTNSAA	LSMTISHVVS	QISSSNPGLS
AF350277_Nm1	SRLSSPQASS	RVSSAVSNLV	ASG-PTNSAA	LSSTISHVVS	QIGASNPGLS
AF350279_Ns1	SRLSSPEASS	RVSSAVSNLV	SSG-PTNSAA	LSSTISHVVS	QIGASNPGLS
AY666057_Ov1	SRLSSPEASS	RVSSAVSNLV	SSG-PTNSAA	LSMTISHVVS	QISSSNPGLS
AY666064_Ps1	SPLSSPEASS	RVSSAVSNLV	SSG-PTNSAA	LPNTISHVVS	QISSSNPGLS
AF350285_Tk1	SLSSSPASHA	RISSAVSALA	SGA-ASSPGY	LSSVISHVVS	QVSSNNGGLV
AF350286_Tv1	SRLSSPASHA	RISSAVSALA	SSG-ASSPGY	LSSVISHVVS	QVSSNNGGLS
ABU20328_Ab2	SRLSSSAASS	RVSSAVSSLV	SSG-PTTPAA	LSMTISSAVS	QISASNPGLS
AY365016_Aam2	-RSLSSPQASS	RVSSAVSTLV	SSG-PTNPAS	LSNAIGSVVS	QVSASNPGLP
AF350263_Aau2	SRLSSPQASS	RVSSAVSTLV	SSG-PTNPAA	LSNAISSVVS	QVSASNPGLS
AF350267_At2	SRLSSPQASS	RVSSAVSTLV	SSG-PTNPAS	LSNAISSVVS	QVSSSNPGLS
AF350272_Gm2	SRLSSPQAGA	RVSSAVSALV	ASG-PTSPAA	VSSAISNVAS	QISASNPGLS
AF350275_Lg2	SALSSPTTHA	RISSHASTLL	SSG-PTNSAA	ISNVISNAVS	QVSASNPGLS
AY953075_Lh2	SALSSPTTHA	RISSHASTLL	SSG-PTNSAA	ISNVISNAVS	QVSASNPGLS
AY654293_Nc2	SRLASPDGSA	RVSSAVSNLV	SSG-PTSSAA	LSSVISHVVS	QIGASNPGLS
AF350278_Nm2	SRLASPDGSA	RVSSAVSNLV	SSG-PTSSAA	LSSVISHVVS	QIGASNPGLS
AF350280_Ns2	SRLASPDGSA	RVSSAVSNLV	SSG-PTSSAA	LSSVISHVVS	QIGASNPGLS
AF350269_DtFb1	SRLSSPEASS	RVSSAVSSLV	SNG-QVNVDA	LPSIISNLSS	SISASATTAS
AF350270_DtFb2	SRLSSPQASS	RVSSAVSSLV	SNG-QVNVAA	LPSIISNLSS	SISASATTAAS
U47853_ADF1	NRLSSAGAAS	RVSSAVSALA	SAG---AAA	LPNVISNIYS	GVLSS--GVS
U47854_ADF2	SRLSSPQAAA	RVSSAVS-LV	SHGGPTSPAA	LSSVISHVVS	QISASNPGLS
U47855_ADF3	SRLSSPEASS	RVSSAVSSLV	SSG-PTKHAA	LSNTISSVVS	QVSASNPGLS
U47856_ADF4	SVYLRLQPLR	EVSSAVSSLV	SSG-PTNGAA	VSGALNSLVS	QISASNPGLS
コンセンサス	SRLSSPQASS	RVSSAVSNLV	SSG-PTNSAA	LSMTISHVVS	QISASNPGLS

図1

【図1 - 2】

CThyb_Esp	GCDVLVQALL	EVVSALIHIL	GSSSIGQVNY	GSAGQATQLV	QGSVYQALGE
CTnat_Eau	GCEVIVQALL	EVITALWQIV	SSSSVGYINP	SAVWQITWVW	ANAMAQVMG-
AF350266_At1	GCDVLVQALL	EIVSALVHIL	GSAMIGQVNS	SEVGRSASIV	GQSSINQAFS-
AY666062_Cm1	GCDVLVQALL	EVVSALIHIL	GSSSIGQVNY	GSAGQATQIV	-----
AF350273_Lg1	SCDVLVQALL	ELVTALLTII	GSSNVGNVNY	DSGGQYQVW	SQSVQNAFV-
AY953074_Lh1	ACDVLVQALL	ELVTALLTII	GSSNIGSVNY	DSGGQYQVW	TQSVQNVFV-
AY666068_Mh1	GCDVLVQALL	EVVSALIHIL	GSSSIGQVNY	GSAGQATQIV	GQSA-----
U20329_Nc1	GCDVLVQALL	EVVSALIQIL	GSSSIGQVNY	GSAGQATQIV	QGSVYQALG-
AY666076_Np1	GCDVLVQALL	EVVSALIHIL	GSSSIGQVNY	GSAGQATQIV	-----
AF350277_Nm1	GCDVLVQALL	EVVSALIHIL	GSSSIGQVNY	GSAGQATQIV	-----
AF350279_Ns1	GCDVLVQALL	EVVSALVHIL	GSSSIGQVNY	GSAGQATQIV	-----
AY666057_Ov1	GCDVLVQALL	EVVSALVHIL	GSSSIGQVNY	GSAGQATQIV	-----
AY666064_Ps1	GCDVLVQALL	EVVSALIHIL	GSSSIGQVNY	GSAGQATQIV	-----
AF350285_Tk1	GCDTLVQALL	EAAAALVHVL	ASSSGQVNL	HTAGYTSQL-	-----
AF350286_Tv1	GCDTVVQALL	EVAALVHVL	ASSNIGQVNL	HTAGYTSQL-	-----
ABU20328_Ab2	GCDVLVQALL	EVVSALVHIL	GSSSVGQVNY	GASAGYAGNV	-----
AY365016_Aam2	SCDVLVQALL	EIVSALVHIL	GSSSIGQVNY	SASSQYARLV	QGSIAQALG-
AF350263_Aau2	GCDVLVQALL	EIVSALVHIL	GSSSIGQVNY	AAS-----	-----
AF350267_At2	GCDVLVQALL	EIVSALVHIL	GSSSIGQVNY	AASSQYQALV	QGSITQALG-
AF350272_Gm2	GCDVLVQALL	EIVSALVHIL	SSASIGQVNY	GASGQYAAVI	-----
AF350275_Lg2	SCDVLVQALL	ELITALISIV	DSSNIGQVNY	GSGGQYQVW	G-----
AY953075_Lh2	SCDVLVQALL	EIITALISIL	DSSSVGQVNY	GSGGQYQVW	QGSVYQALG-
AY654293_Nc2	GCDVLVQALL	EIVSACVTIL	GSSSIGQVNY	GAASQYQVW	QGSVLSAF--
AF350278_Nm2	GCDVLVQALL	EIVSACVTIL	GSSSIGQVNY	GAA-----	-----
AF350280_Ns2	GCDVLVQALL	EIVSACVTIL	GSSSIGQVNY	GAA-----	-----
AF350269_DtFb1	DCEVLVQVLL	EVVSALVQIV	CS-----	-----	-----
AF350270_DtFb2	DCEVLVQVLL	EIVSALVQIV	SSANVGYINP	EASGSLH-AV	GSALAAAMG-
U47853_ADF1	SSEALVQALL	EVISALHVL	GSASIGNVSS	VGWNSALMAV	QNAVQYAG-
U47854_ADF2	GCDVLVQALL	EIISALVHIL	GSAMIGQVNS	SSAGQASIV	QGSVYRALS-
U47855_ADF3	GCDVLVQALL	EVVSALVHIL	GSSSIGQVNY	GASAGYQVW	QGSVYQALG-
U47856_ADF4	GCDVLVQALL	EIVSALVHIL	SSASIGQVNY	SSVVSQYQVW	SQALS-----
コンセンサス	GCDVLVQALL	EVVSALVHIL	GSSSIGQVNY	GSAGQATQIV	QGSVAQALGE

図1(続き)

【 図 2 】

Ea MaSp1 SHTTPTWTPNGLAENFMVNSFMQGLSSMPGFTASQLDDMDSTIAQSMVQSIQSLAAQCRQTSPTNKLQALNMAFA
 Lg MaSp1 QANTPWSKCANADAFINSFISAAQNTGFSQDQMDMSLLGNTMTAMDNMG--GRIITPSKLOALDMAFA
 Lh MaSp1 QANTPWSKCANADAFINSFISAAQNTGFSQDQMDMSLLGNTMTAMDNMG--GRIITPSKLOALDMAFA
 Nc MaSp1 -QNTPWSKTELADAFINAFNEAGRTGAFTQDLDMDSTIGDTIKTAMDKNRSKSKGKLOALNMAFA
 At MaSp2 QGAPWNSQLAESSFRLERFIQSGAFSPNQDLDMDSSIGDFTLKAIEKQAQSRKSKKLOALNMAFA
 Lg MaSp2 ---LRWSSKONADRFINAEIQAASNGAFSSDQVDDMSVIGNTMTAMDNMG--GRIITPSKLOALDMAFA
 Lh MaSp2 QANTPWSKCANADAFINAFNEAGRTGAFTQDLDMDSSIGDFTLKAIEKQAQSRKSKKLOALNMAFA
 Nc MaSp2 QANTPWSKTELADAFINAFNEAGRTGAFTQDLDMDSTIGDTIKTAMDKNRSKSKGKLOALNMAFA
 Nc MaSp2 QARSEWSDTATADAFIQNELAVSSGAFSTDQDLDMDSTIGDTIKTAMDKNRSKSKKLOALNMAFA
 Ab Cysp1 AVPSVSPNLAAGFLQCLTFGIGNSPAFPTEQDLDLDAIAQVILNAVSSNTGATASAR--AQAALSTALA
 Lh MaSp2 FVPSVSPNLAAGFLQCLTFGIGNSPAFPTEQDLDLDAIAQVILNAVSSNTGATASAR--AQAALSTALA
 Ncl Cysp1 ASVNIENPNAATSFNCLRSNIESPAPFQEQADLDSIAEVILSDVSS-VNTASSAT--SLALSSTALA
 Lh TuSp1 IANSPFNPNTAEAFARFVSNIVSSGFEFGAGAEFDDIIQSLIQAQ-SMGKGRHDTKAKAKAMQVALA
 Nc flag IVNSPFPNPNTAEAFARFVSNIVSSGFEFGAGAEFDDIIQSLIQAQ-SMGKGRHDTKAKAKAMQVALA
 NlM flag

Ea MaSp1 SSMAEIAASEEGGSLSTKTSITASAMNAFLQTVGVNPFINEITQLVSNFAQAQANDY
 Lg MaSp1 SSVAEIAASEG--GDLGVTTNALADALTSAFYQTGVVNRFFISEIRSLISMFQAASANDY
 Lh MaSp1 SSVAEIAASEG--GDLGVTTNALADALTSAFYQTGVVNRFFISEIRSLIGMFAQASANDY
 Nc MaSp1 SSMAEIAAVEQGLSYDAKTNAIADLSNLSAFYQTGAANFQVNEIRSLINMFAQASANEV
 At MaSp2 SSMAEIAVAEQGLSLEAKTNAIASALSAAFLETGTVNQQVNEIKTLLIFMIAQASSNEI
 Lg MaSp2 SSVAEIAVADG--QNVGGATNAISNALKRSAFYQTGVVNNQFISEISNLIINMFAQVANEV
 Lh MaSp2 SSVAEIAVADG--QNVGAATNAISDALRSAFYQTGVVNNQFITGISLIGMFAQVANEV
 NlM MaSp2 SSMAEIAAVEQGCQSMVKTNAIANALDSAFYQTGVVNNQFIVNEMRSLINMLSAAVNEV
 Nc MaSp2 SSMAEIAAVEQGCQSMVKTNAIYDGLNSAFYQTGAANFQVNEIRSLINMFAQASANEV
 Ab Cysp1 SSLDILLIAESAEISNYSNQISELTGILSDCFIQTGSDNPAFVRSIQSLIVLSQNDNTNI
 Lh MaSp2 SSLADLLISESGSSYQTQISALTNILSDCFVTGNNPAPFVRSVQTLLIGVLSQSSNAI
 Ncl Cysp1 SSLAELLVTESAEEDIDNQVVALSTILSQCFVETGSPNPAFVRSVKSLLGVLSQSSANEV
 Lh TuSp1 SSIABLVIAESSGGDVRKNTVINSNLRNMLMSTGSPNEEFVHEVQDILLIQMLSQEQINEV
 Nc flag SSIABLVIAESSGGDVRKNTVINSNLRNMLMSTGSPNEEFVHEVQDILLIQMLSQEQINEV
 NlM flag

図2

【 図 19 】

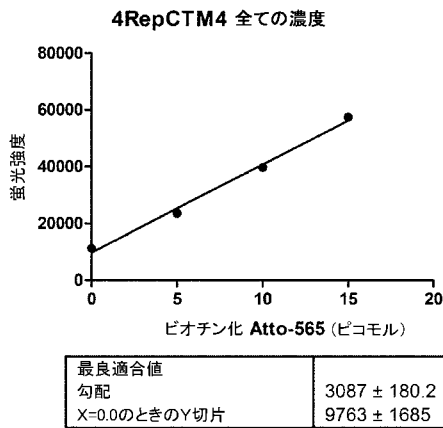


図19

【 図 20 】

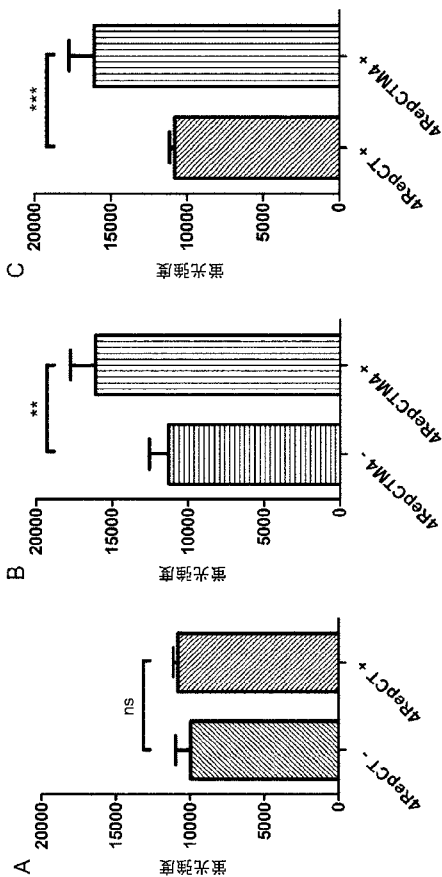


図20

【 図 21 】

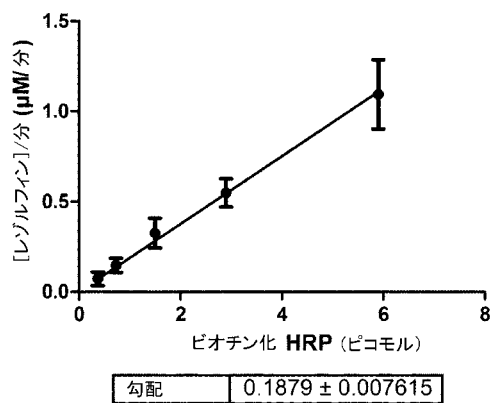


図21

【 図 2 2 】

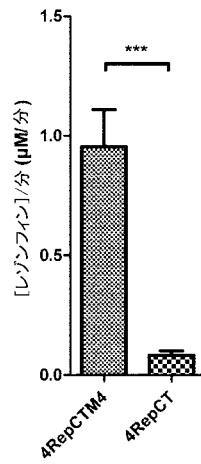


図22

【 図 2 4 】

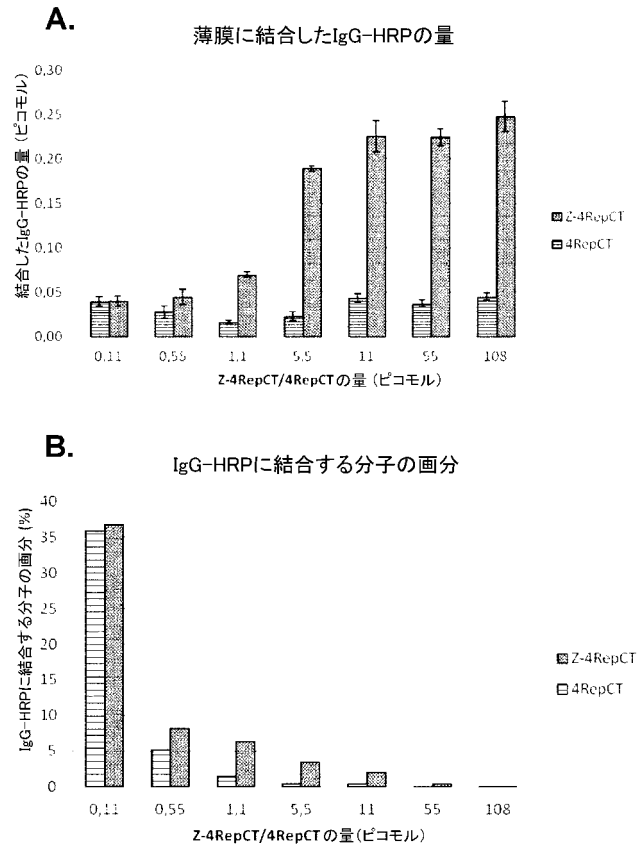


図24

【 図 2 5 】

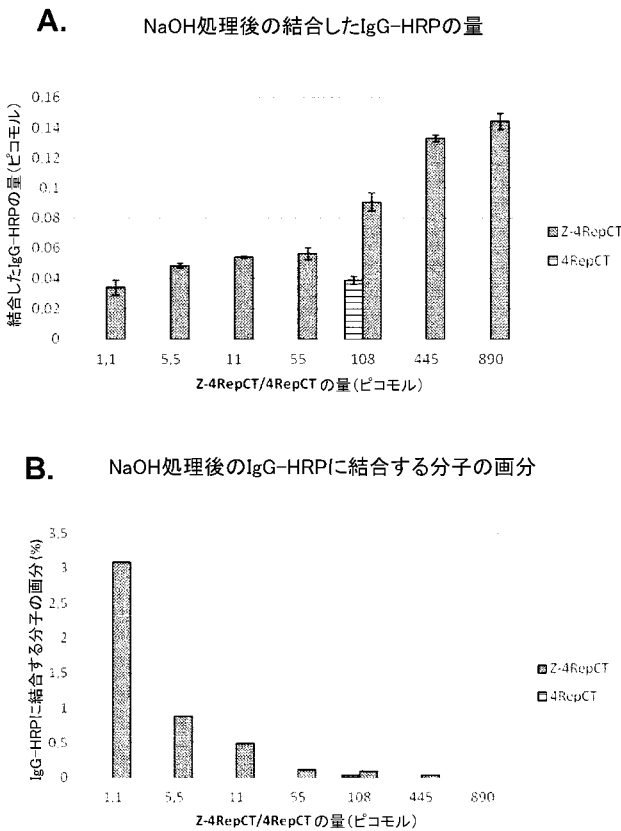


図25

【 図 2 6 】

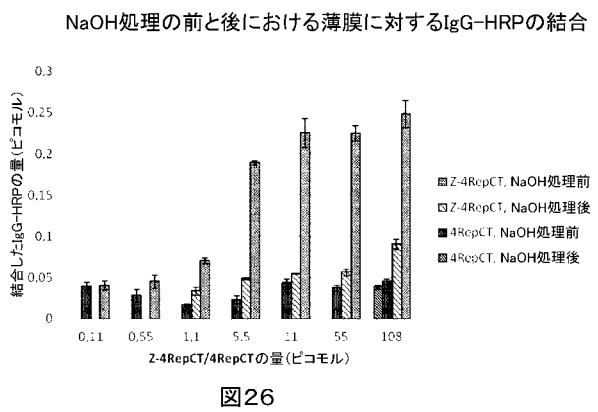


図26

【 図 2 7 】

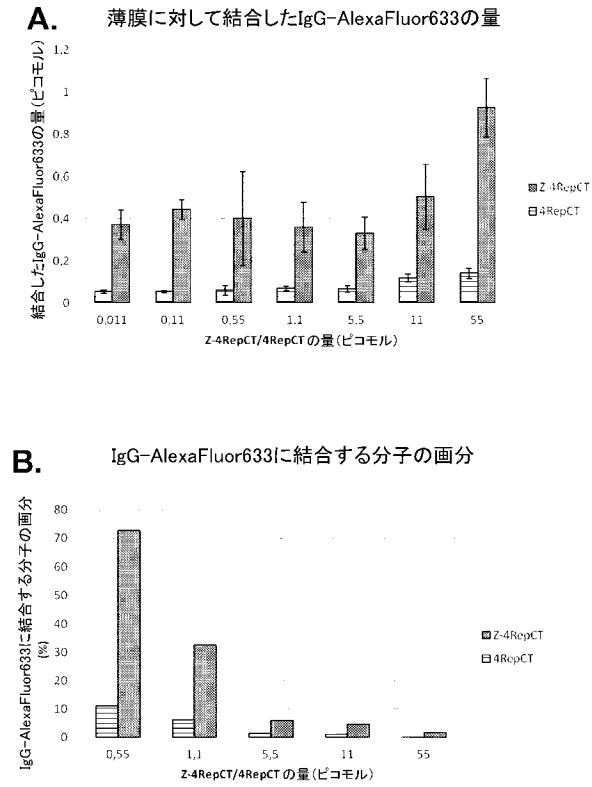


図27

【 図 3 】

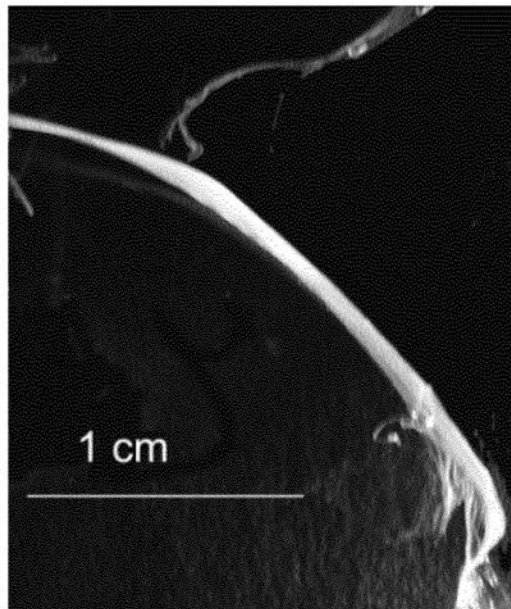


図3

【 図 4 】

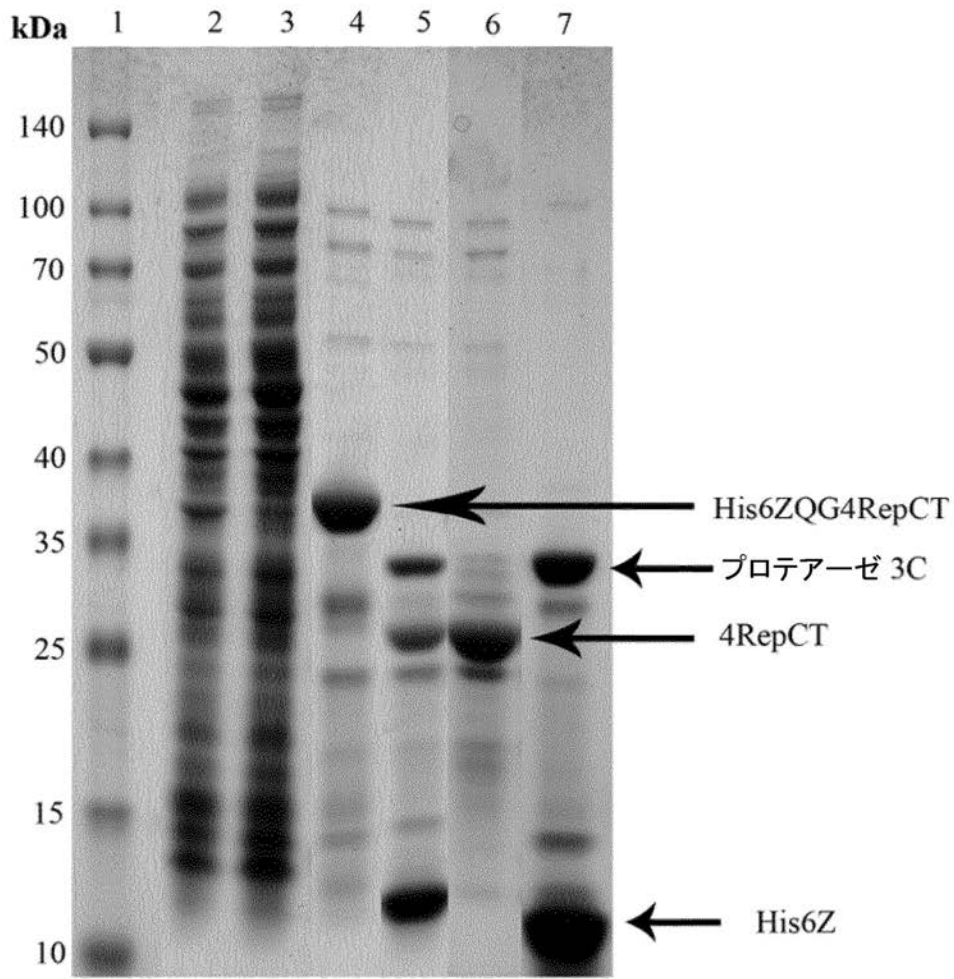


図4

【 図 5 】

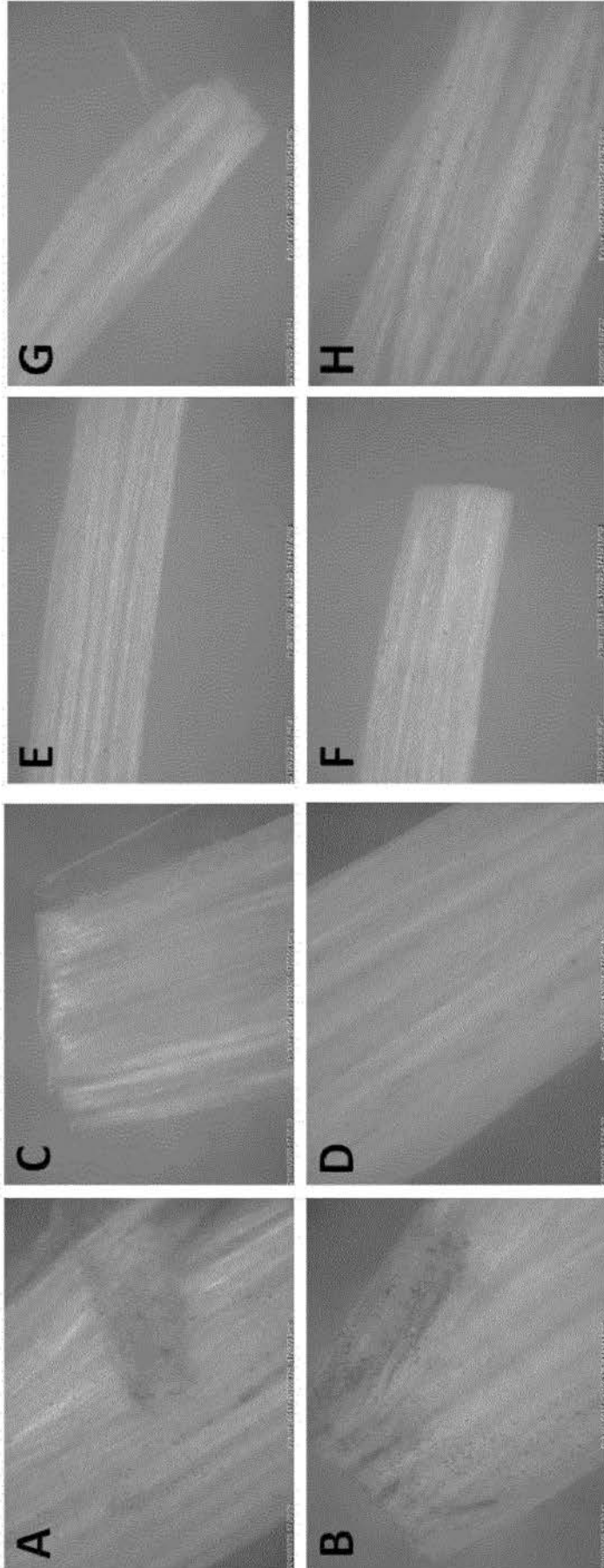


図 5

【 図 6 】

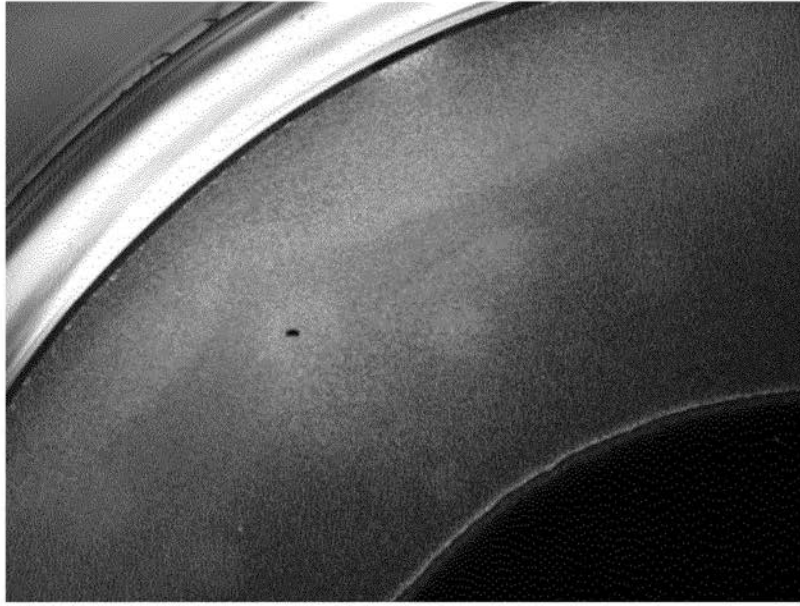


図6

【 図 7 】

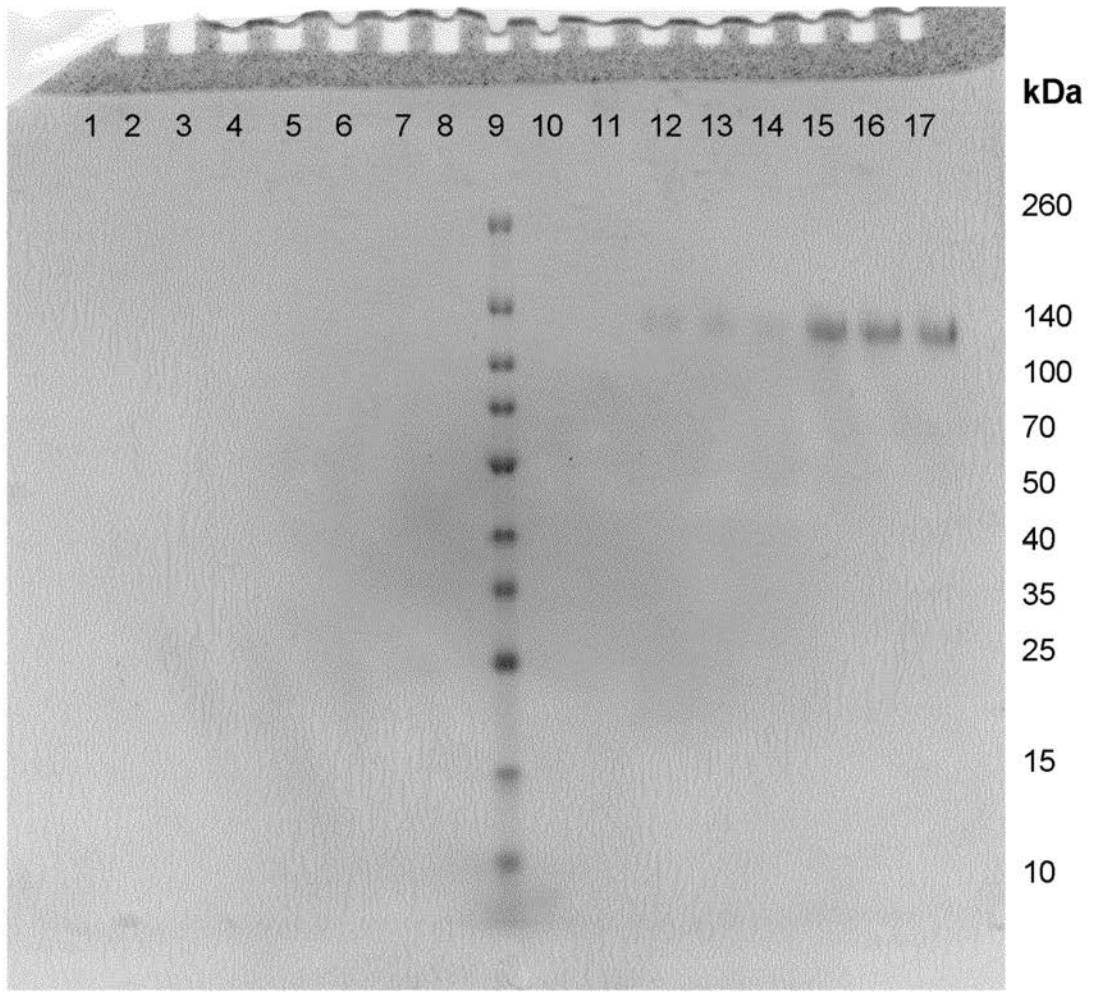


図7

【 図 8 】

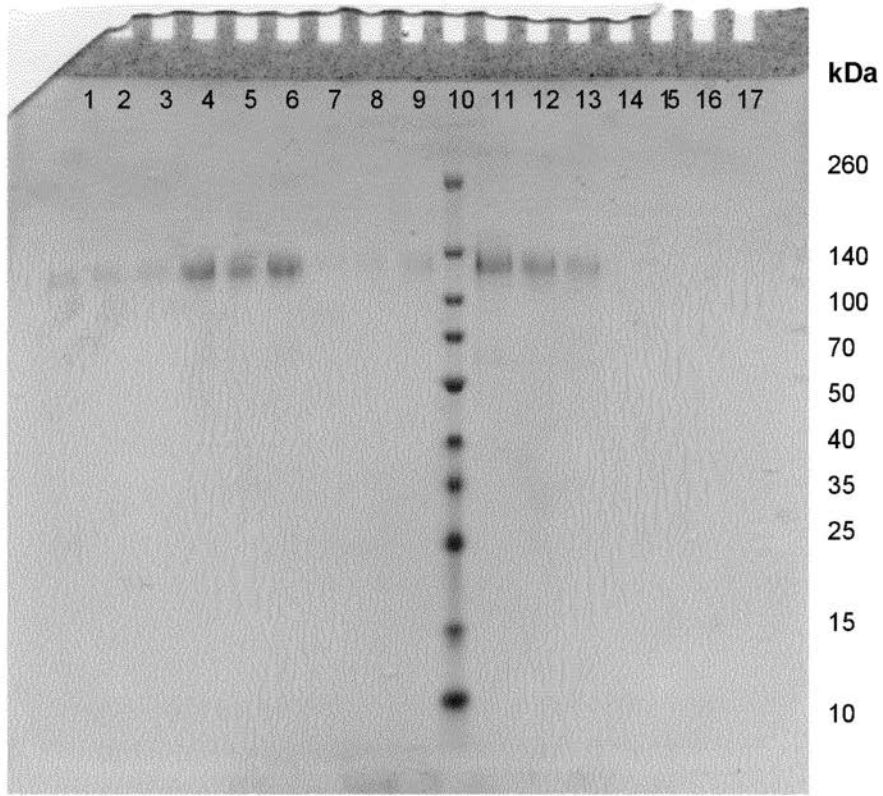


図 8

【 図 9 】

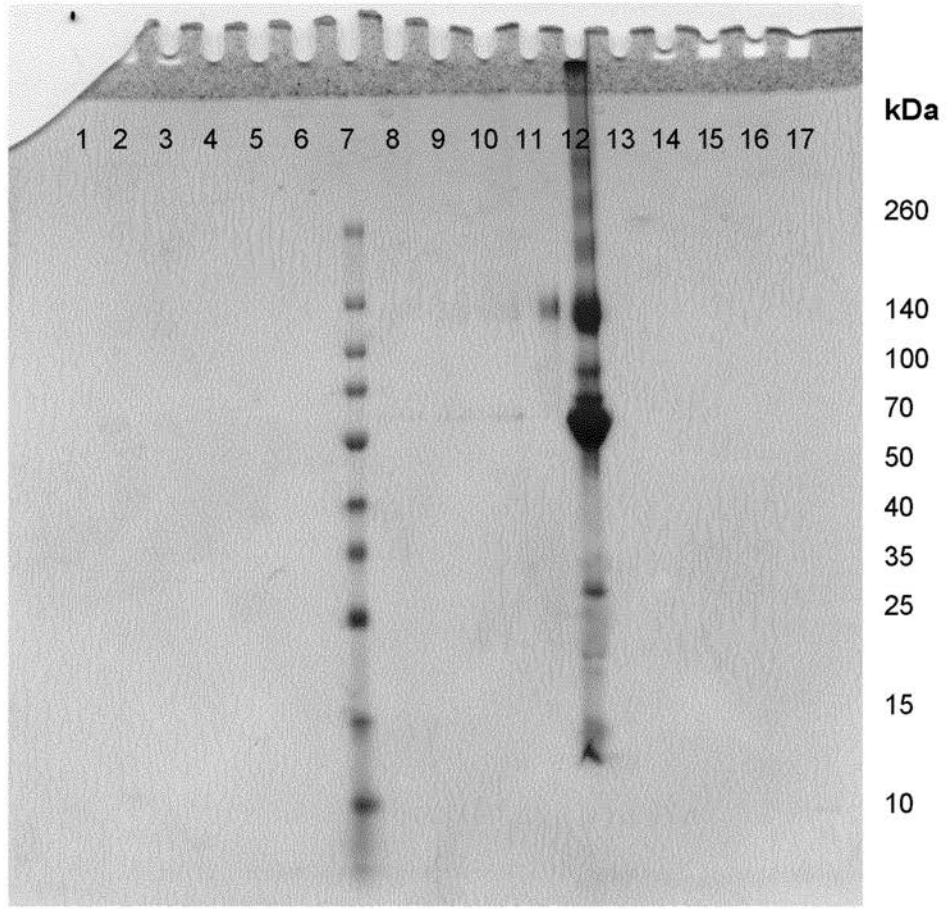


図9

【 図 10 】

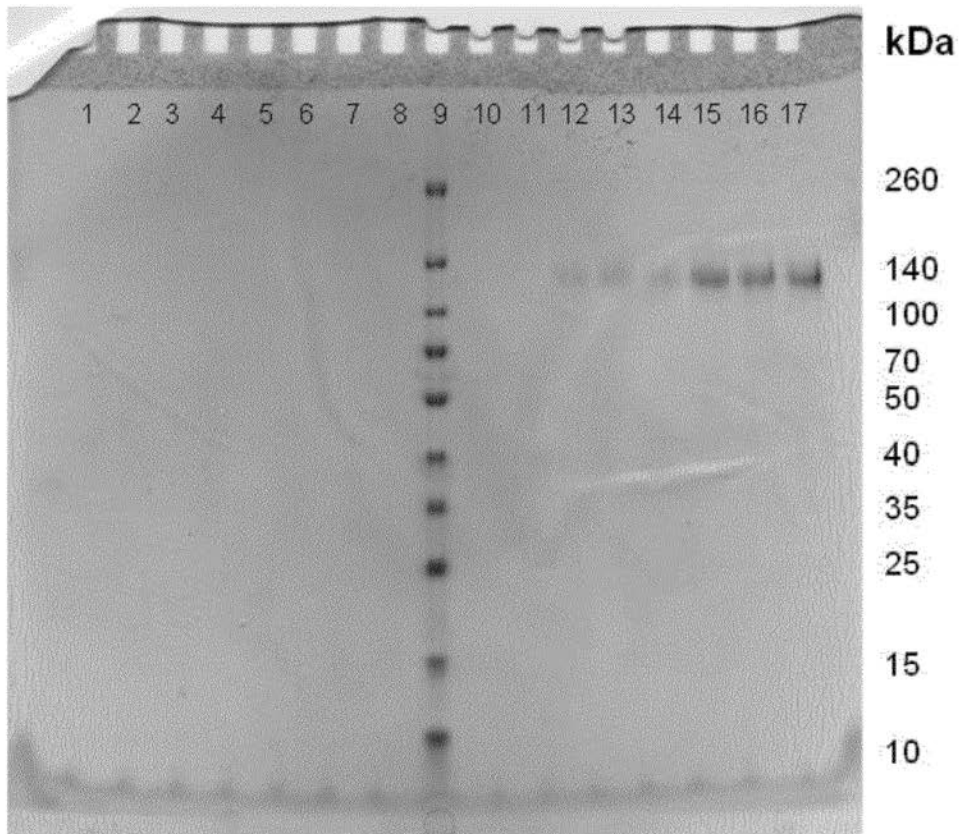


図10

【 図 1 1 】

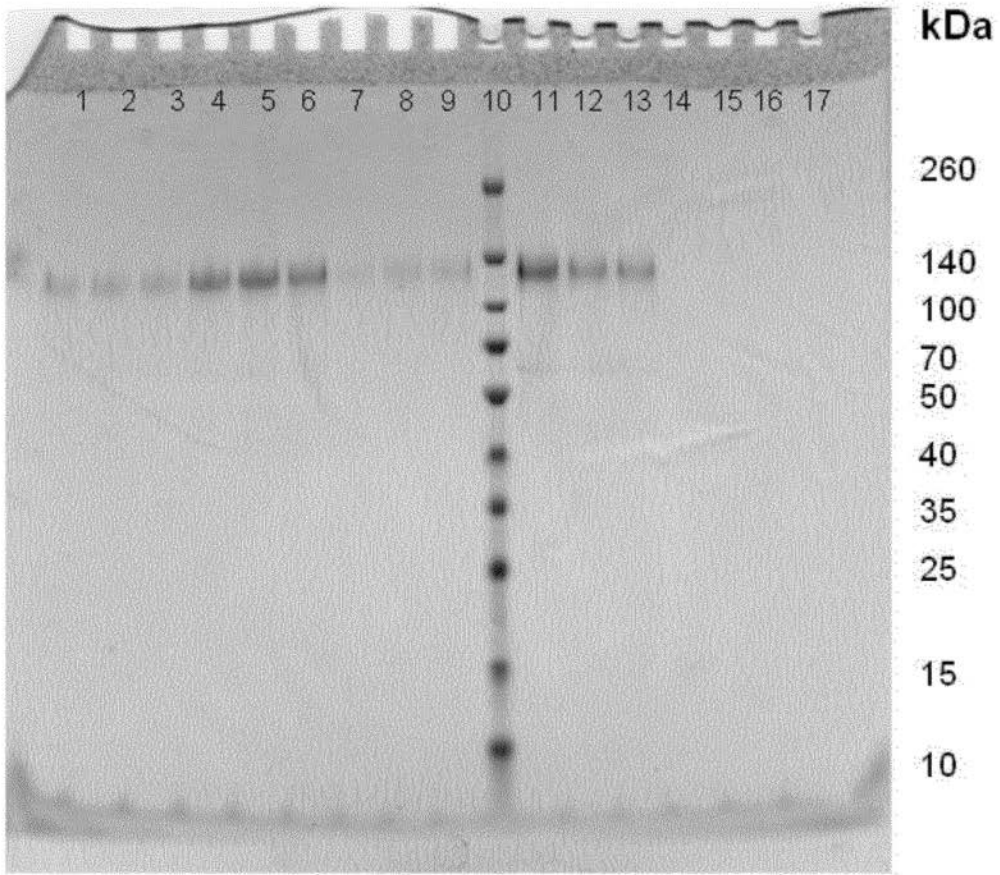


図 1 1

【 図 1 2 】

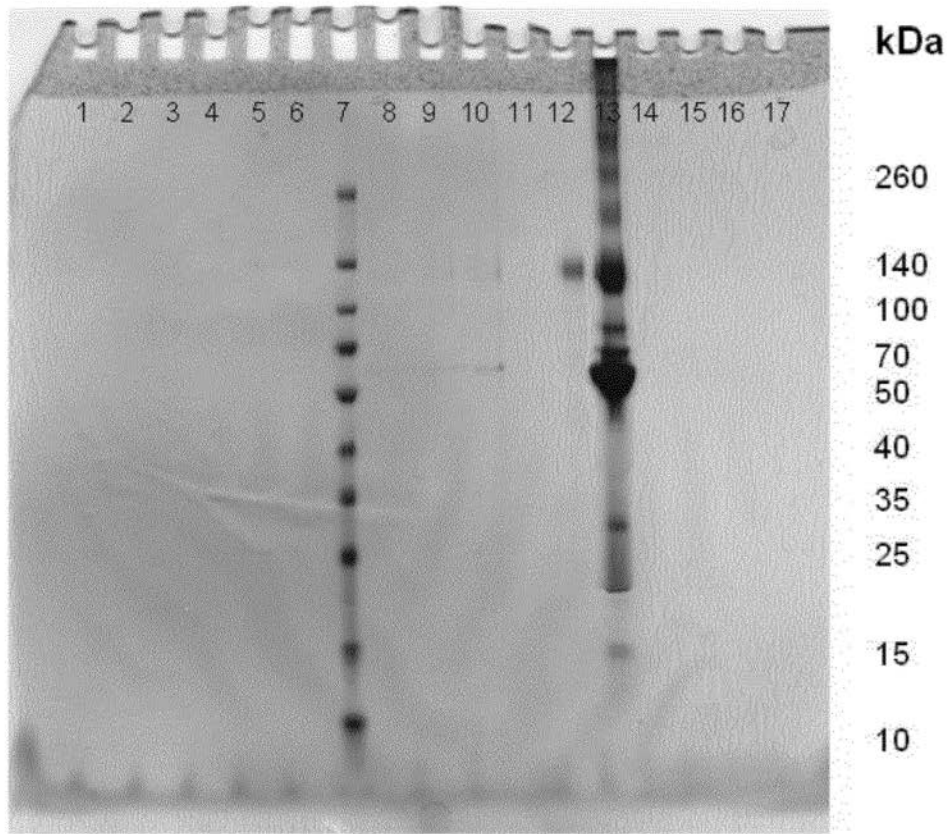


図12

【 図 13 】

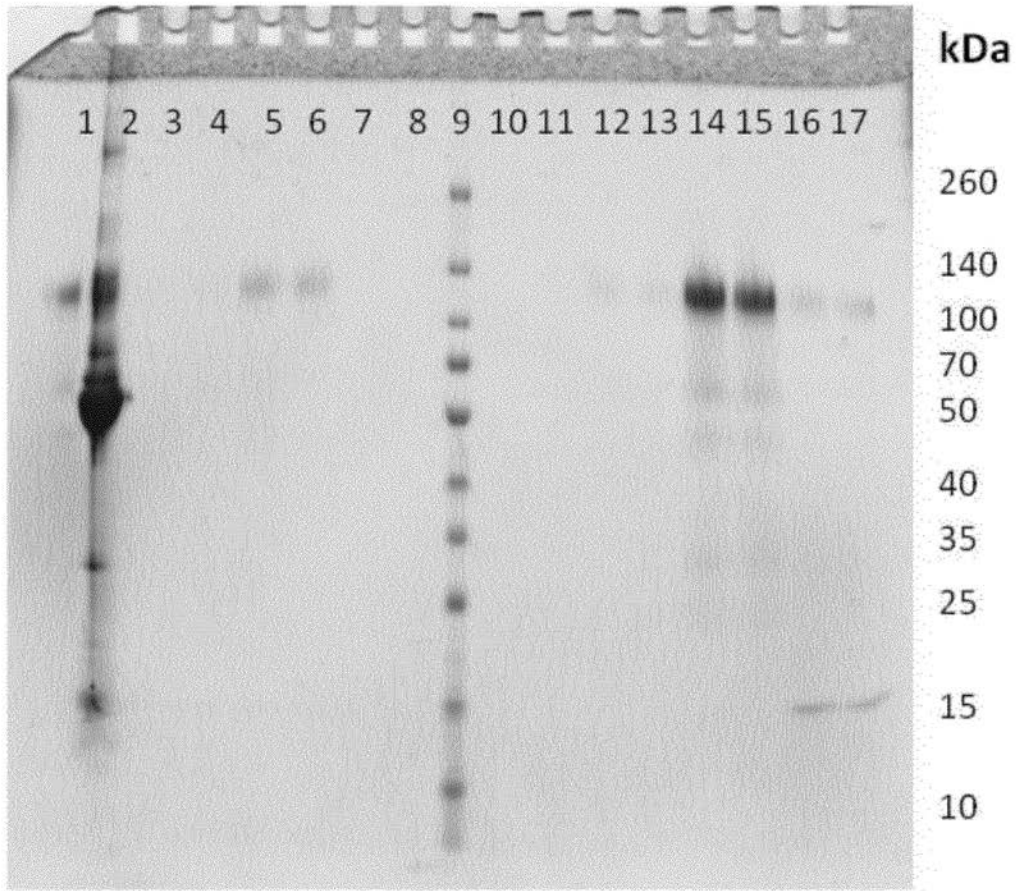


図13

【 図 1 4 】

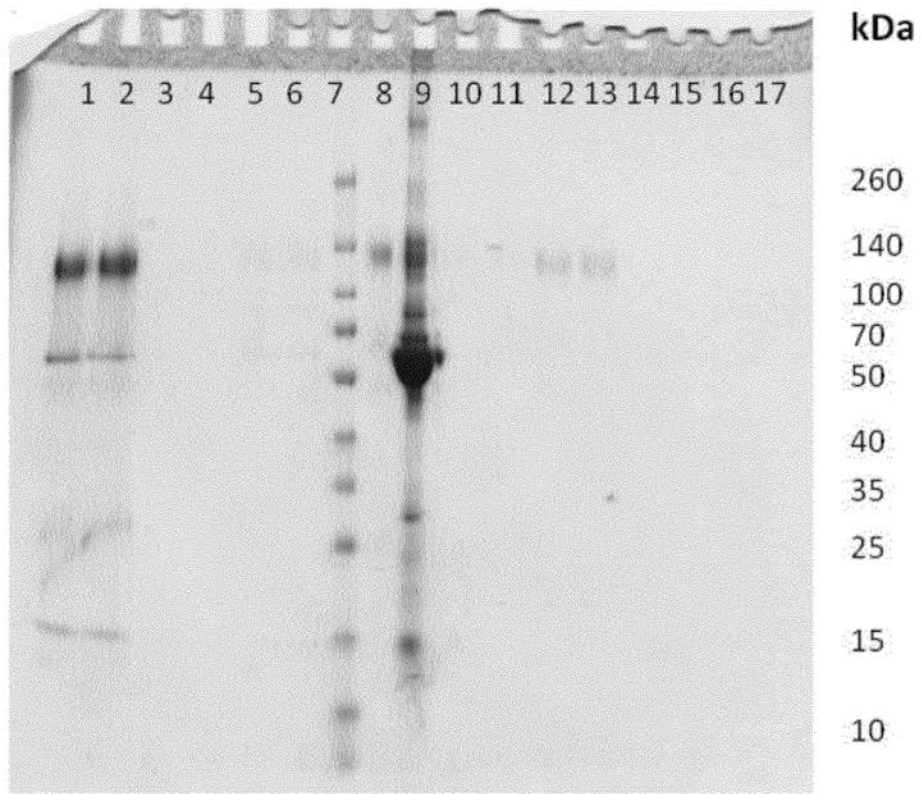


図 14

【 図 15 】

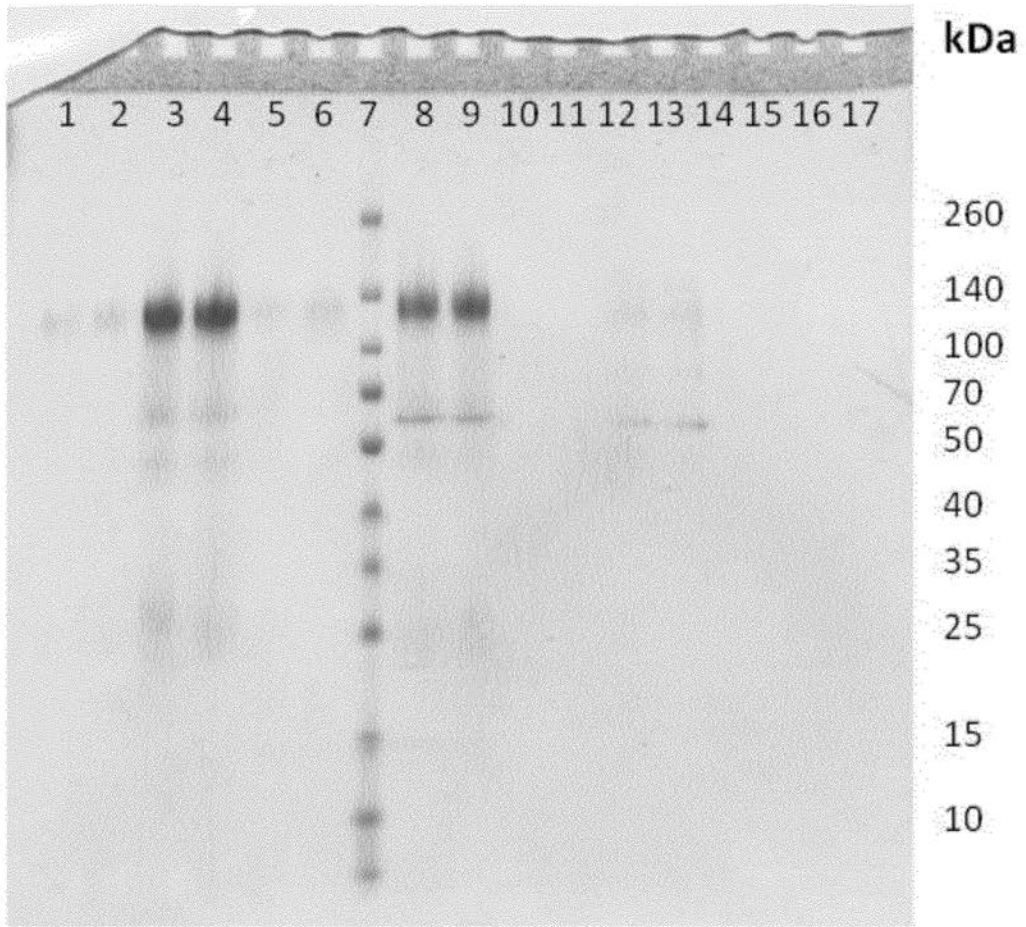


図15

【 図 16 】

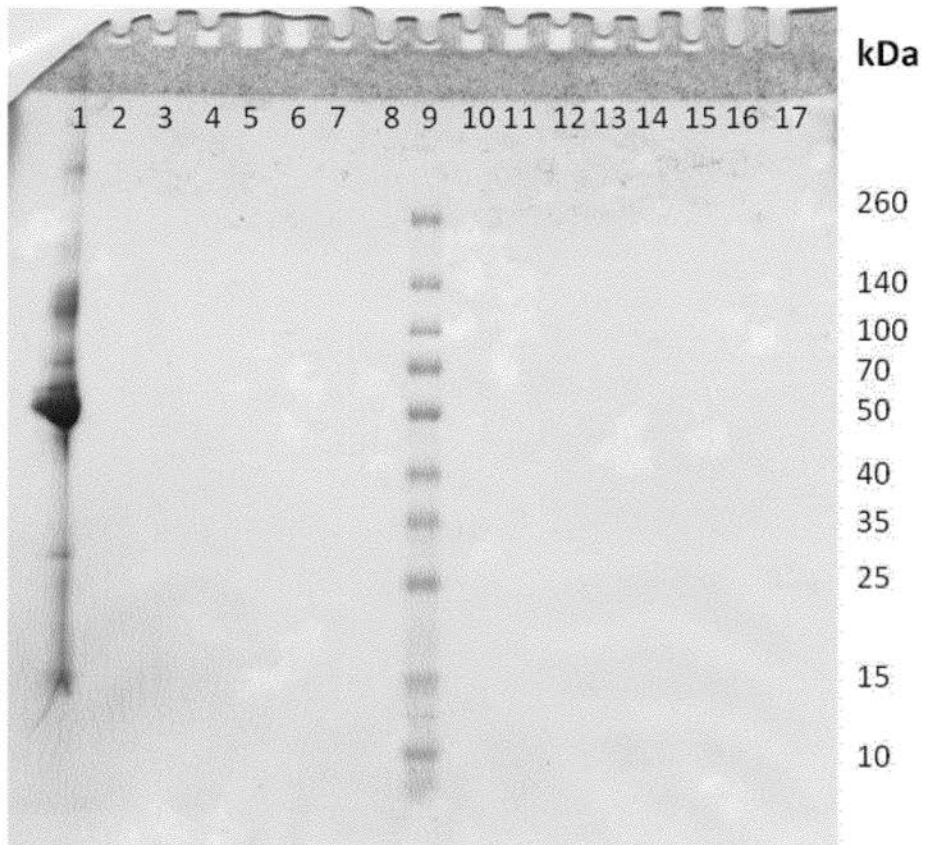


Fig 16

【 図 17 】

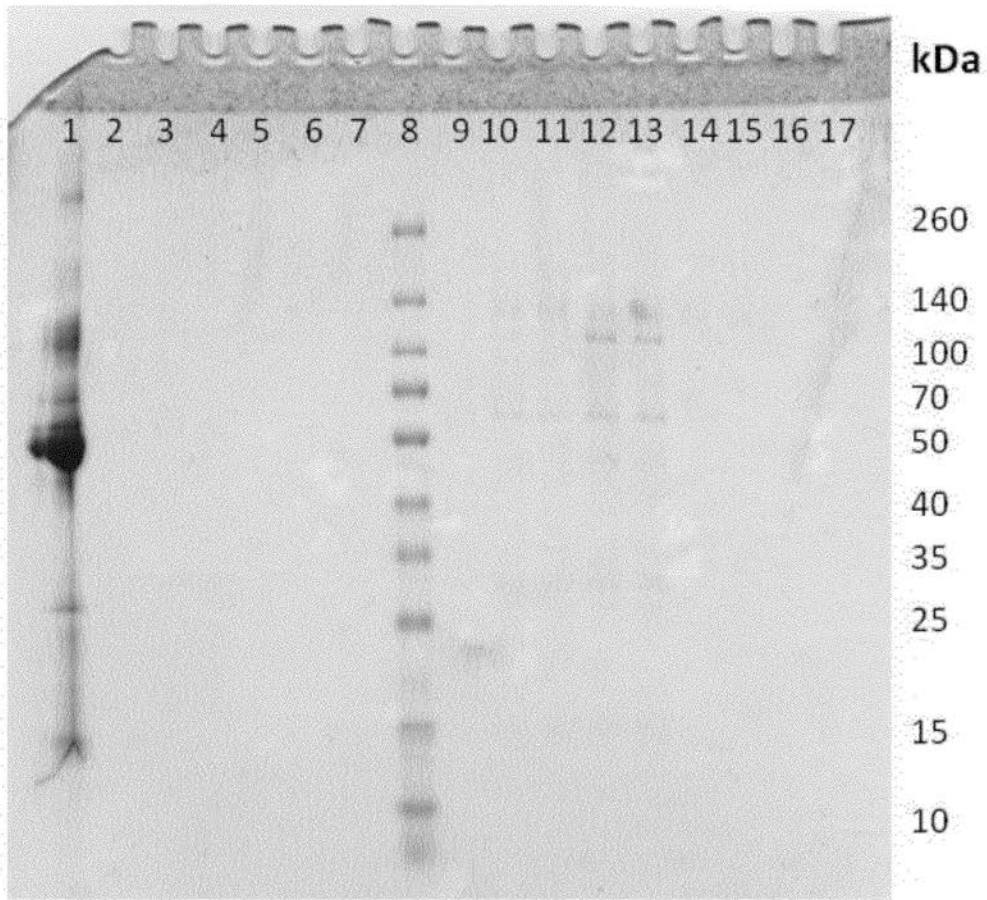


図17

【 図 18 】

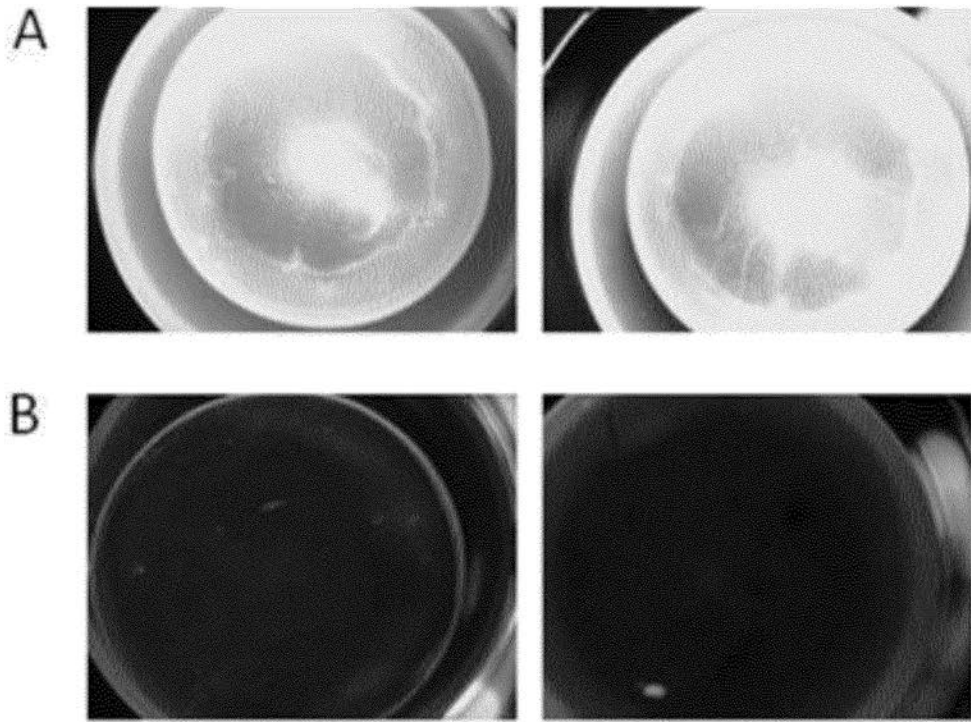


図18

【 図 2 3 】

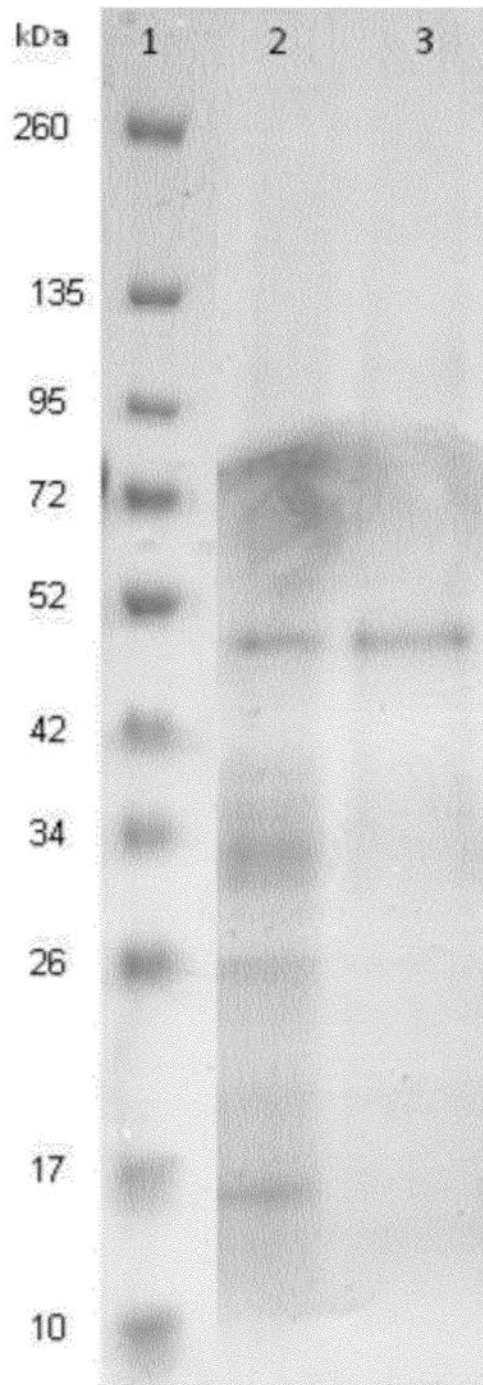


図23

【 図 28 】

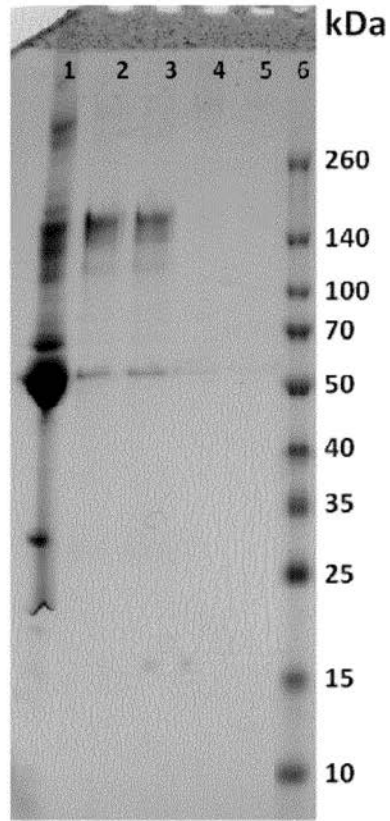


図28

【 図 29 】

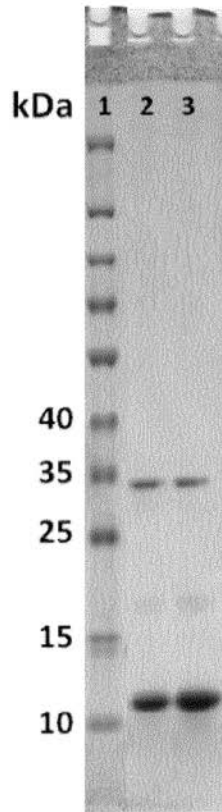


図29

【 図 30 】

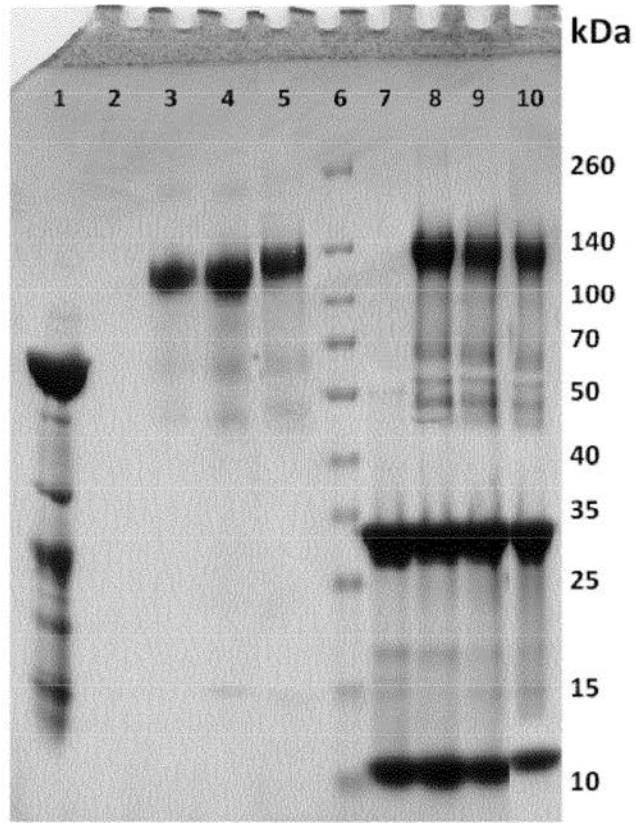


図30

【 図 3 1 】

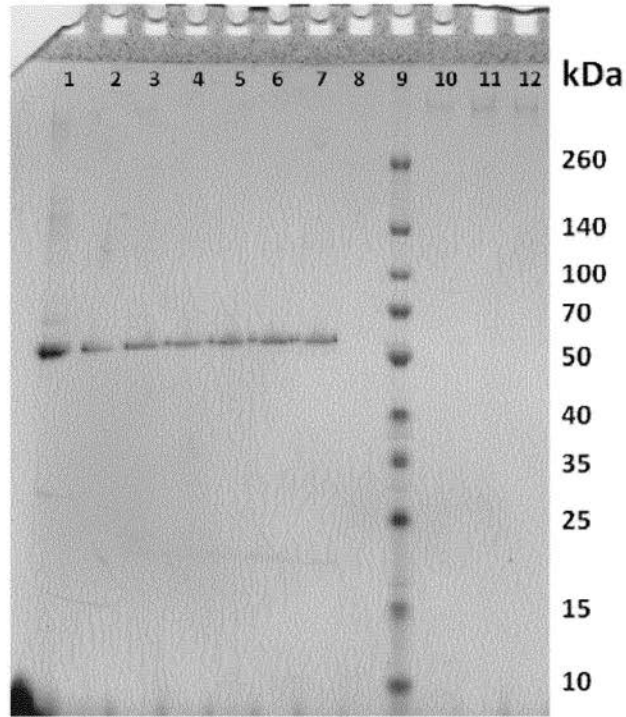


図31

【 図 3 2 】

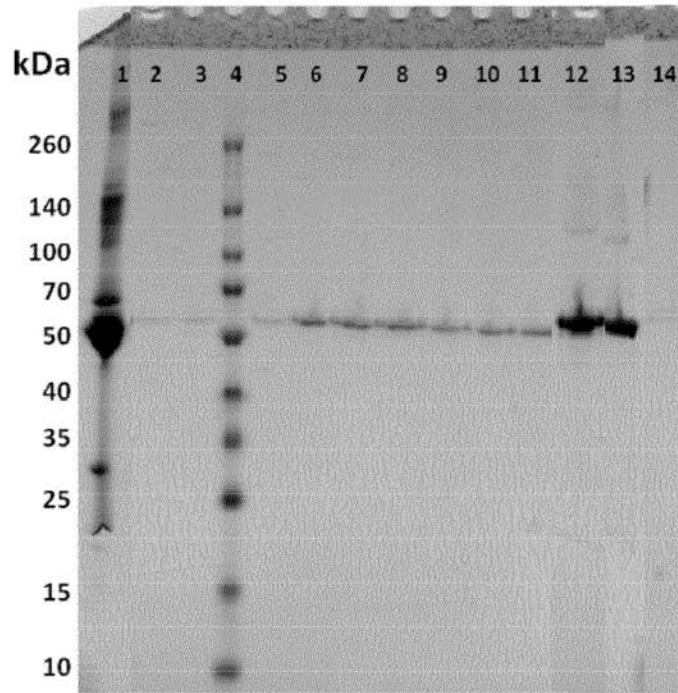


図32

【 図 3 3 】

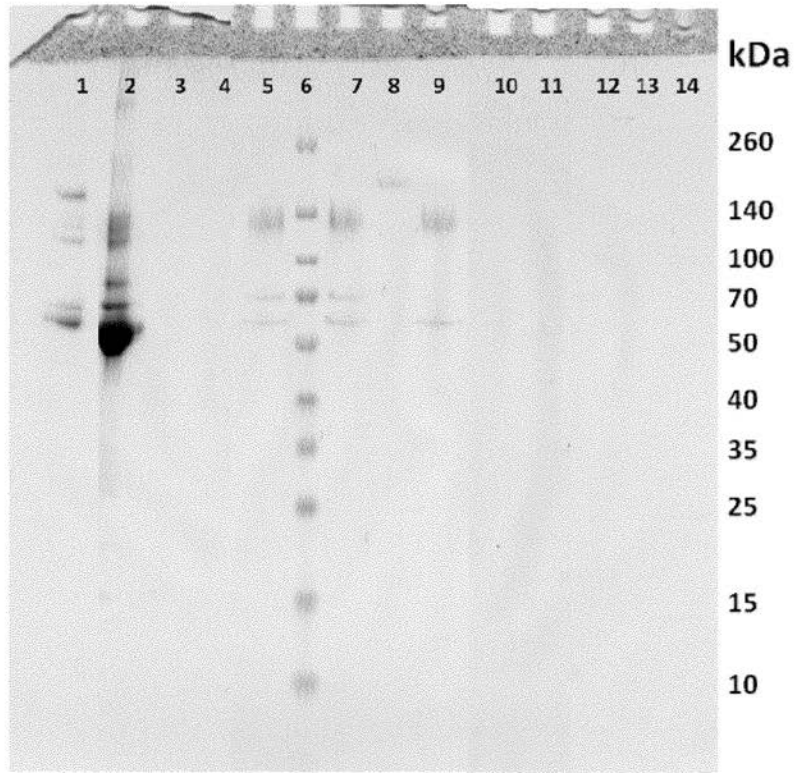


図33

【図 3 4】

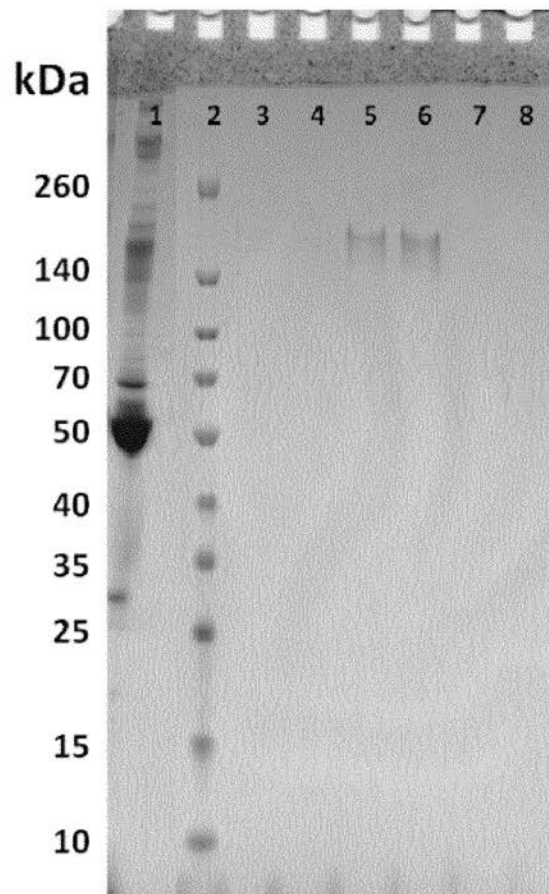


図34

【配列表】

2013544508000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年12月14日(2012.12.14)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I g G の結晶化可能断片 (F c) 領域及び I g G 又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される有機ターゲットと選択的相互作用が可能なタンパク質構造であって、前記タンパク質構造が、反復構造単位として、有機ターゲットと選択的相互作用が可能である、部分 B、R E P 及び C T を含む組換え融合タンパク質を含むポリマーであり、該ポリマーが 1 0 0 を超える融合タンパク質構造単位を含んでおり、

B は 3 0 アミノ酸残基を超える非スピドロイン部分であり、有機ターゲットとの相互作用の能力を提供し、B 部分が、ブドウ球菌プロテイン A の Z ドメイン、ブドウ球菌プロテイン A 及びその E、D、A、B 及び C ドメイン；及びこれらのアミノ酸配列の何れかに対して少なくとも 7 0 % の同一性を有するタンパク質断片から選択され；

REP及びCT部分がポリマーを形成する能力を提供し；

REPは、 $L(A G)_n L$ 、 $L(A G)_n A L$ 、 $L(G A)_n L$ 、 $L(G A)_n G L$ からなる群から選択される、70から300アミノ酸残基の部分であり、

nは2から10の整数であり；

各個々のAセグメントは8から18アミノ酸残基のアミノ酸配列であり、アミノ酸残基の0から3はAlaではなく、残りのアミノ酸残基がAlaであり；

各個々のGセグメントは12から30アミノ酸残基のアミノ酸配列であり、少なくとも40%のアミノ酸残基がGlyであり；及び

各個々のLセグメントは、0から20アミノ酸残基のリンカーアミノ酸配列であり；及び

CTが70から120アミノ酸残基の部分であり、配列番号9に少なくとも50%の同一性、又は配列番号7に少なくとも80%の同一性を有するタンパク質構造。

【請求項2】

B部分が、ブドウ球菌プロテインAのZドメイン、ブドウ球菌プロテインAのBドメイン、及びこれらのアミノ酸配列の何れかに対して少なくとも70%の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される、請求項1に記載のタンパク質構造。

【請求項3】

B部分が、ブドウ球菌プロテインAのZドメイン、及びブドウ球菌プロテインAのZドメインに対して少なくとも70%の同一性を有するタンパク質断片からなる群から選択される、請求項2に記載のタンパク質構造。

【請求項4】

B部分が、ブドウ球菌プロテインAのZドメインである、請求項3に記載のタンパク質構造。

【請求項5】

前記組換え融合タンパク質が式

$B_x - REP - B_y - CT - B_z$ 及び $B_x - CT - B_y - REP - B_z$ により定められるタンパク質の群から選択され、

x、y及びzは0から5の整数であり；

かつ $x + y + z = 1$ である請求項4に記載のタンパク質構造。

【請求項6】

前記組換え融合タンパク質が式

$B_x - REP - CT$ 、 $B_x - CT - REP$ 、 $REP - CT - B_z$ 及び $CT - REP - B_z$ により定められるタンパク質の群から選択され、

x及びzは1から5の整数である、請求項5に記載のタンパク質構造。

【請求項7】

前記組換え融合タンパク質が式

$B - REP - CT$ 、 $B - CT - REP$ 、 $REP - CT - B$ 及び $CT - REP - B$ により定められるタンパク質の群から選択される、請求項6に記載のタンパク質構造。

【請求項8】

B部分が、配列番号6から10の何れかに対して30%未満の同一性を有する、請求項1から7の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項9】

前記タンパク質構造が少なくとも2次元で少なくとも $0.1 \mu m$ の大きさを有する、請求項1から8の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項10】

前記タンパク質構造が、繊維、薄膜、発泡体、網、メッシュ、球及びカプセルからなる群から選択される物理的形態である、請求項1から9の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項11】

CT部分が、配列番号9に対して少なくとも50%の同一性と配列番号7に対して少なくとも80%の同一性を有する、請求項1から10の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項 1 2】

C T 部分が、配列番号 7 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する、請求項 1 から 1 0 の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項 1 3】

C T 部分が配列番号 7 である、請求項 1 2 に記載のタンパク質構造。

【請求項 1 4】

融合タンパク質が、配列番号 1 4、及び配列番号 1 4 に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有するタンパク質からなる群から選択される、請求項 1 から 1 3 の何れかに記載のタンパク質構造。

【請求項 1 5】

(a) 請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質を提供し；

(b) 融合タンパク質を、組換え融合タンパク質を含むポリマーの形成を達成するための条件にさらす工程を含み、I g G の結晶化可能断片 (F c) 領域及び I g G 又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される有機ターゲットに対する結合活性を示す、請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載のタンパク質構造を提供するための方法。

【請求項 1 6】

I g G の結晶化可能断片 (F c) 領域及び I g G 又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される有機ターゲットの固定化のための親和性培地であって、該親和性培地が請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載の融合タンパク質を含み、B 部分が、有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である親和性培地。

【請求項 1 7】

前記親和性培地が請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載のタンパク質構造を含み、該タンパク質構造が組換え融合タンパク質を含むポリマーである、請求項 1 6 に記載の親和性培地。

【請求項 1 8】

前記有機ターゲットを更に含み、B 部分が前記有機ターゲットと選択的相互作用が可能であり該有機ターゲットに結合する、請求項 1 6 又は 1 7 の何れか一項に記載される親和性培地。

【請求項 1 9】

前記有機ターゲットが第二有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、請求項 1 8 に記載の親和性培地。

【請求項 2 0】

前記タンパク質構造が薄膜の物理的形態である、請求項 1 7 から 1 9 の何れか一項に記載の親和性培地。

【請求項 2 1】

細胞表面に存在する有機ターゲットを有する細胞の培養のための細胞足場材料であって、前記細胞足場材料が請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載のタンパク質構造を含み、前記細胞足場材料が、I g G の結晶化可能断片 (F c) 領域及び I g G 又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される中間体有機ターゲットを更に含み、B 部分が、前記中間体有機ターゲットとの選択的相互作用が可能であり前記中間体有機ターゲットに結合し、前記中間体有機ターゲットが細胞表面に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である細胞足場材料。

【請求項 2 2】

前記タンパク質構造が薄膜の物理的形態である、請求項 2 1 に記載の細胞足場材料。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 又は 2 2 の何れか一項に記載の細胞足場材料と細胞との組み合わせ。

【請求項 2 4】

サンプルからの I g G の結晶化可能断片 (F c) 領域及び I g G 又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される有機ターゲットの分離における請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載のタンパク質構造の使用。

【請求項 2 5】

細胞の培養における請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載のタンパク質構造の使用。

【請求項 2 6】

有機ターゲットを含むサンプルを提供し；

前記親和性培地が有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、請求項 1 6 から 2 0 の何れか一項に記載の親和性培地を提供し；

前記親和性培地を、親和性培地と有機ターゲット間の結合を達成するのに適した条件下で前記サンプルと接触させ；及び

非結合サンプルを除去する工程を含む、サンプルからの I g G の結晶化可能断片 (F c) 領域及び I g G 又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される有機ターゲットの分離のための方法。

【請求項 2 7】

第一有機ターゲットと第二有機ターゲット間の結合を達成するために適した条件下で、第一の有機ターゲットとの選択的相互作用が可能である、第二の有機ターゲットと、前記親和性培地及び固定化有機ターゲットを接触させる工程を更に含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

親和性培地と有機ターゲット間の結合を達成するために前記親和性培地と前記サンプルを接触させると、親和性培地中の融合タンパク質が、請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載のタンパク質構造として存在する、請求項 2 6 又は 2 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

親和性培地と有機ターゲットの間の結合を達成するために前記親和性培地と前記サンプルを接触させると、親和性培地中の融合タンパク質が溶解して存在し、有機ターゲットに結合した融合タンパク質の複合体に、請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載の融合タンパク質構造を形成させる、請求項 2 6 又は 2 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記親和性培地上で固定化ターゲットの存在を検出し、かつ任意で定量する工程を更に含む、請求項 2 6 から 2 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記親和性培地から有機ターゲットを放出し、及び回収する工程を更に含む、請求項 2 6 から 3 0 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

化学的処理及び / 又は滅菌加熱処理により親和性培地を再生する最終工程を更に含む、請求項 2 6 から 3 1 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

化学的処理が N a O H 及び / 又は尿素による処理を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

目的の細胞を含むサンプルを提供し；

前記サンプルを請求項 2 1 又は 2 2 の何れか一項に記載の細胞足場材料に適用し、前記細胞足場材料が細胞表面に存在する有機ターゲットとの選択的相互作用が可能であり；

前記細胞を、細胞表面の有機ターゲットと前記細胞足場材料との間の結合により、前記細胞足場材料に対して固定化させることを含む、細胞を固定化するための方法。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 に記載の細胞足場材料に目的の細胞を固定化し

それに適用された細胞を有する前記細胞足場材料を細胞培養に適した条件下で維持することを含む、細胞を培養するための方法。

【請求項 3 6】

前記タンパク質構造が薄膜、繊維又は発泡体の物理的形態である、請求項 2 6 から 3 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

配列番号 1 4 からなる組換え融合タンパク質。

【請求項 3 8】

請求項 3 7 に記載の融合タンパク質及び配列番号 1 5 をコードする核酸からなる群から選択される、単離されたポリ核酸。

【請求項 3 9】

a) 適切な宿主において、請求項 3 7 に記載の融合タンパク質を発現し：及び

b) 融合タンパク質を含む混合物を得て、任意で融合タンパク質を単離する工程を含む、融合タンパク質を生産する方法。

【請求項 4 0】

タンパク質構造が組換え融合タンパク質を含むポリマーであり、I g G の結晶化可能断片 (F c) 領域及び I g G 又はその誘導体を含む分子からなる群から選択される有機ターゲットと選択的相互作用が可能な該タンパク質構造の生成のための、請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載の組換え融合タンパク質の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/068626

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K14/435 C07K16/06 B01D15/38 A61K47/48 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K B01D A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/261479 A1 (HOFFMANN CHRISTIAN [US] ET AL) 24 November 2005 (2005-11-24) paragraphs [0006], [0073], [0080]; claim 5	1-59
Y	----- WO 2007/078239 A2 (JOHANSSON JAN [SE]; HJAELM GOERAN [SE]; STARK MARGARETA [SE]; RISING A) 12 July 2007 (2007-07-12) page 7, lines 22-29 page 27, lines 6-23; sequence 2 ----- -/--	3-59
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 December 2011		Date of mailing of the international search report 31/01/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Petri, Bernhard

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/068626

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ANNA RISING ET AL: "Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications", CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, vol. 68, no. 2, 29 July 2010 (2010-07-29), pages 169-184, XP019871087, BIRKHÄUSER-VERLAG, BA ISSN: 1420-9071, DOI: DOI:10.1007/S00018-010-0462-Z page 180, left-hand column, paragraph 2nd -----</p>	3-59
Y	<p>WIDHE M ET AL: "Recombinant spider silk as matrices for cell culture", BIOMATERIALS, vol. 31, no. 36, 28 August 2010 (2010-08-28), pages 9575-9585, XP027496068, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.08.061 [retrieved on 2010-09-28] left-hand column, lines 15-19; figures 1,2, 4 page 9578, left-hand column, paragraph 3.4 page 9581, right-hand column, lines 2-3 page 9582, left-hand column, line 9 - right-hand column, line 1 page 9584, right-hand column, paragraph 4-5 -----</p>	1-59
A	<p>KRISTINA SPIESS ET AL: "Recombinant Spider Silk Proteins for Applications in Biomaterials", MACROMOLECULAR BIOSCIENCE, vol. 10, no. 9, 9 September 2010 (2010-09-09), pages 998-1007, XP055015288, ISSN: 1616-5187, DOI: 10.1002/mabi.201000071 left-hand column, line 3 - right-hand column, line 4 -----</p>	1-59
Y	<p>EP 2 157 099 A1 (MILLIPORE CORP [US]) 24 February 2010 (2010-02-24) paragraphs [0080] - [0082]; claims 14-15 ----- -/--</p>	1-59

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/068626

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>Anonymous: "Antibody Purification Handbook", GE Healthcare</p> <p>2007, page 162PP, XP002666277, Retrieved from the Internet: URL: http://www.gelifescience.com/aptrix/up/p00919.nsf/Content/5D52FF61B5C78FE3C1257628001CD404/\$file/18103746AD.pdf [retrieved on 2011-12-21] page 43 - page 104</p> <p>-----</p>	1-59
A	<p>XIAOQIN WANG ET AL: "Functionalization of Silk Fibroin with NeutrAvidin and Biotin", MACROMOLECULAR BIOSCIENCE, vol. 11, no. 1, 7 September 2010 (2010-09-07), pages 100-110, XP055015323, ISSN: 1616-5187, DOI: 10.1002/mabi.201000173 right-hand column, paragraph 3</p> <p>-----</p>	1-59
A	<p>KRISTINA SPIESS, STEFANIE WOHLRAB AND THOMAS SCHEIBEL: "Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films", SOFT MATTER, vol. 6, 6 July 2010 (2010-07-06), pages 4168-4174, XP009155077, DOI: 10.1039/B927267D page 4169, left-hand column, paragraph 2 figures 7-8</p> <p>-----</p>	1-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/068626

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005261479	A1	24-11-2005	NONE

WO 2007078239	A2	12-07-2007	AU 2006333611 A1 12-07-2007
			CA 2635660 A1 12-07-2007
			CN 101395178 A 25-03-2009
			EP 1976868 A2 08-10-2008
			JP 2009521921 A 11-06-2009
			US 2009226969 A1 10-09-2009
			WO 2007078239 A2 12-07-2007

EP 2157099	A1	24-02-2010	CN 101704879 A 12-05-2010
			EP 2157099 A1 24-02-2010
			JP 2010075175 A 08-04-2010
			SG 159458 A1 30-03-2010
			US 2010063256 A1 11-03-2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)			C 1 2 P 21/02			C
G 0 1 N 33/53 (2006.01)			G 0 1 N 33/53			Z
G 0 1 N 33/566 (2006.01)			G 0 1 N 33/566			
G 0 1 N 33/531 (2006.01)			G 0 1 N 33/531			A

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

(72)発明者 ヨハンソン, ヤーン
スウェーデン国 ストックホルム エス - 1 1 6 3 1, レンシエルナス ガータ 4 0

(72)発明者 ライジング, アンナ
スウェーデン国 ウプサラ エス - 7 5 6 5 1, ドッピンヴェーゲン 1 2

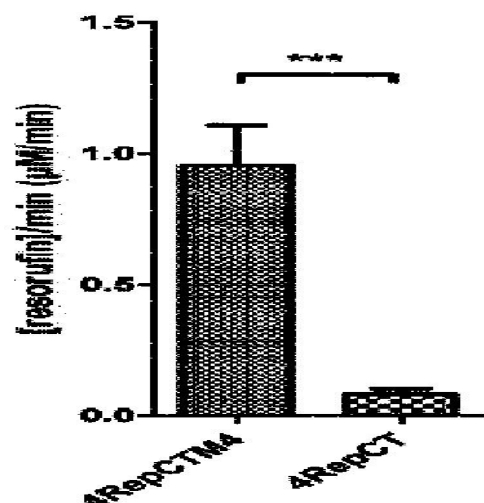
(72)発明者 ニーグレン, ペル - オーケ
スウェーデン国 エーケレー エス - 1 7 8 4 0, シンゲルグレン 3 6

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA01 CA07 CA09 CA11 CA20 DA06 EA04 GA11
HA01 HA11
4B064 AG01 CA02 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA53Y AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44 CA46
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 BA42 CA40 EA60 FA74

专利名称(译)	蜘蛛融合蛋白结构与有机靶结合		
公开(公告)号	JP2013544508A	公开(公告)日	2013-12-19
申请号	JP2013535399	申请日	2011-10-25
申请(专利权)人(译)	Supaiba技术安倍晋三		
[标]发明人	ヘドハンマルミュー ヨハンソンヤーン ライジングアンナ ニーグレンベルオーケ		
发明人	ヘドハンマル, ミュー ヨハンソン, ヤーン ライジング, アンナ ニーグレン, ベル-オーケ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C07K14/31 C12N5/071 C12N5/07 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/531		
CPC分类号	B01D15/20 B01D15/3809 B01D15/3823 B01J20/281 C07D495/04 C07K14/31 C07K14/43518 C07K16/065 C07K2319/21 C07K2319/22 C07K2319/70 C07K2319/705 C12N2533/92 Y10S210/905 B01J20/28 B01D15/3804 C07K14/76 C07K2319/01 C12N5/0068 C12N2533/50		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K19/00 C07K14/31 C12N5/00.202.A C12N5/00.202.Z C12P21/02.C G01N33/53.Z G01N33/566 G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA53Y 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA42 4H045/CA40 4H045/EA60 4H045/FA74		
优先权	2010189059 2010-10-27 EP		
其他公开文献	JP6057904B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供蛋白质结构，其允许与有机靶标的选择性相互作用。蛋白质结构是包含能够与有机靶标选择性相互作用的重组融合蛋白作为重复结构单元的聚合物。融合蛋白含有B部分，REP和CT，以及任选的NT。B是非多吡啶部分，其超过30个氨基酸残基并提供选择性地与有机靶相互作用的能力。REP是由蜘蛛丝蛋白的重复片段衍生的70至300个氨基酸残基组成的部分。CT由70至120个氨基酸残基组成，衍生自蜘蛛丝蛋白的C末端片段。NT是由蜘蛛丝蛋白的N-末端片段衍生的100-160个氨基酸残基组成的任意部分。融合蛋白及其蛋白质结构可用作亲和介质和细胞支架材料。



Fig