

(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2019-525889

(P2019-525889A)

(43) 公表日 令和1年9月12日 (2019.9.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 17/00 (2006.01)	CO7K 17/00 ZNA	4H045
GO1N 33/531 (2006.01)	GO1N 33/531 Z	
CO7K 14/395 (2006.01)	CO7K 14/395	
CO7K 1/22 (2006.01)	CO7K 1/22	
CO7K 19/00 (2006.01)	CO7K 19/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-560003 (P2018-560003)
 (86) (22) 出願日 平成29年5月8日 (2017.5.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年12月13日 (2018.12.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2017/050461
 (87) 国際公開番号 W02017/200461
 (87) 国際公開日 平成29年11月23日 (2017.11.23)
 (31) 優先権主張番号 1650661-0
 (32) 優先日 平成28年5月17日 (2016.5.17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 スウェーデン (SE)

(71) 出願人 518397434
 ハード, トーレイフ
 スウェーデン国, エスイー-753 17
 ウプサラ, サガルガータン 8 シー
 (71) 出願人 518397445
 サンドグレン, マツ
 スウェーデン国, エスイー-756 55
 ウプサラ, ラベニウスヴァーゲン 20
 (71) 出願人 518397456
 シュムック, ベンジャミン
 スウェーデン国, エスイー-754 28
 ウプサラ, カリン ボイエガータン 6
 イー
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体結合性ナノフィブリル

(57) 【要約】

本実施形態は、1 : 0.20 ~ 1 : 0.90 の範囲内で選択されたモル比での担体タンパク質と担体-Z融合タンパク質のc o-フィブリル化により得ることができる抗体結合性ナノフィブリルに関する。この抗体結合性ナノフィブリルは、非常に高い抗体結合能を有し、それにより抗体の精製、および医療現場または実験室診断の用途におけるバイオマーカの検出等の、様々な用途で利用できる。

【選択図】 図6

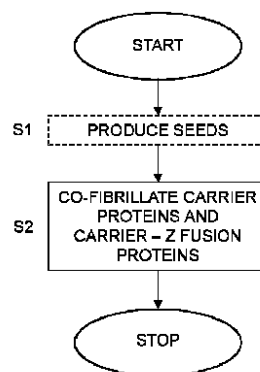


Fig. 6

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 : 0 . 2 0 ~ 1 : 0 . 9 0 の範囲内で選択されるモル比での担体タンパク質と担体-Z 融合タンパク質の c o - フィブリル化により得ることができる抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 2】

1 : 0 . 2 0 ~ 1 : 0 . 9 0 の範囲内で選択されるモル比で前記担体タンパク質および前記担体-Z 融合タンパク質を含む請求項 1 に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 3】

前記モル比が、1 : 0 . 3 0 ~ 1 : 0 . 9 0 の範囲内、好ましくは 1 : 0 . 3 0 ~ 1 : 0 . 7 0 の範囲内、かつより好ましくは 1 : 0 . 3 0 ~ 1 : 0 . 5 0 の範囲内で選択される、請求項 1 または 2 に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 4】

前記キャリアタンパク質が、S u p 3 5 キャリアタンパク質であり、かつ前記キャリア-Z 融合タンパク質が、S u p 3 5 - Z 融合タンパク質である、請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 5】

前記 S u p 3 5 キャリアタンパク質が、サッカロマイセス・セレビスエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) 真核生物翻訳放出因子 S u p 3 5 の N 末端断片であり、かつ前記 S u p 3 5 - Z 融合タンパク質が、S . セレビスエ真核生物翻訳放出因子 S u p 3 5 の前記 N 末端断片と少なくとも 1 つの Z ドメインとの融合タンパク質である、請求項 4 に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 6】

前記 N 末端断片が、S . セレビスエ真核生物翻訳放出因子 S u p 3 5 のアミノ酸番号 1 ~ 6 1 からなる、請求項 5 に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 7】

前記モル比が、1 : 0 . 3 0 ~ 1 : 0 . 4 0 の範囲内、好ましくは 1 : 0 . 3 0 ~ 1 : 0 . 3 5 の範囲内で選択され、かつより好ましくは約 1 : 0 . 3 3 に等しい、請求項 4 ~ 6 の何れか 1 項に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 8】

前記担体タンパク質が、U r e 2 担体タンパク質であり、かつ前記担体-Z 融合タンパク質が、U r e 2 - Z 融合タンパク質である、請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 9】

前記 U r e 2 担体タンパク質が、サッカロマイセス・セレビスエ・セレビスエウレイドコハク酸輸送タンパク質の N 末端断片であり、かつ前記 U r e 2 - Z 融合タンパク質が、S . セレビスエ・ウレイドコハク酸輸送タンパク質の前記 N 末端断片と少なくとも 1 つの Z ドメインとの融合タンパク質である、請求項 8 に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 10】

前記 N 末端フラグメントが、S . セレビスエ・ウレイドコハク酸輸送タンパク質のアミノ酸番号 1 ~ 8 0 からなる、請求項 8 に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 11】

前記モル比が、1 : 0 . 4 5 ~ 1 : 0 . 5 5 の範囲内、好ましくは 1 : 0 . 4 7 ~ 1 : 0 . 5 1 の範囲内で選択され、かつより好ましくは約 1 : 0 . 4 9 に等しい、請求項 8 ~ 1 0 の何れか 1 項に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 12】

前記担体-Z 融合タンパク質が、前記担体タンパク質とプロテイン A の免疫グロブリン G (I g G) 結合ドメインとの間の融合タンパク質である、請求項 1 ~ 1 1 の何れか 1 項に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記担体－Z融合タンパク質が、担体－Z二量体融合タンパク質である、請求項1～12の何れか1項に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項14】

前記抗体結合性ナノフィブリルが、免疫グロブリンG（IgG）を結合できる、請求項1～13の何れか1項に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項15】

前記抗体結合性ナノフィブリルが、ナノフィブリル1mg当たり少なくとも1.5mgの免疫グロブリンG（IgG）、好ましくはナノフィブリル1mg当たり少なくとも1.6mgのIgG、より好ましくは1mgのナノフィブリル当たり少なくとも1.7mgのIgG、ナノフィブリル1mg当たり少なくとも1.8mgのIgGなどの結合能を有する、請求項1～14の何れか1項に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

10

【請求項16】

担体－Z融合タンパク質の少なくとも1つのZドメインに結合される少なくとも1つの抗体を含む、請求項1～15の何れか1項に記載の抗体結合性ナノフィブリル。

【請求項17】

サンプル中の化学物質の存在を検出するためのキットであって、
請求項1～15の何れか1項に記載の抗体結合性ナノフィブリルと、
前記サンプル中の前記化学物質に特異的に結合する抗体とを含み、
前記抗体結合性ナノフィブリルの担体－Z融合タンパク質が、前記抗体に結合できる、
キット。

20

【請求項18】

固体表面上に固定化された請求項1～15の何れか1項に記載の抗体結合性ナノフィブリルを含む抗体捕捉装置。

【請求項19】

抗体結合性ナノフィブリルを製造する方法であって、前記抗体結合性ナノフィブリルを形成するために1：0.20～1：0.90の範囲内において選択されるモル比で担体担体タンパク質及び担体－Z融合タンパク質をc o－フィブリル化すること（S2）を含む、方法。

【請求項20】

水溶液中で担体タンパク質を超音波処理することによりタネを製造すること（S1）を更に含む、請求項19に記載の方法であって、前記担体タンパク質と前記担体－Z融合タンパク質をc o－フィブリル化すること（S2）が、前記モル比での前記担体タンパク質及び前記担体－Z融合タンパク質と共に前記タネをインキュベート（S2）して前記抗体結合性ナノフィブリルを形成することを含む、方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本実施形態は一般に、ナノフィブリルに関し、特に抗体結合性ナノフィブリルに関する。

40

【背景技術】

【0002】

材料の特性がサブμmスケールで実質的に変化するという認識が、ナノテクノロジーの出現の誘因となった。例えば、100nm未満の直径を有する繊維またはフィブリルはそれらの巨視的対応物よりも、表面積／体積比、種々の機能および機械的特性において優れている。ナノフィブリルは、炭素、アクリルニトリル、シリコンなどの多種多様な材料から、またはセルロース、キチンおよびタンパク質などの生物起源の分子から合成することができる。

【0003】

秩序だったナノフィブリルまたはナノ繊維へのタンパク質のアセンブリ（フィブリル化

50

）の性質は、非常に複雑である。そのため、フィブリル化の詳細を解明するため、およびナノフィブリルの分子構造を理解するために相当な努力が行われてきた。これらの研究は、機能的凝集体の構築及びアミロイド疾患の遺伝をカバーする生命科学の、不可欠な側面に対する洞察を提供することを意図している。成熟したフィブリルは架橋β型構造を有し、これは極めて硬質であり且つ並外れた物理的および化学的安定性を示す。この事実が架橋β線維を、全ての種類のバイオテクノロジー応用を探求するための標的にする。この文脈において、別の有用な特性は、タンパク質の再折畳みおよびナノフィブリルアセンブリが自己伝播性であることであり、これは、時に重合と称される凝集の、連続的な制御の必要性を排除する。更に、タンパク質工学は遺伝子レベルで実施されるので、ペプチドのフィブリル化は、ナノフィブリル材料を意図した目的に応じて適合され得る。

10

【0004】

診断目的および治療のために使用される抗体についてのニーズの高まりは、それらを精製するためのコスト効率的な手段を必要とする。典型的には、抗体は、プロテインA〔例えばプロテインAセファロース（登録商標）CL4B（GEヘルスケア）〕で被覆された、架橋アガロースビーズのマトリックスに基づくアフィニティークロマトグラフィーにより精製される。プロテインAセファロース（登録商標）は抗体精製のための主力であるが、媒体の高コストに関連して、20～50mg/mLの免疫グロブリンG（IgG）の結合能が精製の律速因子である。この精製プロトコルにより提起される制約は、プロテインAを用いる必要性を回避するために、IgGの正確な生化学的特性に基づく別のクロマトグラフィー法の開発を促進してきた。結合能力を増加させることを目的とする別のアプローチは、プロテインA提示のためのマトリックスを変化させることである。例えば、ポリエステルビーズのPolyBind-Z（商標）（PolyBatics製）は、排出された媒質1g当たり100ミリグラムの結合能力を生じることが示された。

20

【0005】

二官能性タンパク質ナノフィブリルが、プロテインGまたはメチルパラチオンヒドロラーゼ（MPH）と遺伝子的に融合された、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）由来の播種誘発性自己アセンブルSup35タンパク質を用いて製造された〔1〕。プロテインGはIgG分子に結合でき、IgG分子が特異性を有する抗原を固定化したプレート上にナノフィブリルを固定するために使用された。この免疫アッセイは、従来の酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）と比較して、ベスト菌F1抗原の検出に適用した場合に100倍の感度増強をもたらした。

30

【0006】

タンパク質ナノフィブリルは、Sup35蛋白質およびヒトLa蛋白質を用いて製造された〔26〕。これらのタンパク質ナノフィブリルは、ヒトLaタンパク質の断片（アミノ酸179～364）への結合により抗SSB/La抗体を検出するために使用された。従って、タンパク質ナノフィブリルは、シェーグレン症候群のマーカーを検出するために使用できる。

【0007】

しかしながら、抗体に対して高い結合能を有し、かつ抗体を捕獲および／または精製するために用いることができる技術が必要とされている。

40

【発明の概要】

【0008】

目的は、抗体結合性ナノフィブリルを提供することである。

【0009】

特別な目的は、改善された抗体結合能を有するそのようなナノフィブリルを提供することである。

【0010】

これらのおよび他の目的は、本明細書に開示される実施形態によって満たされる。

【0011】

実施形態のある態様は、1：0.20～1：0.90の範囲内の選択されたモル比での

50

担体タンパク質及び担体－Z融合タンパク質のc o－フィブリル化により得られる抗体結合性ナノフィブリルに関する。

【0012】

実施形態の別の態様は、サンプル中の化学物質の存在を検出するためのキットに関する。キットは、上記の抗体結合性ナノフィブリル及びサンプル中の化学物質に特異的に結合する抗体を含む。上記抗体結合性ナノフィブリルの担体－Z融合タンパク質は、抗体を結合できる。

【0013】

実施形態の更なる態様は、固体表面上に固定化された上記の抗体結合性ナノフィブリルを含む抗体補足装置に関する。

10

【0014】

実施形態の更に別の態様は、抗体結合性ナノフィブリルを製造する方法に関する。この方法は、1：0.20～1：0.90の範囲内の選択されたモル比で担体タンパク質及び担体－Z融合タンパク質をc o－フィブリル化して抗体結合性ナノフィブリルを形成することを含む。

【0015】

実施形態の抗体結合性ナノフィブリル抗体は、改善された抗体結合能を有する。この改善された抗体結合能は、抗体精製に関して今日のゴールドスタンダードであるプロテインAセファロース（登録商標）アフィニティー媒体と比較して、約20倍高い。

【0016】

添付の図面と一緒に以下の説明を参照することによって、実施形態は、その更なる目的及び利点と共に最も良く理解することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】実施例において用いた非官能性及び官能性Sup35及びUre2タンパク質構築物を概略的に示す。略語TSはトロンビン切断部位を指す。

【図2-1】固定化されたSup35(1-61)-ZZ(A、E)、ZZ-Ure2(1-80)(B)、Sup35(1-61)-ZZフィブリル(C)、ZZ-Ure2(1-80)フィブリル(D)またはZ(F)とのヒトIgGの相互作用のビアコア(Biacore)センサグラムを示す。タンパク質及びフィブリルは、His₆-tagを介してNTA-chip上に固定化された。(A)リガンド：Sup35(1-61)-ZZ、アナライト：ヒトIgG5-40nM(Thermo Scientific)、(B)リガンド：ZZ-Ure2(1-80)、アナライト：ヒトIgG5-40nM、(C)リガンド：Sup35(1-61)-ZZフィブリル(官能性タンパク質：非官能性タンパク質のモル比は1：0.04)、アナライト：ヒトIgG5-40nM、(D)リガンド：ZZ-Ure2(1-80)フィブリル(非官能性タンパク質：官能性タンパク質のモル比は1：0.04)、アナライト：ヒトIgG5-40nM、(E)リガンド：Sup35(1-61)-ZZ、アナライト：ヒトIgG5-40nM(lab-精製)、(F)リガンド：Z、アナライト：ヒトIgG5-40nM。オリジナルデータは、低濃度点(塗り潰し)から高濃度点(白抜き)へと点により表される。データは、1：1結合モデル(A、B、E、F)または実線で示される2価アナライトモデル(C、D)に適合された。

30

40

【図2-2】固定化されたSup35(1-61)-ZZ(A、E)、ZZ-Ure2(1-80)(B)、Sup35(1-61)-ZZフィブリル(C)、ZZ-Ure2(1-80)フィブリル(D)またはZ(F)とのヒトIgGの相互作用のビアコア(Biacore)センサグラムを示す。タンパク質及びフィブリルは、His₆-tagを介してNTA-chip上に固定化された。(A)リガンド：Sup35(1-61)-ZZ、アナライト：ヒトIgG5-40nM(Thermo Scientific)、(B)リガンド：ZZ-Ure2(1-80)、アナライト：ヒトIgG5-40nM、(C)リガンド：Sup35(1-61)-ZZフィブリル(官能性タンパク質：非官能性

50

タンパク質のモル比は1 : 0.04)、アナライト:ヒトIgG 5-40 nM、(D) リガンド:ZZ-Ure2 (1-80) フィブリル (非官能性タンパク質:官能性タンパク質のモル比は1 : 0.04)、アナライト:ヒトIgG 5-40 nM、(E) リガンド:Sup 35 (1-61) -ZZ、アナライト:ヒトIgG 5-40 nM (lab-精製)、(F) リガンド:Z、アナライト:ヒトIgG 5-40 nM。オリジナルデータは、低濃度点 (塗り潰し) から高濃度点 (白抜き) へと点により表される。データは、1 : 1 結合モデル (A、B、E、F) または実線で示される2価アナライトモデル (C、D) に適合された。

【図2-3】固定化されたSup 35 (1-61) -ZZ (A、E)、ZZ-Ure2 (1-80) (B)、Sup 35 (1-61) -ZZ フィブリル (C)、ZZ-Ure2 (1-80) フィブリル (D) またはZ (F) とのヒトIgGの相互作用のビアコア (Biacore) センサグラムを示す。タンパク質及びフィブリルは、His₆-tagを介してNTA-chip上に固定化された。(A) リガンド:Sup 35 (1-61) -ZZ、アナライト:ヒトIgG 5-40 nM (Thermo Scientific)、(B) リガンド:ZZ-Ure2 (1-80)、アナライト:ヒトIgG 5-40 nM、(C) リガンド:Sup 35 (1-61) -ZZ フィブリル (官能性タンパク質:非官能性タンパク質のモル比は1 : 0.04)、アナライト:ヒトIgG 5-40 nM、(D) リガンド:ZZ-Ure2 (1-80) フィブリル (非官能性タンパク質:官能性タンパク質のモル比は1 : 0.04)、アナライト:ヒトIgG 5-40 nM、(E) リガンド:Sup 35 (1-61) -ZZ、アナライト:ヒトIgG 5-40 nM (lab-精製)、(F) リガンド:Z、アナライト:ヒトIgG 5-40 nM。オリジナルデータは、低濃度点 (塗り潰し) から高濃度点 (白抜き) へと点により表される。データは、1 : 1 結合モデル (A、B、E、F) または実線で示される2価アナライトモデル (C、D) に適合された。

【図3】官能性ドメインZZを表すSup 35 (1-60) (A) またはUre2 (1-80) (B) ナノフィブリルを用いた、ヒト血清からのIgGの精製を示す。(A) ヒトIgGの重鎖が50 kDaで、軽鎖が25 kDaで見られ、Sup 35 (1-61) -ZZは22 kDaで、およびSup 35 (1-61) は14 kDaで見られる。レーン1. ヒト血清、2. 遠心分離及びフィブリルとのインキュベーション後の上清、3. ウォッシュ、4. 溶出後に残る不溶性物質、5. 溶出液、6. ゲル濾過後の溶出液。7~11. ヒトIgG:0.0625~1 mg/mL (Thermo Scientific)、12. プレシジョン プラス プロテイン未着色標準 (Precision Plus Unstained Standards) (Biorad)。(B) ヒトIgGの重鎖が50 kDaで、軽鎖が25 kDaで見られ、ZZ-Ure2 (1-80) は25 kDaで、またUre2 (1-80) は18 kDaで見られる。レーン1. ヒト血清、2. 遠心分離及びフィブリルとのインキュベーション後の上清、3. ウォッシュ、4. 溶出後に残る不溶性物質、5. 溶出液、6. ゲル濾過後の溶出液、7~10. ヒトIgG、0.125~1 mg/mL (Thermo Scientific)、11. プレシジョン プラス プロテイン未着色標準 (Biorad)。

【図4-1】1 : 0.16の非官能性タンパク質:官能性タンパク質の比を有する抗体結合性フィブリルの透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像を示す。このフィブリルは、ヒトIgGで飽和され、金に結合された二次抗体で標識された。画像の指定された部分は、12.5~25倍拡大された。黒の点は、5 nmの金粒子を表す。

【図4-2】1 : 0.16の非官能性タンパク質:官能性タンパク質の比を有する抗体結合性フィブリルの透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像を示す。このフィブリルは、ヒトIgGで飽和され、金に結合された二次抗体で標識された。画像の指定された部分は、12.5~25倍拡大された。黒の点は、5 nmの金粒子を表す。

【図5-1】IgG結合パラメータに対する、co-フィブリル組成物、即ち、フィブリルドーピング頻度の影響を概略的に示す。非官能性タンパク質:官能性タンパク質についてモル比1 : 0.04~0.65 (Sup 35-co-フィブリル、A、C、E) または

1 : 0.04 ~ 0.9 (Ure2-co-フィブリル、B、D、F) をカバーする、幾つかのフィブリル型が研究された。足場タンパク質に対する融合タンパク質のモル頻度は、x 軸上で「ドーピング頻度」と呼ばれる。(A、B) ドーピング頻度の関数としての co-フィブリルの IgG 結合能。フィブリル 1 mg 当たりの極大値 1.8 mg (Sup35) 及び 1.7 mg (Ure2) が、それぞれ 1 : 0.33 及び 1 : 0.49 のモル比で達成された。(C、D) 1 つの抗体分子を結合するために必要なタンパク質の数。(E、F) 理論的な最大結合能で除した実験的に決定された IgG 結合能は、最低ドーピング頻度、即ち、0.04 および 0.08 を有するフィブリルを考慮しないならば線形減少を示す。全てのデータ点は、6 つの独立測定値からの平均値を表す。

【図 5-2】 IgG 結合パラメータに対する、co-フィブリル組成物、即ち、フィブリルドーピング頻度の影響を概略的に示す。非官能性タンパク質：官能性タンパク質についてモル比 1 : 0.04 ~ 0.65 (Sup35-co-フィブリル、A、C、E) または 1 : 0.04 ~ 0.9 (Ure2-co-フィブリル、B、D、F) をカバーする、幾つかのフィブリル型が研究された。足場タンパク質に対する融合タンパク質のモル頻度は、x 軸上で「ドーピング頻度」と呼ばれる。(A、B) ドーピング頻度の関数としての co-フィブリルの IgG 結合能。フィブリル 1 mg 当たりの極大値 1.8 mg (Sup35) 及び 1.7 mg (Ure2) が、それぞれ 1 : 0.33 及び 1 : 0.49 のモル比で達成された。(C、D) 1 つの抗体分子を結合するために必要なタンパク質の数。(E、F) 理論的な最大結合能で除した実験的に決定された IgG 結合能は、最低ドーピング頻度、即ち、0.04 および 0.08 を有するフィブリルを考慮しないならば線形減少を示す。全てのデータ点は、6 つの独立測定値からの平均値を表す。

【図 5-3】 IgG 結合パラメータに対する、co-フィブリル組成物、即ち、フィブリルドーピング頻度の影響を概略的に示す。非官能性タンパク質：官能性タンパク質についてモル比 1 : 0.04 ~ 0.65 (Sup35-co-フィブリル、A、C、E) または 1 : 0.04 ~ 0.9 (Ure2-co-フィブリル、B、D、F) をカバーする、幾つかのフィブリル型が研究された。足場タンパク質に対する融合タンパク質のモル頻度は、x 軸上で「ドーピング頻度」と呼ばれる。(A、B) ドーピング頻度の関数としての co-フィブリルの IgG 結合能。フィブリル 1 mg 当たりの極大値 1.8 mg (Sup35) 及び 1.7 mg (Ure2) が、それぞれ 1 : 0.33 及び 1 : 0.49 のモル比で達成された。(C、D) 1 つの抗体分子を結合するために必要なタンパク質の数。(E、F) 理論的な最大結合能で除した実験的に決定された IgG 結合能は、最低ドーピング頻度、即ち、0.04 および 0.08 を有するフィブリルを考慮しないならば線形減少を示す。全てのデータ点は、6 つの独立測定値からの平均値を表す。

【図 6】 一実施形態に従って抗体結合性ナノフィブリルを製造する方法を示すフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の実施形態は一般に、当該技術においてナノ繊維とも称される、ナノフィブリルに関する。特に、実施形態は、抗体を結合できる新規なナノフィブリル、即ち、抗体結合性ナノフィブリルに関する。

【0019】

実施形態の抗体結合性ナノフィブリルは、2 つのタンパク質種またはペプチド種、所謂担体タンパク質もしくはペプチドと、官能化された担体タンパク質もしくはペプチドとの co-フィブリル化、即ち、アセンブリによって得られる。担体タンパク質は、分子自己アセンブリプロセスでオリゴマーへと凝集し、更にフィブリル及び繊維へと凝集する可溶性タンパク質モノマーである。このことは、担体タンパク質が自然に、または誘導されて、担体タンパク質モノマーから出発してより長い構造へと凝集及びアセンブルし、かつオリゴマー及び更にはフィブリルへと成長することを意味する。フィブリルは一般にナノメートル範囲の直径を有し、従って、本明細書ではナノフィブリルと称される。ナノフィブリルの典型的なコア径は、とりわけ、官能化担体タンパク質における特定の担体タンパク

質及び官能基（複数可）に応じて、3～20ナノメートル内である。ナノフィブリルは、フィブリル化プロセスの間に、長さが1ミクロンまたは数ミクロンのかなり長いフィブリルへと成長し得る。ナノ繊維の微小径であるが比較的大きい長さの結果、ナノフィブリルは、優れた表面積／体積比を提示する。

【0020】

2つのタンパク質種、即ち、担体タンパク質および官能化された担体タンパク質のc oーフィブリル化は、得られるナノフィブリルが官能基を、即ち、抗体結合性の基またはドメインを含むことを意味する。

【0021】

プロテインGと遺伝子的に融合されたサッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）Sup35とMPHと遺伝的に融合されたSup35タンパク質の自己アセンブリによって得られる二官能性ナノフィブリルが当技術分野において知られている[1]。このナノフィブリルのプロテインG基はIgG分子に結合し、IgG分子が特異性を有する固定化された抗原を有するプレート上に上記ナノフィブリルを固定化するために使用された。抗体結合性ナノフィブリルは、ヒトLaタンパク質の断片と遺伝的に融合されたSup35タンパク質により得られた。[1, 26]に例示されるように抗体結合能力を有する従来技術のナノフィブリルは、しかしながら、ナノフィブリルの抗体結合能に関して最適化されていない。

【0022】

本実施形態は、向上した抗体結合能を有する抗体結合性ナノフィブリルに向けられる。この改善された抗体結合能は、担体タンパク質と官能化された担体タンパク質との間の選択された範囲のモル比を使用することによって達成される。本明細書で提示される実験データは、抗体結合能力に関する改善は、本発明のモル比の範囲内における担体タンパク質と官能化された担体タンパク質とのc oーフィブリル化によってのみ達成されることを示している。

【0023】

従って、c oーフィブリル化プロセスの際の官能化された担体タンパク質の量が非官能性担体タンパク質に比較して低すぎれば、得られる抗体結合性ナノフィブリルは、低い数の抗体結合ドメインを有し、それにより最大の抗体結合能には遥かに届かないであろう。しかしながら、非官能性担体タンパク質に対する官能化された担体タンパク質の量が本発明の範囲の上限を超えて増大すれば、得られるナノフィブリルの抗体結合能は低下する。より多い官能化ドメインを備えたナノフィブリルに見られるこの予測されなかった抗体結合能の低下は、ナノフィブリル内での立体的制限によって生じる官能化されたドメインのアクセス可能性の低下に起因するものであろう。この発見は、各担体タンパク質が官能化された[即ち、何れもが酵素ドメイン(MPH)または抗体結合性ドメイン(プロテインG)を有する]先行技術[1, 26]の抗体結合性ナノフィブリルを考慮すると、非常に驚くべきものである。

【0024】

従って、担体タンパク質と官能化された担体タンパク質とのモル比が本発明の範囲未満であれば、ナノフィブリルは僅かな抗体結合性ドメインしか提示せず、それにより、本実施形態の抗体結合性ナノフィブリルに比較して遥かに低い抗体結合能を有するであろう。これに対応して、モル比が逆に上記本発明の範囲を超えていれば、ナノフィブリルは多くの抗体結合ドメインを提示する。しかしながら、立体障害のために、実際にアクセス可能で且つ抗体を結合できる抗体結合性ドメインの数は、本実施形態の抗体結合性ドメインに比較して低いであろう。

【0025】

実施形態の一つの態様は、1:0.20～1:0.90の範囲内で選択されたモル比での担体タンパク質と担体- γ 融合タンパク質とのc oーフィブリル化により得られる、抗体結合性ナノフィブリル、即ち、ナノ繊維に関する。

【0026】

抗体結合性ナノフィブリルは従って、c o o-フィブリル化、即ち、担体タンパク質と官能化された担体タンパク質、即ち、抗体結合能を有する、担体-Z融合タンパク質のc o o-アセンブリまたはc o o-凝集により得ることができる。上記c o o-フィブリル化は、二つの異なるモノマー種が凝集し、ナノメータ範囲内の直径及び典型的なマイクロメータ領域内の長さを典型的に備えたフィブリル構造を形成することを意味する。実施形態の選択されたモノマー種のモル比は、十分に高濃度のZドメイン、即ち、抗体結合性ドメインを備えた高い抗体結合能を有するナノフィブリルの形成を導くが、そのようなZドメインの濃度は、抗体に対するZドメインのアクセス可能性を低下させるほど高くはない。

【0027】

実施形態の抗体結合性ナノフィブリルは、それによって、1:0.20~1:0.90の範囲内で選択されるモル比で上記担体タンパク質及び担体Z融合タンパク質を含む。

【0028】

ある実施形態において、抗体結合性ナノフィブリルの抗体結合性ドメイン、即ち、Zドメインは好ましくは、上記抗体結合性ナノフィブリルの全長に亘って分布される。従って、好ましい実施形態において、上記Zドメインは、抗体結合性ナノフィブリルの一部分に単に存在するだけでなく、抗体結合性ナノフィブリルの全長、または少なくともその大部分に亘って、均等に分布される。

【0029】

本明細書で使用される担体-Z融合タンパク質は、担体タンパク質モノマーまたはドメイン、即ちフィブリル化ドメインが少なくとも1つのZドメイン、即ち抗体結合性ドメイン（複数可）に融合されて、融合タンパク質を形成することを指す。ドメインの融合は好ましくは、遺伝子レベルで、即ち、上記担体タンパク質をコードするヌクレオチド配列を少なくとも1つのZドメインをコードするヌクレオチド配列と組み合わせること、または融合させることによって行われる。ヌクレオチド配列の融合は、担体-Z融合タンパク質をコードする遺伝子をもたらす。

【0030】

担体-Z融合タンパク質を得る現在の好ましい方法は、担体-Z融合タンパク質の転写制御下に担体-Z融合タンパク質をコードする遺伝子を含む、プラスミドなどの発現カセットを含む、または宿主細胞のゲノム中のプロモーターの転写制御下に担体-Z融合タンパク質をコードする遺伝子を含む宿主細胞中での、担体-Z融合タンパク質の産生である。しかしながら、実施形態はこれに限定されるものではない。例えば、別々に製造された担体タンパク質およびZドメインを化学的に連結するなどの、担体-Z融合タンパク質を生成する別の方法も可能である。

【0031】

ある実施形態において、担体タンパク質のN末端またはC末端は、担体-Z融合タンパク質中の少なくとも1つのZドメインのC末端またはN末端に直接的に連結されてよい。或いは、担体タンパク質および少なくとも1つのZドメインは、架橋またはリンカーによって相互連結され得るであろう。このようなリンカーは、Nアミノ酸の短いペプチドの形態であり得る。ある実施形態において、Nは好ましくは、3~15、好ましくは3~12、より好ましくは3~7の範囲内で選択され、例えば約5である。ある実施形態において、リンカーのアミノ酸は、グリシン（G）、アラニン（A）、スレオニン（T）、セリン（S）、フェニルアラニン（F）、グルタミン酸（E）およびリシン（K）、並びにそれらの組合せから好ましく選択される。そのようなモチーフの例は、A（E A A A K）_n A（配列番号1）であり、nは好ましくは2~5、より好ましくは2~3である。そのようなモチーフは、リンカー中にヘリックスを導入する。他のヘリックス形成モチーフが上記リンカーに使用され得るであろう。上記実施形態に従って使用できる更なるリンカーは、[2]における表3に開示されており、上記実施形態に従って使用され得る表3のリンカーモチーフに関するその教示は、本明細書の一部として本明細書に援用される。

【0032】

ある実施形態において、担体タンパク質と担体-Z融合タンパク質との間のモル比は、

好ましくは1:0.30~1:0.90、より好ましくは1:0.30~1:0.70の範囲内である。特に好ましい範囲は、1:0.30~1:0.50である（表2および表3、並びに図5Aおよび図5Bを参照されたい）。

【0033】

これらの好ましく且つより限定されたモル比範囲は、先に述べたより広い範囲と比較して、より高い抗体結合能を有するナノフィブリルをもたらす。

【0034】

ある実施形態において、担体タンパク質はSup35担体タンパク質であり、担体-Z融合タンパク質はSup35-Z融合タンパク質である。ある実施形態において、Sup35担体タンパク質は、サッカロマイセス・セレビシエ真核生物翻訳放出因子Sup35の完全アミノ酸配列、即ち685アミノ酸を含む。しかしながら、一般には、このアミノ酸配列の一部分だけ、従って上記アミノ酸配列のフィブリル化部分を使用することが好ましい。このフィブリル化部分は、Sup35タンパク質のN末端断片を構成する。簡単に言うと、Sup35タンパク質は、アミノ酸1~123に対応するフィブリル化N末端、Sup35タンパク質に可溶性を与える中間ドメイン（Mドメイン）、およびSup35タンパク質の本来の機能にとって必須であるC末端またはC末端ドメインの3つのドメインからなる。従って、ある実施形態において、Sup35担体タンパク質は、S.セレビシエ真核生物翻訳放出因子Sup35のN末端断片であるか、或いは、一般にはあまり好ましくないが、S.セレビシエ真核生物翻訳放出因子Sup35のN+Mドメインまたはドメイン断片である。Sup35-Z融合タンパク質は従って、S.セレビシエ真核生物翻訳放出因子Sup35のN末端断片と、少なくとも1つのZドメインとの融合タンパク質である。

【0035】

N末端フラグメントは従って、Sup35タンパク質の完全なアミノ酸配列の一部を構成する。特定の実施形態において、N末端フラグメントは、本明細書中でSup35（1-61）と表示される、S.セレビシエ真核生物翻訳放出因子Sup35のアミノ酸番号1~61からなる。別の実施形態において、N末端フラグメントは、S.セレビシエ真核生物翻訳放出因子Sup35のアミノ酸番号1~47からなる。更なる実施形態において、N末端フラグメントは、S.セレビシエ真核生物翻訳放出因子Sup35のアミノ酸番号1~57からなる。

【0036】

これらのSup35のN末端断片は、凝集の際にβシート構造をとり、フィブリル化過程で高度に秩序化されたクロスβ構造のナノフィブリルに自己アセンブルできる[3, 4]。

【0037】

co-フィブリル化によって得られ、好ましくはSup35（1-61）タンパク質およびSup35（1-61）-Z融合タンパク質を含む抗原結合性ナノフィブリルは、好ましくは1:0.30~1:40の範囲内のSup35（1-61）タンパク質およびSup35（1-61）-Z融合タンパク質のモル比を有する。モル比はより好ましくは、1:0.30~1:0.35の範囲内であり、例えば好ましくは約1:0.33に等しい。

【0038】

表2および図5Aに示される実験データは、担体タンパク質としてSup35、特にSup35（1-61）を使用することに関して、上記のモル比の範囲または値が好ましいことを示している。

【0039】

Sup35（1-61）-Z融合タンパク質は好ましくは、そのN末端からC末端に向かって、Sup35（1-61）タンパク質に続いて少なくとも1つのZドメインを含む。別の実施形態では、Sup35（1-61）タンパク質および少なくとも1つのZドメインの順序は交換される。Sup35（1-61）ドメインと少なくとも1つのZドメイ

ンとを相互接続する任意の架橋またはリンカーが S u p 3 5 (1 - 6 1) - Z 融合タンパク質中に存在し得る。

【0040】

別の実施形態において、担体タンパク質は U r e 2 担体タンパク質であり、担体-Z 融合タンパク質は Z-U r e 2 融合タンパク質である。ある実施形態において、U r e 2 担体タンパク質は、S. セレビスエのウレイドコハク酸輸送体タンパク質の完全なアミノ酸配列、即ち、354 アミノ酸を含む。しかしながら、一般には、アミノ酸配列の一部分のみ、従ってアミノ酸配列のフィブリル化部分を使用することが好ましい。このフィブリル化部分は、U r e 2 タンパク質のN末端断片を構成する。従って、ある実施形態において、U r e 2 担体タンパク質は、S. セレビスエ真核生物ウレイドコハク酸輸送体タンパク質のN末端断片である。従って、Z-U r e 2 融合タンパク質は、S. セレビスエ真核生物ウレイドコハク酸輸送体タンパク質のN末端断片と、少なくとも1つのZドメインとの融合タンパク質である。

10

【0041】

N末端断片は従って、U r e 2 タンパク質の完全なアミノ酸配列の一部を構成する。特定の実施形態において、N末端断片は、本明細書では U r e 2 (1 - 8 0) と表示される、S. セレビスエのウレイドコハク酸輸送体タンパク質のアミノ酸番号1~80からなる。他の特定の実施形態は、S. セレビスエのウレイドコハク酸輸送体 U r e 2 のアミノ酸番号1~93, 1~65, 1~89および10~39からなるN末端断片を使用することを含む。

20

【0042】

U r e 2 のこれらのN末端フラグメントは、フィブリル化プロセスにおいて、高度に秩序化されたクロスβ構造のナノフィブリルへと自己アセンブルできる[5]。

【0043】

c o-フィブリル化によって得られる、好ましくは U r e 2 (1 - 8 0) タンパク質および Z-U r e 2 (1 - 8 0) 融合タンパク質を含む抗原結合性ナノフィブリルは好ましくは、1:0.45~1:55の範囲内の、U r e 2 (1 - 8 0) タンパク質と Z-U r e 2 (1 - 8 0) 融合タンパク質とのモル比を有する。モル比は、より好ましくは1:0.47~1:0.51の範囲内であり、例えば好ましくは約1:0.49に等しい。

【0044】

表3および図5Bに示す実験データは、担体タンパク質として U r e 2、特に U r e 2 (1 - 8 0) を用いることに関して、上で述べたモル比の範囲または値が好ましいことを示す。

30

【0045】

Z-U r e 2 (1 - 8 0) 融合タンパク質は好ましくは、そのN末端からC末端に向かって、少なくとも1つのZドメインに続く U r e 2 (1 - 8 0) タンパク質を含む。別の実施形態では、U r e 2 (1 - 8 0) タンパク質および少なくとも1つのZドメインの順序は交換される。U r e 2 (1 - 8 0) ドメインと少なくとも1つのZドメインとを相互接続する任意の架橋またはリンカーが、Z-U r e 2 (1 - 8 0) 融合タンパク質中に存在してもよい。

40

【0046】

一般的に、実施形態は、融合タンパク質内の担体タンパク質および少なくとも1つのZドメインの任意の順序、即ち、担体質に続いて、N末端からC末端に向けて、少なくとも1つのZドメイン、または少なくとも1つのZドメインに続いて担体タンパク質を使用できる。

【0047】

S u p 3 5 および U r e 2 は、抗体結合性ナノフィブリルのための好ましい担体タンパク質である。実施形態はしかし、これに限定されない。このことは、分子自己アセンブリ(MSA)が可能な他のタンパク質またはタンパク質断片もまた、上記実施形態に従って使用でき、かつ少なくとも1つのZドメインで官能化され得るであろうことを意味する。

50

上記実施形態に従って使用できるそのような他の担体タンパク質の非限定的かつ例証的な例は、タンデムリピートSH3ドメイン[6]、B16[7]、ウシホエイタンパク質[8]、 β テールペプチド[9]、 α -シヌクレイン[10]、CsgA[11]およびRnq1[12]を含む。

【0048】

ある実施形態において、Sup35(1-61)-Z融合タンパク質またはZ-Ure2(1-80)融合タンパク質などの、担体-Z融合タンパク質は好ましくは、Sup35(1-61)またはUre2(1-80)などの、担体タンパク質と、プロテインAの免疫グロブリンG(IgG)結合ドメイン(本明細書ではZドメインと称される)との間の融合タンパク質である。

10

【0049】

プロテインAは、細菌である黄色ブドウ球菌の細胞壁でもともと見出された、42kDaの表面タンパク質である。それはspa遺伝子によってコードされる。それは免疫グロブリンに結合するその能力のために、生化学的研究における用途を見出してきた。それは3つのヘリックス束に折り畳まれる5つの相同なIg結合ドメインから構成される。各ドメインは、多くの哺乳動物種に由来するタンパク質、特にIgGに結合できる。それは、殆どの免疫グロブリンのFc領域内およびヒトVH3科の場合にはFab領域内の重鎖を結合する。

【0050】

ある実施形態において、融合タンパク質のZドメインは、プロテインAの任意の天然のまたは野生型のIgG結合ドメイン、またはプロテインAのそのようなIgG結合ドメインの組換えバージョンであり得る。例えば、Zドメインは、プロテインAの8kDaの改変されたBドメイン変異体であり得る[13]。このIgG結合ドメインは現在、AFFIBODY(登録商標)分子を作製するための足場として使用され、かつ低nM領域の解離定数(K_D)でIgGのFc部分を本来的に結合する。上記実施形態に従って使用できるZドメインの別の例は、MabSelect(商標)で使用されるIgG結合ドメインである。このIgG結合ドメインは、大腸菌(Escherichia coli)で産生されIgGに対する増強された結合能力を与える配向したカップリングに有利なように特異的に操作された組換えプロテインA中のZドメインを構成する。

20

【0051】

上記実施形態に従って使用し得るIgG結合ドメインの他の例は、プロテインG[14]、プロテインA/G[15]、プロテインM[16]、プロテインL[17]、SpAおよびSbi[18]並びにプロテインH[19]を含む。

30

【0052】

特定の実施形態において、担体-Z融合タンパク質は、担体-Z二量体融合タンパク質である。従って、この実施形態において、担体-Z融合タンパク質は好ましくは、2つのZドメイン、即ち、Z二量体(ZZ)を含む。従って、好ましい担体-Z融合タンパク質は、Sup35(1-61)-ZZおよびZZ-Ure2(1-80)を含む。

【0053】

二価のZ、即ちZ二量体(ZZ)は、おそらくはアビディティ効果により、IgGに対するより高い親和性を有するので、一価のZドメインよりも一般に好ましい。IgGに対するZZの結合速度はより速く、且つIgGの放出はより遅い(図2および表1参照)。このことは、官能基の完全な占有および漏れの減少に依存する用途のために潜在的に有利である。

40

【0054】

Z二量体は好ましくは、2つの相互接続されたZドメイン、即ちZZの形態である。別の実施形態において、Z二量体は、架橋またはリンカーによって相互接続された2つのZドメインの形態である。例えば、2つのZドメインは、ドメイン間ヘリックス断片(ZhZ)により、または可撓性リンカー(ZfZ)により相互連結され得る。そのようなドメイン間ヘリックス断片の例はA(EA AAK)_nA(配列番号1)であり、nは好ましく

50

は2～5である。可撓性リンカーは、Mアミノ酸のペプチド形態であり得るであろう。ある実施形態において、Mは好ましくは、10～60、好ましくは15～50、より好ましくは20～45の範囲内で選択される。ある実施形態において、リンカーのアミノ酸は好ましくは、グリシン（G）、アラニン（A）、トレオニン（T）、セリン（S）、フェニルアラニン（F）、グルタミン酸（E）およびリジン（K）、並びにそれらの組合せから選択される。上記実施形態に従って使用できる更なるリンカーは、[2]の表3に開示されており、上記実施形態に従って使用し得る表3のリンカーモチーフに関する教示は、本明細書の一部として援用される。

【0055】

リンカーは、IgGのFc断片の両側をZ二量体に結合させる能力を与するために使用でき、これは次いで、今度は親和性を増加させるであろう。各Fc断片は、69.6 Å離れた2つのZ結合部位を有する。Z二量体中の2つのZドメインがリンカーなしで相互接続される場合、1つの部位のみがアクセス可能である。従って、リンカーが完全に伸長されないことを考慮して、リンカーは、少なくとも80 Åの距離広がれることが好ましい。一般に、各アミノ酸は3.25 Åを与えるので、上記リンカーには少なくとも25アミノ酸が好ましく使用される。上記実施形態に従って使用できる十分に可撓性のリンカーの非限定的な例は、(GGGGS)₅₋₇（配列番号2）、(GGGGT)₅₋₇（配列番号3）、GSAGSAAAGSGEF-GGGGS-GSAGSAAAGSGEF（配列番号4）、およびGSAGSAAAGSGEF-GGGGT-GSAGSAAAGSGEF（配列番号5）を含む。ヘリックス部分とフレキシブルな部分の両方を含むリンカーまたは架橋は、GGGSGGGGS-A(EAAAK)₂₋₃A-GGGSGGGGS（配列番号6）、GGGGTGGGGT-A(EAAAK)₂₋₃A-GGGTGGGGT（配列番号7）、およびGSAGSAAAGSGEF-A(EAAAK)₂₋₃A-GSAGSAAAGSGEF（配列番号8）を含む。

【0056】

2つのZドメインをヘリックス断片またはリンカーと相互接続することは可能であるが、実験的データは、そのようなZ二量体（即ちZhZおよびZfZ）は、相互に連結されたZドメイン（即ちZZ）と比較したときに、抗体及びIgGに対して如何なる増大した親和性も持たないことを示している。

【0057】

上記実施形態の抗体結合性ナノフィブリルは、高親和性および高容量で抗体を結合できる。抗体結合性ナノフィブリルは好ましくは、IgG抗体を結合できる。

【0058】

ある実施形態において、抗体結合性ナノフィブリルは、ナノフィブリル1mg当たり少なくとも1.5mgのIgGの結合能力を有する。好ましい実施形態において、抗体結合性ナノフィブリルは、ナノフィブリル1mg当たり少なくとも1.6mgのIgG、より好ましくは1mgのナノフィブリル当たり少なくとも1.7mgのIgG、例えばナノフィブリル1mg当たり少なくとも1.8mgの結合能力を有する。

【0059】

本明細書に示す実験データは、Ure2（1-80）およびZZ-Ure2（1-80）のc o-フィブリル化によって作製されたナノフィブリルが、ナノフィブリル1mgあたり約1.7mgのIgGの結合能力を達成でき、一方でSup35（1-61）およびSup35（1-61）-ZZのc o-フィブリル化によって製造されたナノフィブリルは、ナノフィブリル1mgあたり約1.8mgのIgGの結合能力を達成できることを示す。これらの結合能力は、抗体結合性ナノフィブリルのZドメインにIgG分子を結合させる場合に使用される結合条件を最適化しなくても達成された。

【0060】

しかしながら、これらの最適化されていない結合条件下でさえ、上記実施形態の抗体結合性ナノフィブリルは、今日では抗体精製に関するゴールドスタンダードであるプロテインA・SEPHAROSE（登録商標）CL4B（GEヘルスケア）などのプロテインA

セファロース（登録商標）アフィニティー媒体と比較して、殆ど20倍超の結合能を有する。

【0061】

上記実施形態の別の態様は、抗体結合性ナノフィブリルの担体-Z融合タンパク質の少なくとも1つのZドメインに結合される少なくとも1つの抗体を含む、上記実施形態による抗体結合性ナノフィブリルに関する。ある実施形態において、少なくとも1つの抗体は、少なくとも1つのIgG分子である。

【0062】

図6は、上記実施形態による抗体結合性ナノフィブリルの製造方法を示すフローチャートである。この方法は、ステップS2において、担体タンパク質および担体-Z融合タンパク質を、1:0.20~1:0.90の範囲内で選択されるモル比でc o o-フィブリル化して、抗体結合性ナノフィブリルを形成することを含む。

10

【0063】

様々な実施形態において、上述した特定のモル比範囲、担体タンパク質およびZドメインを、図6の方法で使用できるであろう。

【0064】

任意の実施形態において、方法はまた、ステップS1を含む。このステップS1は、水溶液中で担体タンパク質を超音波処理することによりタネを生成することを含む。当該方法は次いで、ステップS2へと続き、それは、この実施形態において、このタネを上記モル比での担体タンパク質および担体-Z融合タンパク質と共にインキュベートして、抗体結合性ナノフィブリルを形成することを含む。

20

【0065】

ステップS1で形成されるタネは従って、そこに担体タンパク質および担体-Z融合タンパク質のモノマーが凝集して抗体結合性ナノフィブリルを成長させることができる、タネとして働く。

【0066】

水性フィブリル化緩衝液は、pH7.0~約8.5、例えば約7.0~約8.0の範囲内のpHを好ましくは有する任意の水性緩衝液であり得るであろう。そのような水性緩衝液の非限定的で説明的な例は、リン酸カリウム（K P i）緩衝液またはT r i s-H C l緩衝液を含む。

30

【0067】

フィブリル化のための好ましい条件は、0℃~42℃の範囲内の温度、3~9の範囲内のpH、0mM~200mMの塩濃度、0μM~150μMのドデシル硫酸ナトリウム（S D S）などの界面活性剤濃度、0rpm~600rpmの一定の回転速度、および数時間~数日間のフィブリル化時間を含む。これらの条件における変化は、繊維形態および凝集の完全性に影響を及ぼす可能性がある。また、フィブリル化の動力学は、担体タンパク質の濃度に大きく依存する。

【0068】

上記実施形態の抗体結合性ナノフィブリルは、選択されたモル比の範囲内の担体タンパク質および担体-Z融合タンパク質を含み、且つこれらから製造される。抗体結合性ナノフィブリルの官能化ドメインは従って、抗体結合能を有するZドメインである。しかし、c o o-フィブリル化プロセスの際に他の担体-官能化ドメイン融合タンパク質を含むことによって、抗体結合性ナノフィブリル中に他の官能化ドメインを導入することも可能である。このような他の官能化ドメインの非限定的で例示的な実例は、酵素、金属結合ドメイン、シトクロムp450等であり得るであろう。しかしながら、このような他の官能化ドメインは、抗体結合性Zドメインへの抗体のアクセス可能性に対して負の影響を有し得るであろう。従って、一般には、少なくとも抗体精製用途では、Zドメイン以外の官能化ドメインを持たない抗体結合性ナノフィブリルを使用することが好ましい。

40

【0069】

治療剤としておよび診断目的のために使用される抗体、特にモノクローナル抗体に対す

50

る需要が着実に増加している。従って、費用効率の高い、高負荷抗体精製法に対するニーズが高まっている。抗体精製の現在のゴールドスタンダードは、高度に選択的な媒体プロテインA SEPHAROSE（登録商標）を用いるアフィニティークロマトグラフィーである。にもかかわらず、IgG精製の生産性は、プロテインA SEPHAROSE（登録商標）の限定された結合能力によって制限される。設定された境界を克服するために、抗体結合性ナノフィブリルを、IgG結合性Zドメイン二量体を提示するための足場として使用できる。ナノフィブリルにより提供される優れた表面積／体積比は、このような抗体精製用途に極めて適している。

【0070】

従って、上記実施形態の抗体結合性ナノフィブリルを、抗体およびモノクローナル抗体の精製用途において有利に使用できる。

【0071】

実施形態の更なる態様は従って、固体表面上に固定化された上記実施形態の抗体結合性ナノフィブリルを含む抗体捕捉装置に関する。

【0072】

固体表面上への抗体結合性ナノフィブリルの固定化は、種々の実施形態に従って達成できる。ある実施形態において、少なくとも幾つかの担体タンパク質、少なくとも幾つかの担体-Z融合タンパク質または少なくとも幾つかの担体タンパク質及び担体-Z融合タンパク質は、担体タンパク質及び／または担体-Z融合タンパク質のN末端及び／またはC末端に、His_nタグ等のHisタグを含む。特定の実施形態において、nは、好ましくは少なくとも5、より好ましくは少なくとも6であり、典型的には当該分野においてポリヒスタジントグと呼ばれる。nの上限は、好ましくは14である。例えば、His₆タグを、Sup35（1-61）およびUre（1-80）担体タンパク質のN末端に、Sup（1-35）-ZZ融合タンパク質のN末端に、および／またはZZ-Ure2（1-80）融合タンパク質のC末端に結合できるであろう（図1参照）。

【0073】

そのようなHisタグは、抗体結合性タンパク質がNi²⁺またはCo²⁺荷電表面上に固定化されることを可能にする。当該表面は、結合された二価イオンまたはコバルトイオンを含む親和性樹脂の表面であり得る。これらの樹脂は一般に、ニッケルについてはイミノ二酢酸（IDA）またはニトリロトリ酢酸（NTA）、コバルトについてはカルボキシルメチルアスパルテート（CMA）などの、キレート剤で官能化された、セファロースまたはアガロースである。このようなキレート化剤で官能化された樹脂の例は、HiTrapキレートHPカラム（GE Healthcare）である。HisタグとNi²⁺またはCo²⁺との間の相互作用を介して抗体結合性ナノフィブリルを固定化するために使用できる固体表面のさらなる例は、NTA、IDAまたはCMAのチップまたはビーズである。

【0074】

Hisタグ-Ni²⁺/Co²⁺以外の固定化溶液も可能である。例えば、ビオチン-ストレプトアビジンまたはビオチン-アビジンを使用して、抗体結合性ナノフィブリルを固体表面上に固定化できる。そのようなアプローチでは、少なくとも幾つかの担体タンパク質および／または少なくとも幾つかの担体-Z融合タンパク質のN末端またはC末端が、直接または間接にビオチン分子またはストレプトアビジンまたはアビジン分子に連結される。そのようなアプローチにおいて、上記固体表面は、固定化されたストレプトアビジンまたはアビジン分子またはビオチン分子を含む。

【0075】

更に、ナノフィブリルを固体表面に共有結合させる多くの方法が存在する[20, 21]。例えば、スパーサーアームとして働くヘキサメチレンは、アクリルガラスの慣用名で良く知られているジアミン・ポリ（メチルメタクリレート）（PMMA）のカルボニル基と容易に反応する。カルボジイミドを次いで使用して、アスパラギン酸またはグルタミン酸のカルボキシル基を上記スパーサーアームに共有結合できる。別の選択肢は、エポキシ

樹脂上での固定化である。これは、シアヌル酸を有する樹脂のヒドロキシル基の活性化と、それが次いで、リシン、アスパラギンおよびグルタミン等のアミノ酸により提示されるアミン基と反応することによって達成される。タンパク質固定化のために以前に使用されてきた他の表面は、特に、デキストランで誘導体化されたPDMS、セルロース、金およびポリスチレンを含むが、これに限定されない。しかし、これらのカップリング技術は、繊維の非特異的結合をもたらす。

【0076】

表面への特異的な化学的カップリングは、C末端システイン残基（Sup35（1-61）-CysまたはUre2（1-80）-Cys）を提示するSup35（1-61）またはUre2（1-80）を用いることによって達成できる。担体タンパク質Sup35（1-61）またはUre2（1-80）およびそれらの官能化された対応物中にはシステイン残基が存在しないため、フィブリルのアセンブリの際にSup35（1-61）-CysおよびUre2（1-80）-Cysを加え、従って、当該ナノフィブリル中に組み込むことができる。システインを提示するごく少数の担体タンパク質を導入することは、カップリングがナノフィブリルに沿って非常に少数の場所で、好ましくは1つの場所で起こり、残りのナノフィブリルに対する自由な水平移動の能力を与えることを保証する。任意の実施形態において、担体タンパク質および／または担体-Z融合タンパク質のN末端またはC末端は、必ずしも固定タグまたはアンカータグもしくは分子に直接連結される必要はない。NまたはC末端と固定化タグまたはアンカータグもしくは分子との間に、リンカーまたは架橋を有することが可能である。そのようなアプローチにおいて、リンカーまたは架橋は、制限酵素切断部位の形態であっても、またはそれを含んでいてもよく、制限酵素切断部位は図1に示され、ここでプロテアーゼ切断部位はトロンビン切断部位（TS）によって例示される。これは、特定のプロテアーゼの添加により、上記表面から、上記固定された抗体結合性ナノフィブリルを放出させる効率的な方法を提供する。

【0077】

疾病伝播の初期段階を示すバイオマーカの検出は、患者の良好な治療のために極めて重要である。従って、血液中に放出される疾患特異的タンパク質の検出限界（LOD）および定量限界（LOQ）を低下させる目的で、ELISAの最適化およびその進歩した変法の開発により、イムノアッセイは絶えず改善されている。デジタルELISA、即ち、50 fLの反応チャンパー中に酵素標識されたタンパク質を捕捉するマイクロビーズの単離は、fM範囲未満に検出限界を下げたが、高度な実験装置および訓練された人間を必要とする。一方、ラテラルフローイムノアッセイ（LFA）は、医療現場（POC）での検出には適しているが、膜の抗体結合能が低いため、 10^{-11} M未満のバイオマーカを検出できない。しかしながら、頻繁に言及される前立腺癌バイオマーカの前立腺特異的抗原（PSA）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）などの感染症、神経学的障害などの同定は典型的には、 10^{-12} ~ 10^{-16} Mの検出限界を必要とする。これらの制限を克服するために、標的タンパク質のプレ濃縮は幾つかの改善を可能にする。LFAのLODを低下させるための別の選択肢は、膜上の捕捉抗体の密度を大幅に増加させることである。これは、利用可能な表面積を増幅し、従ってバイオマーカ結合部位の数を増加させる、当該実施形態の抗体結合性フィブリルを用いることによって達成できるであろう。更に、抗体結合性ナノフィブリルは、より大きな表面積から利益を得るとされる任意の免疫アッセイまたは装置を改善する可能性を有する。

【0078】

POC用途および実験室診断の両方のために、低濃度バイオマーカについての高感度アッセイが必要とされている。

【0079】

従って、当該実施形態の更に別の態様は、サンプル中の化学物質の存在を検出するためのキットに関する。キットは、上記実施形態による抗体結合性ナノフィブリルを含む。このキットはまた、サンプル中の化学物質に特異的に結合する、IgG等の抗体も含む。抗体結合性ナノフィブリルの担体-Z融合タンパク質は、上記抗体を結合できる。

【0080】

化学物質は、抗体結合性フィブリルのZドメインに結合できる、IgG等の、抗体により認識され得る任意の化合物、薬剤、アナライトまたはバイオマーカであり得るであろう。非限定的で例示的な例は、心血管系疾患のバイオマーカ、例えばトロポニンまたは高感受性C反応性タンパク質(hsCRP)；頭蓋外傷または外傷のバイオマーカ、例えばS100カルシウム結合性タンパク質B(S100B)、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)、神経フィラメント軽タンパク質(NFL)、D-二量体(フィブリン分解産物)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)；脳卒中のバイオマーカ、例えばS100B、GFAP、NFL；様々な癌タイプのバイオマーカ、例えばPSA、核マトリックスタンパク質no. 22(MP22)、膀胱腫瘍抗原(BTA)、癌胎児性抗原(CEA)、癌抗原15-3(CA15-3)、癌抗原19-9(CA19-9)；感染症のためのバイオマーカ、例えばインフルエンザAまたはB、HIVのためのバイオマーカ；アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、認知症などの、神経学的疾患のバイオマーカ、例えばNFL、アミロイド- β ペプチド、タウを含む。

10

【0081】

従って、当該実施形態のキットは、化学物質に特異的に結合する、抗体、好ましくはIgG分子によって認識される任意の化学物質を検出するために使用できる。

【0082】

化学物質への、即ち、抗原性化学物質のエピトープへの抗体の結合に関して本明細書で使用される「特異的に結合する」は、当技術分野で十分に理解されている用語であり、そのような特異的または優先的結合を決定する方法もまた、当該技術分野において周知である。抗体は化学物質に、それが他の化学物質に結合するよりも大きな親和性、アビディティで、より容易に、および／またはより長い持続時間で結合する場合、「特異的に結合する」。典型的には、特異的に結合するとは、解離定数(KD) < 1 μ M、好ましくは < 100 nM、より好ましくは < 10 nMを意味する。

20

【0083】

もちろん、複数種類の抗体を、当該実施形態の抗体結合性ナノフィブリルに結合させることも可能である。このような場合、これらの2以上の異なる抗体タイプは、異なる抗原(即ち、化学物質)、および／または所与の抗原(即ち、化学物質)上の異なるエピトープに対する特異性を有し、これに結合できる。

30

【0084】

抗体が特異的に結合する化学物質を含むサンプルは、任意のサンプルであってよいが、好ましくは、ヒトまたは動物の身体に由来する生体サンプルである。例示的なそのようなサンプルの例は、体液サンプル、例えば血液サンプル、血漿サンプルまたは血清サンプルを含む。身体サンプルの他の例は、組織サンプル、脳脊髄液サンプル、尿サンプルなどを含む。

【0085】

従って、本明細書に記載の抗体結合性ナノフィブリルを含む実施形態のキットは、特定の化学物質、特に、サンプル中に低濃度で存在するそのような化学物質の存在を検出する必要がある、POCおよび／または実験室診断で使用できる貴重なツールを構成する。抗体結合能を最大にするか、または少なくとも顕著に改善するよう設計され、且つ優れた表面積／体積の比を有する実施形態の抗体結合性ナノフィブリルは、抗体結合性ナノフィブリルが固定化される所定の体積または表面積内で、上記抗体結合性ナノフィブリルに結合または付着される非常に高い量または数の抗体を可能にする。

40

【0086】

例えば、捕獲抗体が固体表面に付着されるサンドイッチELISA等の従来のELISAと比較して、本実施形態では、代わりに上記抗体結合性ナノフィブリルを固体表面に付着させ、それにより固体表面の所定面積についての捕捉抗体数を有意に増加させる。

【0087】

従って、当該実施形態のキットは、pM、fM、aMまたはそれより低濃度においてで

50

あっても、試料中の化学物質の存在を検出するために使用できる。

【0088】

〔実施例〕

この研究では、抗体の精製を目的としたナノフィブリルが、最大の結合能力を達成することを目的として設計された。この目的のために、フィブリル重量は、プロテインAの操作されたBドメイン変異体であるZドメイン(8kDa)を用いた官能化によって最小化された。Zドメインは、AFFIBODY(登録商標)分子を作製するための足場として使用されるが、低nM範囲でIgGのFc部分を本来的に結合する。官能基単位の最大限のアクセス可能性および保持された親和性を付与するために、Sup35(1-61)-Z二量体およびUre2(1-8)-Z二量体融合タンパク質を、それぞれ非官能性Sup35断片およびUre2断片とco-アセンブルした。この戦略は、我々がフィブリル組成を最適化することを可能にし、それにより既存製品の動的結合能力を少なくとも1桁超えるコンセプト材料が得られた。

10

【0089】

<材料及び方法>

・クローニング

Sup35(1-61)、Ure2(1-80)、Sup35(1-61)-ZZ、ZZ-Ure2(1-80)およびZの遺伝子を、大腸菌(*Escherichia coli*)における発現のためにコドン最適化し、またGeneArt Strings DNA断片合成(Thermo Scientific)からDNA断片を入手した。これらの断片をFastDigest制限酵素(Thermo Scientific)で切断し、pET28b(+)ベクターに連結した。最終構築物His₆-TS-Sup35(1-61)(配列番号9)、His₆-TS-Ure2(1-80)(配列番号10)、His₆-TS-Sup35(1-61)-GGGSGリンカーZホモ二量体(配列番号11)、Zホモ二量体-GGGSGリンカーUre2(1-80)-His₆(配列番号12)およびHis₆-Z(図1)を、ウプサラゲノムセンター(ウプサラ大学、ウプサラ、スウェーデン)のサイエンス・フォー・ライフ・ラボラトリー(Science for Life Laboratory)において配列決定した。

20

【0090】

・発現および精製

それぞれの遺伝子Sup35(1-61)、Ure2(1-80)、Sup35(1-61)-ZZ、またはZを有するpET28b(+)発現ベクターを保持する形質転換BL21star(DE3)の一晚(ON)培養物(Lysogeny-broth(LB)培地; 25°C; 180rpm)を、900mLのTerrificブロス(TB)培地(30μg/mLカナマイシン)中に1:100希釈した。この培養物を、OD600が0.6に達するまで37°Cおよび180rpmで増殖させた。最終濃度が1mMになるようにイソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加することにより、タンパク質発現を誘導し、細菌を180rpmにて、37°Cで4.5時間(Sup35(1-61)、Ure2(1-80)およびZ)、または30°Cで5時間(Sup35(1-61)-ZZ)追加的にインキュベートした。ZZ-Ure2(1-80)の発現のために、出発培養物(TB培地; 37°C; 180rpm; 5時間)を、900mLのTB培地(30μg/mLカナマイシン)中で1:180希釈した。この培養物を、OD600が1.0に達するまで180rpmで増殖させ、その時点で培養物を氷上で冷却し、その後IPTGを最終濃度0.1mMまで添加した。タンパク質発現を、20°Cおよび180rpmで14時間行った。

30

40

【0091】

細胞を、F9-6x1000LEXロータを用いるSorvall LYNX6000(Thermo Scientific)遠心分機において、4°Cにて20分間3,500×gで回収した。上清を捨て、残りの細胞ペレットを、Sup35(1-61)およびUre2(1-80)について緩衝液LD[8M尿素、20mM Tris、150mM

50

のNaCl、pH8] 中で、またはSup35(1-61)-ZZ、ZZ-Ure2(1-80) およびZについて緩衝液LN[25mMトリス、150mMのNaCl、pH8] 中で穏やかに攪拌することにより再懸濁し、-20℃で保存した。自然条件での細胞溶解を、1.35kbaにて細胞破壊装置(Constant Systems) 中で実施した。続いて、1000UのDNase I(Boehringer Mannheim) および1個の完全EDTAフリーのプロテアーゼ阻害剤錠剤(Roche) を添加した。氷上で30分間インキュベートした後、溶解物をSorvall・RC6+(Thermo Scientific) 中で、F21-8x50yロータを39,000×gで用いて4℃で30分間遠心分離して不溶性破片を除去した。尿素を含む緩衝液中の細胞ペレット再懸濁物を解凍し、60分および周囲温度にて同じ方法で遠心分離した。最後に、溶解物を、シリンジ駆動のFiltropurS0.45μmフィルター(Sarstedt) を通して濾過した。 10

【0092】

タンパク質の精製を、固有の緩衝液条件について4℃で、または変性条件について室温で、アクタエクスプローラ(Aekta Explorer) プラットフォーム上で行った。変性条件においては、細胞溶解液をロードする前に、Ni²⁺を充填した5mLのHiTrapキレートHPカラム(GE Healthcare) を緩衝液AD[8M尿素、20mMトリス、pH8] で平衡化した。弱く結合するタンパク質がまず、30mMのイミダゾールを含む緩衝液ADで溶出された。Sup35(1-61) は90mMのイミダゾールで溶出され、3つの連続したピークを生じ、一方で第3のピークはSup35(1-61) を含んだ。Ure2(1-80) は200mMのイミダゾールで溶出された。5mLのMonoQカラム(Amersham Bioscience) を緩衝液ADで平衡化した後、Sup35(1-61) またはUre2(1-80) をロードし、純粋なタンパク質をフロースルー中に回収した。Sup35(1-61) を、Vivaspin20MWCO 5,000Daを用いて>1000μMに濃縮した。 20

【0093】

官能化されたSup35(1-61)-ZZ、ZZ-Ure2(1-80)、並びにZを、緩衝液AN[25mMのTris、pH8] を用いて天然緩衝液条件下で精製した。タンパク質を、固定化金属イオン親和性クロマトグラフィー(IMAC) カラムから、200mMのイミダゾールを含有する天然の緩衝液で本質的に純粋に溶出した。最終精製段階として、タンパク質を、HiLoad16/600Superdex75pg(GE Healthcare) ゲル濾過カラムにかけた。全てのタンパク質の純度およびサイズを、4~20%のMini-protean TGX Stain-Free Precast Gels(Biorad) を用いるドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) によって確認した。 30

【0094】

マトリックス支援レーザー脱着/イオン化(MALDI)-飛行時間(TOF) 質量分光法(MS) により、Sup35(1-61) およびUre2(1-80) について、8M尿素中での貯蔵による翻訳後修飾は存在しないことが確認された。Sup35(1-61)、Sup35(1-61)-ZZ、ZZ-Ure2(1-80) およびZのタンパク質濃度を、280nmでの吸光度(Abs₂₈₀) を測定することにより、および計算された配列特異的吸光係数を用いることにより決定した[22]。加えて、ビシンコニン酸アッセイ(Thermo Scientificアッセイキット) を用いて、Ure2(1-80) およびZZ-Ure2(1-80) の濃度を決定した。これらのタンパク質をアリコートに分け、液体窒素で急速冷凍してから-80℃で長期保存した。 40

【0095】

・官能化されたナノフィブリルの凝集

Sup35(1-61) とSup35(1-61)-ZZ、およびUre2(1-80) とZZ-Ure2(1-80) との同時凝集であるco-フィブリル化を、それぞれ緩衝液FBS[30mMトリス-HCl、200mMのNaCl、pH8.0] および緩衝 50

液 FBU [10 mM の KPi、150 mM の NaCl、pH 7.4] の中で実施した。18 μ g の Sup35 (1-61) を最初に緩衝液 FBS 中で 50 倍希釈することによって、官能性 Sup35 (1-61) フィブリルをアセンブリ化した。このサンプルを、1.5 mL のエッペンドルフバイアル中で、Branson 2510 超音波処理浴において 8 分間超音波処理した。次いで、これらのタネを、79 μ g の Sup35 (1-61) および 10~159 μ g の Sup35 (1-61)-ZZ を含有する試料に直ちに添加した。添加されたタネの量を考慮すると、1:0.04~1:0.65 に対応する Sup35 (1-61)-ZZ に対する Sup35 (1-61) の最終モル比が得られた。同様に、Ure2 (1-80) のタネを得るために、タンパク質を Vivaspin 500 MWCO 3,000 Da により 9,000 $\times$ g で約 1 mM に濃縮し、次いでバッファー FBU 中で 50 倍に希釈した。次に、ステップマイクロチップを使用する Vibra・Cell・VC505 (Sonics) を用いて、100 μ g を超音波処理した (2 秒間オン、8 秒間オフ、20% 振幅、合計時間 60 秒)。タネは直ちに、71 μ g の Ure2 (1-80) 及び 8~169 μ g の ZZ-Ure2 (1-80) を含有する試料に添加され、これにより、添加されたタネの量も考慮したときに、1:0.04~1:0.9 に対応する Ure2 (1-80)/ZZ-Ure2 (1-80) の最終モル比が得られた。完全な凝集のために、サンプルを室温で一晩インキュベートした。フィブリル化の完全性を、フィブリルを沈降させるための 7,000 $\times$ g での 10 分間の遠心分離、その後 Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) で上清の 280 nm での吸光度を測定することまたは如何なる残留タンパク質も存在しないことを確認するための SDS-PAGE により試験した。アセンブルされたフィブリルを、使用まで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

【0096】

・生体分子相互作用

全ての相互作用研究は、25 $^{\circ}$ C、流速 30 μ L/分において、Biacore・X100 (GEヘルスケア)での表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイを用いて実施した。His₆ タグ化したタンパク質を、10 ng/mL の Z を 30 秒間、40 ng/mL の Sup35 (1-61)-ZZ を 90 秒間、または 160 ng/mL の ZZ-Ure2 (1-80) を 90 秒間、ニッケル帯電された表面を覆って注入することにより、ニッケル (Ni²⁺) キレート化されたニトリロトリアセテート (NTA) チップ (GE Healthcare) 上に固定化した。典型的には、10 応答単位 (RU) ~ 40 RU の安定した最終固定化レベルが達成された。ポリクローナルヒト IgG (Pierce) を、緩衝液 HBS-P [10 mM の HEPES、150 mM 後 NaCl、3 mM の EDTA、0.05% の TWEEN (登録商標) 20、pH 7.4] 中での連続 2 倍希釈シリーズで調製し、5~40 nM の間で変化させた。分析は、複数サイクル設定で、即ち、分析物の各注入後に Ni²⁺ 帯電表面を完全再生させて実施された。会合段階を 180 秒間、解離段階を 600 秒間モニターした。データは、Biacore 評価ソフトウェアを用いて 1:1 結合モデルに適合させた。各実験は 4 回繰り返し行なった。c o o フィブリル (モル比 1:0.04) の結合動態を記録するために同様の設定を用いた。c o o フィブリルを 160 ng/mL (Sup35) または 1 μ g/mL (Ure2) に希釈し、NTA チップのニッケル帯電表面上に 180 秒間注入し、30 RU の固定化レベルを得た。分析物 (ポリクローナル IgG) の濃度は 5~40 nM の間で変化させた。得られたセンサグラムを二価アナライトモデルに適合させた。

【0097】

・ヒト血清からの IgG の精製

1:0.16 のモル比を有する約 680 μ g の Sup35 c o o フィブリル、または 1:0.49 のモル比を有する 530 μ g の Ure2 フィブリルを、緩衝液 FBS で 2 回洗浄し、室温で 30 分間、ヒト血清 (3H Biomedical) と共にインキュベートした。フィブリルを次いで、Heraeus Pico17 Table Top 遠心分離機 (Thermo Scientific) において、17,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離して沈降させ、厳密に 3 回洗浄した。結合した IgG を、緩衝液 EB (0.1 M

グリシン-HCl、pH 3) を用いて溶出させ、溶出した IgG の総量を 280 nm での吸光度を測定することにより推定した。ポリッシングのために、溶出された IgG を、緩衝液 AN を用いる Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) にロードした。IgG の良好な精製を、SDS-PAGE を用いて評価した。

【0098】

・電子顕微鏡法

ポリクローナルヒト IgG (Thermo Fisher Scientific) を一次抗体として使用して、1:0.16 フィブリルに等しい比で提示された ZZ ドメインを飽和させた。室温で 30 分間インキュベートした後、二次ヤギ抗ヒト IgG の 5 nm 金コンジュゲート (Sigma Aldrich) を、免疫金粒子当たり 66 または 40 0 ZZ 結合部位の最終比になるまで上記フィブリルに加えた。追加の重量によりフィブリルは非常に迅速に沈降し、これにより上清の除去および新しい緩衝液 EM (5 mM の Tris-HCl、pH 8) 中での再懸濁が可能になった。緩衝液 EM を用いて洗浄を 4 回繰り返した。上記フィブリルを炭素被覆グリッド (SPI Supplies) 上に載せ、1% ウラニルアセテートで陰性染色した [23]。TEM 画像を、SciLife Lab・BioVis 施設 (Rudbeck laboratory, Uppsala University, Uppsala, Sweden) で撮影した。

【0099】

・ナノフィブリルの結合能力

ZZ を提示する c o - フィブリルの最大 IgG 結合能力を、ドーピング頻度の関数として決定した。この目的のために、c o - フィブリルを、1:0.04~1:0.65 (Sup 35) または 1:0.04~1:0.9 (Ure 2) に対応する非官能性/官能性フィブリルタンパク質の相対モル比でアSEMBルした。上記比に応じて、7.4~17.8 μg の Sup 35 足場 c o - フィブリル、または 6.6~17.8 μg の Ure 2 足場 c o - フィブリルを、ヒト IgG (Pierce) と共に室温で 60 分間インキュベートした。添加された抗体の量は、実際のフィブリル結合能力の 1.5~2 倍の範囲であった。使用前に、IgG をストックから新たに希釈し、280 nm での吸光度 (ϵ パーセント = 13.7 g/100 mL⁻¹ cm⁻¹) を 4 回測定して最終濃度を決定した。インキュベーション後、Heraeus Pico 17 Table Top 遠心分離機 (Thermo Scientific) において、サンプルを 17,000 × g で 10 分間遠心分離し、上清の 280 nm での吸光度を 3 回測定した。上清の 280 nm での吸光度は、フィブリルに結合した IgG の量に直接関連した。各フィブリルタイプの結合能力を 6 回測定した。

【0100】

<結果>

・タンパク質の精製

Sup 35 (1-61) および Ure 2 (1-80) を変性条件下で精製し、それぞれ、大腸菌培養物 1 L 当たり 10 mg および 20 mg のタンパク質を得た。MALDI-TOF MS により、Sup 35 (1-61) (8,995 Da) および Ure 2 (1-80) (10,793 Da) の理論質量を確認し、これは尿素中での貯蔵に起因する改変がないことを示唆した。官能的変異体の Sup 35 (1-61) - ZZ および ZZ - Ure 2 (1-80) を、天然状態で発現および精製した。IMAC 精製後、収量はそれぞれ 71 mg/L および 20 mg/L と推定された。同様に、Z ドメインの精製により、IMAC 後に純粋なタンパク質 89 mg/L が得られた。

【0101】

・生体分子相互作用

効率的に IgG に結合することを目的としてナノフィブリルを設計することは、機能ドメインの選択に本質的に依存する。Z ドメインは、この目的のために慎重に選択された候補である。更に、以前の研究では、二量体 ZZ は、個々の Z ドメインと比較して IgG に対する増加した結合親和性をもたらすことが示されている [24]。Biacore

を用いて、個々の分子として融合タンパク質 Sup 35 (1-61) - ZZ および ZZ - Ure 2 (1-80) でおよびアセンブリされたフィブリルで利用される、ZZ の保持された能力を評価した (図 2 A および 2 B)。結果は、反応速度論が、文献で入手できるデータとよく一致していることを示唆した (表 1) [24, 25]。しかし、 k_{off} は、以前に報告された値よりも約 1桁遅い。データの相違についてのもっともらしい正当な理由は、官能性 ZZ の最適な配向を達成するために、Ni²⁺ 帯電 NTA チップを、His₆ タグを介したタンパク質固定化に利用したという事実である。この実験設計とは対照的に、以前のデータは、CM5 チップへの IgG のアミンカップリングによる非特異的固定化を用いて得られ、これは異種表面を生じた。それにもかかわらず、ZZ はそのタグによって損なわれず、また IgG に対する有効な ZZ 結合は無傷のままであり、これが高 pM 範囲の親和性を提供すると結論付けることができる。

10

【0102】

【表 1】

表 1 - 異なるタンパク質構築物中に存在する Z ドメインに対する ヒト IgG の会合定数及び解離定数

タンパク質	k_{on} ($M^{-1} s^{-1} \times 10^5$)	k_{off} ($s^{-1} \times 10^{-4}$)	K_D ($M \times 10^{-9}$)
Z ^B	2.41 ± 0.31	3.42 ± 0.45	1.44 ± 0.27
Sup35(1-61)-ZZ ^B	3.82 ± 0.13	1.04 ± 0.32	0.27 ± 0.08
Sup35(1-61)-ZZ フィブリル ^A	3.22 ± 0.38	1.71 ± 0.38	0.62 ± 0.17
ZZ-Ure2(1-80) ^B	4.18 ± 0.17	0.74 ± 0.21	0.18 ± 0.05
ZZ-Ure2(1-80) フィブリル ^A	3.13 ± 0.24	1.18 ± 0.61	0.39 ± 0.21

20

A. データは、二価アナライトモデルに適合された。速度 k_{on} および k_{off} は、IgG - 繊維相互作用の主成分である。c o - フィブリルにおける官能性タンパク質に対する非官能性タンパク質のモル比は、1 : 0.04 であった。

B. データは、1 : 1 結合モデルに適合された。

【0103】

c o - フィブリルのアセンブリおよび官能性

共凝集を開始するためのタネの使用は、2つの実体の比とは無関係に、1日未満で官能性 c o - フィブリルを生じた。従って、フィブリルに沿った ZZ の密度は、c o - フィブリルの凝集後の、Sup 35 (1-61) - ZZ または ZZ - Ure 2 (1-80) 濃度の変化によって容易に調整された。良好なフィブリル化を、遠心分離により懸濁液からフィブリルを除去することによって評価した。上清中に可溶性タンパク質が完全に存在しないことを、吸光度測定または SDS-PAGE によって確認した。

【0104】

アセンブリ化された材料上に提示された ZZ の保存された官能性を評価するために、もう一度 SPR 技術を適用して、c o - フィブリルに対する IgG の速度論的結合速度を測定した (図 2 C および 2 D)。この相互作用のセンサグラムはより複雑であり、1 : 1 結合モデルに適合させることができなかった。この観察は、c o - フィブリル固定化が全ての結合部位に対して等しいアクセス可能性を提供するとは期待されないという理論的根拠に合致する。その結果、二価アナライトモデルを用いてデータを適合させた。相互作用の主成分は、可溶性キメラタンパク質から得られたデータと一致する速度を生じ、Sup 35 (1-61) 並びに Ure 2 (1-80) フィブリル上に提示された ZZ の官能性を証明した。この知見を強調するために、複合マトリックスからの IgG の精製を試みた。この目的のために、Sup 35 および Ure 2 足場 c o - フィブリルについてのドーピング頻度がそれぞれ 1 : 0.16 および 1 : 0.49 の ZZ 官能化フィブリルを、ヒト血清と共にインキュベートした。上記フィブリルを次いで、遠心分離によってペレット化し、徹

30

40

50

底的に洗浄し、0.1 M グリシン-HCl (pH 3) で IgG を除去した。この精製の SDS-PAGE 分析は、機能的な物質が専ら IgG を結合し、他の非常に豊富なタンパク質を結合しなかったことを示した (図 3 A および 3 B)。溶出された抗体の純度は、遠心分離により除去されなかった恐らくは小さなフィブリル断片の存在を除き、商業的に得られる IgG に匹敵した。純度を高め小さなフィブリルフラグメントを除去するために、サンプルをゲル濾過した。合計 720 μg (Sup 35-足場 c o-フィブリル) および 650 μg (Ure 2-足場 c o-フィブリル) の IgG をヒト血清から精製し、これはそれぞれ、1.06 および 1.22 mg の IgG / 1 mg のフィブリル収量に相当した。精製された抗体の完全性を、商業的に得られた純粋な IgG で最初に行われた SPR アッセイを繰り返すことによって確認した。ラボ精製した IgG の固定化された Sup 35 (1-61)-ZZ との相互作用によって結合定数が得られ (k_{on} 3.30 $\pm$ 0.24 $\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 k_{off} 0.82 $\pm$ 0.41 $\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ および K_D 0.25 $\pm$ 0.12 nM)、これは (表 1) に記載されているレートと実際に同じである。

10

【0105】

c o-フィブリルの官能性を、TEM を用いても確認した (図 4)。フィブリルをまずヒト IgG で完全に飽和させ、次いで金結合二次抗体で標識した。明らかに、金標識された抗体は均一に分布され、専らフィブリルに沿って配置された。フィブリル幅の概算は、Sup 35 (1-61) および Ure 2 (1-80) 足場における c o-フィブリルのコアが、それぞれ約 5 nm および 6 nm であることを明らかにした。30 nm の最大幅のフィブリル周囲の拡散雲も観察された、これはフィブリルの両側に IgG が存在することによる可能性が最も高く、IgG が 12 nm の長さを有することを考慮するとこれは妥当であった。

20

【0106】

・ナノフィブリルの抗体結合能力

フィブリル上の ZZ ドメインの上昇した密度は、IgG の結合能力の増加を導く可能性がある。にもかかわらず、これはまた、立体的な制約のため各機能領域のアクセス可能性を低下させる可能性がある。結合能力に関して ZZ 密度が IgG 結合を妨害するドーピング頻度を同定するために、官能性担体タンパク質に対する非官能性担体タンパク質のモル比が増加するフィブリル (複数) を、正確に決定された量の IgG で飽和させた。次に、フィブリルをペレット化し、上清の 280 nm における吸光度を測定した。これは、フィブリルに結合された IgG 及び結合されなかった IgG の定量を可能にした。収集したデータによれば、結合能力とフィブリル組成との間には明確な相関があった (図 5 A および 5 B、並びに表 2)。モル比 1 : 0.04 から出発して、IgG 結合能は着実に増大し、ドーピング頻度が 1 : 0.33 (Sup 35 フィブリル) または 1 : 0.49 (Ure 2 フィブリル) に近づくにつれてプラトーに達した。Sup 35 フィブリルについての比 1 : 0.33 もまた最大総結合能を示し、これはフィブリル 1 mg あたり 1.8 mg の IgG に等しかった。1 : 0.04 および 1 : 0.08 の比を有する c o-フィブリルの最大 IgG 結合能力は、キメラタンパク質と本質的に等モルであり、全ての結合部位がアクセスされ得ることを示している。これは、約 12 個の非官能性の担体タンパク質が、Sup 35 c o-フィブリル中の各繫留された ZZ 分子を取り囲んでいる場合である (図 5 B)。より高い ZZ 含量を有するフィブリルは、理論的に可能な量の IgG の一部のみが結合されたという事実を示唆されるように、各 ZZ 部位への完全なアクセスを与えなかった。比が 1 : 0.16 から 1 : 0.65 / 0.9 へと増加するにつれて、アクセス可能な ZZ 結合部位の割合は直線的に減少した (図 5 C)。1 分子の IgG を結合するのに必要であったキャリアタンパク質の数を表すデータは、漸近傾向に従い、Sup 35 c o-フィブリルについては 6.5、または Ure 2 c o-フィブリルについては 6.0 に接近した (図 5 B)。

30

40

【0107】

従って、IgG の精製のために ZZ ドープされたナノフィブリルを用いることはより高いスループットをもたらし、これが今度は全体のプロセス時間を最小限にし、従ってコス

50

ト効率を向上できるであろう。

【0108】

【表2】

表2-ZZを提示するSup35フィブリルのIgG結合能

Sup35:Sup35-ZZ ^A	IgG (mg) / フィブリル (mg) ^B	理論的結合能の% ^C	# タンパク質/IgG ^D
1:0.04	0.68 ± 0.07	111 ± 12 %	23.2 ± 2.4
1:0.08	1.14 ± 0.14	101 ± 12 %	13.2 ± 1.5
1:0.16	1.43 ± 0.08	74 ± 4 %	9.7 ± 0.5
1:0.24	1.67 ± 0.06	66 ± 2 %	7.7 ± 0.3
1:0.33	1.77 ± 0.10	59 ± 3 %	6.9 ± 0.4
1:0.41	1.72 ± 0.12	51 ± 4 %	6.8 ± 0.5
1:0.49	1.72 ± 0.08	47 ± 2 %	6.5 ± 0.3
1:0.57	1.67 ± 0.06	43 ± 2 %	6.4 ± 0.2
1:0.65	1.61 ± 0.14	39 ± 3 %	6.5 ± 0.6

10

【0109】

A. c oーフィブリルにおけるSup35 (1-61) - ZZに対するSup35 (1-61) のモル比；

B. それぞれのフィブリルの実験的に決定されたヒトIgG結合能の平均値；

20

C. 実験的に決定されたIgG結合能の平均値を、理論上の最大結合能力で除した値；

D. 1分子のIgGを結合するために必要なタンパク質の数。

示される誤差は標準偏差である。

【0110】

【表3】

表3-ZZを提示するUre2フィブリルのIgG結合能力

Ure2:ZZ-Ure2 ^A	IgG (mg) / フィブリル (mg) ^B	理論的能力の% ^C	# タンパク質/IgG ^D
1:0.04	0.53 ± 0.06	102 ± 12%	25.3 ± 3.3
1:0.08	0.79 ± 0.08	82 ± 8%	16.3 ± 1.6
1:0.16	1.11 ± 0.06	66 ± 4%	10.8 ± 0.7
1:0.24	1.31 ± 0.09	59 ± 4%	8.7 ± 0.6
1:0.33	1.55 ± 0.12	58 ± 5%	7.0 ± 0.6
1:0.41	1.57 ± 0.07	52 ± 2%	6.6 ± 0.3
1:0.49	1.67 ± 0.08	51 ± 2%	6.0 ± 0.3
1:0.57	1.65 ± 0.07	46 ± 2%	5.9 ± 0.3
1:0.65	1.65 ± 0.07	44 ± 2%	5.8 ± 0.3
1:0.73	1.62 ± 0.05	41 ± 1%	5.7 ± 0.2
1:0.81	1.58 ± 0.06	38 ± 1%	5.8 ± 0.2
1:0.90	1.48 ± 0.06	37 ± 3%	6.1 ± 0.3

30

40

【0111】

A. c oーフィブリルにおけるZZ-Ure2 (1-80) に対するUre2 (1-80) のモル比；

B. それぞれのフィブリルの実験的に決定されたヒトIgG結合能の平均値；

C. 実験的に決定されたIgG結合能の平均値を、理論上の最大結合能力で除した値；

D. 1分子のIgGに結合するために必要なタンパク質の数。

50

示される誤差は標準偏差である。

【0112】

上述した実施形態は、本発明の幾つかの例示的实施形態として理解されるべきである。当業者であれば、本発明の範囲から逸脱することなく、様々な修飾、組み合わせ、および変更を上記実施形態に加えることができることを理解するであろう。特に、異なる実施形態における異なる部分解決策は、技術的に可能な場合には他の構成において組み合わせることができる。しかしながら、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって規定されるものである。

【0113】

<参考文献>

1. Men, D., et al., Seeding-induced self-assembling protein nanowires dramatically increase the sensitivity of immunoassays. *Nano letters*, 2009. 9(6): p. 2246-50.
2. Cheng, X., et al., Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013. 65: p. 1357-1369.
3. Paushkin, S. V., et al., Propagation of the yeast prion-like [psi⁺] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. *The EMBO journal*, 1996. 15(12): p. 3127-34.
4. Glover, J. R., et al., Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell*, 1997. 89(5): p. 811-9.
5. Maddelerin, M. L. and R. B. Wickner, Two prion-inducing regions of Ure2p are nonoverlapping. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(6): p. 4516-24.
6. Baldwin, A. J., et al., Cytochrome Display on Amyloid Fibrils. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. 128(7): p. 2162-2163.
7. Kodama, H., et al., Construction of a protein array on amyloid-like fibrils using co-assembly of designed peptides. *Chemical Communications*, 2004(24): p. 2876-2877.
8. Sasso, L., et al., Versatile multi-functionalization of protein nanofibrils for biosensor applications. *Nanoscale*, 2014. 6(3): p. 1629-1634.
9. Hudalla, G. A., et al., Graded assembly of multiple proteins into supramolecular nanomaterials. *Nature materials*,

2014. 13 (8) : p. 829-36.
10. Padalkar, S., et al., Alpha-synuclein as a template for the synthesis of metallic nanowires. *Nanotechnology*, 2007. 18 (5) .
11. Zhong, C., et al., Strong underwater adhesives made by self-assembling multi-protein nanofibres. *Nature Nanotechnology*, 2014. 9 (10) : p. 858-866.
12. Wickner, R. B., F. Dyda, and R. Tycko, Amyloid of Rnq1p, the basis of the [P^{IN+}] prion, has a parallel in-register beta-sheet structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105 (7) : p. 2403-8. 10
13. Nilsson, B., et al., A Synthetic IgG-Binding Domain Based on Staphylococcal Protein-A. *Protein Engineering*, 1987. 1 (2) : p. 107-113.
14. Bjorck, L. and G. Kronvall, Purification and Some Properties of Streptococcal Protein-G, Protein-a Novel IgG-Binding Reagent. *Journal of Immunology*, 1984. 133 (2) : p. 969-974. 20
15. Eliasson, M., et al., Chimeric IgG-Binding Receptors Engineered from Staphylococcal Protein-a and Streptococcal Protein-G. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. 263 (9) : p. 4323-4327.
16. Grover, R. K., et al., A Structurally Distinct Human Mycoplasma Protein that Generically Blocks Antigen-Antibody Union. *Science*, 2014. 343 (6171) : p. 656-661. 30
17. Wikstrom, M., et al., Proton nuclear magnetic resonance sequential assignments and secondary structure of an immunoglobulin light chain-binding domain of protein L. *Biochemistry*, 1993. 32 (13) : p. 3381-6.
18. Atkins, K. L., et al., S. aureus IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Molecular Immunology*, 2008. 45 (6) : p. 1600-1611. 40
19. Åkesson, P., et al., Protein H-A novel igg binding bacterial protein. *Molecular Immunology*, 1990. 27 (6) : p. 523-531.
20. Sulaiman, S., et al., A review: potential usage of cellulose nanofibers (CN 50

- F) for enzyme immobilization via covalent interactions. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015. 175 (4) : p. 1817-42.
21. Wong, L. S., F. Khan, and J. Micklefield, Selective covalent protein immobilization: strategies and applications. *Chem Rev*, 2009. 109 (9) : p. 4025-53.
22. Gasteiger, E., et al., Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in *The Proteomics Protocols Handbook*, J. M. Walker, Editor. 2005, Humana Press: Totowa, NJ. p. 571-607. 10
23. Zhang, L., et al., Morphology and structure of lipoproteins revealed by an optimized negative-staining protocol of electron microscopy. *Journal of lipid research*, 2011. 52 (1) : p. 175-84.
24. Nilsson, J., et al., Competitive elution of protein A fusion proteins allows specific recovery under mild conditions. *European journal of biochemistry / FEBS*, 1994. 224 (1) : p. 103-8. 20
25. Jendeborg, L., et al., Kinetic analysis of the interaction between protein A domain variants and human Fc using plasmon resonance detection. *Journal of molecular recognition : JMR*, 1995. 8 (4) : p. 270-8.
26. Lee, D. S., et al., A protein nanofiber hydrogel for sensitive immunoassays. *Analyst*, 2013. 138 : p. 4786-94. 30

【図 1】

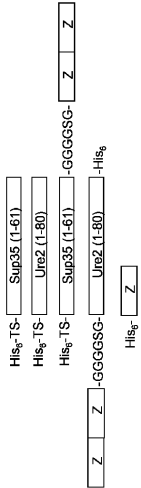
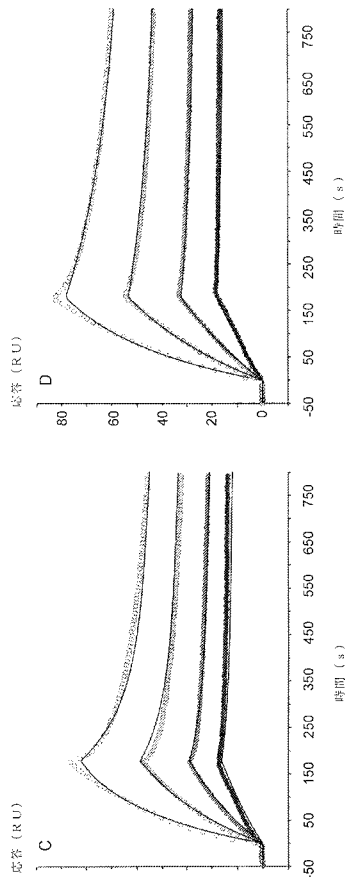
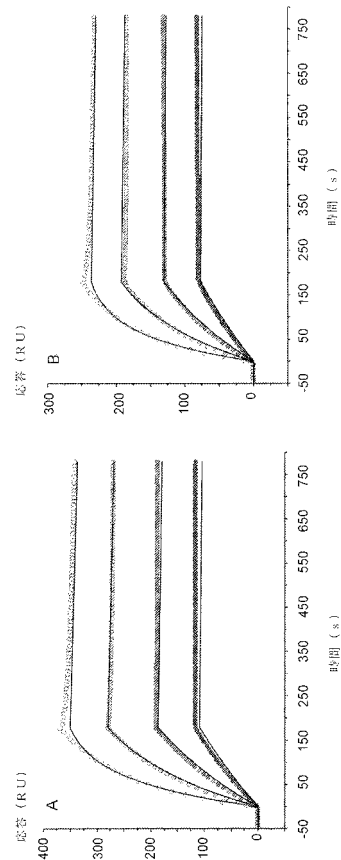


Fig. 1

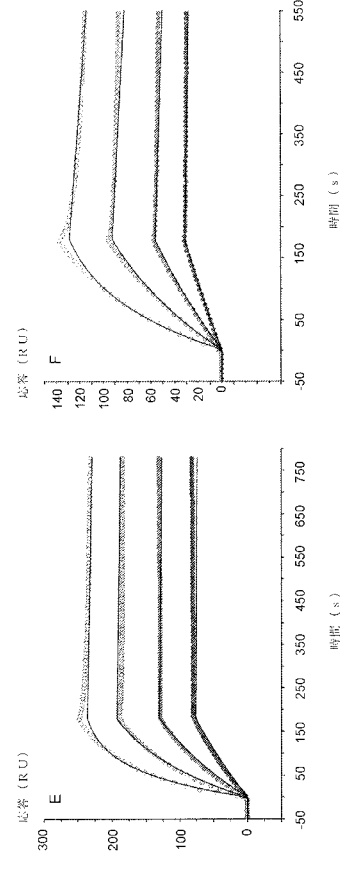
【図 2 - 2】



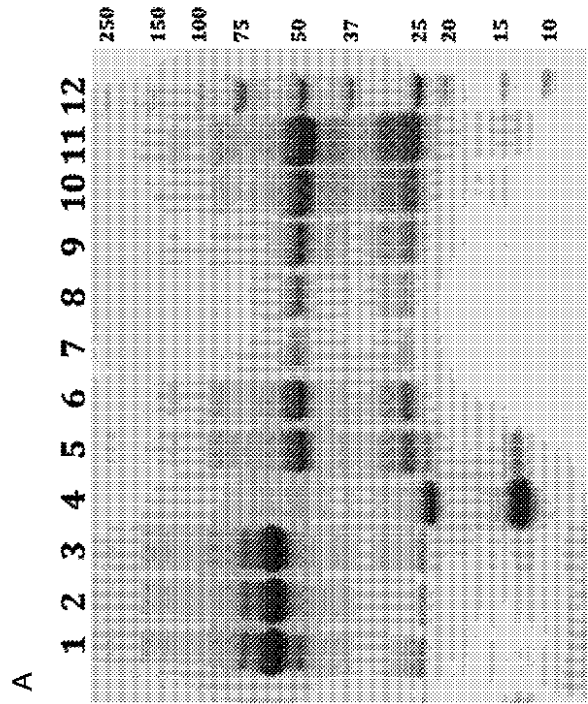
【図 2 - 1】



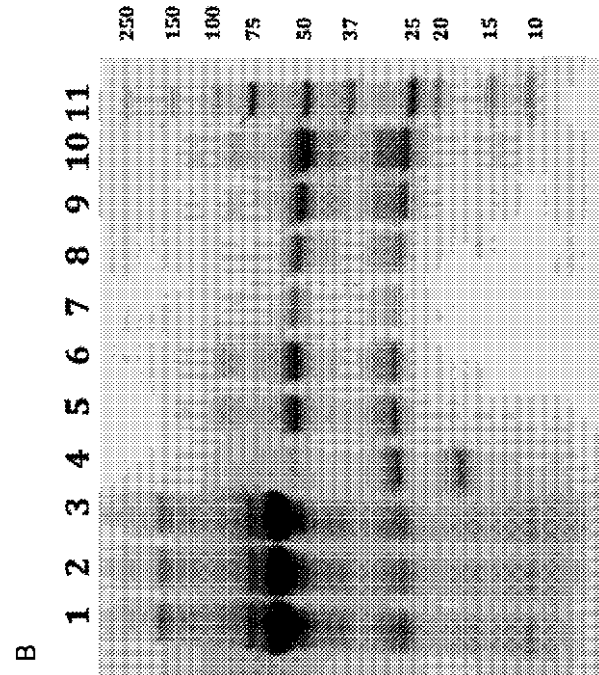
【図 2 - 3】



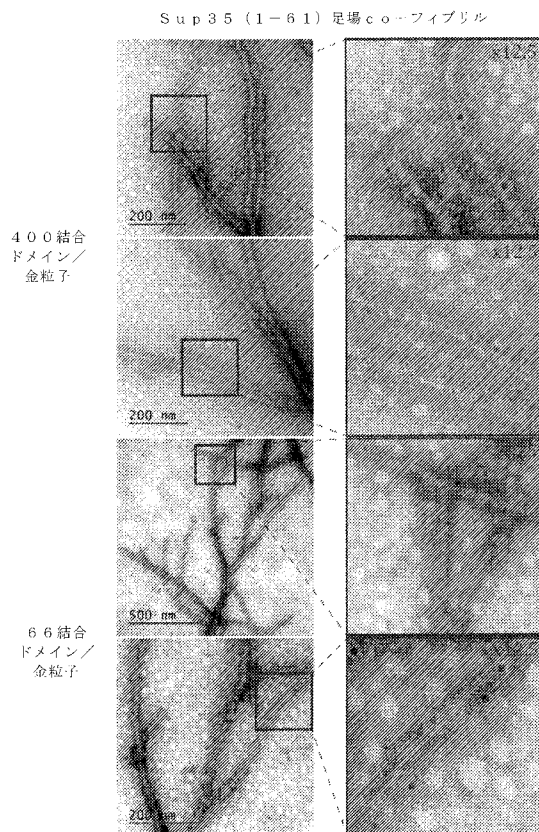
【図 3 A】



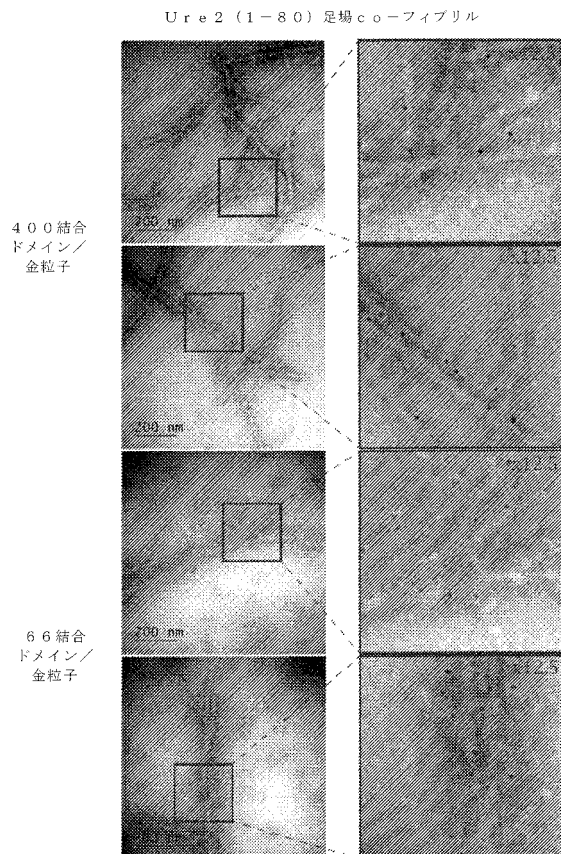
【図 3 B】



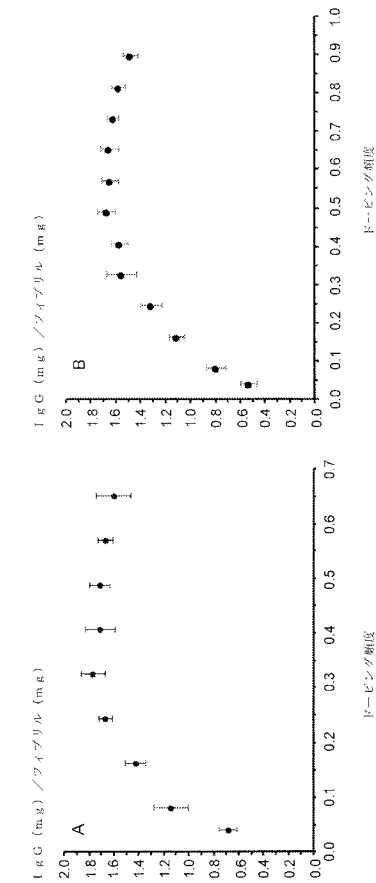
【図 4 - 1】



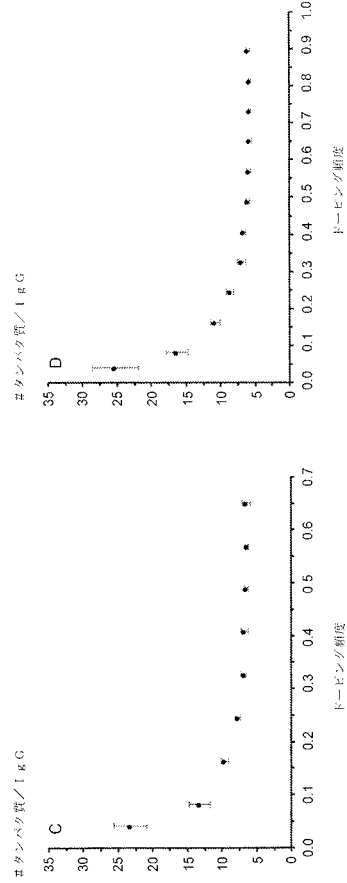
【図 4 - 2】



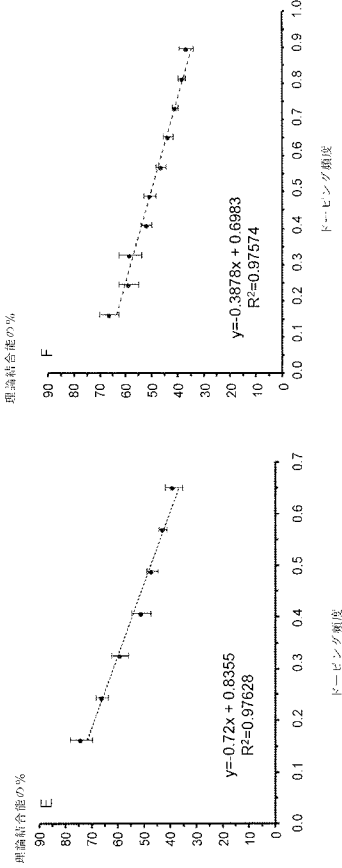
【図 5 - 1】



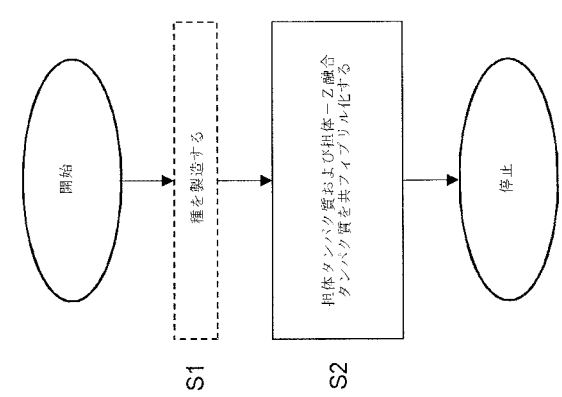
【図 5 - 2】



【図 5 - 3】



【図 6】



【手続補正書】

【提出日】平成31年1月17日(2019.1.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2019525889000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2017/050461

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: see extra sheet		
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)		
IPC: C07K, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE, DK, FI, NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, PAJ, WPI data, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, MEDLINE, Registry, DGENE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Dae-Sung Lee et al., "A protein nanofiber hydrogel for sensitive immunoassays", Analyst, 2013, vol. 138, pages 4786-4794; See the abstract; page 4787, left column, third paragraph; page 4789, left column, second paragraph-right column, first paragraph; page 4794, left column, first paragraph and figures 1 and 2 --	1-20
X	WO 2005118633 A2 (THE WHITEHEAD INTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH), 15 December 2005 (2005-12-15); See page 1, lines 10-13; page 23, lines 3-4; page 52, lines 28-31; page 19, lines 1-7 and page 53, line 27-page 55, line 16	1-20
Y	--	1-20
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03-07-2017		Date of mailing of the international search report 03-07-2017
Name and mailing address of the ISA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 666 02 86		Authorized officer Carolina Palmcrantz Telephone No. + 46 8 782 28 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2017/050461

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Dong Men et al., "Seeding-induced self-assembling protein nanowires dramatically increase the sensitivity of immunoassays", Nano Letters, 2009, vol. 9, no. 6, pages 2246-2250; See the whole document --	1-20
Y	Dong Men et al., "An auto-biotinylated bifunctional protein nanowire for ultra-sensitive molecular biosensing", Biosensors and Bioelectronics, 2010, vol. 26, pages 1137-1141; See the whole document --	1-20
Y	Yan Leng et al., "Integration of a fluorescent molecular biosensor into self-assembled protein nanowires : A large sensitivity enhancement", Angew. Chem. Int. Ed., 2010, vol. 49, pages 7243-7246; See the whole document --	1-20
Y	CN 101624568 A (WUHAN VIROLOGY ACAD INST SINICA), 13 January 2010 (2010-01-13); See the English machine translation --	1-20
A	Ghose S et al., "Binding capacity differences for antibodies and Fc-fusion proteins on protein A chromatographic materials", Biotechnology and Bioengineering, 2007, vol. 96, no. 4, pages 768-779; See page 776, left column and page 778, left column --	1-20
A	Ghisaidoobe A.BT. et al., "Functionalized protein nanocages as a platform of targeted therapy and immunodetection", Nanomedicine, 2015, vol. 10, no.24, pages 3579-3595; See page 3583 --	1-20
A	Hauser C.A.E et al., "Amyloid-based nanosensors and nanodevices", Chem. Soc. Rev., 2014, vol. 43, pages 5326-5345; See the whole document --	1-20
A	Nelson JT et al., "Mechanism of immobilized protein A binding to immunoglobulin G on nanosensor Array Surfaces", Analytical Chemistry, 2015, vol. 87, pages 8186-8193; See the whole document --	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2017/050461
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Schmuck B et al., "A fine-tuned composition of protein nanofibrils yields an upgraded functionality of displayed antibody binding domains", Biotechnology Journal, 2017, 12, 1600672, pages 1-13; See the whole document -- -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2017/050461

Continuation of: second sheet

International Patent Classification (IPC)

C07K 19/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

C07K 14/395 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/SE2017/050461

WO	2005118633 A2	15/12/2005	US	20060105320 A1	18/05/2006
CN	101624568 A	13/01/2010	NONE		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2017/050461
--

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

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

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 N 15/62 (2006.01) C 1 2 N 15/62 Z

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

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 ハード, トーレイフ

スウェーデン国, エスイー 7 5 3 1 7 ウプサラ, サガルガータン 8 シー

(72)発明者 サンドグレン, マッツ

スウェーデン国, エスイー 7 5 6 5 5 ウプサラ, ラベニウスヴァーゲン 2 0

(72)発明者 シュムック, ベンジャミン

スウェーデン国, エスイー 7 5 4 2 8 ウプサラ, カリン ボイエガータン 6 イー

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA10 EA50 FA74 GA21

专利名称(译)	抗体结合纳米纤维		
公开(公告)号	JP2019525889A	公开(公告)日	2019-09-12
申请号	JP2018560003	申请日	2017-05-08
申请(专利权)人(译)	沙格伦，垫		
[标]发明人	サンドグレンマツ		
发明人	ハード,トーレイフ サンドグレン,マツツ シュムツク,ベンジャミン		
IPC分类号	C07K17/00 G01N33/531 C07K14/395 C07K1/22 C07K19/00 C12N15/62		
CPC分类号	C07K1/22 C07K14/31 C07K14/395 C07K16/00 C07K16/065 C07K2319/00 C07K19/00 G01N33/54346 G01N2610/00 C07K2319/30 G01N33/531		
FI分类号	C07K17/00.ZNA G01N33/531.Z C07K14/395 C07K1/22 C07K19/00 C12N15/62.Z		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA10 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA21		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	1650661 2016-05-17 SE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

该实施方案涉及通过以在1：0.20至1：0.90的范围内选择的摩尔比共原纤化载体蛋白和载体-Z融合蛋白而获得的抗体结合纳米原纤维。抗体结合纳米纤维具有非常高的抗体结合能力，因此可以用于各种应用，例如医学领域或实验室诊断应用中的抗体纯化和生物标志物检测。[选择图]图6

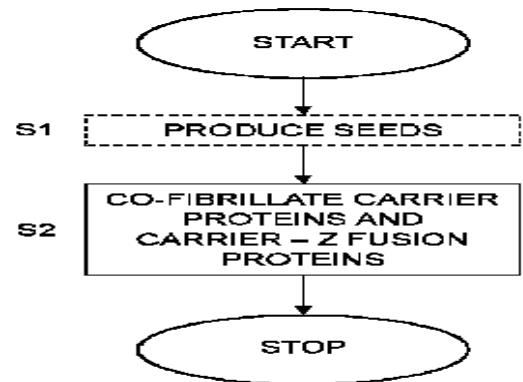


Fig. 6