

(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2019-508366
(P2019-508366A)

(43) 公表日 平成31年3月28日(2019.3.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00 ZNA	4B050
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	4C084
C07K 7/08 (2006.01)	C07K 7/08	4C085
C07K 14/00 (2006.01)	C07K 14/00	4H045
C12N 9/00 (2006.01)	C12N 9/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-531168 (P2018-531168)
 (86) (22) 出願日 平成28年12月13日 (2016.12.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年7月18日 (2018.7.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/080847
 (87) 国際公開番号 W02017/102759
 (87) 国際公開日 平成29年6月22日 (2017.6.22)
 (31) 優先権主張番号 15200111.1
 (32) 優先日 平成27年12月15日 (2015.12.15)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100106208
 弁理士 宮前 徹
 (74) 代理人 100120112
 弁理士 中西 基晴

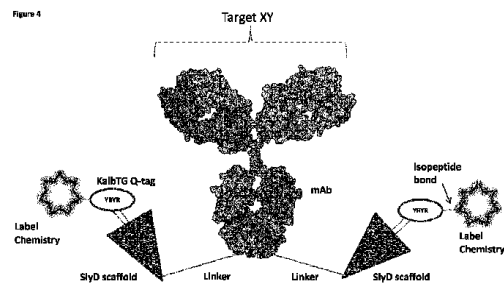
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスグルタミナーゼ認識部位を有するFKBPドメイン

(57) 【要約】

本発明は、FKBPポリペプチドのFKBPドメインのアミノ酸配列を含む組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質であって、その「インサートインフラップ」(IF)ドメインが、ペプチド配列X-YR YRQ-X₂(配列番号1)のYR YRQ部分と少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含むアミノ酸5~20個のアミノ酸配列(「Q-タグ」)で少なくとも一部置換されており、前記TG基質がKutzneria albidata TGのTG機能に対する基質である、組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質に関する。本発明はさらに、前記基質の使用に関する。

【選択図】 図4



【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の一般式 I



による組換えトランスグルタミナーゼ (TG) 基質であって、

F* が、FKBPポリペプチドのFKBPドメインのアミノ酸配列から選択され、その「インサートインフラップ」(IF)ドメインが、アミノ酸5~20個のアミノ酸配列(「Q-タグ」)で少なくとも一部置換されており、Q-タグがペプチド配列X₁-YRYRQ-X₂(配列番号1)のYRYRQ部分と少なくとも80%の配列同一性を有する連続する5個のアミノ酸のサブ配列を含み、X₁およびX₂が存在またはリンカーアミノ酸を構成し；

Lが存在またはリンカーアミノ酸配列から選択され；

Xが目的タンパク質であり；

yが1~100の整数であり、

前記TG基質が、配列番号23によるKutzneria albida TGのTG機能に対する基質である、

前記組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質。

【請求項2】

前記FKBPドメインが、FKBP12、AIP、AIPL1、FKBP1A、FKBP1B、FKBP2、FKBP3、FKBP5、FKBP6、FKBP7、FKBP8、FKBP9、FKBP9L、FKBP10、FKBP11、FKBP14、FKBP15、FKBP52、LOC541473、およびSLYD、およびこれらのFKBPドメインのホモログから選択される真核生物または細菌FKBPポリペプチドから選択される、請求項1に記載の組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質。

【請求項3】

前記FKBPドメインが、約120~170個、好ましくは約130~160個、および最も好ましくは約145~155個の、前記FKBPポリペプチドのN末端アミノ酸を含む、請求項1または2に記載の組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質。

【請求項4】

前記FKBPドメインがSLYDポリペプチドのN末端アミノ酸1~64および123~149を含み、アミノ酸65~122が前記Q-タグで置換されている、請求項1から3のいずれか1項に記載の組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質。

【請求項5】

前記リンカー配列Lが1~20個のアミノ酸を含み、好ましくは前記アミノ酸が、FKBPドメインおよび/または目的タンパク質を本質的に妨害しない、請求項1から4のいずれか1項に記載の組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質。

【請求項6】

前記目的タンパク質が、酵素、ウイルスタンパク質などの抗原、抗体またはその断片、およびその他の免疫学的結合相手から選択される、請求項1から5のいずれか1項に記載の組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質。

【請求項7】

目的タンパク質を標識化するインビトロ方法であって、

a) 目的タンパク質と結合させた、請求項1から6のいずれか1項に記載の組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質を用意するステップ、

b) 有効量の、好ましくは配列番号23による、Kutzneria albidaのトランスグルタミナーゼを用意するステップ、

c) 例えばリジンなどの、アルキル-アミン基を含む、結合させる適切な標識を用意するステップ、および、

d) a)~c)による前記成分を接触させ、それにより前記トランスグルタミナーゼが前記標識を前記基質に結合させるステップ、

10

20

30

40

50

を含む、前記インビトロ方法。

【請求項 8】

Kutzneria albidia の前記トランスグルタミナーゼが組換え産生される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記標識が、酵素、ビオチン、放射性基、蛍光色素などの色素、同位体、化学発光標識、および金属から選択される、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記標識化が、標識および目的タンパク質の化学量論比、例えば約 1 : 1 で実現される、請求項 7 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記目的タンパク質が、酵素、ウイルスタンパク質などの抗原、抗体またはその断片、およびその他の免疫学的結合相手から選択される、請求項 7 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 7 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法に従って産生される、少なくとも 1 つの標識された目的タンパク質を、薬学的に許容される担体化合物とともに含む医薬組成物または診断用組成物。

【請求項 13】

前記目的タンパク質が、標識および目的タンパク質の化学量論比、例えば約 1 : 1 で標識される、請求項 12 に記載の医薬組成物または診断用組成物。

20

【請求項 14】

請求項 12 または 13 に記載の診断用組成物を、任意選択で、イムノアッセイを実施するためのその他の成分とともに含む診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、FKBP ポリペプチドの FKBP ドメインのアミノ酸配列を含む組換えトランスグルタミナーゼ (TG) 基質であって、その「インサートインフラップ (insert-in-flap)」(IF) ドメインが、ペプチド配列 $X_1 - YRYRQ - X_2$ (配列番号 1)、特にこのペプチド配列の YRYRQ 部分と少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含むアミノ酸 5 ~ 20 個のアミノ酸配列 (「Q-タグ」) で少なくとも一部置換されており、前記 TG 基質が *Kutzneria albidia* TG (KalbTG) の TG 機能に対する基質である、組換えトランスグルタミナーゼ (TG) 基質に関する。本発明はさらに、前記基質の使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

インビトロでの診断検査には、可溶性および/または免疫反応性の抗原およびそのバリエーションが必須である。例として、HIV-1 感染症を検出するために、ウイルス外被タンパク質 gp41 の組換えおよび可溶性バリエーションが使用される。

40

【0003】

免疫反応性抗原およびそのバリエーションに必要な溶解性は、有効なアッセイの設計における難題となる場合があるが、ペプチジルプロリルイソメラーゼ (PPIアーゼ) 活性を有する 1 つまたは複数のシャペロンユニットと融合させることにより改善することができる。スキャホールドにより提示されるポリペプチドドメインを操作するための、タンパク質スキャホールドを使用する技術が、抗体および抗体断片の分野で既知である。このように、抗体の抗原結合領域の可変ループなどのドメインを大きく操作して、既知の標的への結合性 (例えば親和性および/または特異性) が改善されたアミノ酸配列セグメントが産生されてきた (WO 2014/071978 を参照のこと)。

【0004】

50

FK506結合タンパク質(FKBP)は、酵母からヒトまで多くの真核生物で確認されており、プロリン残基を含むタンパク質のタンパク質フォールディングシャペロンとして機能する。シクロフィリンとともに、FKBPはイムノフィリンファミリーに属する。ヒトゲノムでは、そのセグメントが、強力な免疫抑制性マクロライドであるFK506またはラパマイシンの標的である12kDaのタンパク質の配列と有意な相同性を有するタンパク質15種がコードされている。FKBP-12として知られる、FK506結合タンパク質(FKBP)の12kDaの原型は豊富に存在する細胞内タンパク質である。FKBP12は、プロリンcis/transコンフォメーション相互転換を触媒するPPiアーゼとして機能する。FKBPは、タンパク質フォールディング、細胞シグナル伝達、アポトーシスおよび転写を含む様々な細胞の機能に参与する。FKBPは、標的タンパク質に直接結合してコンフォメーションを変化させることによりその機能を引き出し、したがって分子スイッチとして作用する。

10

【0005】

細菌slyD遺伝子は、FKBP型ペプチジル-プロリンcis-transイソメラーゼ(PPiアーゼ)をコードする。SlyDは、分子シャペロン、プロリンcis/transイソメラーゼ、およびニッケル結合タンパク質として機能する2ドメインの細菌タンパク質である。SlyDの一方のドメインに存在するシャペロン機能はツインアルギニン移行に参与し、タンパク質フォールディングにおけるプロリンcis/transイソメラーゼドメインの触媒効率を2桁増加させる。

20

【0006】

SchlapschyおよびSkerra(Periplasmic chaperones used to enhance functional secretion of proteins in E. coli. Methods Mol Biol. 2011;705:211~24にて)は、Escherichia coliにおいて、組換え遺伝子産物のフォールディング、およびタンパク質凝集すなわち封入体形成に関する問題に頻繁に直面することについて開示している。このことは特に、抗体断片、サイトカイン、増殖因子、および真核生物細胞表面受容体の細胞外断片を含む、構造上ジスルフィド結合を有するタンパク質に当てはまる。したがって彼らは、確立された4種のペリプラズムシャペロンおよび/またはフォールディング触媒:ジスルフィド架橋の形成および異性体化を触媒するチオール-ジスルフィドオキシドレダクターゼDsbAおよびDsbC、ならびにシャペロン活性を有する2種のペプチジル-プロリンcis/transイソメラーゼ、FkpAおよびSurAの過剰発現をもたらすヘルパープラスミドpTUM4を開発した。

30

【0007】

E. coli SlyDおよびFKBP12(野生型および突然変異体C23AおよびC23S)は、E. coliにおいて可溶性形態として高収量で組換え産生可能である(Standaert, R.F.,ら、Nature 346(1990)671~674)。好熱性生物由来FKBPおよびE. coli SlyDは、E. coliでのキメラポリペプチドの組換え発現においてシャペロンとして使用可能である(Ideno, A.,ら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 64(2004)99~105)。E. coli SlyDおよびFKBP12ポリペプチドは、ポリペプチドを可逆的にフォールディングさせる(Scholz, C.,ら、J. Biol. Chem. 271(1996)12703~12707)。Low, C.,ら、J. Mol. Biol. 398(2010)375~390は、Thermus thermophilus由来の金属シャペロンSlyDの結晶構造および機能的特徴について報告している。Thermus thermophilusは、2つの機能性ユニットに相当する2つのドメインからなる。PPiアーゼ活性は典型的なFKBPドメインに存在し、シャペロン機能は自律的にフォールディングされたインサートインフラップ(IF)ドメインに関連する。これら2つの分離したドメインは溶液中で安定かつ機能性である。

40

50

【0008】

Kovermannら (Kovermann M, Schmid FX, Balbach J. Molecular function of the prolyl cis/trans isomerase and metallochaperone SlyD. Biol Chem. 2013 Aug; 394(8): 965~75にて) は、SlyDが分子シャペロン、プロリルcis/transイソメラーゼ、およびニッケル結合タンパク質として機能する2ドメインの細菌タンパク質であることを開示している。彼らは、SlyDの分子酵素機構についての最近の発見をまとめている。SlyDの一方のドメインに存在するシャペロン機能はツインアルギニン移行に関与し、タンパク質フォールディングにおけるプロリルcis/transイソメラーゼドメインの触媒効率を2桁増加させる。

10

【0009】

FKBP12ポリペプチドのアミノ酸配列は、60位に単一のトリプトファン残基を含む。したがって、トリプトファン蛍光を分析するだけで、FKBP12突然変異体を構造上の完全性について分析することができる (DeCenzo, M.T., ら, Protein Eng. 9 (1996) 173~180)。残ったロタマーゼ (rotamase) 活性を決定することで、FKBP12突然変異体の残った酵素活性についての試験を実施することができる (Brecht, S., ら, Neuroscience 120 (2003) 1037~1048; Schories, B., ら, J. Pept. Sci. 13 (2007) 475~480; Timerman, A.P., ら, J. Biol. Chem. 270 (1995) 2451~2459)。FK506またはラパマイシンとの結合について決定することでも、FKBP12突然変異体の構造上の完全性を決定することができる (DeCenzo, M.T., ら, Protein Eng. 9 (1996) 173~180)。

20

【0010】

Geitnerら (Geitner AJ1, Varga E, Wehmer M, Schmid FX. Generation of a highly active folding enzyme by combining a parvulin-type prolyl isomerase from SurA with an unrelated chaperone domain. J Mol Biol. 2013 Nov 15; 425(22): 4089~98にて) は、フォールディング酵素の触媒ドメインとして機能する低分子プロリルイソメラーゼとしてのパルブリン (parvulin) について開示している。Escherichia coliのペリプラズム由来のSurA (survival protein A) は、不活性 (Par1) および活性 (Par2) パルブリンドメイン、ならびにシャペロンドメインからなる。シャペロンドメインが存在しない状態では、Par2のフォールディング活性は実質的に失われる。彼らは、FKBPファミリーにおける無関係のフォールディング酵素であるSlyDのシャペロンドメインを、SurAの分離したPar2ドメインのループに挿入することによりキメラタンパク質を作り出した。これにより、Par2がその天然のシャペロンドメインと結合しているSurAの活性より大きい値まで、Par2のフォールディング活性が450倍増加した。天然および外来性のシャペロンドメイン両方が存在する状態では、Par2のフォールディング活性が1500倍増加した。このように、関連するシャペロンドメインも無関係のシャペロンドメインも、プロリルイソメラーゼPar2のフォールディング活性を増強するのに同様に効率的である。各種シャペロンドメインの配列分析により、可動鎖領域 (mobile chain region) において曝露されるメチオニン残基のクラスターが、フォールディングされていないタンパク質鎖との全体的な相互作用において重要である可能性があることが示唆される。この結合は非常にダイナミックであり、フォールディングしつつあるタンパク質鎖がシャペロンおよび触媒ドメイン間を頻繁に移行することができる。

30

40

【0011】

50

免疫学的診断システムでは、抗原および/もしくは抗体またはその他の免疫学的結合相手(目的タンパク質)が大抵、これらの検出のため、例えばビオチン(ストレプトアビジンと固定化させるため)、またはルテニウムなどのその他の標識とさらにコンジュゲートされる。通常、このようなマーカーを反応性のアミノまたはスルフヒドリル部分とコンジュゲートさせるのには化学的方法が使用される。

【0012】

不運なことに、タンパク質改変における従来の化学的戦略は制御が困難であり、それぞれが各自のインビボでの特徴を有する、可変の化学量論組成での不均一なイムノコンジュゲート集団を生じさせる。さらに、コンジュゲートされる分子または標識の数が制御不可能であり、そのため規定されず、通常は正規分布に従うことにより、反応を定量化しようとする問題が起こる。

10

【0013】

部位特異的かつ化学量論的なタンパク質改変のための、人工の生体直交性基(bio-orthogonal group)の導入は、この問題に対し見込みのある解決策をもたらす。このような戦略は流行しているものの、大抵は労力を要し、産物が不均一となるおそれが依然としてある。さらに、系の成分全てが、長期間およびコンジュゲーション条件下で安定でなければならず、また安定なままでなければならない。また、コンジュゲーションの位置/場所を制御することができない。例えばタンパク質の活性中心、もしくはその近くに、または免疫学的活性を媒介する位置、もしくはその位置近くにマーカーを非特異的に含めると、免疫反応性が妨害されるか、これが完全に阻害されることさえありうる。

20

【0014】

マーカーを、酵素により部位特異的にコンジュゲートさせる方法は既知である(例えばソルターゼ、MTG)が、これらには、標識化される目的タンパク質にさらなる特異的な認識配列(タグ配列)の存在が必要である。

【0015】

微生物トランスグルタミナーゼ(MTG)は、多くの食品およびバイオテクノロジー用途でのタンパク質およびペプチドの架橋において最も重要な酵素の1つである。MTGは最初に生物*Streptomyces mobaraensis*で発見され、後にこれより抽出された。組換え産生された*Streptomyces mobaraensis* MTGは、今日工業的に使用されるMTGのバルクの代表例である。この酵素は、アシル基、例えばグルタミン(Q)側鎖と、アルキル-アミン、例えばリジン(K)側鎖との間のイソペプチド結合の形成を触媒する。反応性アミン基が存在しない状態では、水との酵素反応でグルタミン側鎖の脱アミノが起こる。この細菌酵素は、 Ca^{2+} またはGTPなどの補因子の添加なしに、広範なpH、緩衝液および温度条件で作用する。MTGは治療用抗体-薬物コンジュゲートの開発に既に使用されているが、酵素の特異性が低いため、このようなMTG媒介性コンジュゲートの大規模産生は未だ確立されていない。既知の活性な微生物トランスグルタミナーゼの全ての種類が、38kDa超の分子量を示す。天然に存在する架橋酵素であるため、微生物トランスグルタミナーゼは、アミン供与体分子に対しては広範な基質特異性を示し、アシル供与体に対しては比較的低い特異性を示す。*Streptomyces mobaraensis*由来の酵素およびホモログ酵素の基質特異性が知られているのみであるため、生体直交性コンジュゲーション手法、例えば、2つ以上の異なる標識-基質および2種類以上のトランスグルタミナーゼを使用する、生体分子の同時標識化は現時点では不可能である。

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

上記のことを考慮して、本発明の目的は、免疫学的診断システムおよび/または治療システムならびに免疫学的診断法および/または治療法の状況における、抗原および/または抗体またはその他の免疫学的結合相手(目的タンパク質)の効率的かつ制御された標識

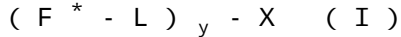
50

化を提供するための新規の手段および方法を提供することである。その他の態様および目的は、本発明についての以下のより詳細な記載を読めば当業者には明らかとなるはずである。

【課題を解決するための手段】

【0017】

その第1の態様によれば、上記の目的は、以下の一般式 I



による組換えトランスグルタミナーゼ (TG) 基質を提供することによって解決される。

【0018】

前記式 (I) において、 F^* は、好ましくは、未改変のポリペプチドでは、FK506 結合タンパク質 (FKBP) 型のプロリルイソメラーゼである宿主ドメインの表面ループにゲストとして内部に挿入されている「インサートインフラップ」(IF) ドメインを含む、FKBP ポリペプチドの FKBP ドメインのアミノ酸配列から選択される。それにも関わらず、本発明は、Q-タグが酵素の相同な位置に挿入された、「インサートインフラップ」(IF) ドメインを天然に (未改変では) 含まない FKBP ドメインも含む (例えば、以下の Knappe を参照のこと)。

【0019】

前記「インサートインフラップ」(IF) ドメインは、連続する5個のアミノ酸のサブ配列 (sub-sequence) を含む5~20個の長さのアミノ酸を有するアミノ酸配列 (「Q-タグ」) で少なくとも一部置換されており、サブ配列はペプチド配列 $X_1 - YRYRQ - X_2$ (配列番号1) と、特にペプチド配列 $X_1 - YRYRQ - X_2$ (配列番号1) の YRYRQ 部分と少なくとも80%の配列同一性を有し、 X_1 および X_2 は不存在かリンカーアミノ酸を構成する。具体的な実施形態において、IF ドメインは、5~15個または5~20個の長さのアミノ酸を有する $X_1 - YRYRQ - X_2$ (配列番号1) (「Q-タグ」) で少なくとも一部置換されており、Q-タグはアミノ酸5個の連続するサブ配列 (すなわち連続する5個のアミノ酸残基からなるサブ配列) を含み、サブ配列はペプチド配列 $X_1 - YRYRQ - X_2$ (配列番号1) の YRYRQ 部分と少なくとも80%の配列同一性を有し、 X_1 および X_2 は不存在かリンカーアミノ酸を構成する。

【0020】

より具体的な実施形態においては、 X_1 のみが不存在であり、ペプチド配列 $X_1 - YRYRQ - X_2$ の長さがアミノ酸6~15個または6~20個である。さらにより具体的な実施形態において、 X_2 は、YRYRQ サブ配列または YRYRQ 部分と少なくとも80%の配列同一性を有するサブ配列の後に直接、アルギニン残基を含む (か、これらからなっていてよい)。

【0021】

さらに非常に具体的な実施形態において、ペプチド配列 $X_1 - YRYRQ - X_2$ (配列番号1) の YRYRQ 部分と少なくとも80%の配列同一性を有する連続する5個のアミノ酸残基からなるサブ配列において、グルタミン残基がサブ配列の選択された位置にあり、サブ配列におけるその位置は、第3位、第4位、第5位、およびそれらの組合せからなる群から選択される。

【0022】

さらに非常に具体的な実施形態において、ペプチド配列 $X_1 - YRYRQ - X_2$ (配列番号1) の YRYRQ 部分と少なくとも80%の配列同一性を有する連続する5個のアミノ酸残基からなるサブ配列において、アルギニン残基がサブ配列の選択された位置にあり、サブ配列におけるその位置は、第4位、第5位、およびそれらの組合せからなる群から選択される。

【0023】

本発明によれば、リンカーアミノ酸 X_1 および X_2 がもしあれば、互いに独立に選択されることがさらに理解される。

配列 $X_1 - YRYRQ - X_2$ (配列番号1)、 $X_1 - RYRQR - X_2$ (配列番号2)

10

20

30

40

50

、 $X_1 - R Y S Q R - X_2$ (配列番号3)、 $X_1 - F R Q R Q - X_2$ (配列番号4)、 $X_1 - R Q R Q R - X_2$ (配列番号5)、 $X_1 - F R Q R G - X_2$ (配列番号6)、 $X_1 - Q R Q R Q - X_2$ (配列番号7)、 $X_1 - Y K Y R Q - X_2$ (配列番号8)、 $X_1 - Q Y R Q R - X_2$ (配列番号9)、 $X_1 - Y R Q T R - X_2$ (配列番号10)、 $X_1 - L R Y R Q - X_2$ (配列番号11)、 $X_1 - Y R Q S R - X_2$ (配列番号12)、 $X_1 - Y Q R Q R - X_2$ (配列番号13)、 $X_1 - R Y T Q R - X_2$ (配列番号14)、 $X_1 - R F S Q R - X_2$ (配列番号15)、 $X_1 - Q R Q T R - X_2$ (配列番号16)、 $X_1 - W Q R Q R - X_2$ (配列番号17)、 $X_1 - P R Y R Q - X_2$ (配列番号18)、 $X_1 - A Y R Q R - X_2$ (配列番号19)、 $X_1 - V R Y R Q - X_2$ (配列番号20)、 $X_1 - V R Q R Q - X_2$ (配列番号21)、および $X_1 - Y R Q R A - X_2$ (配列番号22)から選択され、 X_1 および X_2 が上記の通りである、本発明によるQ-タグが好ましい。

【0024】

驚くべきことに、IFドメインのFKBPドメイン上流および下流挿入の2つの部分 (the two parts of the FKBP domain upstream and downstream insertion of the IF domain) が、構造的に相当に強固かつ正確なスキャホールド、またはIFドメイン部分に挿入されるかつ/もしくはこれを置換する配列のための「カラー (collar)」、「ヘッド」、「Q-タグ」として機能することが発見された。このため、挿入/置換の提示および方向づけにより基質のその他の成分の任意のその他の機能、具体的には目的タンパク質 (X) の機能が実質的に妨害されることは、確実になくなる。さらに、この場合 - TG基質結合部位 (Q-タグ) の提示により、標識の高度に制御された化学量論的結合、したがって目的タンパク質の標識化につながる。

【0025】

式 (I) において、Lは不存在かリンカーアミノ酸配列から選択される。好ましくは、前記リンカー配列Lは1~20個のアミノ酸を含み、より好ましい前記アミノ酸は、FKBPドメインの機能 (具体的には置換/挿入) および/またはタンパク質 (目的s9) の機能 (例えば免疫学的機能) を本質的に阻害しない。

【0026】

Xは目的タンパク質を示し; 好ましくは酵素、ウイルスタンパク質などの抗原、抗体またはその断片、およびその他の免疫学的結合相手から選択される。

式 (I) において、yは1~100の整数であり、したがって、いくつかのマーカー基 $F^* - L$ が目的タンパク質に結合されうる。

【0027】

好ましくは、本発明による組換えトランスグルタミナーゼ (TG) 基質は、例えばNおよび/またはC末端に、ピオチン、マルトースまたはhisタグなどの、精製および/または固定化用タンパク質タグをさらに含んでよい。

【0028】

好ましくは、TG活性を使用する制御された基質標識化を可能にするため、基質 F^* 、Lおよび/またはXの様々な成分が互いに共有結合される。基質は融合タンパク質として組換え産生可能であり、例えば、細菌または酵母宿主細胞などの宿主細胞から発現および精製されうる。各方法は当業者にとって周知である。成分は、別々にまたは一部産生 (例えば合成) することもでき、次いで、状況および望ましい目的に応じて、共有結合またはコンジュゲートされる。

【0029】

本発明によれば、発明によるTG基質は、配列番号23によるKutzneria albidata TG、またはそのアミノ酸配列と少なくとも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%、98もしくは99%同一であり、本明細書に記載される実質的なTG活性を示す相同なタンパク質のトランスグルタミナーゼ (TG) 機能に対する基質である。好ましくは、TGポリペプチド、またはその、実質的なトランスグルタミナーゼ機能もしくは活性を有する一部が宿主細胞でクローニングおよび組換え産

生され、次いで、状況および望ましい目的に応じて（少なくとも一部）精製される。各方法は当業者に周知である。TG活性は、これも当業者に周知のアッセイを使用して測定することができる。本発明の文脈での「組換えTG基質」は、基質が概して天然には存在しないことを意味するものとする。

【0030】

本発明による組換えトランスグルタミナーゼ（TG）基質に使用されるFKBPドメインは、好ましくはFKBP12、AIP、AIPL1、FKBP1A、FKBP1B、FKBP2、FKBP3、FKBP5、FKBP6、FKBP7、FKBP8、FKBP9、FKBP9L、FKBP10、FKBP11、FKBP14、FKBP15、FKBP52、LOC541473、およびSLYD、および、これらのアミノ酸配列と少なくとも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、98または99%同一であり、Q-タグの挿入に適した、これらのFKBPドメインのホモログから選択される真核生物または細菌FKBPポリペプチドから選択される。各ドメインを、本明細書および文献に記載されるように、例えば、具体的には構造上のアラインメントを特定するためアラインメントプログラムを使用して、その適合性について分析することができる。

10

【0031】

一実施形態において、本発明による組換えトランスグルタミナーゼ（TG）基質に使用されるFKBPドメインは、PPIアーゼ活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列を含む。PPIアーゼ活性を有するポリペプチドは、原核生物または真核生物起源であるか、それらの人工のバリエーション（突然変異体）としての、PPIアーゼ活性を有するポリペプチドである。PPIアーゼ活性を有するポリペプチドの人工のバリエーションは、タンパク質工学の最新技術による技術で生成可能である。本発明によれば、PPIアーゼ活性を有するポリペプチドの人工のバリエーションは、例えば1つまたは複数のアミノ酸の置換、付加または欠失を特徴とする。具体的な実施形態では、本発明による組換えトランスグルタミナーゼ基質に使用されるFKBPドメインのPPIアーゼ活性および/またはシャペロン機能が、人工のバリエーションで保存される。

20

【0032】

Knappeら（Knappe TA、Eckert B、Schaarschmidt P、Scholz C、Schmid FX. Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding. J Mol Biol. 2007 May 18; 368(5): 1458~68. Epub 2007 Mar 14にて）は、プロリルイソメラーゼとしてのヒトFKBP12の触媒活性が、短いペプチドに対しては高いがプロリン制限性のタンパク質フォールディング反応では非常に低いことを開示している。対照的に、FKBPファミリーのメンバーであるSlyDタンパク質は、フォールディング酵素として非常に活性である。これらは、プロリルイソメラーゼ活性部位近くにさらなる「インサートインフラップ」つまりIFドメインを含む。このドメインを除去しても、短いペプチド基質に対するEscherichia coli由来のSlyDのプロリルイソメラーゼ活性に影響はなかったが、プロリン制限性タンパク質フォールディング反応では触媒活性が失われた。ヒトFKBP12にSlyDのIFドメインを相互挿入（reciprocal insertion）するとフォールディング活性が200倍増加し、SlyD自体よりも活性なフォールディング触媒が生じた。IFドメインはリフォールディングしつつあるタンパク質鎖に結合し、そのためシャペロンモジュールとして機能する。

30

40

【0033】

E. coliでは、SLYDのアミノ酸1~69がPPIアーゼドメインの第1の部分形成し、アミノ酸76~120がIF-シャペロン（ドメイン）を形成し、アミノ酸129~151がPPIアーゼドメインの第2の部分形成すると考えられている。したがって、アミノ酸1~151がFKBPドメインを形成する。アミノ酸152~196は金

50

属結合に關与する。

【0034】

前記FKBPドメインが、約120～170個、好ましくは約130～160個、および最も好ましくは約145～155個の長さの、前記FKBPポリペプチドのN末端アミノ酸を有する、本発明による組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質が好ましい。これは、IFドメイン配列を含む。

【0035】

本発明の文脈では、「約」は所与の値の+/-10%を意味するものとする。

前記FKBPドメインがSLYDポリペプチドのN末端アミノ酸1～64および123～149を含み、アミノ酸65～122が前記Q-タグで置換されている、請求項1から3のいずれか1項に記載の組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質が好ましい。

10

【0036】

上記の通り、リンカー配列Lは1～20個のアミノ酸、好ましくは1～10個のアミノ酸、より好ましくは1～5個のアミノ酸を含んでいてよく、好ましくは、前記アミノ酸はFKBPドメインおよび/または目的タンパク質を本質的に妨害しない。好ましいリンカーアミノ酸はグリシンまたはアラニンなどの低分子アミノ酸である。アミノ酸リンカーおよびそれらの組成物は当技術分野で既知である(例えばChichiliらLinkers in the structural biology of protein-protein interactions Protein Sci. 2013 Feb; 22(2): 153～167を参照のこと)。

20

【0037】

本発明の文脈において目的タンパク質とは、概して、本技術を使用して標識化されうるタンパク質全てである。前記目的タンパク質が、酵素、ウイルスタンパク質などの抗原、抗体またはその断片、およびその他の免疫学的結合相手から選択される、本発明による組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質が好ましい。本発明は、定量化が望ましい場合の免疫学的反応およびアッセイに特に使用される。

【0038】

次いで、本発明の別の態様は、目的タンパク質を標識化するインビトロ方法であって、a)目的タンパク質を含む、本発明による組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質を用意するステップ; b)本明細書に記載される、有効量の、Kutzneria albid aのトランスグルタミナーゼ(例えば配列番号23による)またはそのホモログを用意するステップ、c)例えばリジンなどの、アルキル-アミン基(「アミン供与体」)を含む適切な標識を用意するステップ、および、d) a)～c)による前記成分を接触させ、それにより前記トランスグルタミナーゼ(活性)が前記標識を前記基質に結合させるステップを含む、インビトロ方法に関する。

30

【0039】

本明細書に記載されるKutzneria albid aの前記トランスグルタミナーゼまたはそのホモログが、本明細書に記載されるように組換え産生される、本発明による方法が好ましい。

【0040】

本発明によるこの方法において、Q-タグ(任意選択でIF-ドメイン領域を置換)を含むF*基を含む基質は、Kutzneria albid aのトランスグルタミナーゼ活性を使用して標識化される。好ましくは、結合される標識は、酵素、ビオチン、放射性基(radioactive group)、蛍光色素などの色素、同位体、および金属から選択される。前記標識は、例えばリジンなどの、アルキル-アミン基を含む標識成分/化合物の一部である。最も好ましくは、前記標識成分/化合物は、ペプチド配列RYESKと少なくとも80%の配列同一性を有するアミン供与体タグ(「K-タグ」)を含む。好ましいK-タグおよびそれらの組成物の例は以下に記載され、文献でも見つけることができる。

40

【0041】

50

前記標識化が、制御され、かつ例えば、標識および目的タンパク質の化学量論比例例えば約1:1で実現される、本発明による方法が好ましい。2つまたは偶数倍の標識を単一/複数の目的タンパク質に結合させるため、さらなる酵素(例えばKalb-TG以外のTG)およびその他の各TG基質を使用して、複数標識化を実現することもできる。

【0042】

前記目的タンパク質が、酵素、ウイルスタンパク質などの抗原、抗体またはその断片、およびその他の免疫学的結合相手から選択される、本発明による方法が好ましい。本発明は、定量化が望ましい場合の免疫学的反応およびアッセイに特に使用される。

【0043】

目的タンパク質の選択は、療法、研究および/または診断のいずれかにおける、使用されるpiRNA分子の意図される用途によっても決まる。前記目的タンパク質が、がん、神経疾患、免疫疾患、アレルギー、代謝疾患、妊孕性(例えば繁殖率または数)、動物産生(例えば肉または乳の量)に関係する/を引き起こすタンパク質、細胞増殖および/もしくは発達、mRNA分解、翻訳抑制、ならびに/または転写遺伝子のサイレンシングに必須のタンパク質から選択される、本発明による方法が好ましい。

10

【0044】

次いで、本発明の別の態様は、本発明による少なくとも1つの組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質を、緩衝液などの、薬学的に許容される担体および成分とともに含む医薬組成物または診断用組成物に関する。2つまたは偶数倍の標識を単一/複数の目的タンパク質に結合させることができるように、さらなる酵素(例えばKalb-TG以外のTG)およびその他の各TG基質を含む、複数標識化のための医薬組成物または診断用組成物を得ることもできる。

20

【0045】

次いで、本発明の別の態様は、本発明による方法に従って産生される少なくとも1つの標識化された目的タンパク質を、緩衝液などの薬学的に許容される担体および成分とともに含む医薬組成物または診断用組成物に関する。

【0046】

前記目的タンパク質が、標識および目的タンパク質の化学量論比例例えば約1:1で標識化される、本発明による医薬組成物または診断用組成物が好ましい。2つまたは偶数のいくつかの標識を単一/複数の目的タンパク質に結合させることもできる。

30

【0047】

次いで、本発明の別の態様は、本発明による診断用組成物を、任意選択で、イムノアッセイを実施するためのその他の成分とともに含む診断用キットに関する。キットは、共同のまたは別々の容器に、微生物組換えトランスグルタミナーゼ、例えば本明細書に記載されるKutznerialbida微生物トランスグルタミナーゼと少なくとも80%の配列同一性を有する精製済み微生物トランスグルタミナーゼを含んでいてよい。キットは、ペプチド配列RYESKと少なくとも80%の配列同一性を有するアミン供与体タグを含む基質などの基質をさらに含んでいてよい。キットは、本発明による標識化されたまたは標識化されていない基質の使用が必要な反応(例えばイムノアッセイ)を実施するための説明書も含んでいてよい。

40

【0048】

本発明の別の態様は、具体的には、定量化が望ましい場合の免疫学的反応およびアッセイにおける、目的タンパク質を標識化するためのまたは目的タンパク質の標識化での、本発明による組換えトランスグルタミナーゼ(TG)基質、医薬組成物または診断用組成物、またはキットの使用に関する。

【0049】

本発明の方法は、インビボでもインビトロでも、具体的には実験動物でも培養物でも実施可能である。

これより、本発明について、添付の図を参照して以下の非限定的な例でさらに説明を行う。本発明において、本明細書で言及される全ての出版物、特許出願、特許、およびその

50

他の参考文献が、その全内容にわたって参照により組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】*Kutzneria albid*a由来のトランスグルタミナーゼのアミノ酸配列(データベース番号WP_030111976)、*E. coli*のslyDのアミノ酸配列、*Cyclobacteriaceae bacterium AK24*のslyDのアミノ酸配列、および*Bacteroidales bacterium*のslyDのアミノ酸配列を示す図である。

【図2】以下の実施例による、Cy3またはCy5を使用した標識化の結果を示す図である。図2Bは、6.2~9.0の範囲では比較的pH非依存であることを示す。

【図3】図3Aは、ルテニウム(*rhutenium*)で標識化された融合構築物の一般的な構造を示す図である。図3Aは、以下の実施例による、SDS-PAGEを使用した標識化の結果を示す図である。

【図4】本発明による、基質を標識化された目的タンパク質(ここでは、抗体の鎖2本)の好ましい実施形態を示す図である。

【図5-1】図5A:配列番号60の「TtSlyQD-Xa-gp21-8H」を示す概略図である。SlyD部分、さらに実施例で示す、融合タンパク質中のQ-タグ、および第Xa因子プロテアーゼの認識部位、および「gp21」部分が示される。星はルテニウム標識を象徴する。図5B:*Streptomyces mobaraensis*の細菌トランスグルタミナーゼによる、組換えgp21(HTLV)抗原の特異的および非特異的ルテニウム標識化について示す、SDS-PAGE分析後の結果を示す図である。Ru標識化後の、非標識化、一重標識化、二重標識化、および三重標識化された「TtSlyQD-Xa-gp21-8H」融合タンパク質が示される。

【図5-2】図5C:ルテニウム標識について示す図である。

【図6-1】図6A:*Elec*sysアッセイにおいて、配列番号62による標識化された「TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H」を使用した結果を示す図である。

【図6-2】図6B-D:*Elec*sysアッセイにおいて、配列番号62による標識化された「TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H」を使用した結果を示す図である。

【図6-3】図6E:*Elec*sysアッセイにおいて、配列番号62による標識化された「TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H」を使用した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0051】

配列番号1~22は、本発明の文脈で特定されるQ-タグモチーフの配列を示し、N末端のXは上記の通りX₁、C末端のXは上記の通りX₂である。

配列番号23は、*Kutzneria albid*a由来のトランスグルタミナーゼのアミノ酸配列(データベース番号WP_030111976)を示す。

【0052】

配列番号24は、*E. coli*のslyDのアミノ酸配列を示す。

配列番号25は、*Cyclobacteriaceae bacterium AK24*のslyDのアミノ酸配列を示す。

【0053】

配列番号26は、*Bacteroidales bacterium CF*のslyDのアミノ酸配列を示す。

配列番号27は、*E. coli*のslyDのFKBPドメインのアミノ酸配列を示す。

【0054】

配列番号28は、*E. coli*のFKBP16のFKBPドメインのアミノ酸配列を示す。

10

20

30

40

50

配列番号29は、*Thermus thermophilus*のslyDのFKBPドメインのアミノ酸配列を示す。

【0055】

配列番号30～51は、N末端およびC末端アミノ酸が1つの例示的なグリシンリンカーである、本発明の文脈で特定されるQ-タグモチーフの配列を示す。

配列番号52は、slyDのFKBPドメインに組換えにより移植された、KaltbTGグルタミン供与体配列のアミノ酸配列を示す。

【0056】

配列番号53は、トランスグルタミナーゼリジン供与体配列(K-タグ)のアミノ酸配列を示す。

10

配列番号54はslyDアミノ酸配列を示す。

【0057】

配列番号55は、MTG Q-タグを有するslyDのアミノ酸配列を示す。

配列番号56は、KaltbTG Q-タグを有するslyDのアミノ酸配列を示す。

配列番号57はslpAアミノ酸配列を示す。

【0058】

配列番号58は、主要なHTLV抗原およびウイルスエンベロープ糖タンパク質アミノ酸配列「gp21」を示す。

配列番号59は、イムノアッセイにおけるより良好な溶解性、安定性および反応性のために操作された、改変「gp21」エクトドメインポリペプチド配列のアミノ酸配列を示す。

20

【0059】

配列番号60は、組換え融合タンパク質「TtslyQD-Xa-gp21-8H」のアミノ酸配列を示す。

配列番号61は、組換え融合タンパク質「TtslyD-Xa-gp21-8H」のアミノ酸配列を示す。

【0060】

配列番号62は、組換え融合タンパク質「TtslyKQD-slpA-Xa-gp21-8H」のアミノ酸配列を示す。

【実施例】

30

【0061】

IFドメインの位置の特定

基本的には、例えばプログラムClustal Omegaを使用して、置換される(または付加される)IFドメインの位置を特定するため、FKBPドメインのアミノ酸配列の一次構造のアラインメントを使用することができる。ドメインが構造的に保存されたエレメントを構成することから、特に非細菌FKBPに関しては、代替法は3D構造のアラインメントである(例えばプログラムPyMolを使用して)。

【0062】

具体的な例は以下の通りである：

Escherichia coli (株K12) FKBPドメインのSLYD_ECOLLIFKBP型ペプチジル-プロリルcis-transイソメラーゼslyD、IFドメインに二重下線を引いてある。

40

【0063】

【化1】

MKVAKDLVVSLAYQVRTEDGVLVDESPVSAPLDYLGHGGS
 LISGLETALEGHEVGDKFDVAVGANDAYGQYDENLVQRVP
KDVFMGVDELQVGMRFLAETDQGPVPVEITAVEDDHVVVD
GNHMLAGQNLKFNVEVVAIREATEEELAHGHVHGAHDHHH
 DHDHD (配列番号27)。

10

【0064】

Escherichia coli (株K12)FKBPドメインのECOLI FKBP型16kDaペプチジル-プロリルcis-transイソメラーゼ、IFドメインに二重下線を引いてある。

【0065】

【化2】

MSESVQSNSAVLVHFTLKLDDGTTAESTRNNGKPALFRLG
 DASLSEGLEQHLLGLKVGDKTTFSLPDAAFGVSPDLIQ
YFSRREFMDAGEPEIGAIMLFTAMDGSEMPGVIREINGDS
ITVDFNHPLAGQTVHFDI EVLEIDPALEA (配列番号28)。

20

【0066】

Thermus thermophilus (株HB8/ATCC27634)FKBPドメインのペプチジル-プロリルcis-transイソメラーゼ、IFドメインに二重下線を引いてある。

【0067】

【化3】

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGL
 EEALEGREGGEAFQAHVPAEKAYGPHDPEGVQVVPLSAFP
EDAEVVPGAQFYAQDMEGNPMPLTVVAVEGEEVTVDFNHP
LAGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAH (配列番号29)。

30

【0068】

KalbtGに対するQ-タグ配列の分析

NおよびC末端グリシン残基3つ(G_1 および G_2)が結合した5-merアミノ酸配列を含む一連のペプチドを用いた標識化アッセイを使用して特定されたKalbtGペプチド基質の分析により、これらの基質が共有する一連の特徴が明らかとなった。具体的な例は以下の通りであった：

G_1 - YRYRQ - G_2 (配列番号30)、 G_1 - RYRQR - G_2 (配列番号31)、
 G_1 - RYSQR - G_2 (配列番号32)、 G_1 - FRQRQ - G_2 (配列番号33)、
 G_1 - RQRQR - G_2 (配列番号34)、 G_1 - FRQRG - G_2 (配列番号35)、
 G_1 - QRQRQ - G_2 (配列番号36)、 G_1 - YKYRQ - G_2 (配列番号37)、
 G_1 - QYRQR - G_2 (配列番号38)、 G_1 - YRQTR - G_2 (配列番号39)、

40

50

G₁ - L R Y R Q - G₂ (配列番号40)、G₁ - Y R Q S R - G₂ (配列番号41)、
 G₁ - Y Q R Q R - G₂ (配列番号42)、G₁ - R Y T Q R - G₂ (配列番号43)、
 G₁ - R F S Q R - G₂ (配列番号44)、G₁ - Q R Q T R - G₂ (配列番号45)、
 G₁ - W Q R Q R - G₂ (配列番号46)、G₁ - P R Y R Q - G₂ (配列番号47)、
 G₁ - A Y R Q R - G₂ (配列番号48)、G₁ - V R Y R Q - G₂ (配列番号49)、
 G₁ - V R Q R Q - G₂ (配列番号50)、およびG₁ - Y R Q R A - G₂ (配列番号51)。

【0069】

Kal b T Gについて、式X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - X a a₄ - X a a₅を有する5-merアミノ酸配列を含むアシル供与体基質が、X a aが任意のアミノ酸である場合に、概していくつかの設計ルールに従うことがデータより明らかとなった。まず、各5-mer配列は少なくとも1つのグルタミン(Q)を含んでいた。より具体的には、5-mer配列の第3、第4、および第5位(すなわち、X a a₃、X a a₄、およびX a a₅)のうち少なくとも1つがグルタミンであった。第3および第5位のそれぞれにグルタミンを含む配列がいくつか観察された。さらに、各5-mer配列が少なくとも1つのアルギニン(R)を含むことが観察された。より具体的には、5-mer配列の第4および第5位(すなわち、X a a₄およびX a a₅)のうち少なくとも1つがアルギニンであった。

10

【0070】

標識化アッセイ

1. 蛍光色素

標識化アッセイでは、Thermus thermophilus由来のシャペロンSlyD(Universal Protein Resource(UniProt)番号Q5SLE7)を、Kal b T Gに対する標識化スキャホールドとして使用した。SlyD配列は:

M K V G Q D K V V T I R Y T L Q V E G E V L D Q G E L S Y L H G H R N L I P G L
 E E A L E G R E E G E A F Q A H V P A E K A Y G P H D P E G V Q V V P L S A F P
 E D A E V V P G A Q F Y A Q D M E G N P M P L T V V A V E G E E V T V D F N H P
 L A G K D L D F Q V E V V K V R E A T P E E L L H G H A H (配列番号29)

である。

30

【0071】

Kal b T Gグルタミン供与体配列(Q-タグ、下線)を、SlyDのFKBPドメインに組換えにより移植し、以下のポリペプチド配列を得た:

M K V G Q D K V V T I R Y T L Q V E G E V L D Q G E L S Y L H G H R N L I P G L
 E E A L E G R E E G E A F Q A H V P A E K A Y G A G S G G G G R Y R Q R G G G G
 G S S G K D L D F Q V E V V K V R E A T P E E L L H G H A H H H H H H H H (配列番号52)。

【0072】

8X-ヒスチジン-タグ付きタンパク質をE. coli B121 Tunerで産生させ、標準的なNiセファロースベースの固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィー(HisTrap、Superdex200; GE Healthcare)で精製した。ペプチドは全て、標準的なフルオレニルメチルオキシカルボニル(FMOC)ベースの固相ペプチド合成により合成した。

40

【0073】

(N末端~C末端の順序で)Z-保護基(すなわちカルボキシベンジル基)、トランスグルタミナーゼリジン供与体配列(K-タグ)、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタノ酸(dioxaoctanoic acid)(O2Oc)、ペプチド、およびCy3またはCy5蛍光色素を有するように、標識化されたペプチドを化学的に合成した。標識化されたペプチドの一次化学構造は:

Z - R Y E S K G - O 2 O c - E U E U E U E U E U E U E U E U E U E U E U E U E U E U E U

50

EUEUEUEUEUEUEUEU - C (s C y 3 - M H) - O H (配列番号 5 3)

であった。

【 0 0 7 4 】

2 0 0 m M M O P S p H 7 . 2 および 1 m M E D T A 中 に 7 2 μ M 基 質 タ ン パ ク 質、 7 2 0 μ M 標 識 ペ プ チ ド お よ び 1 μ M ト ラ ン ス グ ル タ ミ ナ ー ゼ が 存 在 す る 状 態 で、 3 7 ° C で 1 5 分 間 標 識 化 反 応 を 実 施 し た。 3 7 ° C で 3 0 分 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 後、 1 m M K - タ グ - C y 5 ま た は - C y 3 を 添 加 し、 3 7 ° C で さ ら に 1 5 分 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。 5 0 m M T C A を 添 加 し て 反 応 を 停 止 さ せ た。 イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン ス テ ッ プ の 間 に 試 料 を 採 取 し、 S D S - P A G E、 イ ン ゲ ル 蛍 光 (i n - g e l f l u o r e s c e n c e) (B i o R a d C h e m i D o c ゲ ル ド キ ュ メ ン テ ー シ ョ ン シ ス テ ム、 C y 3 お よ び C y 5 L E D な ら び に フ ィ ル タ ー セ ッ ト) で 分 析 し た。 結 果 を 図 2 に 示 す。

10

【 0 0 7 5 】

2 . ル テ ニ ウ ム (r h u t e n i u m) 標 識

標 識 が ル テ ニ ウ ム (r h u t e n i u m) 標 識 で あ る、 s l y D Q - タ グ g p 2 1 融 合 物 (図 3 B を 参 照 の こ と) か ら な る 同 様 の Q - タ グ 構 築 物 に つ い て 試 験 し た。 図 3 A の S D S - P A G E 結 果 は、 標 識 対 構 築 物 が 良 好 な 1 : 1 比 で あ る こ と を 示 し て い る。

【 0 0 7 6 】

ビオチンおよびルテニウムで標識化された T t S l y D - g p 2 1 (H T L V) 抗 原 の 産 生

さらなる標識化アッセイでは、 T h e r m u s t h e r m o p h i l u s 由 来 の シ ャ ペ ロ ン S l y D (U n i v e r s a l P r o t e i n R e s o u r c e (U n i P r o t) 番 号 Q 5 S L E 7)、 H T L V ウ イ ル ス エ ン ベ ロ ー プ 糖 タ ン パ ク 質 「 g p 2 1 」 (G e n b a n k 受 託 番 号 D Q 2 2 4 0 3 2 . 1) お よ び、 一 例 で は、 E s c h e r i c h i a c o l i 由 来 の シ ャ ペ ロ ン S l p A (U n i P r o t 番 号 P 0 A E M 0) の 間 の 組 換 え 融 合 物 を、 M T G ま た は K a l b T G に 対 す る 標 識 化 ス キ ャ ホ ー ル ド と し て 使 用 し た。

20

S l y D 配 列 は :

M K V G Q D K V V T I R Y T L Q V E G E V L D Q G E L S Y L H G H R N L I P G L E E A L E G R E E G E A F Q A H V P A E K A Y G P H D P E G V Q V V P L S A F P E D A E V V P G A Q F Y A Q D M E G N P M P L T V V A V E G E E V T V D F N H P L A G K D L D F Q V E V V K V R E A T P E E L L H G H A H (配 列 番 号 5 4)

30

である。

【 0 0 7 7 】

M T G ま た は K a l b T G グ ル タ ミ ン 供 与 体 配 列 (Q - タ グ) を、 S l y D の F K B P ド メ イ ン に 組 換 え に よ り 移 植 し、 以 下 の ポ リ ペ プ チ ド 配 列 を 得 た :

M T G Q - タ グ を 有 す る S l y D :

M K V G Q D K V V T I R Y T L Q V E G E V L D Q G E L S Y L H G H R N L I P G L E E A L E G R E E G E A F Q A H V P A E K A Y G A G S G G G G D Y A L Q G G G G G S S G K D L D F Q V E V V K V R E A T P E E L L H G H A H (配 列 番 号 5 5)

K a l b T G Q - タ グ を 有 す る S l y D :

M K V G Q D K V V T I R Y T L Q V E G E V L D Q G E L S Y L H G H R N L I P G L E E A L E G R E E G E A F Q A H V P A E K A Y G A G S G G G G Y R Y R Q G G G G G S S G K D L D F Q V E V V K V R E A T P E E L L H G H A H (配 列 番 号 5 6)

40

S l p A 配 列 は :

M S E S V Q S N S A V L V H F T L K L D D G T T A E S T R N N G K P A L F R L G D A S L S E G L E Q H L L G L K V G D K T T F S L E P D A A F G V P S P D L I Q Y F S R R E F M D A G E P E I G A I M L F T A M D G S E M P G V I R E I N G D S I T V D F N H P L A G Q T V H F D I E V L E I D P A L E A (配 列 番 号 5 7)

である。

【 0 0 7 8 】

主 要 な H T L V 抗 原 お よ び ウ イ ル ス エ ン ベ ロ ー プ 糖 タ ン パ ク 質 配 列 「 g p 2 1 」 は :

50

IVSSACNNSLILPPFSLSPVPTVGSRSRRAVPVAVWVSA
 LAMGAGVAGGITGSMASLASKSLLHEVDKDISQLTQAIVK
 NHKNLLKIAQYAAQNRRLDGLLFWEQGGLCKALQECCFL
 NITNSHVSILQERPPLENRVLTGWGLNWDLGLSQWAREAL
 QTGITLVALLLLVILAGPCIRCP CRTMHP (配列番号58)

である。

【0079】

イムノアッセイにおけるより良好な溶解性、安定性および反応性のために操作された、
 gp21エクトドメインポリペプチド配列は：

MSLASKSLLHEVDKDISQLTQAIVKNHKNLLKIAQYAAQ
 NRRGLDGLLFWEQGLAKALQEQA AFLNITNSHVSILQERP
 PLENRVLTGWGLNWDLGLSQWAREALQTG (配列番号59)

10

である。

【0080】

標識化アッセイに使用した組換え融合物配列は：

「TtSlyQD - Xa - gp21 - 8H」：

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGE LSYLHGHRNLIPGL
 EEALEGREGGEAFQAHVPAEKAYGAGSGGGGDYALQGGGG
 GSSGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAHGGGSGGGSGG
 GSGGGSGGGSGGGIEGRMSLASKSLLHEVDKDISQLTQA
 IVKNHKNLLKIAQYAAQNRRLDGLLFWEQGGLAKALQEQA
 AFLNITNSHVSILQERPPLENRVLTGWGLNWDLGLSQWAR
 EALQTGGHHHHHHHH (配列番号60)

20

「TtSlyD - Xa - gp21 - 8H」：

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGE LSYLHGHRNLIPGL
 EEALEGREGGEAFQAHVPAEKAYGPHDPEGVQVPLSAFP
 EDAEVVPGAQFYAQDMEGNMPLTVVAVEGEEVTVDFNH
 PLAGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAHGGGSGGGSGG
 SGGGSGGGSGGGIEGRMSLASKSLLHEVDKDISQLTQAI
 VKNHKNLLKIAQYAAQNRRLDGLLFWEQGGLAKALQEQA
 AFLNITNSHVSILQERPPLENRVLTGWGLNWDLGLSQWAR
 EALQTGGHHHHHHHH (配列番号61)

30

「TtSlyKQD - SplA - Xa - gp21 - 8H」：

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGE LSYLHGHRNLIPGL
 EEALEGREGGEAFQAHVPAEKAYGAGSGGGGYRYRQGGGG
 GSSGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAHGGGSGGGSGG
 GSGGGSGGGSGGGMSSESVQSNSAVLVHFTLKLDDGTTAES
 TRNNGKPA LFR LGDASLSEGLEQHLLGLKVGDKTTTFSLEP
 DAAFVGPSPDLIQYFSRREFMDAGEPEIGA IMLFTAMDGS
 EMPGVIREINGDSITVDFNHPLAGQTVHFDIEVLEIDPAL
 EAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGIEGRMSLASKSLLH
 EVDKDISQLTQAIVKNHKNLLKIAQYAAQNRRLDGLLFWE
 QGGLAKALQEQA AFLNITNSHVSILQERPPLENRVLTGWG
 L NWDLGLSQWAREALQTGGHHHHHHHH (配列番号62)

40

であった。

【0081】

8X - ヒスチジン - タグ付きタンパク質をE. coli BL21 Tunerで産生
 させ、標準的なNiセファロースベースの固定化金属イオンアフィニティークロマトグラ
 フィーおよびサイズ排除クロマトグラフィー (HisTrap、Superdex 200
 ; GE Healthcare) で精製した。

50

【0082】

(N末端～C末端の順序で)「Z-」基(すなわちカルボキシベンジル基)、トランスグルタミナーゼリジン供与体配列(K-タグ)、ポリエチレングリコール(PEG)、ペプチド、およびビオチン標識またはピピリミジンルテニウム(BPRu)複合体を有するように、標識化されたペプチドを化学的に合成した。標識化されたペプチドの一次化学構造は:

K a l b T G K - タグ - B i (「B i」はビオチン標識を表す):

Z - R Y E S K G - P E G 2 7 - K (B i) - O H (2 5 3 2 . 0 g / m o l)

K a l b T G K - タグ - R u (「R u」は、電気化学発光用のルテニウムベースの標識を表す):

Z - R Y E S K G - P E G 2 7 - K (B P R u) - O H (2 9 5 8 . 4 g / m o l)

であった。

【0083】

別途注記されない限り、典型的な標識化反応は、K a l b T G 酵素による標識化では、200mM M O P S pH7.4に65μM基質タンパク質、1000μM標識ペプチドおよび0.1μMトランスグルタミナーゼが存在する状態で37℃で、またMTG酵素では200mM M O P S pH7.4中に72μM基質タンパク質、720μM標識ペプチドおよび1μMトランスグルタミナーゼが存在する状態で37℃で、15分間実施した。トランスグルタミナーゼによる標識化については、出願US2016/0178627「System and Method for Identification and Characterization of Transglutaminase Species」およびWO2016/096785「IDENTIFICATION OF TRANSGLUTAMINASE SUBSTRATES AND USES THEREFOR」により詳細に記載されている。

【0084】

標識化反応混合物をサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex200; GE Healthcare)で分離し、標識化された融合タンパク質を含む画分をその後の分析用に単離した。

【0085】

ビオチンおよびルテニウム標識化の分析ならびにイムノアッセイ

標識化反応の質および量をSDS-PAGEで分析した。ビオチン標識化の効率は、クーマシー染色したゲルにおけるバンドの分子量変化により推定した。ルテニウム標識化の効率は、クーマシー染色したゲルにおけるバンドの分子量変化、およびインゲル蛍光(BioRad ChemiDocゲルドキュメンテーションシステム、Cy3LEDおよびフィルターセット)により推定した。E l e c s y s e 4 1 1 装置で、製造業者の説明書に従い、試験の試薬R1におけるビオチン標識化された抗原部分を、MTGでビオチン標識化された「T t S l y D - X a - g p 2 1 - 8 H」またはK a l b T G でビオチン標識化された「T t S l y K Q D - S l p A - X a - g p 2 1 - 8 H」でそれぞれ置き換え、かつ、試験の試薬R2におけるルテニウム標識化された抗原部分を、MTGでルテニウム標識化された「T t S l y D - X a - g p 2 1 - 8 H」またはK a l b T G でルテニウム標識化された「T t S l y K Q D - S l p A - X a - g p 2 1 - 8 H」でそれぞれ置き換えて、診断用イムノアッセイ(Roche HTLV I/II)を実施した。HTLV陽性血清および市販のHTLV I/IIキットを用いて陽性対照を実施した。HTLV陰性血清、ならびに様々なキャリブレーションおよび対照溶液と組み合わせたHTLV陽性血清を用いて陰性対照を実施した。

【0086】

結果については、図5および6を参照のこと。

T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 Hルテニウム標識化の質量分析

図5Aは、配列番号60の融合タンパク質「T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 H」を図式的に示す。図5Bは、S t r e p t o m y c e s m o b a r a e n s i s の細菌

10

20

30

40

50

トランスグルタミナーゼによる、組換え g p 2 1 (H T L V) 抗原の特異的および非特異的ルテニウム標識化について示す、S D S - P A G E 分析後の結果を示す。R u 標識化後の、非標識化、一重標識化、二重標識化、および三重標識化された「T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 H」融合タンパク質が示される。R u - 標識については図 5 C を参照のこと。

【 0 0 8 7 】

ルテニウム標識化された融合タンパク質のプールされた 2 つの画分、[1] T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 H _ F r a c t i o n 1 7 ~ 1 9 および [2] T t S l y Q D X a - g p 2 1 - 8 H _ F r a c t i o n 2 0 ~ 2 3 について分析した；非標識化「T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 H」タンパク質は、対照 (T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 H _ C o n t r o l) として機能した。

10

【 0 0 8 8 】

ペプチドマッピングを実施した。トリプシンによる消化、クロマトグラフィー分離、その後の M S / M S 分析、および手動の解釈ツールと組み合わせたデータベース検索によるペプチドマッピング後、以下のことが発見された：

【 0 0 8 9 】

【 化 4 】

(a) 標識 1 つを有するトリプシンペプチド、6 2 ~ 8 5 ' 「AYGAGSGGGG DYALQGGGGGSSGK」配列番号 6 3 (付番は以下に与える配列を参照) は、両画分、T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 H _ F r a c t i o n 1 7 ~ 1 9 ' および T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 H _ F r a c t i o n 2 0 ~ 2 3 ' に見られた。

20

(b) 標識 1 つを有するトリプシンペプチド、1 9 5 ~ 2 2 2 ' 「ALQEQAALFNITNSHVSILQERPPLNENR」配列番号 6 4 は、T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 H _ F r a c t i o n 1 7 ~ 1 9 ' にのみわずかに見られた。

30

(c) 標識 1 つを有するトリプシンペプチド、2 4 1 ~ 2 5 5 ' 「EALQTGGHHHHHHHH」配列番号 6 5 (H i s - タグ) は、両画分、T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 H _ F r a c t i o n 1 7 ~ 1 9 ' および T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 H _ F r a c t i o n 2 0 ~ 2 3 ' に見られた。

(d) 上記に加えて、その他のルテニウム標識化ペプチド/副産物も両画分に存在することが判明したが、有意でない量であった。

40

【 0 0 9 0 】

上記 (a ~ c) で与えられる T t S l y Q D - X a - g p 2 1 - 8 H トリプシンペプチドのアミノ酸配列には太字でかつ下線を引いて印を付けている：

【 0 0 9 1 】

【化5】

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGE LSYLHGHRNLIPGL
 EEALEGREGGEAFQAHVPAEKAYGAGSGGGG DYALQGGG
GGSSGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAHGGGSGGGG
 GGGSGGGSGGGSGGGIEGRMSLASGKSL LHEVDKDISQLT
 QAI VKNHKNLLKIAQYAAQNRRLD L LFWEQGGLAKALQ
EQA AFLNITNSHVSILQERPPLENRVLTGWGLNWDLGLS
 QWAREALQTGGHHHHHHHH (配列番号60)

10

【0092】

*Kutzneria albid*aの細菌トランスグルタミナーゼを使用してビオチン およびルテニウムにより部位特異的に標識化された組換えgp21 (HTLV) 抗原により、Elec Sys HTLV-I/IIインビトロ診断用アッセイにおける本発明の利点 が実証される。

20

【0093】

結果を図6および以下に提示する。

図6Aは、ルテニウムおよびビオチン標識化されたgp21抗原(Q = KalbTG Q-タグ、L = リンカー、Xa = 第Xa因子切断部位、8H = His-タグ)の一次構造、および診断検査の原理を示す概略図を示す；患者試料由来の血清抗体(赤)が、ビオチンおよびルテニウム標識化された抗原(緑)を架橋している。

【0094】

図6B~D: KalbTGによるgp21の一重ビオチンまたはルテニウム標識化につい て示すSDS-PAGE分析。B: ビオチン標識化を示す、クーマシー染色したSDS - PAGEゲル、レーン1: 染色済みタンパク質分子量マーカー、レーン2: KalbTG およびビオチン標識とともにインキュベートしたTtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H。C: ルテニウム標識化を示す、クーマシー染色したSDS-PAGEゲル、レーン3a: KalbTGおよびルテニウム標識とともにインキュベートしたTtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H、レーン4a: 未変更TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H(対照)。D: Cに示すSDS-PAGE分析の蛍光画像。レーン3b~4bはレーン3a~4aに対応する。

30

【0095】

図6E: MTGで標識化された試薬または市販のキット(対照)試薬を使用した、HTLV抗体についての血清陰性(左)および陽性(右)での、Elec Sysアッセイ(HTLV-I/II)。対照における標識化のための化学量論組成が1:1より大きいため、陽性対照シグナルがKalbTGで標識化されたgp21シグナルより高いことに留意されたい。つまり、KalbTGで標識化された分子はより少ない標識を保持する。測定は二連で実施し、平均シグナルを示した。

40

【0096】

TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8Hのアミノ酸配列は以下の通りである:

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGE LSYLHGHRNLIPGL
 EEALEGREGGEAFQAHVPAEKAYGAGSGGGG YRYRQGGGG
 GSSGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAHGGGSGGGSGG
 GSGGGSGGGSGGGMSSESVQSN SAVLVHFTLKLDDGTTAES

50

TRNNGKPA LFR LGDAS LSEGLEQHLLGLKVGDKTTTFSLEP
 DAAFVPS PDLIQYFSRREFMDAGEPEIGAIMLFTAMDGS
 EMPGVI REINGDSITVDFNHPLAGQTVHFDIEVLEIDPAL
 EAGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGI EGRMSLASGKSLH
 EVDKDISQLTQAI VKNHKNLLKIAQYAAQNRRLD L L FWE
 QGGLAKALQEQA AFLNITNSHVSILQERPPLENRVLTGWG
 LNWD LGLS QWAREALQTGGHHHHHHHH (配列番号62)。

【 図 1 】

A) 配列番号 23

1 mhkwflraav vaavgfqlpt liattaqaaa vaaptprapl applaedrsy rtwrvedyve
 61 aweryhngrem tederenlar gcigvtvvn nredlsnpl nlsfgslrta eavgaalnk
 121 vdthpspagy eaavakdpil krknvkal pswidsaklk asifskrfys wqnpdwseer
 181 ahttyrpdre tdqvdmstyr yrarpgyvnf dygwfddqtn twwhanheep rmvvyqstlr
 241 hysrplqdfd eqvftvafak kd

B) 配列番号 24 (E. coli)

10	20	30	40	50
MKVAKDLVVS	LAYQVRTEDG	VLVDESPVSA	PLDYLHGHGS	LISGLETALE
60	70	80	90	100
GHEVGDKFDV	AVGANDAYGQ	YDENLVQRVP	KDFVMGVDEL	QVGMFLAET
110	120	130	140	150
DQGPVPEIT	AVEDDHVVVD	GNHMLAQNL	KFNVEVVAIR	EATEEELAHG
160	170	180	190	
HVHGADHDDH	DHDHDGCCG	HGHHDGHEHG	GEGCCGGKGN	GGCGCH

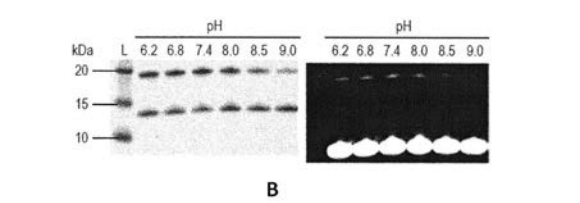
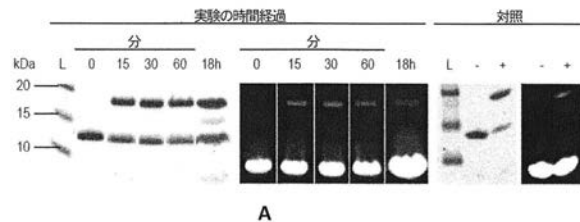
C) 配列番号 25 (Cyclobacteriaceae bacterium AK24)

10	20	30	40	50
MRFSQSLVFM	EISENVVGL	TYELKVTNNE	EDSIPFSVEV	RDEEDPFYFV
60	70	80	90	100
FGNSGLEPEKF	ERLLENKAVG	NFNFTLSIE	EAYGHAEEL	ILIVPKKQFT
110	120	130	140	150
GEKGFPEPEML	EEGNFLPLID	EDGYFMQAKV	IKDLGEEELL	DFNHPLVGMN
160	170			
LHFDGEVYKV	RKATKBETEK	GYIEVN		

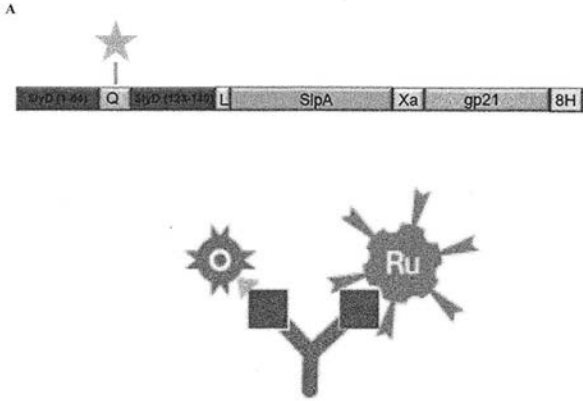
D) 配列番号 26 (Bacteroidales bacterium CF)

10	20	30	40	50
MKIGINKVVS	LAYTLEVEGD	VMETVTSEKP	LEFIFGTGYL	LPKFEENVSN
60	70	80	90	100
KVVGDAFDFT	LTASEGYGEE	NPDALIELPK	DIFKVDGKIE	EGLLTVGNIL
110	120	130	140	150
PMQSDGNRL	QGSIDEIKDD	VVVMFNHPL	AGADLHFKEI	VVAVREASET
160	170			
ELVNLRGEL	GTSCGDGCS	GCSGCH		

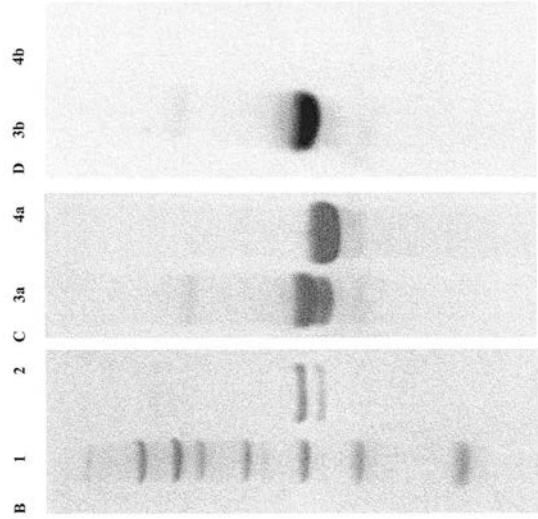
【 図 2 】



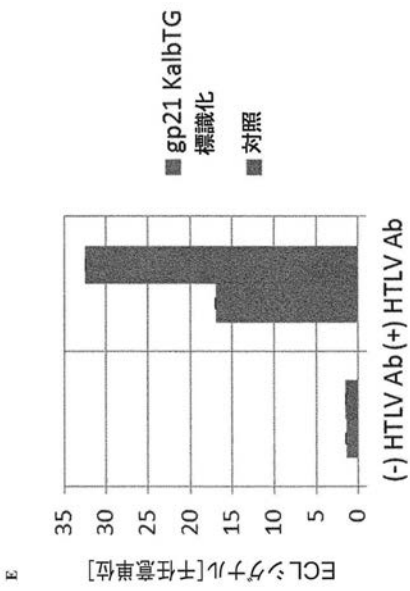
【 図 6 - 1 】



【 図 6 - 2 】



【 図 6 - 3 】



【配列表】

2019508366000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/080847

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K1/13 C12N9/90 G01N33/532 G01N33/58 G01N33/68 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) A61K C07K C12N G01N		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2016/100735 A1 (ROCHE NIMBLEGEN INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; ROCHE DIAGNOSTICS GM) 23 June 2016 (2016-06-23) paragraph [0006] - paragraph [0080]; example 4 -----	1-13
Y	WO 00/43492 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; TEW DAVID G [US]; POWELL DAVID J [GB]; M) 27 July 2000 (2000-07-27) page 3, line 27 - page 17, line 3; claims 1-38; examples 1-4 -----	1-14
Y	WO 2012/059882 A2 (RINAT NEUROSCIENCE CORP [US]; PFIZER [US]; STROP PAVEL [US]; DORYWALSK) 10 May 2012 (2012-05-10) claims 1-58; examples 1-11 ----- -/--	1-14
<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 :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 22 March 2017	Date of mailing of the international search report 05/04/2017	
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 Westphal-Daniel, K	

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/080847

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/077008 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; SCHOLZ CHRISTIAN) 12 July 2007 (2007-07-12) page 34, line 14 - page 35, line 28; example 1 -----	1-14
Y	WO 03/000878 A2 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 3 January 2003 (2003-01-03) examples 2,3 -----	1-14
A	WO 2009/074318 A2 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; SCHOLZ CHRISTIAN) 18 June 2009 (2009-06-18) examples 1-4 -----	1-14
A	CN 103 421 753 B (UNIV JIANGNAN) 11 February 2015 (2015-02-11) abstract -----	1-14
A	WO 2014/071978 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; CASAGOLDA VALLRIB) 15 May 2014 (2014-05-15) cited in the application page 12, line 17 - page 51, line 29 -----	1-14
A	GEITNER ANNE-JULIANE ET AL: "Generation of a Highly Active Folding Enzyme by Combining a Parvulin-Type Prolyl Isomerase from SurA with an Unrelated Chaperone Domain", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 425, no. 22, 2013, pages 4089-4098, XP028751688, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2013.06.038 the whole document -----	1-14
A	LOW C ET AL: "Crystal Structure Determination and Functional Characterization of the Metallochaperone SlyD from Thermus thermophilus", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 398, no. 3, 7 May 2010 (2010-05-07), pages 375-390, XP027011890, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2010.03.014 [retrieved on 2010-03-15] cited in the application the whole document -----	1-14
	----- -/--	

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/080847

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KOVERMANN M ET AL: "Molecular function of the prolyl cis/trans isomerase and metallochaperone SlyD", BIOLOGICAL CHEMISTRY, WALTER DE GRUYTER GMBH & CO, BERLIN, DE, vol. 394, no. 8, 1 August 2013 (2013-08-01), pages 965-975, XP009190300, ISSN: 1431-6730 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>SCHLAPSCHY MARTIN ET AL: "Periplasmic chaperones used to enhance functional secretion of proteins in E. coli", METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US, vol. 705, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 211-224, XP009146613, ISSN: 1064-3745, DOI: 10.1007/978-1-61737-967-3_12 the whole document</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>KNAPPE ET AL: "Insertion of a Chaperone Domain Converts FKBP12 into a Powerful Catalyst of Protein Folding", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 368, no. 5, 26 April 2007 (2007-04-26), pages 1458-1468, XP022046689, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2007.02.097 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-14

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/080847

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2016100735	A1	23-06-2016	US 2016178627 A1 WO 2016100735 A1	23-06-2016 23-06-2016
WO 0043492	A2	27-07-2000	EP 1151299 A1 JP 2003527561 A US 2005136491 A1 US 2007190578 A1 WO 0043492 A2	07-11-2001 16-09-2003 23-06-2005 16-08-2007 27-07-2000
WO 2012059882	A2	10-05-2012	CA 2813411 A1 CA 2930801 A1 EP 2635310 A2 JP 2014500866 A US 2013230543 A1 WO 2012059882 A2	10-05-2012 10-05-2012 11-09-2013 16-01-2014 05-09-2013 10-05-2012
WO 2007077008	A1	12-07-2007	AT 527345 T CA 2636075 A1 CN 101351550 A EP 1971684 A1 ES 2375863 T3 HK 1128727 A1 JP 4871960 B2 JP 2009521938 A US 2009042251 A1 US 2011189754 A1 WO 2007077008 A1	15-10-2011 12-07-2007 21-01-2009 24-09-2008 07-03-2012 12-07-2013 08-02-2012 11-06-2009 12-02-2009 04-08-2011 12-07-2007
WO 03000878	A2	03-01-2003	AT 445016 T AT 522603 T AU 2002317841 A1 AU 2002325265 B2 BR 0210598 A CA 2449747 A1 CA 2450476 A1 CA 2770453 A1 CN 1524123 A DK 1402015 T3 DK 2267452 T3 EP 1402015 A2 EP 1402041 A2 EP 2267452 A1 ES 2333108 T3 ES 2372031 T3 ES 2391623 T3 HK 1068918 A1 JP 4174422 B2 JP 4262594 B2 JP 4309910 B2 JP 4320351 B2 JP 4523660 B2 JP 2004534831 A JP 2004535195 A JP 2007125026 A JP 2007322436 A JP 2009100770 A JP 2009102320 A KR 20040010774 A	15-10-2009 15-09-2011 08-01-2003 19-10-2006 20-07-2004 03-01-2003 03-01-2003 03-01-2003 25-08-2004 05-12-2011 29-10-2012 31-03-2004 31-03-2004 29-12-2010 17-02-2010 13-01-2012 28-11-2012 09-04-2010 29-10-2008 13-05-2009 05-08-2009 26-08-2009 11-08-2010 18-11-2004 25-11-2004 24-05-2007 13-12-2007 14-05-2009 14-05-2009 31-01-2004

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/080847

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		KR 20060027871 A	28-03-2006
		MX PA03011455 A	05-04-2004
		PL 215170 B1	31-10-2013
		PL 218245 B1	31-10-2014
		US 2003096352 A1	22-05-2003
		US 2009028893 A1	29-01-2009
		WO 03000877 A2	03-01-2003
		WO 03000878 A2	03-01-2003

WO 2009074318	A2	18-06-2009	CA 2705716 A1
			18-06-2009
			CN 101939330 A
			05-01-2011
			EP 2222694 A2
			01-09-2010
			ES 2450998 T3
			26-03-2014
			HK 1148026 A1
			14-11-2014
			JP 5461423 B2
			02-04-2014
			JP 2011505811 A
			03-03-2011
			US 2011059552 A1
			10-03-2011
			WO 2009074318 A2
			18-06-2009

CN 103421753	B	11-02-2015	NONE

WO 2014071978	A1	15-05-2014	EP 2917388 A1
			16-09-2015
			ES 2603589 T3
			28-02-2017
			WO 2014071978 A1
			15-05-2014

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/005 (2006.01)	C 0 7 K 14/005	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 0 7 K 1/13 (2006.01)	C 0 7 K 1/13	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 49/04 (2006.01)	A 6 1 K 49/04	
A 6 1 K 49/18 (2006.01)	A 6 1 K 49/18	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 51/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z

(81) 指定国 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, 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, 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, G, T, 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

(72) 発明者 シュレムル, ミハエル

ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ホーホフェルトシュトラッセ 4 6

(72) 発明者 シュテフェン, ヴォイテク

ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ゼースハウプター・シュトラッセ 4 4 アー

F ターム(参考) 4B050 CC03 DD02 LL01 LL03

4C084 AA17 NA20

4C085 HH03 HH11 HH13 KA29

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17

BA41 CA01 CA40 DA75 DA76 DA89 EA20 EA50 FA10 FA74

专利名称(译)	具有转谷氨酰胺酶识别位点的FKBP结构域		
公开(公告)号	JP2019508366A	公开(公告)日	2019-03-28
申请号	JP2018531168	申请日	2016-12-13
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	シュレムルミハエル シュテフェンヴォイテク		
发明人	シュレムル,ミハエル シュテフェン,ヴォイテク		
IPC分类号	C07K19/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C12N9/00 C07K14/005 C07K16/00 C07K1/13 A61K45/00 A61K49/04 A61K49/18 A61K51/00 G01N33/53 C12N9/10 C12N15/09		
CPC分类号	A61K47/65 C07K1/13 C07K2319/21 C07K2319/35 C12N9/90 C12N2740/14022 G01N33/532		
FI分类号	C07K19/00.ZNA C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C12N9/00 C07K14/005 C07K16/00 C07K1/13 A61K45/00 A61K49/04 A61K49/18 A61K51/00 G01N33/53.D C12N9/10 C12N15/09.Z		
F-TERM分类号	4B050/CC03 4B050/DD02 4B050/LL01 4B050/LL03 4C084/AA17 4C084/NA20 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/HH13 4C085/KA29 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA10 4H045/FA74		
代理人(译)	山本修 宫前彻 中西 基晴		
优先权	2015200111 2015-12-15 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是重组转谷氨酰胺酶 (TG) 底物，其包含FKBP多肽的FKBP结构域的氨基酸序列，其“插入基础结构” (IF) 结构域是肽序列X-YRYRQ-X2 (SEQ ID NO : 1) 至少部分地被5至20个氨基酸的氨基酸序列 (“Q-tag”) 取代，所述氨基酸序列包含与YRYRQ部分具有至少80%的序列同一性的序列，并且TG底物是白僵菌 它涉及重组转谷氨酰胺酶 (TG) 底物，其是TG的TG功能的底物。本发明还涉及所述基材的用途。[选择图]图4

