



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108064286 A

(43)申请公布日 2018.05.22

(21)申请号 201680007231.2

(22)申请日 2016.01.25

(30)优先权数据

2015-012664 2015.01.26 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.07.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/052038 2016.01.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/121703 JA 2016.08.04

(71)申请人 株式会社钟化

地址 日本大阪府

(72)发明人 吉田慎一

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 沈雪

(51)Int.Cl.

C12N 15/09(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

C07K 14/195(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书22页
序列表(电子公布) 附图3页

(54)发明名称

突变型免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽

(57)摘要

本发明的目的在于提供一种免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽、具有该肽作为配体的亲和分离基质、以及使用了该亲和分离基质的包含免疫球蛋白 κ 链可变区的蛋白质的制造方法,所述免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽的特征在于,与导入突变前相比,包含免疫球蛋白 κ 链可变区的蛋白质的酸解离pH向中性侧移动。另外,本发明的目的还在于提供一种编码该肽的DNA、包含该DNA的载体、以及利用该载体进行了转化的转化体。通过利用对于来自于大消化链球菌菌株的蛋白质L的 κ 链可变区结合结构域在适当的部位导入了突变的肽作为亲和配体,解决了上述课题。

1. 下述 (1) ~ (3) 中任一种免疫球蛋白κ链可变区结合性肽:

(1) 一种免疫球蛋白κ链可变区结合性肽,其在序列号21的氨基酸序列中,具有选自第15位、第16位、第17位及第18位中的1个以上氨基酸残基被取代的氨基酸序列,且与导入取代前相比,其酸解离pH向中性侧移动;

(2) 一种免疫球蛋白κ链可变区结合性肽,其在上述 (1) 的氨基酸序列中,具有在除上述第15位、第16位、第17位及第18位以外的区域中缺失、取代和/或添加了1个以上且20个以下的氨基酸残基的氨基酸序列,且与导入突变前相比,其酸解离pH向中性侧移动;

(3) 一种免疫球蛋白κ链可变区结合性肽,其具有相对于上述 (1) 的氨基酸序列有80%以上序列同一性的氨基酸序列,且与导入突变前相比,其酸解离pH向中性侧移动,其中,选自上述 (1) 所限定的氨基酸序列中的第15位、第16位、第17位及第18位中的1个以上位置的氨基酸残基的取代在 (3) 中没有进一步突变。

2. 根据权利要求1所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽,其中,所述 (1) 所限定的氨基酸序列为序列号12~20中的任意氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽,其中,在所述 (1) 所限定的氨基酸序列中,第16位或第18位中的任意位置的氨基酸残基被取代。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽,其中,在所述 (1) 所限定的氨基酸序列中,第15位被His取代,第16位被Ala、Asp或His取代,第17位被His取代,第18位被Asp、Gln或His取代。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽,其中,在所述 (2) 所限定的氨基酸序列中,所述缺失、取代和/或添加了氨基酸残基的位置为N末端和/或C末端。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽,其中,在所述 (3) 所限定的氨基酸序列中,所述序列同一性为95%以上。

7. 一种免疫球蛋白κ链可变区结合性肽多聚体,其具有将2个以上的权利要求1~6中任一项所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽连接而成的2个以上结构域。

8. 一种亲和分离基质,其是权利要求1~6中任一项所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽或权利要求7所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽多聚体以配体的形式固定于水不溶性载体而成的。

9. 一种制造包含免疫球蛋白κ链可变区的蛋白质的方法,该方法包括:

使权利要求8所述的亲和分离基质与含有包含免疫球蛋白κ链可变区的蛋白质的液体试样接触的工序,以及

将结合于亲和分离基质的包含免疫球蛋白κ链可变区的蛋白质从亲和分离基质上分离的工序。

10. 一种DNA,其编码权利要求1~6中任一项所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽或权利要求7所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽多聚体。

11. 一种载体,其包含权利要求10所述的DNA。

12. 一种转化体,其是通过权利要求11所述的载体转化而成的。

突变型免疫球蛋白κ链可变区结合性肽

技术领域

[0001] 本发明涉及对免疫球蛋白的κ链可变区的酸解离特性进行了改良的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽、具有该肽作为配体的亲和分离基质、使用该亲和分离基质的包含免疫球蛋白κ链可变区的蛋白质的制造方法、编码该肽的DNA、含有该DNA的载体、以及利用该载体进行了转化的转化体。

背景技术

[0002] 作为蛋白质的重要功能之一,可以列举与特定分子特异性结合的功能。该功能在生物体内的免疫反应、信号传导中发挥重要的作用。广泛进行了将该作用用于有用物质的分离纯化的技术开发。作为实际上工业应用的一个例子,可以举出用于从动物细胞培养物中一次性以高纯度对抗体医药进行纯化(捕获)的蛋白质A亲和分离基质(以下,有时将蛋白质A简称为“SpA”) (非专利文献1、2)。

[0003] 作为抗体医药开发的基本上是单克隆抗体,使用重组培养细胞技术等进行了大量生产。“单克隆抗体”是指从来自于单一的抗体生产细胞的克隆中得到的抗体。现在上市的抗体医药在分子结构上基本均为免疫球蛋白G (IgG) 亚型。另外,由具有将免疫球蛋白片段化而得到的分子结构的抗体衍生物(片段抗体)制成的抗体医药也在广泛地进行临床开发,正在对各种片段抗体医药进行临床开发(非专利文献3)。

[0004] 抗体医药制造工序中的初期纯化工序中利用了上述的SpA亲和分离基质。但是,SpA是基本上与IgG的Fc区特异性结合的蛋白质。因此,不含Fc区的片段抗体无法利用SpA亲和分离基质进行捕获。因此,从抗体医药纯化工序的平台开发的观点考虑,对能够捕获不含IgG的Fc区的片段抗体的亲和分离基质的工业需求很多。

[0005] 已知有多种与IgG的Fc区以外结合的肽(非专利文献4)。其中,从能够结合的片段抗体形式的种类多少、以及能够与IgM、IgA等结合的观点考虑,最优选能够与可变区(抗原结合结构域)结合的肽,例如,广为知晓的蛋白质L(以下,有时将蛋白质L简称为“PpL”)。PpL是包含多个κ链可变区结合结构域(以下,有时将κ链可变区简称为“VL-κ”)的蛋白质,各VL-κ结合结构域的氨基酸序列不同。另外,根据菌株的种类不同,VL-κ结合结构域的数量及各氨基酸序列不同。例如,大消化链球菌(*Peptostreptococcus magnus*) 312株的PpL中含有的VL-κ结合结构域数量为5个,大消化链球菌株3316的PpL中含有的VL-κ结合结构域数量为4个(非专利文献5~7、专利文献1~2)。而且,这些总计9个VL-κ结合结构域中没有相互相同的氨基酸序列的结构域。

[0006] 已经有多种以PpL作为配体的亲和分离基质上市。但是,对于SpA而言,正在深入地进行蛋白质工程研究,所述蛋白质工程研究是部位特异性地导入突变来对作为亲和分离基质用配体的功能进行改进(非专利文献1、专利文献3~8),对于PpL而言,也存在多个为了在学术上分析结合力、结合方式而导入突变的报告(非专利文献7~9),还存在想要改变作为亲和配体的功能的研究的报告(专利文献9)。然而,与SpA的情况相比,PpL的突变导入报告例子是有限的,特别是关于吸附于亲和分离基质的抗体类的酸洗脱pH,对于SpA而言,虽然

有多个在pH3.5~4.0下能够洗脱的报告(非专利文献1、专利文献7~8),但对于PpL而言,仍留有改进的余地。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本特表平7-506573号公报

[0010] 专利文献2:日本特表平7-507682号公报

[0011] 专利文献3:美国专利第5143844号公报

[0012] 专利文献4:日本特开2006-304633号公报

[0013] 专利文献5:欧州专利第1123389号公报

[0014] 专利文献6:国际公开第03/080655号小册子

[0015] 专利文献7:美国公开第2006/0194950号公报

[0016] 专利文献8:国际公开第2011/118699号小册子

[0017] 专利文献9:国际公开第00/15803号小册子

[0018] 非专利文献

[0019] 非专利文献1:Hober S.等,J.Chromatogr.B,2007,848卷,40-47页

[0020] 非专利文献2:Shukla A.A.等,Trends Biotechnol.,2010,28卷,253-261页

[0021] 非专利文献3:Nelson A.N.等,Nat.Biotechnol.,2009,27卷,331-337页

[0022] 非专利文献4:Bouvet P.J.,Int.J.Immunopharmac.,1994,16卷,419-424页

[0023] 非专利文献5:Kastern W.等,J.Biol.Chem.,1992,267卷,12820-12825页

[0024] 非专利文献6:Murphy J.P.等,Mol.Microbiol.,1994,12卷,911-920页

[0025] 非专利文献7:Housden N.G.等,Biochemical Society Transactions,2003,31卷,716-718页

[0026] 非专利文献8:Housden N.G.等,J.Biol.Chem.,2004,279卷,9370-9378页

[0027] 非专利文献9:Tadeo X.等,Biophys.J.,2009,97卷,2595-2603页

发明内容

[0028] 发明要解决的课题

[0029] 如上所述,已经开发了各种用于纯化免疫球蛋白或其片段的亲和分离基质。对于利用亲和分离基质对免疫球蛋白或其片段进行纯化而言,通常使中性的溶液与亲和分离基质接触而选择性地吸附免疫球蛋白或其片段,进行清洗而除去杂质,然后利用酸性的洗脱液对吸附的免疫球蛋白或其片段进行洗脱。此时,为了得到纯度高的目标化合物,需要使用选择性吸附力强的亲和分离基质充分进行清洗。而且,为了以高回收率得到目标化合物,需要在能够可靠地使选择性吸附解离的酸性pH下进行洗脱。但是,在强酸性条件下,存在作为目标化合物的免疫球蛋白或其片段受损的隐患。

[0030] 因此,本发明的目的在于提供一种免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,所述免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽一方面对免疫球蛋白的 κ 链可变区肽显示出优异的选择性吸附能力,另一方面通过较高pH的酸性洗脱液能够释放出该 κ 链可变区肽。另外,本发明的目的还在于提供一种具有该肽作为配体的亲和分离基质、使用该亲和分离基质的含免疫球蛋白 κ 链可变区的蛋白质的制造方法、编码该肽的DNA、含有该DNA的载体、以及利用该载体进行了转化

的转化体。

[0031] 解决课题的方法

[0032] 本发明人发现,在对以蛋白质L (PpL) 作为配体的亲和分离基质进行预评价时,虽然轻链为 κ 链,但根据片段抗体的种类,色谱曲线有很大不同。具体来说,对于结合容量高、且未发现中间清洗中的漏出的片段抗体而言,具有在酸洗脱时需要更强的酸的倾向。本发明人为了解决上述课题,对PpL的 κ 链可变区结合性结构域的突变体进行了分子设计,使用蛋白质工程的方法及基因工程的方法从转化细胞中获得该突变体,对获得的该突变体的物性进行了比较研究。其结果是发现了通过在来自于大消化链球菌的蛋白质L的 κ 链可变区结合性结构域导入特定的突变,可以解决上述课题,从而完成了本发明。

[0033] 以下,示出本发明。

[0034] [1] 下述(1)~(3)中任一种免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽:

[0035] (1) 一种免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,其在序列号21的氨基酸序列中,具有选自第15位、第16位、第17位及第18位中的1个以上氨基酸残基被取代的氨基酸序列,且与导入取代前相比,其酸解离pH向中性侧移动;

[0036] (2) 一种免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,其在上述(1)的氨基酸序列中,具有在除上述第15位、第16位、第17位及第18位以外的区域中缺失、取代和/或添加了1个以上且20个以下的氨基酸残基的氨基酸序列,且与导入突变前相比,其酸解离pH向中性侧移动;

[0037] (3) 一种免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,其具有相对于上述(1)的氨基酸序列有80%以上序列同一性的氨基酸序列,且与导入突变前相比,其酸解离pH向中性侧移动,其中,选自上述(1)所限定的氨基酸序列中的第15位、第16位、第17位及第18位中的1个以上位置的氨基酸残基的取代在(3)中没有进一步突变。

[0038] [2] 根据上述[1]所述的免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,其中,所述(1)所限定的氨基酸序列为序列号12~20中的任意氨基酸序列。

[0039] [3] 根据上述[1]所述的免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,其中,在所述(1)所限定的氨基酸序列中,第16位或第18位中的任意位置的氨基酸残基被取代。

[0040] [4] 根据上述[1]~[3]中任一项所述的免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,其中,在所述(1)所限定的氨基酸序列中,第15位被His取代,第16位被Ala、Asp或His取代,第17位被His取代,第18位被Asp、Gln或His取代。

[0041] [5] 根据上述[1]~[4]中任一项所述的免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,其中,在所述(2)所限定的氨基酸序列中,所述缺失、取代和/或添加了氨基酸残基的位置为N末端和/或C末端。

[0042] [6] 根据上述[1]~[5]中任一项所述的免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,其中,在所述(3)所限定的氨基酸序列中,所述序列同一性为95%以上。

[0043] [7] 一种免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽多聚体,其具有将2个以上的上述[1]~[6]中任一项所述的免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽连接而成的2个以上结构域。

[0044] [8] 一种亲和分离基质,其是上述[1]~[6]中任一项所述的免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽或上述[7]所述的免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽多聚体以配体的形式固定于水不溶性载体而成的。

[0045] [9] 一种制造包含免疫球蛋白 κ 链可变区的蛋白质的方法,该方法包括:

[0046] 使上述[8]所述的亲和分离基质与含有包含免疫球蛋白κ链可变区的蛋白质的液体试样接触的工序,以及

[0047] 将结合于亲和分离基质的包含免疫球蛋白κ链可变区的蛋白质从亲和分离基质上分离的工序。

[0048] [10]一种DNA,其编码上述[1]~[6]中任一项所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽或上述[7]所述的免疫球蛋白κ链可变区结合性肽多聚体。

[0049] [11]一种载体,其包含上述[10]所述的DNA。

[0050] [12]一种转化体,其是通过上述[11]所述的载体转化而成的。

[0051] 发明的效果

[0052] 将根据本发明得到的κ链可变区结合性肽固定于不溶性载体而得到的亲和分离基质对于包含免疫球蛋白κ链可变区的蛋白质显示出优异的选择性吸附能力。另一方面,显示出与优异的酸解离特性相反的特性。这里的“优异的酸解离特性”是指如下特性,含κ链可变区的蛋白质在更靠近中性侧的酸性洗脱条件下解离、且在酸性条件下使含κ链可变区的蛋白质洗脱时的洗脱峰曲线更加尖锐。通过使色谱的洗脱峰变得更尖锐,能够用更少容量的洗脱液回收更高浓度的含抗体的洗脱液。

附图说明

[0053] 图1是来自于PpL的VL-κ结合结构域的氨基酸序列的序列比对。

[0054] 图2是示出LB5t-Wild.1d的表达质粒的制备方法的图。

[0055] 图3是将在第16位导入了突变的各种LB5t突变体添加于aRSV-Fab固定化担载体,通过pH梯度进行洗脱时的亲和纯化色谱图。

具体实施方式

[0056] 本发明涉及下述(1)~(3)中任一种免疫球蛋白κ链可变区结合性肽。

[0057] (1)一种免疫球蛋白κ链可变区结合性肽,其在序列号21的氨基酸序列中,具有选自第15位、第16位、第17位及第18位中的1个以上氨基酸残基被取代的氨基酸序列,且与导入取代前相比,其酸解离pH向中性侧移动;

[0058] (2)一种免疫球蛋白κ链可变区结合性肽,其在上述(1)的氨基酸序列中,具有在除上述第15位、第16位、第17位及第18位以外的区域中缺失、取代和/或添加了1个以上且20个以下的氨基酸残基的氨基酸序列,且与导入突变前相比,其酸解离pH向中性侧移动;

[0059] (3)一种免疫球蛋白κ链可变区结合性肽,其具有相对于上述(1)的氨基酸序列有80%以上序列同一性的氨基酸序列,且与导入突变前相比,其酸解离pH向中性侧移动(选自上述(1)所限定的氨基酸序列中的第15位、第16位、第17位及第18位中的1个以上位置的氨基酸残基的取代在(3)中没有进一步突变)。

[0060] “免疫球蛋白(IgG)”是淋巴细胞中的B细胞产生的糖蛋白,具有识别特定的蛋白质等分子并与其结合的功能。免疫球蛋白具有与该特定的分子(抗原)特异性结合的功能、以及与其它生物体分子、细胞协同对具有抗原的因子进行无毒化/除去的功能。免疫球蛋白通常被称为“抗体”,这是着眼于这样的功能的名称。所有的免疫球蛋白基本上由相同的分子结构形成,以“Y”字型的4条链结构(轻链/重链2条多肽链各有2条)作为基本结构。轻链(L

链)中有 λ 链和 κ 链2种,所有的免疫球蛋白具有其中的任一种。重链(H链)中有 γ 链、 μ 链、 α 链、 δ 链、 ϵ 链这样结构不同的5种,免疫球蛋白的种类(同种型)随着该重链不同而改变。免疫球蛋白G(IgG)是单体型的免疫球蛋白,由2条重链(γ 链)和2条轻链构成,具有2个的抗原结合部位。

[0061] 将位于免疫球蛋白的“Y”字下半部分的竖直部分的部位称为Fc区,将上半部分的“V”字的部分称为Fab区。Fc区具有引起抗体与抗原结合后的反应的效应器功能,Fab区具有与抗原结合的功能。重链的Fab区与Fc区通过铰链部连接,木瓜中含有的蛋白质分解酶木瓜蛋白酶可分解该铰链部,切断成为2个Fab区和1个Fc区。Fab区中接近于“Y”字前端的部分可观察到氨基酸序列中的多样的变化,使得其能够与多种抗原结合,被称为可变区(V区)。将轻链的可变区称为VL区,重链的可变区称为VH区。V区以外的Fab区和Fc区是变化较少的区域,被称为恒定区(C区)。将轻链的恒定区称为CL区,将重链的恒定区称为CH区,CH区进一步被分为CH1~CH3这3种。重链的Fab区由VH区和CH1形成,重链的Fc区由CH2和CH3形成。铰链部位于CH1与CH2之间。蛋白质L与轻链为 κ 链的可变区(在本说明书中,有时简称为“VL- κ ”)结合(非专利文献5~7)。

[0062] 本发明的 κ 链可变区结合性肽与免疫球蛋白的 κ 链可变区结合。本发明肽所要结合的含VL- κ 链可变区的蛋白质可以使包含免疫球蛋白的 κ 链可变区的蛋白质,可以是含有不缺少Fab区和Fc区的IgG,可以是IgM、IgD及IgA等其它Ig类,还可以是将上述蛋白质经过蛋白质工程学改变的免疫球蛋白分子的衍生物。本发明的VL- κ 链可变区结合性肽所结合的免疫球蛋白分子衍生物只要是具有VL- κ 链可变区的衍生物即可,没有特别限制。可以列举例如:仅免疫球蛋白G的Fab区片段化而得到的Fab片段、仅由免疫球蛋白G的可变区形成的scFv、将人免疫球蛋白G的一部分结构域取代为其它生物的免疫球蛋白G的结构域并使其融合而得到的嵌合型免疫球蛋白G、对Fc区的糖链实施了分子修饰的免疫球蛋白G、与药物共价键合的scFv片段等。

[0063] 在本发明中,“肽”是指包含具有多肽结构的所有分子的意思,不仅包含所谓的蛋白质,还包含片段化后的物质、通过肽键与其它肽连接而成的物质。“结构域”是指蛋白质的高级结构的单元,由数十至数百个氨基酸残基序列构成,可表现出某种物理化学或生物化学功能的肽的单元。蛋白质、肽的“突变体”是指在氨基酸水平对野生型的蛋白质、肽的序列至少导入了1个以上的取代、添加或缺失而形成的蛋白质或肽。对于取代氨基酸的突变的表示而言,在取代位置的序号前添加野生型或非突变型的氨基酸、并在取代位置的序号后添加突变后的氨基酸来进行表示。例如,将29位的Gly取代为Ala的突变表示为G29A。

[0064] “蛋白质L(PpL)”是来自于属于消化链球菌属(*Peptostreptococcus*)的厌氧性革兰氏阳性球菌的细胞壁的蛋白质。优选为来自于大消化链球菌(*Peptostreptococcus magnus*)的PpL、来自于大消化链球菌312株及大消化链球菌3316株的2种PpL,但并不限于此(非专利文献4~6)。需要说明的是,在本说明书中,有时将大消化链球菌312株的PpL简称为“PpL312”,将来自于大消化链球菌3316株的PpL简称为“PpL3316”。将PpL312的氨基酸序列示于序列号1,将PpL3316的氨基酸序列示于序列号2(包含信号序列)。

[0065] PpL在蛋白质中含有由70~80个残基形成的多个VL- κ 结合性结构域。PpL312中含有的VL- κ 结合性结构域的数量为5个,PpL3316中含有的VL- κ 结合性结构域的数量为4个。PpL312的VL- κ 结合性结构域从N末端起依次称为B1结构域(序列号3)、B2结构域(序列号4)、

B3结构域(序列号5)、B4结构域(序列号6)、B5结构域(序列号7), PpL3316的VL- κ 结合性结构域从N末端起依次称为C1结构域(序列号8)、C2结构域(序列号9)、C3结构域(序列号10)、C4结构域(序列号11)(非专利文献5~6)。

[0066] 图1中示出了对这些各种VL- κ 结合性结构域的氨基酸序列进行比对的情况。在图1中,仿照非专利文献7~8及专利文献9,将赋予的残基序号示于()内。通过研究可知,N末端的约20个残基不具有特定的二级结构,即使在使N末端区域缺失的情况下,也保持作为VL- κ 结合性结构域的三维结构,表现出VL- κ 结合性(非专利文献7)。因此,例如B1结构域的序列号12的氨基酸序列、B2结构域的序列号13的氨基酸序列、B3结构域的序列号14的氨基酸序列、B4结构域的序列号15的氨基酸序列、B5结构域的序列号16的氨基酸序列、C1结构域的序列号17的氨基酸序列、C2结构域的序列号18的氨基酸序列、C3结构域的序列号19的氨基酸序列、C4结构域的序列号20的氨基酸序列所示的肽也作为VL- κ 结合性结构域而发挥功能。本说明书中示出的PpL312的B5结构域的氨基酸序列优选为序列号16所示的氨基酸序列。另外,作为适用于本发明的氨基酸序列,优选为广泛包含与各种结构域(序列号12~20)共通的氨基酸残基的氨基酸序列(序列号21)。在本说明书中,将序列号21的N末端定义为第1位,赋予氨基酸残基序号。在图1中,示出了基于该定义的残基序号,并且将各种结构域(序列号12~20)从位于第1位的Val至位于第60位的Ala用粗体字表示。

[0067] 本发明的技术特征在于,通过对于野生型的PpL的VL- κ 结合结构域(B1~B5、C1~C4)的任一者导入特定的氨基酸取代突变,与导入突变前相比,使含有免疫球蛋白 κ 链可变区的蛋白质的酸解离pH向中性侧移动。

[0068] 突变型VL- κ 链可变区结合性肽(1)如后面叙述的实施例中确认的那样,在更高pH的酸性洗脱条件下解离 κ 链可变区肽,且在酸性条件下使 κ 链可变区肽洗脱时的洗脱峰更尖锐。

[0069] 在序列号21的氨基酸序列中,本发明的氨基酸残基的取代部位是选自第15位、第16位、第17位及第18位的1个以上的氨基酸残基。例如,序列号12的第15位为Gln,第16位为Thr,第17位为Ala,第18位为Glu。在序列号12~20的氨基酸序列中,第15位为Gln,第17位为Ala。另外,在C1结构域的氨基酸序列(序列号17)中,第16位为Asn,在B5结构域的氨基酸序列(序列号16)中,第18位为Thr。在突变导入前和后的氨基酸序列的氨基酸数不同的情况下,在序列同一性为80%以上时,本领域技术人员可以容易地确定相当于序列号21的第15~18位的位置。具体而言,可以用氨基酸序列多序列比对用程序Clustal (<http://www.clustal.org/omega/>)或遗传信息处理软件GENETYX (<https://www.genetyx.co.jp/>)进行比对来确认。需要说明的是,根据非专利文献7~8及专利文献9中记载的残基序号,本发明的氨基酸残基的取代部位相当于第35位~第38位。

[0070] 本发明的突变型VL- κ 链可变区结合性肽(1)具有选自上述的第15位、第16位、第17位及第18位中1个以上的氨基酸残基被取代的氨基酸序列。取代的位置优选为第15位、第16位、第17位及第18位,更优选为第15位、第16位及第18位,进一步优选为第16位及第18位,最优选为第16位。

[0071] 在本发明中,肽“具有(特定的)氨基酸序列”是指只要该肽的氨基酸序列包含特定的氨基酸序列即可,且保持了该肽的功能。在肽中,作为特定的氨基酸序列以外的序列,除了用于组氨酸标签、固定化的接头序列以外,可以列举-S-S-键等的交联结构等。

[0072] 突变的氨基酸的种类包括对非蛋白质氨基酸(non-proteinogenic amino acids)、非天然氨基酸的取代,没有特别限定,从基因工程上生产的观点考虑,可以优选使用天然型氨基酸。另外,天然型氨基酸可分类为:中性氨基酸;酸性氨基酸Asp和Glu;碱性氨基酸Lys、Arg、His。中性氨基酸可分类为:脂肪族氨基酸;亚氨基酸Pro;芳香族氨基酸Phe、Tyr、Trp。脂肪族氨基酸还可以分类为:Gly;Ala;分支氨基酸Val、Leu、Ile;羟基氨基酸Ser、Thr;含硫氨基酸Cys、Met;酰胺氨基酸Asn、Gln。另外,由于Tyr具有酚羟基,因此不仅可以分类为芳香族氨基酸,也可以分类为羟基氨基酸。另外,从其它观点考虑,也可以将天然氨基酸分类为:疏水性高的非极性氨基酸类Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Cys、Met、Pro、Phe;中性的极性氨基酸类Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr;酸性的极性氨基酸类Asp、Glu;碱性的极性氨基酸类Lys、Arg、His。另外,还可以优选使用在支链上具有可在酸性条件下质子化的官能团的氨基酸His、Asp及Glu。

[0073] 作为在第15位取代的氨基酸,优选为Ala、Glu或His,特别优选为His。作为在第16位取代的氨基酸,优选为Ala、Asp、Gly、Ile、Leu或His,优选为Ala、Asp或His。作为在第17位取代的氨基酸的种类,优选为Glu或His,特别优选为His。作为在第18位取代的氨基酸的种类,优选为Asp、Gln或His。

[0074] 突变型VL- κ 链可变区结合性肽(2)是一种免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,其在上述(1)的氨基酸序列中,具有在除上述第15位、第16位、第17位及第18位以外的区域中缺失、取代和/或添加了1个以上且20个以下的氨基酸残基的氨基酸序列,且与导入突变前相比,其酸解离pH向中性侧移动

[0075] 作为上述的缺失、取代和/或添加的突变数量,优选为15个以下或10个以下,更优选为7个以下、5个以下或3个以下,进一步优选为1个或2个,特别优选为1个。在本发明的突变型免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽(2)的氨基酸序列中,氨基酸残基的缺失、取代和/或添加的位置只要是突变型VL- κ 链可变区结合性肽(1)中限定的第15位、第16位、第17位及第18位以外即可,没有特别限制。作为氨基酸残基的缺失、取代和/或添加的位置,可以列举例如N末端和/或C末端。这些部位特别优选作为缺失和/或添加的部位。

[0076] 序列号12~21的氨基酸序列是使序列号3~11的氨基酸序列的N末端侧10~20个残基及C末端侧1~2个残基缺失后的氨基酸序列。因此,作为实施方式之一,作为向N末端和/或C末端添加氨基酸,可举出添加来自于这些氨基酸序列的氨基酸序列。作为实施方式之一,可举出Glu-Glu或Glu-Gln作为添加于N末端的氨基酸序列。作为实施方式之一,可举出Gly、Cys或Gly-Cys作为添加于C末端的氨基酸序列。

[0077] 突变型VL- κ 链可变区结合性肽(3)是一种免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,其具有相对于上述(1)的氨基酸序列有80%以上序列同一性的氨基酸序列,且与导入突变前相比,其酸解离pH向中性侧移动,其中,选自上述(1)所限定的氨基酸序列中的第15位、第16位、第17位及第18位中的1个以上位置的氨基酸残基的取代在(3)中没有进一步突变。

[0078] 本发明的突变型VL- κ 链可变区结合性肽(3)是一种免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽,其特征在于,具有相对于上述(1)所限定的氨基酸序列有80%以上序列同一性的氨基酸序列,且与导入突变前相比,包含免疫球蛋白 κ 链可变区的蛋白质的酸解离pH向中性侧移动,其中,选自上述(1)所限定的氨基酸序列中的第15位、第16位、第17位及第18位中的1个以上位置的氨基酸残基的取代在(3)中没有进一步突变。

[0079] 作为上述序列同一性,优选为85%以上,进一步优选为90%以上、95%以上、98%以上或99%以上,特别优选为99.5%以上。如上所述,上述序列同一性可以使用氨基酸序列多序列比对用程序Clustal (<http://www.clustal.org/omega/>) 等进行评价。

[0080] 本发明的突变型VL- κ 链可变区结合性肽(1)~(3)的特征在于,与导入突变前相比,含有免疫球蛋白 κ 链可变区(VL- κ)的蛋白质的酸解离pH向中性侧移动。通常,在强酸条件下、强碱条件下,分子表面电荷的变化、改性所导致的立体结构的变化是主要原因,会使肽之间的键消失。“酸解离pH”是指在酸性侧(值小于7的pH)其特异性结合消失而解离的pH。酸解离pH是能够对吸附于以本发明的突变型VL- κ 链可变区结合性肽(1)~(3)作为配体的亲和分离基质的含VL- κ 的蛋白质进行分离(洗脱)的最高pH值。因此,在本说明书中,酸解离pH与酸洗脱pH是基本上含义相同的。酸解离pH“与导入突变前相比向中性侧移动”是指,结合的解离所需要的pH的数值在导入突变前较小,在导入突变后较大。即,导入突变后可在更弱的酸性溶液中使结合解离。

[0081] 酸解离pH的数值随着含VL- κ 的蛋白质的种类、酸性溶液的缓冲成分的种类/浓度而改变,在亲和分离基质的情况下,随着水不溶性担载体的种类/结构、配体固定化用接头的种类/结构而改变,因此难以用明确的数值范围来表示。通常,导入本突变前的酸解离pH为2.0以上且3.5以下左右,随着导入本发明的突变而移动至pH3.0以上且4.5以下左右,但并不限于此。在该条件下进行洗脱时,对抗体的损伤小(Ghose S.等, *Biotechnology and bioengineering*, 2005年, 92卷, 6号)。通过导入本发明的突变,优选酸解离pH以pH值计向中性侧移动0.1以上,更优选以pH值计向中性侧移动0.2以上,进一步优选以pH值计向中性侧移动0.3以上,更进一步优选以pH值计向中性侧移动0.4以上,更进一步优选以pH值计向中性侧移动0.5以上。

[0082] 评价导入突变前后的酸解离pH的方法只要是能够检测出生物分子间相互作用的方法即可,没有特别限定,例如,可以通过使用了表面等离子体共振(Surface Plasmon Resonance)原理的Biacore系统(GE Healthcare公司)等生物传感器来进行试验。作为酸解离pH的测定方法,例如,可以将待结合的一种肽固定于传感器芯片,将调整至希望pH的另一种肽的溶液添加于流路,检测有无结合信号,对无法检测出结合信号的pH进行评价,但并不限于此。作为其它方法,可以在添加了肽溶液后,添加希望pH的缓冲液,对添加前后芯片上未解离而残留的结合信号的变化进行评价。作为测定条件,优选将温度设为20~40℃的恒定温度,观察结合状态时的pH设为pH5~8的中性条件。作为缓冲液的成分,在中性的情况下,可以列举:磷酸、Tris、Bis-Tris等,在酸性的情况下,可以列举:乙酸、柠檬酸、甘氨酸等,但并不限于此。缓冲液的NaCl浓度没有特别限定,优选为0~0.15M左右,特别优选观察解离状态时为0M。在该评价中,为了比较导入突变前后的区别,全部满足除突变以外的条件是很重要的。例如,在使用了Biacore系统的评价中,可以将突变型VL- κ 链可变区结合性肽以固定于芯片侧(固相)的形式进行评价,也可以将其以添加于流路侧(液相)的形式进行评价。例如,在难以满足将突变型VL- κ 链可变区结合性肽固定于芯片的量的情况下,优选满足添加流路时的浓度而将突变型VL- κ 链可变区结合性肽添加于流路。

[0083] 作为评价酸解离pH的方法,优选使用亲和分离基质对色谱图进行评价的方法。例如,可以将待结合的一种肽固定于色谱柱,并将该柱与色谱装置连接,然后向该柱添加另一种肽的溶液,对于以逐渐降低pH的线性梯度洗脱吸附的肽的峰顶的pH进行评价,但并不限

定于此。测定时的温度、缓冲液、盐浓度优选为上述的条件,但没有特别限定于此。例如,为了获得良好的pH线性梯度,优选除pH以外将结合用缓冲液(缓冲液A)与解离用缓冲液(缓冲液B)的成分设为相同。在该评价中,为了比较导入突变前后的区别,全部满足除突变以外的条件是很重要的。在该评价体系中,可以将突变型VL- κ 链可变区结合性肽以固定于柱侧(固相)的形式进行评价,也可以将其以添加并洗脱侧(液相)的形式进行评价。例如,在难以满足将突变型VL- κ 链可变区结合性肽固定于柱的量的情况下,优选满足添加于柱时的浓度而添加突变型VL- κ 链可变区结合性肽,并将得到的色谱图重叠进行比较。

[0084] 本发明的VL- κ 链可变区结合性肽(1)~(3)可以作为亲和配体而保持在柱中,显示出优异的VL- κ 结合力。对于VL- κ 链可变区的亲和性例如可以通过使用了表面等离子体共振原理的Biacore系统等生物传感器来进行试验,但并不限定于此。

[0085] 作为结合参数,可以使用例如亲和常数(K_A)、解离常数(K_D) (永田等著,“生物体物质相互作用的实时分析实验法”,Spiegel-Verlag Tokyo,1998年,41页)。亲和常数是结合速度常数(k_{on})除以解离速度常数(k_{off})得到的值($K_A=k_{on}/k_{off}$)。

[0086] 本发明的VL- κ 链可变区结合性肽与含有VL- κ 链可变区的肽的亲和常数可以通过利用Biacore系统将含有VL- κ 链可变区的肽固定于传感器芯片并在温度25°C、pH7.4的条件下将本发明的VL- κ 链可变区结合性肽添加于流路的实验体系而求出。关于具有本发明的导入了突变的序列,优选与含有VL- κ 链可变区的肽的亲和常数(K_A)为 $1 \times 10^6 M^{-1}$ 以上,更优选为 $5 \times 10^6 M^{-1}$ 以上,进一步优选为 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 以上。但是,亲和常数随着含有VL- κ 链可变区的肽的种类、VL- κ 结合肽的结构域数量而变化,因此并不限定于此。

[0087] PpL是以串联排列的形式含有4个或5个VL- κ 链可变区结合性结构域的蛋白质。因此,作为实施方式之一,本发明的VL- κ 链可变区结合性肽也可以是2个以上、优选为3个以上、更优选为4个以上、更优选为5个以上的作为单体或单结构域的该VL- κ 链可变区结合性肽连接而成的多个结构域的多聚体。作为连接的结构域数量的上限,例如为10个以下,优选为8个以下,更优选为6个以下。这些多聚体可以是作为单一VL- κ 链可变区结合性肽连接体的同源二聚体、同源三聚体等均聚物,只要不包含PpL312的B1~B4结构域及PpL3316的C1~C4结构域中的任一者,也可以是作为多种VL- κ 链可变区结合性肽连接体的异源二聚体、异源三聚体等杂聚物。

[0088] 作为本发明的VL- κ 链可变区结合性肽多聚体的连接方法,可以列举:通过1个或多个氨基酸残基进行连接的方法及不包夹氨基酸残基而直接连接的方法,但并不限定于这些方法。连接的氨基酸残基数量没有特别限制,优选为20个残基以下,更优选为15个残基以下,进一步优选为10个残基以下,更进一步优选为5个残基以下,更进一步优选为2个残基以下。这些氨基酸序列优选为不使单体蛋白质的三维立体结构变得不稳定的序列。

[0089] 另外,作为实施方式之一,可以列举融合肽,其特征在于,由本发明得到的VL- κ 链可变区结合性肽或其多聚体作为1个构成成分与功能不同的其它肽融合。作为融合肽的例子,可以列举白蛋白、谷胱甘肽S-转移酶(GST)融合而成的肽作为例子,但并不限定于此。另外,在融合了DNA适体(apptamer)等核酸、抗生素等药物、聚乙二醇(PEG)等高分子的情况下,只要利用了本发明中得到的肽的有用性,就包含在本发明中。

[0090] 作为本发明的实施方式之一,包括将本发明肽用作亲和配体,所述亲和配体的特征在于,对免疫球蛋白、其片段、特别是对VL- κ 链可变区具有亲和性。同样地,作为实施方式

之一,也包括该亲和分离基质,所述亲和分离基质的特征在于将配体固定于水不溶性担载体。

[0091] 本发明的亲和分离基质的特征在于,本发明的上述免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽或上述免疫球蛋白 κ 链可变区结合性肽多聚体以配体的形式固定于水不溶性担载体。

[0092] 在本发明中,“配体”是指,基于抗原与抗体的结合所代表的特异性分子间亲和力而从某个分子集合中选择性捕获或结合目标分子的物质、官能团的用语,在本发明中,是指对免疫球蛋白特异性结合的肽。在本发明中,简单表示为“配体”的情况与“亲和配体”含义相同。

[0093] 在本发明中,“亲和配体”是指,基于抗原与抗体的结合所代表的特异性分子间亲和力而从某个分子集合中选择性捕获或结合目标分子的物质、官能团的用语,在本发明中,是指对免疫球蛋白特异性结合的肽。在本发明中,简单表示为“配体”的情况与“亲和配体”含义相同。

[0094] 作为本发明中使用的水不溶性担载体,可示例出:玻璃珠、硅胶等无机担载体;交联聚乙烯醇、交联聚丙烯酸酯、交联聚丙烯酰胺、交联聚苯乙烯等合成高分子;由结晶性纤维素、交联纤维素、交联琼脂糖、交联葡聚糖等多糖类形成的有机担载体;以及由它们的组合而得到的有机-有机、有机-无机等复合担载体等。作为市售品,可示例出:多孔纤维素凝胶GCL2000、烯丙基葡聚糖与亚甲基双丙烯酰胺以共价键交联而成的Sephacryl S-1000、丙烯酸酯类担载体Toyopearl、琼脂糖类交联担载体Sephacryl CL4B、以及纤维素类交联担载体Cellufine等。但本发明中的水不溶性担载体并不仅限于例示的上述担载体。

[0095] 另外,从本亲和分离基质的使用目的及方法方面考虑,本发明中使用的水不溶性担载体优选表面积大,优选为具有大量适当大小的微孔的多孔状。作为担载体的形态,可以是珠状、单片状、纤维状、膜状(包括中空丝)等的任一种,可以选择任意的形态。

[0096] 上述配体直接或借助连接基团通过共价键固定于上述水不溶性基材。作为该连接基团,可以列举例如: C_{1-6} 亚烷基、氨基(-NH-)、醚基(-O-)、羰基(-C(=O)-)、酯基(-C(=O)O-或-OC(=O)-)、酰胺基(-C(=O)NH-或-NHC(=O)-)、脲基(-NHC(=O)NH-);选自 C_{1-6} 亚烷基、氨基、醚基、羰基、酯基、酰胺基及脲基中的2个以上且10个以下的基团连接而成的基团;一端或两端具有选自氨基、醚基、羰基、酯基、酰胺基及脲基中的基团的 C_{1-6} 亚烷基。作为上述的连接数量,优选为8个以下或6个以下,更优选为5个以下,进一步优选为4个以下。另外,上述 C_{1-6} 亚烷基可以被羟基等取代基等所取代。

[0097] 本发明的亲和分离基质可以通过将上述配体固定于上述水不溶性担载体来制造。

[0098] 关于配体的固定化方法,例如,可以通过利用了存在于配体的氨基、羧基或硫醇基的现有的偶联法而结合于担载体。作为偶联法,可以列举:使溴化氰、表氯醇、二缩水甘油基醚、甲苯磺酰氯、三氟乙基磺酰氯、肼或高碘酸钠等与担载体发生反应而对担载体进行活性化、或者在担载体表面导入反应性官能团,从而与以配体的形式固定的化合物进行偶联反应的固定化的方法;以及,在存在担载体和以配体的形式固定的化合物的体系中加入碳化二亚胺这样的缩合试剂、或者戊二醛这样在分子中具有多个官能团的试剂,通过缩合、交联来进行的固定化方法。

[0099] 另外,可以在配体与担载体之间导入由多个原子形成的间隔分子,也可以将配体直接固定于担载体。因此,为了进行固定化,可以对本发明的VL- κ 链可变区结合性肽进行化

学修饰,可以加入有利于固定化的氨基酸残基。作为有利于固定化的氨基酸,可以列举:在支链具有有利于固定化的化学反应的官能团的氨基酸,可以列举例如:在支链含有氨基的Lys、在支链含有硫醇基的Cys。本发明的本质在于,在本发明中赋予肽的VL- κ 链可变区结合性同样地被赋予将该肽以配体的形式固定化而得到的基质,为了固定化而进行的任何修饰/变更均包含在本发明的范围内。

[0100] 利用本发明的亲和分离基质,可以通过亲和柱色谱纯化法对含有免疫球蛋白的 κ 链可变区的蛋白质(含VL- κ 的蛋白质)进行分离纯化。这些含VL- κ 的蛋白质的纯化方法可以通过免疫球蛋白的亲和柱色谱纯化法、例如按照利用SpA亲和分离基质的纯化方法的步骤来实现(非专利文献1)。

[0101] 即,在制备含有含VL- κ 的蛋白质的溶液(pH为中性附近)后,使该溶液通过填充有本发明的亲和分离基质的亲和柱,吸附含VL- κ 的蛋白质。接着,使适量的纯缓冲液通过亲和柱,对柱内部进行清洗。此时,希望的含VL- κ 的蛋白质被吸附于柱内的本发明的亲和分离基质。另外,在该样品添加工序至基质清洗工序中,将本发明所得到的肽以配体的形式固定化的亲和分离基质吸附保持含VL- κ 的目标蛋白质的性能优异。接下来,将调整为适当的pH的酸性缓冲液通过柱,对希望的含VL- κ 的蛋白质进行洗脱,由此实现高纯度的纯化。用于洗脱肽的上述酸性缓冲液中可以添加促进从基质中解离的物质。

[0102] 特别是对于本发明的亲和分离基质而言,可以使用pH更靠近中性侧的酸性缓冲液作为洗脱液。作为使用的酸性缓冲液,优选pH值为pH3.0以上,更优选为pH3.1以上,进一步优选为pH3.2以上,更进一步优选为pH3.3以上,更进一步优选为pH3.4以上,更进一步优选为pH3.5以上,更进一步优选为pH3.6以上,更进一步优选为pH3.7以上,更进一步优选为pH3.8以上。使用的酸性缓冲液的上限没有特别限定,在亲和柱色谱的中间清洗中以pH5.0左右进行清洗的情况、为了在纯化后除去病毒而在pH3.8左右进行孵育的情况下,使用的酸性缓冲液优选为pH4.5以下,更优选为pH4.0以下。

[0103] 通过使完全不损害配体化合物、担载体基材的功能的程度的适当强酸性或强碱性纯缓冲液通过进行清洗,可以对本发明的亲和分离基质进行再利用。上述的再生用缓冲液可以配合适当的改性剂、有机溶剂。

[0104] 本发明还涉及编码上述突变型VL- κ 链可变区结合性肽的DNA。对于编码本发明肽的DNA而言,只要翻译其碱基序列而得到的氨基酸序列构成该肽即可。这样的碱基序列可以利用通常使用的公知的方法、例如聚合酶链式反应(以下简称为“PCR”)法来获得。另外,也可以通过公知的化学合成法来合成,还可以由DNA文库得到。该碱基序列的密码子可以用简并密码子取代,只要翻译时编码相同氨基酸即可,不需要与原本的碱基序列相同。可以获得具有一个或一个以上该碱基序列的重组DNA、或者含有该重组DNA的质粒及噬菌体等载体、以及通过具有该DNA的载体进行转化而得到的转化微生物/细胞、或者导入了该DNA的转基因生物、或者以该DNA作为转录模板DNA的无细胞蛋白质合成体系。

[0105] 另外,本发明的VL- κ 链可变区结合性肽可以以与具有辅助蛋白质表达的作用或易于纯化的优点的公知蛋白质的融合肽的形式而获得。即,可以得到至少含有一个编码融合肽的重组DNA的微生物或细胞,所述融合肽含有本发明的VL- κ 链可变区结合性肽。作为上述蛋白质的例子,可以列举:麦芽糖结合蛋白(MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)等,但并不限定于这些蛋白质。

[0106] 用于改变编码本发明的肽的DNA的部位特异性突变的导入可以如下所述使用重组DNA技术、PCR法等来进行。

[0107] 即,利用重组DNA技术进行的突变导入例如可以通过盒式突变法来进行,所述盒式突变法是如下方法:在编码本发明肽的基因中于希望进行突变导入的目标部位的两侧存在适当的限制酶识别序列时,用上述限制酶切断这些限制酶识别序列部分,除去包含希望进行突变导入的部位的区域,然后通过化学合成等插入仅在目标部位进行了突变导入的DNA片段。

[0108] 另外,利用PCR进行的部位特异性突变导入可以通过例如双引物法来进行,所述双引物法是如下方法:以编码本发明肽的双链质粒作为模板,使用在+链及-链含有互补突变的2种合成寡聚引物进行PCR。

[0109] 另外,通过将编码本发明的单体肽(1个结构域)的DNA仅以需要的数量串联连接,也可以制备编码多聚体肽的DNA。例如,编码多聚体肽的DNA的连接方法可以在DNA序列中导入适当的限制酶部位,并用DNA连接酶连接由限制酶片段化后的双链DNA。限制酶部位可以是1种,也可以导入多种不同种类的限制酶部位。另外,在编码多聚体肽的DNA中,在编码各单体肽的碱基序列相同的情况下,在宿主中可能诱导同源重组,因此,编码连接的单体肽的DNA的碱基序列间的序列同一性为例如90%以下,优选为85%以下,更优选为80%以下,进一步更优选为75%以下。需要说明的是,碱基序列的同一性也可以与氨基酸序列同样地通过通常方法来确定。

[0110] 本发明的“表达载体”包含编码上述的本发明肽或其部分氨基酸序列的碱基序列、以及可发挥作用地连接于该碱基序列且在宿主中可发挥功能的启动子。通常,可以通过将编码本发明肽的基因连接或插入适当的载体来得到,用于插入基因的载体只要能够在宿主中自主复制即可,没有特别限定,可以使用质粒DNA、噬菌体DNA作为载体。例如,在使用大肠杆菌作为宿主的情况下,可以列举:pQE系载体(QIAGEN公司)、pET系载体(Merck公司)及pGEX系载体(GE Healthcare Bioscience公司)的载体等。

[0111] 本发明的转化细胞可以通过向成为宿主的细胞导入本发明的重组载体来获得。作为向宿主导入重组体DNA的方法,可以列举例如:使用钙离子的方法、电穿孔法、原生质体法、乙酸锂法、土壤杆菌感染法、基因枪法及聚乙二醇法等,但并不限于此。另外,作为在宿主中表达得到的基因的功能的方法,可以列举将本发明中得到的基因导入基因组(染色体)的方法等。关于成为宿主的细胞,没有特别限定,从可廉价地大量生产方面考虑,可优选使用大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、短芽孢杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属、链霉菌属(*Streptomyces*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)等细菌(真细菌)。

[0112] 本发明的VL- κ 链可变区结合性肽可以通过如下方式制造:在培养基中对上述转化细胞进行培养,使本发明的肽生成蓄积于培养菌体中(包括菌体周质区域中)或培养液中(菌体外),从该培养物中提取希望的肽。另外,本发明肽可以通过如下方式制造:在培养基中对上述转化细胞进行培养,使包含本发明肽的融合肽生成蓄积于培养菌体中(包括菌体周质区域中)或培养液中(菌体外),从该培养物中提取该融合肽,并用适当的蛋白酶切断该融合肽,从而提取希望的肽。

[0113] 在培养基中对本发明的转化细胞进行培养的方法可以按照宿主的培养所使用的通常方法来进行。得到的转化体的培养所使用的培养基只要是能够以高效率、高产量生产

本发明肽的培养基即可,没有特别限制。具体而言,可以使用葡萄糖、蔗糖、甘油、聚脲、肉提取物、酵母提取物、酪蛋白氨基酸等碳源、氮源。另外,可以根据需要添加钾盐、钠盐、磷酸盐、镁盐、锰盐、锌盐、铁盐等无机盐类。在使用营养缺陷性的宿主细胞时,可以添加生长所需要的营养物质。另外,如果需要,可以添加青霉素、红霉素、氯霉素、新霉素等抗生素。

[0114] 另外,为了抑制存在于菌体内外的来自于宿主的蛋白酶所导致的该目标肽的分解,可以以适当的浓度添加公知的各种蛋白酶抑制剂,即,苯甲基磺酰氟(Phenylmethane sulfonyl fluoride,PMSF)、苄脒(Benzamidine)、4-(2-氨基乙基)-苯磺酰氯(4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride,AEBSF)、抗蛋白酶素(Antipain)、糜蛋白酶抑制素(Chymostatin)、亮抑蛋白酶肽(Leupeptin)、胃酶抑素A(Pepstatin A)、磷酸阿米酮(Phosphoramidon)、抑酶肽(Aprotinin)、乙二胺四乙酸(EDTA)和/或其它市售的蛋白酶抑制剂。

[0115] 另外,为了使本发明的VL- κ 链可变区结合性肽正确地折叠,可以利用例如GroEL/ES、Hsp70/DnaK、Hsp90、Hsp104/ClpB等分子伴侣(例如,通过共表达或融合蛋白质化等方法使其与本发明的肽共存)。需要说明的是,为了使本发明肽正确折叠,有在培养基中加入有助于正确折叠的添加剂及在低温下进行培养等方法,但并不限于此。

[0116] 作为对于以大肠杆菌为宿主得到的转化细胞进行培养的养基,可以列举LB培养基(胰蛋白胨1%,酵母提取物0.5%,NaCl 1%)或2×YT培养基(胰蛋白胨1.6%,酵母提取物1.0%,NaCl 0.5%)等。

[0117] 另外,通过在例如15~42°C、优选为20~37°C的培养温度、通气搅拌条件下,进行数小时~数天的需氧培养,使本发明肽蓄积于培养细胞内(包括菌体周质区域内)或培养溶液(细胞外)中进行回收。根据情况,可以阻断通气进行厌氧培养。在分泌生产重组肽的情况下,可以在培养结束后通过离心分离、过滤等通常的分离方法对培养细胞与含有分泌生产的肽的上清液进行分离,从而回收生产的重组肽。另外,在蓄积于培养细胞内(包括菌体周质区域内)的情况下,例如,通过离心分离、过滤等方法从培养液中采集菌体,接着,通过超声波破碎法、弗氏细胞压碎器法等对该菌体进行破碎,和/或添加表面活性剂等可进行可溶化,从而对蓄积生产于细胞内的肽进行回收。

[0118] 本发明的肽的纯化可以单独或组合使用亲和色谱、阳离子或阴离子交换色谱、凝胶过滤色谱等来进行。得到的纯化物质为目标肽的确认可以通过例如SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳、N末端氨基酸序列分析、Western印迹法等通常的方法来进行。

[0119] 本申请要求2015年1月26日提出申请的日本专利申请第2015-12664号的优先权。以参考的方式将2015年1月26日提出申请的日本专利申请第2015-12664号的说明书的全部内容引用到本申请中。

[0120] 实施例

[0121] 以下,基于实施例对本发明更详细地进行说明,但本发明并不限于这些实施例。

[0122] 以下的实施例中获得的突变肽以“肽名称-导入的突变”的形式表示,未导入突变的野生型肽以“肽名称-Wild”的形式表示。例如,序列号7所示的野生型PpL312的B5结构域以“LB5-Wild”表示。另外,在本实施例中,实验中主要利用了序列号16所示的PpL312的B5结构域,为了将其与序列号7相区别,表示为“LB5t-Wild”。导入了突变T16H的PpL312的B5结构域突变体表示为“LB5t-T16H”。对于同时导入了多种突变的突变体的表示,使用斜线一并进

行表示。例如,导入了突变T16H及T18D的PpL312的B5结构域突变体表示为“LB5t-T16H/T18D”。另外,关于结构域数量,紧接着句号在连接的数量后加上“d”进行表示。在由单结构域形成的突变体的情况下,表示为“LB5t-T16H.1d”。

[0123] 实施例1:PpL的各种突变型VL-κ结合肽的制备

[0124] (1) 表达质粒制备

[0125] 由LB5t-Wild.1d(序列号16)的氨基酸序列进行逆翻译,设计了编码该肽的碱基序列(序列号22)。需要说明的是,根据实验方面的情况,碱基序列设计为编码N末端添加了Glu-Gln、且C末端添加了Gly的氨基酸序列。这1~2个残基的添加序列来自于野生型PpL的B5结构域。然后,将表达质粒的制备方法示于图2。编码LB5t-Wild.1d的DNA以连接具有相同限制酶位点的2种双链DNA(f1和f2)的形式进行制备,将其导入表达载体的多克隆位点。实际上,通过连接2种双链DNA与表达载体的总计3种双链DNA的3片段接合,同时实施了制备编码DNA和对载体的导入。2种双链DNA的制备方法通过重叠PCR对相互含有30个碱基左右的互补区域的2种单链寡聚DNA(f1-1/f1-2或f2-1/f2-2)进行延长,制备了目标双链DNA。具体的实验操作如下所述。通过外包合成单链寡聚DNA f1-1(序列号23)/f1-2(序列号24)(Sigma Genosys公司),使用Pyrobest(TAKARA BIO公司)作为聚合酶,进行了重叠(Overlap)PCR反应。对PCR反应产物进行琼脂糖电泳,并切取目标条带,由此用限制酶BamHI和HindIII(均为TAKARA BIO公司)切断了提取出的双链DNA。同样地通过外包合成单链寡聚DNA f2-1(序列号25)/f2-2(序列号26),经过重叠PCR反应,用限制酶HindIII和EcoRI(均为TAKARA BIO公司)切断了合成、提取出的双链DNA。接着,将上述2种双链DNA亚克隆至质粒载体pGEX-6P-1(GE Healthcare Biosciences公司)的多克隆位点中的BamHI/EcoRI位点。使用Ligation high(TOYOBO公司),并按照产品附带的实验方案实施了亚克隆中的接合反应。

[0126] 使用上述质粒载体pGEX-6P-1,按照感受态细胞产品所附带的实验方案进行了该感受态细胞(TAKARA BIO公司,“大肠杆菌HB101”)的转化。如果使用上述质粒载体pGEX-6P-1,则可产生融合了谷胱甘肽-S-转移酶(以下简称为“GST”)的LB5t-Wild.1d。接着,使用质粒纯化试剂盒(Promega公司制造“Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System”),按照试剂盒附带的标准实验方案对质粒DNA进行了扩增、提取。表达质粒的编码DNA的碱基序列的确认使用DNA测序仪(Applied Biosystems公司制造的“3130xl Genetic Analyzer”)来进行。使用基因分析试剂盒(Applied Biosystems公司制造的“BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit”)和质粒载体pGEX-6P-1的测序用DNA引物(GE Healthcare Biosciences公司),按照附带的实验方案进行了测序PCR反应。使用质粒纯化试剂盒(Applied Biosystems公司制造的“BigDye X Terminator Purification Kit”),按照附带的实验方案对该测序产物进行纯化,用于碱基序列分析。

[0127] 对于编码各种LB5t突变体的DNA而言,以制备的LB5t-Wild.1d的表达质粒作为模板,通过使用了质粒载体pGEX-6P-1的5'侧测序用DNA引物和序列号27~34中各DNA引物(3'侧)的PCR反应,合成了与图2的f1对应的双链DNA。DNA引物PCR反应使用Blend Taq-Plus-(TOYOBO公司)按照附带的实验方案进行。用限制酶BamHI和HindIII切断该双链DNA,并用相同的限制酶切断LB5t-Wild.1d的表达质粒,通过对两者进行接合反应,制备了各种LB5t突变体的表达质粒。将制备各突变体时使用的寡聚DNA的碱基序列、编码突变体的cDNA的碱基序列及突变体的氨基酸序列的序列号示于表1。

[0128] 表1

[0129]

突变体	引物DNA	编码DNA	氨基酸
LB5t-Q15H.1d	27	35	43
LB5t-T16A.1d	28	36	44
LB5t-T16D.1d	29	37	45
LB5t-T16H.1d	30	38	46
LB5t-A17H.1d	31	39	47
LB5t-T18D.1d	32	40	48
LB5t-T18H.1d	33	41	49
LB5t-T18Q.1d	34	42	50

[0130] (2) 蛋白质的表达和纯化

[0131] 用含有氨苄西林的 $2 \times$ YT培养基在 37°C 下对导入了上述(1)中得到的各种LB5t突变体基因的转化细胞进行过夜培养。将这些培养液接种于含有100倍量左右的氨苄西林的 $2 \times$ YT培养基,在 37°C 下培养约2小时,然后添加异丙基1-硫代- β -D-半乳糖苷(以下简称为“IPTG”),使最终浓度为 0.1mM ,进一步在 25°C 下培养18小时。

[0132] 培养结束通过离心收集菌体,将其再悬浮于PBS缓冲液5mL中。通过超声波破碎对细胞进行破碎,进行离心分离,分离为上清级分(无细胞提取液)和不溶性级分。在pGEX-6P-1载体的多克隆位点导入目标基因时,以N末端带有GST的融合肽的形式表达。通过SDS电泳对各级分进行分析,结果是在所有由各转化细胞培养液制备的各种无细胞提取液中,在分子量约25,000以上的位置均确认到了认为是由IPTG诱导得到的肽的条带。

[0133] 使用利用了对GST具有亲和性的GSTrap FF柱(GE Healthcare Biosciences公司)的亲和色谱,从含有GST融合肽的各无细胞提取液中对GST融合肽进行了粗纯化。将各无细胞提取液添加于GSTrap FF柱,用标准缓冲液($20\text{mM NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, 150mM NaCl , $\text{pH}7.4$)清洗柱,接着使用洗脱用缓冲液(50mM Tris-HCl , 20mM 谷胱甘肽, $\text{pH}8.0$)对目标GST融合肽进行洗脱。

[0134] 在pGEX-6P-1载体的多克隆位点导入基因时,在GST与目标蛋白质之间导入能够用序列特异性蛋白酶PreScission蛋白酶(GE Healthcare Biosciences公司)切断GST的氨基酸序列。使用PreScission蛋白酶按照附带的实验方案进行了GST切断反应。通过使用了Superdex 75 10/300GL柱(GE Healthcare Biosciences公司)的凝胶过滤色谱,从以如上所述切断了GST的形式用于检测的样品中纯化目标肽。将各反应溶液添加于用标准缓冲液平衡后的Superdex 75 10/300GL柱,从切断了GST、PreScission蛋白酶中分离纯化目标蛋白质。需要说明的是,以上的基于使用了柱的色谱而进行的肽纯化全部利用AKTAprime plus系统(GE Healthcare Biosciences公司)实施。另外,本实施例中得到的切断GST后的各蛋白质N末端侧带有来自于载体pGEX-6P-1的Gly-Pro-Leu-Gly-Ser。因此,例如,LB5t-T36H.1d是对序列号46的氨基酸序列在N末端侧添加了Gly-Pro-Leu-Gly-Ser-Glu-Gln、在C末端侧添加了Gly的氨基酸序列的肽。

[0135] 实施例2:各种LB5t突变体对aRSV-Fab的亲合性评价

[0136] (1) 来自于IgG的Fab片段的制备

[0137] 作为人化单克隆IgG制剂的原料,通过利用木瓜蛋白酶将其片段化为Fab片段和Fc片段、并仅对Fab片段进行分离纯化来制备。具体而言,将轻链由 κ 链形成的抗RSV单克隆IgG(通用名“帕利珠单抗(Palivizumab)”,产品名“Synagis”,AbbVie公司)制剂溶解于木瓜蛋白酶消化用缓冲液(0.1M AcOH-AcONa,2mM EDTA,1mM半胱氨酸,pH5.5),添加“Papain Agarose from papaya latex”木瓜蛋白酶固定化琼脂糖(SIGMA公司),并用旋转器使其混和,同时在37℃下孵育约8小时。从由木瓜蛋白酶固定化琼脂糖中分离得到的反应溶液(混合有Fab片段和Fc片段)中,通过利用了MabSelect SuRe柱(GE Healthcare Bioscience公司)的亲和色谱,在流过的级分中回收IgG-Fab,由此进行分离纯化。通过使用了Superdex 75 10/300GL柱(平衡及分离使用标准缓冲液)的凝胶过滤色谱对分离后的IgG-Fab溶液进行纯化,得到了IgG-Fab溶液(aRSV-Fab)。需要说明的是,与实施例1同样地利用AKTAprime plus系统实施了基于色谱进行的蛋白质纯化。

[0138] (2) 各种LB5t突变体对IgG-Fab的亲亲和性的分析

[0139] 使用利用了表面等离子体共振的生物传感器Biacore3000(GE Healthcare Biosciences公司),对实施例1(2)中获得的各种LB5t突变体与IgG-Fab的亲亲和性进行分析。在本实施例中,将实施例2(1)中获得的IgG-Fab固定于传感器芯片,使各种肽流过芯片,检测了两者的相互作用。IgG-Fab对传感器芯片CM5的固定通过使用了N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)及N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)的胺偶联法进行,封闭使用了乙醇胺(传感器芯片、固定化用试剂均为GE Healthcare Bioscience公司制造)。IgG-Fab溶液使用固定化用缓冲液(10mM CH₃COOH-CH₃COONa,pH4.5)稀释至10倍左右,按照Biacore 3000附带的实验方案固定于传感器芯片。另外,相对于芯片上的其它流通池,进行在通过EDC/NHS进行活性化后固定人血清白蛋白(和光纯药株式会社制造)的处理,由此准备了作为阴性对照的参比池。对于各种LB5t突变体而言,使用运行缓冲液(20mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄,150mM NaCl,0.005%P-20,pH7.4),将浓度调整为0.01、0.1、1或10 μ M的蛋白质溶液以流速40 μ L/min用1分钟添加于传感器芯片。在测定温度25℃下,依次观察了添加时(结合相,1分钟)及添加结束后(解离相,1分钟)的结合反应曲线。在各观察结束后,添加约20mM NaOH进行了清洗。对于得到的结合反应曲线(减去了参比池结合反应曲线的结合反应曲线)使用系统附带的软件BIA评估进行了基于1:1结合模型的拟合分析,计算出对于aRSV-Fab的亲亲和常数($K_A = k_{on}/k_{off}$)。将比较例2中测定的野生型LB5t-Wild.1d的各种结合参数和分析结果一并示于表2。

[0140] 表2

[0141]

LB5t-Wild.1d	$k_{on} (x10^5 [M^{-1}s])$	$k_{off} (x10^{-2} [s^{-1}])$	$K_A (x10^6 [M^{-1}])$
LB5t-Wild.1d	1.85	1.48	12.5
LB5t-Q15H.1d	3.25	4.85	6.7
LB5t-T16A.1d	4.21	2.25	18.71
LB5t-T16D.1d	3.81	2.65	14.38
LB5t-T16H.1d	4.28	1.59	26.92
LB5t-A17H.1d	0.8	7.38	1.08
LB5t-T18D.1d	3.17	4.67	6.79

LB5t-T18H.1d	4.22	3.6	11.72
LB5t-T18Q.1d	3.73	2.96	12.6

[0142] 如表2所示的结果,例如,与野生型(突变前)相比,在导入了T16A、T16D、T16H、T18H及T18Q的突变的情况下,突变体对于aRSV-Fab的亲亲和常数 K_A 为基本相同至约2倍,表现出保持了VL- κ 结合性的结果。关于Q15H、A17H、T18D的突变,虽然亲和常数 K_A 降低,但其数值为 1×10^6 (1/M)以上。对于VL- κ 结合力而言,只要作为配体能够将对象分子保持在柱中即可,由于结合力过强时可能不利于洗脱,因此可以认为,只要为 1×10^6 (1/M)以上就能够充分发挥作用。

[0143] 实施例3:各种LB5t突变体的aRSV-Fab酸解离pH的评价

[0144] (1) Fab片段固定化担载体的制备

[0145] 利用将偶联目标官能团设为氨基的市售的配体固定化用偶联柱,制作了固定有实施例2中得到的aRSV-Fab的亲亲和分离基质。

[0146] 作为水不溶性基材,市售的预填充柱(GE Healthcare Bioscience公司制造的“Hitrap NHS activated HP”)1mL。该柱以交联琼脂糖作为基质,且已经导入了将偶联目标官能团设为氨基的蛋白性配体固定化用的活性基团,因此按照产品说明书对配体进行了固定。进行3次将冰浴冷却的1mM HCl以流速1mL/min流过2mL量的操作,除去了柱中的异丙醇。

[0147] 然后立即以相同的流速添加1mL用偶联缓冲液(0.2M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH8.3)将aRSV-Fab稀释至1mg/mL而得到的溶液,将柱的上下端密封,在25°C下静置30分钟,由此将获得的配体固定于柱中。

[0148] 然后开封,以相同的流速流过3mL偶联缓冲液,回收未反应的aRSV-Fab。然后,实施3次将封闭用缓冲液(0.5M乙醇胺, 0.5M NaCl, pH8.3)流过2mL的操作,实施3次将清洗用缓冲液(0.1M乙酸, 0.5M NaCl, pH4.0)流过2mL的操作。

[0149] 流过封闭用缓冲液和清洗用缓冲液的一系列操作各交替进行了3次。最后流过标准缓冲液(20mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, 150mM NaCl, pH 7.4) 2mL,完成了亲和分离柱的制备。

[0150] (2) 使用Fab片段固定化担载体的色谱实验

[0151] 通过利用了实施例3(1)中制备的aRSV-Fab固定化柱的亲亲和纯化色谱,对实施例1(2)中制备的各种LB5t突变体进行了LB5t突变体洗脱峰顶的pH(酸解离pH)分析。具体而言,作为色谱系统,利用AKTAprime plus系统,向用离子交换用缓冲液A(50mM柠檬酸-柠檬酸钠, pH5.5)平衡后的柱中添加调整至约0.1mg/mL的各种LB5t突变体的蛋白质溶液0.1mL,以pH5.5至pH2.5的pH线性梯度进行洗脱。更具体来说,利用离子交换用缓冲液A和离子交换用缓冲液B(50mM CH₃COOH-CH₃COONa, 1M NaCl, pH2.5),将20柱容量份的缓冲液通过柱,此时,缓冲液B的浓度从0%线性提高至100%,通过这样的工序由洗脱位置对酸解离pH进行评价。作为实际数据的一个例子,关于在各种LB5t的第16位导入了突变的突变体,以可与比较例3的野生型LB5t进行比较的形式将重叠的色谱图示于图3。在该实验中,本发明中得到的各种LB5t突变体(LB5t-T16A.1d、LB5t-T16D.1d、LB5t-T16H.1d)比未导入突变的LB5t-Wild.1d更快洗脱。这表明能够以更靠近中性侧的pH对各种LB5t突变体进行洗脱。即,可以认为这是表明本发明的肽与含有VL- κ 链可变区的蛋白质解离的pH变得更靠近中性侧的数据。将该实验体系中各洗脱位置(峰顶)的pH值和比较例3的结果一并示于表3。

[0152] 表3

[0153]

	解离pH
LB5t-Wild.1d	3.35
LB5t-Q15H.1d	3.90
LB5t-T16A.1d	3.60
LB5t-T16D.1d	3.60
LB5t-T16H.1d	3.90
LB5t-A17H.1d	3.90
LB5t-T18D.1d	3.85
LB5t-T18H.1d	3.90
LB5t-T18Q.1d	3.65

[0154] 如表3所示的结果,对于各突变体而言,与含有VL- κ 链可变区的肽解离的pH变得更靠近中性侧。

[0155] 比较例1:PpL的野生型B5结构域(LB5t-Wild.1d)的制备

[0156] 使用实施例1中制备的LB5t-Wild.1d的表达质粒,通过与实施例1相同的方法制备转化细胞,经过培养、纯化,制备了蛋白质溶液。

[0157] 比较例2:LB5t-Wild.1d对aRSV-Fab的亲水性评价

[0158] 对于比较例1中制备的LB5t-Wild.1d而言,通过与实施例2(2)相同的方法对与实施例2(1)中制备的RSV-Fab的亲水性进行了分析。将其分析结果一并示于上述表2。

[0159] 比较例3:LB5t-Wild.1d的aRSV-Fab酸解离pH评价

[0160] 对于比较例1中制备的LB5t-Wild.1d而言,使用实施例3(1)中制备的RSV-Fab固定化担载体,用与实施例3(2)相同的方法对酸解离pH进行了分析。将其分析结果一并示于上述表3。

[0161] 实施例4:PpL312的B5结构域突变体的4结构域型(LB5t-T16H.4d)的制备

[0162] 利用序列号1所示的PpL312中包含的VL- κ 结合结构域间的氨基酸序列,设计了将4个序列号46所示的B5结构域突变体的氨基酸序列连接而成的序列号51的氨基酸序列(“LB5t-T16H.4d”)。由序列号51的氨基酸序列进行逆翻译,设计了编码该肽的碱基序列(序列号52)。通过外包于Eurofins Genomics公司,进行了在序列号52的DNA的5'末端添加了PstI识别位点、在3'末端添加了XbaI识别位点而得到的DNA(序列号53)的人工合成基因的全合成。用限制酶PstI及XbaI(TAKARA BIO公司)消化该亚克隆后的表达质粒,将得到的DNA片段接合于用相同的限制酶消化后的短芽孢杆菌表达用载体pNCM02(TAKARA BIO公司),制备了在短芽孢杆菌表达用载体pNCM02中插入了编码LB5t-T36H.4d的氨基酸序列的DNA而得到的表达质粒。需要说明的是,接合反应使用Ligation high(TOYOBO公司)按照产品附带的实验方案实施,质粒的制备使用了大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) JM109株(TAKARA BIO公司)。各表达质粒DNA碱基序列的确认使用DNA测序仪3130xl Genetic Analyzer(Applied Biosystems公司)来进行。使用BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems公司)按照附带的实验方案进行各质粒DNA的测序PCR反应,使用质粒纯化试剂盒(Applied Biosystems公司,“BigDye Xterminator Purification Kit”)按照附带的实验方案对该测序产物进行纯化,用于序列分析。

[0163] 用得到的质粒对铈子短芽孢杆菌 (*Brevibacillus choshinensis*) SP3株 (TAKARA BIO公司) 进行转化, 培育了分泌生产LB5t-T16H.4d的基因重组体。用含有60 μ g/mL新霉素的30mL A培养基 (聚脲3.0%, 酵母提取物0.5%, 葡萄糖3%, 硫酸镁0.01%, 硫酸铁0.001%, 氯化锰0.001%, 氯化锌0.0001%) 在30 $^{\circ}$ C下对该基因重组体进行3天的振荡培养。培养后, 通过在15,000rpm、25 $^{\circ}$ C下对培养液进行5分钟离心分离而分离菌体。

[0164] 通过利用了UnoSphere S (Bio-Rad公司) 的阳离子交换色谱从得到的培养上清中纯化了LB5t-T16H.4d。UnoSphere S填充于Tricorn 10/200 (GE Healthcare Bioscience公司) 使用。具体而言, 添加乙酸钠使其最终浓度为50mM, 再将用乙酸调整至pH4.0的培养上清添加于用阳离子交换用缓冲液A (50mM CH₃COOH-CH₃COONa, pH4.0) 平衡后的UnoSphere S柱, 用阳离子交换用缓冲液A进行清洗, 然后通过利用了阳离子交换用缓冲液A和阳离子交换用缓冲液B (50mM CH₃COOH-CH₃COONa, 1M NaCl, pH4.0) 而得到的盐浓度梯度对过程中洗脱的LB5t-T16H.4d进行分级。接着, 通过利用了Nuvia Q柱 (Bio-Rad公司) 的阴离子交换色谱对LB5t-T16H.4d进行纯化。Nuvia Q填充于Tricorn 10/200 (GE Healthcare Bioscience公司) 中使用。具体而言, 将分级后的LB5t-T16H.4d溶液透析于阴离子交换用缓冲液A (50mM Tris-HCl, pH8.0), 添加于用阴离子交换用缓冲液A平衡后的Nuvia Q柱, 并用阴离子交换用缓冲液A进行清洗, 然后通过利用了阴离子交换用缓冲液A和阴离子交换用缓冲液B (50mM Tris-HCl, 1.0M NaCl, pH8.0) 而得到的盐浓度梯度对过程中洗脱的LB5t-T36H.4d进行分级。将分级后的LB5t-T16H.4d再次透析于超纯水, 将仅含有LB5t-T16H.4d的水溶液制成最终纯化样品。需要说明的是, 通过上述使用了柱的色谱进行的蛋白质纯化利用AKTAavant 25系统 (GE Healthcare Bioscience公司) 来实施。

[0165] 实施例5: PpL312的B5结构域突变体的4结构域型固定化担载体的制备

[0166] 将实施例4中制备的LB5t-T16H.4d固定于水不溶性纤维素担载体。作为水不溶性纤维素担载体, 使用了结晶性高交联纤维素 (JNC公司制造, 通过日本特开2009-242770号公报或US20090062118A中记载的方法而得到的凝胶)。此时, 利用环氧法作为固定化方法。

[0167] 具体而言, 将担载体2mL凝胶转移至玻璃过滤器, 用10mL超纯水清洗3次。然后, 将担载体转移至离心管, 加入给定量的1,4-双(2,3-环氧丙氧基)丁烷, 在37 $^{\circ}$ C下搅拌30分钟。30分钟后, 加入9.2M氢氧化钠水溶液, 并使其最终浓度为1M, 在37 $^{\circ}$ C下搅拌2小时, 将担载体转移至玻璃过滤器。通过减压除去反应溶液, 用30mL超纯水清洗玻璃过滤器上的担载体, 得到了环氧化的担载体。

[0168] 接着, 进行将LB5t-T16H.4d固定于环氧化的担载体的操作。将环氧化的担载体1.5mL转移至离心管, 再加入LB5t-T16H.4d溶液, 在37 $^{\circ}$ C下使其反应30分钟。反应后, 添加硫酸钠粉末, 使其最终浓度为0.6M。添加硫酸钠后, 在37 $^{\circ}$ C下使其反应2小时。反应后, 将载体转移至玻璃过滤器, 用固定化缓冲液 (150mM Na₂HPO₄, 1mM EDTA, pH8.5) 5mL清洗3次, 回收了未反应的LB5t-T16H.4d。接着, 用5mL超纯水将担载体清洗3次, 然后用含有硫代甘油的灭活缓冲液 (200mM NaHCO₃, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH8.0) 5mL清洗3次。使担载体悬浮于含有硫代甘油的灭活化缓冲液并进行回收, 然后转移至离心管, 在25 $^{\circ}$ C下使其反应过夜。然后, 将担载体转移至玻璃过滤器, 用超纯水及清洗缓冲液 (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH8.0) 5mL清洗3次, 然后转移至离心管, 在25 $^{\circ}$ C下搅拌20分钟。将担载体转移至玻璃过滤器, 用超纯水5mL清洗3次。再用超纯水10mL、20%乙醇10mL清洗担载体, 然后将担载体悬浮于20%乙

醇中进行回收,得到了LB5t-T16H.4d固定化担载体。

[0169] 用光谱仪对回收后的未反应LB5t-T16H.4d的280nm吸光度进行测定,根据由氨基酸序列计算出的吸光系数计算未反应LB5t-T36H.4d的量。根据LB5t-T16H.4d的加入量与定量所得到的未反应LB5t-T36H.4d的量之差计算出LB5t-T16H.4d的固定化量,进一步根据担载体的体积计算出配体密度。将制备的担载体的配体密度示于表4。

[0170] 表4

[0171]

担载体	配体密度 (mg/mL/gel)
实施例5	2.9

[0172] 实施例6:使用了PpL312的B5结构域突变体的4结构域型固定化担载体的色谱实验

[0173] 将填充有实施例5中制备的担载体1mL凝胶的Tricorn 5/50column (GE Healthcare Bioscience公司)连接于色谱系统AKTAavant 25,对实施例2的(1)中制备的aRSV-Fab的洗脱峰顶的pH(酸解离pH)进行了分析。具体而言,将调整至1.0mg/mL的aRSV-Fab溶液1.0mL添加于用离子交换用缓冲液A(50mM柠檬酸-柠檬酸钠,pH5.0)平衡后的柱,通过pH5.0至pH2.4的pH线性梯度进行洗脱。更具体来说,利用离子交换用缓冲液A和离子交换用缓冲液B(50mM柠檬酸-柠檬酸钠,pH2.4),将20柱容量份的缓冲液通过柱,此时,缓冲液B的浓度从0%线性提高至100%,通过这样的工序由洗脱位置对酸解离pH进行评价。将结果示于表5。

[0174] 表5

[0175]

担载体	洗脱pH
实施例5	3.66

[0176] 如表5所示的结果,固定有将本发明的B5结构域突变体连接而成的肽的亲分离基质能够在比较靠近中性的pH下解离单克隆Fab。

[0177] 实施例7:各种VL-κ链结合结构域突变体的追加制备、以及对包含VL-κ链可变区的Fab的酸解离pH的评价

[0178] (1) 表达质粒制备及蛋白质的表达和纯化

[0179] 追加制备了LB5t-Wild.1d(序列号16)、LB1t-Wild.1d(序列号12)及LC4t-Wild.1d(序列号20)的突变体的表达质粒。具有LB1t-Wild.1d及LC4t-Wild.1d的编码DNA的导入突变用表达质粒通过与实施例1(1)的记载相同的方法使用表6所示的序列号54~61的单链寡聚DNA来制备。在制备的表达质粒中,关于编码目标肽的DNA,用与实施例1(1)的记载相同的方法通过碱基序列分析确认了LB1t-Wild.1d为序列号62的碱基序列,LC4t-Wild.1d为序列号63的碱基序列。

[0180] 表6

野生型	单链寡聚DNA				编码DNA	氨基酸
	f1-1	f1-2	f2-1	f2-2		
LB5t-Wild. 1d	23	24	25	26	22	16
LB1t-Wild. 1d	54	55	56	57	62	12
LC4t-Wild. 1d	58	59	60	61	63	20

[0181]

[0182] 表中的数字表示序列号

[0183] 对于各种单结构域型VL- κ 链结合结构域突变体的表达质粒而言,以各自对应的野生型表达质粒作为模板,通过使用了质粒载体pGEX-6P-1的5'侧测序用DNA引物和序列号64~69中各3'侧DNA引物的PCR反应来合成与图2的f1相对应的双链DNA,通过与实施例1(1)的记载相同的方法进行制备。将制备各突变体时使用的寡聚DNA的碱基序列、编码突变体的cDNA的碱基序列、以及突变体的氨基酸序列的序列号示于表7。对于各种突变体而言,通过与实施例1相同的方法,制备转化细胞,经过培养、纯化,制备了蛋白质溶液。

[0184] 表7

[0185]

突变体	引物DNA	编码DNA	氨基酸
LB5t-T16I.1d	64	70	76
LB5t-T16L.1d	65	71	77
LB5t-T16G.1d	66	72	78
LB1t-E18D.1d	67	73	79
LC4t-T16D.1d	68	74	80
LC4t-E18H.1d	69	75	81

[0186] 表中的数字表示序列号

[0187] (2) 各种VL- κ 链结合结构域突变体对Fab的酸解离pH的评价

[0188] 使用aRSV-Fab固定化担载体或aIgE-Fab固定化担载体进行了(1)中制备的各种VL- κ 链结合结构域突变体对Fab的酸解离pH的评价。aIgE-Fab由抗IgE单克隆IgG制剂(常用名“奥马珠单抗(Omalizumab)”,产品名“Xolair”,Novartis Pharma公司)用实施例2(1)中记载的方法制备,aRSV-Fab固定化担载体通过用实施例3(1)中记载的方法固定于市售的预填充柱而制备。各种VL- κ 链结合结构域突变体对aRSV-Fab或aIgE-Fab的酸解离pH通过与实施例3(2)记载相同的色谱实验进行评价。

[0189] 首先,将使用了aRSV-Fab固定化担载体的评价结果、即表示各洗脱位置的峰顶的pH值与比较例3及5的结果一并示于表8。

[0190] 表8

[0191]

	解离pH
LB5t-Wild.1d	3.35
LB5t-T16I.1d	3.55
LB5t-T16L.1d	3.65
LB1t-Wild.1d	2.70
LB1t-E18D.1d	2.95

[0192] 已确认,与未导入突变的LB5t-Wild.1d相比,追加的LB5t突变体(LB5t-T16I.1d和LB5t-T16L.1d)也同样地在靠近中性侧的pH下洗脱。该结果表明,突变氨基酸的种类为疏水性氨基酸时也能够获得相同的效果。可以认为,与实施例3的结果的组合是表明以下结果的数据,即,本发明的本质在于在序列号21的第15位~第18位导入氨基酸取代突变。另外,对于LB1t突变体而言,确认了与未导入突变的LB1t-Wild.1d相比,本发明的导入了突变的突

变体LB1t-E18D.1d在靠近中性侧的pH下洗脱。LB5t-Wild.1d(序列号16)与LB1t-Wild.1d(序列号12)的序列同一性为62.3%。据此可以认为这是表明以下结果的数据,即,即使导入突变前的序列同一性为60%左右,本发明也能够适用于作为VL- κ 链结合结构域而发挥功能的肽。

[0193] 接下来,将使用了aIgE-Fab固定化担载体的评价结果与比较例3及5的结果一并示于表9。

[0194] 表9

[0195]

	解离pH
LB5t-Wild.1d	3.05
LB5t-T16I.1d	3.20
LB5t-T16G.1d	3.20
LC4t-Wild.1d	3.20
LC4t-T16D.1d	3.40
LC4t-E18H.1d	3.40

[0196] 确认了如下结果:与上述实验结果相同,与未导入突变的肽相比,对于含有不同种类的VL- κ 链可变区的蛋白质,本发明的肽也在靠近中性侧的pH下洗脱。上述结果可以认为是表明如下结果的数据,即,本发明的突变的效果并不限定于含有特定序列的VL- κ 链可变区的蛋白质。另外,以C4结构域为基础的突变体也可观察到同样的倾向,这可以认为是表明以下结果的数据,即,本发明的突变并不限定于特定菌株的蛋白质L,本发明也可适用于可被识别为普通的蛋白质L或其类似物的蛋白质。

[0197] 比较例4:PpL的野生型B1结构域(LB1t-Wild.1d)及C4结构域(LC4t-Wild.1d)的制备

[0198] 使用实施例7(1)中制备的LB1t-Wild.1d及LC4t-Wild.1d的表达质粒,通过与实施例7相同的方法,制备转化细胞,经过培养、纯化,制备了蛋白质溶液。

[0199] 比较例5:LB1t-Wild.1d的aRSV-Fab的酸解离pH评价、以及LC4t-Wild.1d的aIgE-Fab的酸解离pH评价

[0200] 对于比较例4中制备的LB1t-Wild.1d,使用实施例3(1)中制备的aRSV-Fab固定化担载体,通过与实施例7(2)相同的方法分析了酸解离pH。另外,对于比较例4中制备的LC4t-Wild.1d,使用实施例7(2)中制备的aIgE-Fab固定化担载体,通过与实施例7(2)相同的色谱实验分析了酸解离pH。将该分析结果一并示于上述的表8及表9。

```

(20)      (30)      (40)      (50)      (60)      (70)      (80)
0          10         20         30         40         50         60
>PpL-312_B1: KEETPETPDSSEEEVTIKANLIIFANGSTQTAEFFKGTFEKATSEAYAYADTLKKNNGEYTVDVADKGYTLNKFAG-
>PpL-312_B2: ---KEKTPE-EPKKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFFKGTFEATAEAYRYADALKKDNNGEYTVDVADKGYTLNKFAG-
>PpL-312_B3: ---KEKTPE-EPKKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFFKGTFEATAEAYRYADLLAKENGGYTVDVADKGYTLNKFAG-
>PpL-312_B4: ---KEKTPE-EPKKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFFKGTFAEATAEAYRYADLLAKENGGYTVADLEDDGGYTTINIRFAG-
>PpL-312_B5: ---KKVDEKPEEKEQVTIKENIYFEDGTVQATFKGTFAEATAEAYRYADLLSKEHGKYTADLEDDGGYTTINIRFAG-
>PpL-3316_C1: ----KETPEPEEEVTIKANLIIFADGSTQNAEFFKGTFAKAVSDAYAYADALKKDNNGEYTVDVADKGLTLNKFAGK
>PpL-3316_C2: ---KEKPE-EPKKEEVTIKVNLIFADGKTQTAEFFKGTFEATAKAYAYADLLAKENGGYTVADLEDDGGNTINIKFAG-
>PpL-3316_C3: -KETPETPE-EPKKEEVTIKVNLIFADGKIQTAEFFKGTFEATAKAYAYANLLAKENGGYTVADLEDDGGNTINIKFAG-
>PpL-3316_C4: -KETPETPE-EPKKEEVTIKVNLIFADGKTQTAEFFKGTFEATAEAYRYADLLAKVNGEYTVADLEDDGGYTTINIKFAGK

```

图1

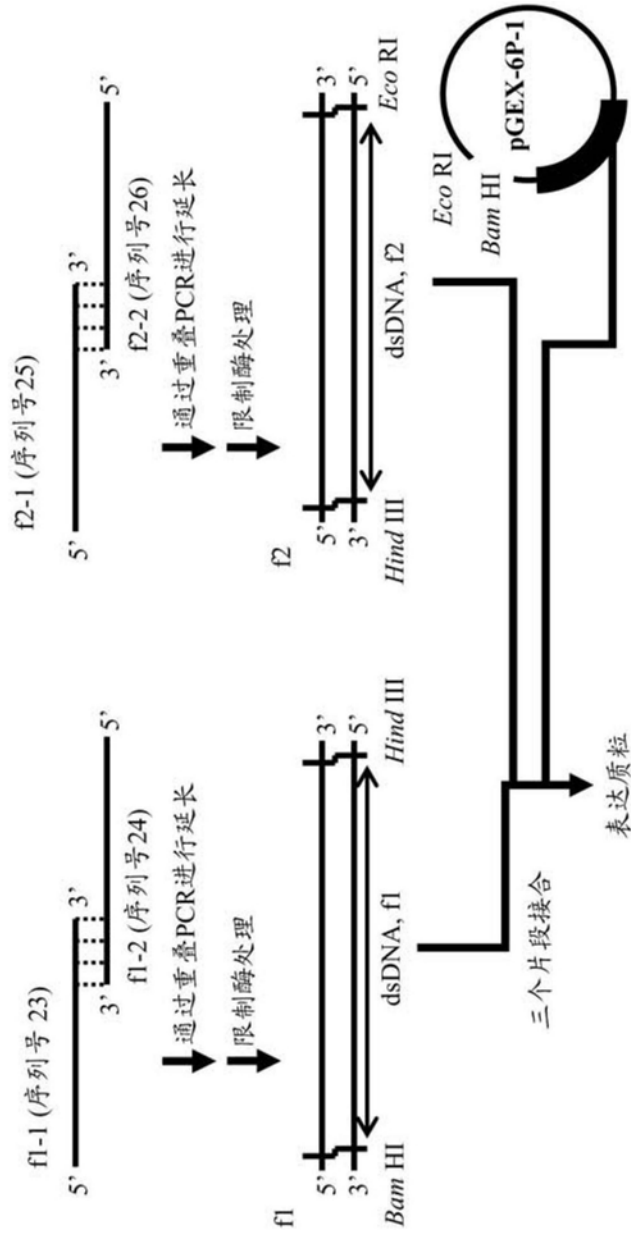


图2

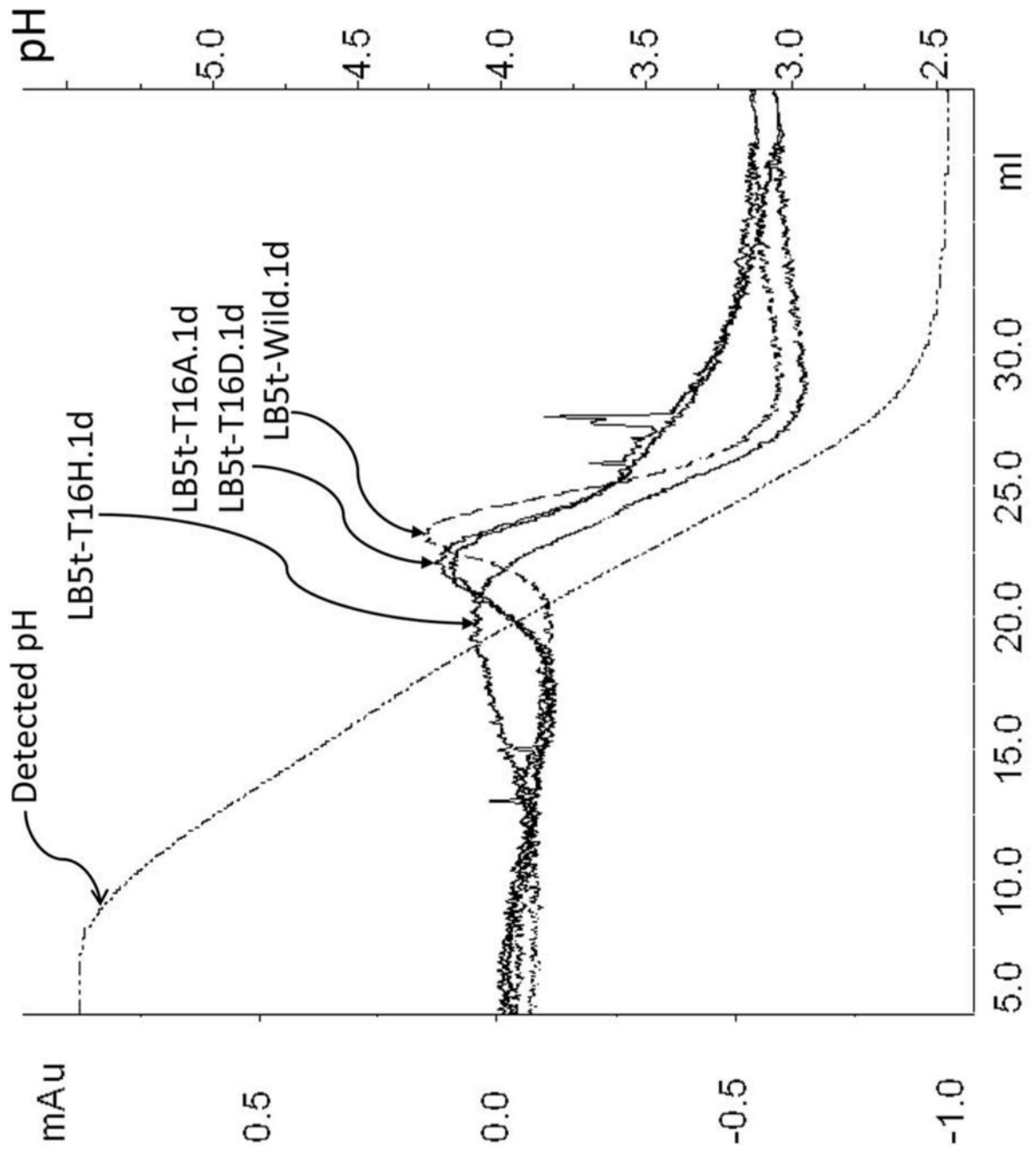


图3

专利名称(译)	突变型免疫球蛋白κ链可变区结合性肽		
公开(公告)号	CN108064286A	公开(公告)日	2018-05-22
申请号	CN201680007231.2	申请日	2016-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	钟渊化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	株式会社钟化		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社钟化		
[标]发明人	吉田慎一		
发明人	吉田慎一		
IPC分类号	C12N15/09 C07K1/22 C07K14/195 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/315 C07K1/22 C07K14/195 C07K19/00 C12N5/10 C12N15/09 G01N33/53 C07K16/00 C07K16/1027 C07K17/00 C07K2317/55		
代理人(译)	沈雪		
优先权	2015012664 2015-01-26 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于提供一种免疫球蛋白κ链可变区结合性肽、具有该肽作为配体的亲和分离基质、以及使用了该亲和分离基质的包含免疫球蛋白κ链可变区的蛋白质的制造方法，所述免疫球蛋白κ链可变区结合性肽的特征在于，与导入突变前相比，包含免疫球蛋白κ链可变区的蛋白质的酸解离pH向中性侧移动。另外，本发明的目的还在于提供一种编码该肽的DNA、包含该DNA的载体、以及利用该载体进行了转化的转化体。通过利用对于来自于大消化链球菌菌株的蛋白质L的κ链可变区结合结构域在适当的部位导入了突变的肽作为亲和配体，解决了上述课题。

野生型	单链寡聚DNA				编码DNA	氨基酸
	f1-1	f1-2	f2-1	f2-2		
LB5t-Wild. 1d	23	24	25	26	22	16
LB1t-Wild. 1d	54	55	56	57	62	12
LC4t-Wild. 1d	58	59	60	61	63	20