

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2005/033307

発行日 平成18年12月14日(2006.12.14)

(43) 国際公開日 平成17年4月14日(2005.4.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 1/02 (2006.01)	C07K 1/02 ZNA	4B024
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4B063
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	4B064
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 595	4C084
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 W	4G066
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 53 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2005-514502 (P2005-514502)	(71) 出願人	502055481 技術研究組合 生物分子工学研究所 大阪府吹田市古江台6丁目2番3号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2004/014801	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(22) 国際出願日	平成16年9月30日(2004.9.30)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	特願2003-342645 (P2003-342645)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成15年9月30日(2003.9.30)	(72) 発明者	大木 出 大阪府吹田市古江台6-2-3
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	楯 真一 大阪府吹田市古江台6-2-3
		Fターム(参考)	4B024 AA11 AA20 BA63 CA04 CA07 DA06 EA04 GA11 HA12 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規のリフォールディング方法およびその方法によって得られたタンパク質

(57) 【要約】

従来法よりも高純度かつ均質なタンパク質を調製するためのリフォールディング方法、およびそのようなリフォールディング方法によって調製されたタンパク質を提供することを、本発明の課題とする。本発明によって、可溶化された封入体のような変性したタンパク質をリフォールディングする方法であって、a) アルギニン、還元型グルタチオン、酸化型グルタチオンを含有するリフォールディング緩衝液中に、変性したタンパク質を滴下する工程、を包含する方法、ならびにそのような方法によって調製されたタンパク質、ならびにそのようなタンパク質を含む薬学的組成物が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

変性したタンパク質をリフォールディングする方法であって、以下の工程：

a) アルギニン、還元型グルタチオン、酸化型グルタチオンを含有するリフォールディング緩衝液中に、変性したタンパク質を滴下する工程、
を包含する方法。

【請求項 2】

前記変性タンパク質およびリフォールディング緩衝液のいずれもが、界面活性剤を含有しない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記滴下が、 $10 \sim 300 \mu\text{l}/\text{分}$ の速度で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記滴下が、 $20 \sim 30 \mu\text{l}/\text{分}$ の速度で行われる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記リフォールディング緩衝液の pH が $7.5 \sim 9.5$ の範囲である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記リフォールディング緩衝液の pH が $8.0 \sim 8.5$ の範囲である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記リフォールディング緩衝液が Tris-HCl を含有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 Tris-HCl の濃度が $5 \sim 20 \text{mM}$ である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記アルギニンの濃度が $100 \text{mM} \sim 600 \text{mM}$ である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記アルギニンの濃度が $300 \text{mM} \sim 400 \text{mM}$ である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンとの比が、 $1:5 \sim 1:10$ の間である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記還元型グルタチオンの濃度が $1 \sim 20 \text{mM}$ であり、前記酸化型グルタチオンの濃度が $0.2 \sim 2 \text{mM}$ である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記滴下する変性タンパク質溶液とリフォールディング緩衝液との容量の比が、 $1:50 \sim 1:100$ である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記滴下する変性タンパク質溶液の滴下後のリフォールディング緩衝液中でのタンパク質濃度が、 $5 \sim 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記滴下する変性タンパク質溶液の滴下後のリフォールディング緩衝液中でのタンパク質濃度が、 $20 \sim 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記変性タンパク質が、変性剤、熱、または照射によって変性されたタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記変性タンパク質が、細菌で発現した封入体タンパク質を、SH 保護試薬および変性剤を含有する可溶性緩衝液を用いて可溶化することによって得られる変性タンパク質である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

前記可溶化の際のタンパク質の濃度が、1～5 mg/mLである、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記可溶化の際のタンパク質の濃度が、2.0～3.0 mg/mLである、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

前記可溶化緩衝液のpHが7.0～9.0である、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

前記可溶化緩衝液が、100 mMのTris-HCl緩衝液である、請求項20に記載の方法。

10

【請求項22】

前記SH保護試薬がジチオトレイトールである、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

前記ジチオトレイトールの濃度が5～200 mMである、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記ジチオトレイトールの濃度が50～100 mMである、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記滴下工程の後に、溶液を攪拌する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項26】

前記攪拌工程が、10～48時間行われる、請求項25に記載の方法。

20

【請求項27】

前記攪拌工程が、10～14時間行われる、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

請求項17に記載の方法によって得られる、リフォールディングされたタンパク質。

【請求項29】

前記封入体タンパク質が細菌細胞で組換え発現された、受容体タンパク質のリガンド結合フラグメントである、請求項28に記載のリフォールディングされたタンパク質。

【請求項30】

前記受容体が、以下の受容体からなる群から選択される、請求項29に記載のリフォールディングされたタンパク質：

30

スカベンジャー受容体、インスリン受容体ファミリーに属する受容体、EGF受容体ファミリーに属する受容体、PDGF受容体ファミリーに属する受容体、VEGF受容体ファミリーに属する受容体、FGF受容体ファミリーに属する受容体、NGF受容体ファミリーの増殖因子受容体、TGF- β スーパーファミリーに属する受容体、Toll-like受容体ファミリーに属する受容体、LDL受容体関連タンパク質ファミリーに属する受容体、およびGタンパク質共役型受容体ファミリーに属する受容体。

【請求項31】

前記受容体が、スカベンジャー受容体のLOX-1である、請求項30に記載のリフォールディングされたタンパク質。

【請求項32】

98%以上の純度である、請求項31に記載のリフォールディングされたタンパク質。

40

【請求項33】

2.5オングストロームの分解能を与えるX線回折像を与える単結晶を与える純度を有する、請求項31に記載のリフォールディングされたタンパク質。

【請求項34】

固相固定化部位が付加されている、請求項31に記載のリフォールディングされたタンパク質。

【請求項35】

前記固相固定化部位がビオチンまたはタグ配列である、請求項34に記載のリフォールディングされたタンパク質。

50

【請求項 36】

前記タグ配列が、以下からなる群から選択されるタグ配列である、請求項 35 に記載のリフォールディングタンパク質：

H i s タグ、G S T タグ、m y c タグ、セルロース結合ドメインタグ、カルモジュリン結合ペプチドタグ、S タンパク質結合ペプチドタグ、T 7 タグまたはこれらの組み合わせ。

【請求項 37】

請求項 34 に記載の固相固定化部位を介して固相に固定化されたリフォールディングタンパク質を含有する、受容体チップ。

【請求項 38】

表面プラズモン共鳴、水晶発振子マイクロバランス、または質量分析計による検出に適合する、請求項 37 に記載の受容体チップ。

【請求項 39】

請求項 38 に記載の受容体チップを用いる、変性 L D L、異常細胞または細菌の検出方法。

【請求項 40】

請求項 38 に記載の受容体チップを含む、検出用キット。

【請求項 41】

請求項 34 に記載の固相固定化部位を介して固相に固定化されたリフォールディングタンパク質を含有する、リガンド除去材料。

【請求項 42】

請求項 41 に記載のリガンド除去材料を含有する、血中のリガンドを除去するためのリガンド除去材料。

【請求項 43】

請求項 41 に記載のリガンド除去材料を含有する、変性 L D L 動態異常に起因する動脈硬化症を処置するための治療用材料。

【請求項 44】

請求項 41 に記載のリガンド除去材料を含有する、変性 L D L 動態異常に起因する高脂血症を処置するための治療用材料。

【請求項 45】

$a = 6.2 \text{ nm}$ 、 $b = 6.9 \text{ nm}$ 、および $c = 7.9 \text{ nm}$ の単位格子定数を有する、 $P 2_1 2_1 2_1$ 斜方晶形である L O X - 1 リガンド結合フラグメントの結晶形態。

【請求項 46】

請求項 31 に記載のリフォールディングされたタンパク質を含む、動脈硬化を予防または処置するための、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、新規のリフォールディング方法に関する。さらに本発明は、本発明のリフォールディング方法によって得られたタンパク質に関する。本発明のリフォールディング方法によって得られるタンパク質は、高純度、かつ高度に均質であるという特徴を有する。そのため、本発明はまた、本発明のリフォールディング方法によって得られたタンパク質の結晶を提供する。

さらに本発明は、本発明のリフォールディング方法を適用することによって得られる受容体タンパク質のリガンド結合フラグメントを固相上に固定化することにより調製される受容体チップ、受容体カラムおよびリガンド除去材料、ならびにこのようなりガンド除去材料を含有する治療用材料に関する。

具体的には、例えば、本発明において、受容体フラグメントとして使用するスカベンジャー受容体のリガンド認識部位に関係する領域を細胞内で封入体として発現させた後、本発明のリフォールディング方法を用いてリフォールディングし、その後、リフォールディングしたタンパク質を固相上に固定化して作製された受容体チップが提供される。例えば

、スカベンジャー受容体の細胞外領域、またはCタイプレクチン様領域（CTL Dとも略記する）を封入体として細胞内で発現させた後、本発明のリフォールディング方法を適用し、リフォールディングしたタンパク質を固相上に固定化することによって、酸化LDL、アセチルLDL、サクシニルLDL、およびマロンジアルデヒドLDL、糖化LDLなどの変性LDL（Low Density Lipoprotein）異常細胞並びに細菌を検出するための、高感度な受容体チップを提供することができる。

また、本発明のリフォールディング方法を用いて調製されたスカベンジャー受容体の細胞外領域、またはCTL Dは、高純度かつ均質であるため、標的リガンド以外の物質に対する非特異的結合が少ない。従って、そのようなスカベンジャー受容体の細胞外領域、またはCTL Dを用いることによって、血液中の変性LDL以外の成分に対して影響を与えることなく、血中の変性LDLを除去する方法および治療用材料が提供される。

さらに、本発明のリフォールディング方法によって調製されたタンパク質を用いた結晶も提供される。

【背景技術】

所望のタンパク質を大量に調製するための方法として、タンパク質の組換え発現法が周知である。組換え発現によって、天然の供給源からの大量調製が困難であるタンパク質についても、大量に調製することが可能となった。

例えば、細胞表面に存在する受容体は、その受容体に対応するリガンドと特異的に結合し、種々のシグナルを細胞内に伝達するタンパク質であり、細胞あたりの発現量が少ないため、天然の供給源から大量に調製することが困難であるが、組換え発現法を用いれば大量に調製することが可能である。

細胞表面に存在する受容体は多様であり、その対応するリガンドも異なることから、特定のリガンドの検出および／または定量を行うために、そのリガンドに特異的に結合する受容体を大量に調製して用いることは有用である。大量に調製した受容体または受容体フラグメントを固相に固定化して、異常細胞または疾患の診断マーカーをリガンドとする受容体チップを作製することにより、細胞集団中の異常細胞の存在の検出、または、疾患の診断のための有用なツールを提供できることが、予想される。例えば、生体内に蓄積した変性LDLやアポトーシス細胞や老化赤血球などの異常細胞、並びに生体内に侵入した細菌等を認識して結合する能力のある複数の受容体の存在が発見されている。このような受容体の中には、認識する対象（リガンド）の認識に必要な領域が予想されているものも多い。これらの受容体そのもの、あるいは認識に必要な領域のみを利用すれば、リガンドである変性LDL、アポトーシス細胞などの異常な細胞、細菌を簡便に検出できる可能性がある。

また、受容体とその対応するリガンドとの結合が特異的であることから、大量発現した受容体またはそのリガンド結合性フラグメントを固相に固定化し、リガンドを除去する材料を提供することが可能である。例えば、変性LDLに対する受容体を用いて、血中の変性LDLを除去することにより、変性LDL動態異常に起因する動脈硬化症、高脂血症などの疾患を治療することが可能である。従って、本発明は、変性LDLリガンド除去材料を含有する治療用材料をも提供する。

タンパク質を組換え発現するために用いる種々の宿主細胞およびベクターが周知である。組換え発現の宿主細胞としては、細菌細胞、動物細胞、植物細胞、真菌細胞などが挙げられる。なかでも、大腸菌のような細菌細胞は、その増殖速度が速く、かつ操作が比較的簡便であり、かつ調製コストが安いいため、宿主細胞として広く利用されており、特に工業的規模での生産に適している。しかし、大腸菌において外来遺伝子を高発現した場合には、産物タンパク質が不溶性物質として細胞内に封入体として蓄積される場合が多い。この封入体は、不溶性であり、かつ封入体タンパク質の立体構造は天然の状態のタンパク質の立体構造とは異なるため、可溶化およびリフォールディングを必要とする。

ところが、従来のリフォールディング方法は、例えば、受容体を樹脂に吸着させた後、吸着させた樹脂を変性剤を含有する緩衝溶液と接触させ、次いで変性剤の濃度を漸次低下させた緩衝溶液と接触させる（特開2003-169693）というように、いずれも煩

雑な方法であった。さらに、固相に固定化された状態でリフォールディングした場合は、リフォールディング後に固相からの溶出や切り出しなどの工程を経る必要があり、煩雑さを増すと共に収率が低下するなどの問題があった。さらに、界面活性剤を用いる従来のリフォールディング方法（特開2002-306163）では、使用した界面活性剤をリフォールディングしたタンパク質から除去することが困難であるという問題も生じる。そのため、従来法では、可溶化およびリフォールディング工程において使用する物質がリフォールディングしたタンパク質中に混入することによる純度の低下、および不完全にリフォールディングされたタンパク質の存在による不均一さが問題となっている。

この純度の低下および不均一さは、天然のタンパク質と比較した場合のリフォールディングしたタンパク質の比活性の低さとして検出することができる。実際に、従来法では、
10
リフォールディングしたタンパク質が必ずしも100%の比活性を示すことはない（D a u g h e r t y, D. L. ら、（1998）J. Biol. Chem. 273、33961～33971；Sundari, C. S. ら、（1999）FEBS, Lett.、443、215～219；およびMachida ら（2000）FEBS, Lett.、486、131～135）。

例えば、受容体のリガンド結合フラグメントをリフォールディングし、リガンド検出のための受容体チップとして利用する場合、従来のリフォールディング方法を用いると高純度かつ均質なリフォールディングタンパク質の調製ができないため、定性的検出および定量的検出における感度の低下を生じる。また、受容体のリガンド結合フラグメントをリフォールディングし、例えば、血中に存在するリガンドの除去のための材料として利用する
20
際に、リフォールディングしたタンパク質の純度および均質性が低い場合には、血中の他の因子との相互作用によって、目的とするリガンド以外の物質を除去することとなる。

従って、従来法と比較して、より高純度かつ均質なタンパク質を得るためのリフォールディング方法、特に、封入体からリフォールディングしたタンパク質を調製するための方法が望まれる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、変性タンパク質から、高純度かつ均質な適正に折り畳まれたタンパク質を調製するリフォールディング方法を提供することにある。また、本発明のさらなる目的は、本発明のリフォールディング方法を用いることによって、高純度かつ均質な適正に
30
折り畳まれたタンパク質を提供することにある。

本発明はさらに、封入体タンパク質から、高純度かつ均質な適正に折り畳まれたタンパク質を調製し、そのタンパク質を固相上に固定化することによって受容体チップを作製することを目的とする。また、本発明のさらなる目的は、そのようなチップを用いた、検出
40
キットおよび検出方法を提供することにある。

本発明のさらなる目的は、スカベンジャー受容体を用いた受容体チップを作製し、変性LDL、異常細胞並びに細菌の検出方法を提供し、また、好適には方向性を有した状態（リガンド結合部位が外側に位置するように）で固相上に固定化可能な可溶性のリガンド認識領域を大量に調製し、そのリガンド認識特性を活かしたセンサー部位を構築し、これを利用して変性LDLやアポトーシス細胞や老化赤血球などの異常細胞、並びに生体内に侵入した細菌等を検出する方法および検出用キットを提供することである。
40

また、本発明のさらなる目的は、血中の変性LDL、異常細胞並びに細菌を除去するための、スカベンジャー受容体を用いたリガンド除去材料を提供すること、およびそのような材料を用いた、血中の変性LDL、異常細胞並びに細菌を除去する方法および材料を提供することにある。

本発明のさらなる目的は、従来法のリフォールディング法によって調製されたタンパク質と比較して、より高純度であり、かつ均質なタンパク質を提供することにある。さらに、そのようなタンパク質を提供することによって、ワクチン組成物のような治療用組成物の製造に適したタンパク質の製造を可能とすることも、本発明の目的の1つである。

【課題を解決するための手段】

本発明は、アルギニン、還元型グルタチオン、酸化型グルタチオンを含有するリフォールディング緩衝液中に、変性したタンパク質を滴下する工程を用いることによって、上記課題を解決した。本発明はまた、リフォールディングされるタンパク質として、L O X-1のリガンド結合性フラグメントを用いることによって、血中の変性LDL、異常細胞並びに細菌を除去するための方法および材料を提供するという上記課題を解決した。

従って、本発明は以下を提供する。

1. 変性したタンパク質をリフォールディングする方法であって、以下の工程：
 - a) アルギニン、還元型グルタチオン、酸化型グルタチオンを含有するリフォールディング緩衝液中に、変性したタンパク質を滴下する工程、10
を包含する方法。
2. 前記変性タンパク質およびリフォールディング緩衝液のいずれもが、界面活性剤を含有しない、項目1に記載の方法。
3. 前記滴下が、 $10 \sim 300 \mu\text{l}/\text{分}$ の速度で行われる、項目1に記載の方法。
4. 前記滴下が、 $20 \sim 30 \mu\text{l}/\text{分}$ の速度で行われる、項目3に記載の方法。
5. 前記リフォールディング緩衝液のpHが7.5～9.5の範囲である、項目1に記載の方法。
6. 前記リフォールディング緩衝液のpHが8.0～8.5の範囲である、項目5に記載の方法。
7. 前記リフォールディング緩衝液がTris-HClを含有する、項目1に記載の方法。20
8. 前記Tris-HClの濃度が $5 \sim 20 \text{mM}$ である、項目7に記載の方法。
9. 前記アルギニンの濃度が $100 \text{mM} \sim 600 \text{mM}$ である、項目1に記載の方法。
10. 前記アルギニンの濃度が $300 \text{mM} \sim 400 \text{mM}$ である、項目9に記載の方法。
11. 前記還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンとの比が、 $1 : 5 \sim 1 : 10$ の間である、項目1に記載の方法。
12. 前記還元型グルタチオンの濃度が $1 \sim 20 \text{mM}$ であり、前記酸化型グルタチオンの濃度が $0.2 \sim 2 \text{mM}$ である、項目11に記載の方法。
13. 前記滴下する変性タンパク質溶液とリフォールディング緩衝液との容量の比が、 $1 : 50 \sim 1 : 100$ である、項目1に記載の方法。
14. 前記滴下する変性タンパク質溶液の滴下後のリフォールディング緩衝液中でのタンパク質濃度が、 $5 \sim 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、項目1に記載の方法。30
15. 前記滴下する変性タンパク質溶液の滴下後のリフォールディング緩衝液中でのタンパク質濃度が、 $20 \sim 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、項目14に記載の方法。
16. 前記変性タンパク質が、変性剤、熱、または照射によって変性されたタンパク質である、項目1に記載の方法。
17. 前記変性タンパク質が、細菌で発現した封入体タンパク質を、SH保護試薬および変性剤を含有する可溶化緩衝液を用いて可溶化することによって得られる変性タンパク質である、項目16に記載の方法。
18. 前記可溶化の際のタンパク質の濃度が、 $1 \sim 5 \text{mg}/\text{mL}$ である、項目17に記載の方法。40
19. 前記可溶化の際のタンパク質の濃度が、 $2.0 \sim 3.0 \text{mg}/\text{mL}$ である、項目17に記載の方法。
20. 前記可溶化緩衝液のpHが7.0～9.0である、項目17に記載の方法。
21. 前記可溶化緩衝液が、 100mM のTris-HCl緩衝液である、項目20に記載の方法。
22. 前記SH保護試薬がジチオトレイトールである、項目20に記載の方法。
23. 前記ジチオトレイトールの濃度が $5 \sim 200 \text{mM}$ である、項目22に記載の方法。
24. 前記ジチオトレイトールの濃度が $50 \sim 100 \text{mM}$ である、項目23に記載の方法。50
25. 前記滴下工程の後に、溶液を攪拌する工程を包含する、項目1に記載の方法。

26. 前記攪拌工程が、10～48時間行われる、項目25に記載の方法。
27. 前記攪拌工程が、10～14時間行われる、項目26に記載の方法。
28. 項目17に記載の方法によって得られる、リフォールディングされたタンパク質。
29. 前記封入体タンパク質が細菌細胞で組換え発現された、受容体タンパク質のリガンド結合フラグメントである、項目28に記載のリフォールディングされたタンパク質。
30. 前記受容体が、以下の受容体からなる群から選択される、項目29に記載のリフォールディングされたタンパク質：
 スカベンジャー受容体、インスリン受容体ファミリーに属する受容体、EGF受容体ファミリーに属する受容体、PDGF受容体ファミリーに属する受容体、VEGF受容体ファミリーに属する受容体、FGF受容体ファミリーに属する受容体、NGF受容体ファミリーの増殖因子受容体、TGF- β スーパーファミリーに属する受容体、Toll-like受容体ファミリーに属する受容体、LDL受容体関連タンパク質ファミリーに属する受容体、およびGタンパク質共役型受容体ファミリーに属する受容体。 10
31. 前記受容体が、スカベンジャー受容体のLOX-1である、項目30に記載のリフォールディングされたタンパク質。
32. 98%以上の純度である、項目31に記載のリフォールディングされたタンパク質。
33. 2.5オングストロームの分解能を与えるX線回折像を与える単結晶を与える純度を有する、項目31に記載のリフォールディングされたタンパク質。
34. 固相固定化部位が付加されている、項目31に記載のリフォールディングされたタンパク質。 20
35. 前記固相固定化部位がビオチンまたはタグ配列である、項目34に記載のリフォールディングされたタンパク質。
36. 前記タグ配列が、以下からなる群から選択されるタグ配列である、項目35に記載のリフォールディングタンパク質：
 Hisタグ、GSTタグ、mycタグ、セルロース結合ドメインタグ、セルロース結合ペプチドタグ、カルモジュリン結合ペプチドタグ、Sタンパク質結合ペプチドタグ、T7タグまたはこれらの組み合わせ。
37. 項目34に記載の固相固定化部位を介して固相に固定化されたりフォールディングタンパク質を含有する、受容体チップ。 30
38. 表面プラズモン共鳴、水晶発振子マイクロバランス、または質量分析計による検出に適合する、項目37に記載の受容体チップ。
39. 項目38に記載の受容体チップを用いる、変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法。
40. 項目38に記載の受容体チップを含む、検出用キット。
41. 項目34に記載の固相固定化部位を介して固相に固定化されたりフォールディングタンパク質を含有する、リガンド除去材料。
42. 項目41に記載のリガンド除去材料を含有する、血中のリガンドを除去するためのリガンド除去材料。
43. 項目41に記載のリガンド除去材料を含有する、変性LDL動態異常に起因する動脈硬化症を処置するための治療用材料。 40
44. 項目41に記載のリガンド除去材料を含有する、変性LDL動態異常に起因する高脂血症を処置するための治療用材料。
45. $a = 6.2 \text{ nm}$ 、 $b = 6.9 \text{ nm}$ 、および $c = 7.9 \text{ nm}$ の単位格子定数を有する、 $P2_12_12_1$ 斜方晶形であるLOX-1リガンド結合フラグメントの結晶形態。
46. 項目31に記載のリフォールディングされたタンパク質を含む、動脈硬化を予防または処置するための、薬学的組成物。
- さらに、本発明は、所望のリガンドに特異的に結合する受容体タンパク質のリガンド結合フラグメントを高純度かつ均質な状態で調製し、そのフラグメントを固相に結合することによって、その所望のリガンドを高感度で検出する受容体チップを提供する。本発明は 50

また、そのような受容体チップを用いて、その所望のリガンドを検出する方法を提供する。

本発明は、所望のリガンドに特異的に結合する受容体タンパク質のリガンド結合フラグメントを高純度かつ均質な状態で調製し、そのフラグメントを固相に結合することによって、その所望のリガンドを特異的に除去するためのリガンド除去材料を提供する。本発明はまた、その所望のリガンドを血中から除去する方法であって、以下の工程を包含する方法を提供する：

(1) 被検体の血液を得る工程；および
(2) 該血液を、血中の所望のリガンドとリガンド除去材料が特異的に結合する条件下で、リガンド除去材料と接触させる工程。

10

1つの局面において、上記方法で処理された血液は、被検体に戻される。

さらに、本発明においては、試料中の細菌および／またはウイルスなどの病原体を除去するための方法であって、以下の工程を包含する方法が提供される：

(1) 病原体を除去するための試料を得る工程；および
(2) 該試料を、試料中の病原体とリガンド除去材料が特異的に結合する条件下で、リガンド除去材料と接触させる工程。

1つの局面において、上記方法で処理された試料は、被検体に注入される。

さらに本発明は、受容体のリガンド認識に関係する領域を細胞内で発現させて得た組換えタンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法を提供する。

20

また本発明は、受容体のリガンド認識に関係する領域をビオチン化タンパク質として細胞内で発現させた後、発現させたビオチン化タンパク質をアビジンまたはストレプトアビジンを介して方向性を保って固相上に固定化し、当該固定化タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法によるリガンドの検出方法を提供する。

また本発明は、受容体のリガンド認識に関係する領域をタグ化タンパク質として細胞内で発現させた後、発現させたタグ化タンパク質をそのタグと特異的に結合する因子を介して方向性を保って固相上に固定化し、当該固定化タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法によるリガンドの検出方法を提供する。

本発明はさらに、大腸菌内に蓄積した受容体の細胞外領域またはリガンド認識領域を正しい立体構造にリフォールディングして再構成して得た再構成タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法を提供する。

30

また本発明は、大腸菌内に蓄積した受容体のビオチン化細胞外領域またはビオチン化リガンド認識領域を正しい立体構造にリフォールディングして再構成した後、再構成したビオチン化タンパク質をアビジンまたはストレプトアビジンを介して方向性を保って固相上に固定化し、当該固定化タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法を提供する。

また本発明は、大腸菌内に蓄積した受容体のタグ化細胞外領域またはタグ化リガンド認識領域を正しい立体構造にリフォールディングして再構成した後、再構成したタグ化タンパク質をタグと特異的に結合する因子を介して方向性を保って固相上に固定化し、当該固定化タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法を提供する。

40

本発明はまた、大腸菌内に凝集体として蓄積した受容体の細胞外領域またはリガンド認識領域を変性剤により構造を解きほぐした後、正しい立体構造にリフォールディングしたタンパク質を含む変性LDL、異常細胞または細菌の検出用キットを提供する。

本発明はまた、種々の疾患（例えば、動脈硬化）を処置するためのワクチン組成物を製造するためのタンパク質を提供する。例えば、動脈硬化を処置するためのワクチン組成物は、例えば、変性LDLのようなりボタンパク質、T o l l - l i k e 受容体ファミリーに属する受容体、およびL O X - 1 のようなスカベンジャー受容体のようなタンパク質を含み得る。

50

【発明の効果】

本発明によって、新規のリフォールディング方法、およびその方法によって得られたタンパク質が提供される。本発明のリフォールディング方法によって、高純度かつ均質なリフォールディングタンパク質を得ることが可能となる。

さらに、本発明のリフォールディング方法を用いることによって、所望のリガンドに対する高感度の受容体チップセンサーもまた提供される。

また、本発明のリフォールディング方法を用いることによって、従来法のリフォールディング法によって調製されたタンパク質と比較して、より高純度であり、かつ均質なタンパク質を調製することが可能となる。そのため、本発明のリフォールディング方法によって、ワクチン組成物のような治療用組成物の製造に適したタンパク質の製造が可能となる

10

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明のリフォールディング方法で得たタンパク質が、従来法の環状糖質サイクロアミロースによるリフォールディング方法よりも分子量の幅が狭く、従ってより高い純度で精製されていることを示す。

図2は、本発明のリフォールディング方法によって得たタンパク質が従来法の環状糖質サイクロアミロースによりリフォールディング方法よりも夾雑物が少なく高純度に精製されていることを示す。

図3は、本発明のリフォールディング方法によって得たタンパク質が単一の分子種としてリフォールディングしているのに対して、従来法で得たタンパク質は、不完全なリフォールディングタンパク質が混在していることが示される。

20

図4は、本発明のリフォールディング方法によって得たタンパク質には不完全なリフォールディングタンパク質の混在が無いことを示す。

図5は、本発明のリフォールディング方法を用いてリフォールディングされたLOX-1 C T L Dが酸化LDLおよびアセチル化LDLに対して天然のLOX-1と同程度の親和性を有することが示す。

図6は、LOX-1の細胞外ドメイン全長を本発明のリフォールディング方法でリフォールディングした結果得られたタンパク質が、細胞表層にあるLOX-1の存在様式と同様に2量体であることを示す。図中、 β Me (+)は、 β メルカプトエタノールを添加したことを示す。 β Me (-)は、 β メルカプトエタノールを添加しなかったことを示す。

30

図7は、センサーチップにapoB100抗体を介して固定したアセチル化LDLに対して、二量体構造を形成したLOX-1細胞外ドメイン全長、単量体として存在するリガンド結合ドメインC T L Dをそれぞれ相互作用させた実験の結果を示す。アセチル化LDL認識には、リガンド結合ドメインが二量体構造を取ることが必要であることが示された

。

発明の詳細な説明

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など、独語の場合の「ein」、「der」、「das」、「die」などおよびその格変化形、仏語の場合の「un」、「une」、「le」、「la」など、スペイン語における「un」、「una」、「el」、「la」など、他の言語における対応する冠詞、形容詞など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

40

（用語の定義）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

本明細書において使用される用語「受容体」とは、1個以上のリガンドと可逆的、かつ特異的に複合体化する1個以上の結合ドメインを備える生物学的な構造であって、ここで、この複合体化は生物学的な構造を有する。受容体は、完全に細胞の外部（細胞外の受容体）、細胞膜の中（しかし、受容体の部分を細胞外部の環境および細胞質ゾルに向けてい

50

る)、または完全に細胞の中(細胞内の受容体)に存在し得る。これらはまた、細胞と独立的に機能し得る。細胞膜中の受容体は、細胞を、その境界の外部の空間と連絡(例えば、シグナル伝達)させ、そして細胞の内側および外側への分子およびイオンの輸送において機能させることを可能とする。本明細書において使用する場合、受容体は、受容体全長であっても、受容体のフラグメントであってもよい。

受容体フラグメントを用いる場合には、受容体タンパク質のリガンド認識に関係する部位を用いる。受容体タンパク質のリガンド認識に関係する部位は、以下のように同定することができる。ホモロジーやドメイン検索により相同性や機能上の類似点の高いタンパク質の構造からリガンド認識領域を推定することができる。例えば、同一のリガンドに特異的に結合する、異なる受容体分子のアミノ酸配列をBLASTのデフォルトパラメータを用いて算出した場合、50%以上、好ましくは55%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは65%以上の相同性を示す領域が、リガンド認識領域として推定される。

さらに欠損変異やアミノ酸置換などを導入した変異受容体をコードする遺伝子を動物細胞などに一過性発現させ、その機能に必須の領域を決定することも、当業者は容易になし得る。

本明細書において使用される用語「リガンド」とは、特異的な受容体または受容体のファミリーに対する結合パートナーである。リガンドは、受容体に対する内因性のリガンドであるか、またはその代わりに、薬剤、薬剤候補、もしくは薬理学的手段のような受容体に対する合成リガンドであり得る。

本明細書において使用される用語「タンパク質」「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされ得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変(例えば、標識成分との結合体化)。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド(例えば、非天然のアミノ酸などを含む)、ペプチド様化合物(例えば、ペプトイド)および当該分野において公知の他の改変が包含される。

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxazine-modified cytosine)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示

10

20

30

40

50

される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る（Batzeraら、Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)）。用語「核酸」はまた、本明細書において、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用される。特定の核酸配列はまた、「スプライス改変体」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を暗黙に包含する。その名が示唆するように「スプライス改変体」は、遺伝子のオルタナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる（別の）核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス改変体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナティブスプライシングを含む。読み越し転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義に包含される。スプライシング反応の任意の産物（組換え形態のスプライス産物を含む）がこの定義に含まれる。

本明細書において「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定する遺伝子を構造遺伝子といい、その発現を左右する調節遺伝子という。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに/あるいは「タンパク質」「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」をさすことがある。本明細書において遺伝子の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。

本明細書では塩基配列の同一性の比較および相同性の算出は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」とは、その遺伝子などがインピボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一態様であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。

本明細書において、「アミノ酸」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体アミノ酸」または「アミノ酸アナログ」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがもとのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体アミノ酸およびアミノ酸アナログは、当該分野において周知である。用語「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、 γ -カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体である。用語「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラ-ニトロフェニルアラニン、ホモフェ

10

20

30

40

50

ニルアラニン、パラフルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および/または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様な様式で機能する化合物をいう。

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に受け入れられた1文字コードにより言及され得る。

10

本明細書中において、「対応する」アミノ酸とは、あるタンパク質分子またはポリペプチド分子において、比較の基準となるタンパク質またはポリペプチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)が含まれるが、これらに限定されない。

20

本明細書において、「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド(長さがn)に対して、1~n-1までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ(例えば、11など)もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ(例えば、11など)もまた、下限として適切であり得る。本明細書において使用する場合、好ましくは、受容体「フラグメント」は、全長受容体が特異的に結合し得るリガンドに特異的に結合する。レクチン様酸化LDL受容体の好ましいフラグメントは、C-タイプレクチン様領域(CTL D)を含むフラグメントである。

30

本発明のポリペプチドを製造する方法としては、例えば、そのポリペプチドを産生する原核生物である細菌を培養し、細菌中に組換え受容体タンパク質を封入体として蓄積させ、その宿主細菌を破壊することによって、そのポリペプチドを得る方法が挙げられる。

大腸菌内でタンパク質をビオチン化するためのビオチン化モチーフのアミノ酸配列としては：

40

「MKLKVTVNGTAYDVDVDVDKSHENPMGTILFGGGTGGAPAPAAGGAGAGKAGEGEIPAPLAGTVSKILVKEGDTVKAGQTVLVLEAMKMETEINAPTDGKVEKVLVKERDAVQGGQGLIKIGDLEL」(配列番号5)が挙げられる。アミノ酸配列「GLNDIFEAQKIEWHE」(配列番号6)もまたビオチン化モチーフとして利用可能である。これら配列において、実際にビオチン化を受けるK(リジン)残基以外に変異を導入しても、ビオチン化活性に大きな影響はないので、リジン残基以外を置換した配列もまた、ビオチン化モチーフとして使用することができる。また、実際にビオチン化を受けるKを含んだ「KIG, KI, KIA, KIE, KIGDP(配列番号7), KLWSI(配列番号8), KLG, KVG」などをC末側に付加することによるビオチン化も可能である。

50

また、エンドプロテイナーゼである Factor Xa の認識配列「IEGR」（配列番号9）やエンテロキナーゼの認識配列「DDDDK」（配列番号10）などをこれらビオチン化モチーフと発現される外来タンパク質との間に挿入し、Factor Xa またはエンテロキナーゼによる切断により外来タンパク質を精製することも可能である。例えば、CTLD を発現する場合、これらビオチン化モチーフとCTLDとの間にアミノ酸配列「IEGR」を挿入し、CTLDのみの精製をすることも可能である。

「形質転換体」とは、宿主細胞を形質転換することによって作製された細胞などの生命体の全部または一部をいう。形質転換体としては、原核細胞が例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれ、本明細書においてそれらの形態をすべて包含するが、特定の文脈において特定の形態を指し得る。 10

形質転換体を得るための宿主細菌細胞は、生理活性を保持するポリペプチドを発現するものであれば、特に限定されず、従来から遺伝子操作において利用される各種の宿主細菌細胞を用いることができる。原核細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する原核細胞、例えば、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* KY3276、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* No. 49、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* NY49、*Escherichia coli* BL21 (DE3)、*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS、*Escherichia coli* HMS174 (DE3)、*Escherichia coli* HMS174 (DE3) pLysS、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacterium ammoniagenes*、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869、*Corynebacterium acetophilum* ATCC13870、*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC15354、*Pseudomonas* sp. D-0110などが例示される。 20 30

本発明において得られた細胞に由来するポリペプチドは、天然型のポリペプチドと実質的に同一の作用を有する限り、アミノ酸配列中の1以上のアミノ酸が置換、付加および/または欠失していてもよく、糖鎖が置換、付加および/または欠失していてもよい。 40

あるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、リガンド分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている (Kyte, J および Doolittle, R. F. J. Mo 50

1. Biol. 157 (1) : 105-132, 1982)。アミノ酸の疎水性性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子（例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原など）との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リジン (-3.9)；およびアルギニン (-4.5) である。 10

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質（例えば、リガンド結合能において等価なタンパク質）を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらにより好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0)；アスパラギン酸 (+3.0±1)；グルタミン酸 (+3.0±1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5±1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)；およびトリプトファン (-3.4)。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらにより好ましい。 20

本発明において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または/および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。 30

本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮 (truncated) 改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。対立遺伝子 (allele) とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。「種相同体またはホモログ (homolog)」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性（好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性）を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ (ortholog)」とは、オルソログス遺伝子 (orthologous gene) ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトとマウスの α ヘモグロビン遺伝子はオルソログであるが、ヒトの α ヘモグロビン遺伝子と β ヘモグロビン遺伝子はパラログ（遺伝子重複で生じた遺伝子）である。オルソログは、分子系統樹の推定に有用であることから、オルソログもまた、本発明において有用であり得る。 40

「保存的（に改変された）改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G、および G C U はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。このような核酸の変動は、保存的に改変された変異の1つの種である「サイレント改変（変異）」である。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント変異を記載する。当該分野において、核酸中の各コドン（通常メチオニンのための唯一のコドンである A U G、および通常トリプトファンのための唯一のコドンである T G G を除く）が、機能的に同一な分子を産生するために改変され得ることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列において暗黙に含まれる。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換のほか、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

このような核酸は、周知の P C R 法により得ることができ、化学的に合成することもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変位誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わることまたは取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、1つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、癌マーカー、神経疾患マーカーなど）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、1または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの20%以内、10%以内、または100個以下、50個以下、25個以下などであり得る。

高分子構造（例えば、ポリペプチド構造）は種々のレベルの構成に関して記述され得る。この構成の一般的な議論については、例えば、Albertsら、*Molecular Biology of the Cell*（第3版、1994）、ならびに、CantorおよびSchimmel、*Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*（1980）を参照。「一次構造」とは、特定のペプチドのアミノ酸配列をいう。「二次構造」とは、ポリペプチド内の局所的に配置された三次元構造をいう。これらの構造はドメインとして一般に公知である。ドメインは、ポリペプチドの緻密単位を形成し、そして代表的には50～350アミノ酸長であるそのポリペプチドの部分であ

10

20

30

40

50

る。代表的なドメインは、 β シート (β ストランドなど) および α -ヘリックスのストレッチ (stretch) のような、部分から作られる。「三次構造」とは、ポリペプチドモノマーの完全な三次元構造をいう。「四次構造」とは、独立した三次単位の非共有結合により形成される三次元構造をいう。異方性に関する用語は、エネルギー分野において知られる用語と同様に使用される。

本発明において利用され得る一般的な分子生物学的手法としては、Ausubel F. A. ら編 (1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY; Sambrook J. ら (1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYなどを参酌して当業者であれば容易に実施をすることができる。

本明細書において遺伝子について言及する場合、「ベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるものをいう。そのようなベクターとしては、細菌宿主細胞において自律複製が可能である、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。

「発現ベクター」は、構造遺伝子およびその発現を調節するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーターおよび、選択マーカーを含み得る。発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細菌細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

「組換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核宿主細胞において自立複製が可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。

原核細胞に対する「組換えベクター」としては、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもRoche Molecular Biochemicalsより市販)、pKK233-2 (Pharmacia)、pSE280 (Invitrogen)、pGEMEX-1 (Promega)、pQE-8 (QIAGEN)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 (Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984))、pLSA1 (Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989))、pGEL1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985))、pBluescript II SK+ (Stratagene)、pBluescript II SK(-) (Stratagene)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia)、pETシステム (Novagen)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen)、pMAL-c2 (New England Biolabs)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28 (宝酒造)、pUC118 (宝酒造)、pPA1 (特開昭63-233798)、Pinpoint Xa (Promega社製)、PAN、PAC (avidity社製) などが例示される。

本明細書において用いられる「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子の上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。

本明細書において使用される「固相」とは、抗体のような分子が固定され得る支持体を

いう。固相の形状は、平面状、球状、またはその他の形状であってもよい。また、本発明の固相は、ゲル状であってもよい。本発明において表面プラズモン共鳴の原理を用いて検出する場合、固相は、金、銀またはアルミニウムを含む金属薄膜を片面に持つガラス基板の基材であることが好ましい。本発明において水晶発振子マイクロバランスの原理を用いて検出する場合は、周波数変換素子（例えば水晶発振子、表面弾性波素子）を固相として用い、直接受容体を結合させる。水晶板の片面はシリコンで被覆し、もう一方の面は金電極を施したものを固相として用いる。

本明細書において使用される「基板」とは平面状の固相であって、本発明のチップまたはアレイが構築される材料（好ましくは固体）をいう。したがって、基板は固相の概念に包含される。基板の材料としては、共有結合かまたは非共有結合のいずれかで、本発明において使用される生体分子に結合する特性を有するかまたはそのような特性を有するように誘導体化され得る、任意の固体材料が挙げられる。

固相および基板として使用するためのそのような材料としては、固体表面を形成し得る任意の材料が使用され得るが、例えば、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属（合金も含まれる）、天然および合成のポリマー（例えば、ポリスチレン、セルロース、キトサン、デキストラン、およびナイロン）以下が挙げられるがそれらに限定されない。基板は、複数の異なる材料の層から形成されていてもよい。例えば、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォルステライト、炭化珪素、酸化珪素、窒化珪素などの無機絶縁材料を使用できる。また、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、シリコン樹脂、ポリフェニレンオキサイド、ポリスルホン等の有機材料を用いることができる。本発明においてはまた、ナイロン膜、ニトロセルロース膜、PVD膜など、プロットイングに使用される膜を用いることもできる。高密度のものを解析する場合は、ガラスなど硬度のあるものを材料として使用することが好ましい。基板として好ましい材質は、測定機器などの種々のパラメータによって変動し、当業者は、上述のような種々の材料から適切なものを適宜選択することができる。

本明細書において「チップ」または「マイクロチップ」は、互換可能に用いられ、多様の機能をもち、システムの一部となる超小型集積回路をいう。本明細書において、ビオチン化受容体を固定化した固相を、受容体チップおよび/または受容体マイクロチップと呼ぶ。

本明細書において「アレイ」とは、1以上（例えば、1000以上）の受容体が整列されて配置されたパターンまたはパターンを有する基板（例えば、チップ）そのものをいう。アレイの中で、小さな基板（例えば、10×10mm上など）上にパターン化されているものはマイクロアレイというが、本明細書では、マイクロアレイとアレイとは互換可能に使用される。従って、上述の基板より大きなものにパターン化されたものでもマイクロアレイと呼ぶことがある。例えば、アレイはそれ自身固相表面または膜に固定されている所望の受容体のセットで構成される。アレイは好ましくは同一のまたは異なる受容体を少なくとも 10^2 個、より好ましくは少なくとも 10^3 個、およびさらに好ましくは少なくとも 10^4 個、さらにより好ましくは少なくとも 10^5 個を含む。これらの受容体は、好ましくは表面が 125×80 mm、より好ましくは 10×10 mm上に配置される。形式としては、96ウェルマイクロタイタープレート、384ウェルマイクロタイタープレートなどのマイクロタイタープレートの大きさのものから、スライドグラス程度の大きさのものが企図される。固定される受容体は、1種類であっても複数種類であってもよい。そのような種類の数は、1個〜スポット数までの任意の数であり得る。例えば、約10種類、約100種類、約500種類、約1000種類の受容体が固定され得る。

基板のような固相表面または膜には、上述のように任意の数の生体分子（例えば、受容

体)が配置され得るが、通常、基板1つあたり、 10^8 個の生体分子まで、他の実施形態において 10^7 個の生体分子まで、 10^6 個の生体分子まで、 10^5 個の生体分子まで、 10^4 個の生体分子まで、 10^3 個の生体分子まで、または 10^2 個の生体分子までの個の生体分子が配置され得るが、 10^8 個の生体分子を超える生体分子が配置されていてもよい。これらの場合において、基板の大きさはより小さいことが好ましい。特に、生体分子である受容体のスポットの大きさは、単一の生体分子のサイズと同じ小さくあり得る(これは、 $1-2\text{ nm}$ の桁であり得る)。最小限の基板の面積は、いくつかの場合において基板上の生体分子の数によって決定される。本発明では、細胞と特異的に結合する因子は、通常、 $0.01\text{ mm}\sim 10\text{ mm}$ のスポット状に共有結合あるいは物理的相互作用によって配列固定されている。

10

アレイ上には、生体分子の「スポット」が配置され得る。本明細書において「スポット」とは、生体分子の一定の集合をいう。本明細書において「スポットティング」とは、ある生体分子のスポットをある基板または固相に作製することをいう。スポットティングはどのような方法でも行うことができ、例えば、ピペッティングなどによって達成され得、あるいは自動装置で行うこともでき、そのような方法は当該分野において周知である。本明細書において、生体分子は、受容体、受容体のフラグメント、または受容体の改変体である。

本明細書において使用される用語「アドレス」とは、基板上のユニークな位置をいい、他のユニークな位置から弁別可能であり得るものをいう。アドレスは、そのアドレスを伴うスポットとの関連づけに適切であり、そしてすべての各々のアドレスにおける存在物が他のアドレスにおける存在物から識別され得る(例えば、光学的)、任意の形状を採り得る。アドレスを定める形は、例えば、円状、楕円状、正方形、長方形であり得るか、または不規則な形であり得る。したがって、「アドレス」は、抽象的な概念を示し、「スポット」は具体的な概念を示すために使用され得るが、両者を区別する必要がない場合、本明細書においては、「アドレス」と「スポット」とは互換的に使用され得る。

20

各々のアドレスを定める大きさは、とりわけ、その基板の大きさ、特定の基板上のアドレスの数、分析物の量および/または利用可能な試薬、微粒子の大きさおよびそのアレイが使用される任意の方法のために必要な解像度の程度に依存する。大きさは、例えば、 $1-2\text{ nm}$ から数 cm の範囲であり得るが、そのアレイの適用に一致した任意の大きさが可能である。

30

アドレスを定める空間配置および形状は、そのマイクロアレイが使用される特定の適用に適合するように設計される。アドレスは、密に配置され得、広汎に分散され得るか、または特定の型の分析物に適切な所望のパターンへとサブグループ化され得る。

マイクロアレイについては、秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」、M. F. Templin, et al., Protein microarray technology, Drug Discovery Today, 7 (15), 815-822 (2002)に広く概説されている。

マイクロアレイから得られるデータは膨大であることから、クローンとスポットとの対応の管理、データ解析などを行うためのデータ解析ソフトウェアが重要である。そのようなソフトウェアとしては、各種検出システムに付属のソフトウェアが利用可能である(Ermolaeva Oら(1998) Nat. Genet. 20:19-23)。また、データベースのフォーマットとしては、例えば、Affymetrixが提唱しているGATC (genetic analysis technology consortium)と呼ばれる形式が挙げられる。

40

微細加工については、例えば、Campbell, S. A. (1996). The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996). Micromicroarray Fabrication: a Practical Guide to Semiconductor Processing, Semiconductor Services; Madou, M. J

50

． (1997)． *Fundamentals of Microfabrication*， CRC 15 Press； Rai-Choudhury, P. (1997)． *Handbook of Microlithography, Micromachining, & Microfabrication: Microlithography*などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

マイクロアレイの作製には、マイクロコンタクトプリンティング法、光リソグラフィ法などの種々の方法を用いることが可能であるが、望ましくは、アルカンチオール単分子膜のマイクロパターン化表面を利用する方法である。この場合、まず、片面に金薄膜を蒸着したガラス基板に、メチル基、フルオロメチル基のような疎水性官能基をもつアルカンチオールの単分子膜を形成させる。この単分子膜に、直径数 μm から1mm程度の多数の光透過性スポットを配列させたフォトマスクを重ね、紫外線を照射する。これによって、照射部のアルカンチオールをスポット状に分解除去することができる。スポット内に導入された反応性官能基を使ってストレプトアビジン、アビジンなどのビオチンと特異的に結合するタンパク質を固定化するか、またはタグと特異的に結合する因子を固定化する。最後に受容体タンパク質のビオチン化部位またはタグ部分を介して受容体タンパク質を固定化することにより、化学的処理を経ずに穏やかな条件下で方向性を保った状態での、受容体タンパク質の固定化が完了する。例えば、カルボキシル基含有スポットの場合には、カルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミドを用いて活性エステルに変換し、アビジンやストレプトアビジンなどを固定化させた後、微量の生体分子含有溶液を各スポットに滴下することで、固定化を行うことができる。スポット周囲に形成させた疎水性の単分子膜は、溶液の拡散を抑えるために有効である。スポット周囲のバックグラウンド領域と分析物との非特異的な相互作用を抑えるため、ウシ血清アルブミンのような不活性タンパク質、ポリエチレングリコールのような親水性高分子でブロッキングを行う。

DNAマイクロアレイ、プロテインチップなどを使った分析技術の進歩を見ても明らかのように、マイクロアレイは、一枚の基板上で多数の検体に対してハイスループット分析が可能であるため、きわめて有効な分析手段である。本発明は、このようなマイクロアレイの考え方を、多種類の生体分子-細胞間相互作用を迅速に計測するために応用する。この場合、きわめて多くの検体を同時に分析したり、分析に必要な生体分子および細胞の量をできる限り少なくするためには、マイクロアレイの集積化が重要である。しかし一方で、マイクロアレイ上の細胞に関する情報を取得する場合、ある程度以上の細胞数からなる集団を対象とした測定を行わない限り、誤差の大きいデータしか得ることができない。このような観点から、マイクロアレイを構成する各スポットの大きさは、少なくとも数十~数千個程度の細胞が相互作用することのできる大きさであることが望ましく、例えば、円形のスポットの場合、その直径はおおよそ数 μm から1mm程度である。

マイクロアレイの作製には、マイクロコンタクトプリンティング法、光リソグラフィ法などの種々の方法を用いることが可能であるが、望ましくは、アルカンチオール単分子膜のマイクロパターン化表面を利用する方法である。

本明細書において使用される用語「生体分子」とは、生体に関連する分子をいう。本明細書において「生体」とは、生物学的な有機体をいい、動物、植物、菌類、ウイルスなどを含むがそれらに限定されない。生体分子は、生体から抽出される分子を包含するが、それに限定されず、生体に影響を与え得る分子であれば生体分子の定義に入る。そのような生体分子には、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルライブラリ化合物など）、これらの複合分子などが包含されるがそれらに限定されない。本明細書において好ましい生体分子は、受容体および受容体フラグメント、ならびにそれらのリガンドである。

本明細書において使用される場合、「ビオチンと特異的に結合する因子」とは、ビオチンと特異的に結合し得る任意の因子をいう。ビオチンと特異的に結合する因子とビオチン

10

20

30

40

50

との結合は、可逆的であっても、不可逆的であってもよい。ビオチンと特異的に結合する因子としては、アビジン、およびストレプトアビジン、ならびにこれらの改変体が挙げられるが、これらに限定されない。

本明細書において使用される場合、「タグと特異的に結合する因子」とは、タグと特異的に結合し得る任意の因子をいう。タグと特異的に結合する因子とタグとの結合は、可逆的であっても、不可逆的であってもよい。タグと特異的に結合する因子は、タグの種類に応じて異なり、当該分野において周知である。例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼをタグとする場合、タグと特異的に結合する因子は、例えば、グルタチオンである；mycタンパク質をタグとする場合、タグと特異的に結合する因子は、例えば、抗myc抗体である；6残基の連続するヒスチジン残基をタグとする場合、タグと特異的に結合する因子は、例えば、ニッケルキレートカラムである；配列番号11のような、セルロース結合ドメインタグを用いる場合、タグと特異的に結合する因子は、例えば、セルロースである；配列番号12のような、カルモジュリン結合ペプチドタグを用いる場合、タグと特異的に結合する因子は、例えば、カルモジュリンである；配列番号13のような、Sタンパク質結合ペプチドタグを用いる場合、タグと特異的に結合する因子は、例えば、Sタンパク質である；配列番号14のような、T7タグを用いる場合、タグと特異的に結合する因子は、例えば、抗T7抗体である。

10

表面プラズモン共鳴 (SPR) は、金属表面に生じた表面プラズモン (弾性波) と、全反射した電磁波によって発生するエバネッセント波 (光波) との間で起こる相互作用である。プラズモン波とエバネッセント波の波数と波動ベクトルが近似的に一致する条件を与える光の入射角 θ において共鳴が起こり、エバネッセント波が表面プラズモンの励起に使われるため反射光強度が低下する。表面プラズモン共鳴を得るためには、高屈折率媒体からなるプリズムを配置し (Kretschmann配置)、レーザー光およびLED光を入射する方法がとられる。ここで、プリズムとは反対側の金属表面に接触する媒体の誘電率の変化によって、プラズモン波の波数が変化する。すなわち、金属表面上に物質が接近することによって、表面プラズモン共鳴を与える光の入射角がシフトする。このことを利用して、金属表面の物質による被覆をセンシングすることが可能となる。この測定法は、表面鉛直方向の分解能に優れており (0.1 nmのオーダー)、表面に存在する物質量を $ng \sim pg/cm^2$ のオーダーでリアルタイムに観測することが可能である。また、水媒体中で測定できることもタンパク質のような生体分子の挙動を調べる上で大きな利点である。これを利用した測定装置が生体分子間相互作用測定装置として開発され、タンパク質およびDNAなどの相互作用の分析に応用されている。

20

30

水晶発振子マイクロバランスは、周波数変換素子の電極上に化学的に結合対の一方を結合・固定化し、その周波数変換素子を水中に浸漬し、その結合対と対応する結合対との特異的に結合により生じる質量変化に伴う周波数変換素子の周波数変化を測定して、結合の有無を検出するものである (例えば、特開平6-94591)。この周波数変換素子としては、例えば水晶発振子、表面弾性波素子 (SAW) などが挙げられる。

本発明の受容体チップはまた、質量分析計のための質量分析チップとしても使用され得る。一般的に、質量分光測定による分析は、レーザービームを含む、レーザーなどの高エネルギー源を用いた少量のサンプルの気化およびイオン化を伴っている。物質はレーザービームによって、質量分析チップ先端の表面からガスあるいは気相に気化され、このプロセス中に、個々の分子の一部は陽子を取り込んで、イオン化される。これら正の電荷にイオン化された分子は、次に、短い高圧電界で加速され、高真空度チェンバーに導かれ (ドリフト)、その先で、感度の高い検出装置の表面に衝突する。飛行時間はイオン化された分子の質量の関数であるから、イオン化と衝突との間に経過する時間は、その分子の質量の判定に用いることができ、その分子質量は、次に特定の質量の既知の分子が存在しているかどうかの判定に用いることができる (飛行時間質量分光測定 (TOF))。また、イオン化されたサンプルに含まれる特定の質量/電荷数 (m/Z) のイオンだけが安定な振動状態になることを利用して、直流成分と高周波の交流成分の電圧を加えることにより、特定の質量/電荷数 (m/Z) を有するイオンのみを通過させる質量フィルターを用いて

40

50

(必要であれば、フラグメントイオンを生成させて)、サンプル(またはサンプルのフラグメントイオン)の質量/電荷数(m/Z)を検出することもできる(タンデム質量分析法)。

気相イオンの生成方法としては、粒子のサンプルへの衝撃から得られる脱着/イオン化法などがある。この方法には、高速原子衝撃法(FAB-揮発性マトリクスに懸濁したサンプルに中性粒子(neutral)を衝撃する)、二次イオン質量分析法(SIMS-keV一次イオンが表面に衝撃して二次イオンを発生する)、液体SIMS(LSIMS-一次種がイオンであることを除いてFABと同様)、プラズマ脱着質量分析法(MeV一次イオンを用いることを除いてSIMSと同様)、大量クラスタ衝撃法(MCI-大きいクラスタの一次イオンを用いてSIMSと同様)、レーザー脱着/イオン化法(LDI-レーザー光を用いて、表面から種を脱着/イオン化する)、マトリクス補助型レーザー脱着/イオン化法(MALDI-脱着およびイオン化の事象を補助することができるマトリクスから種を脱着/イオン化することを除いてLDIと同様)などがある。代表的な質量分析法としては、レーザー脱着/イオン化、飛行時間質量分光測定(TOF)を用いる方法が挙げられる。

質量分析計において、受容体のような親和性結合を行う分子を結合した質量分析チップを用いる測定方法は、例えば以下のように、特表平9-501489に開示される：受容体を固定化した質量分析チップ面を、前記分析対象物分子(例えば、リガンドを含む混合物)の源にさらし、前記分析対象物分子が結合するようにするステップと；前記分析対象物分子が結合している質量分析チップ先端を、飛行時間質量分光測定器の一方の端に置き、真空および電場を与えて分光測定器内に加速電位を作るステップと；前記先端より前記分析対象物分子のイオンを脱着させるために、分光測定器内の、誘導された質量分析チップ先端面に結合している分析対象物の少なくとも一部分を、1つあるいはそれ以上のレーザーパルスを用いて、打つステップと；前記質量分光測定器内で、飛行時間によってイオンの質量を検出するステップと；このように検出された質量を表示するステップとから成る、方法。この方法において、質量分析チップに結合した分子(例えば、受容体に特異的に結合するリガンド)のイオンの質量を検出することができる。

上記の方法において、レーザー脱着/イオン化、飛行時間質量分光測定法により、分析対象物分子の質量を測定することが可能であり、この方法においては、分析対象物の脱着およびイオン化を容易にするために、前記分析対象物と一緒にエネルギー吸収物質(例えば、シナピン酸、シンナムアミド、シンナミル臭化物、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、およびα-シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸)を用いることができる。

質量分析計において、受容体のような親和性結合を行う分子を固定化した質量分析チップを用いるさらなる測定方法は、特表平11-512518に開示される。この開示される方法においては、一般にヒドロゲル、およびさらに詳細には、カルボキシメチル化デキストランなどの多糖のヒドロゲルを有する支持体表面に受容体のような親和性結合分子をチップに固定化し、その分析物(例えば、リガンド)をその支持体と接触させた後、親和性結合分子に結合した分析物の有無およびその質量等について解析する。

本明細書において使用する受容体としては、レクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)を含むスカベンジャー受容体、インスリン受容体ファミリーに属する受容体、EGF受容体ファミリーに属する受容体、PDGF受容体ファミリーに属する受容体、VEGF受容体ファミリーに属する受容体、FGF受容体ファミリーに属する受容体、NGF受容体ファミリーなどの増殖因子受容体、ならびに、TGF-βスーパーファミリー受容体、Toll-like受容体ファミリーの受容体、LDL受容体関連タンパク質ファミリーの受容体、およびGタンパク質共役型受容体ファミリーの受容体が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい受容体は、LDL受容体関連タンパク質ファミリーの受容体に属するLOX-1である。

本明細書において、「LOX-1」とは、レクチン様酸化LDL受容体-1の略称をさし、スカベンジャー受容体の一種であるLDL受容体関連タンパク質ファミリーの受容体を指す。LOX-1は、非常に誘導のかかりやすい遺伝子であり、動脈硬化を促進するよ

10

20

30

40

50

うな高血圧、高脂血症、糖尿病などの条件下で発現が誘導される。また、酸化LDLがLOX-1を介して血管内皮細胞に働くと、活性酸素の産生や、それに伴うNO放出の低下が引き起こされる。また細胞接着分子やケモカインの発現も誘導され、いわゆる内皮機能不全の状態が引き起こされるといわれている。ヒトLOX-1 (hLOX-1) の細胞外領域の塩基配列およびアミノ酸配列を配列表の配列番号1および2に、hLOX-1のCTLDの塩基配列およびアミノ酸配列を配列表の配列番号3および4に、それぞれ示す。

本明細書において、「LDL」とは、低密度リポタンパク質をいい、動脈硬化の促進因子である血清タンパク質の一種をいう。血清中に約300mg/dl含まれ、コレステロールを約50%含み、アポBとよばれるタンパク質を20%含む。

本明細書において、封入体として発現された受容体タンパク質のリフォールディングは、アルギニン、還元型グルタチオン、酸化型グルタチオンを含有するリフォールディング緩衝液中に、変性したタンパク質を滴下することによって、行われる。好ましくは、変性タンパク質およびリフォールディング緩衝液のいずれもが、界面活性剤を含有しない。

本明細書においてタンパク質に関して使用する場合、用語「変性」とは、タンパク質の一次構造は変化せずに、高次構造のみが破壊され、天然での状態と物性が変化することをいう。

本明細書において使用する場合、用語「変性剤」とは、タンパク質の変性を起こす薬剤をいう。変性剤としては、グアニジン塩酸塩、尿素、ジオキサソ、アルコール、エチレングリコールなどが挙げられるが、これらに限定されない。グアニジン塩酸塩を用いる濃度は、好ましくは、4~8M、より好ましくは、6Mである。

本明細書において使用する場合、用語「リフォールディング」とは、変性したタンパク質から、もとの立体構造、生物活性などを回復したタンパク質を得ることをいう。受容体タンパク質のリガンド結合フラグメントの場合、その生物活性とは、例えば、リガンド結合活性である。

本明細書において使用する場合、用語「封入体」とは、大腸菌のような細菌において外来遺伝子を大量に組換え発現する場合に生成される、タンパク質が不溶性物質として細胞内に蓄積した構造体をいう。

本明細書において使用する場合、封入体の「可溶化」とは、変性剤を用いて、不溶性の封入体を変性して、水溶液に溶解した形態を生じさせることをいう。

本明細書において使用する場合、用語「SH保護試薬」とは、タンパク質内のチオール基(SH基)が、SH基と反応性の物質と反応することを妨げる試薬をいう。SH保護試薬としては、ジチオトレイトール、 β -メルカプトエタノール、グルタチオンが挙げられるが、これらに限定されない。

本明細書において、封入体として発現された受容体タンパク質のリフォールディングを、アルギニン、還元型グルタチオン、酸化型グルタチオンを含有するリフォールディング緩衝液中に、変性したタンパク質を滴下することによって行う場合、好ましくは、この滴下速度は、10~300 μ l/分の速度であり、より好ましくは、20~30 μ l/分の速度である。リフォールディング緩衝液のpHは、好ましくは、7.5~9.5の範囲であり、より好ましくは、8.0~8.5の範囲であるが、リフォールディングするタンパク質の性質に応じて、適切なpHを変化させることは、当該分野において周知である。1つの実施形態において、このリフォールディング緩衝液は、Tris-HClを含有し、好ましくは、このTris-HClの濃度は5~100mMである。

リフォールディング緩衝液中に含まれるアルギニンの濃度は、好ましくは100mM~600mMであり、より好ましくは、300mM~400mMである。

本発明のリフォールディング方法において、好ましくは、還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンとの比は、1:5~1:12、より好ましくは、1:5~1:10、最も好ましくは、1:5である。さらに好ましくは、還元型グルタチオンの濃度は1~20mMであり、酸化型グルタチオンの濃度は0.2~2mMである。

本発明のリフォールディング方法において、滴下する変性タンパク質溶液とリフォールディング緩衝液との容量の比は、好ましくは、1:50~1:100である。また、好ま

10

20

30

40

50

しくは、滴下する変性タンパク質溶液の滴下後のリフォールディング緩衝液中でのタンパク質濃度は、 $5 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、より好ましくは、 $5 \sim 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、なお好ましくは、 $20 \sim 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ である。

本発明のリフォールディング方法に用いられる変性タンパク質は、変性剤、熱、または紫外線照射、放射線照射のいずれかによって変性されたタンパク質であるが、好ましくは、変性剤によって変性されたタンパク質である。

本発明のリフォールディング方法に用いられる変性タンパク質は、好ましくは、細菌で発現した封入体タンパク質を、SH保護試薬および変性剤を含有する可溶化緩衝液を用いて可溶化することによって得られる変性タンパク質である。好ましくは、変性タンパク質を得るための可溶化は、 $1 \sim 5 \text{mg}/\text{mL}$ の濃度のタンパク質を用いて行われる。より好ましくは、変性タンパク質を得るための可溶化は、 $2.0 \sim 3.0 \text{mg}/\text{mL}$ の濃度のタンパク質を用いて行われる。また、好ましくは、可溶化緩衝液のpHは $7.0 \sim 9.0$ であり、1つの局面において、可溶化緩衝液は、 $5 \sim 100 \text{mM}$ のTris-HCl緩衝液である。

本発明において、好ましくは、SH保護試薬はジチオトレイトールであり、さらに好ましくは、ジチオトレイトールの濃度は $5 \sim 200 \text{mM}$ であり、なおより好ましくは、ジチオトレイトールの濃度は $50 \sim 100 \text{mM}$ である。

本発明のリフォールディング方法においては、好ましくは、変性タンパク質溶液をリフォールディング緩衝液に滴下した後に、溶液を攪拌する工程が行われる。より好ましくは、この攪拌工程は、 $10 \sim 48$ 時間行われ、なおより好ましくは、この攪拌工程は、 $10 \sim 14$ 時間行われる。この攪拌は、 $4^\circ\text{C} \sim$ 室温で行うことができるが、好ましくは、 4°C で行われる。

本発明のリフォールディング方法を用いることによって、従来のリフォールディング方法を用いて調製されたタンパク質よりも高純度かつ均質なタンパク質を得ることができる。例えば、本発明のリフォールディング方法を用いることによって、 90% 以上、 91% 以上、 92% 以上、 93% 以上、 94% 以上、 95% 以上、 96% 以上、 97% 以上、 98% 以上、 99% 以上の純度のタンパク質が得られる。また、本発明のリフォールディング方法を用いることによって得られたタンパク質を質量分析法によって分析した場合、MSスペクトルによる m/z の幅が、 70 以下、 60 以下、 50 以下、 40 以下、 30 以下、 20 以下の純度のタンパク質を得ることができる。

また、本発明のリフォールディング方法を用いることによって得られたタンパク質を用いて、 4.0 オングストロームの分解能を与えるX線回折像を与える単結晶、 3.5 オングストロームの分解能を与えるX線回折像を与える単結晶、 3.2 オングストロームの分解能を与えるX線回折像を与える単結晶、 3.0 オングストロームの分解能を与えるX線回折像を与える単結晶、 2.8 オングストロームの分解能を与えるX線回折像を与える単結晶、 2.5 オングストロームの分解能を与えるX線回折像を与える単結晶、が得られる。

本明細書において「予防」(prophylaxisまたはprevention)とは、ある疾患または障害について、そのような状態が引き起こされる前に、そのような状態が起これないように処置することをいう。

本明細書において「治療」とは、ある疾患または障害について、そのような状態になった場合に、そのような疾患または障害の悪化を防止、好ましくは、現状維持、より好ましくは、軽減、さらに好ましくは消長させることをいう。

本明細書において使用する場合、「ワクチン」とは、疾患に対する免疫学的予防を提供する薬剤をいう。そのような免疫学的予防は、体液性免疫であっても、細胞性免疫であってもよい。ワクチン組成物は、例えば、疾患に関連した免疫応答を惹起する抗原を含み得る。ワクチン組成物に含まれる抗原としては、タンパク質、ペプチド、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、アミノ酸、糖類などが挙げられるが、これらに限定されない。本発明において、ワクチンに含まれる好ましい抗原は、タンパク質抗原であり、より好ましくは、本発明の方法によってリフォールディングされたタンパク質である。

本発明のワクチンにおいて治療され得る疾患としては、動脈硬化、癌、および感染症が挙げられるが、これらに限定されない。

本明細書において使用される場合、「キット」とは、複数の容器、および製造業者の指示書を含み、そして各々の容器が、本発明の薬学的組成物、その他の薬剤、およびキャリアを含む製品をいう。

本明細書において使用される場合、「被検体」とは、本発明の薬学的組成物が投与される対象であり、ヒト、マウス、ウシ、ニワトリなどの動物が挙げられるが、これらに限定されない。

本明細書において「薬学的に受容可能なキャリア」は、医薬または動物薬のような農薬を製造するときに使用される物質であり、有効成分に有害な影響を与えないものをいう。10
そのような薬学的に受容可能なキャリアとしては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、賦形剤および／または薬学的アジュバント。

本発明の処置方法において使用される薬剤の種類および量は、本発明の方法によって得られた情報（例えば、疾患に関する情報）を元に、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、投与される被検体の部位の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明のモニタリング方法を被検体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定す20
ることができる。疾患状態をモニタリングする頻度としては、例えば、毎日－数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回－1ヶ月に1回）のモニタリングが挙げられる。1週間－1ヶ月に1回のモニタリングを、経過を見ながら施すことが好ましい。

必要に応じて、本発明の治療では、2種類以上の薬剤が使用され得る。2種類以上の薬剤を使用する場合、類似の性質または由来の物質を使用してもよく、異なる性質または由来の薬剤を使用してもよい。このような2種類以上の薬剤を投与する方法のための疾患レベルに関する情報も、本発明の方法によって入手することができる。

本明細書において「候補化合物」とは、目的とする疾患または障害を処置するために使用され得る化合物の候補をいう。したがって、ある化合物は、目的とする疾患または障害について効果があると予測される場合は、候補化合物と呼ばれ得る。30

本明細書において「化合物種」とは、ある化合物の集合において、特定の目的とする活性を有するなど、所望の性質を有する1種の化合物についていう。例えば、LOX-1の活性を調節する化合物の集合において、LOX-1の活性を調節する化合物が特定される場合、そのような化合物は、化合物種と称され得る。本明細書では、単に化合物とも称される。

本明細書において「ライブラリー」とは、スクリーニングをするための化合物などの一定の集合をいう。ライブラリーは、同様の性質を有する化合物の集合であっても、ランダムな化合物の集合であってもよい。好ましくは、同様の性質を有すると予測される化合物の集合が使用されるが、それに限定されない。

（薬学的組成物） 40

本発明のリフォールディングされたタンパク質は、動脈硬化の処置、予防、診断または予後のための薬学的組成物の成分としても使用することが可能である。

本明細書において薬剤の「有効量」とは、その薬剤が目的とする薬効が発揮することができる量をいう。本明細書において、そのような有効量のうち、最小の濃度を最小有効量ということがある。そのような最小有効量は、当該分野において周知であり、通常、薬剤の最小有効量は当業者によって決定されているか、または当業者は適宜決定することができる。そのような有効量の決定には、実際の投与のほか、動物モデルなどを用いることも可能である。本発明はまた、このような有効量を決定する際に有用である。

本明細書において「薬学的に受容可能なキャリア」は、医薬または動物薬のような農薬を製造するときに使用される物質であり、有効成分に有害な影響を与えないものをいう。 50

そのような薬学的に受容可能なキャリアとしては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、賦形剤および／または農学的もしくは薬学的アジュバント。

本発明の処置方法において使用される薬剤の種類および量は、本発明の方法によって得られた情報（例えば、疾患に関する情報）を元に、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、投与される被検体の部位の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明のモニタリング方法を被検体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。疾患状態をモニタリングする頻度としては、例えば、毎日一数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回－1ヶ月に1回）のモニタリングが挙げられる。1週間－1ヶ月に1回のモニタリングを、経過を見ながら施すことが好ましい。

本明細書において「指示書」は、本発明の治療方法などを医師、患者など投与を行う人に対して記載したものである。この指示書は、本発明の医薬などを例えば、放射線治療直後または直前（例えば、24時間以内など）に投与することを指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

必要に応じて、本発明の治療では、2種類以上の薬剤が使用され得る。2種類以上の薬剤を使用する場合、類似の性質または由来の物質を使用してもよく、異なる性質または由来の薬剤を使用してもよい。このような2種類以上の薬剤を投与する方法のための疾患レベルに関する情報も、本発明の方法によって入手することができる。

以下に実施例等により本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

[実施例1]

（ヒスチジンタグ化LOX-1 CTLDタンパク質封入体の発現、可溶化、およびリフォールディング）

（1）LOX-1 CTLDタンパク質を発現した大腸菌の培養

以下の配列を有するヒトLOX-1 CTLD（143-273）をNovagen社製ヒスチジンタグ融合タンパク質発現ベクターpET28aのマルチクローニングサイト（NdeI-XhoI）に組み込んだものを大腸菌BL21（DE3）に導入し大量発現を行なった：

PCPQDQDWIWHGENCYLFS SSGS FNWEK S QEKCLSLDAKLLKI
NSTADLDFIQQAISYSSFPFWMGLSRRNPSYPWLWEDGSP
LMPHLFRVRGAVSQ TYP SGT CAYIQRGAVYAENCILAAFS
ICQKKANLRAQ（配列番号4）。

LOX-1発現ベクターで形質転換を行った大腸菌は50 μg/mlのカナマイシンを含むM9最小培地8Lにて37℃で培養を行い、660nmのOD値が0.5になったところでIPTGを終濃度1mMになるように加えてさらに37℃で4時間培養を続け、3,500×gで30分間遠心を行なって菌体を回収した。

（2）LOX-1 CTLDタンパク質の不溶性封入体の回収

回収した菌体を、菌体1gあたり5mlの溶解緩衝液（50mM Tris/HCl（pH8.0）、400mM KCl、0.1% Triton X-100）で懸濁し、Complete Miniプロテアーゼインヒビター（ロシュ社製、菌体1gあたり0.5タブレット使用）を加えて、4℃にてアストラソン社製超音波破碎機を用いて菌体を破碎し

、遠心(10,000×g,30分,4℃)にてペレットを回収した。得られたペレットを溶解緩衝液で再懸濁、超音波処理、遠心操作を2回繰り返してよく洗浄し、不溶性封入体として回収し、次の可溶化操作を行なうまで-80℃で保存した。

(3) LOX-1 CTLDタンパク質の可溶化、リフォールディング操作

不溶性封入体を、30mg(LOX-1 CTLDタンパク質量として)を10mlの可溶化緩衝液(100mM Tris/HCl(pH8.0)、6Mグアニジン塩酸塩、5mM DTT)に懸濁し(タンパク質終濃度3mg/ml)、遠心して沈殿を除去し、室温にて4時間静置した。

その後、DTTを終濃度50mMになるように加え、1Lのリフォールディング緩衝液(10mM Tris/HCl(pH8.5)、400mM アルギニン、5mM 還元型グルタチオン、0.5mM 酸化型グルタチオン)に攪拌しながらFPLC送液ポンプを使用して20-30μl/minの速度で4℃でゆっくり滴下した。滴下終了後、終濃度0.1mMになるようPMSFを加え、さらに4℃で12時間攪拌し、タンパク質のリフォールディングを行なった。

(4) リフォールディングしたLOX-1 CTLDタンパク質の回収、精製

リフォールディングしたタンパク質溶液1Lについて、0.45μmメンブレンフィルターで沈殿を除き、10Lの透析緩衝液(25mM Tris/HCl(pH7.5)、50mM NaCl)に4℃で24時間透析し、緩衝液を交換してさらに24時間透析し、変性剤、アルギニン、グルタチオンを除去した。透析した溶液は0.45μmメンブレンフィルターで沈殿を除き、Ni-キレートリングセファロースカラム(ファルマシア社製)に通し、タンパク質をカラムに吸着させた。その後カラム平衡化緩衝液(50mM Tris/HCl(pH7.5)、100mM NaCl、10mMイミダゾール)でカラムを洗浄し、イミダゾール濃度を500mMまで直線的勾配で上昇させてタンパク質を溶出させた。溶出させたタンパク質溶液はセントリコン-10(ミリポア社製)で2mlまで濃縮し、1mgタンパク質あたり10切断単位の牛スロンビンプロテアーゼを加えて4℃で5時間反応させてヒスチジントグを切断し、その後ベンザミジンセファロースカラム(ファルマシア社製)に通してスロンビン除去し、終濃度0.1mMになるようPMSFを加えてプロテアーゼ反応を停止させた。タンパク質溶液は次にゲル濾過カラム平衡化緩衝液(10mM Tris/HCl(pH7.5)、NaCl 50mM)で平衡化したSuperdex75ゲル濾過カラム(ファルマシア社製)に供し、正しい分子量のフラクションを分取した。

[実施例2]

(ヒスチジントグ化LOX-1細胞外ドメイン封入体の発現、可溶化、およびリフォールディング)

(1) LOX-1細胞外ドメインタンパク質を発現した大腸菌の培養

ヒトLOX-1細胞外ドメイン(61-273)(配列番号2)をNovagen社製ヒスチジントグ融合タンパク質発現ベクターpET28aのマルチクローニングサイト(NdeI-XhoI)に組み込んだものを大腸菌BL21(DE3)に導入し大量発現を行なった。以降の培養に関してはLOX-1 CTLDと同様に行なった。

(2) LOX-1細胞外ドメインタンパク質の不溶性封入体の回収

不溶性封入体の回収に関してはLOX-1 CTLDと同様に行なった。

(3) LOX-1細胞外ドメインタンパク質の可溶化、リフォールディング操作

可溶化、リフォールディング操作に関してはLOX-1 CTLDと同様に行なった。

(4) リフォールディングしたLOX-1細胞外ドメインタンパク質の回収、精製

リフォールディングしたLOX-1細胞外ドメインタンパク質の回収、精製に関しては、透析緩衝液の組成を25mM Tris/HCl(pH7.5)、100mM NaClに、ゲル濾過カラム平衡化緩衝液の組成を10mM Tris/HCl(pH7.5)、NaCl 400mMに、さらにNi-キレートリングセファロースカラムから溶出させたタンパク質溶液を濃縮する際に終濃度400mMになるようにNaClを加えてから行なうことを除いては、LOX-1 CTLDと同様に行なった。

[実施例3]

(hLOX-1のビオチン化細胞外領域封入体、並びにビオチン化CTL D封入体の発現、可溶化、およびリフォールディング)

(1) ビオチン化ポリペプチドとhLOX-1の細胞外領域、もしくはCTL Dとの融合タンパク質発現系の構築

hLOX-1の細胞外領域、もしくはCTL DをコードするDNA断片はPCR法による常法により調製した。それらの両端には、5'側にNru I、3'側にEcoRVの制限酵素サイトを付加した。PCR産物を抽出後、両制限酵素により処理した後、クローニング用ベクターであるpBSに挿入し、遺伝子配列に誤りがないかDNAシーケンサーにより確認した。hLOX-1の細胞外領域の塩基配列およびアミノ酸配列を配列表の配列番号1および2に、hLOX-1のCTL Dの塩基配列およびアミノ酸配列を配列表の配列番号3および4に、それぞれ示す。配列を確認した当該タンパク質をコードした遺伝子を、制限酵素により切り出し、大腸菌内においてビオチン化を受けることが知られているポリペプチドをコードしているプラスミドベクターPinPoint Xa (Promega社製)の上記制限酵素サイトに挿入した。次いで、発現宿主である大腸菌JM109に形質転換した後、正しく目的遺伝子を取り込んだ形質転換体を選抜した。

(2) ビオチン化タンパク質の誘導方法

目的プラスミドにより形質転換された大腸菌JM109のコロニーを最終濃度で100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、並びに2 μM のビオチンを含むLB培地5 mlに接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩攪拌しながら培養した。続いて、この培養液を最終濃度で100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、並びに2 μM のビオチンを含む50 mlのLB培地に1:100 (容量比)の割合で接種し、1時間培養した後、最終濃度で100 μM になるようにIPTGを添加し、目的融合タンパク質の発現を誘導し、さらに4時間攪拌しながら培養した。

(3) ビオチン化細胞外領域、ビオチン化CTL Dの検出と発現状態の確認

上記誘導処理後の培養液100 μl を1.5 mlの遠心チューブに入れ、15,000 rpmで数分間遠心し、菌体を回収した。回収した菌体を超音波処理にて破碎後、20,000 gで30分間遠心して得られた上清(可溶性成分)と沈殿(不溶性成分)をそれぞれSDSサンプルバッファーに懸濁し、95 $^{\circ}\text{C}$ で4分間処理した。次いで、12%のSDS-PAGEにてタンパク質を分離した後、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。

転写後のニトロセルロース膜は、ポンソーSによる染色で、タンパク質バンドの位置を確認した後、TBS-Tween (20 mM Tris、150 mM NaCl、pH 7.6、0.1% Tween 20)中にて室温で穏やかに60分間攪拌した。次に、ストレプトアビジン標識アルカリフォスファターゼ中にて室温で30分間反応させた。続いて、反応後のニトロセルロース膜をTBS-Tweenにて洗浄した後、アルカリフォスファターゼの基質であるNBT/BCIP溶液を添加し、ビオチン化タンパク質のバンドが検出されるまで室温で反応させた。その結果、不溶性成分には、ビオチン化細胞外領域、およびビオチン化CTL Dの分子量に相当する位置にビオチン化タンパク質の顕著なバンドが検出された。

(4) LOX-1 CTL Dタンパク質の可溶化、リフォールディング操作

不溶性封入体を、30 mg (LOX-1 CTL Dタンパク質量として)を10 mlの可溶化緩衝液(100 mM Tris/HCl (pH 8.0)、6 M グアニジン塩酸塩、5 mM DTT)に懸濁し(タンパク質終濃度3 mg/ml)、遠心して沈殿を除去し、室温にて4時間静置した。

その後、DTTを終濃度50 mMになるよう加え、1 Lのリフォールディング緩衝液(10 mM Tris/HCl (pH 8.5)、400 mM アルギニン、5 mM 還元型グルタチオン、0.5 mM 酸化型グルタチオン)に攪拌しながらFPLC送液ポンプを使用して20-30 $\mu\text{l}/\text{min}$ の速度で4 $^{\circ}\text{C}$ でゆっくり滴下した。滴下終了後、終濃度0.1 mMになるようPMSFを加え、さらに4 $^{\circ}\text{C}$ で12時間攪拌し、タンパク質のリフォールディングを行なった。

(5) リフォールディングしたビオチン化タンパク質の回収、精製

リフォールディングしたタンパク質溶液 1 L について、0.45 μ m メンブレンフィルターで沈殿を除き、10 L の透析緩衝液 (25 mM Tris / HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl) に 4℃ で 24 時間透析し、緩衝液を交換してさらに 24 時間透析し、変性剤、アルギニン、グルタチオンを除去した。透析した溶液は 0.45 μ m メンブレンフィルターで沈殿を除いた。タンパク質溶液をセントリコンー 10 (ミリポア社製) で 2 ml まで濃縮した。タンパク質溶液は次にゲル濾過カラム平衡化緩衝液 (10 mM Tris / HCl (pH 7.5), NaCl 50 mM) で平衡化した Superdex 75 ゲル濾過カラム (ファルマシア社製) に供し、正しい分子量のフラクションを分取した。

(参考例 1)

10

本発明と比較検討する対象として、従来法である、環状糖質サイクロアミロースと界面活性剤を用いるリフォールディング方法によってリフォールディングしたタンパク質を、以下のとおり調製した。

(1) ビオチン化細胞外領域、ビオチン化 CTL D の可溶性タンパク質への再構成

封入体を最終濃度 40 mM の DTT を含む 6 M のグアニジン塩酸塩溶液で室温にて 1 時間処理し、間違った構造を完全に解きほぐした。続いて、70 倍容量の界面活性剤溶液 (0.1% CTAB もしくは SB3-14、最終濃度で 2 mM の DL-cysteine を含む PBS (-) 溶液) を添加し、室温で 1 時間反応させた後、反応液 2.4 ml を取り出し、3% CA 溶液 6 ml を加えさらに 1 時間室温で反応させた。

この溶液を 20,000 g で 10 分間遠心し、得られた上清 (可溶性画分) をリフォールディング溶液とした。リフォールディングされたタンパク質の存在を確認したところ、80% 以上が可溶性画分に回収されていることが確認され、効率的にリフォールディングされていることが示された。

リフォールドされたビオチン化細胞外領域、ビオチン化 CTL D をストレプトアビジンビーズ上に固定化し、リガンドの一つであるアセチル化 LDL を蛍光標識した DiI Ac LDL の結合を確認したところ、リフォールディングしたビオチン化細胞外領域、もしくはビオチン化 CTL D 領域を固定化したビーズ上に蛍光が観察され、どちらもリガンド結合能を回復していることが示された。

[実施例 4]

(リフォールディングしたタンパク質のゲルろ過による純度検定)

30

(1) ゲルろ過による純度検定

微量精製用 HPLC (SMART システム、Pharmacia 社製) を用いて、Superose 12 (Pharmacia 社製) ゲルろ過カラムにより分子量および純度の検定を行った。20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5)、400 mM NaCl で平衡化した Superose 12 カラムに同じ緩衝液に溶解した LOX-1 細胞外ドメインをアプライし、流速 20 μ L / 分での溶出パターンを 280 nm の UV 吸収によってモニターした。

本発明のリフォールディング方法を用い実施例 1 で調製したヒスチジンタグ化 LOX-1 CTL D タンパク質から、実施例 1 (4) に記載した手順でタグを取り除いたタンパク質の純度をゲルろ過によって確認したところ、従来法の環状糖質サイクロアミロースを用いるリフォールディング方法によって調製したタンパク質よりも分子量の幅が狭かった。この結果は、本発明のリフォールディング方法が従来法よりも高い純度のタンパク質を調製する方法であることを示している (図 1)。

40

ゲルろ過による純度検定の結果と SDS-PAGE での純度検定の結果 (データ示さず) を考慮すると、本発明のリフォールディング方法によって調製したタンパク質の純度が約 99% 以上であることを示す。

(2) 質量分析法による純度検定

上記 (1) と同様に、ヒスチジンタグ化 LOX-1 CTL D タンパク質からタグを取り除いたタンパク質を、0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) 溶液に溶解し、0.1 TFA を含む 30% アセトニトリル溶液中に溶解させたシナピン酸溶液を添加して混合した

50

。その溶解した試料に対して、MALDI-TOF質量分析装置 (Voyager Elite, Perspective Biosystems社製) による分析を行った。

リフォールディングしたLOX-1のCTLDの質量分析によるタンパク質純度の検定結果。本発明のリフォールディング方法によって得た、タグを除去したヒスチジントグ化LOX-1 CTLDタンパク質は、約50のm/z比 (質量/荷電) という狭い幅の質量分析スペクトルを与えた。この狭い幅の結果は、従来法の環状糖質サイクロアミロースを用いるリフォールディング方法よりも夾雑物が少なく高純度に精製されていることを示す (図2)。

(3) NMR分析法による純度検定

実施例1で得られたタンパク質からタグを除去し、0.1mMの濃度になるように20mMのTris HCl緩衝液 (pH7.0)、50mM NaClに可溶化し、600MHz NMR分光器により $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence correlation spectroscopy) 2次元相関スペクトルの測定を、25℃で行った。

本発明のリフォールディング方法によって調製したタンパク質は、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC 2次元相関スペクトル上にてタンパク質の主鎖に由来する ^1H シグナルが7ppmから11ppmの広い範囲に分布しているのに対し、シクロアミロースを利用してリフォールディングしたタンパク質では、7ppm~8.5ppmの狭い範囲で、お互いのシグナルが重なるように分布しており、かつ個々のシグナルの線幅が適正にリフォールディングされたタンパク質よりも広がった。

主鎖 ^1H シグナル分布の以上の結果から、本発明のリフォールディング方法でリフォールディングしたタンパク質は、適切なタンパク質構造を形成していることが理解できる。これに対して、従来法 (シクロアミロース法) を用いたリフォールディングでは、不完全にリフォールディングされた構造を有するタンパク質が混入していることが理解できる。

[実施例5]

(リフォールディングしたタンパク質の結晶化)

タンパク質を結晶化するためには、非常に高純度のタンパク質を調製する必要があることは周知である。本発明のリフォールディング方法を用いて調製されたタンパク質が、結晶化が可能な程度の純度を有することを、実証した。

試料としてCTLDを用いた。CTLDの結晶化は、1 μL の8mg/mLのCTLD溶液 (タンパク質を溶解する緩衝液として、10mM Tris-HCl、pH7.5、50mM NaCl、10mM酢酸亜鉛を用いた) に対して、1 μL の0.1Mクエン酸緩衝液 (pH3.0~4.0) を添加し、この溶液を0.1Mクエン酸緩衝液 (pH3.0~4.0) に対して、2~4日間蒸気拡散することによって、得られた。

得られた結晶は、 $a=6.2\text{nm}$ 、 $b=6.9\text{nm}$ 、および $c=7.9\text{nm}$ の単位格子定数を有する、 $P2_12_12_1$ 斜方晶形であった。また、この結晶から、約2.5オングストロームの分解能を持つX線回折像が得られた (図4)。

以上の結果が示すように、本発明のリフォールディング方法で得られたLOX-1 CTLDは結晶化が可能な程度の高純度であった。

[実施例6]

(リフォールディングしたタンパク質の機能測定)

本発明のリフォールディング方法によってリフォールディングした、ヒスチジントグ化タンパク質およびピオチントグ化タンパク質の各々について、リガンド結合能を確認した。

(1) リフォールディングしたヒスチジントグ化タンパク質のリガンド結合能の確認

リフォールディングに成功したヒスチジントグ化細胞外領域、もしくはヒスチジントグ化CTLDを変性LDLなどを検出するセンサーとして使用する目的で、表面プラズモン共鳴により検出が可能な機器のセンサー部位へ各ヒスチジントグ化タンパク質を固定化し、実際のリガンドの結合を検討した。表面プラズモン共鳴装置としては、BIAcore社製のBIAcoreを使用した。

(1. 1) 実施例1で調製した、リフォールディングしたヒスチジン化細胞外領域をB I A C O R Eのセンサーチップ上に、リガンド認識に関わる部分が外側を向くように固定化した。具体的には、N T Aセンサーチップ (B I A c o r e社製) 表面を、0. 35 M E D T Aを含むP B S (リン酸緩衝化生理食塩水) で洗浄後、500 μ M N i C l₂ をインジェクトして、センサーチップ上にタンパク質を固定化した。このチップ上に、実施例1で調製したヒスチジントグ化C T L Dを固定化した。なお、固定化量は、1000 R U以下になるように、インジェクトするタンパク質量を調整した。

(1. 2) 変性L D Lとして、アセチル化L D Lおよび酸化L D Lを以下のように調製した。

酸化L D Lの調製：精製したL D Lおよび硫酸銅の濃度がそれぞれ3 m g / m Lおよび75 μ Mとなる様に調製した溶液をC O₂ インキュベーター内で20時間インキュベートした。ついでE D T Aを含有する0. 15 Mの塩化ナトリウム溶液にて透析し、酸化L D Lを得た。

アセチル化L D Lの調製：精製したL D Lに対して最終濃度が50%になるように酢酸ナトリウム溶液を加え、0℃に冷却した。このとき全量を1 m Lにした。氷上で攪拌しながら無水酢酸1 μ Lを10分間隔で5回加えさらに30分間冷却攪拌を続け反応を完結させた。

(1. 3) 受容体チップに対する各種L D Lの結合を、以下のとおりに検出した。流速20 μ L / 分で、L D Lおよび変性L D L (アセチル化L D Lおよび酸化L D L) を2分間インジェクトして、センサーグラムの変化を記録した。表面プラズモン共鳴の原理を利用した機器の場合、リガンドの結合をレゾナンスユニット : R Uの増加を示すセンサーグラムの変化として検出することになる。その後、1 M N a C l P B S緩衝液 (p H 7. 4) を30秒間インジェクトし、結合したL D Lを剥離することによって、センサーチップを再生した。このサイクルを5回繰り返し、センサーチップのベースラインおよびセンサーグラムの応答レベルが再現性よく安定していることを確認したうえで、センサーグラムの変化から、結合定数および結合量を算出した。

その結果、本発明のリフォールディング方法を用いてリフォールディングされたヒスチジントグ化L O X - 1 C T L Dは、酸化L D Lおよびアセチル化L D Lに対して、天然のL O X - 1と同程度の親和性を有することが確認された (図5)。なお、リフォールディングされたL O X - 1 C T L Dは、L D Lに対して、変性L D Lの場合よりも2桁低い結合能を示した (データ示さず)。

(2) リフォールディングしたビオチンタグ化タンパク質のリガンド結合能の確認

リフォールディングに成功したビオチンタグ化細胞外領域、もしくはビオチンタグ化C T L Dを変性L D Lなどを検出するセンサーとして使用する目的で、表面プラズモン共鳴により検出が可能な機器のセンサー部位へ各ビオチンタグ化タンパク質を固定化し、実際のリガンドの結合を検討した。表面プラズモン共鳴装置としては、B I A c o r e社製のB I A c o r eを使用した。

(2. 1) 実施例3で調製した、リフォールディングしたビオチン化細胞外領域をB I A C O R Eのセンサーチップ上に、リガンド認識に関わる部分が外側を向くように固定化した。具体的には、センサーチップS A (B I A c o r e社製) 表面を、固定化緩衝液 (10 m M T r i s - H C l p H 7. 5、50 m M N a C l) で平衡化した後、固定化緩衝液中に調製した70 μ g / m Lのビオチン化L O X - 1タンパク質を、10 μ L / 分でインジェクトした。50 μ Lのビオチン化L O X - 1をインジェクトした時点で、約3000 R Uを与える量のタンパク質が固定化されたことを確認して、タンパク質の固定化を終了した。その後、固定化緩衝液を20 μ L / 分で流して、チップに結合しなかったタンパク質を洗浄して取り除いた。600分間の洗浄を行っても、R U値の低下は、5%以下であった。このセンサーチップを用いて、上記(1. 2)および(1. 3)と同様にして、L D Lおよび変性L D Lの結合について試験した。

その結果、ビオチン化C T L Dの場合も、酸化L D Lおよびアセチル化L D Lに対して、天然のL O X - 1と同程度の親和性を有することが確認された。

[実施例7]

(リフォールディングしたタンパク質は二量体を形成する)

天然のLOX-1タンパク質は、二量体を形成する。そこで、本発明のリフォールディング方法によってリフォールディングしたLOX-1が二量体を形成するか否かについて、ゲルろ過、PAGE、および質量分析を用いて確認した。この実施例では、実施例2の方法に従って得た細胞外ドメイン全長(61-273)にヒスチジntagを付けて発現した後リフォールディングを行い、その後に、ヒスチジntagを除いたタンパク質を使用した。

(1) ゲルろ過による純度検定

微量精製用HPLC (SMARTシステム、Pharmacia社製)を用いて、Superose 12 (Pharmacia社製)ゲルろ過カラムにより、分子量および純度の検定を行った。20mMリン酸緩衝液(pH7.5)、400mM NaClで平衡化したSuperose 12カラムに、平衡化に使用した緩衝液と同一の緩衝液に溶解した、実施例2で調製したヒスチジntag化LOX-1細胞外ドメインをアプライし、流速20 μ L/分での溶出パターンを280nmのUV吸収によってモニターした。

(2) 質量分析による純度検定

0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) 溶液に溶解した実施例1で調製したヒスチジntag化LOX-1細胞外ドメインに、0.1TFAを含む30%アセトニトリル溶液中に溶解させたシナピン酸溶液を混合した。その溶解した試料に対して、MALDI-TOF質量分析装置 (Voyager Elite, Perspective Biosystems社製) による分析を行った。

(3) 還元および非還元条件下でのSDS-PAGE

本発明のリフォールディング方法によって得られたLOX-1タンパク質に20% β -メルカプトエタノールを含む試料緩衝液(250mM Tris HCl, pH6.8、8% SDS、20% スクロース、0.02% ブロモフェノールブルー (BPB))を加え、100 $^{\circ}$ Cで5分間煮沸した試料を、還元状態の試料とした。一方、上記の試料緩衝液から β -メルカプトエタノールを除いた試料緩衝液を加えて、30分間室温において反応させた試料を、非還元状態の試料とした。各々の試料を、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、クマシーブリリアントブルー (CBB) を用いて染色した。

(化学架橋実験)

リフォールディング方法によって得られたLOX-1タンパク質溶液(300 μ g/mL、50mM HEPES pH7.5、100mM NaCl、3mM EDTA)に対して、化学架橋剤BS3 (Pierce社製)を、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2mMとなるように添加し、室温で30分間架橋反応を行った。反応後すぐに、SDS-PAGE用の試料緩衝液(250mM Tris HCl, pH6.8、8% SDS、20% スクロース、0.02% ブロモフェノールブルー (BPB)、20% β -メルカプトエタノール)を添加して、100 $^{\circ}$ Cで5分間過熱し、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、CBB染色して、添加した化学架橋の量に依存して増加する二量体タンパク質の変化量を観測した。

(二量体実験のまとめ)

以上の実験の結果、LOX-1の細胞外ドメイン全長を本発明のリフォールディング方法でリフォールディングした結果得られたタンパク質が、細胞表層にあるLOX-1の存在様式と同様に二量体であることが示された(図6)。

[実施例8]

(蛍光サンドイッチ法による変性LDLの検出)

実施例3で調製したビオチン化タグをN末端に付けたLOX-1を、ストレプトアビジンでコートされたマイクロプレート(バイオコート(登録商標)、BD Bioscience社)上に、ビオチンを介して固定化する。不要な血液凝固を避けるためにヘパリンを含んだ試験管に採血を行って(ヘパリン採血)得られたヒト血漿から遠心分離によって得られたLDL分画を分注して、4 $^{\circ}$ Cで1時間放置する。その後、0.05%のTween

20-TBS (NaCl 140mM、KCl 2.7mM、25mM TrisHCl、pH7.5 pH7.4)で3回洗浄した後、ビオチン化したLOX-1に対して、ストレプトアビジン化された量子ドット(登録商標)(Qdot(登録商標)525、住商バイオサイエンス株式会社)で蛍光標識したLOX-1を加えて1時間放置後、0.05%のTween-20 TBSで3回洗浄する。その後、ウェルからの525nmの蛍光を観測して、蛍光強度に基づいて、血液中に存在する結合したLDLの量を算出する。

[実施例9]

(蛍光磁器トラップ法による変性LDLの検出)

実施例3で調製したビオチン化タグをN末端に付けたLOX-1を、ストレプトアビジンでコートされた磁器ビーズ(Dynabeads M-280 ストレプトアビジン、株式会社ベリタス)上に結合させる。ヘパリン採血で得られたヒト血漿から遠心分離によって得られたLDL分画を100 μ Lに対して、磁器ビーズと結合したLOX-1タンパク質を10 μ L添加して、1時間4 $^{\circ}$ Cで放置する。磁器ビーズを磁石で固定化し、0.05%のTween20-TBS (NaCl 140mM、KCl 2.7mM、25mM TrisHCl、pH7.5 pH7.4)で3回洗浄した後、ビオチン化したLOX-1に対して、ストレプトアビジン化された量子ドット(登録商標)(Qdot(登録商標)525、住商バイオサイエンス株式会社)で蛍光標識したLOX-1を加えて1時間放置後、再度0.05%のTween-20 TBSで3回洗浄する。洗浄後の磁器ビーズからの525nmの蛍光を観測して、蛍光強度に基づいて、血液中に存在する結合したLDLの量を算出する。

[実施例10]

(表面プラズモン共鳴法(SPR)によるLOX-1蛋白質のリガンド結合アッセイ)

LOX-1のリガンドであるアセチル化LDLをLDL抗体でSPRチップ上に固定化し、そこにLOX-1タンパク質を流し、それにより生じるSPRシグナルを観測することでLOX-1のアセチル化LDLに対する結合活性を調べた。SPR測定装置にはBiacore社製Biacore2000システムを用いた。

ヤギ抗ApoB抗体(Rockland社製)をBiacore社製CM3チップにアミンカップリング法を用いて固定化し、そこにアセチル化LDL(Molecular probes社)を添加して抗体に結合させた。CM3チップへのアセチル化LDLの結合量は3,000 Response Unit程度になるよう添加量を調節した。その後、測定用緩衝液(10mM HEPES、pH7.5、150mM NaCl)でチップを平衡化し、同じ緩衝液に懸濁したLOX-1細胞外ドメインおよびLOX-1 CTLD(蛋白質濃度は10nM~20 μ M)を流速20 μ l/minで加え、SPRシグナルを観測した。得られたデータを基にBIAevaluationソフトウェア(Biacore社)を用いて反応速度定数を算出した。

センサーグラムの結果と、算出されたKaおよびKdの値を図7に記載する。

LOX-1細胞外ドメインのアセチル化LDLに対する結合定数は、天然のLOX-1の場合とほぼ同程度であることから、本発明のリフォールディング方法によってリフォールディング方法されたタンパク質は、天然のタンパク質と実質的に同一の構造を有すると考えられる。

CTLDをセンサー上に固定化した場合、CTLDとアセチル化LDLとの結合が観察された。この結合能は、LOX-1とアセチル化LDLとの結合の場合と同程度であった。逆に、アセチル化LDLを固定化した場合には、CTLDとアセチル化LDLとの結合が観察されなかった。この結果から、以下のことが理解できる。

LOX-1細胞外ドメインは溶液中では、SS結合で結ばれた二量体構造をとるが、CTLD単独では溶液中で単量体として存在している。

従って、LOX-1のCTLDをセンサー上に固定化した場合に、CTLDとアセチル化LDLとの結合が観察されたのは、センサー上でCTLDが周密化することにより、CTLDが、LOX-1細胞外ドメインと同様に二量体を形成したことが理由であると考えられる。これに対して、溶液中ではCTLDは単量体として存在するため、アセチル化L

DLに結合しなかったものと考えられる。従って、これらの結果から、アセチル化LDLへの結合にはCTLDが二量体化することが必須であるといえる。

細胞外領域全長はSS結合により安定なホモ二量体を形成しており、アセチル化LDLに対する結合活性を示すが、その結合活性は、細胞上に存在するLOX-1よりも低い。一方、既に説明したように、CTLDのアセチル化LDLへの結合には、CTLDの二量体化が必須であるが、その結合活性は、ただ単にCTLDが二量体化するだけでは十分ではなく、ただ単に二量体化したCTLDの結合能は、細胞上に存在するLOX-1の結合能に比べて、4桁程度低い。これらのことから細胞上ではLOX-1細胞外ドメインどうしがさらに会合して共同的にアセチル化LDLに結合するものと考えられる。実際に細胞上でLOX-1は最低4分子からなる(二量体×2)会合体を形成していることがわかって

10

ている。従って、これらの実験結果から、血液中の酸化LDL含量測定、酸化LDLの血液からの除去、ワクチン利用などの応答を想定した場合、単量体としてのCTLDは、アセチル化LDLに対する結合能を有さないため、使用することができないこと、および、今回のリフォールディングで得られる二量体構造が最低の単位として必要であることが示される。

しかしながら、溶液中では単量体であるCTLDであっても、または、細胞上に存在するLOX-1よりも低い結合能を示すLOX-1の細胞外領域全長であっても、SPRセンサーのような基盤に周密化状態で固定化することによって、天然のLOX-1と同等の結合能を示す。

20

【発明の効果】

本発明のリフォールディング方法によって、高純度かつ均質なリフォールディングタンパク質を得ることが可能となった。また、本発明のリフォールディング方法によって得られたタンパク質を用いることによって、高感度の受容体チップの作製が可能となる。また、本発明のリフォールディング方法によって得られたタンパク質を用いることによって、非特異的結合を従来よりも低減したりリガンド除去材料を提供することが可能となる。

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。当業者は、本発明の具体的な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施

30

することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Biomelecular Engineering Research Institute

<120> A NOVEL METHOD FOR REFOLDING AND PROTEIN OBTAINED THEREBY

<130>

10

<150>

<151>

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

20

<211> 639

<212> DNA

<213> Homo sapiens aortic endothelial cell

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(639)

<223>

30

<400> 1

tcc cag gtg tct gac ctc cta aca caa gag caa gca aac cta act cac	48
Ser Gln Val Ser Asp Leu Leu Thr Gln Glu Gln Ala Asn Leu Thr His	
1 5 10 15	

cag aaa aag aaa ctg gag gga cag atc tca gcc cgg caa caa gca gaa	96
Gln Lys Lys Lys Leu Glu Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln Gln Ala Glu	
20 25 30	

40

gaa gct tca cag gag tca gaa aac gaa ctc aag gaa atg ata gaa acc	144
Glu Ala Ser Gln Glu Ser Glu Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr	

35	40	45	
ctt gct cgg aag ctg aat gag aaa icc aaa gag caa atg gaa ctt cac			192
Leu Ala Arg Lys Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Met Glu Leu His			
50	55	60	
cac cag aat ctg aat ctc caa gaa aca ctg aag aga gta gca aat tgt			240
His Gln Asn Leu Asn Leu Gln Glu Thr Leu Lys Arg Val Ala Asn Cys			
65	70	75	10
80			
tca gct cct tgt ccg caa gac tgg atc tgg cat gga gaa aac tgt tac			288
Ser Ala Pro Cys Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu Asn Cys Tyr			
85	90	95	
cta ttt tcc tcg ggc tca ttt aac tgg gaa aag agc caa gag aag tgc			336
Leu Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys			
100	105	110	20
ttg tct ttg gat gcc aag ttg ctg aaa att aat agc aca gct gat ctg			384
Leu Ser Leu Asp Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Ala Asp Leu			
115	120	125	
gac ttc atc cag caa gca att tcc tat tcc agt ttt cca ttc tgg atg			432
Asp Phe Ile Gln Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met			
130	135	140	30
ggg ctg tct cgg agg aac ccc agc tac cca tgg ctc tgg gag gac ggt			480
Gly Leu Ser Arg Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu Asp Gly			
145	150	155	160
tct cct tlg atg ccc cac tta ttt aga gtc cga ggc gct gtc tcc cag			528
Ser Pro Leu Met Pro His Leu Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln			
165	170	175	40
aca tac cct tca ggt acc tgt gca tat ata caa cga gga gct gtt tat			576
Thr Tyr Pro Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr			

180 185 190
 gcg gaa aac tgc att tta gct gcc ttc agt ata tgt cag aag aag gca 624
 Ala Glu Asn Cys Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala
 195 200 205

aac cta aga gca cag 639
 Asn Leu Arg Ala Gln
 210

10

<210> 2
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens aortic endothelial cell

<400> 2

20

Ser Gln Val Ser Asp Leu Leu Thr Gln Glu Gln Ala Asn Leu Thr His
 1 5 10 15

Gln Lys Lys Lys Leu Glu Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln Gln Ala Glu
 20 25 30

30

Glu Ala Ser Gln Glu Ser Glu Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr
 35 40 45

Leu Ala Arg Lys Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Met Glu Leu His
 50 55 60

40

His Gln Asn Leu Asn Leu Gln Glu Thr Leu Lys Arg Val Ala Asn Cys
 65 70 75 80

Ser Ala Pro Cys Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu Asn Cys Tyr
 85 90 95

Leu Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys
 100 105 110

Leu Ser Leu Asp Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Ala Asp Leu
 115 120 125

10

Asp Phe Ile Gln Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met
 130 135 140

Gly Leu Ser Arg Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu Asp Gly
 145 150 155 160

20

Ser Pro Leu Met Pro His Leu Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln
 165 170 175

Thr Tyr Pro Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr
 180 185 190

30

Ala Glu Asn Cys Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala
 195 200 205

Asn Leu Arg Ala Gln
 210

40

<210> 3
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens aortic endothelial cell

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(393) 10
 <223>

<400> 3
 cct tgt ccg caa gac tgg atc tgg cat gga gaa aac tgt tac cta ttt 48
 Pro Cys Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu Asn Cys Tyr Leu Phe
 1 5 10 15

 tcc tcg ggc tca ttt aac tgg gaa aag agc caa gag aag tgc ttg tct 96
 Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys Leu Ser 20
 20 25 30

 ttg gat gcc aag ttg ctg aaa att aat agc aca gct gat ctg gac ttc 144
 Leu Asp Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Ala Asp Leu Asp Phe
 35 40 45

 atc cag caa gca att tcc tat tcc agt ttt cca ttc tgg atg ggg ctg 192
 Ile Gln Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu 30
 50 55 60

 tct egg agg aac ccc agc tac cca tgg ctc tgg gag gac ggt tct cct 240
 Ser Arg Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu Asp Gly Ser Pro
 65 70 75 80

 ttg atg ccc cac tta ttt aga gtc cga ggc gct gtc tcc cag aca tac 288
 Leu Met Pro His Leu Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln Thr Tyr 40
 85 90 95

cct tca ggt acc tgt gca tat ata caa cga gga gct gtt tat gcg gaa 336
 Pro Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr Ala Glu
 100 105 110

aac tgc att tta gct gcc ttc agt ata tgt cag aag aag gca aac cta 384
 Asn Cys Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu
 115 120 125

aga gca cag 393 10
 Arg Ala Gln
 130

<210> 4

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens aortic endothelial cell 20

<400> 4

Pro Cys Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu Asn Cys Tyr Leu Phe
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys Leu Ser 30
 20 25 30

Leu Asp Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Ala Asp Leu Asp Phe
 35 40 45

Ile Gln Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu 40
 50 55 60

Gly Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala
 35 40 45

Gly Lys Ala Gly Glu Gly Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ala Gly Thr Val
 50 55 60

Ser Lys Ile Leu Val Lys Glu Gly Asp Thr Val Lys Ala Gly Gln Thr
 65 70 75 80

10

Val Leu Val Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Thr Glu Ile Asn Ala Pro
 85 90 95

Thr Asp Gly Lys Val Glu Lys Val Leu Val Lys Glu Arg Asp Ala Val
 100 105 110

20

Gln Gly Gly Gln Gly Leu Ile Lys Ile Gly Asp Leu Glu Leu
 115 120 125

<210> 6

30

<211> 15

<212> PRT

<213> Synthetic

<400> 6

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 1 5 10 15

40

<210> 7

<211> 5
<212> PRT
<213> Synthetic

<400> 7

Lys Ile Gly Asp Pro
1 5

10

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Synthetic

<400> 8

20

Lys Leu Trp Ser Ile
1 5

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Synthetic

30

<400> 9

Ile Glu Gly Arg
1

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Synthetic

40

<400> 10

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 11

<211> 157

<212> PRT

<213> Synthetic

10

<400> 11

Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser Ala Gln Thr Asn Ser
1 5 10 15

20

Ile Thr Pro Ile Leu Lys Ile Thr Asn Thr Ser Asp Ser Asp Leu Asn
20 25 30

Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Thr Ser Asp Gly Thr Gln
35 40 45

30

Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser
50 55 60

Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn Phe Val Lys Glu Thr
65 70 75 80

40

Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Val Glu Phe Gly Phe Ala
85 90 95

Ser Gly Ala Ala Thr Leu Lys Lys Gly Gln Phe Ile Thr Ile Gln Gly
 100 105 110

Arg Ile Thr Lys Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Thr Gln Thr Asn Asp Tyr
 115 120 125

Ser Phe Asp Ala Ser Ser Ser Thr Pro Val Val Asn Pro Lys Val Thr
 130 135 140

10

Gly Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Val Leu Gly Thr Ala Pro
 145 150 155

<210> 12

20

<211> 26

<212> PRT

<213> Synthetic

<400> 12

Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg
 1 5 10 15

30

Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu
 20 25

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

40

【図3】

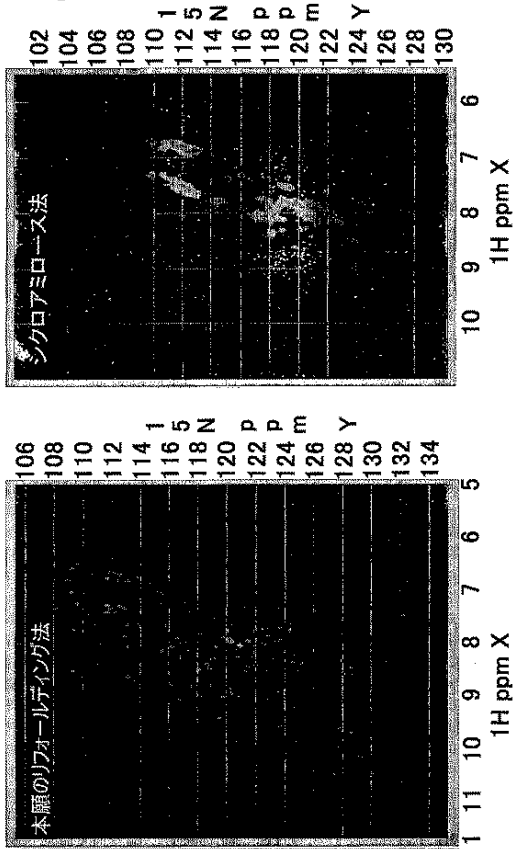


図3

【図5】

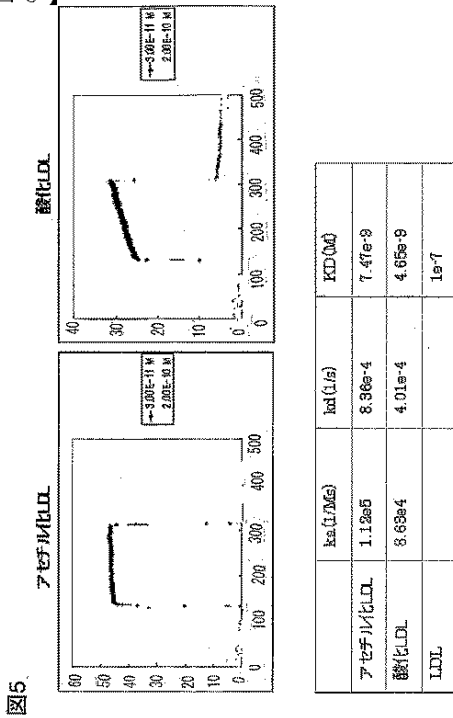


図5

【図4】

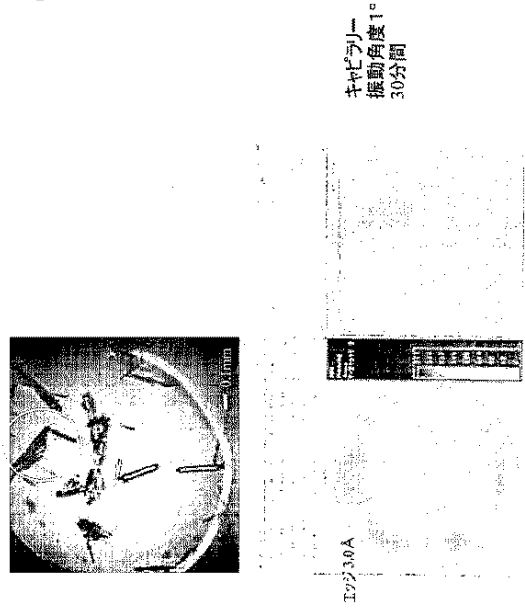


図4

【図6】

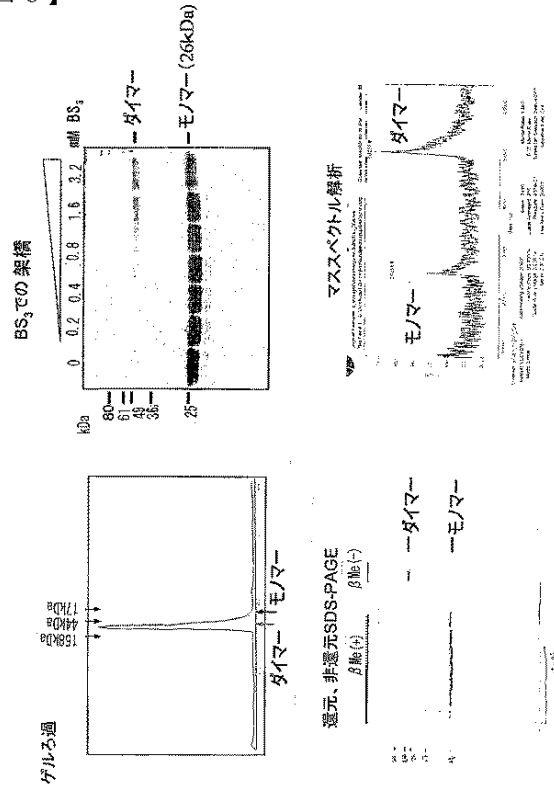
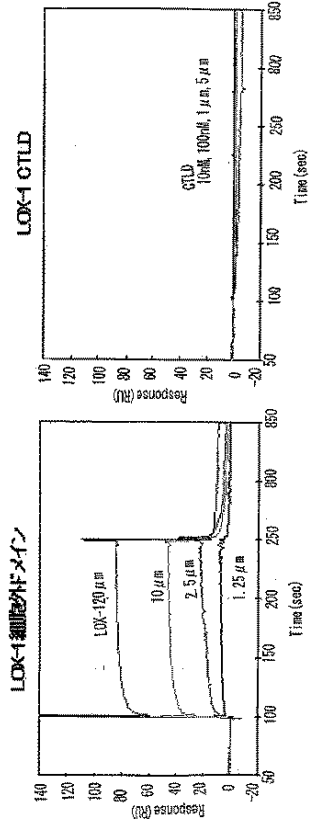


図6

【図7】

図7



KA (1/M)	KD (M)
LOK-1 細胞表面分析	3.8×10^{-5}
LOK-1 OTLD	N.D. ($< 5 \times 10^{-5}$)

N.D.: not detected

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014801

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C12N15/09, C07K1/00, C07K14/705, C12P21/02, C12Q1/68, G01N33/50, A61K38/00		
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) Int.Cl. ⁷ C12N15/00-15/90, C12N1/00-9/99, C12Q1/00-70, G01N33/00-98, C07K1/00-19/00, A61K31/00-48/00		
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) WPI (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), SwissProt/PIR/Geneseq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 10-234386 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 08 September, 1998 (08.09.98), (Family: none)	1-10, 12, 17-21, 25-28/ 11, 13-16, 22-24, 29-46
X/Y	JP 10-191989 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 28 July, 1998 (28.07.98), (Family: none)	1-10, 12, 17-21, 25-28/ 11, 13-16, 22-24, 29-46
Y	JP 10-082793 A (BASF AG.), 31 March, 1998 (31.03.98), & EP 829722 A2	34-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&"	document member of the same patent family
"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		
Date of the actual completion of the international search 19 January, 2005 (19.01.05)	Date of mailing of the international search report 22 February, 2005 (22.02.05)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014801

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 02/54070 A1 (SHANGHAI HEALTH DIGIT LTD.), 11 July, 2002 (11.07.02), & JP 2004-516489 A & EP 1348961 A1 & US 2003/0228631 A1	34-46
Y	Frankel A.E. et al., "High-level expression and purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DTGM for PHASE I clinical trials.", Protein Expr.Purif., Vol.16, No.1, (1999), pages 190 to 201	1-46
Y	Kreitman R.J. et al., "Purification and characterization of IL6-PE4E, a recombinant fusion of interleukin 6 with Pseudomonas exotoxin.", Bioconjug.Chem., Vol.4, No.6, (1993), pages 581 to 585	1-46

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2004/014801
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)). Int.Cl ⁷ C12N 15/09, C07K 1/00, C07K 14/705, C12P 21/02, C12Q 1/68, G01N 33/50, A61K 38/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12N 15/00 ~ 15/90, C12N 1/00 ~ 9/99, C12Q 1/00 ~ 70, G01N 33/00 ~ 98, C07K 1/00 ~ 19/00, A61K 31/00 ~ 48/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	JP 10-234386 A (武田薬品工業株式会社) 1998.09.08 (ファミリーなし)	1-10, 12, 17-21, 25-28 /11, 13-16, 22-24, 29-46
X/Y	JP 10-191989 A (武田薬品工業株式会社) 1998.07.28 (ファミリーなし)	1-10, 12, 17-21, 25-28 /11, 13-16, 22-24, 29-46
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 19. 01. 2005	国際調査報告の発送日 22. 2. 2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 齊藤真由美	4B 8931
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2004/014801
C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 10-082793 A (BASF AG.) 1998.03.31 & EP 829722 A2	34-46
Y	WO 02/54070 A1 (SHANGHAI HEALTH DIGIT LTD.) 2002.07.11 & JP 2004-516489 A & EP 1348961 A1 & US 2003/0228631 A1	34-46
Y	Frankel AE, et al., " High-level expression and purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DTGM for PHASE I clinical trials. " Protein Expr Purif., Vol.16, No.1, (1999), p.190-201	1-46
Y	Kreitman RJ, et al., " Purification and characterization of IL6-PE4E, a recombinant fusion of interleukin 6 with Pseudomonas exotoxin." Bioconjug. Chem., Vol.4, No.6, (1993), p.581-585.	1-46

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53		Y	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 37/02			
B 0 1 J 20/24 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1		
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	B 0 1 J 20/24		C	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 P 21/02		C	
	C 1 2 N 15/00		A	

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

(出願人による申告)「国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成15年度新エネルギー・産業技術総合開発機構 基盤技術研究促進事業(民間基盤技術研究支援制度)プロテインネットワーク/超分子複合体機能構造の解析と制御による創薬等産業基盤技術の開発)委託研究、産業活力再生特別処置法 第30条の適用を受けるもの」

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ02 QQ06 QQ08 QQ79 QR48 QR82 QS32
 4B064 AG01 AG20 CA02 CA19 CC07 CC08 CC24 CD12 CD13 CD30
 DA01 DA13
 4C084 AA02 DC50 NA14 ZA451
 4G066 AC03B AE14A AE14D CA54 DA12
 4H045 AA20 AA30 BA05 CA40 DA50 EA23 EA50 FA65 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の1第1項(実用新案法第48条の1第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	新的重折叠方法和通过该方法获得的蛋白质		
公开(公告)号	JPWO2005033307A1	公开(公告)日	2006-12-14
申请号	JP2005514502	申请日	2004-09-30
申请(专利权)人(译)	技术研究组合 生物分子工学研究所		
[标]发明人	大木出 楯真一		
发明人	大木 出 楯 真一		
IPC分类号	C07K1/02 C07K14/705 C12Q1/04 G01N33/543 G01N33/53 A61K38/00 A61P9/10 B01J20/24 C12P21/02 C12N15/09 C07K1/113 C07K5/103 C07K7/06		
CPC分类号	C07K7/06 A61K38/00 C07K1/1136 C07K5/101		
FI分类号	C07K1/02.ZNA C07K14/705 C12Q1/04 G01N33/543.595 G01N33/53.W G01N33/53.Y A61K37/02 A61P9/10.101 B01J20/24.C C12P21/02.C C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR82 4B063/QS32 4B064/AG01 4B064/AG20 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC07 4B064/CC08 4B064/CC24 4B064/CD12 4B064/CD13 4B064/CD30 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA451 4G066/AC03B 4G066/AE14A 4G066/AE14D 4G066/CA54 4G066/DA12 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA05 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA23 4H045/EA50 4H045/FA65 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	2003342645 2003-09-30 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种用于制备比常规方法更高纯度和同质性的蛋白质的重折叠方法，以及通过这种重折叠方法制备的蛋白质。根据本发明，提供了一种重折叠变性蛋白例如溶解的包涵体的方法，该方法包括：提供了包括滴加步骤的方法以及通过这种方法制备的蛋白质，以及包含此类蛋白质的药物组合物。

【图1】

