

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503344

(P2005-503344A)

(43) 公表日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
CO7K 7/08	CO7K 7/08 ZNA	2GO45
C12N 7/00	C12N 7/00	4BO65
GO1N 33/15	GO1N 33/15 Z	4HO45
GO1N 33/50	GO1N 33/50 Z	
GO1N 33/53	GO1N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 231 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-583585 (P2002-583585)	(71) 出願人	502352519 ダイアックス コーポレーション アメリカ合衆国 02139 マサチュー セッツ州, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 300, 8ティーエイチ フロ アー
(86) (22) 出願日	平成14年4月18日 (2002.4.18)	(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月16日 (2003.10.16)	(72) 発明者	ロンドン, イサク, ジェズス アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 116 ボストン, アパートメント ナン バー3, セント ボトルフ ストリート 90
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/012492		
(87) 国際公開番号	W02002/086070		
(87) 国際公開日	平成14年10月31日 (2002.10.31)		
(31) 優先権主張番号	60/284,534		
(32) 優先日	平成13年4月18日 (2001.4.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Fc領域ポリペプチドの結合分子

(57) 【要約】

免疫グロブリンFc領域ポリペプチドを検出または単離するための結合分子、およびその使用方法が記載される。好ましいFc領域結合ポリペプチド、Fc領域結合ポリペプチドを発現する組換えバクテリオファージ、および該ポリペプチドを示す分離媒体が特に開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I、II、III または IV :

I. $Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-W-C-Z_2$ (配列番号 : 4) ;

式中、

Z_1 は、少なくとも 6 アミノ酸のポリペプチドである ;

X_1 は、G、H、N、R、または S である ;

X_2 は、A、D、E、F、I、M、または S である ;

X_3 は、A、I、L、M、または V である ;

X_4 は、I、M、T、または V である ;

Z_2 は、少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在しない ; および

Z_1 は、少なくとも 1 つのシステイン残基を含み、不変なシステイン残基とのジスルフィド結合の形成により 12 アミノ酸の環状ペプチドが形成される ;

II. $Z_1-X-W-Z_2-W-Z_3$ (配列番号 : 5)

式中、

Z_1 は、少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在しない ;

X は、F または Y である ;

Z_2 は、トリペプチドである ; および

Z_3 は、少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドである ; および

ここで、ポリペプチド Z_1 、 Z_2 、 Z_3 の内の少なくとも 2 つは、システイン残基を含み、システイン残基間のジスルフィド結合の形成により 7 ~ 12 アミノ酸の環状ペプチドを形成する ;

III. $Z_1-W-Z_2-W-W-Z_3$ (配列番号 : 6) ;

式中、

Z_1 は、少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドである ;

Z_2 は、トリペプチドである ; および

Z_3 は、少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドである ;

ここで、ポリペプチド Z_1 、 Z_2 、および Z_3 の内の少なくとも 2 つは、システイン残基を含み、かかるシステイン残基間のジスルフィド結合の形成により 8 ~ 12 アミノ酸の環状ペプチドが形成されるが、ただし、 Z_1 はシステインを含む場合、 Z_2 はシステインを含まず、 Z_2 がシステインを含む場合、これはトリペプチドの中央の残基であり、 Z_3 もまたシステインを含む ;

IV. $Z_1-P-X_1-W-X_2-C-X_3-X_4-X_5$ (配列番号 : 7) ;

式中、

Z_1 は、少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドであり、システイン残基を含む ;

X_1 は、A、E、R、S、または T である ;

X_2 は、F、W、または Y である ;

X_3 は、D、E、L、M、または Q である ;

X_4 は、H、W、または Y である ;

X_5 は、F または Y である ; および

ここで、 Z_1 のシステイン残基および X_2 と X_3 との間のシステイン残基は、10 ~ 12 アミノ酸の環状ペプチドを形成する ;

の アミノ酸配列を含む、免疫グロブリン Fc 領域に結合する単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

(a) 該ポリペプチドが式 :

I. $Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-W-C-Z_2$ (配列番号 : 4) ;

式中、

X_1 は、G である ;

X_2 は、A または E である ;

X_3 は、L である ;

10

20

30

40

50

X_4 は、I または V である；

のアミノ酸配列を含むか、または

(b) 該ポリペプチドが式：

II. $Z_1-X-W-Z_2-W-Z_3$ (配列番号：5)

式中、

X は、F または Y である；および

ここで、 Z_2 は式： $X_1-X_2-X_3$ のペプチドであり、式中、

X_1 は、C または Y である；

X_2 は、C、K、N、または T であり、ただし、 X_1 が C である場合、 X_2 は C ではない、および

X_3 は、F、I、K、Q、または V である

のアミノ酸配列を含む請求項 1 記載のポリペプチド。

10

【請求項 3】

以下：

R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:14)

W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:15)

S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (配列番号:16)

L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-G-S	(配列番号:17)	
P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L	(配列番号:18)	
L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L	(配列番号:19)	
W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H	(配列番号:20)	
D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H	(配列番号:21)	
W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L	(配列番号:22)	
C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H	(配列番号:23)	
R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H	(配列番号:24)	
L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D	(配列番号:25)	10
D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-M-W-C-D-N-H	(配列番号:26)	
P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-I-L-V-W-C-S-G-H	(配列番号:27)	
S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-I-W-C-S-A-N	(配列番号:28)	
F-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-L-I-W-C-S-S-F	(配列番号:29)	
H-D-L-C-A-Q-A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R	(配列番号:30)	
P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L	(配列番号:31)	
P-L-D-C-A-R-D-I-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G	(配列番号:32)	
G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W	(配列番号:33)	20
W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L	(配列番号:34)	
S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F	(配列番号:35)	
D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H	(配列番号:36)	
R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-H-Y	(配列番号:37)	
W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-V-W-C-P-Y-L	(配列番号:38)	
G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F	(配列番号:39)	
A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F	(配列番号:40)	
W-W-N-C-H-N-G-W-T-W-T-G-G-W-C-W-W-F	(配列番号:41)	
Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-I-W-C-E-A-F	(配列番号:42)	30
N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L	(配列番号:43)	
Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-S-R	(配列番号:44)	
Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S	(配列番号:45)	
Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y	(配列番号:46)	
N-Y-W-C-N-V-W-L-L-G-D-V-C-R-S-H	(配列番号:47)	
L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P	(配列番号:48)	

Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D	(配列番号:49)	
D-D-H-C-Y-W-F-R-E-W-F-N-S-E-C-P-H-G	(配列番号:50)	
N-Y-W-C-N-I-W-G-L-H-G-C-N-S-H	(配列番号:51)	
Y-W-F-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D	(配列番号:52)	
H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R	(配列番号:53)	
S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N	(配列番号:54)	
F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D	(配列番号:55)	
Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q	(配列番号:56)	10
S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S	(配列番号:57)	
K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N	(配列番号:58)	
Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N	(配列番号:59)	
K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S	(配列番号:60)	
K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S	(配列番号:61)	
K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-E	(配列番号:62)	
H-F-W-C-E-V-W-G-L-C-P-S-I	(配列番号:63)	
Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V	(配列番号:64)	20
A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E	(配列番号:65)	
K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N	(配列番号:66)	
Q-Y-W-C-N-V-W-G-V-C-L-P-S	(配列番号:67)	
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P	(配列番号:68)	
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q	(配列番号:69)	
Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y	(配列番号:70)	
T-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-P-H-N	(配列番号:71)	
F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P	(配列番号:72)	30
G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E	(配列番号:73)	
R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D	(配列番号:74)	
K-F-W-C-T-I-W-G-V-C-H-M-P	(配列番号:75)	
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P	(配列番号:76)	
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q	(配列番号:77)	
F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D	(配列番号:78)	
H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S	(配列番号:79)	
H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D	(配列番号:80)	40

- H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-I-N (配列番号:81)
 R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A (配列番号:82)
 S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (配列番号:83)
 Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R (配列番号:84)
 Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D (配列番号:85)
 E-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R (配列番号:86)
 K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q (配列番号:87)
 K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T (配列番号:88)
 R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N (配列番号:89)
 N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H (配列番号:90)
 Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M (配列番号:91)
 A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G (配列番号:92)
 K-Y-W-C-K-F-W-G-L-E-C-K-V-G (配列番号:93)
 N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K (配列番号:94)
 S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H (配列番号:95)
 E-Y-W-C-R-I-W-G-L-Q-C-N-M-V (配列番号:96)
 K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (配列番号:97)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (配列番号:98)
 F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S (配列番号:99)
 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T (配列番号:100)
 K-Y-W-C-K-R-W-G-L-M-C-N-G-G (配列番号:101)
 A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W (配列番号:102)
 K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (配列番号:103)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S (配列番号:104)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (配列番号:105)
 L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D (配列番号:106)
 T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T (配列番号:107)
 T-Y-W-C-T-F-W-E-L-P-C-D-P-A (配列番号:108)
 K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-E-V (配列番号:109)
 N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q (配列番号:110)
 T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D (配列番号:111)
 N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L (配列番号:112)

10

20

30

F-W-Y-C-Y-W-F-N-E-K-C-K-T-P	(配列番号:113)	
G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G	(配列番号:114)	
P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F	(配列番号:115)	
E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M	(配列番号:116)	
H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T	(配列番号:117)	
E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F	(配列番号:118)	
N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L	(配列番号:119)	
Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S	(配列番号:120)	10
Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S	(配列番号:121)	
Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y	(配列番号:122)	
Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H	(配列番号:123)	
A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Y-Q-W-F-C-T-D-S	(配列番号:124)	
Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R	(配列番号:125)	
Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T	(配列番号:126)	
D-W-Q-C-L-W-W-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L	(配列番号:127)	
F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D	(配列番号:128)	
N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H	(配列番号:129)	20
S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F	(配列番号:130)	
S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L	(配列番号:131)	
S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y	(配列番号:132)	
S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y	(配列番号:133)	
G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y	(配列番号:134)	
D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y	(配列番号:135)	
Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F	(配列番号:136)	
N-P-M-C-W-R-A-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H	(配列番号:186)	
N-P-M-C-W-R-A-H-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H	(配列番号:187)	30
E-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H	(配列番号:188)	
A-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H	(配列番号:189)	
T-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H	(配列番号:190)	
E-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H	(配列番号:191)	
V-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H	(配列番号:192)	
S-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H	(配列番号:194)	
E-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H	(配列番号:195)	40
A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H	(配列番号:196)	
T-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H	(配列番号:197)	
E-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H	(配列番号:198)	
V-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H	(配列番号:199) および	
G-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H	(配列番号:200)	

からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む請求項1記載のポリペプチド。

【請求項4】

以下：

RRACSRDWSGALVWCAGH (配列番号:14);
DHMCVYTTWGELIWCDNH (配列番号:36);
KYWCSFWGLQCKT (配列番号:88);
PVDCKHHFWWCYWN (配列番号:141);
DDHCYWFREWFNSECPHG (配列番号:50);
YYWCNYWGLCPDQ (配列番号:56);
PHNCDDHYWYCKWF (配列番号:115);
SYWCKIWDVCPQS (配列番号:57);
KYWCNLWGVCPAN (配列番号:58);
AATCSTSYWYYQWFCTDS (配列番号:124);
TYWCTFWELPCDPA (配列番号:108);
YWYCWFPDRPECPY (配列番号:143);
SWVCWKAKWWEDKRCAPF (配列番号:130);
NPMCWKKSWWEDAYCINH (配列番号:129);
SWNCAFHHNEMVWCDDG (配列番号:142);
Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:144);
Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:146);
Ac-AGPVDCKHHFWWCYWNGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:153);
Ac-GDDDH CYWFREWFNSECPHGEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:154);
Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:145);
Ac-AGYYWCNYWGLCPDQGTGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:155);
Ac-AGPHNCDDHYWYCKWFPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:150);
Ac-AGSYWCKIWDVCPQSPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:147);

10

20

Ac-AGKYWCNLWGVCPANPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:148);
 Ac-AGAATCSTSYWYYQWFCTDSPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:151);
 Ac-AGTYWCTFWELPCDPAPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:149);
 Ac-AGYWYCWFPDRPECPLYPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:152);
 Ac-GDSWVCWKAKWWEDKRCAPFGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:156);
 Ac-GDNPMCWKKSWWEDAYCINHGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:157);
 Ac-GDSWNCAFHHNEMVWCDDGGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:158);
 Ac-GDWGECTVTSYGELIWCGLLEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:159);
 Ac-GDNPMCWRRASWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:160);
 Ac-GDNPMCWRAHWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:161);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEG-X-NH₂ (配列番号:162);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDNHEPG-X-Su-X-NH₂ (配列番号:163);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDNHEPG-X-Z-X-NH₂ (配列番号:164);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDN-X-NH₂ (配列番号:165);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDN-X-Su-X-NH₂ (配列番号:166);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDN-X-Z-X-NH₂ (配列番号:167);
 Ac-DHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:169);
 Ac-EHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:170);
 Ac-ACVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:171);
 Ac-TCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:172);
 Ac-ECVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:173);
 Ac-VCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:174);
 Ac-[Nle]CVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:175);
 Ac-CVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:176);
 Ac-SRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:177);
 Ac-RRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:178);
 Ac-ERACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:179);
 Ac-ACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:180);
 Ac-TCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:181);
 Ac-ECSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:182);
 Ac-VCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:183);
 Ac-GCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:184); および
 Ac-CSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:185),

10

20

30

式中、Ac-はN-末端アセチル化を表す；-NH₂はC末端アミド化を表す；[Nle]はノルロイシンを表す；-X-NH₂はC末端基-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂を表す；-X-Su-X-NH₂はC末端基-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C:O-CH₂CH₂-C:O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂を表す；および-X-Z-X-NH₂はC末端基-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C:O-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C:O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂を表す

40

からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む請求項1記載のポリペプチド。

【請求項5】

免疫グロブリンFc領域に結合する、以下：

F-C-N-C-W-G-S-H-E-F-T-F-C-V-D-D (配列番号:137)
 P-G-W-C-Y-S-D-I-W-G-F-K-H-F-C-N-L-D (配列番号:138)
 D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-F-P (配列番号:139)
 R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V (配列番号:140)
 P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N (配列番号:141)
 S-W-N-C-A-F-H-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G (配列番号:142)
 Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-E-C-P-L-Y (配列番号:143),

からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

10

【請求項 6】

少なくとも 1 つの免疫グロブリン Fc 領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を含むと思われる溶液中の少なくとも 1 つの免疫グロブリン Fc 領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を検出する方法であって、

(a) 該溶液と請求項 1 または請求項 5 記載のポリペプチドとを接触させる工程；および
 (b) 該ポリペプチドと該ポリペプチド標的との間で結合が生じるかどうか決定する工程を含む、方法。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの免疫グロブリン Fc 領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を含む溶液中の少なくとも 1 つの免疫グロブリン Fc 領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を単離

20

する方法であって、
 (a) 請求項 1 または請求項 5 記載の結合性ポリペプチドを固相支持体に固定化することにより、または該結合性ポリペプチドとアフィニティータグとを結合させることにより請求項 1 または請求項 5 記載の結合性ポリペプチドを調製する工程；
 (b) 該ポリペプチド標的を含む溶液と工程 (a) の結合性ポリペプチドとを接触させる工程；および
 (c) 該溶液の非結合成分と工程 (b) の結合性ポリペプチドとを分離する工程を含む、方法。

【請求項 8】

少なくとも 1 つの免疫グロブリン Fc 領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を含む溶液から少なくとも 1 つの免疫グロブリン Fc 領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を除去

30

する方法であって、
 (a) 請求項 1 または請求項 5 記載の結合性ポリペプチドを固相支持体に固定化することによりまたは該結合性ポリペプチドをアフィニティータグに結合することにより請求項 1 または請求項 5 記載の結合性ポリペプチドを調製する工程；
 (b) 該ポリペプチド標的を含有する溶液と工程 (a) により調製された結合ポリペプチドとを接触させる工程；および
 (c) 該溶液の非結合成分と工程 (b) 記載の結合性ポリペプチドとを分離する工程を含む、方法。

【請求項 9】

(a) Fc 領域ポリペプチドを含むポリペプチド標的を含むと思われる溶液と標的ポリペプチド標的のための結合分子とを接触させる工程、ここで結合分子は固相支持体に固定化される、

40

(b) 固相支持体に結合した標的と溶液の未結合成分とを分離する工程、
 (c) 固相支持体と、検出可能に標識された請求項 1 または請求項 5 記載の Fc 結合性ポリペプチドとを接触させる工程、および
 (d) 固相支持体上の標識 Fc 結合性ポリペプチドの結合を検出する工程を含む、Fc 領域ポリペプチドを含有するポリペプチド標的の固相検出アッセイ方法。

【請求項 10】

前記溶液が、全血、血漿、トランスジェニックミルク、トランスジェニック鳥類の卵、お

50

よび馴化培地からなる群より選ばれる請求項 6、7、8 または 9 いずれか記載の方法。

【請求項 1 1】

溶液がトランスジェニックマウス、ラット、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、または雌ウシから得られるトランスジェニックミルクである請求項 1 0 記載の方法。

【請求項 1 2】

溶液がトランスジェニックニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、ダチョウ、またはガチョウから得られる卵である請求項 1 0 記載の方法。

【請求項 1 3】

前記ポリペプチド標的が Fc 領域の全てもしくは一部を含む抗体または抗フラグメントでありうる請求項 6、7、8 いずれか記載の方法。

10

【請求項 1 4】

前記ポリペプチド標的が抗体である請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記抗体が、ヒト IgG1、IgG2、IgG3、および IgG4 からなる群より選ばれる免疫グロブリンである請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記固相支持体が、セルロース、規則的細孔ガラス、シリカ、ポリスチレン、スチレンジビニルベンゼン、アガロース、および架橋アガロースからなる群より選ばれる請求項 7、8 または 9 いずれか記載の方法。

【請求項 1 7】

免疫グロブリン Fc 領域に結合しうる外来ポリペプチドを発現する組換えバクテリオファージであって、該外来ポリペプチドが式 I、II、III または IV :

20

I. $Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-W-C-Z_2$ (配列番号: 4) ;

式中、

Z_1 は、少なくとも 6 つのアミノ酸のポリペプチドである ;

X_1 は、G、H、N、R、または S である ;

X_2 は、A、D、E、F、I、M、または S である ;

X_3 は、A、I、L、M、または V である ;

X_4 は、I、M、T、または V である ;

Z_2 は、少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在しない ; および

30

Z_1 は、少なくとも 1 つのシステイン残基を含み、不変なシステイン残基とのジスルフィド結合の形成により 12 アミノ酸の環状ペプチドが形成される ;

II. $Z_1-X-W-Z_2-W-Z_3$ (配列番号: 5)

式中、

Z_1 は、少なくとも 1 つのアミノ酸であるか、または存在しない ;

X は、F または Y である ;

Z_2 は、トリペプチドである ; および

Z_3 は、少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドである ; および

ここで、ポリペプチド Z_1 、 Z_2 、および Z_3 の内の少なくとも 2 つは、システイン残基を含み、かかるシステイン残基間のジスルフィド結合の形成は、7 ~ 12 アミノ酸の環状ペプチドを形成する ;

40

III. $Z_1-W-Z_2-W-W-Z_3$ (配列番号: 6)

式中、

Z_1 は、少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドである ;

Z_2 は、トリペプチドである ;

Z_3 は、少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドである ;

ここで、ポリペプチド Z_1 、 Z_2 、および Z_3 の内の少なくとも 2 つは、システイン残基を含み、かかるシステイン残基間のジスルフィド結合の形成により 8 ~ 12 アミノ酸の環状ペプチドが形成されるが、ただし、 Z_1 がシステインを含む場合、 Z_2 はシステインを含まず、 Z_2 がシステインを含む場合、これはトリペプチドの中央の残基であり、 Z_3 はまたシステインを

50

含む；

IV. Z_1 -P- X_1 -W- X_2 -C- X_3 - X_4 - X_5 (配列番号：7)；

式中、

Z_1 は、少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドであり、システイン残基を含む；

X_1 は、A、E、R、S、またはTである；

X_2 は、F、W、またはYである；

X_3 は、D、E、L、M、またはQである；

X_4 は、H、W、またはYである；

X_5 は、FまたはYである；および

ここで、 Z_1 のシステイン残基および X_2 と X_3 との間のシステイン残基は、10～12アミノ酸の環状ペプチドを形成する；

のいずれかのアミノ酸配列を含む組換えバクテリオファージ。

【請求項18】

該外来ポリペプチドが式：

Z_1 - X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -W-C- Z_2 (配列番号：4)；

式中、

X_1 は、Gである；

X_2 は、AまたはEである；

X_3 は、Lである；

X_4 は、IまたはVである；

のアミノ酸配列を含む；または

該外来ペプチドが式：

Z_1 -X-W- Z_2 -W- Z_3 (配列番号：5)

式中、

Xは、FまたはYである；ここで、 Z_2 は式： X_1 - X_2 - X_3 のペプチドである、式中、

X_1 は、CまたはYである；

X_2 は、C、K、N、またはTであるが、ただし、 X_2 がCでない場合、 X_1 はCである、および

X_3 は、F、I、K、Q、またはVである

のアミノ酸配列を含む請求項17記載の組換えバクテリオファージ。

【請求項19】

該外来ポリペプチドが、

10

30

- R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:14)
 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:15)
 S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (配列番号:16)
 L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-G-S (配列番号:17)
 P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L (配列番号:18)
 L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:19)
 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H (配列番号:20)
 D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H (配列番号:21)
 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:22)
 C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:23)
 R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:24)
 L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (配列番号:25)
 D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-M-W-C-D-N-H (配列番号:26)
 P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-I-L-V-W-C-S-G-H (配列番号:27)
 S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-I-W-C-S-A-N (配列番号:28)
 F-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-L-I-W-C-S-S-F (配列番号:29)
 H-D-L-C-A-Q-A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R (配列番号:30)
 P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L (配列番号:31)
 P-L-D-C-A-R-D-I-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G (配列番号:32)
 G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W (配列番号:33)
 W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L (配列番号:34)
 S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F (配列番号:35)

10

20

- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:36)
R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-H-Y (配列番号:37)
W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-V-W-C-P-Y-L (配列番号:38)
G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F (配列番号:39)
A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F (配列番号:40)
W-W-N-C-H-N-G-W-T-W-T-G-G-W-C-W-W-F (配列番号:41)
Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-I-W-C-E-A-F (配列番号:42)
N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (配列番号:43)
Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-S-R (配列番号:44)
Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S (配列番号:45)
Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (配列番号:46)
N-Y-W-C-N-V-W-L-L-G-D-V-C-R-S-H (配列番号:47)
L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P (配列番号:48)
Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D (配列番号:49)
D-D-H-C-Y-W-F-R-E-W-F-N-S-E-C-P-H-G (配列番号:50)
N-Y-W-C-N-I-W-G-L-H-G-C-N-S-H (配列番号:51)
Y-W-F-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D (配列番号:52)
H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R (配列番号:53)
S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N (配列番号:54)
F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D (配列番号:55)
Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q (配列番号:56)
S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (配列番号:57)
K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (配列番号:58)
Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N (配列番号:59)
K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S (配列番号:60)
K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S (配列番号:61)
K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-E (配列番号:62)
H-F-W-C-E-V-W-G-L-C-P-S-I (配列番号:63)
Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V (配列番号:64)
A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E (配列番号:65)
K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (配列番号:66)
Q-Y-W-C-N-V-W-G-V-C-L-P-S (配列番号:67)

10

20

30

H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P	(配列番号:68)	
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q	(配列番号:69)	
Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y	(配列番号:70)	
T-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-P-H-N	(配列番号:71)	
F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P	(配列番号:72)	
G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E	(配列番号:73)	
R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D	(配列番号:74)	
K-F-W-C-T-I-W-G-V-C-H-M-P	(配列番号:75)	
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P	(配列番号:76)	10
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q	(配列番号:77)	
F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D	(配列番号:78)	
H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S	(配列番号:79)	
H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D	(配列番号:80)	
H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-I-N	(配列番号:81)	
R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A	(配列番号:82)	
S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S	(配列番号:83)	
Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R	(配列番号:84)	
Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D	(配列番号:85)	20
E-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R	(配列番号:86)	
K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q	(配列番号:87)	
K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T	(配列番号:88)	
R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N	(配列番号:89)	
N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H	(配列番号:90)	
Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M	(配列番号:91)	
A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G	(配列番号:92)	
K-Y-W-C-K-F-W-G-L-E-C-K-V-G	(配列番号:93)	
N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K	(配列番号:94)	30
S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H	(配列番号:95)	
E-Y-W-C-R-I-W-G-L-Q-C-N-M-V	(配列番号:96)	
K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N	(配列番号:97)	
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S	(配列番号:98)	
F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S	(配列番号:99)	

H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T	(配列番号:100)	
K-Y-W-C-K-R-W-G-L-M-C-N-G-G	(配列番号:101)	
A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W	(配列番号:102)	
K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N	(配列番号:103)	
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S	(配列番号:104)	
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S	(配列番号:105)	
L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D	(配列番号:106)	
T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T	(配列番号:107)	
T-Y-W-C-T-F-W-E-L-P-C-D-P-A	(配列番号:108)	10
K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-E-V	(配列番号:109)	
N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q	(配列番号:110)	
T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D	(配列番号:111)	
N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L	(配列番号:112)	
F-W-Y-C-Y-W-F-N-E-K-C-K-T-P	(配列番号:113)	
G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G	(配列番号:114)	
P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F	(配列番号:115)	
E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M	(配列番号:116)	
H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T	(配列番号:117)	20
E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F	(配列番号:118)	
N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L	(配列番号:119)	
Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S	(配列番号:120)	
Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S	(配列番号:121)	
Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y	(配列番号:122)	
Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H	(配列番号:123)	
A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Y-Q-W-F-C-T-D-S	(配列番号:124)	
Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R	(配列番号:125)	
Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T	(配列番号:126)	30
D-W-Q-C-L-W-W-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L	(配列番号:127)	
F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D	(配列番号:128)	
N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H	(配列番号:129)	
S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F	(配列番号:130)	
S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L	(配列番号:131)	

S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y (配列番号:132)
 S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y (配列番号:133)
 G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y (配列番号:134)
 D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y (配列番号:135)
 Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F (配列番号:136)
 N-P-M-C-W-R-A-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (配列番号:186)
 N-P-M-C-W-R-A-H-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (配列番号:187)
 E-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:188)
 A-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:189)
 T-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:190)
 E-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:191)
 V-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:192)
 S-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:194)
 E-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:195)
 A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:196)
 T-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:197)
 E-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:198)
 V-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:199)および
 G-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:200)

10

20

からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む請求項 17 記載の組換えバクテリオファージ。

【請求項 20】

免疫グロブリンFc領域に結合可能な外来ポリペプチドを発現する組換えバクテリオファージであって、該外来ポリペプチドが以下；

F-C-N-C-W-G-S-H-E-F-T-F-C-V-D-D (配列番号:137)
 P-G-W-C-Y-S-D-I-W-G-F-K-H-F-C-N-L-D (配列番号:138)
 D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-F-P (配列番号:139)
 R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V (配列番号:140)
 P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N (配列番号:141)
 S-W-N-C-A-F-H-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G (配列番号:142)
 Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-E-C-P-L-Y (配列番号:143)

30

からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む組換えバクテリオファージ。

【請求項 21】

溶液中の少なくとも1つの免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的の検出方法であって、

40

(a) 該溶液と請求項 17 または請求項 20 記載のバクテリオファージとを接触させる工程；および

(b) 結合が該ポリペプチド標的と該バクテリオファージとの間で生じたかどうかを決定する工程

を含む、方法。

【請求項 22】

該溶液が、全血、血漿、トランスジェニックミルク、トランスジェニック鳥類の卵、および馴化培地からなる群より選ばれる請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

該ポリペプチド標的がFc領域の全てまたは一部を含む抗体または抗体フラグメントである

50

請求項 19 記載の方法。

【請求項 24】

該ポリペプチド標的が抗体である請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

該抗体が、ヒト IgG1、IgG2、IgG3、および IgG4 からなる群より選ばれる請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

該バクテリオファージがファージミドである請求項 12 記載の方法。

【請求項 27】

請求項 1、2、3、4 または 5 いずれか記載のクロマトグラフィーマトリックス物質、およびそこに固定化されたポリペプチドを含有してなる分離媒体。 10

【請求項 28】

該クロマトグラフィーマトリックス物質が、セルロース、シリカゲル型樹脂または膜、架橋多糖、およびアガロースからなる群より選ばれる請求項 27 記載の分離媒体。

【請求項 29】

該クロマトグラフィーマトリックス物質がアミン反応性クロマトグラフィーマトリックス物質である請求項 28 記載の分離媒体。

【請求項 30】

該クロマトグラフィーマトリックス物質がアルデヒド機能性メタクリレート樹脂である請求項 28 記載の分離媒体。 20

【請求項 31】

該クロマトグラフィーマトリックス物質がホルミルメタクリレート樹脂である請求項 28 記載の分離媒体。

【請求項 32】

クロマトグラフィーマトリックス物質が NHS-活性化アガロース樹脂である請求項 28 記載の分離媒体。

【請求項 33】

(a) アミン-反応性クロマトグラフィーマトリックス物質；および

(b) 以下：

- Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:144);
 Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:146);
 Ac-AGPVDCKHHFWWCYWNGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:153);
 Ac-GDDDHICYWFREWFNSECPHGEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:154);
 Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:145);
 Ac-AGYYWCNYWGLCPDQGTTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:155);
 Ac-AGPHNCDDHYWYCKWFPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:150);
 Ac-AGSYWCKIWDVCPQSPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:147);
 Ac-AGKYWCNLWGVCPANPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:148); 10
 Ac-AGAATCSTSYWYYQWFCTDSPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:151);
 Ac-AGTYWCTFWELPCDPAPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:149);
 Ac-AGYWYCWFPDRPECPLYPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:152);
 Ac-GDSWVCWKAKWWEDKRCAPFGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:156);
 Ac-GDNPMCWKKSWWEDAYCINHGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:157);
 Ac-GDSWNCAPHHNEMVWCDDGGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:158);
 Ac-GDWGECTVTSYGELIWCGGLEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:159);
 Ac-GDNPMCWRASWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:160);
 Ac-GDNPMCWRAHWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:161); 20
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEG-X-NH₂ (配列番号:162);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPG-X-Su-X-NH₂ (配列番号:163);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPG-X-Z-X-NH₂ (配列番号:164);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNH-X-NH₂ (配列番号:165);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNH-X-Su-X-NH₂ (配列番号:166);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNH-X-Z-X-NH₂ (配列番号:167);
 Ac-DHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:169);
 Ac-EHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:170); 30
 Ac-ACVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:171);
 Ac-TCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:172);
 Ac-ECVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:173);
 Ac-VCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:174);
 Ac-[Nle]CVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:175);
 Ac-CVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:176);
 Ac-SRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:177);
 Ac-RRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:178);
 Ac-ERACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:179); 40
 Ac-ACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:180);
 Ac-TCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:181);
 Ac-ECSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:182);
 Ac-VCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:183);
 Ac-GCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:184); および
 Ac-CSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:185);

式中、Ac-はN-末端アセチル化を表す；-NH₂はC末端アミド化を表す；[Nle]はノルロイシンを表す；-X-NH₂はC末端基-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂を表す；-X-Su-X-NH₂はC末端基-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C:O-CH₂CH₂-C:O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂を表す；および-X-Z 50

-X-NH₂はC末端基-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C:O-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C:O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂を表す、

からなる群より選ばれるポリペプチドの反応産物を含有してなる分離媒体。

【請求項34】

該マトリックス物質がアルデヒド-機能性メタクリレートクロマトグラフィー樹脂である請求項33記載の分離媒体。

【請求項35】

該マトリックス物質がホルミル置換エチレングリコール-メタクリレートコポリマー支持体である請求項33記載の方法。

10

【請求項36】

該マトリックス物質がNHS活性化アガロース支持体である請求項33記載の方法。

【請求項37】

少なくとも1つの免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を含む溶液から少なくとも1つの免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を分離する方法であって、

(a) 結合条件下で該溶液と請求項33に規定される分離媒体とを接触させる工程；

(b) 未結合物質を除去する工程；および

(c) 該分離媒体から結合性ポリペプチド標的を溶出させる工程を含む、方法。

【請求項38】

該ポリペプチド標的がFc領域の全てまたは一部を含む抗体または抗体フラグメントでありうる請求項37記載の方法。

20

【請求項39】

該ポリペプチド標的が抗体である請求項37記載の方法。

【請求項40】

該抗体が、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選ばれる請求項39記載の方法。

【請求項41】

少なくとも1つの免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を含む溶液から少なくとも1つの免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を除去する方法であって、

30

(a) 結合条件下で、該溶液と請求項33に規定されるような分離媒体とを接触させる工程；および

(b) 未結合物質を除去する工程を含む、方法。

【請求項42】

前記溶液が全血、血漿、トランスジェニックミルク、トランスジェニック鳥類の卵、および馴化媒体からなる群より選ばれる請求項41記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

40

本発明は、タンパク質の単離および精製の分野に関する。詳細には、本発明は、ヒト免疫グロブリンFc領域ポリペプチドに結合する分子の同定、単離、および合成に関する。かかる結合分子は、ポリペプチドの1つのドメインとして存在するFc領域を有する免疫グロブリンまたは融合タンパク等の単離されたFc領域アミノ酸配列またはポリペプチドの検出、除去、または精製に有用である。

【0002】

背景

抗体（免疫グロブリン）は、外来抗原の存在に反応してBリンパ球により産生される糖タンパク質の群であり、全ての哺乳動物の血清および組織液に存在する。各抗体分子は、本

50

質的に二機能性である：分子の一方の領域、Fabは抗原結合部位を含み、第二の領域、Fc（「結晶化可能フラグメント」）は、例えば、免疫系の種々の細胞の表面（マクロファージおよび好中球等）に位置するFcレセプターへの抗体分子の結合を容易にするエフェクター配列を含む。

【0003】

種々の免疫グロブリン、特にIgGのFc領域は、ブドウ球菌プロテインA（Eyら、*Immunochemistry*, 15:429-436 (1978)）に対する親和性を有することが示されており、この相互作用を利用してポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方を精製するためのいくつかの方法が開発された。例えば、Ngoら、米国特許第4,801,687号は、液体とアフィニティークラムに固定されたプロテインAを接触させることによる液体（例えば、血清）からのモノクローナル抗体の精製方法を記載している。Ngoらは、一価カチオンおよび多塩基アニオンの組み合わせを含む緩衝液において、IgGが高pH（7.5～10）の条件下でプロテインAとの結合複合体を形成し、低pH、すなわち、pH3～6の溶液と接触されると解離することを示した。Shadleら、米国特許第5,429,746号は、プロテインA親和性工程、続いてイオン交換工程、続いてHIC工程を利用する疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）プロトコルまたは多段階手順を用いてIgGを精製した。

10

【0004】

しかし、プロテインAは、異なる種由来のIgG間を区別しない。従って、ヒト特異的免疫グロブリンリガンドの産生のためのトランスジェニックモデルを開発するために、ヒト免疫グロブリンに特異的に結合し、トランスジェニック宿主の免疫グロブリンのいずれでもないリガンドを開発することは必須である。

20

【0005】

しかし、プロテインAの使用を必要としない他の抗体精製方法が開発されている。例えば、Craneら、米国特許第4,606,825号は、免疫グロブリンを結合し、続いてpH5.5～8.3を有する緩衝液での溶出のためにシリカゲルを利用する液体カラムクロマトグラフィー手順による生物学的液体由来のIgGの精製を記載している。Sullivanら、米国特許第4,849,352号は、ポリアクリルアミドゲルを用いるアフィニティークロマトグラフィーによるFabおよびF(ab)₂断片の精製を記載している；およびRaisonら、米国特許第5,077,391号は、固定されたC1q、補体経路に關与するタンパク質との複合体化によるIgMの精製を記載している。

【0006】

2つの逐次的イオン交換クロマトグラフィー工程または単一イオン交換工程、続いて疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）を使用するプロトコルを利用する別の抗体精製法が、Hakalahtiら、*J. Immunol. Meth.*, 117:131-136 (1989)に記載されている。

30

【0007】

しかし、これらの抗体精製法の不利な点は、多結合性ドメインタンパク質親和性リガンド、プロテインA、および/または多精製カラムを必要とすることである。例えば、Ibrahim, *Scand. J. Immunol.*, 38:368-374 (1993)は、プロテインAが総数5つの相同性ドメイン（A～E）を有し、これらのドメインの4つまでがIgGのFc領域に結合することを報告した。

【0008】

Dybwadら、*Clin. Exp. Immunol.*, 102: 438 (1995)は、ファージディスプレイライブラリーを用いてポリクローナル抗体のためのリガンドを単離する可能性を調査した。ライブラリーを、合成17マーポリペプチドに対して惹起したウサギ抗血清に接触させた。Dybwadらは、17マーペプチドに高い配列相同性を示した陽性のファージの多くの配列を報告した。Fassinara, *J. Mol. Recognit.*, 9:564 (1996)は、合成多量体ペプチドライブラリーをスクリーニングし、プロテインAとビオチン標識免疫グロブリンとの間の相互作用と競合する能力を有するプロテインA模倣ペプチドを同定した。Ehrlichら、*J. Mol. Recognit.*, 11:121-125 (1998)は、ヒト化IgG1モノクローナル抗体をペプシンで処理し、残りの抗体からpFc'フラグメントを分離した。pFc'フラグメントは、pFc'フラグメントに親和性を有するペプチドを同定するために可変長ファージディスプレイライブラリーの標的として使用され

40

50

た。

【0009】

Krookら、J. Immunol. Meth., 221:151-157 (1998)は、プロテイン A に対する可能なアナログとして直鎖10マーペプチド配列を同定するための標的として、またはプロテイン A 結合に関与しないFc分子の一部に対する親和性リガンドのためにIgG Fcを使用してデカペプチドファージディスプレイライブラリーをスクリーニングした。DeLanoら、Science, 287:1279 (2000)は、標的配列としてIgG Fcを用いて可変サイズの環状ペプチドをディスプレイするファージライブラリーをスクリーニングした。DeLanoらは、いくつかのラウンドのスクリーニング後、回収したFc領域結合ペプチドにおいて2つのポリペプチド配列、ETQRCTWHMGELVWCEREHN (配列番号: 1) およびKEASCSYWLGLVWCVAGVE (配列番号: 2) が優勢であったことを報告した。従って、DeLanoらは、共通のGELVWC (配列番号: 3) モチーフを有する2つの環状11マーを記載した。しかし、DeLanoらは、精製ヒト免疫グロブリンのクロマトグラフィー捕捉および回収を示さなかった。

10

【0010】

Fc領域ポリペプチドのための改善されたリガンドおよび改善された精製方法を提供するさらなるペプチドリガンドがなおも必要とされている。

【0011】

発明の要旨

本発明のFc領域結合分子は、(システイン間のジスルフィド結合の形成の際に)6、7、8、9、10または12アミノ酸残基を有する環状ペプチドを提供するための離れて位置する2つの不変なシステインを含む12~18アミノ酸の変化に富んだペプチドを含むファージディスプレイライブラリーを利用して単離された。新規に発見されたFc領域結合分子は、抗体Fc領域に高い特異性を有する。分離適用のために、リガンドが標的に対して $10\mu\text{M} \sim 0.01\mu\text{M}$ の範囲の親和性を有すること、および非標的物質に対して親和性が十分に低いことが好ましい。本明細書中で記載される「高親和性」は、標的物質に関して約 $10\mu\text{M} \sim 約0.01\mu\text{M}$ の範囲の K_D を有し、非標的物質に対して大いに低い親和性を有する結合部分に適用する。標的物質の回収が所望される場合、標的を変性しない条件の設定下で固定化リガンドが標的に対して無視できる親和性を有することがまた重要であり; そうでないと、固定化リガンドから標的を回収することはできない。高純度収量での迅速かつ効率的な単離の利点に加えて、本発明はまた、Fc領域ポリペプチドを含む融合タンパク質の一部として発現される目的のタンパク質の迅速な精製のためのこれらの新規ポリペプチドの使用を開示する。

20

30

【0012】

従って、本発明の目的は、ヒトFc領域ポリペプチドに対する新規結合分子を提供することである。本発明の好ましい結合分子は、標的Fc領域アミノ酸配列への結合に関する個々の特徴だけではなく、標的Fc領域結合分子の放出(溶出)に関する特異的特徴をも示す。本発明の特に好ましい結合分子は、短いポリペプチド配列であり、安定なループ構造(すなわち、環状ペプチド)により特徴づけられる。

【0013】

ファージディスプレイ技術を使用することによる本発明の結合分子の単離のための好ましい方法が本明細書中に開示される。本発明のファージディスプレイ法は、ポリペプチド結合分子のファミリーを同定するのに有用である。この技術を用いて、ヒトFc領域アミノ酸配列に親和性を示す多数の結合ペプチドが同定され、単離されている。かかる結合ペプチドは、溶液(例えば、全血、血漿、トランスジェニックミルク、トランスジェニック鳥類(ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、ダチョウ、またはガチョウ等)の卵、馴化培地(conditioned medium)など)中に存在するヒトFc領域ポリペプチドを単離されたポリペプチドとして同定し、単離し、精製するために、抗体を単離し、精製するために、およびFc領域アミノ酸配列を含むように遺伝子操作された融合タンパク質を単離し、精製するために同定するために有用である。トランスジェニックミルクは、トランスジェニックマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、および雌ウシから得られうる。

40

50

【0014】

Fc領域ポリペプチドに特異的な最も好ましい結合分子としては、2つの間のあいだ、不変なシステイン残基を含み、従ってシステイン側鎖間に形成されたジスルフィド結合により非還元条件下で環状構造を形成しうる。本発明の特異的Fc領域結合分子は、以下の4つの一般式のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む：

【0015】

I. $Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-W-C-Z_2$ (配列番号：4)；

式中、

Z_1 は少なくとも6アミノ酸のポリペプチドである；

X_1 はG、H、N、R、またはSである；

X_2 はA、D、E、F、I、M、またはSである；

X_3 は、A、I、L、M、またはVである；

X_4 は、I、M、T、またはVである；

Z_2 は、少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在しない；および

Z_1 は、少なくとも1つのシステイン残基を含み、不変なシステインとのジスルフィド結合の形成により12アミノ酸の環状ペプチドが形成される。

【0016】

II. $Z_1-X-W-Z_2-W-Z_3$ (配列番号：5)

式中、

Z_1 は、少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在しない；

Xは、FまたはYである；

Z_2 は、トリペプチドである；および

Z_3 は、少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドである；および

式中、ポリペプチド Z_1 、 Z_2 、および Z_3 の内の少なくとも2つはシステイン残基を含み、かかるシステイン残基間のジスルフィド結合の形成により7～12アミノ酸の環状ペプチドを形成する。

【0017】

前述の式IIポリペプチドにおいて、 Z_2 は式(IIA)を有することが好ましい：

$X_1-X_2-X_3$ (IIA)、

式中、

X_1 は、A、C、F、K、P、R、W、またはYである；

X_2 は、C、D、E、G、H、K、M、N、Q、R、S、T、V、またはYである；および

X_3 は、A、E、F、H、I、K、L、Q、R、S、T、V、またはYである；

ただし、 X_1 、 X_2 、および X_3 のせいぜい1つはCでありうる。好ましくは、 X_2 がCである場合、 X_1 はYである。

最も好ましくは、 X_1 はCである。

【0018】

III. $Z_1-W-Z_2-W-W-Z_3$ (配列番号：6)；

式中、

Z_1 は、少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドである；

Z_2 は、トリペプチドである；および

Z_3 は、少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドである；

式中、ポリペプチド Z_1 、 Z_2 、および Z_3 の内の少なくとも2つはシステイン残基を含み、その結果、かかるシステイン残基間のジスルフィド結合の形成により8～12アミノ酸の環状ペプチドが形成されるが、ただし、 Z_1 がシステインを含む場合、 Z_2 はシステインを含まず、 Z_2 がシステインを含む場合、これはトリペプチドの中央の残基であり、 Z_3 もまたシステインを含む。

【0019】

好ましくは、式IIIのポリペプチドに関して、 Z_1 および Z_3 の各々がシステイン残基を含む場合、 Z_1 のシステインは、不変のトリプトファン(W)に隣接し、 Z_2 の最初のアミノ酸は

10

20

30

40

50

リジンであり、Z₃の2番目のアミノ酸はアスパラギン酸(D)である。

【0020】

IV. Z₁-P-X₁-W-X₂-C-X₃-X₄-X₅ (配列番号:7)

式中、

Z₁は、少なくとも1つのポリペプチドであり、システイン残基を含む；

X₁は、A、E、R、S、またはTである；

X₂は、F、W、またはYである；

X₃は、D、E、L、M、またはQである；

X₄は、H、W、またはYである；

X₅は、FまたはYである；および

ここで、Z₁のシステイン残基およびX₂とX₃との間のシステイン残基は10~12アミノ酸の環状ペプチドを形成する。

【0021】

本発明のFc領域結合性ポリペプチドは、以下：

R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:14)

W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:15)

S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (配列番号:16)

L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-G-S (配列番号:17)

P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L (配列番号:18)

L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:19)

W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H (配列番号:20)

D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H (配列番号:21)

W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:22)

C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:23)

R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:24)

L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (配列番号:25)

D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-M-W-C-D-N-H (配列番号:26)

P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-I-L-V-W-C-S-G-H (配列番号:27)

S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-I-W-C-S-A-N (配列番号:28)

F-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-L-I-W-C-S-S-F (配列番号:29)

H-D-L-C-A-Q-A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R (配列番号:30)

P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L (配列番号:31)

P-L-D-C-A-R-D-I-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G (配列番号:32)

G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W (配列番号:33)

W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L (配列番号:34)

S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F (配列番号:35)

D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:36)

R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-H-Y (配列番号:37)

W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-V-W-C-P-Y-L (配列番号:38)

10

20

30

40

G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F (配列番号:39)
 A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F (配列番号:40)
 W-W-N-C-H-N-G-W-T-W-T-G-G-W-C-W-W-F (配列番号:41)
 Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-I-W-C-E-A-F (配列番号:42)
 N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (配列番号:43)
 Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-S-R (配列番号:44)
 Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S (配列番号:45)
 Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (配列番号:46)
 N-Y-W-C-N-V-W-L-L-G-D-V-C-R-S-H (配列番号:47)
 L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P (配列番号:48)
 Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D (配列番号:49)
 D-D-H-C-Y-W-F-R-E-W-F-N-S-E-C-P-H-G (配列番号:50)
 N-Y-W-C-N-I-W-G-L-H-G-C-N-S-H (配列番号:51)
 Y-W-F-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D (SEQ ID NO:52)
 H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R (配列番号:53)
 S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N (配列番号:54)
 F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D (配列番号:55)
 Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q (配列番号:56)
 S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (配列番号:57)
 K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (配列番号:58)
 Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N (配列番号:59)
 K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S (配列番号:60)
 K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S (配列番号:61)
 K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-E (配列番号:62)
 H-F-W-C-E-V-W-G-L-C-P-S-I (配列番号:63)
 Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V (配列番号:64)
 A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E (配列番号:65)
 K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (配列番号:66)
 Q-Y-W-C-N-V-W-G-V-C-L-P-S (配列番号:67)
 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (配列番号:68)
 R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (配列番号:69)
 Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y (配列番号:70)

10

20

30

T-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-P-H-N	(配列番号:71)
F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P	(配列番号:72)
G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E	(配列番号:73)
R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D	(配列番号:74)
K-F-W-C-T-I-W-G-V-C-H-M-P	(配列番号:75)
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P	(配列番号:76)
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q	(配列番号:77)
F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D	(配列番号:78)
H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S	(配列番号:79)
H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D	(配列番号:80)
H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-I-N	(配列番号:81)
R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A	(配列番号:82)
S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S	(配列番号:83)
Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R	(配列番号:84)
Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D	(配列番号:85)
E-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R	(配列番号:86)
K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q	(配列番号:87)
K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T	(配列番号:88)
R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N	(配列番号:89)
N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H	(配列番号:90)
Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M	(配列番号:91)
A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G	(配列番号:92)
K-Y-W-C-K-F-W-G-L-E-C-K-V-G	(配列番号:93)
N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K	(配列番号:94)
S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H	(配列番号:95)
E-Y-W-C-R-I-W-G-L-Q-C-N-M-V	(配列番号:96)
K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N	(配列番号:97)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S	(配列番号:98)
F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S	(配列番号:99)
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T	(配列番号:100)
K-Y-W-C-K-R-W-G-L-M-C-N-G-G	(配列番号:101)
A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W	(配列番号:102)

10

20

30

K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N	(配列番号:103)	
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S	(配列番号:104)	
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S	(配列番号:105)	
L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D	(配列番号:106)	
T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T	(配列番号:107)	
T-Y-W-C-T-F-W-E-L-P-C-D-P-A	(配列番号:108)	
K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-E-V	(配列番号:109)	
N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q	(配列番号:110)	
T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D	(配列番号:111)	10
N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L	(配列番号:112)	
F-W-Y-C-Y-W-F-N-E-K-C-K-T-P	(配列番号:113)	
G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G	(配列番号:114)	
P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F	(配列番号:115)	
E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M	(配列番号:116)	
H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T	(配列番号:117)	
E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F	(配列番号:118)	
N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L	(配列番号:119)	20
Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S	(配列番号:120)	
Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S	(配列番号:121)	
Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y	(配列番号:122)	
Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H	(配列番号:123)	
A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Y-Q-W-F-C-T-D-S	(配列番号:124)	
Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R	(配列番号:125)	
Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T	(配列番号:126)	
D-W-Q-C-L-W-W-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L	(配列番号:127)	
F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D	(配列番号:128)	30
N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H	(配列番号:129)	
S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F	(配列番号:130)	
S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L	(配列番号:131)	
S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y	(配列番号:132)	
S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y	(配列番号:133)	
G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y	(配列番号:134)	

D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y (配列番号:135)
 Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F (配列番号:136)
 F-C-N-C-W-G-S-H-E-F-T-F-C-V-D-D (配列番号:137)
 P-G-W-C-Y-S-D-I-W-G-F-K-H-F-C-N-L-D (配列番号:138)
 D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-F-P (配列番号:139)
 R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V (配列番号:140)
 P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N (配列番号:141)
 S-W-N-C-A-F-H-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G (配列番号:142)
 Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-E-C-P-L-Y (配列番号:143)
 N-P-M-C-W-R-A-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (配列番号:186)
 N-P-M-C-W-R-A-H-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (配列番号:187)
 E-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:188)
 A-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:189)
 T-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:190)
 E-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:191)
 V-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:192)
 [Nle]-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:193)
 S-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:194)
 E-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:195)
 A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:196)
 T-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:197)
 E-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:198)
 V-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:199) および
 G-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:200)

10

20

からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0022】

環状ポリペプチドの下流のかかるFc領域結合性ポリペプチドのN-末端および/またはC末端切断(抗体Fc領域に対する結合親和性を保持する)もまた意図される。

【0023】

さらに、本発明のフェージディスプレイ法がFc領域アミノ酸配列に特異的な結合分子のさらなるファミリーを単離するために使用されることが想定される。

【0024】

上記式の好ましいFc領域結合分子は、以下：

式Iのポリペプチド、ここで X_1 はGである； X_2 はAまたはEである； X_3 はLである；および X_4 はIまたはVである；

式IIのポリペプチド、ここでXはFまたはYである；式IIAのトリペプチドにおいて、 X_1 はCまたはYである； X_2 はC、K、NまたはTである；および X_3 はF、I、K、QまたはVであるを含む。

【0025】

溶液中の、Fc領域アミノ酸配列の単離または検出のための最も好ましい結合分子、ならびにこれらの配列を含むより大きな分子は、以下のポリペプチド：

30

40

RRACSRDWSGALVWCAGH (配列番号:14);
 DHMCVYTTWGELIWCDNH (配列番号:36);
 KYWCSFWGLQCKT (配列番号:88);
 PVDCKHHFWWCYWN (配列番号:141);
 DDHCYWFREWFNSECPHG (配列番号:50);
 YYWCNYWGLCPDQ (配列番号:56);
 PHNCDDHYWYCKWF (配列番号:115);
 SYWCKIWDVCPQS (配列番号:57);
 KYWCNLWGVCPAN (配列番号:58);
 AATCSTSYWYYQWFCTDS (配列番号:124);
 TYWCTFWELPCDPA (配列番号:108);
 YWYCWFDPDRPECPY (配列番号:143);
 SWVCWKAKWWEDKRCAPF (配列番号:130);
 NPMCWKKSWWEDAYCINH (配列番号:129); および
 SWNCAFHHNEMVWCDDG (配列番号:142)

10

を含む。

【 0 0 2 6 】

20

標識または固定化を容易にするアミノ末端およびカルボキシ末端修飾を有する特に好ましいポリペプチドは：

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:144, DX249と呼ぶ);
 Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:146, DX250と呼ぶ);
 Ac-AGPVDCKIHHFWWCYWNGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:153, DX251と呼ぶ);
 Ac-GDDDHHCYWFREWFNSECPHGEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:154, DX252と呼ぶ);
 Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:145, DX253と呼ぶ);
 Ac-AGYYWCNYWGLCPDQGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:155, DX254と呼ぶ);
 Ac-AGPHNCDDHYWYCKWFPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:150, DX389と呼ぶ);
 Ac-AGSYWCKIWDVCPQSPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:147, DX392と呼ぶ);
 Ac-AGKYWCNLWGVCPANPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:148, DX395と呼ぶ);
 Ac-AGAATCSTSYWYYQWFCTDSPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:151, DX398と呼ぶ);

30

- Ac-AGTYWCTFWELPCDPAPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:149, DX404と呼ぶ);
 Ac-AGYWYCWFPDRPECPYLPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:152, DX413と呼ぶ);
 Ac-GDSWVCWKAKWWEDKRCAPFGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:156, DX595と呼ぶ);
 Ac-GDNPMCWKKSWWEDAYCINHGTGPEGGGK-NH₂ (配列番号:157, DX596と呼ぶ);
 Ac-GDSWNCAFHHNEMVWCDDGGTTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:158, DX597と呼ぶ);
 Ac-GDWGECTVTSYGELIWCGLLEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:159, DX1070と呼ぶ);
 Ac-GDNPMCWRRASWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:160, DX1071と呼ぶ);
 Ac-GDNPMCWRAHWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:161, DX1072と呼ぶ);
 Ac-GDDHIMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEG-X-NH₂ (配列番号:162, DX877と呼ぶ);
 Ac-GDDHIMCVYTTWGELIWCNDNHEPG-X-Su-X-NH₂ (配列番号:163, DX878と呼ぶ);
 Ac-GDDHIMCVYTTWGELIWCNDNHEPG-X-Z-X-NH₂ (配列番号:164, DX905と呼ぶ);
 Ac-GDDHIMCVYTTWGELIWCNDN-X-NH₂ (配列番号:165, DX907と呼ぶ);
 Ac-GDDHIMCVYTTWGELIWCNDN-X-Su-X-NH₂ (配列番号:166, DX909と呼ぶ);
 Ac-GDDHIMCVYTTWGELIWCNDN-X-Z-X-NH₂ (配列番号:167, DX911と呼ぶ);
 Ac-DHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:169, DX1062と呼ぶ);
 Ac-EHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:170, DX1063と呼ぶ);
 Ac-ACVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:171, DX1064と呼ぶ);
 Ac-TCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:172, DX1065と呼ぶ);
 Ac-ECVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:173, DX1066と呼ぶ);
 Ac-VCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:174, DX1067と呼ぶ);
 Ac-[Nle]CVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:175, DX1068と呼ぶ);
 Ac-CVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:176, DX1069と呼ぶ);
 Ac-SRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:177, DX1139と呼ぶ);
 Ac-RRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:178, DX1142と呼ぶ);
 Ac-ERACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:179, DX1141と呼ぶ);
 Ac-ACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:180, DX1142と呼ぶ);
 Ac-TCSR DWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:181, DX1143と呼ぶ);
 Ac-ECSR DWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:182, DX1144と呼ぶ);
 Ac-VCSR DWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:183, DX1145と呼ぶ);
 Ac-GCSR DWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:184, DX1146と呼ぶ); および
 Ac-CSR DWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:185, DX1147と呼ぶ);

10

20

30

を含む。

【 0 0 2 7 】

前述のポリペプチドにおいて、Ac-はN-末端アセチル化を表し、-NH₂はC末端アミド化を表し、-X-NH₂はC末端基 -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂を表し、-X-Su-X-NH₂はC末端基 -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C:O-CH₂CH₂-C:O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂を表し、-X-Z-X-NH₂はC末端基 -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C:O-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C:O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂を表し、および[Nle]はノルロイシンを表す。本明細書中に記載される結合研究のために、所定のこれらのポリペプチドは、フルオレセイン標識され、フルオロフォア (fluorophore) がカルボキシ末端リジンの -アミノ基に付着される。フルオレセイン形態において、ポリペプチドDX249 (すなわち、Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂、配列番号:144) をDX276と呼ぶ; フルオレセイン形態において、ポリペプチドDX250 (すなわち、Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTGPEGGGK-NH₂、配列番号:146) をDX300と呼ぶ; フルオレセイン形態において、ポリペプチドDX253 (すなわち、Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂、配列番号:145) をDX301と呼ぶ。

40

50

【0028】

本発明のポリペプチドは、Fc領域ポリペプチドへの特異的結合を示す。本明細書中に開示される好ましいポリペプチドは、ヒトFcポリペプチドまたは特定のIgGイソ型（例えば、IgG1、IgG2、IgG3および/またはIgG4）に対して高親和性（例えば、 $10\mu\text{M} \sim 0.01\mu\text{M}$ の範囲、より好ましくは $1.0\mu\text{M} \sim 0.01\mu\text{M}$ の範囲の K_D ）を示す。いくつかのポリペプチドはまた、種特異性（例えば、他の哺乳動物IgGではなくヒトに結合する）を示す。例えば：DX249は、ヒトIgG1に対してpH5.7で $0.1\mu\text{M}$ 未満およびpH7.4で $0.5\mu\text{M}$ 未満の解離定数（ K_D ）を示す（表1、下記参照）；

DX252は、ヒトIgG3に対してpH5.7で $0.1\mu\text{M}$ 未満ならびにIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4に対してpH7.4で約 $2.1\mu\text{M} \sim 約3.4\mu\text{M}$

10

の範囲の解離定数（ K_D ）を示す（表1、下記参照）；

DX253は、緩衝液およびタバコ抽出物からのFcタンパク質の定量的結合（全負荷の $>90\%$ の捕捉効率）を示す（実施例7および8下記参照）；

DX254は、ヒトIgG1に対してpH5.7で $0.1\mu\text{M}$ 未満、pH7.4で $2.0\mu\text{M}$ 未満、およびpH9.3で $1.0\mu\text{M}$ 未満の解離定数（ K_D ）を示す（表1下記参照）；

DX301は、ヒトFc、IgG1、IgG2およびIgG4に対して約 $10\mu\text{M}$ 未満の解離定数を示す（表8、下記参照）；および

DX300は、ヒトIgG3に対して 4.1 ± 4.6 の解離定数を示す（表6参照）。

【0029】

本発明はまた、少なくとも1つの免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を含むと思われる溶液中の少なくとも1つの免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を検出する方法を開示し、この方法は

20

(a) 該溶液と請求項1または請求項5記載のポリペプチドとを接触させる工程；および
(b) 前記ポリペプチドと前記ポリペプチド標的との間で結合が生じたかどうかを決定する工程
を含む。

【0030】

さらなる態様では、本発明は、少なくとも1つの免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を含む溶液中の少なくとも1つの免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列を含むポリペプチド標的を単離する方法に関し、該方法は：

30

(a) 固相支持体上にFc結合性ポリペプチドを固定化させるか、または結合性ポリペプチドとアフィニータグとを結合させることにより本発明のFc結合性ポリペプチドを調製するか、工程；

(b) 前記ペプチド標的と工程(a)の結合性ポリペプチドとを接触させる工程；および

(c) 該溶液の非結合成分と工程(b)の結合性ポリペプチドとを分離する工程、
を含む。

本発明はまた、固相支持体から結合Fc含有ペプチドを溶出させることを意図する。

【0031】

本発明はまた、

(a) Fc領域ポリペプチドを含有する標的ポリペプチドを含有すると思われる溶液と標的ポリペプチドに対する結合分子とを接触させる工程、ここで結合分子は固相支持体に固定化される、

40

(b) 固相支持体に結合した標的と溶液の未結合成分とを分離する工程、

(c) 固相支持体と、検出可能に標識された本発明のFc結合性ポリペプチドとを接触させる工程、および

(d) 固相支持体への標識Fc結合性ポリペプチドの結合を検出する工程

を含む、Fc領域ポリペプチドを含む標的ポリペプチドの固相検出アッセイを意図する。

【0032】

前述の方法において、Fc領域標的が単離されるか、または検出される溶液は、全血、血漿、トランスジェニックミルク、トランスジェニック鳥類の卵、および馴化培地からなる群

50

より選ばれうる。

【0033】

また、前述方法において、ポリペプチド標的は、Fc領域の全てまたは一部を含む抗体または抗体フラグメントでありうる。好ましくは、前述の方法において、前記ポリペプチド標的は抗体である。

【0034】

標的ポリペプチドが抗体である場合、これは、ヒトIgGであり得、任意の特定のイソ型（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、またはその組み合わせ）でありうる。

【0035】

前述の方法において、固相支持体は、例えば、セルロース、規則的細孔ガラス、シリカ、ポリスチレン、スチレンジビニルベンゼン、アガロース、および架橋アガロースでありうる。

【0036】

本発明はまた、免疫グロブリンFc領域に結合可能な外来ポリペプチドを発現する組換えバクテリオファージ、または「ファージ」（「ファージミド」を含む）に関し、該外来ポリペプチドは式I、II、IIIまたはIV：

I. $Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-W-C-Z_2$ （配列番号：4）；

式中、

Z_1 は、少なくとも6アミノ酸のポリペプチドである；

X_1 は、G、H、N、R、またはSである；

X_2 は、A、D、E、F、I、M、またはSである；

X_3 は、A、I、L、M、またはVである；

X_4 は、I、M、T、またはVである；

Z_2 は、少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在しない；および

Z_1 は、少なくとも1つのシステイン残基を含み、不変なシステイン残基とのジスルフィド結合の形成により、12アミノ酸の環状ペプチドが形成される；

II. $Z_1-X-W-Z_2-W-Z_3$ （配列番号：5）

式中、

Z_1 は、少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在しない；

Xは、FまたはYである；

Z_2 は、トリペプチドである；および

Z_3 は、少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドである；

ここで、ポリペプチド Z_1 、 Z_2 、および Z_3 の内の少なくとも2つがシステイン残基を含み、かかるシステイン残基間のジスルフィド結合の形成により7～12アミノ酸の環状ペプチドが形成される；

III. $Z_1-W-Z_2-W-W-Z_3$ （配列番号：6）

式中、

Z_1 は、少なくとも1アミノ酸のポリペプチドである；

Z_2 は、トリペプチドである；および

Z_3 は、少なくとも1アミノ酸のポリペプチドである；

ここで、ポリペプチド Z_1 、 Z_2 、および Z_3 の内の少なくとも2つはシステイン残基を含み、かかるシステイン残基間のジスルフィド結合の形成により、8～12アミノ酸の環状ペプチドが形成されるが、ただし、 Z_1 がシステインを含む場合、 Z_2 はシステインを含まず、 Z_2 がシステインを含む場合、これはトリペプチドの中央の残基であり、 Z_3 はまたシステインを含む；

IV. $Z_1-P-X_1-W-X_2-C-X_3-X_4-X_5$ （配列番号：7）

式中、

Z_1 は、少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドであり、システイン残基を含む；

X_1 は、A、E、R、S、またはTである；

X_2 は、F、W、またはYである；

50

X_3 は、D、E、L、M、またはQである；

X_4 は、H、W、またはYである；

X_5 は、FまたはYである；および

ここで、 Z_1 のシステイン残基および X_2 と X_3 との間のシステイン残基は10～12アミノ酸の環状ペプチドを形成する、

のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【0037】

好ましくは、本発明の前述の組換えバクテリオファージにおいて、前記外来ポリペプチドは、式：

$Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-W-C-Z_2$ (配列番号：4)

10

式中、

X_1 は、Gである；

X_2 は、AまたはEである；

X_3 は、Lである；

X_4 は、IまたはVである；

のアミノ酸配列を含むか、または

前記外来ポリペプチドは、式：

$Z_1-X-W-Z_2-W-Z_3$ (配列番号：5)

式中、

Xは、FまたはYである；および

20

ここで Z_2 は式： $X_1-X_2-X_3$ のペプチドである、式中、

X_1 は、CまたはYである；

X_2 は、C、K、N、またはTであり、ただし X_2 はCでない場合、 X_1 がCである、および

X_3 は、F、I、K、Q、またはVである

のアミノ酸配列を含む。

【0038】

さらに好ましくは、本発明の組換えバクテリオファージは、以下：

- R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:14)
W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:15)
S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (配列番号:16)
L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-G-S (配列番号:17)
P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L (配列番号:18)
L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:19)
W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H (配列番号:20)
D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H (配列番号:21)
W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:22)
C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:23)
R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:24)
L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (配列番号:25)
D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-M-W-C-D-N-H (配列番号:26)
P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-I-L-V-W-C-S-G-H (配列番号:27)
S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-I-W-C-S-A-N (配列番号:28)
F-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-L-I-W-C-S-S-F (配列番号:29)
H-D-L-C-A-Q-A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R (配列番号:30)
P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L (配列番号:31)
P-L-D-C-A-R-D-I-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G (配列番号:32)
G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W (配列番号:33)
W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L (配列番号:34)
S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F (配列番号:35)
D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:36)
R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-H-Y (配列番号:37)
W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-V-W-C-P-Y-L (配列番号:38)
G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F (配列番号:39)
A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F (配列番号:40)
W-W-N-C-H-N-G-W-T-W-T-G-G-W-C-W-W-F (配列番号:41)
Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-I-W-C-E-A-F (配列番号:42)
N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (配列番号:43)
Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-S-R (配列番号:44)
Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S (配列番号:45)

10

20

30

Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y	(配列番号:46)	
N-Y-W-C-N-V-W-L-L-G-D-V-C-R-S-H	(配列番号:47)	
L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P	(配列番号:48)	
Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D	(配列番号:49)	
D-D-H-C-Y-W-F-R-E-W-F-N-S-E-C-P-H-G	(配列番号:50)	
N-Y-W-C-N-I-W-G-L-H-G-C-N-S-H	(配列番号:51)	
Y-W-F-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D	(配列番号:52)	
H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R	(配列番号:53)	
S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N	(配列番号:54)	10
F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D	(配列番号:55)	
Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q	(配列番号:56)	
S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S	(配列番号:57)	
K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N	(配列番号:58)	
Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N	(配列番号:59)	
K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S	(配列番号:60)	
K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S	(配列番号:61)	
K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-E	(配列番号:62)	
H-F-W-C-E-V-W-G-L-C-P-S-I	(配列番号:63)	20
Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V	(配列番号:64)	
A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E	(配列番号:65)	
K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N	(配列番号:66)	
Q-Y-W-C-N-V-W-G-V-C-L-P-S	(配列番号:67)	
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P	(配列番号:68)	
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q	(配列番号:69)	
Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y	(配列番号:70)	
T-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-P-H-N	(配列番号:71)	
F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P	(配列番号:72)	30
G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E	(配列番号:73)	
R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D	(配列番号:74)	
K-F-W-C-T-I-W-G-V-C-H-M-P	(配列番号:75)	
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P	(配列番号:76)	
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q	(配列番号:77)	

F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D (配列番号:78)
 H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S (配列番号:79)
 H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D (配列番号:80)
 H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-I-N (配列番号:81)
 R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A (配列番号:82)
 S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (配列番号:83)
 Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R (配列番号:84)
 Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D (配列番号:85)
 E-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R (配列番号:86)
 K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q (配列番号:87)
 K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T (配列番号:88)
 R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N (配列番号:89)
 N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H (配列番号:90)
 Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M (配列番号:91)
 A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G (配列番号:92)
 K-Y-W-C-K-F-W-G-L-E-C-K-V-G (配列番号:93)
 N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K (配列番号:94)
 S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H (配列番号:95)
 E-Y-W-C-R-I-W-G-L-Q-C-N-M-V (配列番号:96)
 K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (配列番号:97)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (配列番号:98)
 F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S (配列番号:99)
 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T (配列番号:100)
 K-Y-W-C-K-R-W-G-L-M-C-N-G-G (配列番号:101)
 A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W (配列番号:102)
 K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (配列番号:103)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S (配列番号:104)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (配列番号:105)
 L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D (配列番号:106)
 T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T (配列番号:107)
 T-Y-W-C-T-F-W-E-L-P-C-D-P-A (配列番号:108)
 K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-E-V (配列番号:109)

10

20

30

- N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q (配列番号:110)
 T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D (配列番号:111)
 N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L (配列番号:112)
 F-W-Y-C-Y-W-F-N-E-K-C-K-T-P (配列番号:113)
 G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G (配列番号:114)
 P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F (配列番号:115)
 E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M (配列番号:116)
 H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T (配列番号:117)
 E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F (配列番号:118)
 N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (配列番号:119)
 Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S (配列番号:120)
 Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S (配列番号:121)
 Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (配列番号:122)
 Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H (配列番号:123)
 A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Y-Q-W-F-C-T-D-S (配列番号:124)
 Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R (配列番号:125)
 Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T (配列番号:126)
 D-W-Q-C-L-W-W-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L (配列番号:127)
 F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D (配列番号:128)
 N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (配列番号:129)
 S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F (配列番号:130)
 S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L (配列番号:131)
 S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y (配列番号:132)
 S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y (配列番号:133)
 G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y (配列番号:134)
 D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y (配列番号:135)
 Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F (配列番号:136)
 F-C-N-C-W-G-S-H-E-F-T-F-C-V-D-D (配列番号:137)
 P-G-W-C-Y-S-D-I-W-G-F-K-H-F-C-N-L-D (配列番号:138)
 D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-F-P (配列番号:139)
 R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V (配列番号:140)
 P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N (配列番号:141)

10

20

30

S-W-N-C-A-F-H-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G (配列番号:142)
 Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-E-C-P-L-Y (配列番号:143)
 N-P-M-C-W-R-A-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (配列番号:186)
 N-P-M-C-W-R-A-H-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (配列番号:187)
 E-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:188)
 A-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:189)
 T-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:190)
 E-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:191)
 V-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:192)
 S-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:194)
 E-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:195)
 A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:196)
 T-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:197)
 E-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:198)
 V-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:199) および
 G-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:200)

10

からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む外来ポリペプチドをディスプレイする。

20

【0039】

本発明は、さらに、溶液中の、少なくとも1つの免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列を含有してなるポリペプチド標的を検出する方法であって、

(a) 該溶液を本発明によるバクテリオファージと接触させる工程；および

(b) 該ポリペプチド標的と該バクテリオファージとの間に結合が生じたか否かを調べる工程

を含む方法に関する。

【0040】

前述の方法において、該溶液は、全血、血漿、トランスジェニック乳、トランスジェニック鳥の卵および馴化培地からなる群より選ばれ得る。また、該ポリペプチド標的は、Fc領域の全部または一部を含む抗体または抗体断片であり得る。好ましくは、該ポリペプチド標的は抗体である。標的が抗体である場合、それは好ましくはヒトIgGであり、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4およびその組み合わせからなる群より選ばれ得る。

30

【0041】

本発明によるバクテリオファージを使用する前述の方法において、該バクテリオファージは好ましくはファージまたはファージミドである。

【0042】

さらなる態様において、本発明は、

(a) クロマトグラフィーマトリックス材料、および、この上に固定された；

(b) 本発明によるFc結合性ポリペプチド、例えば、配列番号：4～200を含有してなる分離媒体に関する。

40

【0043】

好ましい態様において、該クロマトグラフィーマトリックス材料は、セルロース、シリカゲル系の樹脂または膜、架橋多糖類およびアガロースからなる群より選ばれる。好ましい態様において、該クロマトグラフィーマトリックス材料は、アミン反応性クロマトグラフィーマトリックス材料であり、好ましくはアルデヒド官能性メタクリレート樹脂、ホルミルメタクリレート樹脂であり、あるいは、最も好ましくはNHS-活性化アガロース樹脂である。

【0044】

50

好ましい態様において、本発明の分離媒体は、

(a) アミン反応性クロマトグラフィーマトリックス材料 ; および

(b) 以下 :

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:144);

Ac-AGKYWCSEFWGLQCKTGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:146);

Ac-AGPVDCKHHFWWCYWNGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:153);

Ac-GDDDHICYWFREWFNSECPHGEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:154);

Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:145);

Ac-AGYYWCNYWGLCPDQGTGPEGGGK-NH₂ (配列番号:155);

Ac-AGPHNCDDHYWYCKWFPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:150);

Ac-AGSYWCKIWDVCPQSPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:147);

Ac-AGKYWCNLWGVCPANPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:148);

Ac-AGAATCSTSYWYYQWFCTDSPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:151);

Ac-AGTYWCTFWELPCDPAPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:149);

Ac-AGYWYCWFPDRPECPLYPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:152);

Ac-GDSWYCWKAKWWEDKRCAPFGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:156);

Ac-GDNPMCWKKSWWEDAYCINHGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:157);

Ac-GDSWNCAPHHNEMVWCDDGGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:158);

Ac-GDWGECTVTSYGELIWCGGLEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:159);

Ac-GDNPMCWRASWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:160);

Ac-GDNPMCWRAHWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:161);

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEG-X-NH₂ (配列番号:162);

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPG-X-Su-X-NH₂ (配列番号:163);

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPG-X-Z-X-NH₂ (配列番号:164);

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNH-X-NH₂ (配列番号:165);

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNH-X-Su-X-NH₂ (配列番号:166);

10

20

30

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDNH-X-Z-X-NH₂ (配列番号:167);
 Ac-DHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:169);
 Ac-EHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:170);
 Ac-ACVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:171);
 Ac-TCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:172);
 Ac-ECVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:173);
 Ac-VCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:174);
 Ac-[Nle]CVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:175);
 Ac-CVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:176);
 Ac-SRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:177);
 Ac-RRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:178);
 Ac-ERACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:179);
 Ac-ACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:180);
 Ac-TCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:181);
 Ac-ECSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:182);
 Ac-VCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:183);
 Ac-GCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:184); および
 Ac-CSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:185)

10

20

からなる群より選ばれるポリペプチドの反応生成物を含有する。

前述のリストにおいて、Ac-はN-末端アセチル化を表し、-NH₂はC-末端アミド化を表し、[Nle]はノルロイシンであり、-X-NH₂は-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂であり、-X-Su-X-NH₂は-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C:O-CH₂CH₂-C:O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂であり、-X-Z-X-NH₂は-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C:O-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C:O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂である。

30

【0045】

前述の分離媒体において、該マトリックス材料は、好ましくは、アルデヒド官能性メタクリレートクロマトグラフィー樹脂、ホルミル置換エチレングリコール-メタクリレート共重合体担体またはNHS-活性化アガロース担体である。

【0046】

別の局面において、本発明は、少なくとも1つの免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列を含有してなるポリペプチド標的を、これを含む溶液から分離する方法であって、

(a) 該溶液を、先に定義した分離媒体と結合条件下で接触させる工程;

(b) 非結合材料を除去する工程; および

(c) 結合ポリペプチド標的を該分離媒体から溶出する工程

を含む方法を包含する。

40

【0047】

前述の方法において、該ポリペプチド標的は、Fc領域の全部または一部を含む抗体または抗体断片であり得る。好ましくは、該ポリペプチド標的は抗体である。標的が抗体である場合、それは好ましくはヒトIgGであり、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4およびその組み合わせからなる群より選ばれ得る。

【0048】

また、前述の方法において、該溶液は、全血、血漿、トランスジェニック乳、トランスジェニック鳥の卵および馴化培地であり得る。

【0049】

本発明はまた、前述のFc結合性ポリペプチド(例えば、配列番号:4~143および1

50

86～200)のいずれかをディスプレイする複製可能な遺伝子パッケージを意図する。かかる複製可能な遺伝子パッケージは、ファージ(ファージミドを含む)、細菌、酵母または他の適切な宿主細胞であり得る。

【0050】

Fc領域ポリペプチドが単離または精製される溶液としては、血液、血漿などの血液画分、トランスジェニック乳、トランスジェニックニワトリの卵、Fc領域ポリペプチドを含有する馴化培地、すなわち、天然、組換えまたは合成の免疫グロブリン、そのFc領域含有断片、Fc領域含有融合タンパク質またはその他のFc領域ポリペプチドを含有する任意の溶液または供給流(feed stream)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0051】

別の局面において、本発明は、Fc領域ポリペプチドを含むと思われる溶液中においてFc領域ポリペプチドを検出するための方法であって、該溶液を本発明による結合性分子と接触させる工程および結合性複合体が形成されたか否かを調べる工程を含む方法を提供する。

【0052】

本発明に従って検出、単離または精製されたFc領域ポリペプチドは、免疫グロブリンの単離されたFc領域、全免疫グロブリン、Fc領域の全部または一部を含む抗体断片、Fc領域ポリペプチドを含む融合タンパク質、または本発明による結合性分子と結合したFc領域ポリペプチドとコンジュゲートしたポリペプチドもしくは他の分子であり得る。

【0053】

さらに別の局面において、本発明は、目的の治療用または診断用化合物の血清半減期を増大させるための方法であって、該治療用または診断用化合物を本発明によるFc結合性ポリペプチドに連結する工程、および該化合物/Fc結合性ポリペプチドを個体に投与する工程を含む方法を提供する。化合物/結合部分は血液中でコンジュゲートし、循環している抗体分子と会合し、化合物がFc結合性ポリペプチドの非存在下に投与された場合よりも長期間血清中に留まる。Fc結合性ポリペプチドは、循環中のコンジュゲートの挙動を、コンジュゲートが用いられる特定の治療上または診断上の必要性に合う(tailor)ように、抗体、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンサブタイプに対する特定の親和性に関して選択され得る。

【0054】

好ましい態様において、本発明はまた、個体の投与対象の化合物の血清半減期を増大させるための方法であって、

(a) 該化合物と本発明によるFc結合体ポリペプチド部分とのコンジュゲートを調製する工程、ここで、該コンジュゲートは循環している個体の抗体と会合する能力を有する、および

(b) 該コンジュゲートを個体の循環系に導入する工程を含む方法を開示する。

【0055】

好ましい態様において、該化合物は、診断用化合物であり、放射性標識または磁気共鳴画像形成剤が挙げられ得る。

【0056】

さらに別の好ましい態様において、該化合物は、治療用化合物である。例えば、該化合物は、トロンピンインヒビター、血栓溶解剤、レニンインヒビター、ACEインヒビター、セレクチンリガンド、凝血カスケードのインヒビター、補体調節(complement regulatory)分子、セリンプロテアーゼ、GPIIb/IIIaアンタゴニストおよびCRFアンタゴニストから選ばれ得る。

【0057】

本発明のこれらおよびその他の態様を以下に詳細に記載する。

【0058】

定義

10

20

30

40

50

本明細書で使用される用語「組換え」は、単離されたDNAの操作および宿主細胞の形質転換により、非天然の改変もしくは操作された核酸、外来核酸でトランスフェクトされた宿主細胞、または非天然で発現されたポリペプチドを記述するために使用される。組換えは、具体的には、遺伝子工学技術を用いてインピットロで構築されたDNA分子を包含する用語であり、分子、構築物、ベクター、細胞、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを記述するための形容詞としての「組換え」という用語の使用は、具体的には、天然のかかる分子、構築物、ベクター、細胞、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを除外する。

【0059】

用語「バクテリオファージ」は、DNAコアと、いくつかの異なるタンパク質分子の凝集により構成された保護殻とを含む細菌性ウイルスと定義する。用語「バクテリオファージ」および「ファージ」は、本明細書において互換的に使用される。特に記載のない限り、用語「バクテリオファージ」および「ファージ」はまた、「ファージミド」、すなわちそのゲノムが、宿主のヘルパーファージとの同時感染により切除され得るプラスミドを含むバクテリオファージを包含する。用語「Ffファージ」は、M13、fd、flおよびその数多くの誘導体を含む繊維状バクテリオファージの一群であると定義する。

10

【0060】

本明細書で使用される用語「Fc領域アミノ酸配列」は、免疫グロブリン分子のFc（フラグメント結晶性）ドメインを含むアミノ酸配列をいい、本発明で開示される新規な結合性分子に対して親和性を示す該ドメインのフラグメントを包含する。本開示全体を通して使用される等価な用語には、「Fc領域標的」、「Fc領域ポリペプチド」または単に「Fc」が含まれる。

20

【0061】

本明細書で使用される用語「結合性分子」は、別の分子、ポリペプチド、ペプチド擬似物または形質転換細胞（「形質転換体」）と結合性複合体を形成することができる任意の分子、ポリペプチド、ペプチド擬似物または形質転換体をいう。「Fc領域結合性分子」は、Fc領域ポリペプチドとの複合体を形成する結合性分子である。Fc領域結合性分子の具体例は、本明細書に記載されたポリペプチド（例えば、配列番号：4～7および14～143および186～200）ならびにかかるポリペプチドのいずれかをディスプレイするバクテリオファージである。また、上記式I、II、IIIまたはIVのアミノ酸配列を有するポリペプチドに由来するか、またはこれを含有するポリペプチド、および特定の結果のため、例えば固定化または標識のために修飾されたポリペプチドもFc領域結合性分子の定義に含まれる。意図される修飾の具体例は、クロマトグラフィー支持体または他の基材に結合性分子を連結する目的のためのC-末端またはN-末端アミノ酸置換またはポリペプチド鎖伸長である。別の例としては、アミノ酸位間において、通常のジスルフィド結合よりも安定な結合を形成する目的のために、例えば反応性側鎖を有する非天然アミノ酸残基と通常ジスルフィド結合を形成するシステイン残基のペアの置換が含まれる。かかる修飾された結合性分子もまたすべて、Fc領域ポリペプチドと結合する能力を保持している限り本発明による結合性分子であるとみなされる。

30

【0062】

本明細書で使用される用語「単離された」は、本発明によるポリペプチドに適用される場合、合成されたポリペプチド、または自然環境から取り出された、例えば、天然で会合している他のポリペプチドまたはタンパク質から分離されたポリペプチドをいう。好ましい形態では、単離されたポリペプチドは、他のポリペプチド、特に天然起源の他のポリペプチドを実質的に含まず、例えば、高度に純粋な形態で、すなわち、95%より高い純度、より好ましくは99%より高い純度で提供される。本文脈で使用される場合、用語「単離された」は、ダイマーまたは別のグリコシル化または誘導体化された形態などの、別の物理的形態の同じポリペプチドの存在を除外しない。

40

【0063】

本明細書で使用される用語「固体支持体」は、ポリペプチドの固定化に好適な任意の基材を包含する。かかる基材としては、セルロース、多孔性制御(controlled-pore)ガラス、

50

シリカ、ポリスチレン、スチレンジビニルベンゼン、アガロースおよび架橋アガロースが挙げられる。固体支持体は、これらに限定されないが、プレート、フィルター、ビーズ、樹脂などを含む種々のあらゆる形態を取り得る。本明細書で使用される用語「固体支持体」は、生物学的材料の分離または分画に有用であることが知られている商業的に入手可能な多種多様なクロマトグラフィー材料を示す「クロマトグラフィーマトリックス材料」としても知られる材料を包含する。有用なマトリックス材料としては、セルロースまたはシリカゲル系の樹脂もしくは膜、アガロースなどの架橋多糖類などの高分子物質が挙げられる。また、クロマトグラフィーマトリックス材料は、例えばヘパリン、ビオチン、ストレプトアビジン、合成ペプチドリガンド、またはモノクローナル抗体などの生物学的分子の分離に有用なマトリックスに結合した種々の官能基もしくは活性基または機能性もしくは官能性の分子をさらに含み得る。有用なクロマトグラフィーマトリックス材料の具体例としては、アルデヒド官能性メタクリレート樹脂、特にホルミルメタクリレート樹脂、およびNHS-活性化アガロースが挙げられるが、これらに限定されない。多種多様な固体支持体が、Amer sham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ)などの供給先から商業的に入手可能である。

10

20

30

40

50

【0064】

本明細書で使用される用語「アフィニティタグ」は、ストレプトアビジンなどのリガンドに対する親和性を有するビオチンなどの、別の分子とコンジュゲートし、リガンドへの結合によって捕捉可能となり得る任意の分子を示す。したがって、ビオチン化ポリペプチドは、ビオチン結合性パートナー（リガンド）であるストレプトアビジンとの接触による単離に適するようなビオチン「アフィニティタグ」を有する。一般的なアフィニティタグの他の例は、金属キレート（IMAC）樹脂上への親和性捕捉を提供するポリヒスチジン（例えば、hexaHis）、または、固定化抗-mycタグ抗体（Berkeley Antibody Co., Richmond, CAから入手可能なモノクローナル抗体9E10など）による親和性捕捉を提供する、c-mycタンパク質のエピトープであるmycタグである。

【0065】

詳細な説明

本発明は、免疫グロブリンFc領域アミノ酸配列に対する新規な結合性分子を提供する。かかる分子は、効率的なFc領域アミノ酸配列を含む分子の検出、単離および精製を可能にする。より具体的には、かかるポリペプチドは、抗体を含有する溶液からの該抗体の検出、単離、除去および/または精製に有用であり得る。さらにまた、かかるポリペプチドは、溶液中に存在する目的のタンパク質またはペプチドを融合タンパク質のードメインとして単離するに有用であり得、この融合タンパク質はFc領域ポリペプチドを含有し、好ましくは、例えばエンテロキナーゼ切断配列などの切断配列も含む。

【0066】

また、本出願において開示されるFc領域結合性ポリペプチドは、免疫応答に関与する種々の細胞の表面に位置するFcレセプターに対する抗体のFc領域の結合を制御することにより抗体応答を調節または阻止することが望ましい場合にも有用であり得る。

【0067】

ファージディスプレイ技術の使用

ファージディスプレイ技術は、本発明による新規なFc領域結合性ポリペプチドを同定するために好都合に使用した。かかる使用のためのファージディスプレイライブラリーを調製するため、候補結合性ドメインを選択して所望の結合能力および放出能力を発揮する操作された結合性分子の構造鑄型とした。結合性ドメインは、天然または合成タンパク質、またはタンパク質の領域もしくはドメインであり得る。候補結合性ドメインは、候補結合性ドメインとFc領域アミノ酸配列間の公知の相互作用の知識に基づいて選択され得るが、これは重要ではない。実際、候補結合性ドメインがFc領域アミノ酸配列に親和性を有することは全く決定的なことではない。その目的は、多重アナログ（「ライブラリー」）が生じ得る構造を提供することであり、多重アナログは、所望の結合性および放出性（な

らびに選択対象となる任意のその他の特性)を發揮する1つ以上のアナログを含む。

【0068】

候補結合性ドメインの選択において、その目的は、類似した構造のアナログドメインのライブラリーが生じ得る鑄型または親構造を提供することである。アナログライブラリーは、好ましくはバイアス(biased)ライブラリー(ランダムに生成するライブラリーの逆)であり、それは、ライブラリーを作製するための基本ドメインの多様化は結合性分子の所望される性質に合うように行なわれるからである。

【0069】

候補結合性ドメインの性質は、Fc領域標的に対して試験される誘導化ペプチド(アナログ)の性質に大きく影響する。候補結合性ドメインの選択において、最も重要な考慮すべき事項は、アナログドメインがどのようにFc領域アミノ酸配列に提示されるか、すなわち、どのようなコンホメーションでFc領域アミノ酸配列とアナログが接するのか、ということである。好ましい態様において、例えば、アナログは、複製可能な遺伝子パッケージ内へのアナログをコードする合成DNAの挿入により生成し、M13ファージなどの微生物の表面上へのドメインのディスプレイをもたらされる。多種多様な種々のポリペプチドをディスプレイする、M13ファージなどのファージのかかるライブラリーは、例えば、Kayら、Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego 1996)および米国特許第5,223,409号明細書(Ladnerら)(両者は参照により本明細書にそのまま取り込まれる)に記載されているような技術を用いて調製することができる。

10

20

【0070】

ファージディスプレイライブラリーの形成には、非構造ペプチドとは反対に、構造ポリペプチドを候補結合性ドメインとして使用することが好ましい。タンパク質における表面残基の変異は、通常、そのタンパク質の全体構造または一般的性質(サイズ、安定性、および変性の温度など)にほとんど影響しないが、同時に、残基の表面の変異は、タンパク質の結合性に深く影響する。ペプチドセグメントがより密に折り畳まれる(例えば、ジスルフィド結合により)ほど、任意の特定の標的に結合しにくくなる。しかしながら、もし、結合する場合、結合は、より強固にかつより特異的なようである。したがって、候補結合性ドメインを選択することで、ある程度の剛性を有するフレームワーク内に折り畳まれる

30

【0071】

候補結合性ドメインのサイズもまた重要な考慮すべき事項である。小さいタンパク質またはポリペプチドは大きなタンパク質に比べていくつかの利点をもつ。第1に、結合部位あたりの質量が小さいということである。低分子量を有する高度に安定なタンパク質ドメイン、例えば、Kunitzドメイン(約7kDa)、Kazalドメイン(約7kDa)、Cucurbita maximaトリプシンインヒビター(CMTI)ドメイン(約3.5kDa)およびエンドセリン(約2kDa)は、抗体(150kDa)または単鎖抗体(30kDa)よりも1グラムあたりずっと高い結合性を示し得る。第2に、利用可能な表面が少ないため、非特異的結合の可能性は低減されることである。第3に、小さい

タンパク質またはポリペプチドは、特有のテータリング(tethering)部位を有するように、大きなタンパク質または抗体では実施不可能な方法で操作可能であることである。例えば、小さいタンパク質は、リジン残基を有するように(例えば、クロマトグラフィーマトリックスへの)テータリングに適する部位のみを操作することができるが、これは他の抗体では実現可能ではない。第4に、構造ドメインがインタクトなまま1つのフレームワークを別のものに移動させた場合、折り畳まれたポリペプチド構造は、折り畳まれていない構造よりも、自身の機能性を保持しやすい。例えば、結合ドメイン構造は、ライブラリー内での提示(例えば、ファージ上にディスプレイされる)に使用されるフレームワークから、提示フレームから取り出された単離されたタンパク質またはクロマトグラフィー基材上に固定された単離されたタンパク質に移動しやすい。

40

50

【0072】

全血、血漿、トランスジェニック乳、トランスジェニックニワトリの卵など、またはFc領域ペプチドを含む条件培養培地などの溶液、例えば、天然または合成免疫グロブリンまたはそのFc含有フラグメントを含む任意の溶液または供給流用の効率的なFc領域ポリペプチド分離媒体を形成するために、本発明によるポリペプチドの例えばクロマトグラフィーマトリックス上への固定化が意図される。適切な結合ドメイン鑄型を選択することにより、単一の遊離システイン（すなわち、通常ジスルフィド結合を形成する、別のシステインと対になっていないシステイン）を有する結合性ポリペプチドを単離し得る。かかるチオール機能性ポリペプチドを、ヨードアセトアミド、ヨード酢酸、または類似のヨードカルボン酸基とのチオエーテルの形成により基材への固定化に使用し得る。同様に、アルデヒド官能性基質との反応のために、ペプチドドメインのC-末端カルボキシル基をヒドラジド（-NH-NH₂）に変換し得る。

【0073】

本明細書に記載のライブラリーの候補結合性ドメインは、非変異システイン残基の外側の2~3個の多様化アミノ酸に隣接する6~12個のアミノ酸の短い環状ペプチドである。これらのドメインに基づくライブラリーは、細菌、酵母、好ましくはバクテリオファージまたは「ファージ」（「ファージミド」を含む）などの複製可能な遺伝子パッケージ上にディスプレイされ得、容易に構築され、かつ本発明による結合性分子の選択に使用され得る。

【0074】

候補結合性ドメインアナログのライブラリーの提供

いったん候補結合性ドメインを選択したら、標的、この場合はFc領域ポリペプチドに対するスクリーニングのために潜在的結合性分子のライブラリーを作製する。各アナログが、ドメインの配列内に1つ以上のアミノ酸置換を有する以外は候補結合性ドメインに対応する一連のアナログを作製することによりライブラリーを作製する。

【0075】

アナログライブラリーを作製する目的は、Fc領域アミノ酸配列分子との反応のための非常に大きな数の潜在的結合性分子を提供することであり、通常、ライブラリー内のアナログの数が大きいほど、ライブラリーのメンバーがFc領域アミノ酸配列に結合し、かつ放出に所望される設定条件下で離れる可能性が高くなる。

【0076】

先に示したように、Kayら、Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego 1996)または米国特許第5,223,409号明細書において考察された技術は、選択された候補結合性ドメインに対応するアナログのライブラリーを調製する際に特に有用であり、該アナログは、標的Fc領域アミノ酸配列に関して多数のアナログを大規模スクリーニングするのに好適な形態で提示される。複製可能な遺伝子パッケージ、最も好ましくはバクテリオファージまたは「ファージ」（「ファージミド」を含む）の使用は、非天然DNAにコードされるポリペプチドがファージの表面に出現するように新規な外来DNAセグメントをバクテリオファージのゲノム（または他の増幅可能な遺伝子パッケージ）内に導入することを含む、新規ポリペプチド結合性実体(entity)を作製する強力な方法である。挿入されたDNAが配列多様性を含むならば、各受容ファージは、該DNAにコードされる鑄型（または「親」）アミノ酸配列の1つのバリエーションをディスプレイし、ファージ集団（ライブラリー）は、莫大な数の、異なるが関連するアミノ酸配列をディスプレイする。また、バクテリオファージの使用において、例えば、Smith, Gene, 128:1 (1993)（参照により本明細書にそのまま取り込まれる）で考察されているようなファージミドベクターを好都合に用い得る。

【0077】

本発明によるFc領域ポリペプチド結合体を得るためのスクリーニング手順において、フ

ァージライブラリーを、通常固体支持体に固定された標的 F c 領域ポリペプチドと接触および結合させる。非結合体を結合体と分離する。種々の方法において、結合したファージを、F c 領域ペプチドから遊離させ、回収し、増幅させる。ファージは細菌細胞の感染により増幅され得るため、少量の結合性ファージであっても、結合性実体をコードする遺伝子配列を明らかにするのに十分である。第 1 の組の結合性ペプチドを同定した後、配列情報を用いて、さらなる所望の特性、例えば特定の供給流内における F c 領域ポリペプチドと特定の断片または密接に関連した不純物との差別化を有するメンバーについてバイアスされた他のライブラリーを設計し得る。

【0078】

かかる技術は、大多数の潜在的 F c 領域結合性分子をスクリーニングすることを可能にするだけでなく、結合/溶出サイクルを繰り返すこと、および初期基準を満たすアナログ-ディスプレイパッケージをスクリーニングするための二次的なバイアスライブラリーを構築することを実施可能とする。これらの技術を用い、アナログバイアスライブラリーをスクリーニングし、(a) 結合条件下で強固に(すなわち高い親和性で)結合し、(b) 設定放出条件下できれいに離れる(すなわち F c 領域ペプチド標的から容易に解離する)メンバーを明らかにし得る。

【0079】

本発明による特定のポリペプチドを単離する際に、6 個のファージディスプレイライブラリーをスクリーニングした。6 個のライブラリーはそれぞれ、6、7、8、9、10 または 12 個のアミノ酸の短い多様な外来ペプチドループを、M13 ファージの表面上のタンパク質 III のアミノ末端にディスプレイした。ライブラリーを、TN6/6 (潜在的な 3.3×10^{12} アミノ酸配列多様性を有する); TN7/4 (潜在的な 1.2×10^{14} アミノ酸配列多様性を有する); TN8/9 (潜在的な 2.2×10^{15} アミノ酸配列多様性を有する); TN9/4 (潜在的な 4.2×10^{16} アミノ酸配列多様性を有する); TN10/9 (潜在的な 3.0×10^{16} アミノ酸配列多様性を有する); および TN12/1 (4.6×10^{19} の配列多様性を有する)と呼ぶ。

【0080】

TN6/6 ライブラリーを、12-アミノ酸鑄型に含有される単一微小タンパク質 (microprotein) 結合ループをディスプレイするように構築した。TN6/6 ライブラリーは、Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (配列番号: 8) の鑄型配列を利用した。鑄型の 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 および 11 位のアミノ酸を、システイン (Cys) を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。鑄型の 1 および 12 位のアミノ酸を、システイン (Cys)、グルタミン酸 (Glu)、イソロイシン (Ile)、リジン (Lys)、メチオニン (Met)、およびトレオニン (Thr) を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

【0081】

TN7/4 ライブラリーを、13-アミノ酸鑄型に含有される単一微小タンパク質結合ループをディスプレイするように構築した。TN7/4 ライブラリーは、Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (配列番号: 9) の鑄型配列を利用した。鑄型の 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 および 13 アミノ酸位のアミノ酸を、システイン (Cys) を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

【0082】

TN8/9 ライブラリーを、14-アミノ酸鑄型に含有される単一微小タンパク質結合ループをディスプレイするように構築した。TN8/9 ライブラリーは、Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (配列番号: 10) の鑄型配列を利用した。鑄型の 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 および 14 位のアミノ酸を、システイン (Cys) を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

10

20

30

40

50

【0083】

TN9/4ライブラリーを、15-アミノ酸鑄型に含有される単一微小タンパク質結合ループをディスプレイするように構築した。TN9/1ライブラリーは、鑄型配列 X a a - X a a - X a a - C y s - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - C y s - X a a - X a a - X a a (配列番号: 11) を利用した。鑄型の1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14および15位のアミノ酸を、システイン(C y s)を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

【0084】

TN10/9ライブラリーを、16-アミノ酸鑄型に含有される単一微小タンパク質結合ループをディスプレイするよう構築した。TN10/9ライブラリーは、鑄型配列 X a a - X a a - X a a - C y s - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - C y s - X a a - X a a - X a a (配列番号: 12) を利用した。鑄型の1, 2, 15および16位のアミノ酸を、10個のアミノ酸: D, F, H, L, N, P, R, S, W, または Y) の群より選ばれる任意のアミノ酸が可能となるように改変した。鑄型の3および14位のアミノ酸を、14個のアミノ酸: A, D, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, V, W, または Y) の群より選ばれる任意のアミノ酸が可能となるように改変した。鑄型の5, 6, 7, 8, 9, 10, 11および12位のアミノ酸を、システイン(C y s)を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

10

【0085】

TN12/1ライブラリーを、18-アミノ酸鑄型に含有される単一微小タンパク質結合ループをディスプレイするよう構築した。TN12/1ライブラリーは、鑄型配列 X a a - X a a - X a a - C y s - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - C y s - X a a - X a a - X a a (配列番号: 13) を利用した。鑄型の1, 2, 17および18位のアミノ酸を、12個のアミノ酸: A, D, F, G, H, L, N, P, R, S, W, または Y) の群より選ばれる任意のアミノ酸が可能となるように改変した。3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14および16位のアミノ酸を、システイン(C y s)を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

20

【0086】

6~12個のアミノ酸残基の環状ペプチドをディスプレイする前述のファージディスプレイライブラリーをスクリーニングしてFc領域ペプチド標的に結合するメンバーを明らかにした。いくつかのFc領域アミノ酸配列結合性ポリペプチドを単離し、スクリーニングしたライブラリーのうちの5つからFc領域結合体を単離した:

30

【0087】

TN12/1

- R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号: 14)
- W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号: 15)
- S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (配列番号: 16)
- L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-G-S (配列番号: 17)
- P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L (配列番号: 18)
- L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号: 19)
- W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H (配列番号: 20)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H (配列番号: 21)
- W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号: 22)
- C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号: 23)
- R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号: 24)
- L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (配列番号: 25)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-M-W-C-D-N-H (配列番号: 26)
- P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-I-L-V-W-C-S-G-H (配列番号: 27)
- S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-I-W-C-S-A-N (配列番号: 28)
- F-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-L-I-W-C-S-S-F (配列番号: 29)
- H-D-L-C-A-Q-A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R (配列番号: 30)
- P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L (配列番号: 31)
- P-L-D-C-A-R-D-I-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G (配列番号: 32)
- G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W (配列番号: 33)
- W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L (配列番号: 34)
- S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F (配列番号: 35)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号: 36)
- R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-H-Y (配列番号: 37)
- W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-V-W-C-P-Y-L (配列番号: 38)
- G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F (配列番号: 39)
- A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F (配列番号: 40)
- W-W-N-C-H-N-G-W-T-W-T-G-G-W-C-W-W-F (配列番号: 41)
- Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-I-W-C-E-A-F (配列番号: 42)
- L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P (配列番号: 48)
- D-D-H-C-Y-W-F-R-E-W-F-N-S-E-C-P-H-G (配列番号: 50)
- S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N (配列番号: 54)
- A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Y-Q-W-F-C-T-D-S (配列番号: 124)
- D-W-Q-C-L-W-W-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L (配列番号: 127)
- N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (配列番号: 129)
- S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F (配列番号: 130)
- S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L (配列番号: 131)
- D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y (配列番号: 135)
- P-G-W-C-Y-S-D-I-W-G-F-K-H-F-C-N-L-D (配列番号: 138)
- S-W-N-C-A-F-H-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G (配列番号: 142)
- G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y (配列番号: 134)

10

20

30

TN10/9

- Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-S-R (配列番号: 44)
- Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S (配列番号: 45)
- Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (配列番号: 46)
- N-Y-W-C-N-V-W-L-L-G-D-V-C-R-S-H (配列番号: 47)

Y-W-F-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D (配列番号: 52)
H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R (配列番号: 53)
F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D (配列番号: 55)
Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S (配列番号: 120)
Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S (配列番号: 121)
Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (配列番号: 122)
Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H (配列番号: 123)
S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y (配列番号: 132)
S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y (配列番号: 133)
Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F (配列番号: 136)
F-C-N-C-W-G-S-H-E-F-T-F-C-V-D-D (配列番号: 137)
D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-F-P (配列番号: 139)

10

TN9/4

N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (配列番号: 43)
N-Y-W-C-N-I-W-G-L-H-G-C-N-S-H (配列番号: 51)
N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (配列番号: 119)
Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-E-C-P-L-Y (配列番号: 143)

TN8/9

Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D (配列番号: 49)
E-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R (配列番号: 86)
K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q (配列番号: 87)
R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N (配列番号: 89)
N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H (配列番号: 90)
Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M (配列番号: 91)
A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G (配列番号: 92)
K-Y-W-C-K-F-W-G-L-E-C-K-V-G (配列番号: 93)
N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K (配列番号: 94)
S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H (配列番号: 95)
E-Y-W-C-R-I-W-G-L-Q-C-N-M-V (配列番号: 96)
K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (配列番号: 97)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (配列番号: 98)
F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S (配列番号: 99)
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T (配列番号: 100)
K-Y-W-C-K-R-W-G-L-M-C-N-G-G (配列番号: 101)
A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W (配列番号: 102)
K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (配列番号: 103)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S (配列番号: 104)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (配列番号: 105)
L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D (配列番号: 106)
T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T (配列番号: 107)
T-Y-W-C-T-F-W-E-L-P-C-D-P-A (配列番号: 108)
K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-E-V (配列番号: 109)
N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q (配列番号: 110)
T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D (配列番号: 111)
N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L (配列番号: 112)
F-W-Y-C-Y-W-F-N-E-K-C-K-T-P (配列番号: 113)
G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G (配列番号: 114)

20

30

P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F	(配列番号:115)
E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M	(配列番号:116)
H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T	(配列番号:117)
E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F	(配列番号:118)
Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R	(配列番号:125)
F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D	(配列番号:128)
P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N	(配列番号:141)

TN7/4

Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q	(配列番号:56)
S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S	(配列番号:57)
K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N	(配列番号:58)
Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N	(配列番号:59)
K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S	(配列番号:60)
K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S	(配列番号:61)
K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-E	(配列番号:62)
H-F-W-C-E-V-W-G-L-C-P-S-I	(配列番号:63)
Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V	(配列番号:64)
A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E	(配列番号:65)
K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N	(配列番号:66)
Q-Y-W-C-N-V-W-G-V-C-L-P-S	(配列番号:67)
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P	(配列番号:68)
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q	(配列番号:69)
Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y	(配列番号:70)
T-Y-W-C-T-K-W-C-L-C-P-H-N	(配列番号:71)
F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P	(配列番号:72)
G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E	(配列番号:73)
R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D	(配列番号:74)
K-F-W-C-T-I-W-G-V-C-H-M-P	(配列番号:75)
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P	(配列番号:76)
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q	(配列番号:77)
F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D	(配列番号:78)
H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S	(配列番号:79)
H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D	(配列番号:80)
H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-I-N	(配列番号:81)
R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A	(配列番号:82)
S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S	(配列番号:83)
Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R	(配列番号:84)
Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D	(配列番号:85)
K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T	(配列番号:88)
Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T	(配列番号:126)
R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V	(配列番号:140)

10

20

30

【0088】

Fc結合体内の反復するアミノ酸配列のさらなる解析により、共通のコア構造を示す一連のポリペプチド「ファミリー」が明らかになった：

【0089】

配列ファミリー I:

- R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:14)
- W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:15)
- S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (配列番号:16)
- L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-G-S (配列番号:17)
- P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L (配列番号:18)
- L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:19)
- W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H (配列番号:20)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H (配列番号:21)
- W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (配列番号:22)
- C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:23)
- R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (配列番号:24)
- L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (配列番号:25)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-M-W-C-D-N-H (配列番号:26)
- P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-I-L-V-W-C-S-G-H (配列番号:27)
- S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-I-W-C-S-A-N (配列番号:28)
- F-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-L-I-W-C-S-S-F (配列番号:29)
- H-D-L-C-A-Q-A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R (配列番号:30)
- P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L (配列番号:31)
- P-L-D-C-A-R-D-I-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G (配列番号:32)
- G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W (配列番号:33)
- W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L (配列番号:34)
- S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F (配列番号:35)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (配列番号:36)
- R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-H-Y (配列番号:37)
- W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-V-W-C-P-Y-L (配列番号:38)
- G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F (配列番号:39)
- A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F (配列番号:40)
- W-W-N-C-H-N-G-W-T-W-T-G-C-W-C-W-W-F (配列番号:41)
- Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-I-W-C-E-A-F (配列番号:42)

10

20

配列ファミリー II:

- N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (配列番号: 43)
- Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-S-R (配列番号: 44)
- Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S (配列番号: 45)
- Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (配列番号: 46)
- N-Y-W-C-N-V-W-L-L-G-D-V-C-R-S-H (配列番号: 47)
- L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P (配列番号: 48)
- Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D (配列番号: 49)
- D-D-H-C-Y-W-F-R-E-W-F-N-S-E-C-P-H-G (配列番号: 50)
- N-Y-W-C-N-I-W-G-L-H-G-C-N-S-H (配列番号: 51)
- Y-W-F-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D (配列番号: 52)
- H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R (配列番号: 53)
- S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N (配列番号: 54)
- F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D (配列番号: 55)
- Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q (配列番号: 56)
- S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (配列番号: 57)

30

- K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (配列番号: 58)
- Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N (配列番号: 59)
- K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S (配列番号: 60)
- K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S (配列番号: 61)
- K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-E (配列番号: 62)
- H-F-W-C-E-V-W-G-L-C-P-S-I (配列番号: 63)
- Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V (配列番号: 64)
- A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E (配列番号: 65)
- K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (配列番号: 66)
- Q-Y-W-C-N-V-W-G-V-C-L-P-S (配列番号: 67)
- H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (配列番号: 68)
- R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (配列番号: 69)
- Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y (配列番号: 70)
- T-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-P-H-N (配列番号: 71)
- F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P (配列番号: 72)
- G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E (配列番号: 73)
- R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D (配列番号: 74)
- K-F-W-C-T-I-W-G-V-C-H-M-P (配列番号: 75)
- H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (配列番号: 76)
- R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (配列番号: 77)
- F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D (配列番号: 78)
- H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S (配列番号: 79)
- H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D (配列番号: 80)
- H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-I-N (配列番号: 81)
- R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A (配列番号: 82)
- S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (配列番号: 83)
- Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R (配列番号: 84)
- Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D (配列番号: 85)
- E-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R (配列番号: 86)
- K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q (配列番号: 87)
- K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T (配列番号: 88)
- R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N (配列番号: 89)
- N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H (配列番号: 90)
- Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M (配列番号: 91)
- A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G (配列番号: 92)
- K-Y-W-C-K-F-W-G-L-E-C-K-V-G (配列番号: 93)
- N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K (配列番号: 94)
- S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H (配列番号: 95)
- E-Y-W-C-R-I-W-G-L-Q-C-N-M-V (配列番号: 96)
- K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (配列番号: 97)
- K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (配列番号: 98)
- F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S (配列番号: 99)
- H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T (配列番号: 100)
- K-Y-W-C-K-R-W-G-L-M-C-N-G-G (配列番号: 101)
- A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W (配列番号: 102)
- K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (配列番号: 103)
- K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S (配列番号: 104)
- K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (配列番号: 105)
- L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D (配列番号: 106)

10

20

30

T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T	(配列番号:107)	
T-Y-W-C-T-F-W-E-L-P-C-D-P-A	(配列番号:108)	
K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-E-V	(配列番号:109)	
N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q	(配列番号:110)	
T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D	(配列番号:111)	
N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L	(配列番号:112)	
F-W-Y-C-Y-W-F-N-E-K-C-K-T-P	(配列番号:113)	
G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G	(配列番号:114)	
P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F	(配列番号:115)	
E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M	(配列番号:116)	
H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T	(配列番号:117)	
E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F	(配列番号:118)	
N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L	(配列番号:119)	10
Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S	(配列番号:120)	
Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S	(配列番号:121)	
Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y	(配列番号:122)	
Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H	(配列番号:123)	
A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Y-Q-W-F-C-T-D-S	(配列番号:124)	
Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R	(配列番号:125)	
Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T	(配列番号:126)	

配列ファミリーIII:

D-W-Q-C-L-W-W-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L	(配列番号:127)	
F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D	(配列番号:128)	
N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H	(配列番号:129)	
S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F	(配列番号:130)	20
S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L	(配列番号:131)	

配列ファミリーIV:

S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y	(配列番号:132)	
S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y	(配列番号:133)	
G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y	(配列番号:134)	
D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y	(配列番号:135)	
Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F	(配列番号:136)	

【0090】

前述のペプチドファミリーにおいて、太字で示したアミノ酸は、その位置が非変異であるか、または非変異残基に関する位置において好ましい(すなわち、多くの配列において反復する)かのいずれかである。 30

【0091】

いずれのファミリーにも適合しないFc領域結合ペプチド

F-C-N-C-W-G-S-H-E-F-T-F-C-V-D-D	(配列番号:137)	
P-G-W-C-Y-S-D-I-W-G-F-K-H-F-C-N-L-D	(配列番号:138)	
D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-F-P	(配列番号:139)	
R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V	(配列番号:140)	
P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N	(配列番号:141)	
S-W-N-C-A-F-H-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G	(配列番号:142)	
Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-E-C-P-L-Y	(配列番号:143)	40

【0092】

Fc領域結合性ポリペプチドの上記ファミリーの構造の解析により、Fc領域結合体について以下の一般式が明らかになった:

【0093】

I . $Z_1 - X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - W - C - Z_2$ (配列番号:4);

式中、

Z_1 は少なくとも6個のアミノ酸のポリペプチドである;

X_1 はG、H、N、RまたはSである;

X_2 はA、D、E、F、I、MまたはSである;

X_3 はA、I、L、MまたはVである;

X_4 は I、M、T または V である；

Z_2 は少なくとも 1 個のアミノ酸のポリペプチドであるか、存在しない；および

Z_1 は、非変異システイン残基とのジスルフィド結合の形成により 12 個のアミノ酸の環状ペプチドが形成されるような少なくとも 1 個のシステイン残基を含有する。

【0094】

II . $Z_1 - X - W - Z_2 - W - Z_3$ (配列番号：5)

式中、

Z_1 は少なくとも 1 個のアミノ酸のポリペプチドであるか、存在しない；

X は F または Y である；

Z_2 はトリペプチドである；および

Z_3 は少なくとも 1 個のアミノ酸のポリペプチドである；ならびに

ここで、ポリペプチド Z_1 、 Z_2 および Z_3 のうち少なくとも 2 つは、システイン残基間のジスルフィド結合の形成により 7 ~ 12 個のアミノ酸の環状ペプチドが形成されるようにシステイン残基を含む。

前述の式 II ポリペプチドにおいて、 Z_2 は式 (IIA)：

$X_1 - X_2 - X_3$ (IIA)，

式中、

X_1 は A、C、F、K、P、R、W または Y である；

X_2 は C、D、E、G、H、K、M、N、Q、R、S、T、V、または Y である；および

X_3 は A、E、F、H、I、K、L、Q、R、S、T、V、または Y である；

ただし、 X_1 、 X_2 および X_3 のうち多くて 1 つだけが C であり得るものとする、

を有することが好ましい。好ましくは、 X_2 が C ならば X_1 は Y である。最も好ましくは、 X_1 は C である。

【0095】

III . $Z_1 - W - Z_2 - W - W - Z_3$ (配列番号：6)；

式中、

Z_1 は少なくとも 1 個のアミノ酸のポリペプチドである；

Z_2 はトリペプチドである；および

Z_3 は少なくとも 1 個のアミノ酸のポリペプチドである；

ここで、ポリペプチド Z_1 、 Z_2 および Z_3 のうち少なくとも 2 つは、システイン残基間のジスルフィド結合の形成により 8 ~ 12 個のアミノ酸の環状ペプチドが形成されるようにシステイン残基を含む。ただし、 Z_1 がシステインを含むならば Z_2 はシステインを含まず、 Z_2 がシステインを含むならば、それはトリペプチドの真ん中の残基であり、かつ Z_3 もシステインを含むものとする。

式 III のポリペプチドについて好ましくは、 Z_1 および Z_3 がそれぞれシステイン残基を含有する場合、 Z_1 のシステインは非変異トリプトファン (W) に隣接し、 Z_2 の第 1 アミノ酸はリジンであり、 Z_3 の第 2 アミノ酸はアスパラギン (aspartic) 酸 (D) である。

【0096】

IV . $Z_1 - P - X_1 - W - X_2 - C - X_3 - X_4 - X_5$ (配列番号：7)；式

中、 Z_1 は少なくとも 1 個のアミノ酸のポリペプチドであり、システイン残基を含む；

X_1 は A、E、R、S、または T である；

X_2 は F、W または Y である；

X_3 は D、E、L、M または Q である；

X_4 は H、W または Y である；

X_5 は F または Y である；および

ここで、 Z_1 内のシステイン残基および X_2 と X_3 の間のシステイン残基が 10 ~ 12 個のアミノ酸の環状ペプチドを形成する。

【0097】

Fc 結合性ペプチドの合成

10

20

30

40

50

いったん単離されると、すべての個々の結合性ペプチドの配列またはすべての結合性分子の構造を解析することができ、公知の方法を用いて任意の所望の量で結合体を作製し得る。例えば、本明細書に記載のペプチド結合性分子は、その配列が開示されているため、これは、化学合成した後、元のコンホメーション、すなわち正しいジスルフィド結合を得るのに適切な酸化条件下で処理することにより、好都合に作製され得る。合成は、当業者に周知の方法論により行なわれ得る (Kelleyら、Genetic Engineering Principles and Methods, (Setlow, J. K. 編), Plenum Press, NY., (1990), 第12巻, 1-19頁; Stewartら、Solid-Phase Peptide Synthesis (1989), W. H. Freeman Co., サンフランシスコ, 参照のこと)。本発明の結合性分子は、化学的合成または半合成のいずれかにより作製され得る。化学的合成法または半合成法により、非天然アミノ酸残基の組み込みが可能となる。

10

20

30

40

50

【0098】

本発明のポリペプチド結合性分子は、好ましくは固相ペプチド合成 (Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963); Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5132 (1985)) を用いて調製される。固相合成は、保護されたアミノ酸を適当な樹脂 (該樹脂は、C末端アミノ酸のカルボキシル基と反応し、後に容易に切断される結合を形成するものであり、ハロメチル樹脂、例えば、クロロメチル樹脂、ブromoメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、アミノメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、またはt-アルキルオキシカルボニル-ヒドロラジド樹脂などである) に結合させることにより推定ペプチドのカルボキシ末端から始まる。例えば、塩化メチレン中でトリフルオロ酢酸 (TFA) により -アミノ保護基を除去し、例えば、TEA中で中和した後は、合成の次のサイクルにすぐに進行する。残留する -アミノ酸および、必要ならば側鎖保護アミノ酸を、次いで、縮合により逐次所望の順番で連結し、樹脂に結合した中間体化合物を得る。あるいはまた、いくつかのアミノ酸を互いに連結させてオリゴペプチドを形成した後、該オリゴペプチドを付加して固相ポリペプチド鎖にする。

【0099】

2つのアミノ酸間、またはアミノ酸とペプチド間、またはペプチドとペプチド間の縮合は、アジド法、混合酸無水物法、DCC (ジシクロヘキシルカルボジイミド) 法、活性エステル法 (p-ニトロフェニルエステル法)、BOP [ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート] 法、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル法) およびWoodward試薬K法などの標準的な縮合法に従って行ない得る。

【0100】

種々のアミノ酸部分の反応性側鎖基を、鎖が完全に合成された後にその基を最終的に除去するまでその部位で適当な保護基によって保護することは、ペプチドの化学合成に一般的である。アミノ酸または断片の -アミノ基の保護もまた一般的であるが、その実体がカルボキシル基で反応した後、 -アミノ保護基を選択的に除去すると、その位置で次の反応が起こる。したがって、合成の一工程として、側鎖保護基を有する種々のこれらの残基を有するペプチド鎖の所望の配列内に位置するアミノ酸残基の各々を含む中間体化合物を作製することは一般的である。これらの保護基は、次いで、一般に、精製後に所望の生成産物を作製するために実質的に同時に除去される。

【0101】

- および -アミノ側鎖基を保護するための典型的な保護基は、ベンキシルオキシカルボニル (Z)、イソニコチルオキシカルボニル (iNOC)、O-クロロベンジルオキシカルボニル [Z(NO₂)]、p-メトキシベンジルオキシカルボニル [Z(OMe)]、t-ブトキシカルボニル (Boc)、t-アミイオキシカルボニル (Aoc)、イソボルニルオキシカルボニル、アダマチルオキシカルボニル、2-(4-ピフェニル)-2-プロピルオキシカルボニル (Bpoc)、9-フルオレニルメトキシカルボニル (F

m o c)、メチルスルホニエトキシカルボニル (M s c)、トリフルオロアセチル、フタリル、ホルミル、2 - ニトロフェニルスルフェニル (N P S)、ジフェニルホスフィノチオイル (P p t)、ジメチルホスフィノチオイル (M p t) などが例示される。

【 0 1 0 2 】

カルボキシル基の保護基としては、例えば、ベンジルエステル (O B z l)、シクロヘキシルエステル (C h x)、4 - ニトロベンジルエステル (O N b)、t - ブチルエステル (O b u t)、4 - ピリジルメチルエステル (O P i c) などが例示され得る。アミノ基およびカルボキシル基以外の官能基を有するアルギニン、システインおよびセリンなどの特定のアミノ酸は、必要に応じて適当な保護基で保護されることが望ましい。例えば、アルギニンのグアニジド基は、ニトロ、p - トルエンスルホニル、ベンジロキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、p - メトキシベンゼンスルホニル、4 - メトキシ - 2 , 6 - ジメチルベンゼンスルホニル (M d s)、1 , 3 , 5 - トリメチルフェニルスルホニル (M t s) などで保護され得る。システインのチオール基は、p - メトキシベンジル、トリフェニルメチル、アセチルアミノメチルエチルカルバモイル、4 - メチルベンジル、2 , 4 , 6 - トリメチル - ベンジル (T m b) などにより保護され得、セリンのヒドロキシル基は、ベンジル、t - ブチル、アセチル、テトラヒドロピラニルなどにより保護することができる。

10

【 0 1 0 3 】

所望のアミノ酸配列が完成した後、液体 H F および 1 つ以上のチオを含有するスカベンジャーなどの、ペプチドを樹脂から切断するだけでなく、残留するすべての側鎖保護基も切断する試薬での処理により中間体ペプチドを樹脂支持体から除去する。H F での切断後、タンパク質配列をエーテルで洗浄し、大容量の希酢酸に移し、水酸化アンモニウムで約 8 . 0 に調整された p H で攪拌する。p H を調整すると、ポリペプチドは所望のコンホメーション構成をとる。

20

【 0 1 0 4 】

本発明によるポリペプチドはまた、事業としてペプチド合成を提供する企業 (例えば、B A C H E M B i o s c i e n c e , I n c . , K i n g o f P r u s s i a , P A ; Q u a l i t y C o n t r o l l e d B i o c h e m i c a l s , I n c . , H o p k i n t o n , M A) により商業的に調製され得る。

【 0 1 0 5 】

検出および精製における結合性分子の使用

全血、血漿、トランスジェニック乳、トランスジェニックニワトリの卵および馴化培地、またはかかる F c 領域標的を含む溶液もしくは供給流れなどの溶液中において、単独または大分子 (例えば、天然もしくは合成の免疫グロブリンまたはその F c 領域含有フラグメント) のドメインとして存在する F c 領域ポリペプチドの検出のため、本発明による結合性分子を検出可能に標識、例えば、放射性標識または酵素的に標識することができ、次いで、溶液と接触させ、その後、結合性分子と F c 領域ポリペプチド標的との複合体の形成を検出することができる。あるいはまた、本発明によるファージ結合性分子、すなわち F c 領域結合性ポリペプチドをその表面上にディスプレイする組換えファージは、反応チューブ内の沈殿として検出可能な F c 領域ポリペプチドとの複合体を形成し、これは、沈降または遠心分離後に可視的に検出することができる。

30

40

【 0 1 0 6 】

あるいはまた、サンドイッチ型アッセイを使用してもよく、ここでは、F c 領域結合性分子をプラスチックチューブもしくはウェルなどの固体支持体またはセファロースビーズなどのクロマトグラフィーマトリックス上に固定し、次いで、F c 領域ポリペプチド標的を含むと思われる溶液を固定した結合性分子と接触させ、非結合性物質を洗浄して除去し、複合体を形成した F c 領域ポリペプチドを、F c 領域標的を認識するモノクローナル抗体などの適当な検出試薬 (該試薬は、当該技術分野で公知のいくつかの慣用手段により検出可能であり、検出可能に標識されたもの、例えば放射性標識されたもの、または西洋ワサビペルオキシダーゼなどのような酵素的に標識されたものを含む) を用いて検出する。

50

【0107】

本発明による結合性分子は、アフィニティークロマトグラフィー法によりFc領域ポリペプチドを単離するのに極めて有用である。任意のクロマトグラフィー慣用法を使用し得る。好ましくは、本発明の結合性分子は、例えば、クロマトグラフィーカラムに充填するのに適した固体支持体上に固定されている。固定されたアフィニティリガンドを、次いで、結合性分子/Fc領域ポリペプチド複合体の形成に好都合な条件下で負荷するか、または供給流と接触させ得る。非結合性物質を洗浄して除去し、次いで、結合性複合体の解離に好都合な条件に溶液を導入することによりFc領域ポリペプチドを溶出し得る。

【0108】

あるいはまた、Fc領域ポリペプチド標的を含有する溶液と結合性分子を混合し、次いで、Fc領域ポリペプチド標的と結合性分子の複合体を単離することによりバッチクロマトグラフィーを行ない得る。このタイプの分離としては、多くの方法が知られている。例えば、結合性分子を、固体支持体上に固定し、次いで供給流からFc領域ポリペプチド標的とともに濾過により分離する。あるいは、結合性分子を、ポリヒステイル（例えば、ヘキサヒスチジン）などの自身のアフィニティタグ、ビオチン、mycタグなどにより修飾し、これを、アフィニティタグの結合性パートナー、例えば、ポリヒスタグ分子、ビオチン化分子用のストレプトアビジンなどを捕捉するための固定された金属アフィニティークロマトグラフィー樹脂を用いて複合体が形成された後に結合性分子を捕捉するために使用し得る。いったん分離したら、溶出条件下でFc領域ポリペプチド標的を結合性分子から分離し、純粋な形態で回収し得る。

【0109】

正確な結合および放出条件は、本明細書で開示されたFc領域アミノ酸結合性ポリペプチドを得る際に選択されたが、アフィニティ精製において後に使用することによって、同じ単離されたアフィニティリガンドが機能する、より最適な結合および放出条件が明らかとなり得ることに注目されたい。したがって、本発明による単離後、結合性分子を常にライブラリーからの分離をもたらす結合および放出条件下でのみ使用することは決定的なことでない。

【0110】

本発明によるFc領域結合性分子の単離を以下にさらに説明する。以下の実施例に含まれる特定のパラメータは、本発明の実施を説明することを意図するものであり、本発明の範囲をなんら限定するものではない。

【0111】

本発明で使用されるファージライブラリーは、繊維状ファージM13の誘導体において構築される。ディスプレイされたペプチドは、第Xa因子の認識部位を含むリンカーペプチドを介してタンパク質IIIのアミノ末端に融合される。第Xa因子は、ファージを損傷したりファージの感染力を低減させることなく、ディスプレイされたペプチドをファージから切除し得る。

【0112】

化合物の血清半減期を延長するための結合性分子の使用

本発明のFc結合性ポリペプチドの別の使用は、個体の循環系に投与されるか、または進入する治療用または診断用化合物の半減期および全体的な安定性を増大させることである。例えば、米国特許第5,116,944号明細書；欧州特許EP-A2-395918号明細書；国際公開第91/01743号パンフレット（参照によりその全体が本明細書に取り込まれる）を参照のこと。かかる方法では、本明細書に記載のFc結合性ポリペプチドは、治療用または診断用化合物を受ける個体の血液中に存在する抗体に該治療用または診断用化合物を結合させるために使用される。この態様において、本発明のFc結合性ポリペプチドは、共有結合または非共有結合により、選択された治療用または診断用化合物を、Fc結合性ポリペプチド抗体結合性部位をインタクトに維持し、したがって抗体分子になお結合し得る部位にて、所望の診断活性または治療活性を損なうことなく結合する。このようにして、Fc結合性ポリペプチドは、血液中を循環する抗体に目的の診断用/

10

20

30

40

50

治療用化合物を結合させるためのリンカー分子として機能する。

【0113】

本発明のFc結合性ポリペプチドを用いて循環している抗体に診断用または治療用化合物を結合させることは、通常、所望されない高速分解速度または循環からのクリアランスに供される化合物の循環半減期および/または全体的な安定性の増大に特に有用であることが期待される。循環系内の化合物の半減期または全体的な安定性を増大することは、所望の効果を得るために個体に投与されるべき投薬の回数および/または量の減少に適する。任意の適当な診断用化合物は、このようにして抗体分子に連結され得、染料(フルオレセインなど); ^{131}I またはテクネチウム(Tc^{99})含有化合物などの放射性標識; 酵素(西洋ワサビペルオキシダーゼなど); または検出可能な金属(常磁性鉄など)であり得る。特に検出可能な標識が挙げられる。任意の適当な治療用化合物は、このようにして抗体分子に連結され得、薬物、生体医薬品、および目的の任意のポリペプチドが挙げられる。抗体に結合させるために好適なかかる治療薬の例としては、レセプターアゴニストまたはアンタゴニスト、特異的結合性化合物、酵素インヒビター、金属キレート化剤、ビタミンAなどの分子スカベンジャーなどが挙げられるが、これらに限定されない。このような使用に特に重要なのは、トロンピンインヒビター、血栓溶解剤(tPAおよびウロキナーゼなど)、レニンインヒビター、ACEインヒビター、セレクチンリガンド、凝血カスケードのインヒビター、補体調節分子(DAF、CR1、CR2、C4bp、第H因子など)、セリンプロテアーゼ、GPIIb/IIIaアンタゴニストおよびCRFアンタゴニストなどである。

10

20

【0114】

実施例1: Fc領域アミノ酸ペプチドの結合性分子の単離

上述の技術を用い、Fc領域アミノ酸ペプチドのリガンドの結合性分子を単離した。血漿から単離したヒトIgG Fcフラグメント(Calbiochem, cat. #401104)を、ビオチン:Fcタンパク質のモルが2:1の比率で軽くビオチン化した。ビオチン-Fcを非多孔性ストレプトアビジンビーズ(Dynel)に結合した。スクリーニングの前に、ビオチン-ストレプトアビジンビーズに曝露することにより、ライブラリーTN6/6、TN7/4、TN8/9、TN9/4、TN10/9およびTN12/1からストレプトアビジン、ビオチンおよびビーズ結合ファージを枯渇させた。次に、個々のライブラリーを、ビーズ上のストレプトアビジン固定ビオチン-Fc領域標的に対してスクリーニングし、約10倍モル過剰のプロテインAで競合溶出させた。次いで、TN12とTN10ライブラリーがプールされ、TN9とTN8ライブラリーがプールされ、TN7とTN6ライブラリーがプールされるように、プロテインA溶出液のプールを作製した。各ライブラリーからのプロテインA溶出ビーズを同様にしてプールし、大腸菌増殖培地上に直接プレティングして、プロテインAで溶出されない強固に結合したあらゆるファージを捕捉した。プロテインA溶出液ライブラリーペアおよびビーズプレートライブラリーペアを、次いで増幅し、ビーズ上のビオチン-Fcでのスクリーニングをもう2回行なうことにより別個に担持させた。

30

【0115】

回収した単離物の配列決定により、これまで128個の異なるFc領域結合性ポリペプチドが明らかとなった(配列番号: 14~143)。各ライブラリープールからの第3回目のスクリーニングから無作為に選んだファージ単離物を、ストレプトアビジン-ビオチン化Fc、BSA、ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-BSAを示すプレートにおいて、およびポリスチレンプレートのみにおいてファージELISAにより評価した。ビオチン化FcはすべてのIgG Fcアイソタイプを捕捉した。無作為に選んだ単離物のうち、配列が本明細書で開示されている各群の約95%は、ELISA実験で陽性の結合性を示した。また、種々の濃度での可溶性Fc領域ポリペプチドとの競合下でのELISAシグナルにより単離物を試験した。

40

【0116】

実施例2: 結合性試験

50

いくつかの基準、すなわち、固定化Fcの種々の負荷に対する高吸光度、可溶性Fc競合に対する有効応答、および競合的配列解析に基づく代表的な結合性モチーフまたは特有の結合性モチーフのいずれかに基づき、蛍光異方性によりFc結合性定数を測定するため、および結合に影響する種々のパラメータを調べてFcのアフィニティ精製に有用な至適条件を決定するためのさらなる解析のために4つのファージ単離物を選択した：

Fc： Ac - GDDHMCVYTTWGE LIWCDNHEPGPEGGGK - NH₂
 (配列番号：144, DX249と呼ぶ)； Ac - AGPVDCKHHFWWCYWNG
 TPGPEGGGK - NH₂ (配列番号：153, DX251と呼ぶ)； Ac - GDD
 HC YWFREWFNSECPHGEPEGGGK - NH₂ (配列番号：154, D
 X252と呼ぶ)； Ac - AGYYWCNYWGLCPDQGTTPGPEGGGK - NH
 2 (配列番号：155, DX254と呼ぶ)。

10

【0117】

BACHEM Bioscience, Inc., (King of Prussia, PA)によりペプチドを合成し、フルオレセイン標識し、HPLCにより精製した。ヒト血漿IgGアイソフォーム(Fc標的)の混合物または個々のヒト血漿IgGアイソフォーム：IgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4を用いて結合性試験を行なった。すべてのFc標的タンパク質をCalbiochemから得た。

【0118】

すべての測定を、Tecan Polarion 蛍光極性プレートリーダーを用い、10~20μlの容量で、20nMフルオレセイン-標識ペプチドおよび種々の濃度のIgGアイソフォームを用いて38ウェルマイクロプレート中に行なった。すべての結合用バッファは、マイクロプレートへのペプチド吸収を防ぐために0.01%(v/v)Tween 20を含んだ。測定を行なう前に30のマイクロプレート内で10分間結合性混合物を平衡化した。

20

【0119】

ペプチド間の交差競合試験を、20nMフルオレセイン-標識ペプチドおよび1~2μMのIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4を用い、最大100μMの非標識ペプチドまたは5mg/mlプロテインAの存在下および非存在下で行なった。

【0120】

Fc領域結合性ポリペプチドDX249、DX252およびDX254に対するIgGアイソフォームの結合性を示す解離定数を表1に記載する。

30

【0121】

表1に示すデータは、ペプチドが、pH依存的にIgGに結合することを示す。例えば、バッファのpHを5.7から7.4~9.3に上げると、DX249またはDX252とIgGアイソフォームとの間の相互作用のK_Dが増大する。対照的に、DX254はpH依存的にはIgG1またはIgG2に結合しないようである。さらに、表1のデータは、IgGサブタイプ特異性を示し、例えば、DX249は、IgG1、IgG2およびIgG4には結合するがIgG3には結合しない。

【0122】

【表1】

40

表1: 低イオン強度バッファー中でのIgGアイソフォームと合成ペプチド間の解離定数 (K_D)

タンパク質標的	pH [#]	K_D (μM) ^φ		
		DX249	DX252	DX254
IgG1	5.7	0.074 ± 0.053*	0.1 ± 0.056	0.09 ± 0.09
IgG2	5.7	0.068 ± 0.045	>1	>1
IgG3	5.7	>10	0.06 ± 0.1	0.3 ± 0.3
IgG4	5.7	0.3 ± 0.3	>10	>10
IgG1	7.4	0.4 ± 0.06	2.1 ± 2	1.8 ± 0.6
IgG2	7.4	1.8 ± 0.6	3.4 ± 1.5	2 ± 0.7
IgG3	7.4	>10	2.3 ± 0.4	>10
IgG4	7.4	1.9 ± 0.4	3.2 ± 2.6	2.9 ± 1.6
IgG1	9.3	>10	>10	0.4 ± 0.4
IgG2	9.3	>10	>10	2 ± 2.7
IgG3	9.3	>10	>10	>10
IgG4	9.3	>10	>10	>10

*使用したバッファー: 1) pH 5.7, 0.01 M Tris-酢酸
2) pH 7.4, 0.01 M Tris-HCl
3) pH 9.3, 0.01 M 重炭酸ナトリウム

φ K_D 値の誤差は、シグマプロットにより計算した非線形回帰に由来する標準誤差による。

*この特定の測定値は5つの別個の測定の平均である。

10

20

【0123】

表2に示すデータは、バッファー中の塩化ナトリウム濃度を0から100 mMに上げると、pH 5.7でのDX249とIgG1との K_D が約10倍増大することを示す。

【0124】

【表2】

表2: pH 5.7におけるIgG1と合成ペプチド間の解離定数 (K_D) に対する塩化ナトリウム濃度の効果

[NaCl] (M)	K_D (μM) ^φ
	DX249
0	0.074 ± 0.053
0.05	0.3 ± 0.3
0.1	0.97 ± 0.8
0.15	0.84 ± 0.7

*使用したバッファー: 1) pH 5.7, 0.01 M Tris-酢酸
2) pH 5.7, 0.01 M Tris-酢酸, 0.05 M NaCl
3) pH 5.7, 0.01 M Tris-酢酸, 0.1 M NaCl
4) pH 5.7, 0.01 M Tris-酢酸, 0.15 M NaCl

30

【0125】

表3に示すデータは、3種のペプチドすべてが、ほぼ同じ2~5 μM のFc IgGアイソフォーム混合物に結合するようであり、IgG1に対するペプチドの結合性のpH依存性はDX249およびDX252について150~200 mM NaClの存在下で維持されることを示す。IgG1へのDX249の結合性に対する15%エチレングリコール添加の効果は観察されなかった(表3)。

40

【0126】

【表3】

表3: 「高」イオン強度バッファー中でのIgGアイソフォームと合成ポリペプチド間の解離定数 (K_D)

タンパク質	pH	[NaCl] (M)	K_D (μM) ^o		
			DX249	DX252	DX254
Fc	8.0	0.2	2.5 ± 0.5	5.1 ± 3	1.6 ± 0.6
IgG1	5.7	0.15	0.84 ± 0.7		
IgG1	7.4	0.15	1.4 ± 0.4 2.9 ± 0.9	1.9 ± 1.3 2.9 ± 1.6	0.14 ± 0.14 0.4 ± 0.2
IgG1	9.3	0.2	>10	>10	0.6 ± 0.5
IgG2	7.4	0.15	1.1 ± 0.3	3.6 ± 2.1 3.0 ± 2.6	1.1 ± 0.3
IgG3	7.4	0.15	>10	2.7 ± 2	3.0 ± 1.1
IgG4	7.4	0.15	1.9 ± 1.2	>10	>10
IgG1	5.7	0 (15% EG)	0.08 ± 0.2		
IgG1	7.4	0.15 (15% EG)	3.6 ± 2.5		

*使用したバッファー: 1) pH 8.0, 0.05 M Tris-HCl, 0.2 M NaCl
 2) pH 5.7, 0.01 M Tris-酢酸, 0.15 M NaCl
 3) pH 7.4, PBS
 4) pH 9.3, 0.01 M 重炭酸ナトリウム, 0.2 M NaCl
 5) pH 5.7, 0.01 M Tris-酢酸, 15% EG
 6) pH 7.4 PBS, 15% EG

EG: エチレングリコール

【0127】

表4は、IgGアイソフォームを用いた、ペプチドDX249、DX251、DX252およびDX254間の交差競合試験を示す。結果は、DX254は例外である可能性があるが、ペプチドのすべてがFc混合物中の同じアイソフォームの同じ部位に結合するようであることを示す。

【0128】

【表4】

表4: Fc結合に対する合成ペプチド間の交差競合

標識ペプチド	非標識ペプチド			
	DX249	DX251	DX252	DX254
DX249	+	+	+	+
DX252	+	+	+	+
DX254	-	-	-	+

【0129】

表5は、DX249、DX252またはDX254とプロテインA間のFc結合に関する競合試験を示す。データは、試験したペプチドすべてが、プロテインAと競合的にIgG1、IgG2およびIgG4に結合することを示す。対照的に、プロテインAは、IgG3への結合について、DX252と競合しないようであり、おそらくDX254とも競合しないようである。これは、プロテインAがヒトIgG3とは結合しないことが知られているという事実と一致する。

【0130】

10

20

30

40

50

【表5】

表5: Fc結合に対する合成ペプチドとプロテインA間の競合

標識ペプチド	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
DX249	+	+	NB	+
DX252	+	+	-	NB
DX254	+	+	?	NB

NB: 検出された結合なし

?: 添加した競合物による異方性の一部低下

【0131】

上記のデータは、Fcが低いpHでペプチドカラムに結合し、高塩濃度で洗浄され、低い塩濃度で高pHバッファーを用いて溶出されることが可能なアフィニティ精製手順を示す。

10

【0132】

実施例3: さらなる結合研究

ペプチドDX249、DX250およびDX253をアセチル化N-末端ペプチドおよびC-末端アミノ官能基リンカーを用いて修飾し、N-ヒドロキシスクシンイミドセファロースクロマトグラフィー樹脂(Pharmacia)上への固定化を容易にした。さらなる結合研究を以下のペプチドを用いて行なった:

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:144、C末端で蛍光化し、DX249と呼ぶ);

20

Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:145、C末端で蛍光化し、DX301と呼ぶ); および

Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:146、C末端で蛍光化し、DX300と呼ぶ);

【0133】

上記のように、ペプチドを合成し、フルオレセイン標識し、かつHPLC精製した。ヒト血漿IgGアイソフォーム(Fcタンパク質)の混合物または個々のヒト血漿IgGアイソフォーム: IgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4のいずれかを用いて、結合研究を行った。

30

【0134】

Tecan Polarion 蛍光偏光プレートリーダーを使用して、10μlの容量で2nMフルオレセイン標識ペプチドおよび種々の濃度のIgGアイソフォーム標的を用いて384ウェルマイクロプレート中で測定を行なった。Fc結合バッファーは、50mM Tris-HCl、200mM NaCl、pH8.0、0.01% Tween20であった。IgG結合バッファーは、0.01% Tween20を有するPBSであった。測定を行なう前にマイクロプレート中30分で10分間結合混合物を平衡化した。

【0135】

最大の100μM非標識ペプチドの存在下または不在下で、20nMのフルオレセイン標識ペプチドと6μM Fc(DX276を有する)、11.5μM IgG3(DX301を有する)または2μM IgG3(DX300を有する)とを用いて、ペプチド間の交差競合(Cross-competition)研究を行った。

40

【0136】

表6のデータは、ペプチドDX300およびペプチドDX301が両方、IgGアイソフォーム特異性を示すことを説明する。DX300はIgG3のみ結合し、一方DX301はIgG1、IgG2およびIgG4を結合するが、IgG3を結合しない。

【0137】

【表6】

表6: DX300およびDX301に対する解離定数

タンパク質	DX300 K_D (μM)	DX301 K_D (μM)
Fc	結合せず	6.8 ± 4.3
IgG1	結合せず	3.6 ± 2.6
IgG2	結合せず	2.3 ± 0.8
IgG3	4.1 ± 4.6	結合せず
IgG4	結合せず	9.7 ± 13

【0138】

実施例4:さらなる交差競合研究

以下の可溶性Fc-領域結合ペプチドに対するペプチドDX276、DX300およびDX301の標識Fc結合を試験する交差競合研究を行った: 10

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:144、DX249と呼ぶ);

Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:146、DX250と呼ぶ);

Ac-AGPVDCKHHFWWCYWNGTPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:153、DX251と呼ぶ);

Ac-GDDDHICYWFREWFNSECPHGPEGGGK-NH₂ (配列番号:154、DX252と呼ぶ);

Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:145、DX253と呼ぶ);

および

Ac-AGYYWCNYWGLCPDQGTGPEGGGK-NH₂ (配列番号:155、DX254と呼ぶ);

【0139】

表7は、上記標識ペプチドおよびタンパク質標的ならびに可溶性競合剤DX249、DX250、DX251、DX252、DX253、およびDX254を用いる交差競合実験の結果を示す。 20

【0140】

表7のデータからわかるように、ペプチドDX249はDX300と競合せず、したがってIgG3に結合しない。

【0141】

ペプチドDX250は、その標識ペプチド対応物、すなわちDX300と競合するが、DX276およびDX301とも競合し、このことはIgG1および/またはIgG2またはIgG4に弱く結合しうることを示唆する。ペプチドDX251およびDX252は、DX276と競合するのみである。

【0142】

ペプチドDX253は、DX300と競合せず、したがってIgG3に結合しない。 30

【0143】

最後に、ペプチドDX254は、調査した全てのフルオレセイン標識ペプチドと競合するようである。

【0144】

【表7】

表7: 交差競合

標識ペプチド	タンパク質標的	非標識ペプチド					
		DX249	DX250	DX251	DX252	DX253	DX254
DX276	Fc	+	+	+	+	+	+
DX300	IgG3	-	+	-	-	-	+
DX301	Fc	+	+	-	-	+	+

40

【0145】

実施例5:解離定数

それぞれ、配列番号:57、58、108、115、124および143のFc-領域結合ペプチドを用いて調製した以下のペプチドに対する解離定数を決定した:

Ac-AGSYWCKIWDVCPQSPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:147、DX392と呼ぶ);

Ac-AGKYWCNLWGVCPANPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:148、DX395と呼ぶ);

Ac-AGTYWCTFWELPCDPAPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:149、DX404と呼ぶ);

Ac-AGPHNCDDHYWYCKWFPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:150、DX389と呼ぶ);

Ac-AGAATCSTSYWYYQWFCTDSPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:151、DX398と呼ぶ); および

Ac-AGYWYCWFPDRPECPLYPGPEGGGK-NH₂ (配列番号:152、DX413と呼ぶ);

【0146】

ペプチドをBACHEMにより合成し、次にオレゴングリーン(Oregon Green)標識し、HPLC精製した。Calbiochemから得られるヒト血漿IgGアイソフォーム: IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を用いて、結合研究を行った。 10

【0147】

pH4.0、7.5または9.5のいずれかで、以下のバッファー中の塩有りまたは無しで、結合研究を行った。

【0148】

1) 10mMクエン酸ナトリウム、0.01% Tween20、pH4.0;

2) 10mMクエン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、0.01% Tween20、pH4.0;

3) 10mM Tris-HCl、0.01% Tween20、pH7.5;

4) 10mM Tris-HCl、500mM塩化ナトリウム、0.01% Tween20、pH7.5; 20

5) 10mM炭酸水素ナトリウム、0.01% Tween20、pH9.5;

6) 10mM 炭酸水素ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、0.01% Tween20、pH9.5; または

7) TBS、0.01% Tween20、pH7.5

【0149】

結合研究の結果を表8に示す。

【0150】

【表8】

表8: オレゴングリーン標識ペプチドに結合するIgGのK_D値の要約

ペプチド	IgG アイソフォーム	K _D (μM)						TBS
		pH 4.0 - 塩	pH 4.0 + 塩	pH 7.5 - 塩	pH 7.5 + 塩	pH 9.5 - 塩	pH 9.5 + 塩	
DX389	IgG1	nb*	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	IgG2	nb	nb	nb	結合 ^o	nb	nb	nb
	IgG3	2.5 ± 1.0	1.8 ± 1.4	nb	結合	nb	nb	nb
	IgG4	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
DX392	IgG1	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	IgG2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	IgG3	0.32 ± 0.08	0.6 ± 0.2	nb	結合	nb	結合	nb
	IgG4	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
DX395	IgG1	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	IgG2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	IgG3	1.0 ± 0.26	1.8 ± 1	nb	1.9 ± 0.9	nb	結合	nb
	IgG4	nb	nb	結合	nb	nb	nb	nb
DX398	IgG1	2.4 ± 3.3	nb	4.6 ± 1.2	nb	nb	nb	nb
	IgG2	1.8 ± 1.2	nb	nb	nb	結合	nb	nb
	IgG3	0.02 ± 1.0	0.04 ± 0.01	nb	0.3 ± 0.03	結合	0.3 ± 0.1	結合
	IgG4	1.6 ± 1.5	nb	3.5 ± 0.8	nb	nb	nb	nb
DX404	IgG1	1.5 ± 0.8	2.0 ± 1.7	8.8 ± 4.0	nb	nb	nb	nd
	IgG2	1 ± 0.4	2.0 ± 1	8.6 ± 3.5	nb	nb	nb	nd
	IgG3	0.01 ± 0.01	0.20 ± 0.06	11 ± 5.4	3.7 ± 0.8	nb	結合	nd
	IgG4	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nd [#]
DX413	IgG1	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nd
	IgG2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nd
	IgG3	0.84 ± 0.08	1.1 ± 0.2	nb	nb	nb	nb	nd
	IgG4	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nd

*nb: 有意な結合は観察されなかった

^o結合: ペプチドは結合するようには見えるが、シグナル変化はK_Dの確かな見積もりを得るには適当でなかった。K_Dを10 μMより大きいと見積もる。[#]nd: 測定せず

10

20

30

40

50

【 0 1 5 1 】

表 8 に示される結果は、DX389が、pH4.0で塩の存在下または不在下のいずれにおいても中程度の親和性(K_Dはほぼ2 μM)でIgG3に特異的に結合することを示す。この相互作用は、塩の存在下または不在下においてpH7.5または9.5のいずれでも観察されなかった。

【 0 1 5 2 】

ペプチドDX392は、pH4.0で塩の存在下および不在下の両方において高い親和性(K_Dはほぼ0.3~0.6 μM)で、IgG3に特異的に結合した。この相互作用は、塩の存在下においてpH7.5およびpH9.5で低く、塩の不在下においてはいずれのpHでも観察されなかった。

【 0 1 5 3 】

ペプチドDX395は、pH4.0で塩の存在下または不在下のいずれにおいても中程度親和性(K_Dはほぼ1~2 μM)でIgG3に特異的に結合する。この親和性は、塩の存在下においてほぼ同じ(K_Dはほぼ1.9 μM)であった。この相互作用は、塩の存在下においてpH9.5で減少し、塩の不在下においてpH7.5または9.5で観察されなかった。

【 0 1 5 4 】

ペプチドDX398は、pH4.0で塩の不在下において全ての4つのIgGアイソフォームに結合し、IgG1、IgG2およびIgG4に対して中程度の親和性(K_Dはほぼ2 μM)、およびIgG3に対して高親和性(K_Dはほぼ0.02 μM)であった。塩の存在下においてpH4.0でペプチドDX398は、IgG3に対して高親和性を維持したが、IgG、IgG2またはIgG4とは相互作用しなかった。

【 0 1 5 5 】

pH7.5で、DX398は、塩の不在下においてIgG1およびIgG4のみに結合し、塩の存在下におい

てIgG3のみに結合した。pH9.5で、このペプチドはIgG3のみ結合し、相互作用はイオン強度の増加により促進された。

【0156】

ペプチドDX404は、pH4.0で塩の存在下または不在下において中程度の親和性(K_D はほぼ $2\mu\text{M}$)でIgG1およびIgG2に結合し、IgG3に対して高親和性(K_D はほぼ $.01\mu\text{M}$)を有した。塩の存在下において、IgG3に対する親和性は、 $0.2\mu\text{M}$ に増加した。IgG1およびIgG2に対する親和性は、塩の不在下においてpH7.5で減少し、塩の存在下においてまたはpH9.5では観察されなかったpH7.5および9.5でのIgG3結合は、塩の存在で促進された。

【0157】

ペプチドDX413は、pH4.0で塩の存在下または不在下において中程度の親和性(K_D はほぼ $1.0\mu\text{M}$)でIgG3にのみ結合した。 10

【0158】

表8中のデータは、ペプチドが、pHおよび塩依存様式で変化するアイソフォーム特異性を伴ってIgGに結合することを示す。一般に、表8中のペプチドは、それらの特異性および相互作用の形態に基づいて2つの「クラス」に分類されうる：

クラス1は、DX389、DX392、DX395およびDX413を含む。特にこれらのペプチドは、全てIgG3に主な特異性を示すように見える。さらに、相互作用は、低pHおよび高イオン強度により促進されるようである。結合は、高いpHおよび低い塩で最も弱い。

クラス2は、DX398を含む。このペプチドは、イオン強度により変更可能なアイソフォーム特異性を示す。塩の不在下において低いpHでこのペプチドは全てのIgGアイソフォームに結合するが、pH4.0、7.5および9.5で塩の存在下において非常に高い親和性(K_D はほぼ $.04\sim 0.3\mu\text{M}$)でIgG3を結合するのみである(表8参照)。DX404はDX398に類似するが、このペプチドはDX398とは異なりpH4.0で塩依存性IgG3特異性を示さないが、pH7.5および9.5で塩依存性IgG3特異性を示す。 20

【0159】

さらに、この研究は、異方性測定における蛍光プローブとしてのオレゴングリーンの使用のための最初の詳細な説明を与える。このプローブは、フルオレセインに類似する光物理学的パラメーターを示し、広いpH領域にわたりそれが蛍光であるという利点を提供する。pH範囲におけるこの増加は、オレゴングリーンの両方において見出されるカルボン酸基の低いpKa(pKa = オレゴングリーンの場合4.7対フルオレセインの場合6.4)による。 30

【0160】

上記蛍光異方性データは、混合したヒトFcおよび種々のIgG Fcアイソフォームに対する開示されたFc-領域結合ポリペプチドのいくつかの結合特性を示す。pHおよびNaCl依存研究は、結合および溶出条件に対する潜在的な機構を示す。このデータは、考えられるアフィニティー精製スキームが、低pHバッファーにおいてペプチドのFcへの結合、続く高い塩の洗浄および低い塩、高いpHバッファーを用いる溶出を伴うことを示している。

【0161】

実施例6：バッチ結合評価

選択された固定化DXペプチド(親和性媒体)の $10\mu\text{l}$ のアリコート(充填総容積)を、以下の各標的：ヒトIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4(全てのヒトサブタイプは、黒色腫患者に由来した。それぞれCalbiochem、カタログ番号400120、400122、400124および400126)の 0.5mg/ml の $100\mu\text{l}$ の溶液($10\mu\text{l}$ 樹脂当たり $50\mu\text{g}$ または 5.0mg/ml)を用いてインキュベートすることにより、バッチ結合研究を行った。さらに、以下の標的、全ての非分画IgGもまた、選択した固定化ペプチドを用いて類似のフォーマットで種特異的特性について評価した：ヒトIgG、ヤギIgGおよびウシIgGおよびマウスIgG(それぞれSigma、製造番号I4506、I5256、I5506およびI5381)。さらに、加水分解NHS-活性化セファロース4 Fast Flow(Amersham Pharmacia Biotech、製造番号17-0906-01)および固定化組換えプロテインA(RepliGen Corp.、製造番号IPA-400)の $10\mu\text{l}$ のアリコートもまた、陰性または陽性対照として分析した。150mM NaClと0.01% Tween20とを含有する10mMリン酸バッファー、pH7.2(PBST)または 40 50

150mM NaClと0.01% Tween-20とを含有する50mM Trisバッファー、pH7.5(TBST)中に、IgG標的を希釈した。バッチ(静的)結合および溶出研究を、96-ウェルアッセイフィルタープレート(0.45 μ mのDurapore膜を有するMillipore MultiScreen-HV、製造番号MAHVN4510)中に行った。室温で攪拌しながら1~1.5時間、標的を樹脂とのインキュベートに供した。非結合標的を、試料の遠心分離によりアッセイプレートから低-UV吸収96-ウェル回収プレート(Costar, 製造番号3635またはGreiner, 製造番号655801)に直接回収した。次に、バッファーブランクに対してマイクロプレート分光光度計(Molecular Devices Corp., SPECTRAMax PLUS)上で回収プレートの280nmの吸光度(1cm道長、1.4mg/ml A280吸光係数に対して正規化する)を読むことにより非結合標的を定量した。

【0162】

対応する条件の対照値(回収プレートに直接添加された濾過されていない対照および/または陰性対照)から非結合と決定された質量を引くことにより、結合標的の百分率を決定した。アッセイプレートを200 μ lの結合バッファーで減圧濾過により洗浄し(3 \times)、続いて100 μ lの種々の溶出条件(例えば、0.1M炭酸水素ナトリウムバッファー、pH8.5および/または0.1Mクエン酸ナトリウムバッファー、pH4.0)の添加を行った。室温で攪拌しながら30~60分のインキュベーション後、溶出した標的をアッセイプレートの遠心分離により別の回収プレートに回収し、類似の様式で定量した。次に、全負荷の百分率溶出を決定し、種々の条件下で溶出回収効率を特徴づけた。次に、アッセイプレートを200 μ lの結合バッファーで減圧濾過により洗浄し(3 \times)、続いて樹脂洗浄条件(例えば、0.1M CAPSバッファー(3-[シクロヘキシルアミノ]-1-プロパン-スルホン酸)pH11.5)の添加を行ない、再使用のために樹脂を再生させた。百分率質量バランス(mass balance)決定を計算し、平均で90~100%であった。

【0163】

【表9】

表9: %IgG捕捉-バッチ結合:ヒトIgGサブタイプ特異性

	ヒト IgG1	ヒト IgG2	ヒト IgG3	ヒト IgG4
Prot. A	95	92	1	96
DX249	91	92	0	82
DX253	58	56	7	33
DX398	6	0	79	2
DX404	38	11	74	10
DX392	13	15	76	9
DX395	21	2	85	4
DX252	34	24	35	6
DX254	28	16	36	6
DX389	4	11	26	3
DX251	6	14	5	1

【0164】

【表10】

表10: ヒトIgGのバッチ結合(bdg)および溶出(elu)(全負荷の%)

	ヒト IgG1			ヒト IgG2			ヒト IgG3			ヒト IgG4		
	bdg	elu pH		bdg	elu pH		bdg	elu pH		bdg	elu pH	
	%	8.5	4.0	%	8.5	4.0	%	8.5	4.0	%	8.5	4.0
Prot. A	93	2	79	93	8	75	5	0	0	92	2	95
DX249	91	63	51	92	54	63	3	0	0	82	66	54
DX252	37	19	30	37	8	10	44	8	5	14	4	N/A
DX253	56	44	14	63	32	12	15	0	5	40	22	N/A

【0165】

【表 1 1】

表11: %IgG捕捉-バッチ結合:種特異性

	ヒト IgG	ヤギ IgG	ウシ IgG	マウス IgG
Prot. A	86	23	72	77
DX249	84	0	0	0
DX253	54	0	0	2
DX398	9	0	2	4
DX404	30	0	0	2
DX392	4	0	0	0
DX395	19	0	0	0
DX252	20	0	0	1
DX254	16	0	0	2
DX389	4	0	0	0
DX251	4	0	0	4

10

【0166】

表9における結果は、親和性媒体DX249およびDX253がプロテインAへの類似のバッチ結合特性を示し、それらがヒト免疫グロブリンのFc領域と類似の様式で相互作用しうることを示すことを説明する。他の親和性媒体は、有意に異なる結合特性を示し、プロテインAは結合しないヒトIgG3イソタイプへの有意な結合親和性を伴った。hIgG標的溶出をまた、プロテインAと関連して選択した固定化DXペプチド(親和性媒体)に対して説明した。全hIgG負荷の百分率溶出(表10)は、酸性pH範囲(pH4.0)で溶出するプロテインAと比べて親和性媒体DX249およびDX253がpH4.0と8.5で溶出することを示した。さらに、試験した親和性媒体は、プロテインAと比較してヤギ、ウシおよびマウスIgGへの有意な結合を示さなかった(表11を参照のこと)。プロテインAは、試験したヤギ、ウシおよびマウス免疫グロブリンへの中程度に高い結合親和性を示した。

20

【0167】

実施例7:Fc-結合親和性媒体のクロマトグラフィー性能

選択した固定化DXペプチド(親和性媒体)で充填されたミニクロマトグラフィーカラム上の動的条件下での結合研究は、上記バッチ結合研究で見出されるものに類似の結合プロフィールを示した。したがって、PBST、pH7.2またはTBST、pH7.3中0.250mg/mlで250 μ gの標的(hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4、ヤギIgGおよびウシIgG)を、350 μ l(3 \times 50mm)のカラムに充填し、0.200ml/分、流速(170cm/hr)で流した。流動、溶出および清浄画分を回収し、サイズ排除HPLCにより全タンパク質回収について分析した。質量バランスの百分率をまた平均90~100%であると決定した。結合効率パーセントは、バッチ測定で見られるものよりも通常高く、そのため親和性媒体DX249およびDX253は、hIgG1、hIgG2およびhIgG4に対するプロテインAと類似の結合効率(全て>90%)を示した。親和性媒体DX404はまた、hIgG3に対して特異的に高い結合効率を示した。さらに、試験した親和性媒体は、ヤギまたはウシIgGに対して有意な親和性を示さなかった。プロテインAは、ヤギおよびウシIgGの両方に対してそれぞれ中~高い結合効率を再び示した。

30

【0168】

バッチ結合研究に基づく別の研究において、3つの親和性媒体、DX249、DX253およびDX252を、類似のクロマトグラフィー系におけるさらなる評価のために選択した。これらの実験のために、350 μ lのカラム(3 \times 50mm)を各媒体で充填した。ヒトFc断片またはヒトIgG1(それぞれCalbiochem、401104および400120)を0.5g/lの濃度でPBST、pH7.2に加えてカラムを試験した。65 μ gのFcを各々のカラムに負荷した。負荷後、カラムをPBST、pH7.2で洗浄し、30mM H₃PO₄、150mM NaCl、pH2.0で溶出し、0.1M CAPS、pH11.5バッファー(3-[シクロヘキシルアミノ]-1-プロパン-スルホン酸)で清浄した。回収した画分を2.0M Tris pH8.0を用いてpH約7.2に直ちに中和した。全てのカラム操作を200 μ l/分で行った(170cm/hr)。

40

【0169】

結果は、親和性媒体DX249およびDX253が、FcおよびIgG1両方の定量的結合を示すことを説

50

明する（捕捉効率92%以上）。親和性媒体DX252は、バッチ結合研究で行われるよりも有意に良好であるより低い捕捉効率（それぞれ70および80%）を示した。このことは、クロマトグラフィー系が、バッチ結合系よりも多数の理論的平衡段階を有し、より高い捕捉効率をもたらすはずであるので予測されない。したがって、親和性媒体DX253およびDX252は、結合の85%以上の溶出回収およびサイズ排除HPLC(SEC-HPLC)によるモノマータンパク質の89%以上の純度を示した。

【0170】

実施例8：タバコ抽出物からのヒトFcの捕捉

タバコ抽出物からヒトFcおよびヒトIgG1を捕捉するDX253に基づく親和性媒体の能力を、異なる実験において評価した。使用したタバコ抽出物は、典型的な濃縮ブランクロットであった(CropTech, lot NV100-036)。ヒトFcまたはIgG1を50 μ g/mlでタバコ抽出物に加えた。100 μ g(2ml)を、DX253媒体を充填した350 μ lカラム上に200 μ l/分(170cm/時間)で負荷した。負荷する前に、150mM NaClおよび0.01% Tween20を含有する50mM Trisバッファー、pH7.3(TBST、pH7.3)を用いてカラムを平衡化した。負荷後、1M NaClを含有する50mM Trisバッファー、pH7.3を用いてカラムを洗浄し、続いて30mM H₃PO₄、150mM NaCl、pH2.0を用いて溶出した。次に、0.1M CAPS、pH11.5および別に水中30%イソプロパノール、5%酢酸、約pH2.7を用いてカラムを洗浄した。回収した画分を、サイズ排除HPLCによる解析の前に、2M Tris、pH8を用いて直ちに中和した。結果は、タバコ抽出物からFcおよびIgG1の両方に対してそれぞれ全負荷の91および76%の回収%、ならびに79%および89%のモノマータンパク質の純度を示す。

10

20

【0171】

実施例9：細胞培養上清からのヒトIgG1の捕捉

5%ウシ胎仔血清を含む馴化CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞培養上清からヒトIgG1を捕捉する親和性媒体DX249の能力を評価した。ヒトIgG1(93%モノマー)を馴化CHO培地に50 μ g/mlまで加え、5ml(250 μ g全量)を上記のように350 μ lミニカラム上に負荷した。カラムをPBST、pH7.2を用いてベースラインまで洗浄し、流動画分を回収した。結合IgGを0.1M炭酸水素ナトリウムバッファー、pH9.0を用いて溶出し、0.1M CAPS、pH11.5を用いてカラムを洗浄した。溶出および洗浄画分を、約pH7.2に迅速に中和し、SEC-HPLCによる質量回収に対して分析した。そして、溶出画分において80%回収(98%モノマー)を得た。カラム負荷、流動、溶出および洗浄画分を、ヒトおよびウシIgGの存在に対して電気泳動(SDS-PAGE)、クーマシー染料およびウェスタン解析によりさらに解析した。この解析は、親和性媒体DX249が5%ウシ胎仔血清を含む馴化CHO培地からhIgG1を特異的に捕捉することを示した。この負荷は、ヒトIgGおよびウシIgGの両方の存在を示した。流動画分は、ウシIgGの存在を示し、ヒトIgGは検出できなかった。溶出画分は、ヒトIgG血清の存在を示し、明白なウシIgG混入は無かった。

30

【0172】

これらの結果は、本発明のDX249および同様の特異性を有するペプチドが、ヒト免疫グロブリンおよび他の哺乳動物免疫グロブリンの両方を含む培養培地または他の溶液からヒトFc-領域ポリペプチドを定量的に単離するために使用されうることを示す。

【0173】

実施例10：バッファー中のヤギIgGからのヒトIgG4の捕捉

バッファー中のヤギIgG(5倍過剰)からヒトIgG4を捕捉する親和性媒体DX249の能力をまた評価した。0.250mgのhIgG4(99.5%モノマー)を、全容量1.0mlのPBST、pH7.2中1.0mgのヤギIgGに添加した。そして、1.0mlを、上記のように350 μ lミニカラム上に負荷した。PBST、pH7.2を用いてカラムをベースラインまで洗浄し、流動画分を回収した。結合IgGを0.1M炭酸水素ナトリウムバッファー、pH9.0を用いて溶出し、0.1M CAPS、pH11.5を用いてカラムを洗浄した。溶出および洗浄画分を、pH約7.2に迅速に中和し、SEC-HPLCにより質量回収に対して分析した。そして、溶出画分において87%理論的負荷(ヒトIgG4であると仮定)回収(99.5%モノマー)を得た。同様に、流動画分において102%理論的負荷(ヤギIgGであると仮定)回収を得た。カラム負荷、流動、溶出および洗浄画分を、電気泳動(SDS-

40

50

PAGE)、クーマシー染料によりさらに解析した。この解析は、親和性媒体DX249がバッファ-中5倍過剰のヤギIgGからhIgG45を特異的に捕捉することを示した。この負荷は、ヒトIgGおよびヤギIgGの両方の存在を示した。流動画分は、ヤギIgGの存在を示し、ヒトIgG4は無かった。溶出画分は、ヒトIgG4の存在を示し、明白なヤギIgG混入は無かった。清浄画分は、タンパク質の存在を示さなかった。

【0174】

実施例11：ヒトIgGサブタイプのバッチ結合および溶出

DX596（配列番号：157）、DX597（配列番号：158）およびDX1070（配列番号：159）を固定化し、プロテインAおよびDX249およびDX253（配列番号：144および145）に関連した種特異性ならびにヒトIgGサブタイプ結合および溶出の両方についてフィルタープレートフォーマット（前記）において試験した。これらの試験のために合成したポリペプチドを、以下の表12に示す。

10

【0175】

DX596は、選択配列内に2つのリジン残基を含み、選択配列（おそらく結合部位である）内のカップリングを防ぐために直交する保護基、ivDdeを用いて合成した。一度C-末端リジンを樹脂に結合させると、ivDde保護基をDMF中2%ヒドラジンをを用いて除去した。ivDde保護基を用いた合成の必要性の除去および脱保護工程の除去が可能であるかどうかを決定するために、これらの2つの内部リジンをアルギニンおよびアラニンで置換した誘導体ポリペプチド(DX1071と示す)を合成した。さらに、このアルギニン-アラニン置換およびさらに隣接するセリン残基のヒスチジンでの置換を有する第2誘導体(DX1072と呼ぶ)を合成した。DX596のこれらの2つの残基置換誘導体(DX1071およびDX1072)をまた固定化し、類似の様式でフィルタープレートフォーマットにおいて試験した。全DX-ペプチドを、定量アミノ酸解析によって決定したように1.8 μM/mlの平均リガンド密度で固定化した。

20

【0176】

【表12】

表12：ペプチド配列

DX-数	アミノ酸配列	配列番号:
DX249	Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDNHEPGPEGGGK-NH ₂	144
DX253	Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	145
DX1070	Ac-GDWGECTVTSYGELIWCGLLEPGPEGGGK-NH ₂	159
DX597	Ac-GDSWNC AFHHNEMVWCDDGGTPGPEGGGK-NH₂	158
DX596	Ac-GDNPMC WKKS WEDAYCINHEPGPEGGGK-NH ₂	157
DX1071	Ac-GDNPMC WRAS WEDAYCINHEPGPEGGGK-NH ₂	160
DX1072	Ac-GDNPMC WRAHW WEDAYCINHEPGPEGGGK-NH ₂	161

30

【0177】

前記表において、Ac-はN-末端アセチル化を示し、-NH₂はC-末端アミド化を示す。

【0178】

以下の表13に示された結果は、ポリペプチドDX596、DX597およびDX1070を用いる親和性媒体が、前記のようにプロテインA、DX249およびDX253と類似のバッチ結合特性を示したことを説明する。IgGは、高pHでプロテインAから溶出されず、一方、DX249、DX253、DX596およびDX597は、低pH(pH2.5~4.5)および高pH(pH9.0および9.5)の両方で効率のよい溶出を示した。リガンド(プロテインAを含む)無しは、pH5.5で良好な溶出を示した。DX1070は、pH3.0でヒトIgGの部分的な溶出のみを示した。DX1070に関してpH3.0以外で溶出されたヒトIgGの有意な量を、3M-グアニジン-HCl、pH7.2を用いて清浄工程で回収した。DX596の置換誘導体であるDX1071は、ヒトIgGの有意な結合を示さなかった。DX1072は、プロテインA、DX249、DX253、DX596、DX597およびDX1070と類似の結合プロフィールを示したが(ヒトIgGサブタイプおよび種特異性の両方)、結合効率は、非常に低かった。

40

【0179】

50

【表 1 3】

表13: ヒトIgGのバッチ結合および溶出(全負荷の%)

hIgG1	結合	pH 2.5	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.5	pH 5.5	pH 9.0	pH 9.5
Prot. A	96	80	80	86	29	3	3	3
DX249	88	65	69	69	37	1	65	68
DX253	86	78	75	54	55	8	44	45
DX596	87	66	N/A	78	61	3	62	58
DX597	93	76	N/A	81	39	1	52	57
DX1070	87	N/A	22	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1071	7	N/A	4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1072	31	N/A	27	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

hIgG2	結合	pH 2.5	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.5	pH 5.5	pH 9.0	pH 9.5
Prot. A	85	75	75	76	65	22	13	18
DX249	78	71	73	63	39	1	60	67
DX253	81	78	69	55	31	0	42	47
DX596	81	71	N/A	92	44	3	58	64
DX597	90	82	N/A	80	38	1	51	60
DX1070	82	N/A	42	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1071	2	N/A	7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1072	21	N/A	21	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

hIgG3	結合	pH 2.5	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.5	pH 5.5	pH 9.0	pH 9.5
Prot. A	0	0	0	0	0	0	0	0
DX249	0	0	0	0	0	0	0	0
DX253	0	0	0	0	0	0	0	0
DX596	0	0	N/A	0	0	0	0	0
DX597	0	0	N/A	0	0	0	0	0
DX1070	0	N/A	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1071	0	N/A	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1072	0	N/A	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

hIgG4	結合	pH 2.5	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.5	pH 5.5	pH 9.0	pH 9.5
Prot. A	89	70	77	87	27	6	7	8
DX249	61	42	43	30	10	4	53	59
DX253	60	49	49	53	23	4	45	62
DX596	65	44	N/A	61	17	2	55	67
DX597	71	50	N/A	62	13	3	56	67
DX1070	59	N/A	14	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1071	1	N/A	5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1072	15	N/A	11	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A = 試験せず

【0180】

種特異性の結果(表14)は、ヤギ、ウシ、およびマウスIgGのDX249、DX253、DX597およびDX1070への有意な結合を示さなかった。DX596は、バックグラウンドより5~8%高いこれらのIgG標的へのわずかに増加したレベルの結合を示した。対照的に、プロテインAは、ヤギ、ウシおよびマウスIgGへの結合を示した。

【0181】

【表 1 4】

表14: %IgG捕捉-バッチ結合:種特異性

	ヒト IgG	ヤギ IgG	ウシ IgG	マウス IgG
Prot. A	81	20	60	69
DX249	74	0	0	2
DX253	71	0	0	2
DX596	72	8	5	5
DX597	77	0	0	3
DX1070	91	0	0	0
DX1071	45	3	0	8
DX1072	49	4	0	0

【0182】

実施例12: DX249およびDX253の静的および動的な能力対リガンド密度

ポリペプチドDX249およびDX253を、NHS-活性化セファロース4 Fast Flow媒体上に0.2、1.0、2.0および4.0 μmole リガンド/ml媒体の名目上の(nominal)リガンド密度で(前記のよ

10

20

30

40

50

うに)固定化した。これらの媒体を、対照として、単一密度の市販の固定化組換えプロテインA(Repligen, IPA400)との静的(フィルタープレート)および動的(ミニカラム)様式の両方でのヒトIgG結合能力におけるリガンド密度の効果を決定するために使用した。実際のリガンド密度を、定量アミノ酸解析によって確認したように0.17~3.2 μ mole/ml媒体の範囲で得た。

【0183】

静止(フィルタープレート)様式

96-ウェルアッセイフィルタープレート(Millipore MultiScreen-HV、0.45 μ m Durepore膜、製造番号MAHVN4510)、試験対象の各媒体の10 μ l(充填総体積)、DX249(4密度)、DX253(4密度)、加水分解NHS-セファロース4FF、およびrプロテインA(Repligen Corp. 製造番号IPA-400)を種々の量のヒトIgG(0.0、1.25、2.5および/または20.0mg/mlまで)を含む100 μ lのPBST(10mMリン酸バッファー、150mM NaCl、0.05% Tween-20、pH7.5)中に懸濁した。攪拌しながら室温で1時間の試料のインキュベーション後、非結合IgGを含む各ウェル由来の上清液体を、回収プレートの同系ウェルに遠心分離により回収した。アッセイプレートを3回PBST(200 μ l/洗浄)で洗浄し、100 μ l溶出バッファー(100mM CAPS、pH11.5)中室温で30~60分のインキュベーションにより媒体試料から結合IgGを溶出した。解析のために遠心分離により溶出液を回収した。 A_{280} 測定から、タンパク質濃度を決定し、樹脂1mlあたりに結合したヒトIgGのmg対樹脂1mlあたりに適用したヒトIgGのmgの関数としてプロットした。

10

【0184】

種々の媒体によって捕捉されたIgGの量(溶出工程において回収されたIgGから見積もる)は、IgG濃度とリガンド密度の両方に依存する。一般に、DX249およびDX253の両方を用いた見掛けの(apparent)相対静的能力は、リガンド密度および標的濃度と共に増加した。リガンドおよび標的濃度の両方が K_D 値に近いこれらの静的条件下で、平衡結合が確立され、全体の能力は、正確に決定され得ない。しかしながら、樹脂1mlあたりに適用された0~25mg IgGのIgG範囲にわたり(0~2.5mg/ml標的を10 μ lの樹脂に添加した)、IgGの捕捉はリニアである。この点を超えて樹脂1mlあたりに適用した200mg IgGのレベルまで、飽和はより明白になる。表15は、DX249およびDX253媒体の両方の見掛けの相対静的結合性能を示す。リガンド密度約1 μ mole/mlでDX249およびDX253媒体は、樹脂1mlあたりに適用した25mg IgGの標的濃度(2.5mg/mlの標的を樹脂10 μ lに添加した)のプロテインA媒体に匹敵する。より高いリガンド密度(特に高い標的濃度を有する)で、DXペプチド媒体の見掛けの相対静的能力は、プロテインA媒体を有意に超える(2~3倍)。

20

30

【0185】

動的(ミニカラム)様式

動的性能試験のために、ミニクロマトグラフィーカラム(Omnifit, 6319)3mm \times 25mm(内部直径 \times 長さ)、0.17mlカラム体積に、種々のDX249、種々のDX253、およびプロテインA媒体を充填した。ヒトIgG(ICN, 55908)を、PBS pH7.2中2.5mg/mlに調製した。IgG溶液を0.2ml/分(170cm/時間)の流速でカラム上に負荷した。カラム溶出物の吸光度を214および280nmの両方でモニターし、全ランにわたって画分を回収した。負荷期間の終わりに、カラム溶出物の280nmでの吸光度がベースラインに戻るまで、カラムをPBSで洗浄した。カラムに結合したIgGを30mM H_3PO_4 、150mM NaCl、pH2.0を用いて溶出し、次に、PBSでベースラインまで洗浄し、次に、0.1M CAPS、pH11.5を用いて清浄した。溶出した全IgGを280nmの全タンパク質吸光度により決定したので、溶出画分のpHの中性化は必要なかった。

40

【0186】

全媒体能力を見積もるために、カラム負荷および流動流の吸光度が同一になるまで(全能力まで負荷)IgGをカラム上に負荷した。カラムをベースラインまで洗浄後、結合IgGを溶出し、この溶出画分から捕捉した全量を決定した。捕捉した全IgGをカラム体積容量で割ったものとして媒体の全能力(mg IgG/ml媒体)を計算した。

【0187】

さらに、10%漏出でのカラム能力を、カラム流動流のオンライン A_{280} 測定から計算した。

50

目的のカラムおよび加水分解セファロースFF4媒体を含有する同等の「ブランク」カラムに対して得られた A_{280} 曲線を、整列させた。注射の時間から、目的のカラムに関する A_{280} 値が100% IgG捕捉飽和の負荷溶液に対して得られた最大 A_{280} 吸光度(100%)の10%に増加した時間までのこれらの曲線間の領域における差異(保持および非保持標的に対する)をグラフにより統合した。標準曲線を使用して、統合領域をmg IgG結合およびカラム体積容量で割った全IgG結合として計算した能力に関連づけた。

【0188】

表15は、試験した9個の種々の親和性媒体に対するこれらの研究の結果を要約する：DX249およびDX253、それぞれアミノ酸解析により測定したように4つの種々のリガンド密度、ならびに不確定な密度の組換えプロテインA(Repligen、#IPA400)。DX249媒体およびDX253媒体の両方に対して、動的小および静的能力値の両方が、リガンド密度の増加と共に増加する。rプロテインA媒体と同様の動的小能力が、約2~3 $\mu\text{mole/ml}$ のリガンド密度で達成される。試験した各リガンド密度に対して、静的および全動的的能力は、溶出により測定されるように同様である。全リガンド密度での2つのDX媒体に対して、10%漏出での能力は全動的能力の約50% ($\pm 20\%$)であり；対照的にrプロテインAに関して約75%である。この小さな差異は、媒体間の速度論またはリガンド利用性の差異から生じうる。

【0189】

【表15】

表15: 種々のIgG親和性樹脂の能力

リガンド	リガンド 密度 ($\mu\text{M/ml}$)	能力 (mg IgG/mL 樹脂)		
		静的	全動的	10% 漏出
DX-253	0.17	1.1	0.6	0.1
	0.84	8.5	5.8	2.6
	1.45	13.5	6.4	2.9
	2.75	17.4	24.1	8.5
DX-249	0.19	1.2	1.2	1.1
	0.86	9.5	8.4	4.4
	1.63	15.4	10.3	5.9
	3.20	19.0	16.4	5.5
rProA	(測定せず)	11.1	16.3	12.9

【0190】

実施例13: DX253カラムサイクリング(再利用)

DX253ペプチドを、定量的アミノ酸解析により決定したように2.9 $\mu\text{mole/ml}$ のリガンド密度でNHS-活性化4 Fast Flow上に固定化した。この親和性樹脂を4.6mm x 6cm(内部直径 x 長さ、1.0体積容量) PEEKカラム(Isolation Technologies, Inc., 5050IP-08046-006-20)に充填した。全能力およびサイクリング研究を行う前に、カラム/親和性マトリックスを100mg BSA負荷、0.1Mクエン酸、pH3.0、3Mグアニジン-HCl、20mMリン酸、pH7.2を用いて予め条件付けし、PBS、pH7.2に再度平衡化した。

【0191】

全能力:

全動的結合能力を確立するために、0.05% Na_3N を含むPBS、pH7.2中に2.5mg/mlでポリクローナルヒトIgG(ICN, 55908)を調製した。全75mg(30ml)を0.21ml/分(75cm/hr)で能力まで(負荷の280nmの吸光度が、カラム流動と同等になるまで)負荷した。画分を全ランにわたり回収した。非結合IgGを、0.42ml/分(150cm/時間)でPBS、pH7.2を用いてベースラインまで洗浄した。結合IgGを0.1Mクエン酸、pH3.0バッファーを用いて溶出し、1M HEPES、pH9.0バッファーの最小添加を用いて約pH7.0に直ちに中和した。PBS、pH7.2でのさらなる洗

浄に続き、カラム / 親和性媒体を3Mグアニジン-HCl、20mMリン酸、pH7.2を用いて清浄し、PBS、pH7.2に再度平衡化して戻した。全ての負荷後洗浄、溶出および清浄工程を流速0.42ml/分(150cm/時間)で行った。1.4の吸光係数を用いて計算した溶出画分の280nmでの吸光度を測定することにより、全mg IgG結合を決定した。開始(T=0、カラムサイクリングの開始前)全動的能力は、アフィニティー樹脂1ml当たり19.8mgヒトIgGと測定した。繰り返しの使用および再利用後のアフィニティーカラムの相対性能を評価するために、この決定を95サイクルの過程の間さらに4回繰り返した。これら5つの全能力決定の質量バランス回収は、平均して98%であった。表16は、19.8mg/mlのT=0、または100%の全能力に基づいて計算した相対カラム性能%を示す。カラムは、95サイクル後、全動的能力に関して約90%の相対性能を保持した。表16に示すように、サイクル0、26、66、86、および96に

10

【0192】

カラムサイクリング

10%ウシ胎仔血清(超低)を含む新鮮な細胞培養培地(DMEM)にヒトIgGを0.5mg/mlまで加えた。PBS、pH7.2で予め平衡化したカラム上に2ml(1.0mg IgG)を負荷した。0.21ml/分(75cm/時間)で負荷を行い、全ての続くステップ(洗浄、溶出および清浄)を0.42ml/分(150cm/時間)で行なった。非結合試料を、PBS、pH7.2でベースラインまで洗浄し、続いて0.1Mクエン酸、pH3.0で溶出し、PBS、pH7.2で洗浄し、3Mグアニジン-HCl、20mMリン酸、pH7.2で清浄し、PBS、pH7.2で再度平衡化して戻した。それぞれ5サイクルの全19系列(全95サイクル)をランさせた。表16は、開始サイクル(サイクル1ピーク領域=100%)と比較した溶出ピーク領域回収に関して10サイクルごとの相対性能%を示す。サイクル1~25、27~65、67~85、および87~95についてこの手順を使用した。

20

【0193】

約5%の全動的能力負荷(1.0mg IgG)で、カラム性能は、全能力性能において約10%の減少にかかわらず変化しないままであった。サイクル1、26、41、66、80および95を回収し、溶出したIgG画分を1M HEPES、pH9.0バッファーの最少の添加によりpH約7に直ちに中和した。SDS-PAGE解析(4~12%Tris-グリシゲル、変性/非還元、クーマシー染色)は、細胞培養培地からヒトIgGの完全で効率的な捕捉を示した。溶出画分は、精製された標準と純度が同等であり、研究の過程にわたり一致したままであった。

30

【0194】

【表16】

表16: 様々なサイクルでのDX253セファロースカラムの相対性能

サイクルラン番号	%相対性能	全能力 サイクルラン番号	%相対挙動
1	100	0	100
10	97.6	26	93.9
20	97.9	66	85.9
30	102.3	86	91.4
40	103.1	96	87.9
51	102.0		
60	103.1		
70	102.6		
81	102.1		
90	101.8		

40

【0195】

実施例14: DX249 C-末端切断型 / PEO-リンカー置換:

DX249(配列番号:144)の6個の誘導体の系列を構築し、クロマトグラフィー性能を維持したまま、C-末端スパーサー/リンカー(-PEGGGK、配列番号:168)を含み、より親水性の非ペプチドポリエチレングリコール様リンカーで置換した9個のC-末端残基の切断の可能性を決定した。かかる誘導体は、より迅速に、あまり高価でなく合成されうる。

50

【0196】

表17は、種々のDX249誘導体構築物を示す。末端構造が以下に規定される。31-原子ポリエチレン-グリコール様スペーサー/リンカーを用いてDX905を設計したが、DX905のペプチド合成は失敗した（主に、樹脂上の反応官能基の架橋の結果としての置換の還元のため）。

【0197】

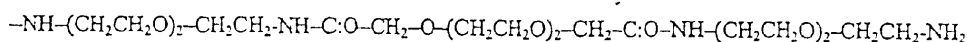
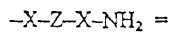
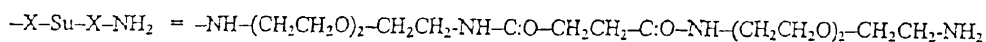
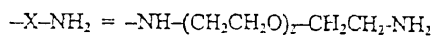
【表17】

表17: DX249C-末端切断型/PEO-リンカー構築物

DX-No.	アミノ酸配列	配列番号:
DX249	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	144
DX877	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEG-X-NH ₂	162
DX878	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPG-X-Su-X-NH ₂	163
DX905*	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPG-X-Z-X-NH ₂	164
DX907	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNH-X-NH ₂	165
DX909	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNH-X-Su-X-NH ₂	166
DX911	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNH-X-Z-X-NH ₂	167

* 合成に失敗

前記表において、Ac-はN-末端アセチル化を示す。末端基は以下である:



【0198】

DX249、DX877、DX878、DX907、DX909およびDX911を合成し、定量的アミノ酸解析により決定した1.9 μmole/mlの平均リガンド密度でNHS-活性化セファロース4 fast flow上に固定化した。続いて、これらを相対静的能力、ヒトIgGサブタイプおよび種特異性についてバッチフィルターフォーマットにおい前記のように試験した。さらに、全動的能力を比較のために決定した。表18は、データの要約である。静的能力（樹脂1 ml当たりmg IgG結合）を2.5mg/ml標的濃度（樹脂1 ml当たり25mgヒトIgG適用）で測定した。配列DX907、DX909およびDX911は、DX249、DX877およびDX878と比較して見掛けの相対静的能力において約2倍の減少を示す。これらの配列は、第2システインの後の最後の種々のアミノ酸に切断され、切断型は減少した親和性を生じうる。ポリクローナルヒトIgGおよびヒトIgGサブタイプの百分率捕捉は、同様の傾向を示す。一般に、配列DX877およびDX878は、DX249と類似の結合特性を示す。種特異性試験は、この系列の誘導体へのウシ、ヤギおよびマウスIgGの有意な結合を示さなかった（データ示さず）。

【0199】

【表18】

10

20

30

40

表18: DX249C-末端切断型/PEG様リンカー置換

バッチ結合(全負荷の捕捉%)							
	hIgG	hIgG1	hIgG2	hIgG3	hIgG4	静的 Cap. mg/ml	動的 Cap. mg/ml
DX249	64	87	77	5	50	24	13
DX877	61	N/D	N/D	N/D	N/D	20	8
DX878	63	N/D	N/D	N/D	N/D	23	9
DX907	49	65	54	7	35	10	5
DX909	49	66	54	9	33	11	N/D
DX911	43	58	46	6	25	9	N/D

N/D = 測定せず

10

【0200】

実施例15: DX249 N-末端切断型 / 残基置換

一般に、配列 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号: 144) を有するDX249の標準Fmoc法を使用する合成は、困難である。この合成およびフォールディングは、主にN-末端のAsp-Asp-His位での転位により、問題がある。したがって、DX249のN-末端切断型誘導体の系列を、設計し、合成する。表19は、種々のDX249構築物を示す。

【0201】

【表19】

表19: DX249N-末端切断型/残基置換構築物

20

DX-No.	アミノ酸配列	配列番号:
DX249	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	144
DX1062	Ac-DHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	169
DX1063	Ac-EHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	170
DX1064	Ac-ACVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	171
DX1065*	Ac-TCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	172
DX1066*	Ac-ECVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	173
DX1067	Ac-VCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	174
DX1068	Ac-[Nle]CVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	175
DX1069	Ac-CVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	176

30

* 固定化せず/試験 [Nle] = ノルロイシン

【0202】

これらのDX249配列バリエーション(未修飾DX249を含む)を合成し、定量的アミノ酸解析により決定した1.9 μmole/mlの平均リガンド密度でNHS-活性化セファロース4 fast flow媒体上に固定化した(DX1065およびDX1066を除く)。前記したように、ヒトIgGサブタイプに対する相対結合効率および種特異性に関してバッチフィルタープレートフォーマットにおいてこれらを試験した。表20は、データの要約である。一般に、全DX249バリエーションは、DX249と類似の結合プロフィールを示す。結合効率は、最初、より広範囲な切断型で減少するように見える傾向がある。しかしながら、第1システイン切断の前に全ての残基を有する配列DX1069は、DX249とほぼ同一の結合特性を示す。種特異性試験は、誘導体の系列へのウシ、ヤギおよびマウスIgGの特異的な結合を示さなかった(データ示さず)。これらのデータおよびC-末端切断型/リンカー置換試験からのデータ(実施例14)は、12~18の全残基のみ有する適切な合成Fc-結合リガンドが、これらの実施例にしたがって作製されることを示す。かかるリガンドは、標準法を用いてより容易にかつ効率よく合成される。

40

【0203】

50

【表 2 0】

表20: DX249N-末端切断型/残基置換

バッチ結合(全負荷の捕捉%)					
	hIgG	hIgG1	hIgG2	hIgG3	hIgG4
DX249	82	84	80	3	67
DX1062	73	73	63	0	49
DX1063	71	73	63	0	45
DX1064	73	70	63	0	39
DX1067	44	33	28	0	25
DX1068	36	33	25	0	21
DX1069	74	77	68	2	51

10

【 0 2 0 4】

実施例 16: DX253 N-末端切断型 / 残基置換

配列 Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (配列番号: 145) を有する DX253 の合成も、主に欠失配列の可能性を与える N-末端の Arg-Arg 位により、困難である。したがって、切断および / または配列の 5 個のアミノ末端残基の位置における種々の残基置換の可能性を決定するために、DX253 の 9 個の誘導体の系列を構築した (上記 DX249 に対するバリエーションと同様)。C-末端ペプチド Spacer / リンカーを含む残りの配列を、保持した。表 21 は、種々の DX253 構築物を示す。

20

【 0 2 0 5】

【表 2 1】

表21: DX253N-末端切断型/残基置換構築物

DX-No.	アミノ酸配列	配列番号:
DX-253	Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	145
DX1139	Ac-SRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	177
DX1140	Ac-RRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	178
DX1141	Ac-ERACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	179
DX1142	Ac-ACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	180
DX1143	Ac-TCSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	181
DX1144	Ac-ECSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	182
DX1145	Ac-VCSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	183
DX1146	Ac-GCSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	184
DX1147	Ac-CSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	185

30

【 0 2 0 6】

これらの DX253 配列バリエーション (未修飾 DX253 を含む) を合成し、2.0 μmole/ml の標的リガンド密度で NHS-活性化セファロース 4 fast flow 媒体上に固定化した。前記したように、ヒト IgG サブタイプに対する相対結合効率および種特異性に関してバッチフィルタープレートフォーマットにおいてこれらを試験した。表 22 は、データの要約である。

40

【 0 2 0 7】

一般に、全 DX253 バリエーションは、DX253 と類似の結合プロフィールを示す。結合効率は、最初、配列 DX1139 ~ DX1141 で減少する傾向がある。しかしながら、配列 DX1142 ~ DX1147 は、DX253 と類似の結合効率を示す。特に興味深いのは、第 1 システイン切断の前に全ての残基を有する DX1147 であり、DX253 とほぼ同一の結合特性を示す。この DX253 誘導ペプチドは、DX253 よりも容易に、かつ効率的に合成される。

【 0 2 0 8】

結合の種々の程度は、部分的には、水性カップリング条件における溶解性の種々の程度の

50

結果としての低いカップリング効率のためでありうる。特に、配列DX1139、DX1140、DX1146およびDX1147は、水性カップリングバッファーに完全には溶解しなかった。しかしながら、rp-HPLCによりモニターされた全9個のDX253バリエーションのカップリング効率は高く、平均>85%であった。実際のリガンド密度は、決定しなかった。種特異性試験は、誘導体のこの系列へのウシ、ヤギおよびマウスIgGの有意な結合を示さなかった(データ示さず)。

【0209】

【表22】

表22: DX253N-末端切断型/残基置換

バッチ結合(全負荷の捕捉%)

	hIgG	hIgG1	hIgG2	hIgG3	hIgG4
DX253	79	88	80	0	58
DX1139	36	43	34	0	22
DX1140	40	43	29	0	20
DX1141	21	17	9	0	2
DX1142	57	66	55	0	39
DX1143	81	88	83	0	55
DX1144	81	88	84	0	61
DX1145	66	74	63	0	42
DX1146	73	83	80	0	50
DX1147	74	83	76	0	47

10

20

【0210】

前記説明に続いて、任意の溶液中からのFc-領域ポリペプチドまたはFc-領域ポリペプチドを含む分子の検出または分離を可能にするアフィニティー結合分子に重要な特徴が、認識されうる。本発明のさらなる結合分子の態様および特定の溶液または供給流に適合させた代替的な方法は、上記説明を調査することにより明らかになるであろう。全てのかかる態様および明らかな代替物は、以下の特許請求の範囲より規定される本発明の範囲内であると意図される。

【0211】

上記に関連した各刊行物は、その全体が参照により本明細書に援用される。

30

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 October 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/086070 A2

- (51) International Patent Classification: C12N (81) Designated States (*national*): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, 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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/12492 (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 18 April 2002 (18.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/284,534 18 April 2001 (18.04.2001) US
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): DVAX CORP. [US/US]; 300 Technology Square, 8th Floor, Cambridge, MA 02139 (US).

Declaration under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for all designations

Published:

without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): RONDON, Isaac, Jesus [US/US]; 90 St. Botolph Street, Apartment #3, Boston, MA 02116 (US). WU, Qi-Long [US/US]; 11 Makin Street, Brighton, MA 02135 (US). LEV, Arthur, C. [US/US]; 122 Adena Road, Newton, MA 02465 (US). STOCHL, Mark [US/US]; 121 Achilles Way, N. Attleboro, MA 02763 (US). RANSOHOFF, Thomas, C. [US/US]; 74 Winter Street, Lexington, MA 02173 (US). POTTER, M., Daniel [US/US]; 176 High Street, Acton, MA 01720 (US).

(74) Agents: ELMORE, Carolyn, S. et al.; Hamilton, Brook, Smith & Reynolds, P.C., 530 Virginia Road, P.O. Box 9133, Concord, MA 01742-9133 (US).

WO 02/086070 A2

(54) Title: BINDING MOLECULES FOR Fc-REGION POLYPEPTIDES

(57) Abstract: Binding molecules for detecting or isolating immunoglobulin Fc-region polypeptides are described, together with methods of use thereof. Preferred Fc-region binding polypeptides, recombinant bacteriophage expressing Fc-region binding polypeptides, and separation media exhibiting such polypeptides are particularly disclosed.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

5

BINDING MOLECULES FOR Fc-REGION POLYPEPTIDES

10

15

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the field of protein isolation and purification. Specifically, the present invention relates to the identification, isolation, and synthesis of molecules that bind to human immunoglobulin Fc-region polypeptides. Such binding molecules are useful for the detection, removal, or purification of isolated Fc-region amino acid sequences or polypeptides such as immunoglobulins or fusion proteins having an Fc region present as one domain of the polypeptide.

BACKGROUND

Antibodies (immunoglobulins) are a group of glycoproteins produced by B lymphocytes in response to the presence of a foreign antigen and are present in the serum and tissue fluids of all mammals. Each antibody molecule is essentially bifunctional: one region of the molecule, Fab, contains the antigen binding site(s), and a second region, Fc (for "fragment crystallizable"), can contain effector sequences that, for instance, facilitate the binding of the antibody molecule to Fc receptors located on the surface of various cells of the immune system, such as macrophages and neutrophils.

It has been shown that the Fc regions of various immunoglobulins, particularly IgG, possess an affinity for Staphylococcal Protein A (Ey et al., *Immunochemistry*, 15: 429-436 (1978)), and several methods have been developed to exploit this interaction to purify both polyclonal and monoclonal antibodies. For instance, Ngo et al., U.S. Pat. No. 4,801,687, describes a method for the purification of a monoclonal antibody from a fluid (e.g., serum) by contacting the fluid with Protein A

WO 02/086070

PCT/US02/12492

immobilized on an affinity column. Ngo et al. demonstrated that IgG, in a buffer containing a combination of monovalent cations and polybasic anions, forms a binding complex with Protein A under conditions of high pH (7.5-10) and will dissociate when contacted with a solution of low pH, i.e., pH 3-6. Shadle et al., U.S. Pat. No. 5,429,746, purified an IgG utilizing a hydrophobic interaction chromatography (HIC) protocol or a multistep procedure utilizing a Protein A affinity step, followed by an ion exchange step, followed by a HIC step.

However, Protein A does not discriminate between IgG's from different species. Thus, to develop transgenic models for the production of human-specific immunoglobulin ligands, it is essential to develop ligands that bind human immunoglobulins specifically, and not any of the immunoglobulins of the transgenic host.

However, other antibody purification methods have been developed that do not require the use of Protein A. For example, Crane et al., U.S. Pat. No. 4,606,825 describes the purification of IgG from a biological fluid by a liquid column chromatography procedure utilizing a silica gel to bind the immunoglobulin followed by elution in a buffer having a pH of 5.5-8.3. Sullivan et al., U.S. Pat. No. 4,849,352 describes the purification of Fab and F(ab)₂ fragments by affinity chromatography using polyacrylamide gels; and Raison et al., U.S. Pat. No. 5,077,391 describes the purification of IgM by complexing with immobilized C1q, a protein involved in the complement pathway.

Another antibody purification method is described by Hakalahti et al., *J. Immunol. Meth.*, 117: 131-136 (1989), utilizing a protocol employing two successive ion exchange chromatographic steps or a single ion exchange step followed by a hydrophobic interaction chromatography (HIC) step.

However, a disadvantage of these antibody purification methods is the requirement for a multiple binding domain protein affinity ligand, Protein A, and/or multiple purification columns. For instance, Ibrahim, *Scand. J. Immunol.*, 38: 368-374 (1993), reported that Protein A has a total of five homology domains (A-E) and that up to four of these domains bind the Fc region of IgG.

Dybwad et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 102: 438 (1995) examined the potential for isolating ligands for polyclonal antibodies using a phage display library. The library was contacted with rabbit antisera raised against a synthetic 17-mer polypeptide. Dybwad et al. reported that the sequence of many of the positive phage demonstrated high sequence homology to the 17-mer peptide. Fassina et al., *J. Mol. Recognit.*, 9: 564 (1996) screened a synthetic multimeric peptide library to identify a Protein A mimetic peptide possessing the ability to compete with the interaction between Protein A and biotinylated immunoglobulins. Ehrlich et al., *J. Mol. Recognit.*, 11: 121-125 (1998) treated a

WO 02/086070

PCT/US02/12492

humanized IgG1 monoclonal antibody with pepsin to separate pFc' fragments from the rest of the antibody. The pFc' fragments were used as targets for a variable-length phage display library to identify peptides with an affinity for the pFc' fragments.

- Krook et al., *J. Immunol. Meth.*, 221: 151-157 (1998) screened a decapeptide phage display library using IgG Fc as a target to identify linear 10-mer peptide sequences as possible analogs to Protein A or for affinity ligands to parts of the Fc molecule not involved in Protein A binding.
- DeLano et al., *Science*, 287: 1279 (2000), screened a phage library displaying cyclic peptides of varying sizes using IgG Fc as a target sequence. DeLano et al. reported that after several rounds of screening, the recovered Fc region binding peptides were dominated by two polypeptide sequences,
- ETQRCTWHMGELVWCEREHN (SEQ ID NO: 1) and KEASCSYWLGLVWCVAGVE (SEQ ID NO: 2). Thus, DeLano et al. described two cyclic 11-mers having a common GELVWC (SEQ ID NO:3) motif. However, DeLano et al. did not demonstrate chromatographic capture and recovery of purified human immunoglobulins.

- There is still a need for additional peptide ligands that would provide improved ligands for Fc-region polypeptides and improved purification methods.

SUMMARY OF THE INVENTION

- The Fc-region binding molecules of the present invention were isolated utilizing phage display libraries in which the display comprised a variegated peptide of from 12-18 amino acids, which peptide included two invariant cysteines, spaced to provide (upon formation of a disulfide bond between the cysteines) cyclic peptides having 6, 7, 8, 9, 10, or 12 amino acid residues. The newly discovered Fc-region binding molecules have a highly specific affinity for the antibody Fc region. For separation applications, it is preferred that the ligand have an affinity for the target that is in the range 10 μ M to 0.01 μ M and much less affinity for non-target materials. "High affinity" as used herein will refer to binding moieties having a K_D in the range of about 10 μ M to about 0.01 μ M with respect to a target material, with much less affinity for non-target materials. When recovery of the target material is desired, it is also important that the immobilized ligand have negligible affinity for the target under a set of conditions that does not denature the target; otherwise, it is impossible to recover the target from the immobilized ligand. In addition to being advantageous for the rapid and efficient isolation of antibodies in highly purified yields, the present invention also discloses the use of these novel polypeptides for the rapid purification of a protein of interest expressed as part of a fusion protein comprising an Fc-region polypeptide.

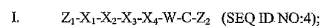
WO 02/086070

PCT/US02/12492

Accordingly, it is an object of the present invention to provide novel binding molecules for human Fc-region polypeptides. Preferred binding molecules of the present invention exhibit not only distinct characteristics for binding to the target Fc-region amino acid sequence but also specific characteristics for the release (elution) of the target Fc-region binding molecules. Especially preferred binding molecules according to the invention are short polypeptide sequences, characterized by a stable loop structure (i.e., cyclic peptides).

A preferred method is disclosed herein for isolation of binding molecules according to the invention by employing phage display technology. The phage display method of the current invention is useful for identifying families of polypeptide binding molecules. Using this technique, a number of binding peptides exhibiting affinity for human Fc-region amino acid sequences have been identified and isolated. Such binding peptides are useful for identifying, isolating and purifying human Fc-region polypeptides present in a solution (e.g., whole blood, plasma, transgenic milk, eggs of transgenic birds (such as chickens, quail, turkeys, ostrich, or geese), conditioned media, etc.) as isolated polypeptides, for isolating and purifying antibodies, and for isolating and purifying fusion proteins genetically engineered to include Fc-region amino acid sequences. Transgenic milk can be obtained from transgenic mice, rats, rabbits, goats, sheep, and cows.

The most preferred binding molecules specific for Fc-region polypeptides include two spaced, invariant cyteine residues and are thus capable of forming a cyclic structure under non-reducing conditions via a disulfide bond formed between the cysteine side chains. Specific Fc-region binding molecules according to the present invention include polypeptides comprising amino acid sequences of the following four general formulas:



wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least 6 amino acids;

25 X_1 is G, H, N, R, or S;

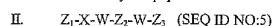
X_2 is A, D, E, F, I, M, or S;

X_3 is A, I, L, M, or V;

X_4 is I, M, T, or V;

Z_2 is a polypeptide of at least one amino acid or is absent; and

30 Z_1 contains at least one cysteine residue such that formation of a disulfide bond with the invariant cysteine residue forms a cyclic peptide of 12 amino acids.



WO 02/086070

PCT/US02/12492

wherein,

Z₁ is a polypeptide of at least one amino acid or is absent;

X is F or Y;

Z₂ is a tripeptide; and

5 Z₃ is a polypeptide of at least one amino acid; and

wherein at least two of the polypeptides Z₁, Z₂, and Z₃ contain a cysteine residue, such that formation of a disulfide bond between such cysteine residues forms a cyclic peptide of 7-12 amino acids.

In the foregoing formula II polypeptides, it is preferred that Z₂ has the formula (IIA):

X₁-X₂-X₃ (IIA),

10 wherein,

X₁ is A, C, F, K, P, R, W, or Y;

X₂ is C, D, E, G, H, K, M, N, Q, R, S, T, V, or Y; and

X₃ is A, E, F, H, I, K, L, Q, R, S, T, V, or Y;

with the proviso that at most one of X₁, X₂ and X₃ can be C. Preferably, where X₂ is C, then X₁ is Y.

15 Most preferably, X₁ is C.

III. Z₁-W-Z₂-W-W-Z₃ (SEQ ID NO:6);

wherein,

Z₁ is a polypeptide of at least one amino acid;

Z₂ is a tripeptide; and

20 Z₃ is a polypeptide of at least one amino acid;

wherein at least two of the polypeptides Z₁, Z₂, and Z₃ contain a cysteine residue, such that formation of a disulfide bond between such cysteine residues forms a cyclic peptide of 8-12 amino acids, with the proviso that where Z₁ contains a cysteine, then Z₂ does not contain a cysteine, and where Z₂ contains a cysteine, it is the middle residue of the tripeptide and Z₃ also contains a cysteine.

25 Preferably for the polypeptides of formula III, when Z₁ and Z₃ each contain a cysteine residue, the cysteine of Z₁ is adjacent the invariant tryptophan (W), the first amino acid of Z₂ is lysine and the second amino acid of Z₃ is aspartic acid (D).

IV. Z₁-P-X₁-W-X₂-C-X₃-X₄-X₅ (SEQ ID NO:7);

wherein,

30 Z₁ is a polypeptide of at least one amino acid and includes a cysteine residue;

X₁ is A, E, R, S, or T;

X₂ is F, W, or Y;

WO 02/086070

PCT/US02/12492

X₃ is D, E, L, M, or Q;

X₄ is H, W, or Y;

X₅ is F or Y; and

wherein the cysteine residue in Z₁ and the cysteine residue between X₂ and X₃ form a cyclic peptide

5 of 10-12 amino acids.

Fe-region binding polypeptides of the present invention include polypeptides comprising

amino acid sequences selected from the group consisting of:

- R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:14)
 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:15)
 10 S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:16)
 L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-G-S (SEQ ID NO:17)
 P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L (SEQ ID NO:18)
 L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:19)
 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H (SEQ ID NO:20)
 15 D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H (SEQ ID NO:21)
 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:22)
 C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:23)
 R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:24)
 L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:25)
 20 D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-M-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:26)
 P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-L-L-V-W-C-S-G-H (SEQ ID NO:27)
 S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-I-W-C-S-A-N (SEQ ID NO:28)
 F-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-L-I-W-C-S-S-F (SEQ ID NO:29)
 H-D-L-C-A-Q₂A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R (SEQ ID NO:30)
 25 P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L (SEQ ID NO:31)
 P-L-D-C-A-R-D-I-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G (SEQ ID NO:32)
 G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W (SEQ ID NO:33)
 W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L (SEQ ID NO:34)
 S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F (SEQ ID NO:35)
 30 D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:36)
 R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-E-Y (SEQ ID NO:37)
 W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-V-W-C-P-Y-L (SEQ ID NO:38)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F (SEQ ID NO:39)
A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F (SEQ ID NO:40)
W-W-N-C-H-N-G-W-I-W-T-G-G-W-C-W-W-F (SEQ ID NO:41)
Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-L-W-C-E-A-F (SEQ ID NO:42)
5 N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:43)
Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-S-R (SEQ ID NO:44)
Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S (SEQ ID NO:45)
Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:46)
N-Y-W-C-N-V-W-L-L-G-D-V-C-R-S-H (SEQ ID NO:47)
10 L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P (SEQ ID NO:48)
Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D (SEQ ID NO:49)
D-D-H-C-Y-W-F-R-E-W-F-N-S-E-C-P-H-G (SEQ ID NO:50)
N-Y-W-C-N-L-W-G-L-H-G-C-N-S-H (SEQ ID NO:51)
Y-W-F-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D (SEQ ID NO:52)
15 H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R (SEQ ID NO:53)
S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N (SEQ ID NO:54)
F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D (SEQ ID NO:55)
Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q (SEQ ID NO:56)
S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:57)
20 K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:58)
Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N (SEQ ID NO:59)
K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S (SEQ ID NO:60)
K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S (SEQ ID NO:61)
K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-E (SEQ ID NO:62)
25 H-F-W-C-E-V-W-G-L-C-P-S-I (SEQ ID NO:63)
Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V (SEQ ID NO:64)
A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E (SEQ ID NO:65)
K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:66)
Q-Y-W-C-N-Y-W-G-V-C-L-P-S (SEQ ID NO:67)
30 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-C-E-R-P (SEQ ID NO:68)
R-Y-W-C-N-L-W-D-V-C-P-E-Q (SEQ ID NO:69)
Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y (SEQ ID NO:70)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- T-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-P-H-N (SEQ ID NO:71)
 F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P (SEQ ID NO:72)
 G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E (SEQ ID NO:73)
 R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D (SEQ ID NO:74)
 5 K-F-W-C-T-L-W-G-V-C-H-M-P (SEQ ID NO:75)
 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-B-R-P (SEQ ID NO:76)
 R-Y-W-C-N-L-W-D-V-C-P-E-Q (SEQ ID NO:77)
 F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D (SEQ ID NO:78)
 H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S (SEQ ID NO:79)
 10 H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D (SEQ ID NO:80)
 H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-I-N (SEQ ID NO:81)
 R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A (SEQ ID NO:82)
 S-Y-W-C-K-L-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:83)
 Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R (SEQ ID NO:84)
 15 Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D (SEQ ID NO:85)
 E-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R (SEQ ID NO:86)
 K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q (SEQ ID NO:87)
 K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T (SEQ ID NO:88)
 R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N (SEQ ID NO:89)
 20 N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H (SEQ ID NO:90)
 Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M (SEQ ID NO:91)
 A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G (SEQ ID NO:92)
 K-Y-W-C-K-F-W-G-L-E-C-K-V-G (SEQ ID NO:93)
 N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K (SEQ ID NO:94)
 25 S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H (SEQ ID NO:95)
 E-Y-W-C-R-L-W-G-L-Q-C-N-M-V (SEQ ID NO:96)
 K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:97)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:98)
 F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S (SEQ ID NO:99)
 30 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T (SEQ ID NO:100)
 K-Y-W-C-K-R-W-G-L-M-C-N-G-G (SEQ ID NO:101)
 A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W (SEQ ID NO:102)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:103)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S (SEQ ID NO:104)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:105)
L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D (SEQ ID NO:106)
5 T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T (SEQ ID NO:107)
T-Y-W-C-T-F-W-B-L-P-C-D-P-A (SEQ ID NO:108)
K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-E-V (SEQ ID NO:109)
N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q (SEQ ID NO:110)
T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D (SEQ ID NO:111)
10 N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L (SEQ ID NO:112)
F-W-Y-C-Y-W-F-N-E-K-C-K-T-P (SEQ ID NO:113)
G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G (SEQ ID NO:114)
P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F (SEQ ID NO:115)
E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M (SEQ ID NO:116)
15 H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T (SEQ ID NO:117)
E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F (SEQ ID NO:118)
N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:119)
Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S (SEQ ID NO:120)
Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S (SEQ ID NO:121)
20 Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:122)
Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H (SEQ ID NO:123)
A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Y-Q-W-F-C-T-D-S (SEQ ID NO:124)
Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R (SEQ ID NO:125)
Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T (SEQ ID NO:126)
25 D-W-Q-C-L-W-W-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L (SEQ ID NO:127)
F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D (SEQ ID NO:128)
N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:129)
S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F (SEQ ID NO:130)
S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L (SEQ ID NO:131)
30 S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y (SEQ ID NO:132)
S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y (SEQ ID NO:133)
G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y (SEQ ID NO:134)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y (SEQ ID NO:135)
 Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F (SEQ ID NO:136)
 F-C-N-C-W-G-S-H-E-F-T-F-C-V-D-D (SEQ ID NO:137)
 P-G-W-C-Y-S-D-I-W-G-F-K-H-F-C-N-L-D (SEQ ID NO:138)
 5 D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-F-P (SEQ ID NO:139)
 R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V (SEQ ID NO:140)
 P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N (SEQ ID NO:141)
 S-W-N-C-A-F-H-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G (SEQ ID NO:142)
 Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-E-C-P-L-Y (SEQ ID NO:143)
 10 N-P-M-C-W-R-A-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:186)
 N-P-M-C-W-R-A-H-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:187)
 E-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:188)
 A-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:189)
 T-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:190)
 15 E-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:191)
 V-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:192)
 [Nle]-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:193)
 S-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:194)
 E-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:195)
 20 A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:196)
 T-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:197)
 E-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:198)
 V-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:199) and
 G-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:200).
 25 N-terminal and/or C-terminal truncations of such Fc-region binding polypeptides down to the
 cyclic polypeptide, that retain binding affinity for antibody Fc-regions are also contemplated.
 In addition, it is also envisioned that the phage display method of the current invention can be
 used to isolate additional families of binding molecules specific for Fc-region amino acid sequences.
 Preferred Fc-region binding molecules according to the above formulae will include the
 30 following:
 polypeptides of formula I, in which X_1 is G; X_2 is A or E; X_3 is L; and X_4 is I or V;

WO 02/086070

PCT/US02/12492

polypeptides of formula II, in which X is F or Y; and in the tripeptide of formula IIA, X₁ is C or Y; X₂ is C, K, N or T; and X₃ is F, I, K, Q or V.

The most preferred binding molecules for isolation or detection of Fe-region amino acid sequences, as well as larger molecules that include these sequences, in a solution include the

5 following polypeptides:

- RRACSRDWSGALVWCAGH (SEQ ID NO:14);
 DHMCVYTTWGLIWCNDNH (SEQ ID NO:36);
 KYWCSFWGLQCKT (SEQ ID NO:88);
 PVDCKHHFWWCYWN (SEQ ID NO:141);
 10 DDHCYWFREWFNSECPHG (SEQ ID NO:50);
 YYWCNYWGLCPDQ (SEQ ID NO:56);
 PHNCDHYWYCKWF (SEQ ID NO:115);
 SYWCKIWDVCPQS (SEQ ID NO:57);
 KYWCNLWGVCPAN (SEQ ID NO:58);
 15 AATCSTSYWYQWFCTDS (SEQ ID NO:124);
 TYWCTFWELPCDPA (SEQ ID NO:108);
 YWYCWFPDRPECLY (SEQ ID NO:143);
 SWVCWKAKWVEDKRCAPF (SEQ ID NO:130);
 NPMCWKKSWWEDAYCINH (SEQ ID NO:129); and
 20 SWNCAFHHNEMVWCDDG (SEQ ID NO:142).

Particularly preferred polypeptides, having amino-terminal and carboxy-terminal modifications to facilitate labeling or immobilization, include:

- Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:144, designated DX249);
 Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:146, designated DX250);
 25 Ac-AGPVDCKHHFWWCYWNGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:153, designated DX251);
 Ac-GDDHCYWFREWFNSECPHGEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:154, designated DX252);
 Ac-GDRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:145, designated DX253);
 Ac-AGYYWCNYWGLCPDQGTGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:155, designated DX254);
 Ac-AGPHNCDHYWYCKWFPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:150, designated DX389);
 30 Ac-AGSYWCKIWDVCPQSPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:147, designated DX392);
 Ac-AGKYWCNLWGVCPANPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:148, designated DX395);
 Ac-AGAATCSTSYWYQWFCTDSPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:151, designated DX398);

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- Ac-AGTYWCTFWELPCDPAPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:149, designated DX404);
Ac-AGYWYCWFPDRPECPLYPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:152, designated DX413);
Ac-GDSWVCWKAKWWEDKRCAPFGTTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:156, designated DX595);
Ac-GDNPWCWKKSWWEDAYCINHGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:157, designated DX596);
5 Ac-GDSWNCFAFHNMVWCDDGGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:158, designated DX597);
Ac-GDWGECTVTSYGELIWCGLPEGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:159, designated DX1070);
Ac-GDNPMCWRASWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:160, designated DX1071);
Ac-GDNPWCWRAHWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:161, designated DX1072);
Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDNHEPGPEG-X-NH₂ (SEQ ID NO:162, designated DX877);
10 Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDNHEPG-X-Su-X-NH₂ (SEQ ID NO:163, designated DX878);
Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDNHEPG-X-Z-X-NH₂ (SEQ ID NO:164, designated DX905);
Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDN-X-NH₂ (SEQ ID NO:165, designated DX907);
Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDN-X-Su-X-NH₂ (SEQ ID NO:166, designated DX909);
Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDN-X-Z-X-NH₂ (SEQ ID NO:167, designated DX911);
15 Ac-DHMCVYTTWGLIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:169, designated DX1062);
Ac-EHMCVYTTWGLIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:170, designated DX1063);
Ac-ACVYTTWGLIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:171, designated DX1064);
Ac-TCVYTTWGLIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:172, designated DX1065);
Ac-ECVYTTWGLIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:173, designated DX1066);
20 Ac-VCVYTTWGLIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:174, designated DX1067);
Ac-[Nle]CVYTTWGLIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:175, designated DX1068);
Ac-CVYTTWGLIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:176, designated DX1069);
Ac-SRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:177, designated DX1139);
Ac-RRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:178, designated DX1142);
25 Ac-ERACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:179, designated DX1141);
Ac-ACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:180, designated DX1142);
Ac-TCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:181, designated DX1143);
Ac-ECSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:182, designated DX1144);
Ac-VCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:183, designated DX1145);
30 Ac-GCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:184, designated DX1146); and
Ac-CSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:185, designated DX1147).

WO 02/086070

PCT/US02/12492

In the foregoing polypeptides, Ac- denotes N-terminal acetylation, -NH₂ denotes C-terminal amidation, -X-NH₂ denotes the C-terminal group -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂, -X-Su-X-NH₂ denotes the C-terminal group -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂, -X-Z-X-NH₂ denotes the C-terminal group -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C(=O)-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂, and [Nle] denotes norleucine. For binding studies described herein, certain of these polypeptides are fluorescein-labeled, the fluorophore being attached at the ϵ -amino group of the carboxy-terminal lysine. In fluoresceinated form, the polypeptide DX249 (i.e., Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNHEPGPEGGGK-NH₂, SBQ ID NO:144) is designated DX276; in fluoresceinated form, the polypeptide DX250 (i.e., Ac-AGKYWCSPFWGLQCKTGTPGPEGGGK-NH₂, SEQ ID NO:146) is designated DX300; in fluoresceinated form, the polypeptide DX253 (i.e., Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂, SEQ ID NO:145) is designated DX301.

The polypeptides of the invention show specific binding to Fc-region polypeptides. Preferred polypeptides disclosed herein show high affinity (e.g., K_D in the range 10 μ M to 0.01 μ M, more preferably in the range 1.0 μ M to 0.01 μ M) for human Fc polypeptides or particular IgG isotypes (e.g., IgG1, IgG2, IgG3 and/or IgG4). Some polypeptides also show species specificity (e.g., binding to human but not other mammalian IgGs). For example:

- DX249, exhibits dissociation constants (K_D) for human IgG1 of less than 0.1 μ M at pH 5.7 and less than 0.5 μ M at pH 7.4 (see Table 1, *infra*);
- DX252, exhibits dissociation constants (K_D) for human IgG3 of less than 0.1 μ M at pH 5.7 and in the range of ~2.1 μ M to ~3.4 μ M for IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 at pH 7.4 (see Table 1, *infra*);
- DX253, exhibits quantitative binding of Fc protein (capture efficiency >90% of total load) from buffer solution and tobacco extract (see Examples 7 and 8, *infra*);
- DX254, exhibits dissociation constants (K_D) for human IgG1 of less than 0.1 μ M at pH 5.7, less than 2.0 μ M at pH 7.4, and less than 1.0 μ M at pH 9.3 (see Table 1, *infra*);
- DX301, exhibits dissociation constants below about 10 μ M for human Fc, IgG1, IgG2 and IgG4 (see Table 8, *infra*); and
- DX300, exhibits a dissociation constant of 4.1 \pm 4.6 for human IgG3 (see Table 6).

The present invention also discloses a method for detecting a polypeptide target which comprises at least one immunoglobulin Fc region amino acid sequence in a solution suspected of containing it comprising:

- (a) contacting said solution with a polypeptide according to Claim 1 or Claim 5; and

WO 02/086070

PCT/US02/12492

(b) determining whether binding has occurred between said polypeptide and said polypeptide target.

In a further embodiment, the invention relates to a method for isolating a polypeptide target which comprises at least one immunoglobulin Fc region amino acid sequence in a solution containing said polypeptide target, said method comprising:

- (a) preparing a Fc binding polypeptide according to the invention by immobilizing the Fc binding polypeptide on a solid support or conjugating the binding polypeptide with an affinity tag;
- (b) contacting the solution containing said polypeptide target with the binding polypeptide of step (a); and
- (c) separating the non-binding components of said solution from the binding polypeptide of step (b).

The present invention also contemplates eluting the bound Fc-containing peptide from the solid support.

The present invention also contemplates a solid-phase detection assay for target polypeptides containing Fc-region polypeptides, comprising the steps:

- (a) contacting a solution suspected of containing a target polypeptide comprising an Fc-region polypeptide with a binding molecule for the target polypeptide, which binding molecule is immobilized on a solid support,
- (b) separating the target bound to the solid support from the unbound components of the solution,
- (c) contacting the solid support with an Fc binding polypeptide according to the invention which has been detectably labeled, and
- (d) detecting binding of the labeled Fc binding polypeptide to said solid support.

In the foregoing methods, the solution in which Fc-region targets are isolated or detected may be selected from the group consisting of whole blood, plasma, transgenic milk, eggs of transgenic birds, and conditioned media.

Also, in the foregoing methods, the polypeptide target can be an antibody or an antibody fragment containing all or part of an Fc region. Preferably, in the foregoing methods, said polypeptide target is an antibody.

Where the target polypeptide is an antibody, it can be a human IgG, and may be of any particular isotype, e.g., human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, or combinations thereof.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

In the foregoing methods, the solid support may be, for example, cellulose, controlled-pore glass, silica, polystyrene, styrene divinyl benzene, agarose, and crosslinked agarose.

The present invention also relates to recombinant bacteriophage, or "phage" (including "phagemid") expressing an exogenous polypeptide capable of binding to an immunoglobulin Fc region, said exogenous polypeptide comprising an amino acid sequence of any of the formulae I, II, III or IV:

I. $Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-W-C-Z_2$ (SEQ ID NO:4);

wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least 6 amino acids;

10 X_1 is G, H, N, R, or S;

X_2 is A, D, E, F, I, M, or S;

X_3 is A, I, L, M, or V;

X_4 is I, M, T, or V;

Z_2 is a polypeptide of at least one amino acid or is absent; and

15 Z_2 contains at least one cysteine residue such that formation of a disulfide bond with the invariant cysteine residue forms a cyclic peptide of 12 amino acids;

II. $Z_1-X-W-Z_2-W-Z_3$ (SEQ ID NO:5)

wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least one amino acid or is absent;

20 X is F or Y;

Z_2 is a tripeptide; and

Z_3 is a polypeptide of at least one amino acid; and

25 wherein at least two of the polypeptides Z_1 , Z_2 , and Z_3 contain a cysteine residue, such that formation of a disulfide bond between such cysteine residues forms a cyclic peptide of 7-12 amino acids;

III. $Z_1-W-Z_2-W-W-Z_3$ (SEQ ID NO:6);

wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least one amino acid;

Z_2 is a tripeptide; and

30 Z_3 is a polypeptide of at least one amino acid;

wherein at least two of the polypeptides Z_1 , Z_2 , and Z_3 contain a cysteine residue, such that formation of a disulfide bond between such cysteine residues forms a cyclic peptide of 8-12

WO 02/086070

PCT/US02/12492

amino acids, with the proviso that where Z_1 contains a cysteine, then Z_2 does not contain a cysteine, and where Z_2 contains a cysteine, it is the middle residue of the tripeptide and Z_3 also contains a cysteine;

IV. Z_1 -P-X₁-W-X₂-C-X₃-X₄-X₅ (SEQ ID NO:7);

5 wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least one amino acid and includes a cysteine residue;

X₁ is A, E, R, S, or T;

X₂ is F, W, or Y;

X₃ is D, E, L, M, or Q;

10 X₄ is H, W, or Y;

X₅ is F or Y; and

wherein the cysteine residue in Z_1 and the cysteine residue between X₂ and X₃ form a cyclic peptide of 10-12 amino acids.

15 Preferably, in the foregoing recombinant bacteriophage according to the invention, said exogenous polypeptide comprises an amino acid sequence of the formula:

Z_1 -X₁-X₂-X₃-X₄-W-C-Z₂ (SEQ ID NO:4);

wherein,

X₁ is G;

X₂ is A or E;

20 X₃ is L;

X₄ is I or V; or

said exogenous polypeptide comprises an amino acid sequence of the formula:

Z_1 -X-W-Z₂-W-Z₃ (SEQ ID NO:5)

wherein,

25 X is F or Y; and

wherein Z_2 is a peptide of the formula: X₁-X₂-X₃, wherein,

X₁ is C or Y;

X₂ is C, K, N, or T, with the proviso that X₂ is not C if X₁ is C, and

X₃ is F, I, K, Q, or V.

30 More preferably, the recombinant bacteriophage according to the invention will display an exogenous polypeptide which comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of:

WO 02/086070

PCT/US02/12492

R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:14)
 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:15)
 S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:16)
 L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-G-S (SEQ ID NO:17)
 5 P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L (SEQ ID NO:18)
 L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:19)
 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H (SEQ ID NO:20)
 D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H (SEQ ID NO:21)
 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:22)
 10 C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:23)
 R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:24)
 L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:25)
 D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-M-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:26)
 P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-I-L-V-W-C-S-G-H (SEQ ID NO:27)
 15 S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-L-W-C-S-A-N (SEQ ID NO:28)
 F-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-I-I-W-C-S-S-F (SEQ ID NO:29)
 H-D-L-C-A-Q-A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R (SEQ ID NO:30)
 P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L (SEQ ID NO:31)
 P-L-D-C-A-R-D-I-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G (SEQ ID NO:32)
 20 G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W (SEQ ID NO:33)
 W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L (SEQ ID NO:34)
 S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F (SEQ ID NO:35)
 D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:36)
 R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-H-Y (SEQ ID NO:37)
 25 W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-V-W-C-P-Y-L (SEQ ID NO:38)
 G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F (SEQ ID NO:39)
 A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F (SEQ ID NO:40)
 W-W-N-C-H-N-G-W-T-W-T-G-G-W-C-W-W-F (SEQ ID NO:41)
 Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-I-W-C-E-A-F (SEQ ID NO:42)
 30 N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:43)
 Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-R (SEQ ID NO:44)
 Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S (SEQ ID NO:45)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:46)
- N-Y-W-C-N-V-W-L-L-G-D-V-C-R-S-H (SEQ ID NO:47)
- L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P (SEQ ID NO:48)
- Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D (SEQ ID NO:49)
- 5 D-D-H-C-Y-W-F-R-E-W-F-N-S-E-C-P-H-G (SEQ ID NO:50)
- N-Y-W-C-N-I-W-G-L-H-G-C-N-S-H (SEQ ID NO:51)
- Y-W-F-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D (SEQ ID NO:52)
- H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R (SEQ ID NO:53)
- S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N (SEQ ID NO:54)
- 10 F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D (SEQ ID NO:55)
- Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q (SEQ ID NO:56)
- S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:57)
- K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:58)
- Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N (SEQ ID NO:59)
- 15 K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S (SEQ ID NO:60)
- K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S (SEQ ID NO:61)
- K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-E (SEQ ID NO:62)
- H-F-W-C-E-V-W-G-L-C-P-S-I (SEQ ID NO:63)
- Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V (SEQ ID NO:64)
- 20 A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E (SEQ ID NO:65)
- K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:66)
- Q-Y-W-C-N-V-W-G-V-C-L-P-S (SEQ ID NO:67)
- H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (SEQ ID NO:68)
- R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (SEQ ID NO:69)
- 25 Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y (SEQ ID NO:70)
- T-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-P-H-N (SEQ ID NO:71)
- F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P (SEQ ID NO:72)
- G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E (SEQ ID NO:73)
- R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D (SEQ ID NO:74)
- 30 K-F-W-C-T-L-W-G-V-C-H-M-P (SEQ ID NO:75)
- H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (SEQ ID NO:76)
- R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (SEQ ID NO:77)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D (SEQ ID NO:78)
 H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S (SEQ ID NO:79)
 H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D (SEQ ID NO:80)
 H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-I-N (SEQ ID NO:81)
 5 R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A (SEQ ID NO:82)
 S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:83)
 Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R (SEQ ID NO:84)
 Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D (SEQ ID NO:85)
 E-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R (SEQ ID NO:86)
 10 K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q (SEQ ID NO:87)
 K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T (SEQ ID NO:88)
 R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N (SEQ ID NO:89)
 N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H (SEQ ID NO:90)
 Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M (SEQ ID NO:91)
 15 A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G (SEQ ID NO:92)
 K-Y-W-C-K-F-W-G-L-E-C-K-V-G (SEQ ID NO:93)
 N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K (SEQ ID NO:94)
 S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H (SEQ ID NO:95)
 E-Y-W-C-R-I-W-G-L-Q-C-N-M-V (SEQ ID NO:96)
 20 K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:97)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:98)
 F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S (SEQ ID NO:99)
 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T (SEQ ID NO:100)
 K-Y-W-C-K-R-W-G-L-M-C-N-G-G (SEQ ID NO:101)
 25 A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W (SEQ ID NO:102)
 K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:103)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S (SEQ ID NO:104)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:105)
 L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D (SEQ ID NO:106)
 30 T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T (SEQ ID NO:107)
 T-Y-W-C-T-F-W-E-L-P-C-D-P-A (SEQ ID NO:108)
 K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-E-V (SEQ ID NO:109)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q (SEQ ID NO:110)
 T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D (SEQ ID NO:111)
 N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L (SEQ ID NO:112)
 F-W-Y-C-Y-W-F-N-E-K-C-K-T-P (SEQ ID NO:113)
 5 G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G (SEQ ID NO:114)
 P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F (SEQ ID NO:115)
 E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M (SEQ ID NO:116)
 H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T (SEQ ID NO:117)
 E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F (SEQ ID NO:118)
 10 N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:119)
 Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S (SEQ ID NO:120)
 Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S (SEQ ID NO:121)
 Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:122)
 Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H (SEQ ID NO:123)
 15 A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Y-Q-W-F-C-T-D-S (SEQ ID NO:124)
 Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R (SEQ ID NO:125)
 Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T (SEQ ID NO:126)
 D-W-Q-C-L-W-W-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L (SEQ ID NO:127)
 F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D (SEQ ID NO:128)
 20 N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:129)
 S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F (SEQ ID NO:130)
 S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L (SEQ ID NO:131)
 S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y (SEQ ID NO:132)
 S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y (SEQ ID NO:133)
 25 G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y (SEQ ID NO:134)
 D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y (SEQ ID NO:135)
 Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F (SEQ ID NO:136)
 F-C-N-C-W-G-S-H-E-F-T-F-C-V-D-D (SEQ ID NO:137)
 P-G-W-C-Y-S-D-I-W-G-F-K-H-F-C-N-L-D (SEQ ID NO:138)
 30 D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-F-P (SEQ ID NO:139)
 R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V (SEQ ID NO:140)
 P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N (SEQ ID NO:141)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- S-W-N-C-A-F-H-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G (SEQ ID NO:142)
 Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-E-C-P-L-Y (SEQ ID NO:143)
 N-P-M-C-W-R-A-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:186)
 N-P-M-C-W-R-A-H-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:187)
 5 E-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:188)
 A-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:189)
 T-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:190)
 E-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:191)
 V-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:192)
 10 S-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:194)
 E-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:195)
 A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:196)
 T-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:197)
 E-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:198)
 15 V-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:199) and
 G-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:200).

The present invention further relates to a method for detecting a polypeptide target comprising at least one immunoglobulin Fc region amino acid sequence in a solution, comprising:

- (a) contacting said solution with a bacteriophage according to the present invention; and
 20 (b) determining whether binding has occurred between said polypeptide target and said bacteriophage.

In the foregoing method, said solution may be selected from the group consisting of whole blood, plasma, transgenic milk, eggs of transgenic birds, and conditioned media.

- Also, said polypeptide target can be an antibody or antibody fragment containing all or part of an Fc region. Preferably, said polypeptide target is an antibody. Where the target is an antibody, it is preferably a human IgG, and may be selected from the group consisting of human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, and combinations thereof.

In the foregoing method of using a bacteriophage according to the invention, said bacteriophage is preferably a phage or phagemid.

- 30 In a further embodiment, the invention relates to separation media comprising:
 (a) a chromatographic matrix material, and, immobilized thereon;
 (b) an Fc binding polypeptide according to the invention, e.g., SEQ ID NOs: 4-200.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

In preferred embodiments, said chromatographic matrix material is selected from the group consisting of cellulose, silica gel-type resins or membranes, crosslinked polysaccharides, and agarose.

In preferred embodiments, said chromatographic matrix material is an amine-reactive chromatographic matrix material, preferably an aldehyde-functional methacrylate resin, a formyl methacrylate resin, or, most preferably, an NHS-activated agarose resin.

In preferred embodiments, the separation media of this invention comprise the reaction product of:

(a) an amine-reactive chromatographic matrix material; and

(b) a polypeptide selected from the group consisting of:

- 10 Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:144);
 Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:146);
 Ac-AGPVDCKHHFWWCYWNGTTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:153);
 Ac-GDDDHCVWFRWFNSECPHGEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:154);
 Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:145);
 15 Ac-AGYYWCNYWGLCPDQGTGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:155);
 Ac-AGPHNCDDHYWYCKWFPPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:150);
 Ac-AGSYWCKIWDVCPQSPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:147);
 Ac-AGKYWCNLWGVCPANPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:148);
 Ac-AGAATCSTSYWYQWFCTDSPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:151);
 20 Ac-AGTYWCIFWELPCDPAPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:149);
 Ac-AGYWYCWFPDRPECPFLYPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:152);
 Ac-GDSWVCWKAKWVEDKRCAPFGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:156);
 Ac-GDNPMCWKKSWWEDAYCINHGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:157);
 Ac-GDSWNCFAHHNEMVWCDDGGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:158);
 25 Ac-GDWGECTVTSYGELIWCGLGEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:159);
 Ac-GDNPMCWRASWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:160);
 Ac-GDNPMCWRAHWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:161);
 Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDNHEPGEG-X-NH₂ (SEQ ID NO:162);
 Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDNHEPG-X-Su-X-NH₂ (SEQ ID NO:163);
 30 Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDNHEPG-X-Z-X-NH₂ (SEQ ID NO:164);
 Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDN-X-NH₂ (SEQ ID NO:165);
 Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDN-X-Su-X-NH₂ (SEQ ID NO:166);

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDH-X-Z-X-NH₂ (SEQ ID NO:167);
 Ac-DHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:169);
 Ac-EHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:170);
 Ac-ACVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:171);
 5 Ac-TCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:172);
 Ac-ECVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:173);
 Ac-VCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:174);
 Ac-[Nle]CVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:175);
 Ac-CVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:176);
 10 Ac-SRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:177);
 Ac-RRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:178);
 Ac-ERACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:179);
 Ac-ACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:180);
 Ac-TCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:181);
 15 Ac-ECSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:182);
 Ac-VCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:183);
 Ac-GCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:184); and
 Ac-CSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:185).

In the foregoing list, Ac- denotes N-terminal acetylation, -NH₂ denotes C-terminal amidation, [Nle] is
 20 norleucine, -X-NH₂ is -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂, -X-Su-X-NH₂ is
 -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂,
 and -X-Z-X-NH₂ is
 -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C(=O)-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-
 25 NH₂.

In the foregoing separation media, said matrix material is preferably an aldehyde-functional
 methacrylate chromatographic resin, a formyl-substituted ethylene glycol-methacrylate copolymer
 support, or an NHS-activated agarose support.

In another aspect, the present invention includes a method for separating a polypeptide target
 comprising at least one immunoglobulin Fc region amino acid sequence from a solution containing it
 30 comprising:

- (a) contacting said solution with separation media as defined above under binding conditions;
- (b) removing unbound material; and

WO 02/086070

PCT/US02/12492

(c) eluting the bound polypeptide target from said separation media.

In the foregoing method, said polypeptide target can be an antibody or an antibody fragment containing all or part of an Fc region. Preferably, said polypeptide target is an antibody. Where the polypeptide is an antibody, it is preferably a human IgG, and may be selected from the group
5 consisting of human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, and combinations thereof.

Also in the foregoing method, said solution may be whole blood, plasma, transgenic milk, eggs of transgenic birds, or conditioned media.

The present invention also contemplates replicable genetic packages displaying any of the foregoing Fc binding polypeptides (e.g., SEQ ID NOS:4-143 and 186-200). Such replicable genetic
10 packages may be phage (including phagemids), bacteria, yeast, or any other suitable host cell.

Solutions from which Fc-region polypeptides may be isolated and purified from include, but are not limited to blood, blood fractions such as plasma, transgenic milk, eggs of transgenic chickens, conditioned media containing Fc-region polypeptides, i.e., any solution or feed stream that contains
15 natural, recombinant or synthetic immunoglobulins, Fc-region-containing fragments thereof, Fc-region-containing fusion proteins or other Fc-region polypeptides.

In another aspect, the present invention provides a method for detecting an Fc-region polypeptide in a solution suspected of containing it, comprising contacting the solution with a binding molecule according to the invention and determining whether a binding complex has formed.

Fc-region polypeptides detected, isolated or purified according to the invention can be
20 isolated Fc regions of an immunoglobulin, whole immunoglobulins, antibody fragments that include all or part of an Fc region, fusion proteins including an Fc region polypeptide, or polypeptides or other molecules conjugated with an Fc-region polypeptide bound by a binding molecule according to the invention.

In yet another aspect, the invention provides methods for increasing the serum half-life of a
25 therapeutic or diagnostic compound of interest comprising linking the therapeutic or diagnostic compound to an Fc-binding polypeptide according to the present invention and administering the compound/Fc-binding polypeptide to an individual. The compound/binding moiety conjugate in the blood and will associate with circulating antibody molecules and will remain in the serum longer than if the compound were administered in the absence of an Fc-binding polypeptide. The Fc-binding
30 polypeptide can be selected for its particular affinity for an antibody, immunoglobulin, or immunoglobulin subtype, so as to tailor the behavior of the conjugate in circulation to the particular therapeutic or diagnostic need for which the conjugate is employed.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

In a preferred embodiment the present invention also discloses a method for increasing the serum half-life of a compound to be administered to an individual comprising:

- (a) preparing a conjugate of said compound with an Fc binder polypeptide moiety according to the invention, wherein the conjugate has the ability to associate with circulating antibodies of the individual, and
- (b) introducing said conjugate into the circulatory system of the individual.

In a preferred embodiment, said compound is a diagnostic compound and may include a radioactive label or a magnetic resonance imaging agent.

In yet another preferred embodiment, said compound is a therapeutic compound. For example, the compound may be selected from thrombin inhibitors, thrombolytics, rennin inhibitors, ACE inhibitors, selectin ligands, inhibitors of the coagulation cascade, complement regulatory molecules, serine proteases, GPIIb/IIIa antagonists, and CRF antagonists.

These and other embodiments of the present invention are described herein in detail.

DEFINITIONS

As used herein, the term "recombinant" is used to describe non-naturally altered or manipulated nucleic acids, host cells transfected with exogenous nucleic acids, or polypeptides expressed non-naturally, through manipulation of isolated DNA and transformation of host cells. Recombinant is a term that specifically encompasses DNA molecules which have been constructed *in vitro* using genetic engineering techniques, and use of the term "recombinant" as an adjective to describe a molecule, construct, vector, cell, polypeptide or polynucleotide specifically excludes naturally occurring such molecules, constructs, vectors, cells, polypeptides or polynucleotides.

The term "bacteriophage" is defined as a bacterial virus containing a DNA core and a protective shell built up by the aggregation of a number of different protein molecules. The terms "bacteriophage" and "phage" are used herein interchangeably. Unless otherwise noted, the terms "bacteriophage" and "phage" also encompass "phagemids", i.e., bacteriophage the genome of which includes a plasmid that can be excised by coinfection of a host with a helper phage. The term "Fφ phage" is defined to be the set of filamentous bacteriophage including M13, fd, φ1, and their numerous derivatives.

The term "Fc-region amino acid sequence" as used herein refers to an amino acid sequence comprising the Fc (fragment crystallizable) domain of an immunoglobulin molecule and includes fragments of this domain that exhibit an affinity to the novel binding molecules disclosed by the present

WO 02/086070

PCT/US02/12492

invention. Equivalent terms used throughout this disclosure include "Fc-region target", "Fc-region polypeptide" or simply "Fc".

The term "binding molecule" as used herein refers to any molecule, polypeptide, peptidomimetic or transformed cell ("transformant") capable of forming a binding complex with another molecule, polypeptide, peptidomimetic or transformant. An "Fc-region binding molecule" is a binding molecule that forms a complex with an Fc-region polypeptide. Specific examples of Fc-region binding molecules are the polypeptides described herein (e.g., SEQ ID NOs: 4-7, 14-143, and 186-200) and bacteriophage displaying any of such polypeptides. Also included within the definition of Fc-region binding molecules are polypeptides derived from or including a polypeptide having an amino acid sequence according to formula I, II, III, or IV above, and such polypeptides which have been modified for particular results, e.g., for immobilization or labeling. Specific examples of modifications contemplated are C-terminal or N-terminal amino acid substitutions or polypeptide chain elongations for the purpose of linking the binding molecule to a chromatographic support or other substrate. Another example involves substitutions of pairs of cysteine residues that normally form disulfide links, for example with non-naturally occurring amino acid residues having reactive side chains, for the purpose of forming a more stable bond between those amino acid positions than the former disulfide bond. All such modified binding molecules are also considered binding molecules according to this invention so long as they retain the ability to bind Fc-region polypeptides.

As used herein, the term "isolated" when applied to a polypeptide according to the invention refers to a polypeptide that has been synthesized or that has been removed from its native environment, e.g., separated from other polypeptides or proteins with which it is naturally associated. In a preferred form, an isolated polypeptide is substantially free of other polypeptides, particularly other polypeptides of natural origin, for example it is provided in a highly purified form, i.e., greater than 95% pure, more preferably greater than 99% pure. When used in this context, the term "isolated" does not exclude the presence of the same polypeptide in alternative physical forms, such as dimers or alternatively glycosylated or derivatized forms.

As used herein, the term "solid support" includes any substrate suitable for the immobilization of polypeptides. Such substrates include cellulose, controlled-pore glass, silica, polystyrene, styrene divinyl benzene, agarose, and crosslinked agarose. Solid supports may take any of a variety of forms including but not limited to plates, filters, beads, resins, and the like. As used herein, the term "solid support" includes materials also known as "chromatographic matrix material", which describes a wide variety of commercially available chromatographic materials known to be

WO 02/086070

PCT/US02/12492

useful in separating or fractionating biological materials. Useful matrix materials include polymeric substances such as cellulose or silica gel-type resins or membranes or crosslinked polysaccharides such as agarose. In addition, the chromatographic matrix materials may further comprise various functional or active groups or molecules bound to the matrices that are useful in separating biological molecules such as, for instance, heparin, biotin, streptavidin, synthetic peptide ligands, or monoclonal antibodies. Particular examples of useful chromatographic matrix materials include but are not limited to aldehyde-functional methacrylate resins, in particular formyl methacrylate resins, and NHS-activated agarose. A wide variety of solid supports are available commercially from such suppliers as Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ).

As used herein, the term "affinity tag" indicates any molecule, such as biotin, with an affinity for a ligand, such as streptavidin, that can be conjugated with another molecule, to render that molecule capable of capture by binding to the ligand. Thus, a biotinylated polypeptide will have a biotin "affinity tag" making it suitable for isolation by contact with the biotin binding partner (ligand), streptavidin. Other examples of common affinity tags are polyhistidine (e.g., hexaHis), providing for affinity capture on a metal chelate (IMAC) resin, or a myc tag, which is an epitope of the c-myc protein, providing for affinity capture by immobilized anti-myc tag antibodies (such as monoclonal antibody 9E10, available from Berkeley Antibody Co., Richmond, CA).

DETAILED DESCRIPTION

The present invention provides novel binding molecules for immunoglobulin Fc-region amino acid sequences. Such molecules make possible the efficient detection, isolation, and purification of molecules that include Fc-region amino acid sequences. More particularly, such polypeptides may be useful for the detection, isolation, removal, and/or purification of antibodies from a solution containing them. Additionally, such polypeptides may be useful for the isolation of a protein or peptide of interest which is present in solution as one domain of a fusion protein, which fusion protein comprises an Fc-region polypeptide and preferably also a cleavage sequence, such as, for instance, an enterokinase cleavage sequence.

Also, the Fc-region binding polypeptides disclosed in the present application may be useful where it is desirable to regulate or prevent an antibody response by controlling the binding of the Fc-region of an antibody to the Fc receptors located on the surface of various cells involved in an immune response.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Use of Phage Display Technology

Phage display technology was advantageously used to identify novel Fc-region binding polypeptides according to the present invention. To prepare phage display libraries for such a use, a candidate binding domain is selected to serve as a structural template for the engineered binding molecules that will exhibit the desired binding and release capabilities. The binding domain may be a naturally occurring or synthetic protein, or a region or domain of a protein. The candidate binding domain may be selected based on knowledge of a known interaction between the candidate binding domain and the Fc-region amino acid sequence, but this is not critical. In fact, it is not essential that the candidate binding domain have any affinity for Fc-region amino acid sequences at all: its purpose is to provide a structure from which a multiplicity of analogues (a "library") can be generated, which multiplicity of analogues will include one or more analogues that exhibit the desired binding and release properties (and any other properties selected for).

In selecting a candidate binding domain, the object is to provide a template or parental structure from which a library of similarly structured analogue domains can be generated. The analogue library will preferably be a biased library (as opposed to a randomly generated library), in that variegation of the basic domain to create the library will be carried out in such a way as to favor the properties desired for the binding molecules.

The nature of the candidate binding domain greatly influences the properties of the derived peptides (analogues) that will be tested against the Fc-region target. In selecting the candidate binding domain, the most important consideration is how the analogue domains will be presented to the Fc-region amino acid sequence, i.e., in what conformation the Fc-region amino acid sequence and the analogues will come into contact. In preferred embodiments, for example, the analogues will be generated by insertion of synthetic DNA encoding the analogue into a replicable genetic package, resulting in display of the domain on the surface of a microorganism, such as M13 phage. Such libraries of phage, such as M13 phage, displaying a wide variety of different polypeptides, can be prepared using techniques as described, e.g., in Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego 1996) and U.S. 5,223,409 (Ladner et al.), both incorporated herein by reference in their entirety.

For formation of phage display libraries, it is preferred to use structured polypeptides as candidate binding domains, as opposed to unstructured peptides. Mutation of surface residues in a protein will usually have little effect on the overall structure or general properties (such as size, stability, and temperature of denaturation) of the protein; while at the same time mutation of surface

WO 02/086070

PCT/US02/12492

residues may profoundly affect the binding properties of the protein. The more tightly a peptide segment is constrained (e.g., by disulfide linkages), the less likely it is to bind to any particular target. If it does bind, however, the binding is likely to be tighter and more specific. Thus, it is preferred to select a candidate binding domain and, in turn, a structure for the polypeptide analogues, that is constrained within a framework having some degree of rigidity.

The size of the candidate binding domain is also an important consideration. Small proteins or polypeptides offer several advantages over large proteins. First, the mass per binding site is reduced. Highly stable protein domains having low molecular weights, e.g., Kunitz domains (~7 kDa), Kazal domains (~7 kDa), *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor (CMTI) domains (~3.5 kDa), and endothelin (~2 kDa), can show much higher binding per gram than do antibodies (150 kDa) or single-chain antibodies (30 kDa). Second, the possibility of non-specific binding is reduced because there is less surface available. Third, small proteins or polypeptides can be engineered to have unique tethering sites in a way that is impractical for larger proteins or antibodies. For example, small proteins can be engineered to have lysine residues only at sites suitable for tethering (e.g., to a chromatography matrix), but this is not feasible for antibodies. Fourth, a constrained polypeptide structure is more likely than a non-constrained structure to retain its functionality when transferred with the structural domain intact from one framework to another. For instance, the binding domain structure is likely to be transferable from the framework used for presentation in a library (e.g., displayed on a phage) to an isolated protein removed from the presentation framework or immobilized on a chromatographic substrate.

Immobilization of the polypeptides according to the invention is contemplated, e.g., onto chromatographic matrices to form efficient Fc-region polypeptide separation media for solutions such as whole blood, plasma, transgenic milk, eggs of transgenic chickens, etc. or conditioned culture media containing Fc-region peptides, e.g., any solution or feed stream that contains natural or synthetic immunoglobulins or Fc-containing fragments thereof. By selecting appropriate binding domain templates, binding polypeptides having a single free cysteine (i.e., a cysteine residue unpaired with another cysteine that ordinarily forms a disulfide link) can be isolated. Such thiol-functional polypeptides can be used for immobilization to substrates by formation of a thioether with iodoacetamide, iodoacetic acid, or similar α -iodo carboxylic acid groups. Similarly, the C-terminal carboxyl group of the peptide domain may be converted to a hydrazide (-NH-NH₂), for reaction with an aldehyde-functional substrate.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

The candidate binding domain of the libraries described herein is a short cyclic peptide of 6-12 amino acids flanked by 2-3 variegated amino acids outside the invariant cysteine residues. Libraries based on these domains may be displayed on replicable genetic packages such as bacteria, yeast, and, preferably, bacteriophage, or "phage" (including "phagemid") and can be readily constructed and used for the selection of binding molecules according to this invention.

Providing a Library of Candidate Binding Domain Analogues

Once a candidate binding domain has been selected, a library of potential binding molecules is created for screening against a target, in this case Fc-region polypeptides. The library is created by making a series of analogues, each analogue corresponding to the candidate binding domain except having one or more amino acid substitutions in the sequence of the domain.

The object of creating the analogue library is to provide a very large number of potential binding molecules for reaction with the Fc-region amino acid sequence molecule, and in general the greater the number of analogues in the library, the greater the likelihood that a member of the library will bind to the Fc-region amino acid sequence and release under the preselected conditions desired for release.

As indicated previously, the techniques discussed in Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego 1996) or U.S. 5,223,409 are particularly useful in preparing a library of analogues corresponding to a selected candidate binding domain, which analogues will be presented in a form suitable for large-scale screening of large numbers of analogues with respect to a target Fc-region amino acid sequence. The use of replicable genetic packages, and most preferably bacteriophage, or "phage" (including "phagemid") is a powerful method of generating novel polypeptide binding entities that involves introducing a novel, exogenous DNA segment into the genome of a bacteriophage (or other amplifiable genetic package) so that the polypeptide encoded by the non-native DNA appears on the surface of the phage. When the inserted DNA contains sequence diversity, then each recipient phage displays one variant of the template (or "parental") amino acid sequence encoded by the DNA, and the phage population (library) displays a vast number of different but related amino acid sequences. The use of bacteriophage can also advantageously utilize phagemid vectors, as discussed, e.g., in Smith, *Gene*, 128:1 (1993), incorporated herein by reference in its entirety.

In a screening procedure to obtain Fc-region polypeptide binders according to this invention, a phage library is contacted with and allowed to bind a target Fc-region polypeptide, usually

WO 02/086070

PCT/US02/12492

immobilized on a solid support. Non-binders are separated from binders. In various ways, the bound phage are liberated from the Fc-region peptide, collected and amplified. Since the phage can be amplified through infection of bacterial cells, even a few binding phage are sufficient to reveal the gene sequence that encodes a binding entity. After a first set of binding peptides is identified, the sequence information can be used to design other libraries biased for members having additional desired properties, e.g., discrimination between Fc-region polypeptides and particular fragments or closely related impurities in a particular feed stream.

Such techniques make it possible not only to screen a large number of potential Fc-region binding molecules but make it practical to repeat the binding/elution cycles and to build secondary, biased libraries for screening analogue-displaying packages that meet initial criteria. Using these techniques, analogue biased libraries may be screened to reveal members that (a) bind tightly (i.e., with high affinity) under the binding conditions and (b) release cleanly (i.e., readily dissociate from the Fc-region peptide target) under preselected release conditions.

In isolating the specific polypeptides according to this invention, six phage display libraries were screened. The six libraries each displayed a short, variegated exogenous peptide loop of 6, 7, 8, 9, 10, or 12 amino acids on the surface of M13 phage, at the amino terminus of protein III. The libraries are designated TN6/6 (having a potential 3.3×10^{12} amino acid sequence diversity); TN7/4 (having a potential 1.2×10^{14} amino acid sequence diversity), TN8/9 (having a potential 2.2×10^{15} amino acid sequence diversity), TN9/4 (having a potential 4.2×10^{16} amino acid sequence diversity), TN10/9 (having a potential 3.0×10^{16} amino acid sequence diversity), and TN12/1 (having a sequence diversity of 4.6×10^{19}).

The TN6/6 library was constructed to display a single microprotein binding loop contained in a 12-amino acid template. The TN6/6 library utilized a template sequence of Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:8). The amino acids at positions 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, and 11 of the template were varied to permit any amino acid except cysteine (Cys). The amino acids at positions 1 and 12 of the template were varied to permit any amino acid except cysteine (Cys), glutamic acid (Glu), isoleucine (Ile), Lysine (Lys), methionine (Met), and threonine (Thr).

The TN7/4 library was constructed to display a single microprotein binding loop contained in a 13-amino acid template. The TN7/4 library utilized a template sequence of Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:9). The amino acids at amino acid positions 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, and 13 of the template were varied to permit any amino acid except cysteine (Cys).

WO 02/086070

PCT/US02/12492

The TN8/9 library was constructed to display a single microprotein binding loop contained in a 14-amino acid template. The TN8/9 library utilized a template sequence of Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:10). The amino acids at position 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, and 14 in the template were varied to permit any amino acid except cysteine (Cys).

5 The TN9/4 library was constructed to display a single microprotein binding loop contained in an 15-amino acid template. The TN9/1 library utilized a template sequence Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:11). The amino acids at position 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 and 15 in the template were varied to permit any amino acid except cysteine (Cys).

10 The TN10/9 library was constructed to display a single microprotein binding loop contained in a 16-amino acid template. The TN10/9 library utilized a template sequence Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:12). The amino acids at positions 1, 2, 15, and 16 in the template were varied to permit any amino acid selected from a group of 10 amino acids: D, F, H, L, N, P, R, S, W, or Y). The amino acids at positions 3 and 14 in the template were varied to permit any amino acid selected from a group of 14 amino acids: A, D, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, V, W, or Y). The amino acids at positions 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, and 12 in the template were varied to permit any amino acid except cysteine (Cys).

15 The TN12/1 library was constructed to display a single microprotein binding loop contained in an 18-amino acid template. The TN12/1 library utilized a template sequence Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:13). The amino acids at position 1, 2, 17, and 18 in the template were varied to permit any amino acid selected from a group of 12 amino acids: A, D, F, G, H, L, N, P, R, S, W, or Y). The amino acids at positions 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, and 16 were varied to permit any amino acid except cysteine (Cys).

20 The foregoing phage display libraries displaying cyclic peptides of from 6 to 12 amino acid residues were screened to reveal members binding to Fc-region peptide targets. A number of Fc-region amino acid sequence-binding polypeptides were isolated, with Fc-region binders being isolated from five of the libraries screened:

30

WO 02/086070

PCT/US02/12492

TN12/1
 R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:14)
 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:15)
 S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:16)
 5 L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-G-S (SEQ ID NO:17)
 P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L (SEQ ID NO:18)
 L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:19)
 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H (SEQ ID NO:20)
 D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H (SEQ ID NO:21)
 10 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:22)
 C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:23)
 R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:24)
 L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:25)
 D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-M-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:26)
 15 P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-I-L-V-W-C-S-G-H (SEQ ID NO:27)
 S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-I-W-C-S-A-N (SEQ ID NO:28)
 P-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-I-L-I-W-C-S-S-F (SEQ ID NO:29)
 H-D-L-C-A-Q-A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R (SEQ ID NO:30)
 P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L (SEQ ID NO:31)
 20 P-L-D-C-A-R-D-I-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G (SEQ ID NO:32)
 G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W (SEQ ID NO:33)
 W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L (SEQ ID NO:34)
 S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F (SEQ ID NO:35)
 D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:36)
 25 R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-H-Y (SEQ ID NO:37)
 W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-I-V-W-C-P-Y-L (SEQ ID NO:38)
 G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F (SEQ ID NO:39)
 A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F (SEQ ID NO:40)
 W-W-N-C-H-N-G-W-T-W-T-G-G-W-C-W-W-F (SEQ ID NO:41)
 30 Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-I-W-C-E-A-F (SEQ ID NO:42)
 L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P (SEQ ID NO:48)
 D-D-H-C-Y-W-P-R-E-W-F-N-S-E-C-P-H-G (SEQ ID NO:50)
 S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N (SEQ ID NO:54)
 A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Q-W-F-C-T-D-S (SEQ ID NO:124)
 35 D-W-Q-C-L-I-W-N-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L (SEQ ID NO:127)
 N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:129)
 S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F (SEQ ID NO:130)
 S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L (SEQ ID NO:131)
 D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y (SEQ ID NO:135)
 40 P-G-W-C-Y-S-D-I-W-G-F-K-H-F-C-N-L-D (SEQ ID NO:138)
 S-W-N-C-A-F-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G (SEQ ID NO:142)
 G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y (SEQ ID NO:134)

45 TN10/9
 Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-S-R (SEQ ID NO:44)
 Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S (SEQ ID NO:45)
 Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:46)
 N-Y-W-C-N-V-W-L-I-G-D-V-C-R-S-H (SEQ ID NO:47)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- Y-W-F-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D (SEQ ID NO:52)
- H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R (SEQ ID NO:53)
- F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D (SEQ ID NO:55)
- Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S (SEQ ID NO:120)
- 5 Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S (SEQ ID NO:121)
- Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:122)
- Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H (SEQ ID NO:123)
- S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y (SEQ ID NO:132)
- S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y (SEQ ID NO:133)
- 10 Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F (SEQ ID NO:136)
- F-C-N-C-W-G-S-H-B-F-T-F-C-V-D-D (SEQ ID NO:137)
- D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-P-P (SEQ ID NO:139)

TN9/4

- 15 N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:43)
- N-Y-W-C-N-I-W-G-L-H-G-C-N-S-H (SEQ ID NO:51)
- N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:119)
- Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-E-C-P-L-Y (SEQ ID NO:143)

TN8/9

- 20 Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D (SEQ ID NO:49)
- E-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R (SEQ ID NO:86)
- K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q (SEQ ID NO:87)
- R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N (SEQ ID NO:89)
- 25 N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H (SEQ ID NO:90)
- Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M (SEQ ID NO:91)
- A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G (SEQ ID NO:92)
- K-Y-W-C-K-F-W-G-L-B-C-K-V-G (SEQ ID NO:93)
- N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K (SEQ ID NO:94)
- 30 S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H (SEQ ID NO:95)
- E-Y-W-C-R-I-W-G-L-Q-C-N-M-V (SEQ ID NO:96)
- K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:97)
- K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:98)
- F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S (SEQ ID NO:99)
- 35 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T (SEQ ID NO:100)
- K-Y-W-C-K-R-W-G-L-M-C-N-G-G (SEQ ID NO:101)
- A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W (SEQ ID NO:102)
- K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:103)
- K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S (SEQ ID NO:104)
- 40 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:105)
- L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D (SEQ ID NO:106)
- T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T (SEQ ID NO:107)
- T-Y-W-C-T-F-W-E-L-P-C-D-P-A (SEQ ID NO:108)
- K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-B-V (SEQ ID NO:109)
- 45 N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q (SEQ ID NO:110)
- T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D (SEQ ID NO:111)
- N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L (SEQ ID NO:112)
- F-W-Y-C-Y-W-F-N-E-K-C-K-T-P (SEQ ID NO:113)
- G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G (SEQ ID NO:114)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F (SEQ ID NO:115)
- E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M (SEQ ID NO:116)
- H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T (SEQ ID NO:117)
- E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F (SEQ ID NO:118)
- 5 Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R (SEQ ID NO:125)
- F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D (SEQ ID NO:128)
- P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N (SEQ ID NO:141)

TN7/4

- 10 Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q. (SEQ ID NO:56)
- S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:57)
- K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:58)
- Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N (SEQ ID NO:59)
- K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S (SEQ ID NO:60)
- 15 K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S (SEQ ID NO:61)
- K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-E (SEQ ID NO:62)
- H-F-W-C-F-V-W-G-L-C-P-S-I (SEQ ID NO:63)
- Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V (SEQ ID NO:64)
- A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E (SEQ ID NO:65)
- 20 K-Y-W-C-N-I-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:66)
- Q-Y-W-C-N-V-W-G-V-C-L-P-S (SEQ ID NO:67)
- H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (SEQ ID NO:68)
- R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-B-Q (SEQ ID NO:69)
- Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y (SEQ ID NO:70)
- 25 T-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-P-H-N (SEQ ID NO:71)
- F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P (SEQ ID NO:72)
- G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E (SEQ ID NO:73)
- R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D (SEQ ID NO:74)
- K-F-W-C-T-I-W-G-V-C-H-M-P (SEQ ID NO:75)
- 30 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (SEQ ID NO:76)
- R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (SEQ ID NO:77)
- F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D (SEQ ID NO:78)
- H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S (SEQ ID NO:79)
- H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D (SEQ ID NO:80)
- 35 H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-I-N (SEQ ID NO:81)
- R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A (SEQ ID NO:82)
- S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:83)
- Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R (SEQ ID NO:84)
- Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D (SEQ ID NO:85)
- 40 K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T (SEQ ID NO:88)
- Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T (SEQ ID NO:126)
- R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V (SEQ ID NO:140)

Further analysis of recurring amino acid sequences among the Fc binders revealed a series of polypeptide "families" exhibiting common core structures:

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Sequence Family I:

- R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:14)
- W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:15)
- S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:16)
- 5 L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-C-S (SEQ ID NO:17)
- P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L (SEQ ID NO:18)
- L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:19)
- W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H (SEQ ID NO:20)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H (SEQ ID NO:21)
- 10 W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:22)
- C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:23)
- R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:24)
- L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:25)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-M-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:26)
- 15 P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-I-L-V-W-C-S-G-H (SEQ ID NO:27)
- S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-I-W-C-S-A-N (SEQ ID NO:28)
- F-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-L-I-W-C-S-S-F (SEQ ID NO:29)
- H-D-L-C-A-Q-A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R (SEQ ID NO:30)
- P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L (SEQ ID NO:31)
- 20 P-L-D-C-A-R-D-L-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G (SEQ ID NO:32)
- G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W (SEQ ID NO:33)
- W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L (SEQ ID NO:34)
- S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F (SEQ ID NO:35)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:36)
- 25 R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-H-Y (SEQ ID NO:37)
- W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-V-W-C-P-Y-L (SEQ ID NO:38)
- G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F (SEQ ID NO:39)
- A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F (SEQ ID NO:40)
- W-W-N-C-H-N-G-W-T-W-T-G-G-W-C-W-W-F (SEQ ID NO:41)
- 30 Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-I-W-C-E-A-F (SEQ ID NO:42)

Sequence Family II:

- N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:43)
- 35 Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-S-R (SEQ ID NO:44)
- Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S (SEQ ID NO:45)
- Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:46)
- N-Y-W-C-N-V-W-L-L-G-D-V-C-R-S-H (SEQ ID NO:47)
- L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P (SEQ ID NO:48)
- 40 Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D (SEQ ID NO:49)
- D-D-H-C-Y-W-F-R-E-W-F-N-S-E-C-P-H-G (SEQ ID NO:50)
- N-Y-W-C-N-I-W-G-L-H-G-C-N-S-H (SEQ ID NO:51)
- Y-W-P-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D (SEQ ID NO:52)
- H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R (SEQ ID NO:53)
- S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N (SEQ ID NO:54)
- 45 F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D (SEQ ID NO:55)
- Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q (SEQ ID NO:56)
- S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:57)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:58)
 Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N (SEQ ID NO:59)
 K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S (SEQ ID NO:60)
 K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S (SEQ ID NO:61)
 5 K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-E (SEQ ID NO:62)
 H-F-W-C-E-V-W-G-L-C-P-S-I (SEQ ID NO:63)
 Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V (SEQ ID NO:64)
 A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E (SEQ ID NO:65)
 K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:66)
 10 Q-Y-W-C-N-V-W-G-V-C-L-P-S (SEQ ID NO:67)
 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (SEQ ID NO:68)
 R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (SEQ ID NO:69)
 Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y (SEQ ID NO:70)
 T-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-P-H-N (SEQ ID NO:71)
 15 F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P (SEQ ID NO:72)
 G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E (SEQ ID NO:73)
 R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D (SEQ ID NO:74)
 K-F-W-C-T-I-W-G-V-C-H-M-P (SEQ ID NO:75)
 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (SEQ ID NO:76)
 20 R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (SEQ ID NO:77)
 F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D (SEQ ID NO:78)
 H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S (SEQ ID NO:79)
 H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D (SEQ ID NO:80)
 H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-T-N (SEQ ID NO:81)
 25 R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A (SEQ ID NO:82)
 S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:83)
 Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R (SEQ ID NO:84)
 Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D (SEQ ID NO:85)
 E-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R (SEQ ID NO:86)
 30 K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q (SEQ ID NO:87)
 K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T (SEQ ID NO:88)
 R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N (SEQ ID NO:89)
 N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H (SEQ ID NO:90)
 Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M (SEQ ID NO:91)
 35 A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G (SEQ ID NO:92)
 K-Y-W-C-K-F-W-G-L-E-C-K-V-G (SEQ ID NO:93)
 N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K (SEQ ID NO:94)
 S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H (SEQ ID NO:95)
 E-Y-W-C-R-I-W-G-L-Q-C-N-M-V (SEQ ID NO:96)
 40 K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:97)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:98)
 F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S (SEQ ID NO:99)
 H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T (SEQ ID NO:100)
 K-Y-W-C-X-R-W-G-L-M-C-N-G-G (SEQ ID NO:101)
 45 A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W (SEQ ID NO:102)
 K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:103)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S (SEQ ID NO:104)
 K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:105)
 L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D (SEQ ID NO:106)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- 5 T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T (SEQ ID NO:107)
- T-Y-W-C-T-F-W-E-L-P-C-D-P-A (SEQ ID NO:108)
- K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-E-V (SEQ ID NO:109)
- N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q (SEQ ID NO:110)
- T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D (SEQ ID NO:111)
- N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L (SEQ ID NO:112)
- F-W-Y-C-Y-W-F-N-R-K-C-K-T-P (SEQ ID NO:113)
- G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G (SEQ ID NO:114)
- 10 P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F (SEQ ID NO:115)
- E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M (SEQ ID NO:116)
- H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T (SEQ ID NO:117)
- E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F (SEQ ID NO:118)
- N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-F-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:119)
- Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S (SEQ ID NO:120)
- 15 Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S (SEQ ID NO:121)
- Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:122)
- Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H (SEQ ID NO:123)
- A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Y-Q-W-F-C-T-D-S (SEQ ID NO:124)
- Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R (SEQ ID NO:125)
- 20 Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T (SEQ ID NO:126)

Sequence Family III:

- D-W-Q-C-L-W-W-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L (SEQ ID NO:127)
- F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D (SEQ ID NO:128)
- 25 N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:129)
- S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F (SEQ ID NO:130)
- S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L (SEQ ID NO:131)

Sequence Family IV:

- 30 S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y (SEQ ID NO:132)
- S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y (SEQ ID NO:133)
- G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y (SEQ ID NO:134)
- D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y (SEQ ID NO:135)
- 35 Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F (SEQ ID NO:136)

In the foregoing peptide families, the amino acids in bold type are either invariant at that position or are preferred (i.e., recurrent in multiple sequences) in a position relative to an invariant residue.

40 Fe-region binding peptides not fitting any family

- F-C-N-C-W-G-S-H-E-F-T-F-C-V-D-D (SEQ ID NO:137)
- P-G-W-C-Y-S-D-L-W-G-P-K-H-F-C-N-L-D (SEQ ID NO:138)
- D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-P-P (SEQ ID NO:139)
- R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V (SEQ ID NO:140)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N (SEQ ID NO:141)
 S-W-N-C-A-F-H-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G (SEQ ID NO:142)
 Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-B-C-P-L-Y (SEQ ID NO:143)

5 Analysis of the structures of the above families of Fe-region binding polypeptides revealed the following general formulae for Fe-region binders:

I. $Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-W-C-Z_2$ (SEQ ID NO:4);

wherein,

10 Z_1 is a polypeptide of at least 6 amino acids;

X_1 is G, H, N, R, or S;

X_2 is A, D, E, F, I, M, or S;

X_3 is A, I, L, M, or V;

X_4 is I, M, T, or V;

15 Z_2 is a polypeptide of at least one amino acid or is absent; and

Z_1 contains at least one cysteine residue such that formation of a disulfide bond with the invariant cysteine residue forms a cyclic peptide of 12 amino acids.

II. $Z_1-X-W-Z_2-W-Z_3$ (SEQ ID NO:5)

20 wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least one amino acid or is absent;

X is F or Y;

Z_2 is a tripeptide; and

Z_3 is a polypeptide of at least one amino acid; and

25 wherein at least two of the polypeptides Z_1 , Z_2 , and Z_3 contain a cysteine residue, such that formation of a disulfide bond between such cysteine residues forms a cyclic peptide of 7-12 amino acids.

In the foregoing formula II polypeptides, it is preferred that Z_2 has the formula (IIA):

$X_1-X_2-X_3$ (IIA),

wherein,

30 X_1 is A, C, F, K, P, R, W, or Y;

X_2 is C, D, E, G, H, K, M, N, Q, R, S, T, V, or Y; and

X_3 is A, E, F, H, I, K, L, Q, R, S, T, V, or Y;

with the proviso that at most only one of X_1 , X_2 and X_3 can be C. Preferably, where X_2 is C, then X_1 is Y. Most preferably, X_1 is C.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

III. Z_1 -W- Z_2 -W-W- Z_3 (SEQ ID NO:6);

wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least one amino acid;

Z_2 is a tripeptide; and

5 Z_3 is a polypeptide of at least one amino acid;

wherein at least two of the polypeptides Z_1 , Z_2 , and Z_3 contain a cysteine residue, such that formation of a disulfide bond between such cysteine residues forms a cyclic peptide of 8-12 amino acids, with the proviso that where Z_1 contains a cysteine, then Z_2 does not contain a cysteine, and where Z_2 contains a cysteine, it is the middle residue of the tripeptide and Z_3 also contains a cysteine.

10 Preferably for the polypeptides of formula III, when Z_1 and Z_3 each contain a cysteine residue, the cysteine of Z_1 is adjacent the invariant tryptophan (W), the first amino acid of Z_2 is lysine and the second amino acid of Z_3 is aspartic acid (D).

IV. Z_1 -P- X_1 -W- X_2 -C- X_3 - X_4 - X_5 (SEQ ID NO:7); wherein, Z_1 is a polypeptide of at least one amino acid and includes a cysteine residue;

15 X_1 is A, E, R, S, or T;

X_2 is F, W, or Y;

X_3 is D, E, L, M, or Q;

X_4 is H, W, or Y;

X_5 is F or Y; and

20 wherein the cysteine residue in Z_1 and the cysteine residue between X_2 and X_3 form a cyclic peptide of 10-12 amino acids.

Synthesis of Fc Binding Peptide

Once isolated, the sequence of any individual binding peptide or the structure of any binding
 25 molecule can be analyzed, and the binder may be produced in any desired quantity using known methods. For example, the peptide binding molecules described herein, since their sequences are disclosed, may advantageously be produced by chemical synthesis followed by treatment under oxidizing conditions appropriate to obtain the native conformation, i.e., the correct disulfide bond linkages. Synthesis may be carried out by methodologies well known to those skilled in the art (see,
 30 Kelley et al. in *Genetic Engineering Principles and Methods*, (Setlow, J.K., ed.), Plenum Press, NY., (1990) vol. 12, pp. 1-19; Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis* (1989), W. H. Freeman Co., San Francisco. The binding molecules of the present invention can be made either by chemical

WO 02/086070

PCT/US02/12492

synthesis or by semisynthesis. The chemical synthesis or semisynthesis methods allow the possibility of non-natural amino acid residues to be incorporated.

Polypeptide binding molecules of the present invention are preferably prepared using solid phase peptide synthesis (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149 (1963); Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5132 (1985)). Solid phase synthesis begins at the carboxy-terminus of the putative peptide by coupling a protected amino acid to a suitable resin, which reacts with the carboxy group of the C-terminal amino acid to form a bond that is readily cleaved later, such as a halomethyl resin, e.g., chloromethyl resin, bromomethyl resin, hydroxymethyl resin, aminomethyl resin, benzhydrylamine resin, or t-alkyloxycarbonyl-hydrazide resin. After removal of the α -amino protecting group with, for example, trifluoroacetic acid (TFA) in methylene chloride and neutralizing in, for example, TEA, the next cycle in the synthesis is ready to proceed. The remaining α -amino and, if necessary, side-chain-protected amino acids are then coupled sequentially in the desired order by condensation to obtain an intermediate compound connected to the resin. Alternatively, some amino acids may be coupled to one another forming an oligopeptide prior to addition of the oligopeptide to the growing solid phase polypeptide chain.

The condensation between two amino acids, or an amino acid and a peptide, or a peptide and a peptide can be carried out according to standard condensation methods such as azide method, mixed acid anhydride method, DCC (dicyclohexylcarbodiimide) method, active ester method (p-nitrophenyl ester method, BOP [benzotriazole-1-yl-oxy-tris (dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate] method, N-hydroxysuccinic acid imido ester method), and Woodward reagent K method.

Common to chemical synthesis of peptides is the protection of the reactive side-chain groups of the various amino acid moieties with suitable protecting groups at that site until the group is ultimately removed after the chain has been completely assembled. Also common is the protection of the α -amino group on an amino acid or a fragment while that entity reacts at the carboxyl group followed by the selective removal of the α -amino-protecting group to allow subsequent reaction to take place at that location. Accordingly, it is common that, as a step in the synthesis, an intermediate compound is produced which includes each of the amino acid residues located in the desired sequence in the peptide chain with various of these residues having side-chain protecting groups. These protecting groups are then commonly removed substantially at the same time so as to produce the desired resultant product following purification.

The typical protective groups for protecting the α - and ϵ -amino side chain groups are exemplified by benzyloxycarbonyl (Z), isonicotinylloxycarbonyl (iNOC), O-chlorobenzyloxycarbonyl

WO 02/086070

PCT/US02/12492

[Z(NO₂)], p-methoxybenzyloxycarbonyl [Z(OMe)], t-butoxycarbonyl (Boc), t-amyoxy carbonyl (Aoc), isobomyloxycarbonyl, adamantyloxycarbonyl, 2-(4-biphenyl)-2-propyloxycarbonyl (Bpoc), 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), methylsulfonyl ethoxycarbonyl (Msc), trifluoroacetyl, phthalyl, formyl, 2-nitrophenylsulphenyl (NPS), diphenylphosphinothioyl (Ppi), dimethylphosphinothioyl (Mpi), and the like.

As protective groups for the carboxy group there can be exemplified, for example, benzyl ester (OBzl), cyclohexyl ester (Chx), 4-nitrobenzyl ester (ONb), t-butyl ester (Obut), 4-pyridylmethyl ester (OPic), and the like. It is desirable that specific amino acids such as arginine, cysteine, and serine possessing a functional group other than amino and carboxyl groups are protected by a suitable protective group as occasion demands. For example, the guanidino group in arginine may be protected with nitro, p-toluenesulfonyl, benzyloxycarbonyl, adamantyloxycarbonyl, p-methoxybenzenesulfonyl, 4-methoxy-2,6-dimethylbenzenesulfonyl (Mds), 1,3,5-trimethylphenylsulfonyl (Mts), and the like. The thiol group in cysteine may be protected with p-methoxybenzyl, triphenylmethyl, acetylaminomethyl ethylcarbamoyl, 4-methylbenzyl, 2,4,6-trimethyl-benzyl (Tmb) etc., and the hydroxyl group in the serine can be protected with benzyl, t-butyl, acetyl, tetrahydropyranyl, etc.

After the desired amino acid sequence has been completed, the intermediate peptide is removed from the resin support by treatment with a reagent, such as liquid HF and one or more thio-containing scavengers, which not only cleaves the peptide from the resin, but also cleaves all the remaining side-chain protecting groups. Following HF cleavage, the protein sequence is washed with ether, transferred to a large volume of dilute acetic acid, and stirred at pH adjusted to about 8.0 with ammonium hydroxide. Upon pH adjustment, the polypeptide takes its desired conformational arrangement.

Polypeptides according to the invention may also be prepared commercially by companies providing peptide synthesis as a service (e.g., BACHEM Bioscience, Inc., King of Prussia, PA; Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MA).

Use of the Binding Molecules in Detection and Purification

For detection of Fc-region polypeptides alone or present as a domain of a larger molecule (e.g., a natural or synthetic immunoglobulin or Fc-region-containing fragment thereof) in a solution such as whole blood, plasma, transgenic milk, eggs of transgenic chickens, conditioned media, or any solution or feed stream containing such Fc-region targets, a binding molecule according to the

WO 02/086070

PCT/US02/12492

invention can be detectably labeled, e.g., radiolabeled or enzymatically labeled, then contacted with the solution, and thereafter formation of a complex between the binding molecule and the Fc-region polypeptide target can be detected. Alternatively, a phage binding molecule according to the invention, i.e., a recombinant phage displaying an Fc-region binding polypeptide on its surface, may
5 form a complex with the Fc-region polypeptide that is detectable as a sediment in a reaction tube, which can be detected visually after settling or centrifugation.

Alternatively, a sandwich-type assay may be used, wherein an Fc-region binding molecule is immobilized on a solid support such as a plastic tube or well, or a chromatographic matrix such as
10 sepharose beads, then the solution suspected of containing the Fc-region polypeptide target is contacted with the immobilized binding molecule, non-binding materials are washed away, and complexed Fc-region polypeptide is detected using a suitable detection reagent, such as a monoclonal antibody recognizing the Fc-region target, which reagent is detectable by some conventional means known in the art, including being detectably labeled, e.g., radiolabeled or labeled enzymatically, as
with horseradish peroxidase, and the like.

The binding molecules according to this invention will be extremely useful for isolation of
15 Fc-region polypeptides by affinity chromatography methods. Any conventional method of chromatography may be employed. Preferably, a binding molecule of the invention will be immobilized on a solid support suitable, e.g., for packing a chromatography column. The immobilized affinity ligand can then be loaded or contacted with a feed stream under conditions
20 favorable to formation of binding molecule/Fc-region polypeptide complexes. Non-binding materials can be washed away, then the Fc-region polypeptides can be eluted by introducing solution conditions favoring dissociation of the binding complex.

Alternatively, batch chromatography can be carried out by mixing a solution containing the
25 Fc-region polypeptide target and the binding molecule, then isolating complexes of the Fc-region polypeptide target and the binding molecules. For this type of separation, many methods are known. For example, the binding molecule can be immobilized on a solid support, then separated from the feed stream along with the Fc-region polypeptide target by filtration. Or the binding molecule may be modified with its own affinity tag, such as a polyHis tail (e.g., hexahistidine), biotin, myc tag, etc.,
30 which can be used to capture the binding molecule after complexes have formed, using the binding partner for the affinity tag, e.g., an immobilized metal affinity chromatography resin for capturing polyHis-tagged molecules, streptavidin for biotinylated molecules, etc. Once separated, the Fc-region

WO 02/086070

PCT/US02/12492

polypeptide target can be released from the binding molecule under elution conditions and recovered in pure form.

It should be noted that although precise binding and release conditions were selected in obtaining the Fc-region amino acid-binding polypeptides disclosed herein, subsequent use in affinity purification may reveal more optimal binding and release conditions under which the same isolated affinity ligand will operate. Thus, it is not critical that the binding molecule, after isolation according to this invention, be always employed only at the binding and release conditions that led to its separation from the library.

Isolation of Fc-region binding molecules in accordance with this invention will be further illustrated below. The specific parameters included in the following examples are intended to illustrate the practice of the invention, and they are not presented to in any way limit the scope of the invention.

The phage libraries used in the present invention are constructed in derivatives of the filamentous phage M13. The displayed peptides are fused to the amino terminus of protein III through a linker peptide which contains the recognition site for Factor Xa. Factor Xa can cleave the displayed peptide from the phage without injuring the phage or reducing its infectivity.

Use of the Binding Molecules to Increase the Serum Half-life of a Compound

Another use for the Fc-binding polypeptides of the present invention is to increase the half-life and overall stability of a therapeutic or diagnostic compound that is administered to or enters the circulatory system of an individual. See, e.g., U.S. Pat. No. 5,116,944; EP-A2-395 918; WO 91/01743, incorporated herein in their entirety by reference. In such methods, an Fc-binding polypeptide described herein is used to link a therapeutic or diagnostic compound to an antibody found in the blood of an individual who will receive the therapeutic or diagnostic compound. In this embodiment, an Fc-binding polypeptide of the invention is linked, covalently or non-covalently, to a selected therapeutic or diagnostic compound at a site that keeps the Fc-binding polypeptide antibody binding site intact and therefore still capable of binding to an antibody molecule, without compromising the desired diagnostic or therapeutic activity. In this way, the Fc-binding polypeptide serves as a linker molecule to link the diagnostic/therapeutic compound of interest to an antibody circulating in the blood.

Linking a diagnostic or therapeutic compound to a circulating antibody using an Fc-binding polypeptide of the invention is expected to be particularly useful in increasing the circulating half-life

WO 02/086070

PCT/US02/12492

and/or overall stability of compounds that are normally subject to an undesirably rapid rate of degradation or clearance from circulation. Increasing the half-life or overall stability of a compound in the circulatory system is likely to reduce the number and/or size of doses that must be administered to an individual to obtain a desired effect. Any suitable diagnostic compound may be linked to an antibody molecule in this manner, including, especially detectable labels, which may be a dye (such as fluorescein); radiolabels such as ^{131}I or a technetium ($\text{Tc}^{99\text{m}}$)-containing compound; enzymes (such as horseradish peroxidase); or a detectable metal (such as a paramagnetic ion). Any suitable therapeutic compound may be linked to an antibody molecule in this manner, including drugs, biopharmaceuticals, and any polypeptide of interest. Examples of such therapeutics suitable for linking to antibodies include but are not limited to receptor agonists or antagonists, specific binding compounds, enzyme inhibitors, metal chelators, molecular scavengers such as vitamin E, and the like. Of particular interest for this use are thrombin inhibitors, thrombolytics (such as tPA and urokinase), renin inhibitors, ACE inhibitors, selectin ligands, inhibitors of the coagulation cascade, complement regulatory molecules (such as DAF, CR1, CR2, C4bp, factor H), serine proteases, GPIIb/IIIa antagonists, CRF antagonists, and the like.

Example 1: The isolation of binding molecules for Fc-region amino acid peptides

The techniques described above were employed to isolate binding molecules for ligands for Fc-region amino acid peptides. Human IgG Fc fragment isolated from plasma (Calbiochem, cat.# 401104) was lightly biotinylated at a ratio of 2:1, moles biotin:Fc protein. The biotin-Fc was bound to non-porous streptavidin beads (Dyneal). Prior to screening, libraries TN6/6, TN7/4, TN8/9, TN9/4, TN10/9, and TN12/1 were depleted of streptavidin, biotin and bead-binding phage by exposure to biotin-streptavidin beads. Next, the individual libraries were screened against the streptavidin-immobilized biotin-Fc-region target on beads and competition-eluted with an approximately ten-fold molar excess of Protein A. Pools were then made of the Protein A eluates such that TN12 and TN10 libraries were pooled, TN9 and TN8 libraries were pooled, and TN7 and TN6 libraries were pooled. The Protein A-eluted beads from each library were pooled in the same way and plated directly onto *E. coli* growth media to capture any tightly bound phage not eluted with Protein A. Protein A eluate library pairs and the bead-plated library pairs were then amplified and carried separately through two more rounds of screening with the biotin-Fc on beads.

Sequencing of recovered isolates has revealed 128 different Fc-region binding polypeptides thus far (SEQ ID NOS:14-143). Randomly chosen phage isolates from the third round of screening

WO 02/086070

PCT/US02/12492

from each library pool were evaluated by phage ELISA on plates exhibiting streptavidin-biotinylated Fc, BSA, biotin, streptavidin-biotin, streptavidin-BSA, and on the polystyrene plate alone. The biotinylated Fc captured all IgG Fc isotypes. Of the randomly-chosen isolates, approximately 95% from each group, the sequences of which are disclosed herein, showed positive binding for the ELISA experiments. In addition, isolates were examined by ELISA signal under competition with various concentrations with soluble Fc-region polypeptide.

Example 2: Binding Studies

Based on several criteria, i.e., high absorbance to various loading of immobilized Fc, effective response to soluble Fc competition, and either a representative binding motif or unique binding motif based on comparative sequence analysis, four phage isolates were chosen for further analysis to determine Fc binding constants by fluorescence anisotropy and to investigate various parameters that affect binding to determine optimal conditions useful for the affinity purification of Fc:

Ac-GDDHMCVYTTWGLIWCNDNHEPFGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:144, designated DX249);
Ac-AGPVDCKHHFWWCYWNGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:153, designated DX251);
Ac-GDDDHCVWFREWFENSECPHGEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:154, designated DX252);
Ac-AGYYWCNYWGLCPDQGTGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:155, designated DX254);

Peptides were synthesized by BACHEM Bioscience, Inc., (King of Prussia, PA), fluorescein labeled and purified by HPLC. Binding studies were performed using either a mixture of human plasma IgG isoforms (the Fc target) or the individual human plasma IgG isoforms: IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4. All Fc target proteins were obtained from Calbiochem.

All measurements were performed in 384 well microplates with 20nM fluorescein-labeled peptide and various concentrations of the IgG isoform in a volume of between 10 and 20 μ l using a Tecan Polarion fluorescence polarization plate reader. All binding buffers included 0.01% (v/v) Tween 20 to prevent peptide adsorption to the microplate. The binding mixture was equilibrated for 10 minutes in the microplate at 30 °C prior to performing the measurement.

Cross-competition studies between peptides were performed using 20nM fluorescein-labeled peptide and 1-2 μ M IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 in the presence and absence of a maximum of 100 μ M unlabeled peptide or 5mg/ml protein A.

Dissociation constants that describe IgG isoform binding for Fc-region binding polypeptides DX249, DX252, and DX254 are listed in Table 1.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

The data in Table 1 demonstrates that the peptides bind IgG in a pH-dependent manner. For instance, increasing the pH of the buffer from 5.7 to 7.4-9.3, increases the K_D of the interaction between DX249 or DX252 and the IgG isoforms. In contrast, DX254 does not appear to bind IgG1 or IgG2 in a pH-dependent manner. Additionally, the data in Table 1 demonstrate IgG subtype specificity, for example, DX249 binds to IgG1, IgG2, and IgG4 but not IgG3.

Table 1: Dissociation Constants (K_D) between IgG Isoforms and Synthetic Peptides in Low Ionic Strength Buffers.

Protein Target	pH [#]	K_D (μ M) ^o		
		DX249	DX252	DX254
IgG1	5.7	0.074 \pm 0.053*	0.1 \pm 0.056	0.09 \pm 0.09
IgG2	5.7	0.088 \pm 0.045	>1	>1
IgG3	5.7	>10	0.06 \pm 0.1	0.3 \pm 0.3
IgG4	5.7	0.3 \pm 0.3	>10	>10
IgG1	7.4	0.4 \pm 0.06	2.1 \pm 2	1.8 \pm 0.6
IgG2	7.4	1.8 \pm 0.6	3.4 \pm 1.5	2 \pm 0.7
IgG3	7.4	>10	2.3 \pm 0.4	>10
IgG4	7.4	1.9 \pm 0.4	3.2 \pm 2.6	2.9 \pm 1.6
IgG1	9.3	>10	>10	0.4 \pm 0.4
IgG2	9.3	>10	>10	2 \pm 2.7
IgG3	9.3	>10	>10	>10
IgG4	9.3	>10	>10	>10

[#]Buffers used: 1) pH 5.7, 0.01 M Tris-acetate
2) pH 7.4, 0.01 M Tris-HCl
3) pH 9.3, 0.01 M sodium bicarbonate

^oThe error in the K_D values is due to the standard error from the nonlinear regression as calculated by SigmaPlot.

*This particular measurement is the average of 5 separate determinations.

The data in Table 2 demonstrate that the K_D between DX249 and IgG1 at pH 5.7 increases approximately ten-fold on raising the sodium chloride concentration in the buffer from 0 to 100 mM.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Table 2: Effect of Sodium Chloride Concentration on the Dissociation Constant (K_D) between IgG1 and Synthetic Peptides at pH 5.7.

[NaCl] (M)	K_D (μM) ^a	
	DX249	
0	0.074 \pm 0.053	
0.05	0.3 \pm 0.3	
0.1	0.97 \pm 0.8	
0.15	0.84 \pm 0.7	

^aBuffers used: 1) pH 5.7, 0.01 M Tris-acetate
 2) pH 5.7, 0.01 M Tris-acetate, 0.05 M NaCl
 3) pH 5.7, 0.01 M Tris-acetate, 0.1 M NaCl
 4) pH 5.7, 0.01 M Tris-acetate, 0.15 M NaCl

The data in Table 3 demonstrate that all three peptides appear to bind the Fc IgG isoform mixture approximately the same, 2-5 μM , and the pH dependence for peptide binding to IgG1 is maintained in the presences of 150-200mM NaCl for DX249 and DX252. There was no observed effect of including 15% ethylene glycol on DX249 binding to IgG1 (Table 3).

Table 3: Dissociation Constants (K_D) between IgG Isoforms and Synthetic Polypeptides in "High" Ionic Strength Buffers.

Protein	pH	[NaCl] (M)	K_D (μM) ^a		
			DX249	DX252	DX254
Fc	8.0	0.2	2.5 \pm 0.5	5.1 \pm 3	1.6 \pm 0.6
IgG1	5.7	0.15	0.94 \pm 0.7		
IgG1	7.4	0.15	1.4 \pm 0.4 2.9 \pm 0.9	1.9 \pm 1.3 2.9 \pm 1.6	0.14 \pm 0.14 0.4 \pm 0.2
IgG1	9.3	0.2	>10	>10	0.6 \pm 0.5
IgG2	7.4	0.15	1.1 \pm 0.3	3.6 \pm 2.1 3.0 \pm 2.6	1.1 \pm 0.3
IgG3	7.4	0.15	>10	2.7 \pm 2	3.0 \pm 1.1
IgG4	7.4	0.15	1.9 \pm 1.2	>10	>10
IgG1	5.7	0 (15% EG)	0.08 \pm 0.2		
IgG1	7.4	0.15 (15% EG)	3.6 \pm 2.5		

WO 02/086070

PCT/US02/12492

*Buffers used: 1) pH 8.0, 0.05 M Tris-HCl, 0.2 M NaCl
 2) pH 5.7, 0.01 M Tris-acetate, 0.15 M NaCl
 3) pH 7.4, PBS
 4) pH 9.3, .01 M sodium bicarbonate, 0.2 M NaCl
 5) pH 5.7, 0.01 M Tris-acetate, 15% EG
 6) pH 7.4 PBS, 15% EG
 EG: ethylene glycol

Table 4 demonstrates cross-competition studies between peptides DX249, DX251, DX252, and DX254, using the IgG isoforms. Results demonstrate that all of the peptides, with the possible exception of DX254, appear to bind to the same isoforms in the Fc mixture and to the same sites.

Table 4: Cross-Competition between Synthetic Peptides for Fc Binding.

Labeled Peptide	Unlabeled Peptide			
	DX249	DX251	DX252	DX254
DX249	+	+	+	+
DX252	+	+	+	+
DX254	-	-	-	+

Table 5 demonstrates competition studies between DX249, DX252, or DX254 and Protein A for Fc binding. The data indicate that all of the peptides tested bind competitively with Protein A to IgG1, IgG2, and IgG4. In contrast, Protein A does not appear to compete with DX252 and possibly DX254 for binding to IgG3. This is consistent with the fact that Protein A is known not to bind human IgG3.

Table 5: Competition between Synthetic Peptides and Protein A for Fc Binding.

Labeled Peptide	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
DX249	+	+	NB	+
DX252	+	+	-	NB
DX254	+	+	?	NB

NB: no detected binding.

?: partial decrease in anisotropy with added competitor.

The above data indicate a possible affinity purification procedure whereby the Fc is bound to the peptide column at low pH, washed with high salt, and eluted with a low salt, high pH buffer.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Example 3: Additional Binding Studies

Peptides DX249, DX250 and DX253 were modified with acetylated N-terminal peptides and a C-terminal amine-functional linker to facilitate immobilization on an N-hydroxysuccinimide sepharose chromatography resin (Pharmacia). Additional binding studies were performed with the following peptides:

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:144, fluoresceinated at the C-terminus and designated DX249);

Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:145, fluoresceinated at the C-terminus and designated DX301); and

Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:146, fluoresceinated at the C-terminus and designated DX300).

Peptides were synthesized, fluorescein-labeled and HPLC purified as described above.

Binding studies were performed using either a mixture of human plasma IgG isoforms (the Fc protein) or the individual human plasma IgG isoforms: IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4.

Measurements were performed in 384-well microplates with 2 nM fluorescein-labeled peptide and a varied concentration of the IgG isoform target in a volume of 10 μ l using a Tecan Polarion fluorescence polarization plate reader. The Fc binding buffer was 50mM Tris-HCl, 200mM NaCl, pH 8.0, 0.01% Tween 20. The IgG binding buffer was PBS with 0.01% Tween 20. The binding mixtures were equilibrated for 10 minutes in the microplate at 30°C prior to performing the measurements.

Cross-competition studies between peptides were performed using 20nM fluorescein-labeled peptide and 6 μ M Fc (with DX276), 11.5 μ M Fc (with DX301) or 2 μ M IgG3 (with DX300) in the presence or absence of a maximum of 100 μ M unlabeled peptide.

The data in Table 6 demonstrate that peptide DX300 and peptide DX301 both exhibit IgG isoform specificity. DX300 binds only IgG3, whereas DX301 binds IgG1, IgG2, and IgG4, but not IgG3.

Table 6: Dissociation Constants for DX300 and DX301

Protein	DX300 K _D (μ M)	DX301 K _D (μ M)
Fc	No binding	6.8 \pm 4.3
IgG1	No binding	3.6 \pm 2.6
IgG2	No binding	2.3 \pm 0.8
IgG3	4.1 \pm 4.6	No binding
IgG4	No binding	9.7 \pm 13

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Example 4: Additional Cross-Competition Studies

Cross-competition studies were performed, testing the labeled Fc binding of peptides DX276, DX300 and DX301 against the following soluble Fc-region binding peptides:

- 5 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:144, designated DX 249);
 Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:146, designated DX250);
 Ac-AGPVDCKHHFWWCYWNGTGPPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:153, designated DX 251);
 Ac-GDDDHICYWPREWFNSECPHGEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:154, designated DX 252);
 Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:145, designated DX 253);
 10 and
 Ac-AGYYWCNYWGLCPDQGTGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:155, designated DX254);

Table 7 shows the results of cross-competition experiments with the labeled peptide and protein target as described above and with soluble competitors DX249, DX250, DX251, DX252, DX253, and DX254.

- 15 As can be seen from the data in Table 7, peptide DX249 does not compete with DX300 and therefore does not bind to IgG3.

Peptide DX250 competes with its labeled peptide counterpart, i.e., DX300, but also competes with DX276 and DX301, suggesting that it may weakly bind IgG1 and/or IgG2 or IgG4. Peptides DX251 and DX252 only compete with DX276.

- 20 Peptide DX253 does not compete with DX300 and therefore does not bind to IgG3.

Finally, peptide DX254 appears to compete with all the fluorescein labeled peptides examined.

Table 7: Cross-Competition

Labeled Peptide	Protein Target	Unlabeled Peptide					
		DX249	DX250	DX251	DX252	DX253	DX254
DX276	Fc	+	+	+	+	+	+
DX300	IgG3	-	+	-	-	-	+
DX301	Fc	+	+	-	-	+	+

25

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Example 5: Dissociation Constants

Dissociation constants were determined for the following peptides, which were prepared using the Fc-region binding peptides of SEQ ID NOS: 57, 58, 108, 115, 124, and 143, respectively:

Ac-AGSYWCKIWDVCPQSPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:147, designated DX392);

5 Ac-AGKYWCNLWGVCNANPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:148, designated DX395);

Ac-AGTYWCTFWELPCDPAPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:149, designated DX404);

Ac-AGPHNCDDHYWYCKWFPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:150, designated DX389);

Ac-AGAATCSTSYWYYQWFCIDSPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:151, designated DX398); and

Ac-AGYWYCWFPDRPECLYPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:152, designated DX413).

10 Peptides were synthesized by BACHEM and then Oregon Green labeled and HPLC purified. Binding studies were performed using human plasma IgG isoforms: IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4, obtained from Calbiochem.

Binding studies were carried out at either pH 4.0, 7.5, or 9.5, with or without salt in the following buffers:

15 1) 10 mM Sodium Citrate, 0.01 % Tween 20, pH 4.0;

2) 10 mM Sodium Citrate, 500 mM Sodium Chloride, 0.01 % Tween 20, pH 4.0;

3) 10 mM Tris-HCl, 0.01 % Tween 20, pH 7.5;

4) 10 mM Tris-HCl, 500 mM Sodium Chloride, 0.01 % Tween 20, pH 7.5;

5) 10 mM Sodium Bicarbonate, 0.01 % Tween 20, pH 9.5;

20 6) 10 mM Sodium Bicarbonate, 500 mM Sodium Chloride, 0.01 % Tween 20, pH 9.5; or

7) TBS, 0.01 % Tween 20, pH 7.5.

Results of the binding studies are shown in Table 8.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Table 8: Summary of K_D values for the IgG binding Oregon Green Labeled Peptides

Peptide	IgG isoform	K_D (μ M)						TBS
		pH 4.0 - salt	pH 4.0 + salt	pH 7.5 - salt	pH 7.5 + salt	pH 9.5 - salt	pH 9.5 + salt	
DX389	IgG1	nb*	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	IgG2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	IgG3	2.5 ± 1.0	1.8 ± 1.4	nb	binds ^b	nb	nb	nb
	IgG4	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
DX392	IgG1	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	IgG2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	IgG3	0.32 ± 0.08	0.6 ± 0.2	nb	binds	nb	binds	nb
	IgG4	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
DX395	IgG1	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	IgG2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	IgG3	1.0 ± 0.26	1.8 ± 1	nb	1.9 ± 0.9	nb	binds	nb
	IgG4	nb	nb	binds	nb	nb	nb	nb
DX398	IgG1	2.4 ± 3.3	nb	4.6 ± 1.2	nb	nb	nb	nb
	IgG2	1.8 ± 1.2	nb	nb	nb	binds	nb	nb
	IgG3	0.02 ± 1.0	0.04 ± 0.01	nb	0.3 ± 0.03	binds	0.3 ± 0.1	binds
	IgG4	1.6 ± 1.5	nb	3.5 ± 0.8	nb	nb	nb	nb
DX404	IgG1	1.5 ± 0.8	2.0 ± 1.7	8.8 ± 4.0	nb	nb	nb	nd
	IgG2	1 ± 0.4	2.0 ± 1	8.6 ± 3.5	nb	nb	nb	nd
	IgG3	0.01 ± 0.01	0.20 ± 0.06	11 ± 5.4	3.7 ± 0.8	nb	binds	nd
	IgG4	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nd ^c
DX413	IgG1	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nd
	IgG2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nd
	IgG3	0.84 ± 0.08	1.1 ± 0.2	nb	nb	nb	nb	nd
	IgG4	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nd

*nb: no significant binding observed

^bbinds: peptide appears to bind but the signal change could not be fit to obtain a reliable estimate of the K_D . The K_D is estimated to be greater than 10 μ M.^cnd: not determined.

The results shown in Table 8 demonstrate that DX389 specifically binds IgG3 at pH 4.0 in either the presence or absence of salt with moderate affinity ($K_D \approx 2 \mu$ M). This interaction was not observed in the presence or absence of salt either at pH 7.5 or 9.5.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Peptide DX392 bound IgG3 specifically at pH 4.0 both in the presence and absence of salt and with a high affinity ($K_D \cong 0.3-0.6 \mu\text{M}$). This interaction was lower at pH 7.5 and pH 9.5 in the presence of salt and was not observed at either pH in the absence of salt.

Peptide DX395 bound IgG3 specifically at pH 4.0 in either the presence or absence of salt at moderate affinity ($K_D \cong 1-2 \mu\text{M}$). The affinity was approximately the same ($K_D \cong 1.9 \mu\text{M}$) in the presence of salt. This interaction was diminished at pH 9.5 in the presence of salt and was not observed at pH 7.5 or 9.5 in the absence of salt.

Peptide DX398 bound all four IgG isoforms at pH 4.0 in the absence of salt with moderate affinity ($K_D \cong 2 \mu\text{M}$) for IgG1, IgG2, and IgG4, and high affinity ($K_D \cong 0.02 \mu\text{M}$) for IgG3. At pH 4.0 in the presence of salt, peptide DX398 maintained a high affinity for IgG3 but did not interact with IgG, IgG2, or IgG4.

At pH 7.5, DX398 bound IgG1 and IgG4 only in the absence of salt and in the presence of salt, only bound IgG3. At pH 9.5, this peptide only bound IgG3 and the interaction was favored by increasing ionic strength.

Peptide DX404 bound IgG1 and IgG2 at pH 4.0 in the presence or absence of salt with moderate affinity ($K_D \cong 2 \mu\text{M}$) and had a higher affinity for IgG3 ($K_D \cong .01 \mu\text{M}$). In the presence of salt, the affinity for IgG3 increased to $0.2 \mu\text{M}$. The affinity for IgG1 and IgG2 was reduced at pH 7.5 in the absence of salt and not observed in the presence of salt or at pH 9.5. IgG3 binding at pH 7.5 and 9.5 was favored in the presence of salt.

Peptide DX413 bound only to IgG3 at pH 4.0 in the presence or absence of salt with moderate affinity ($K_D \cong 1.0 \mu\text{M}$).

The data in Table 8 indicate that the peptides bind IgG with varying isoform specificities in a pH and salt-dependent manner. In general, the peptides in Table 8 can be grouped into two "classes" based on their specificity and mode of interaction:

Class 1 includes DX389, DX392, DX395 and DX413. Essentially these peptides all appear to exhibit primary specificity for IgG3. In addition, the interaction appears to be favored by low pH and high ionic strength. Binding is weakest at high pH and low salt.

Class 2 includes DX398. This peptide exhibits isoform specificity that is alterable by ionic strength. At low pH in the absence of salt, this peptide binds all IgG isoforms but in the presence of salt, it only binds IgG3 with very high affinity ($K_D \cong .04-0.3 \mu\text{M}$) at pH 4.0, 7.5, and 9.5 (See Table 8). DX404 is similar to DX398, however this peptide, unlike DX398, does not exhibit the salt-dependent IgG3 specificity at pH 4.0 but does exhibit salt-dependent IgG3 specificity at pH 7.5 and 9.5.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

In addition, this study presents the first detailed demonstration for the use of Oregon Green as a fluorescent probe in anisotropy measurements. This probe exhibits photophysical parameters similar to fluorescein and offers the advantage of a wider pH range over which it is fluorescent. This increase in pH range is due to the lower pKa of the carboxylic acid group found on both Oregon Green and fluorescein (pKa = 4.7 for Oregon Green vs. 6.4 for fluorescein).

The fluorescence anisotropy data above indicate binding characteristics of several of the disclosed Fc-region binding polypeptides for mixed human Fc and various IgG Fc isoforms. The pH- and NaCl-dependent studies indicate possible schemes for binding and elution conditions. The data indicate that a possible affinity purification scheme will involve binding of the peptides to Fc in a low pH buffer followed by a high salt wash and elution with a low salt, high pH buffer.

Example 6: Batch-binding Evaluation

Batch-binding studies were carried out by incubating 10 μ l aliquots (packed bed volume) of selected immobilized DX peptides (affinity media) with 100 μ l of a 0.5 mg/ml (50 μ g per 10 μ l resin or 5.0 mg/ml resin) solution of each of the following targets: human IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 (all human subtypes derived from myeloma patients, Calbiochem, catalog nos. 400120, 400122, 400124, and 400126, respectively). In addition, the following targets, all unfractionated IgGs, were also evaluated with selected immobilized peptides for species specificity characterization in a similar format: human IgG, goat IgG, bovine IgG, and mouse IgG (Sigma, product nos. I4506, I5256, I5506, and I5381, respectively). In addition, 10 μ l aliquots of hydrolyzed NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, product no. 17-0906-01) and immobilized recombinant Protein A (RepliGen Corp., product no. IPA-400) were also assayed as negative and positive controls. IgG targets were diluted into 10 mM phosphate buffer containing 150 mM NaCl and 0.01% Tween 20, pH 7.2 (PBST) or 50 mM Tris buffer containing, 150 mM NaCl and 0.01% Tween-20, pH 7.5 (TBST). Batch (static) binding and elution studies were conducted in a 96-well assay filterplate (Millipore MultiScreen-HV, with 0.45 μ m Durapore membrane, product no. MAHVN4510). The target was allowed to incubate with the resin for 1-1.5 hours with shaking at room temperature. Unbound target was collected by centrifugation of samples from the assay plate directly into a low-UV absorbing 96-well collection plate (Costar, product no. 3635 or Greiner, product no. 655801). The unbound target was then quantitated by reading the absorbance at 280 nm (normalized to 1 cm pathlength, 1.4 mg/ml A280 extinction coefficient) of the collection plate on a microplate spectrophotometer (Molecular Devices Corp., SPECTRAMax PLUS) against a buffer blank.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

The percentage bound target was determined by subtracting the mass determined as unbound from the corresponding condition's control values (control non-filtered added directly to the collection plate and/or the negative control). The assay plate was washed (3X) with 200 μ l of binding buffer by vacuum filtration followed by addition of 100 μ l of various elution conditions (e.g.: 0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 8.5 and/or 0.1 M sodium citrate buffer, pH 4.0). After a 30-60 minute incubation with shaking at room temperature, the eluted target was collected by centrifugation of the assay plate into another collection plate and quantitated in a similar manner. Percent elution of total load was then determined to characterize elution recovery efficiency under various conditions. The assay plate was then washed (3X) with 200 μ l of binding buffer by vacuum filtration followed by addition of a resin cleaning condition (e.g., 0.1M CAPS buffer (3-(Cyclohexylamino)-1-propane-sulfonic acid), pH 11.5, to regenerate the resin for re-use. Percentage mass balance determination was calculated to be 90-100% on average.

Table 9: % IgG Capture - Batch Binding: Human IgG Subtype Specificity

	Human IgG1	Human IgG2	Human IgG3	Human IgG4
Prot. A	95	92	1	96
DX249	91	92	0	82
DX253	58	56	7	33
DX398	6	0	79	2
DX404	38	11	74	10
DX392	13	15	76	9
DX395	21	2	85	4
DX252	34	24	35	6
DX254	28	16	36	6
DX389	4	11	26	3
DX251	6	14	5	1

15

Table 10: Batch Binding (bdg) and Elution (elu) of Human IgG (% of Total Load)

	Human IgG1			Human IgG2			Human IgG3			Human IgG4		
	bdg %	elu pH 8.5	elu pH 4.0	bdg %	elu pH 8.5	elu pH 4.0	bdg %	elu pH 8.5	elu pH 4.0	bdg %	elu pH 8.5	elu pH 4.0
Prot. A	93	2	79	93	8	75	5	0	0	92	2	95
DX249	91	63	51	92	54	63	3	0	0	82	66	54
DX252	37	19	30	37	8	10	44	8	5	14	4	N/A
DX253	56	44	14	63	32	12	15	0	5	40	22	N/A

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Table 11: % IgG Capture -- Batch Binding: Species Specificity

	Human IgG	Goat IgG	Bovine IgG	Mouse IgG
Prot. A	86	23	72	77
DX249	84	0	0	0
DX253	54	0	0	2
DX398	9	0	2	4
DX404	30	0	0	2
DX392	4	0	0	0
DX395	19	0	0	0
DX252	20	0	0	1
DX254	16	0	0	2
DX389	4	0	0	0
DX251	4	0	0	4

5

The results in Table 9 demonstrate that affinity media DX249 and DX253 exhibited similar batch-binding properties to Protein A, indicating that they may interact with the Fc region of human immunoglobulins in a similar manner. The other affinity media exhibited significantly different binding properties, including significant binding affinity to the human IgG3 isotype, to which Protein A does not bind. hIgG target elution was also demonstrated for selected immobilized DX peptides (affinity media) relative to Protein A. Percentage elution of total hIgG load (Table 10) showed affinity media DX249 and DX253 to elute at both pH 4.0 and 8.5 compared to Protein A, which elutes at acid pH range (pH 4.0). In addition, the affinity media tested showed no significant binding to goat, bovine and mouse IgG relative to Protein A (see, Table 11). Protein A showed a moderately high binding affinity to the goat, bovine and mouse immunoglobulins tested.

Example 7: Chromatographic performance of Fc-binding affinity media

Binding studies under dynamic conditions on mini-chromatography columns packed with selected immobilized DX peptides (affinity media) showed similar binding profiles to those found in the batch binding studies above. Thus, 250 µg of target (hIgG1, hIgG2, hIgG3, hIgG4, goat IgG and bovine IgG) at 0.250 mg/ml in PBST, pH 7.2 or TBST, pH 7.3 was loaded onto a 350 µl column (3 × 50 mm) run at 0.200 ml/min. flowrate (170 cm/hr). Flowthrough, elution and cleaning fractions were collected and assayed for total protein recovery by size-exclusion HPLC. Percentage mass balance was also determined to be 90-100% on average. Percent binding efficiency was generally higher than seen in batch measurements, so that affinity media DX249 and DX253 showed binding efficiencies

WO 02/086070

PCT/US02/12492

similar to that of Protein A for hIgG1, hIgG2 and hIgG4 (all >90%). Affinity media DX404 also showed high binding efficiency specifically for hIgG3. In addition, the affinity media tested showed no significant affinity towards goat or bovine IgG. Protein A again showed moderate to high binding efficiency to both goat and bovine IgG respectively.

5 In another study, based on the batch-binding studies, three affinity media, DX249, DX253 and DX252 were selected for further evaluation in a similar chromatographic system. For these experiments, 350 μ l columns (3 \times 50 mm) were packed with each media. The columns were tested with human Fc fragments or human IgG1 (Calbiochem, 401104 and 400120 respectively) spiked into PBST, pH 7.2 at a concentration of 0.5g/l. 65 μ g of Fc was loaded onto each column. After loading, 10 the columns were washed with PBST, pH 7.2, eluted with 30mM H₃PO₄, 150mM NaCl, pH 2.0 and cleaned with 0.1M CAPS, pH 11.5 buffer (3-[Cyclohexylamino]-1-propane-sulfonic acid). Fractions collected were immediately neutralized to pH ~7.2 with 2.0 M Tris, pH 8.0. All column operations were conducted at 200 μ l/min (170cm/hr).

Results demonstrate that affinity media DX249 and DX253 exhibit quantitative binding of 15 both Fc and IgG1 (capture efficiency \geq 92%). Affinity media DX252 showed lower capture efficiency (70 and 80% respectively), significantly better than it performed in batch-binding studies. This is not unexpected since the chromatographic system will have a greater number of theoretical equilibrium stages than the batch binding system, which should lead to higher capture efficiencies. Thus, affinity media DX253 and DX252 showed \geq 85% elution recovery of bound and \geq 89% purity 20 of monomeric protein by size-exclusion HPLC (SEC-HPLC).

Example 8: Capture of human Fc Out of Tobacco Extract

The ability of affinity media based on DX253 to capture human Fc and human IgG1 out of tobacco extract was evaluated in separate experiments. The tobacco extract used was a representative 25 concentration blank lot (CropTech, lot NV100-136). Human Fc or IgG1 was spiked into the tobacco extract at 50 μ g/ml. 100 μ g (2 ml) was loaded onto a 350 μ l column packed the DX253 media at 200 μ l/min. (170 cm/hr.). Prior to loading, the column had been equilibrated with 50 mM Tris buffer containing 150 mM NaCl and 0.01% Tween 20, pH 7.3 (TBST, pH 7.3). After loading, the column was washed with 50 mM Tris buffer containing 1M NaCl, pH 7.3 followed by elution with 30mM 30 H₃PO₄, 150mM NaCl, pH 2.0. The column was then cleaned with 0.1 M CAPS, pH 11.5 and separately with 30% isopropanol, 5% acetic acid in water, -pH 2.7. Collected fractions were neutralized immediately with 2M Tris, pH 8, prior to analysis by size exclusion HPLC. Results

WO 02/086070

PCT/US02/12492

demonstrate % recovery of 91 and 76% of total load and % purity of 79% and 89% monomeric protein for both Fc and IgG1 from tobacco extract, respectively.

Example 9: Capture of Human IgG1 from Cell Culture Supernatant

5 The ability of affinity media DX249 to capture human IgG1 out of conditioned CHO (Chinese Hamster ovary) cell culture supernatant containing 5% fetal bovine serum was evaluated. Human IgG1 (93% monomer) was spiked into conditioned CHO media to 50 µg/ml and 5 ml (250 µg total) was loaded onto a 350 µl mini-column as described above. The column was washed to baseline with PBST, pH 7.2 and the flowthrough fraction collected. Bound IgG was eluted with 0.1M sodium bicarbonate buffer, pH 9.0, and the column cleaned with 0.1M CAPS, pH 11.5. The eluted and clean 10 fractions were quickly neutralized to -pH 7.2 and assayed for mass recovery by SEC-HPLC. Thus, an 80% recovery (98% monomer) was obtained in the eluted fraction. The column load, flowthrough, elution and cleaning fractions were further analyzed by electrophoresis (SDS-PAGE), Coomassie stain and Western analysis for the presence of human and bovine IgG. This analysis showed that 15 affinity media DX249 specifically captured hIgG1 from conditioned CHO media containing 5% fetal bovine serum. The load showed the presence of both human IgG and bovine IgG. The flowthrough fraction showed the presence of bovine IgG with no detectable human IgG. The elution fraction showed the presence of human IgG serum with no apparent bovine IgG contamination.

These results demonstrate that DX249 and peptides of like specificity according to the 20 invention can be used to quantitatively isolate human Fc-region polypeptides from culture media or other solutions that contain both human and other mammalian immunoglobulins.

Example 10: Capture of human IgG4 from goat IgG in buffer

25 The ability of affinity media DX249 to capture human IgG4 from goat IgG (5-fold excess) in buffer was also evaluated. 0.250 mg of hIgG4 (99.5% monomer) was added to 1.0 mg of goat IgG in a total volume of 1.0 ml of PBST, pH 7.2. Thus, 1.0 ml was loaded onto a 350 µl mini-column as described above. The column was washed to baseline with PBST, pH 7.2 and the flowthrough fraction collected. Bound IgG was eluted with 0.1M sodium bicarbonate buffer, pH 9.0 and the column cleaned with 0.1M CAPS, pH 11.5. The eluted and clean fractions were quickly neutralized 30 to pH-7.2 and assayed for mass recovery by SEC-HPLC. Thus, an 87% theoretical load (assumed to be human IgG4) recovery (99.5% monomer) was obtained in the eluted fraction. Likewise, a 102% theoretical load (assumed to be goat IgG) recovery was obtained in the flowthrough fraction. The

WO 02/086070

PCT/US02/12492

column load, flowthrough, elution and cleaning fractions were further analyzed by electrophoresis (SDS-PAGE), Coomassie stain. This analysis showed that affinity media DX249 specifically captured hIgG4 from goat IgG at 5-fold excess in buffer. The load showed the presence of both human IgG and goat IgG. The flowthrough fraction showed the presence of goat IgG with no human IgG4. The elution fraction showed the presence of human IgG4 with no apparent goat IgG contamination. The cleaning fraction showed no protein present.

Example 11: Batch Binding and Elution of Human IgG Subtypes:

DX596 (SEQ ID NO:157), DX597 (SEQ ID NO: 158) and DX1070 (SEQ ID NO:159) were immobilized and tested in filterplate format (as previously described) for both species specificity and human IgG subtype binding and elution relative to Protein A and DX249 and DX253 (SEQ ID NOs:144 and 145). The polypeptides synthesized for these tests are set forth in Table 12, below.

DX596 contains two lysine residues within the selected sequence which were synthesized using the orthogonal protecting group, ivDde, to prevent coupling within the selected sequence (the likely binding site). Once the C-terminal lysine was coupled to the resin, the ivDde protecting groups were removed with 2% hydrazine in DMF. A derivative polypeptide (designated DX1071) was synthesized in which these two internal lysines were substituted with arginine and alanine to determine if it was possible to eliminate the need for synthesis with the ivDde protecting group and eliminating the de-protecting step. In addition, a second derivative (designated DX1072) was synthesized with the arginine-alanine substitution and also a substitution of the adjacent serine residue with histidine. These two residue-substituted derivatives of DX596 (DX1071 and DX1072) were also immobilized and tested in filterplate format in a similar manner. All DX-peptides were immobilized to an average ligand density of 1.8 $\mu\text{M}/\text{ml}$, as determined by quantitative amino acid analysis.

Table 12: Peptide Sequences

DX-number	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
DX249	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHEPGPEGGK-NH ₂	144
DX253	Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGK-NH ₂	145
DX1070	Ac-GDWGECTVTSYGELIWCGLPEPGPEGGK-NH ₂	159
DX597	Ac-GDSWNC AF HHEM V WCDDGGTPPEGGK-NH ₂	158
DX596	Ac-GDNPMC W K S W W E D A Y CINHEPGPEGGK-NH ₂	157
DX1071	Ac-GDNPMC W R A S W E D A Y CINHEPGPEGGK-NH ₂	160

WO 02/086070

PCT/US02/12492

DX1072 Ac-GDNP~~M~~C~~W~~R~~A~~H~~H~~W~~E~~D~~A~~Y~~C~~I~~N~~H~~E~~P~~G~~P~~E~~G~~G~~G~~K~~-NH₂ 161

In the foregoing table, Ac- denotes N-terminal acetylation, -NH₂ denotes C-terminal amidation.

The results, set forth in Table 13, below, demonstrate that affinity media using polypeptides
5 DX596, DX597, and DX1070 exhibited batch binding properties similar to Protein A, DX249 and
DX253 as previously described. IgG is not eluted from Protein A at high pH, whereas DX249,
DX253, DX596 and DX597 showed efficient elution at both low pH (pH 2.5 to 4.5) and high pH (pH
9.0 and 9.5). No ligand (including Prot. A) showed good elution at pH 5.5. DX1070 showed only
10 partial elution of human IgG at pH 3.0. For DX1070, a significant amount of non-pH 3.0 eluted
human IgG was recovered in a cleaning step with 3M guanidine-HCl, pH 7.2. DX1071, the
substitutional derivative of DX596, showed no significant binding of human IgG. DX1072 showed a
binding profile similar to Prot. A, DX249, DX253, DX596, DX597 and DX1070 (both human IgG
subtype and species specificity), although binding efficiency was much lower.

15

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Table 13: Batch Binding and Elution of Human IgG (% of Total Load)

hIgG1	Bound	pH 2.5	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.5	pH 5.5	pH 9.0	pH 9.5
Prot. A	96	80	80	86	29	3	3	3
DX249	88	65	69	69	37	1	65	68
DX253	88	78	75	54	55	8	44	45
DX596	87	66	N/A	78	61	3	32	58
DX597	93	76	N/A	81	39	1	52	57
DX1070	87	N/A	22	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1071	7	N/A	4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1072	31	N/A	27	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

hIgG2	Bound	pH 2.5	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.5	pH 5.5	pH 9.0	pH 9.5
Prot. A	85	75	75	76	65	22	13	18
DX249	78	71	73	63	39	1	60	67
DX253	81	78	69	55	31	0	42	47
DX596	81	71	N/A	92	44	3	58	64
DX597	90	82	N/A	80	38	1	51	60
DX1070	82	N/A	42	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1071	2	N/A	7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1072	21	N/A	21	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

hIgG3	Bound	pH 2.5	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.5	pH 5.5	pH 9.0	pH 9.5
Prot. A	0	0	0	0	0	0	0	0
DX249	0	0	0	0	0	0	0	0
DX253	0	0	0	0	0	0	0	0
DX596	0	0	N/A	0	0	0	0	0
DX597	0	0	N/A	0	0	0	0	0
DX1070	0	N/A	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1071	0	N/A	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1072	0	N/A	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

hIgG4	Bound	pH 2.5	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.5	pH 5.5	pH 9.0	pH 9.5
Prot. A	89	70	77	87	27	6	7	8
DX249	61	42	43	30	10	4	53	59
DX253	60	49	49	53	23	4	45	62
DX596	65	44	N/A	61	17	2	55	67
DX597	71	59	N/A	62	13	3	58	67
DX1070	59	N/A	14	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1071	1	N/A	5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DX1072	15	N/A	11	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A = not tested

5

Species specificity results (Table 14) showed no significant binding of goat, bovine, and mouse IgG to DX249, DX253, DX597 and DX1070. DX596 showed a slightly elevated level of binding to these IgG targets of 5-8% above background. In comparison, Protein A showed binding to goat, bovine and mouse IgG.

10

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Table 14: % IgG Capture - Batch Binding: Species Specificity

Prot. A	Human IgG	Goat IgG	Bovine IgG	Mouse IgG
DX249	81	20	60	69
DX253	74	0	0	2
DX596	71	0	0	2
DX597	72	8	5	5
DX1070	77	0	0	3
DX1071	91	0	0	0
DX1072	45	3	0	8
	49	4	0	0

5

Example 12: Static and Dynamic Capacity of DX249 and DX253 vs. Ligand Density

Polypeptides DX249 and DX253 were immobilized onto NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow media (as previously described) at nominal ligand densities of 0.2, 1.0, 2.0 and 4.0 μ mole ligand/ml media. These media were used to determine the effect of ligand density on human IgG binding capacity in both static (filterplate) and dynamic (mini-column) modes with commercial immobilized recombinant Protein A (Repligen, IPA400) at a single density as control. Actual ligand densities obtained ranged from 0.17 to 3.2 μ mole/ml media as confirmed by quantitative amino acid analysis.

Static (Filterplate) Mode

Using a 96-well assay filterplate (Millipore MultiScreen-HV, with a 0.45 μ m Durapore membrane, product No. MAHVN4510), 10 μ l (packed bed volume) of each of the media to be tested, DX249 (at four densities), DX253 (at four densities), hydrolyzed NHS-Sepharose 4 FF, and rProtein A (Repligen Corp. product No. IPA-400) were suspended in 100 μ l of PBST (10 mM Phosphate buffer, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) containing varying amounts of human IgG (0.0, 1.25, 2.5 and/or up to 20.0 mg/ml). After incubation of the samples, with shaking, at room temperature for one hour, the supernatant liquid from each well, containing unbound IgG, was collected by centrifugation into the cognate well of a collection plate. The assay plate was washed three times with PBST (200 μ l/wash) and bound IgG was eluted from the media samples by incubation for 30-60 minutes at room temperature in 100 μ l Elution Buffer (100 mM CAPS, pH 11.5). Eluates were collected by centrifugation for analysis. Protein concentrations were determined from A_{280} measurements and plotted as a function of mg human IgG bound per ml resin vs. mg human IgG applied per ml resin.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

The amount of IgG captured (estimated from IgG recovered in the elution step) by the various media is dependent upon both the IgG concentration and the ligand density. In general, with both DX249 and DX253 apparent relative static capacities increased with ligand densities and target concentration. Under these static conditions, where both ligand and target concentrations are close to K_D values, equilibrium binding is established and total capacities cannot be accurately determined. However, over the IgG range of 0 to 25 mg IgG applied per ml resin (0 to 2.5 mg/ml target added to 10 μ l of resin), capture of IgG is linear. Beyond this point, up to a level of 200 mg IgG applied per ml resin, saturation becomes more pronounced. Table 15 shows apparent relative static binding performance of both DX249 and DX253 media. At ligand densities around 1 μ mole/ml DX249 and DX253 media is comparable to that of Protein A media at a target concentration of 25 mg IgG applied per ml resin (2.5 mg/ml target added to 10 μ l of resin). At higher ligand densities (especially with higher target concentrations) the apparent relative static capacities of the DX-peptide media significantly exceed (by 2- to 3- fold) that of the Protein A media.

Dynamic (Mini-Column) Mode

Mini-chromatography columns (Omnifit, 6319) 3 mm \times 25 mm (internal diam. \times length), 0.17 ml bed volume, were packed with various DX249, various DX253, and Protein A media for dynamic performance testing. Human IgG (ICN, 55908) was prepared in PBS pH 7.2 at 2.5 mg/ml. The IgG solution was loaded onto the column at a flow rate of 0.2 ml/minute (170 cm/hr). The absorbance of the column eluate was monitored at both 214 and 280 nm and fractions were collected across the entire run. At the end of the loading period, the column was washed with PBS until the absorbance at 280 nm of the column eluant returned to baseline. IgG bound to the column was eluted using 30 mM H_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 2.0 followed by PBS wash to baseline followed by cleaning with 0.1M CAPS, pH 11.5. Neutralizing the pH of the eluted fractions was unnecessary since the total IgG eluted was determined by total protein absorbance at 280 nm.

To establish total media capacities, IgG was loaded onto the columns until the absorbances of the column load and flow through streams were identical (loading to full capacity). After washing the column to baseline, bound IgG was eluted and the total amount captured from this elution fraction determined. The total capacity of the media (mg IgG/ml media) as total IgG captured divided by the column bed volume was calculated.

Additionally, column capacities at 10% breakthrough were calculated from the online A_{280} measurements of column flowthrough streams. The A_{280} curves obtained for the column of interest and for an equivalent "blank" column containing hydrolyzed Sepharose FF 4 media were aligned.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

The difference in areas between these curves (for a retained and non-retained target) from the time of injection to the time at which the A_{280} value for the column of interest had risen to 10% of the maximum A_{280} absorbance (100%) obtained for the load solution at 100% IgG capture saturation (10% breakthrough) was graphically integrated. A standard curve was used to relate the integrated area to mg IgG bound and capacity calculated as total IgG bound divided by column bed volume.

Table 15 summarizes the results of these studies for the nine different affinity media tested: DX249 and DX253, each at four different ligand densities as measured by amino acid analysis, and recombinant Protein A (Repligen, #IPA400) at an undefined density. For both DX249 and DX253 media, both static and dynamic capacity values increase with increasing ligand densities. Dynamic capacities similar to that for the rProtein A media are achieved for ligand densities of about 2 to 3 $\mu\text{mole/ml}$. For each ligand density tested, static and total dynamic capacities, as measured by elution, are similar. For the two DX media at all ligand densities, capacities at 10% breakthrough are about 50% ($\pm 20\%$) of total dynamic capacities; as compared to about 75% for rProtein A. This small difference may result from kinetic or ligand availability difference between the media.

Table 15: Capacities of Various IgG Affinity Resins

Ligand	Ligand Density ($\mu\text{M}/\text{mL}$)	Capacity (mg IgG/mL resin)		
		Static	Total Dynamic	10% Breakthrough
DX-253	0.17	1.1	0.6	0.1
	0.84	8.5	5.8	2.6
	1.45	13.5	6.4	2.9
	2.75	17.4	24.1	8.5
DX-249	0.19	1.2	1.2	1.1
	0.86	9.5	8.4	4.4
	1.63	15.4	10.3	5.9
	3.20	19.0	16.4	5.5
rProA	(not determined)	11.1	16.3	12.9

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Example 13: DX253 Column Cycling (Re-use)

DX253 peptide was immobilized onto NHS-activated 4 Fast Flow to a ligand density of 2.9 $\mu\text{mole/ml}$ as determined by quantitative amino acid analysis. This affinity resin was packed into a 4.6 mm \times 6 cm (internal diam. \times length, 1.0 ml bed volume) PEEK column (Isolation Technologies, Inc., 50501P-08046-006-20). Prior to performing total capacity and cycling studies, the column/affinity matrix was pre-conditioned with 100 mg BSA load, 0.1M citrate, pH 3.0, 3M guanidine-HCl, 20 mM phosphate, pH 7.2 and re-equilibrated into PBS, pH 7.2.

Total Capacity:

To establish total dynamic binding capacity, polyclonal human IgG (ICN, 55908) was prepared in PBS, pH 7.2 containing 0.05% NaN₃ at 2.5 mg/ml. A total of 75 mg (30 ml) was loaded at 0.21 ml/minute (75 cm/hr) to capacity (until the absorbance at 280 nm of the load was equivalent to that of the column flowthrough). Fractions were collected across the entire run. Unbound IgG was washed to baseline at 0.42 ml/minute (150 cm/hour) with PBS, pH 7.2. Bound IgG was eluted with 0.1M citrate, pH 3.0 buffer and immediately neutralized with minimal addition of 1M HEPES, pH 9.0 buffer to \sim pH 7.0. Following an additional wash with PBS, pH 7.2, the column/affinity media was cleaned with 3M guanidine-HCl, 20 mM phosphate, pH 7.2 and re-equilibrated back into PBS, pH 7.2. All post-load wash, elution and cleaning steps were performed at a flow rate of 0.42 ml/minute (150 cm/hour). Total mg IgG bound was determined by measuring the absorbance at 280 nm of the elution fraction calculated using an extinction coefficient of 1.4. Initial (T = 0, prior to initiating column cycling) total dynamic capacity measured 19.8 mg human IgG per ml affinity resin. This determination was repeated 4 additional times during the course of 95 cycles to assess the relative performance of the affinity column after repeated use and re-use. Mass balance recovery for these 5 total capacity determinations averaged 98%. Table 16 shows the % relative column performance calculated, based on total capacity at T = 0 of 19.8 mg/ml, or 100%. The column retained approximately 90% relative performance with respect to total dynamic capacity after 95 cycles. This procedure was used for cycles 0, 26, 66, 86, and 96, as shown in Table 16.

Column Cycling

Human IgG was spiked into fresh cell culture media (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (ultra low) to 0.5 mg/ml. 2 ml (1.0 mg IgG) was loaded onto the column which was pre-equilibrated with PBS, pH 7.2. Loading was performed at 0.21 ml/minute (75 cm/hour) and all subsequent steps (wash, elution and cleaning) were performed at 0.42 ml/minute (150 cm/hour). Unbound sample was washed to baseline with PBS, pH 7.2, followed by elution with 0.1M citrate,

WO 02/086070

PCT/US02/12492

pH 3.0, wash with PBS, pH 7.2, cleaning with 3M guanidine-HCl, 20 mM phosphate, pH 7.2 and re-equilibration back into PBS, pH 7.2. A total of 19 series of 5 cycles each (95 cycles total) were run. Table 16 shows % relative performance at every tenth cycle, with respect to elution peak area recovery as compared to the initial cycle (cycle 1 peak area = 100%). This procedure was used for cycles 1-25, 27-65, 67-85, and 87-95.

At approximately 5% of total dynamic capacity load (1.0 mg IgG), the column performance remains unchanged despite the ~10% decline in total capacity performance. Cycles 1, 26, 41, 66, 80, and 95 were collected and the eluted IgG fraction was immediately neutralized with a minimal addition of 1M HEPES, pH 9.0 buffer to pH ~7.0. SDS-PAGE analysis (4-12% Tris-Glycine gel, denaturing/non-reducing, Coomassie stained) showed complete and efficient capture of the human IgG from cell culture media. The eluted fraction was equivalent in purity to the purified standard and remained consistent over the course of the study.

Table 16: Relative Performance of DX253 Sepharose Column at Different Cycles

Cycling Run No.	% Relative Performance	Total Capacity Cycle Run No.	% Relative Performance
1	100	0	100
10	97.6	26	93.9
20	97.9	66	85.9
30	102.3	86	91.4
40	103.1	96	87.9
51	102.0		
60	103.1		
70	102.6		
81	102.1		
90	101.8		

Example 14: DX249 C-Terminal Truncation/PFO-Linker Substitution:

A series of six derivatives of DX249 (SEQ ID NO:144) was constructed to determine the possibility of truncating the nine C-terminal residues including the C-terminal spacer/linker (-PEGGGK, SEQ ID NO:168) and replacing it with a more hydrophilic, non-peptide polyethylene glycol-like linker, while maintaining chromatographic performance. Such derivatives may be more quickly and less expensively synthesized.

Table 17 shows the various DX249 derivative constructs. The terminal structures are defined below. DX905 was designed with a 31-atom polyethylene-glycol-like spacer/linker, however peptide

WO 02/086070

PCT/US02/12492

synthesis of DX905 failed (primarily due to reduction of substitution as a result of crosslinking of the reactive functionalities on the resin).

Table 17: DX249 C-Terminal Truncation/PFO-Linker Constructs

DX-No.	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
DX249	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHEPGPEGGK-NH ₂	144
DX877	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHEPGPEG-X-NH ₂	162
DX878	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHEPG-X-Su-X-NH ₂	163
DX905*	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHEPG-X-Z-X-NH ₂	164
DX907	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHI-X-NH ₂	165
DX909	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHI-X-Su-X-NH ₂	166
DX911	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHI-X-Z-X-NH ₂	167

* Synthesis Failed

- 15 In the foregoing table, Ac- denotes N-terminal acetylation. The terminal groups are:
 -X-NH₂ = -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂
 -X-Su-X-NH₂ = -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C-O-CH₂CH₂-C-O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂
 -X-Z-X-NH₂ =
 -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C-O-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C-O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂

- 20 DX249, DX877, DX878, DX907, DX909 and DX911 were synthesized and immobilized onto NHS-activated sepharose 4 fast flow to an average ligand density of 1.9 μmole/ml determined by quantitative amino acid analysis. These were subsequently tested in batch filterplate format for relative static capacity, human IgG subtype and species specificity as previously described. In addition, total dynamic capacities were determined for comparison. Table 18 is a summary of the data. The static capacity (mg IgG bound per ml resin) was measured at the 2.5 mg/ml target concentration (25 mg human IgG applied per ml resin). Sequences DX907, DX909 and DX911 show approximately a 2-fold decrease in apparent relative static capacity compared to DX249, DX877 and DX878. These sequences are truncated to the final varied amino acid after the second cysteine and the truncation may result in decreased affinity. Percentage capture of polyclonal human IgG and human IgG subtypes show a similar trend. In general, sequences DX877 and DX878 show similar binding properties to DX249. Species specificity testing showed no significant binding of bovine, goat and mouse IgG to this series of derivatives (data not shown).

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Table 18: DX249 C-Terminal Truncation/PEG-Like Linker Substitution

	Batch Binding (% Capture of Total Load)						
	hIgG	hIgG1	hIgG2	hIgG3	hIgG4	Static Cap. mg/ml	Dynamic Cap. mg/ml
DX249	64	87	77	5	50	24	13
DX877	61	N/D	N/D	N/D	N/D	20	8
DX878	63	N/D	N/D	N/D	N/D	23	9
DX907	49	65	54	7	35	10	5
DX909	49	66	54	9	33	11	N/D
DX911	43	58	46	6	25	9	N/D

5 N/D = Not Determined

Example 15: DX249 N-Terminal Truncation/Residue Substitution

In general, the synthesis of DX249, having the sequence

- 10 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:144) is difficult using standard Fmoc methods. The synthesis and folding are problematic, primarily due to beta rearrangement at the Asp-Asp-His position at the N-terminus. Accordingly, a series of N-terminally truncated derivatives of DX249 was designed and synthesized. Table 19 shows the various DX249 constructs.

15

Table 19: DX249 N-Terminal Truncation/Residue Substitution Constructs

DX-No.	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
DX249	Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	144
DX1062	Ac-DHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	169
20 DX1063	Ac-EHMCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	170
DX1064	Ac-ACVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	171
DX1065*	Ac-TCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	172
DX1066*	Ac-ECVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	173
DX1067	Ac-VCVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	174
25 DX1068	Ac-[Nle]CVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	175
DX1069	Ac-CVYTTWGELIWCDNHEPGPEGGGK-NH ₂	176

* Not Immobilized/Tested [Nle] = norleucine

30

WO 02/086070

PCT/US02/12492

These DX249 sequence variants (including unmodified DX249) were synthesized and immobilized (with the exception of DX1065 and DX1066) onto NHS activated sepharose 4 fast flow media to an average ligand density of 1.9 $\mu\text{mole/ml}$ as determined by quantitative amino acid analysis. As previously described, these were tested in batch filterplate format for relative binding efficiency for human IgG subtype and species specificity. Table 20 is a summary of the data. In general, all the DX249 variants show a similar binding profile to DX249. Binding efficiency initially tends to appear to decrease with more extensive truncation. However, sequence DX1069, which has all residues prior to the first cysteine truncated, shows binding properties almost identical to those of DX249. Species specificity testing showed no significant binding of bovine, goat and mouse IgG to series of derivatives (data not shown). These data and the data from the C-terminal truncation/linker substitution tests (Example 14) indicate that suitable synthetic Fc-binding ligands having only 12 to 18 total residues can be produced according to these examples. Such ligands may be more easily and efficiently synthesized using standard methods.

Table 20: DX249 N-Terminal Truncation/Residue Substitution

	Batch Binding (% Capture of Total Load)				
	hIgG	hIgG1	hIgG2	hIgG3	hIgG4
DX249	82	84	80	3	67
DX1062	73	73	63	0	49
DX1063	71	73	63	0	45
DX1064	73	70	63	0	39
DX1067	44	33	28	0	25
DX1068	36	33	25	0	21
DX1069	74	77	68	2	51

Example 16: DX253 N-Terminal Truncation/Residue Substitution

The synthesis of DX253, having the sequence Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:145), is also difficult, primarily due to the N-terminal Arg-Arg positions giving the possibility of deletion sequences. Therefore, a series of nine derivatives of DX253 was constructed (similar to the variants for DX249, described *supra*) to determine the possibility of truncation and/or various residue substitutions in the five amino-terminal residue positions of the sequence. The remaining sequence including the C-terminal peptide spacer/linker was retained. Table 21 shows the various DX253 constructs.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Table 21: DX253 N-Terminal Truncation/Residue Substitution Constructs

DX-No.	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
DX-253	Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	145
5 DX1139	Ac-SRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	177
DX1140	Ac-RRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	178
DX1141	Ac-ERACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	179
DX1142	Ac-ACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	180
DX1143	Ac-TCSR D WSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	181
10 DX1144	Ac-ECSR D WSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	182
DX1145	Ac-VCSR D WSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	183
DX1146	Ac-GCSR D WSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	184
DX1147	Ac-CSR D WSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH ₂	185

15 These DX253 sequence variants (including unmodified DX253) were synthesized and immobilized onto NHS activated sepharose 4 fast flow media to a target ligand density of 2.0 μ mole/ml. As previously described, these were tested in batch filterplate format for relative binding efficiency for human IgG subtype and species specificity. Table 22 is a summary of the data.

20 In general, all the DX253 variants show a similar binding profile to DX253. Binding efficiency initially tends to decrease with sequences DX1139 to DX1141. However, sequences DX1142 through DX1147 show binding efficiencies similar to DX253. Of particular interest is DX1147, which has all residues prior to the first cysteine truncated and shows binding properties almost identical to those of DX253. This DX253-derived peptide is more easily and efficiently synthesized than is DX253.

25 The varying degree of binding may be due to, in part, to lower coupling efficiencies as a result of varying degrees of solubility in aqueous coupling conditions. In particular, sequences DX1139, DX1140, DX1146 and DX1147 were not fully soluble in aqueous coupling buffer. However, coupling efficiencies of all nine DX253 variants monitored by rp-HPLC was high and averaged >85%. Actual ligand densities were not determined. Species specificity testing showed no
30 significant binding of bovine, goat and mouse IgG to this series of derivatives (data not shown).

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Table 22: DX253 N-Terminal Truncation/Residue Substitution

	Batch Binding (% Capture of Total Load)				
	hlgG	hlgG1	hlgG2	hlgG3	hlgG4
DX253	79	88	80	0	58
DX1139	36	43	34	0	22
DX1140	40	43	29	0	20
DX1141	21	17	9	0	2
DX1142	57	66	55	0	39
DX1143	81	88	83	0	55
DX1144	81	88	84	0	61
DX1145	66	74	63	0	42
DX1146	73	83	80	0	50
DX1147	74	83	76	0	47

5

Following the foregoing description, the characteristics important for affinity-binding molecules permitting detection or separation of Fe-region polypeptides or molecules including Fe-region polypeptides in or from any solution, can be appreciated. Additional binding-molecule embodiments of the invention and alternative methods adapted to a particular solution or feed stream will be evident from studying the foregoing description. All such embodiments and obvious alternatives are intended to be within the scope of this invention, as defined by the claims that follow.

10

Each of the publications referred to above is hereby incorporated by reference in its entirety.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

CLAIMS

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence of the formulae I, II, III or IV:

I. $Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-W-C-Z_2$ (SEQ ID NO:4);

wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least 6 amino acids;

X_1 is G, H, N, R, or S;

X_2 is A, D, E, F, I, M, or S;

X_3 is A, I, L, M, or V;

X_4 is I, M, T, or V;

Z_2 is a polypeptide of at least one amino acid or is absent; and

Z_1 contains at least one cysteine residue such that formation of a disulfide bond with the invariant cysteine residue forms a cyclic peptide of 12 amino acids;

II. $Z_1-X-W-Z_2-W-Z_3$ (SEQ ID NO:5)

wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least one amino acid or is absent;

X is F or Y;

Z_2 is a tripeptide; and

Z_3 is a polypeptide of at least one amino acid; and

wherein at least two of the polypeptides Z_1 , Z_2 , and Z_3 contain a cysteine residue, such that formation of a disulfide bond between such cysteine residues forms a cyclic peptide of 7-12 amino acids;

III. $Z_1-W-Z_2-W-W-Z_3$ (SEQ ID NO:6);

wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least one amino acid;

Z_2 is a tripeptide; and

Z_3 is a polypeptide of at least one amino acid;

wherein at least two of the polypeptides Z_1 , Z_2 , and Z_3 contain a cysteine residue, such that formation of a disulfide bond between such cysteine residues forms a cyclic peptide of 8-12 amino acids, with the proviso that where Z_1 contains a cysteine, then Z_2 does not contain a cysteine, and where Z_2 contains a cysteine, it is the middle residue of the tripeptide and Z_3 also contains a cysteine;

IV. $Z_1-P-X_1-W-X_2-C-X_3-X_4-X_5$ (SEQ ID NO:7);

wherein,

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Z₁ is a polypeptide of at least one amino acid and includes a cysteine residue;

X₁ is A, E, R, S, or T;

X₂ is F, W, or Y;

X₃ is D, E, L, M, or Q;

X₄ is H, W, or Y;

X₅ is F or Y; and

wherein the cysteine residue in Z₁ and the cysteine residue between X₂ and X₃ form a cyclic peptide of 10-12 amino acids;

wherein said polypeptide binds an immunoglobulin Fc region.

2. The polypeptide according to Claim 1, wherein

(a) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the formula:

I. Z₁-X₁-X₂-X₃-X₄-W-C-Z₂ (SEQ ID NO:4);

wherein,

X₁ is G;

X₂ is A or E;

X₃ is L;

X₄ is I or V; or

(b) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the formula:

II. Z₁-X-W-Z₂-W-Z₃ (SEQ ID NO:5)

wherein,

X is F or Y; and

wherein Z₂ is a peptide of the formula: X₁-X₂-X₃, wherein,

X₁ is C or Y;

X₂ is C, K, N, or T, with the proviso that X₂ is not C if X₁ is C, and

X₃ is F, I, K, Q, or V.

3. The polypeptide according to Claim 1 wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of:

R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:14)

W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-B-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:15)

S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:16)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-G-S (SEQ ID NO:17)
- P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L (SEQ ID NO:18)
- L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:19)
- W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H (SEQ ID NO:20)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H (SEQ ID NO:21)
- W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:22)
- C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:23)
- R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:24)
- L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:25)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:26)
- P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-I-L-V-W-C-S-G-H (SEQ ID NO:27)
- S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-I-W-C-S-A-N (SEQ ID NO:28)
- F-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-L-I-W-C-S-S-F (SEQ ID NO:29)
- H-D-L-C-A-Q-A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R (SEQ ID NO:30)
- P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L (SEQ ID NO:31)
- P-L-D-C-A-R-D-I-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G (SEQ ID NO:32)
- G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W (SEQ ID NO:33)
- W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L (SEQ ID NO:34)
- S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F (SEQ ID NO:35)
- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:36)
- R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-H-Y (SEQ ID NO:37)
- W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-V-W-C-P-Y-L (SEQ ID NO:38)
- G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F (SEQ ID NO:39)
- A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F (SEQ ID NO:40)
- W-W-N-C-H-N-G-W-T-W-T-G-G-W-C-W-W-F (SEQ ID NO:41)
- Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-I-W-C-E-A-F (SEQ ID NO:42)
- N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:43)
- Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-S-R (SEQ ID NO:44)
- Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S (SEQ ID NO:45)
- Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:46)
- N-Y-W-C-N-V-W-L-L-G-D-V-C-R-S-H (SEQ ID NO:47)
- L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P (SEQ ID NO:48)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D (SEQ ID NO:49)
D-D-H-C-Y-W-F-R-B-W-F-N-S-E-C-P-H-G (SEQ ID NO:50)
N-Y-W-C-N-I-W-G-L-H-G-C-N-S-H (SEQ ID NO:51)
Y-W-F-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D (SEQ ID NO:52)
H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R (SEQ ID NO:53)
S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N (SEQ ID NO:54)
F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D (SEQ ID NO:55)
Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q (SEQ ID NO:56)
S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:57)
K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:58)
Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N (SEQ ID NO:59)
K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S (SEQ ID NO:60)
K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S (SEQ ID NO:61)
K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-E (SEQ ID NO:62)
H-F-W-C-E-V-W-G-L-C-P-S-I (SEQ ID NO:63)
Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V (SEQ ID NO:64)
A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E (SEQ ID NO:65)
K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:66)
Q-Y-W-C-N-V-W-G-V-C-L-P-S (SEQ ID NO:67)
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (SEQ ID NO:68)
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (SEQ ID NO:69)
Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y (SEQ ID NO:70)
T-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-P-H-N (SEQ ID NO:71)
F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P (SEQ ID NO:72)
G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E (SEQ ID NO:73)
R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D (SEQ ID NO:74)
K-F-W-C-T-I-W-G-V-C-H-M-P (SEQ ID NO:75)
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (SEQ ID NO:76)
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (SEQ ID NO:77)
F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D (SEQ ID NO:78)
H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S (SEQ ID NO:79)
H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D (SEQ ID NO:80)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-I-N (SEQ ID NO:81)
R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A (SEQ ID NO:82)
S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:83)
Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R (SEQ ID NO:84)
Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D (SEQ ID NO:85)
B-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R (SEQ ID NO:86)
K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q (SEQ ID NO:87)
K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T (SEQ ID NO:88)
R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N (SEQ ID NO:89)
N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H (SEQ ID NO:90)
Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M (SEQ ID NO:91)
A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G (SEQ ID NO:92)
K-Y-W-C-K-F-W-G-L-E-C-K-V-G (SEQ ID NO:93)
N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K (SEQ ID NO:94)
S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H (SEQ ID NO:95)
E-Y-W-C-R-L-W-G-L-Q-C-N-M-V (SEQ ID NO:96)
K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:97)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:98)
F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S (SEQ ID NO:99)
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T (SEQ ID NO:100)
K-Y-W-C-K-R-W-G-L-M-C-N-G-G (SEQ ID NO:101)
A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W (SEQ ID NO:102)
K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:103)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S (SEQ ID NO:104)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:105)
L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D (SEQ ID NO:106)
T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T (SEQ ID NO:107)
T-Y-W-C-T-F-W-E-L-P-C-D-P-A (SEQ ID NO:108)
K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-E-V (SEQ ID NO:109)
N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q (SEQ ID NO:110)
T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D (SEQ ID NO:111)
N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L (SEQ ID NO:112)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- F-W-Y-C-Y-W-F-N-E-K-C-K-T-P (SEQ ID NO:113)
- G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G (SEQ ID NO:114)
- P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F (SEQ ID NO:115)
- E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M (SEQ ID NO:116)
- H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T (SEQ ID NO:117)
- E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F (SEQ ID NO:118)
- N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:119)
- Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S (SEQ ID NO:120)
- Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S (SEQ ID NO:121)
- Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:122)
- Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H (SEQ ID NO:123)
- A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Q-W-F-C-T-D-S (SEQ ID NO:124)
- Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R (SEQ ID NO:125)
- Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T (SEQ ID NO:126)
- D-W-Q-C-L-W-W-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L (SEQ ID NO:127)
- F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D (SEQ ID NO:128)
- N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:129)
- S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F (SEQ ID NO:130)
- S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L (SEQ ID NO:131)
- S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y (SEQ ID NO:132)
- S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y (SEQ ID NO:133)
- G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y (SEQ ID NO:134)
- D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y (SEQ ID NO:135)
- Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F (SEQ ID NO:136)
- N-P-M-C-W-R-A-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:186)
- N-P-M-C-W-R-A-H-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:187)
- E-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:188)
- A-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:189)
- T-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:190)
- E-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:191)
- V-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:192)
- S-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:194)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

E-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:195)
 A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:196)
 T-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:197)
 E-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:198)
 V-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:199) and
 G-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:200).

4. The polypeptide according to Claim 1, wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of:

RRACSRDWSGALVWCAGH (SEQ ID NO:14);
 DHMCVYTTWGELIWCNDNH (SEQ ID NO:36);
 KYWCSFWGLQCKT (SEQ ID NO:88);
 PVDCKHHFWWCYWN (SEQ ID NO:141);
 DDHCYWFREWFNSECPHG (SEQ ID NO:50);
 YYWCNYWGLCPDQ (SEQ ID NO:56);
 PHNCDDHYWYCKWF (SEQ ID NO:115);
 SYWCKIWDVCPQS (SEQ ID NO:57);
 KYWCNLWGVCPAN (SEQ ID NO:58);
 AATCSTSYWYQWFCTDS (SEQ ID NO:124);
 TYWCTFWELPCDPA (SEQ ID NO:108);
 YWYCWFPDRPEPLY (SEQ ID NO:143);
 SWVCWKAKWWEDKRCAPF (SEQ ID NO:130);
 NPMCWKKSWWEDAYCINH (SEQ ID NO:129);
 SWNCAFFHHNEMVWCDDG (SEQ ID NO:142);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:144);
 Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:146);
 Ac-AGPVDCKHHFWWCYWNGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:153);
 Ac-GDDHCYWFREWFNSECPHGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:154);
 Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:145);
 Ac-AGYYWCNYWGLCPDQGTGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:155);
 Ac-AGPHNCDDHYWYCKWFPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:150);
 Ac-AGSYWCKIWDVCPQSPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:147);

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Ac-AGKYWCNLWGVCPANPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:148);
Ac-AGAATCSTSYWYQWFCTDSFGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:151);
Ac-AGTYWCTFWELPCDPAPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:149);
Ac-AGYWYCWFPDRPECPYFPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:152);
Ac-GDSWVCWKAKWWEDKRCAPFGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:156);
Ac-GDNPMCWKKSWWEDAYCINHGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:157);
Ac-GDSWNCAPHENEMVWCDDGGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:158);
Ac-GDWGECTVTSYGELIWCGLLEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:159);
Ac-GDNPMCWRASWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:160);
Ac-GDNPMCWRAHWWEDAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:161);
Ac-GDDHMCVYTTWELIWCNHEPGPEG-X-NH₂ (SEQ ID NO:162);
Ac-GDDHMCVYTTWELIWCNHEPG-X-Su-X-NH₂ (SEQ ID NO:163);
Ac-GDDHMCVYTTWELIWCNHEPG-X-Z-X-NH₂ (SEQ ID NO:164);
Ac-GDDHMCVYTTWELIWCNHEPG-X-NH₂ (SEQ ID NO:165);
Ac-GDDHMCVYTTWELIWCNHEPG-X-Su-X-NH₂ (SEQ ID NO:166);
Ac-GDDHMCVYTTWELIWCNHEPG-X-Z-X-NH₂ (SEQ ID NO:167);
Ac-DHMCVYTTWELIWCNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:169);
Ac-EHMCVYTTWELIWCNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:170);
Ac-ACVYTTWELIWCNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:171);
Ac-TCVYTTWELIWCNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:172);
Ac-ECVYTTWELIWCNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:173);
Ac-VCVYTTWELIWCNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:174);
Ac-[Nle]CVYTTWELIWCNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:175);
Ac-CVYTTWELIWCNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:176);
Ac-SRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:177);
Ac-RRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:178);
Ac-ERACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:179);
Ac-ACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:180);
Ac-TCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:181);
Ac-ECSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:182);
Ac-VCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:183);
Ac-GCSRDSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:184); and

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Ac-CSRDWŠGALVWCAGHEPGPEGGK-NH₂ (SEQ ID NO:185),

wherein: Ac- denotes N-terminal acetylation; -NH₂ denotes C-terminal amidation; [Nle] denotes norleucine; -X-NH₂ denotes the C-terminal group -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂; -X-Su-X-NH₂ denotes the C-terminal group -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C:O-CH₂CH₂-C:O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂; and -X-Z-X-NH₂ denotes the C-terminal group -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C:O-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C:O-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂.

5. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

F-C-N-C-W-G-S-H-E-F-T-F-C-V-D-D (SEQ ID NO:137)

P-G-W-C-Y-S-D-I-W-G-F-K-H-F-C-N-L-D (SEQ ID NO:138)

D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-F-P (SEQ ID NO:139)

R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V (SEQ ID NO:140)

P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N (SEQ ID NO:141)

S-W-N-C-A-F-H-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G (SEQ ID NO:142)

Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-E-C-P-L-Y (SEQ ID NO:143),

wherein said polypeptide binds an immunoglobulin Fc region.

6. A method for detecting a polypeptide target that comprises at least one immunoglobulin Fc region amino acid sequence in a solution suspected of containing it, said method comprising:

- (a) contacting said solution with a polypeptide according to Claim 1 or Claim 5; and
- (b) determining whether binding has occurred between said polypeptide and said polypeptide target.

7. A method for isolating a polypeptide target that comprises at least one immunoglobulin Fc region amino acid sequence in a solution containing said polypeptide target, said method comprising:

- (a) preparing a binding polypeptide according to Claim 1 or Claim 5 by immobilizing the binding polypeptide on a solid support or conjugating the binding polypeptide with an affinity tag;
- (b) contacting the solution containing said polypeptide target with the binding polypeptide of step (a); and
- (c) separating the non-binding components of said solution from the binding polypeptide of step (b).

WO 02/086070

PCT/US02/12492

8. A method for removing a polypeptide target that comprises at least one immunoglobulin Fc region amino acid sequence from a solution containing said polypeptide target, said method comprising:
- (a) preparing a binding polypeptide according to Claim 1 or Claim 5 by immobilizing the binding polypeptide on a solid support or conjugating the binding polypeptide with an affinity tag;
 - (b) contacting the solution containing said polypeptide target with the binding polypeptide prepared according to step (a); and
 - (c) separating the non-binding components of said solution from the binding polypeptide of step (b).
9. A solid-phase detection assay method for a polypeptide target containing an Fc-region polypeptide, comprising the steps:
- (a) contacting a solution suspected of containing a polypeptide target comprising an Fc-region polypeptide with a binding molecule for target polypeptide target, which binding molecule is immobilized on a solid support,
 - (b) separating the target bound to the solid support from the unbound components of the solution,
 - (c) contacting the solid support with an Fc binding polypeptide according to Claim 1 or Claim 5 which is detectably labeled, and
 - (d) detecting binding of the labeled Fc binding polypeptide on said solid support.
10. The method according to any one of Claims 6, 7, 8 or 9, wherein said solution is selected from the group consisting of whole blood, plasma, transgenic milk, eggs of transgenic birds, and conditioned media.
11. The method of Claim 10, wherein the solution is transgenic milk obtained from a transgenic mouse, rat, goat, rabbit, sheep, or cow.
12. The method of Claim 10, wherein the solution is egg from a transgenic chicken, quail, turkey, ostrich, or goose.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

13. The method according to any one of Claims 6, 7, 8 or 9, wherein said polypeptide target can be an antibody or an antibody fragment containing all or part of an Fc region.
14. The method according to Claim 13, wherein said polypeptide target is an antibody.
15. The method according to Claim 14, wherein said antibody is an immunoglobulin is selected from the group consisting of human IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4.
16. The method according to any one of Claims 7, 8 or 9, wherein said solid support is selected from the group consisting of cellulose, controlled-pore glass, silica, polystyrene, styrene divinyl benzene, agarose, and crosslinked agarose.
17. A recombinant bacteriophage expressing an exogenous polypeptide capable of binding to an immunoglobulin Fc region, said exogenous polypeptide comprising an amino acid sequence of any of the formulae I, II, III or IV:

I. $Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-W-C-Z_2$ (SEQ ID NO:4);

wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least 6 amino acids;

X_1 is G, H, N, R, or S;

X_2 is A, D, E, F, I, M, or S;

X_3 is A, I, L, M, or V;

X_4 is I, M, T, or V;

Z_2 is a polypeptide of at least one amino acid or is absent; and

Z_1 contains at least one cysteine residue such that formation of a disulfide bond with the invariant cysteine residue forms a cyclic peptide of 12 amino acids;

II. $Z_1-X-W-Z_2-W-Z_3$ (SEQ ID NO:5)

wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least one amino acid or is absent;

X is F or Y;

Z_2 is a tripeptide; and

Z_3 is a polypeptide of at least one amino acid; and

WO 02/086070

PCT/US02/12492

wherein at least two of the polypeptides Z_1 , Z_2 , and Z_3 contain a cysteine residue, such that formation of a disulfide bond between such cysteine residues forms a cyclic peptide of 7-12 amino acids;

III. Z_1 -W- Z_2 -W- Z_3 (SEQ ID NO:6);

wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least one amino acid;

Z_2 is a tripeptide; and

Z_3 is a polypeptide of at least one amino acid;

wherein at least two of the polypeptides Z_1 , Z_2 , and Z_3 contain a cysteine residue, such that formation of a disulfide bond between such cysteine residues forms a cyclic peptide of 8-12 amino acids, with the proviso that where Z_1 contains a cysteine, then Z_2 does not contain a cysteine, and where Z_2 contains a cysteine, it is the middle residue of the tripeptide and Z_3 also contains a cysteine;

IV. Z_1 -P- X_1 -W- X_2 -C- X_3 - X_4 - X_5 (SEQ ID NO:7);

wherein,

Z_1 is a polypeptide of at least one amino acid and includes a cysteine residue;

X_1 is A, E, R, S, or T;

X_2 is F, W, or Y;

X_3 is D, E, L, M, or Q;

X_4 is H, W, or Y;

X_5 is F or Y; and

wherein the cysteine residue in Z_1 and the cysteine residue between X_2 and X_3 form a cyclic peptide of 10-12 amino acids.

18. The recombinant bacteriophage according to Claim 17, wherein said exogenous polypeptide comprises an amino acid sequence of the formula:

Z_1 - X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -W-C- Z_2 (SEQ ID NO:4);

wherein,

X_1 is G;

X_2 is A or E;

X_3 is L;

X_4 is I or V; or

WO 02/086070

PCT/US02/12492

said exogenous polypeptide comprises an amino acid sequence of the formula:

$$Z_1-X-W-Z_2-W-Z_3 \text{ (SEQ ID NO:5)}$$

wherein,

X is F or Y; and wherein Z_2 is a peptide of the formula: $X_1-X_2-X_3$, wherein,

X_1 is C or Y;

X_2 is C, K, N, or T, with the proviso that X_2 is not C if X_1 is C, and

X_3 is F, I, K, Q, or V.

19. The recombinant bacteriophage according to Claim 17, wherein said exogenous polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of:

R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:14)

W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:15)

S-S-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:16)

L-L-E-C-A-Y-N-T-S-G-E-L-I-W-C-N-G-S (SEQ ID NO:17)

P-D-D-C-S-I-H-F-S-G-E-L-I-W-C-E-P-L (SEQ ID NO:18)

L-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:19)

W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-H (SEQ ID NO:20)

D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-D-H (SEQ ID NO:21)

W-G-E-C-T-V-T-S-Y-G-E-L-I-W-C-G-G-L (SEQ ID NO:22)

C-R-A-C-S-R-D-W-P-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:23)

R-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:24)

L-H-A-C-A-F-D-P-M-G-A-V-I-W-C-T-Y-D (SEQ ID NO:25)

D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-M-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:26)

P-P-T-C-T-W-D-W-Q-G-I-L-V-W-C-S-G-H (SEQ ID NO:27)

S-N-K-C-S-N-T-W-D-G-S-L-I-W-C-S-A-N (SEQ ID NO:28)

F-P-E-C-T-F-D-M-E-G-F-L-I-W-C-S-S-F (SEQ ID NO:29)

H-D-L-C-A-Q-A-P-F-G-D-A-T-W-C-D-L-R (SEQ ID NO:30)

P-N-H-C-S-Y-N-L-K-S-E-L-I-W-C-Q-D-L (SEQ ID NO:31)

P-L-D-C-A-R-D-I-H-N-S-L-I-W-C-S-L-G (SEQ ID NO:32)

G-S-E-C-S-W-T-S-L-N-E-L-I-W-C-A-H-W (SEQ ID NO:33)

W-P-D-C-S-F-T-V-Q-R-D-L-I-W-C-E-A-L (SEQ ID NO:34)

S-H-S-C-A-Y-D-Y-A-H-M-L-V-W-C-T-H-F (SEQ ID NO:35)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

- D-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:36)
- R-P-N-C-T-F-A-A-S-G-E-L-I-W-C-M-H-Y (SEQ ID NO:37)
- W-W-G-C-Q-F-D-W-R-G-E-L-V-W-C-P-Y-L (SEQ ID NO:38)
- G-G-V-C-S-Y-S-G-M-G-E-I-V-W-C-R-W-F (SEQ ID NO:39)
- A-L-M-C-S-H-D-M-W-G-S-L-I-W-C-K-H-F (SEQ ID NO:40)
- W-W-N-C-H-N-G-W-T-W-T-G-G-W-C-W-W-F (SEQ ID NO:41)
- Y-H-V-C-A-R-D-S-W-D-Q-L-I-W-C-E-A-F (SEQ ID NO:42)
- N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:43)
- Y-W-Y-C-K-W-F-S-E-S-A-S-C-S-S-R (SEQ ID NO:44)
- Y-W-Y-C-K-W-F-E-D-K-H-P-C-D-S-S (SEQ ID NO:45)
- Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:46)
- N-Y-W-C-N-V-W-L-L-G-D-V-C-R-S-H (SEQ ID NO:47)
- L-Y-W-C-H-V-W-F-G-Q-H-A-W-Q-C-K-Y-P (SEQ ID NO:48)
- Y-W-K-C-K-W-M-P-W-M-C-G-F-D (SEQ ID NO:49)
- D-D-H-C-Y-W-F-R-E-W-F-N-S-E-C-P-H-G (SEQ ID NO:50)
- N-Y-W-C-N-I-W-G-L-H-G-C-N-S-H (SEQ ID NO:51)
- Y-W-F-C-Q-W-F-S-Q-N-H-T-C-F-R-D (SEQ ID NO:52)
- H-Y-W-C-D-I-W-F-G-A-P-A-C-Q-F-R (SEQ ID NO:53)
- S-G-D-C-G-F-W-P-R-I-W-G-L-C-M-D-N (SEQ ID NO:54)
- F-W-Y-C-K-W-F-Y-E-D-A-Q-C-S-H-D (SEQ ID NO:55)
- Y-Y-W-C-N-Y-W-G-L-C-P-D-Q (SEQ ID NO:56)
- S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:57)
- K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:58)
- Q-Y-W-C-Y-Q-W-G-L-C-G-A-N (SEQ ID NO:59)
- K-Y-W-C-Q-Q-W-G-V-C-N-G-S (SEQ ID NO:60)
- K-Y-W-C-V-Q-W-G-V-C-P-E-S (SEQ ID NO:61)
- K-Y-W-C-M-Q-W-G-L-C-G-W-B (SEQ ID NO:62)
- H-F-W-C-E-V-W-G-L-C-P-S-I (SEQ ID NO:63)
- Q-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-T-N-V (SEQ ID NO:64)
- A-Y-W-C-K-V-W-G-L-C-Q-G-E (SEQ ID NO:65)
- K-Y-W-C-N-L-W-G-V-C-P-A-N (SEQ ID NO:66)
- Q-Y-W-C-N-V-W-G-V-C-L-P-S (SEQ ID NO:67)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (SEQ ID NO:68)
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (SEQ ID NO:69)
Q-Y-W-C-T-H-W-G-L-C-G-K-Y (SEQ ID NO:70)
T-Y-W-C-T-K-W-G-L-C-P-H-N (SEQ ID NO:71)
F-Y-W-C-G-Q-W-G-L-C-A-P-P (SEQ ID NO:72)
G-Y-W-C-N-V-W-G-L-C-S-T-E (SEQ ID NO:73)
R-Y-W-C-G-V-W-G-V-C-E-I-D (SEQ ID NO:74)
K-F-W-C-T-I-W-G-V-C-H-M-P (SEQ ID NO:75)
H-Y-W-C-Q-Q-W-G-I-C-E-R-P (SEQ ID NO:76)
R-Y-W-C-N-I-W-D-V-C-P-E-Q (SEQ ID NO:77)
F-Y-W-C-S-Q-W-G-L-C-K-Y-D (SEQ ID NO:78)
H-Y-W-C-E-K-W-G-L-C-L-M-S (SEQ ID NO:79)
H-Y-W-C-Q-K-W-G-V-C-P-T-D (SEQ ID NO:80)
H-Y-W-C-S-L-W-G-V-C-D-I-N (SEQ ID NO:81)
R-F-W-C-S-A-W-G-V-C-P-A (SEQ ID NO:82)
S-Y-W-C-K-I-W-D-V-C-P-Q-S (SEQ ID NO:83)
Q-Y-W-C-S-I-W-K-V-C-P-G-R (SEQ ID NO:84)
Y-W-Y-C-E-W-F-G-A-C-I-N-D (SEQ ID NO:85)
E-Y-W-C-K-Y-W-G-L-E-C-V-H-R (SEQ ID NO:86)
K-Y-W-C-T-Q-W-G-L-K-C-D-K-Q (SEQ ID NO:87)
K-Y-W-C-S-F-W-G-L-Q-C-K-T (SEQ ID NO:88)
R-Y-W-C-N-F-W-G-V-N-C-D-A-N (SEQ ID NO:89)
N-Y-W-C-T-H-W-G-V-M-C-L-D-H (SEQ ID NO:90)
Y-W-F-C-K-W-F-P-S-Q-C-Q-F-M (SEQ ID NO:91)
A-Y-W-C-K-Q-W-G-L-K-C-Q-L-G (SEQ ID NO:92)
K-Y-W-C-K-F-W-G-L-E-C-K-V-G (SEQ ID NO:93)
N-Y-W-C-T-E-W-G-L-N-C-N-N-K (SEQ ID NO:94)
S-Y-W-C-E-K-W-G-L-T-C-E-T-H (SEQ ID NO:95)
E-Y-W-C-R-I-W-G-L-Q-C-N-M-V (SEQ ID NO:96)
K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:97)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:98)
F-Y-W-C-T-K-W-G-L-E-C-I-H-S (SEQ ID NO:99)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

H-Y-W-C-Q-Q-W-G-L-M-C-F-E-T (SEQ ID NO:100)
K-Y-W-C-K-R-W-G-L-M-C-N-G-G (SEQ ID NO:101)
A-Y-W-C-M-T-W-G-V-P-C-I-S-W (SEQ ID NO:102)
K-Y-W-C-K-K-W-G-V-N-C-D-F-N (SEQ ID NO:103)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-D-S (SEQ ID NO:104)
K-Y-W-C-S-V-W-G-V-Q-C-P-H-S (SEQ ID NO:105)
L-Y-W-C-T-K-W-G-V-T-C-Q-K-D (SEQ ID NO:106)
T-Y-W-C-H-K-W-G-V-K-C-A-T-T (SEQ ID NO:107)
T-Y-W-C-T-F-W-E-L-P-C-D-P-A (SEQ ID NO:108)
K-Y-W-C-T-K-W-Q-L-N-C-E-E-V (SEQ ID NO:109)
N-Y-W-C-H-F-W-Q-V-P-C-L-E-Q (SEQ ID NO:110)
T-Y-W-C-V-V-W-N-V-P-C-S-T-D (SEQ ID NO:111)
N-F-W-C-H-T-W-G-L-Q-C-N-D-L (SEQ ID NO:112)
F-W-Y-C-Y-W-F-N-E-K-C-K-T-P (SEQ ID NO:113)
G-F-W-C-T-F-W-G-V-T-C-E-A-G (SEQ ID NO:114)
P-H-N-C-D-D-H-Y-W-Y-C-K-W-F (SEQ ID NO:115)
E-M-T-C-S-S-H-Y-W-Y-C-T-W-M (SEQ ID NO:116)
H-I-D-C-K-T-N-Y-W-W-C-R-W-T (SEQ ID NO:117)
E-M-R-C-G-Q-H-F-W-Y-C-E-W-F (SEQ ID NO:118)
N-Y-W-C-N-F-W-Q-L-P-T-C-D-N-L (SEQ ID NO:119)
Y-W-Y-C-Q-W-F-Q-E-V-N-K-C-F-N-S (SEQ ID NO:120)
Y-Y-W-C-R-H-W-F-P-D-F-D-C-V-H-S (SEQ ID NO:121)
Y-W-Y-C-S-W-F-P-D-R-P-D-C-P-L-Y (SEQ ID NO:122)
Y-W-Y-C-V-W-F-D-N-A-D-Q-C-V-H-H (SEQ ID NO:123)
A-A-T-C-S-T-S-Y-W-Y-Y-Q-W-F-C-T-D-S (SEQ ID NO:124)
Y-W-A-C-V-W-G-L-K-S-C-V-D-R (SEQ ID NO:125)
Y-W-R-C-V-W-F-P-A-S-C-P-T (SEQ ID NO:126)
D-W-Q-C-L-W-W-G-N-S-F-W-P-Y-C-A-N-L (SEQ ID NO:127)
F-W-R-C-H-W-W-P-E-R-C-P-V-D (SEQ ID NO:128)
N-P-M-C-W-K-K-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:129)
S-W-V-C-W-K-A-K-W-W-E-D-K-R-C-A-P-F (SEQ ID NO:130)
S-R-Q-C-W-K-E-L-W-W-T-D-Q-M-C-L-D-L (SEQ ID NO:131)

WO 02/086070

PCT/US02/12492

S-F-R-C-Q-S-S-F-P-S-W-Y-C-D-Y-Y (SEQ ID NO:132)
 S-W-H-C-Q-N-T-Y-P-E-W-Y-C-Q-W-Y (SEQ ID NO:133)
 G-S-K-C-K-Q-T-G-F-P-R-W-W-C-E-H-Y (SEQ ID NO:134)
 D-G-V-C-G-P-R-G-F-G-P-A-W-F-C-M-H-Y (SEQ ID NO:135)
 Y-S-H-C-A-T-H-Y-P-T-W-Y-C-L-H-F (SEQ ID NO:136)
 N-P-M-C-W-R-A-S-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:186)
 N-P-M-C-W-R-A-H-W-W-E-D-A-Y-C-I-N-H (SEQ ID NO:187)
 E-H-M-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:188)
 A-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:189)
 T-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:190)
 E-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:191)
 V-C-V-Y-T-T-W-G-E-L-I-W-C-D-N-H (SEQ ID NO:192)
 S-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:194)
 E-R-A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:195)
 A-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:196)
 T-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:197)
 E-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:198)
 V-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:199) and
 G-C-S-R-D-W-S-G-A-L-V-W-C-A-G-H (SEQ ID NO:200).

20. A recombinant bacteriophage expressing an exogenous polypeptide capable of binding to an immunoglobulin Fc region, said exogenous polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

F-C-N-C-W-G-S-H-E-F-T-F-C-V-D-D (SEQ ID NO:137)
 P-G-W-C-Y-S-D-I-W-G-F-K-H-F-C-N-L-D (SEQ ID NO:138)
 D-S-S-C-I-K-H-H-N-K-V-T-C-F-F-P (SEQ ID NO:139)
 R-W-S-C-W-G-V-W-G-C-V-W-V (SEQ ID NO:140)
 P-V-D-C-K-H-H-F-W-W-C-Y-W-N (SEQ ID NO:141)
 S-W-N-C-A-F-H-H-N-E-M-V-W-C-D-D-G (SEQ ID NO:142)
 Y-W-Y-C-W-F-P-D-R-P-E-C-P-L-Y (SEQ ID NO:143).

WO 02/086070

PCT/US02/12492

21. A method for detecting a polypeptide target comprising at least one immunoglobulin Fc region amino acid sequence in a solution, comprising:
 - (a) contacting said solution with a bacteriophage according to Claim 17 or Claim 20; and
 - (b) determining whether binding has occurred between said polypeptide target and said bacteriophage.
22. The method according to Claim 21, wherein said solution is selected from the group consisting of whole blood, plasma, transgenic milk, eggs of transgenic birds, and conditioned media.
23. The method according to Claim 19, wherein said polypeptide target is an antibody or antibody fragment containing all or part of an Fc region.
24. The method according to Claim 23, wherein said polypeptide target is an antibody.
25. The method according to Claim 24, wherein said antibody is selected from the group consisting of human IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4.
26. The method according to Claim 12, wherein said bacteriophage is a phagemid.
27. Separation media comprising a chromatographic matrix material, and, immobilized thereon, a polypeptide according to any one of Claims 1, 2, 3, 4 or 5.
28. The separation media of Claim 27, wherein said chromatographic matrix material is selected from the group consisting of cellulose, silica gel-type resins or membranes, crosslinked polysaccharides, and agarose.
29. The separation media of Claim 28, wherein said chromatographic matrix material is an amine-reactive chromatographic matrix material.
30. The separation media of Claim 28, wherein said chromatographic matrix material is an aldehyde-functional methacrylate resin.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

31. The separation media of Claim 28, wherein said chromatographic matrix material is a formyl methacrylate resin.
32. The separation media of Claim 28, wherein said chromatographic matrix material is an NHS-activated agarose resin.
33. Separation media comprising the reaction product of:
- (a) an amine-reactive chromatographic matrix material; and
 - (b) a polypeptide selected from the group consisting of:
 - Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:144);
 - Ac-AGKYWCSFWGLQCKTGTGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:146);
 - Ac-AGPVDCKHHFWWCYWNGTTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:153);
 - Ac-GDDDHICYWFREWFENSECPHGEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:154);
 - Ac-GDRRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:145);
 - Ac-AGYYWCNYWGLCPDQGTGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:155);
 - Ac-AGPHNCDDHYWYCKWFPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:150);
 - Ac-AGSYWCKIWDVCPQSPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:147);
 - Ac-AGKYWCNLGWVCPANPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:148);
 - Ac-AGAATCSTSYWYQWFC TDSGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:151);
 - Ac-AGTYWCTFWELPCDPAPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:149);
 - Ac-AGYWYCWFPDRPECPFLYGPPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:152);
 - Ac-GDSWVCWKAkWWEKRCAPFGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:156);
 - Ac-GDNPMCWKKSWWEDAYCINHGTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:157);
 - Ac-GDSWNCAPHHNEMVWCDDGGTTPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:158);
 - Ac-GDWGECTVTSYGELIWCGLLEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:159);
 - Ac-GDNPMCWRASWWE DAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:160);
 - Ac-GDNPMCWRAHWWE DAYCINHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:161);
 - Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHEPGPEG-X-NH₂ (SEQ ID NO:162);
 - Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHEPG-X-Su-X-NH₂ (SEQ ID NO:163);
 - Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNHEPG-X-Z-X-NH₂ (SEQ ID NO:164);
 - Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNH-X-NH₂ (SEQ ID NO:165);

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDNH-X-Su-X-NH₂ (SEQ ID NO:166);
 Ac-GDDHMCVYTTWGELIWCNDNH-X-Z-X-NH₂ (SEQ ID NO:167);
 Ac-DHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:169);
 Ac-EHMCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:170);
 Ac-ACVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:171);
 Ac-TCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:172);
 Ac-ECVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:173);
 Ac-VCVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:174);
 Ac-[Nle]CVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:175);
 Ac-CVYTTWGELIWCNDNHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:176);
 Ac-SRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:177);
 Ac-RRACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:178);
 Ac-ERACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:179);
 Ac-ACSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:180);
 Ac-TCSR DWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:181);
 Ac-ECSR DWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:182);
 Ac-VCSR DWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:183);
 Ac-GCSR DWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:184); and
 Ac-CSRDWSGALVWCAGHEPGPEGGGK-NH₂ (SEQ ID NO:185),

wherein: Ac- denotes N-terminal acetylation; -NH₂ denotes C-terminal amidation; [Nle] denotes norleucine; -X-NH₂ denotes the C-terminal group -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂; -X-Su-X-NH₂ denotes the C-terminal group -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C(O)-CH₂CH₂-C(O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂; and -X-Z-X-NH₂ denotes the C-terminal group -NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH-C(O)-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C(O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂-NH₂.

34. The separation media of Claim 33, wherein said matrix material is an aldehyde-functional methacrylate chromatographic resin.
35. The method of Claim 33, wherein said matrix material is a formyl-substituted ethylene glycol-methacrylate copolymer support.
36. The method of Claim 33, wherein said matrix material is an NHS-activated agarose support.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

37. A method for separating a polypeptide target comprising at least one immunoglobulin Fc region amino acid sequence from a solution containing it comprising:
- (a) contacting said solution with separation media as defined in Claim 33 under binding conditions;
 - (b) removing unbound material; and
 - (c) eluting the bound polypeptide target from said separation media.
38. The method according to Claim 37, wherein said polypeptide target can be an antibody or an antibody fragment containing all or part of an Fc region.
39. The method according to Claim 37, wherein said polypeptide target is an antibody.
40. The method according to Claim 39, wherein said antibody is selected from the group consisting of human IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4.
41. A method for removing a polypeptide target comprising at least one immunoglobulin Fc region amino acid sequence from a solution containing it comprising:
- (a) contacting said solution with separation media as defined in Claim 33 under binding conditions; and
 - (b) removing unbound material.
42. The method according to Claim 41, wherein said solution is selected from the group consisting of whole blood, plasma, transgenic milk, eggs of transgenic birds, and conditioned media.

WO 02/086070

PCT/US02/12492

SEQUENCE LISTING

<110> DYAX CORP.
 Rondon, Isaac J.
 5 Wu, Qi-Long J.
 Ley, Arthur C.
 Stochl, Mark
 Ranschoff, Thomas C.
 Potter, M. Daniel
 10 <120> BINDING MOLECULES FOR Fc-REGION POLYPEPTIDES
 <130> DYX-022.1 PCT; DYX-022.1 US
 15 <150> US 60/284,534
 <151> 2001-04-18
 <160> 200
 20 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding peptide
 30 <400> 1
 Glu Thr Gln Arg Cys Thr Trp His Met Gly Glu Leu Val Trp Cys Glu
 1 5 10 15
 35 Arg Glu His Asn
 20
 40 <210> 2
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> Fc region binding peptide
 <400> 2
 50 Lys Glu Ala Ser Cys Ser Tyr Trp Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Val
 1 5 10 15
 55 Ala Gly Val Glu
 20
 <210> 3
 <211> 6
 60 <212> PRT

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> motif common to known Fc region binders
5
<400> 3
Gly Glu Leu Val Trp Cys
1 5
10
<210> 4
<211> 8
<212> PRT
15 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
20
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is G, H, N, R, or S
25
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is A, D, E, F, I, M, or S
30
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
35 <223> X4 is A, D, E, F, I, M, or S
<220>
<221> MISC_FEATURE
40 <222> (5)..(5)
<223> X4 is I, M, T, or V
<220>
<221> MISC_FEATURE
45 <222> (1)..(1)
<223> X1 is a polypeptide of at least 6 amino acids
50
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X2 is a polypeptide of at least one amino acid or is absent
55
<400> 4
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Cys Xaa
1 5
60

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```
<210> 5
<211> 6
<212> PRT
5 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is F or Y
15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X1 is a polypeptide of at least one amino acid or is absent
20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
25 <223> X4 is a tripeptide
<220>
<221> MISC_FEATURE
30 <222> (6)..(6)
<223> X6 is a polypeptide of at least one amino acid
<400> 5
35 Xaa Xaa Trp Xaa Trp Xaa
1 5
40 <210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
45 <220>
<223> Fc region binding polypeptide
<220>
<221> MISC_FEATURE
50 <222> (1)..(1)
<223> X1 is a polypeptide of at least one amino acid
<220>
<221> MISC_FEATURE
55 <222> (3)..(3)
<223> X3 is tripeptide
60 <220>
```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X6 is a polypeptide of at least one amino acid
5
<400> 6
Xaa Trp Xaa Trp Trp Xaa
1 5
10
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
20
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is A, E, R, S, or T
25
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
30 <223> X5 is F, W, or Y
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
35 <223> X7 is D, E, L, M, or Q
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
40 <223> X8 is H, W, or Y
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
45 <223> X9 is F or Y
50
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X1 is a polypeptide of at least one amino acid and includes a cys
55 teine residue
<400> 7
Xaa Pro Xaa Trp Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
60 1 5

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

5  <210> 8
   <211> 12
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> variegation template for phage display library

10  <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (1)..(1)
   <223> X1 is any amino acid except cysteine (Cys), glutamic acid (Glu),
15  isoleucine (Ile), Lysine (Lys), methionine (Met), and threonine (
      Thr)

   <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (2)..(3)
   <223> X2, X3 are any amino acid except cysteine (Cys)

20  <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (5)..(8)
   <223> X5-X8 are any amino acid except cysteine (Cys)

25  <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (10)..(11)
   <223> X10, X11 are any amino acid except cysteine (Cys)

30  <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (12)..(12)
   <223> X12 is any amino acid except cysteine (Cys), glutamic acid (Glu),
35  isoleucine (Ile), Lysine (Lys), methionine (Met), and threonine
      (Thr)

40  <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (12)..(12)
   <223> X12 is any amino acid except cysteine (Cys), glutamic acid (Glu),
45  isoleucine (Ile), Lysine (Lys), methionine (Met), and threonine
      (Thr)

45  <400> 8
      Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
      1           5           10

50  <210> 9
   <211> 13
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> variegation template for phage display library

55  <220>
   <221> MISC_FEATURE
60  <222> (12)..(12)

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<222> (1)..(3)
<223> X1-X3 are any amino acid except cysteins (Cys)

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(9)
<223> X5-X9 are any amino acid except cysteine (Cys)

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(13)
<223> X11-X13 are any amino acid except cysteine (Cys)

15
<400> 9
Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
20 1 5 10

<210> 10
<211> 14
25 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variegation template for phage display library
30
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(3)
<223> X1-X3 are any amino acid except cysteine (Cys)
35
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(10)
40 <223> X5-X10 are any amino acid except cysteine (Cys)

<220>
<221> MISC_FEATURE
45 <222> (12)..(14)
<223> X12-X14 are any amino acid except cysteine (Cys)

<400> 10
50 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10

55 <210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

60 <220>

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<223> variegation template for phage display library
<220>
<221> MISC_FEATURE
5 <222> (1)..(3)
<223> X1-X3 are any amino acid except cysteine (Cys)

<220>
10 <221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(11)
<223> X5-X11 are any amino acid except cysteine (Cys)

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(15)
<223> X13-X15 are any amino acid except cysteine (Cys)

20
<400> 11
Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1      5      10      15

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
30 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> variegation template for phage display library

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> X1, X2 is D, F, H, L, N, P, R, S, W, or Y

40
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
45 <223> X3 is A, D, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, V, W, or Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
50 <222> (5)..(12)
<223> X5-X12 are any amino acid except cysteine (Cys)

<220>
<221> MISC_FEATURE
55 <222> (14)..(14)
<223> X14 is A, D, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, V, W, or Y

<220>
60 <221> MISC_FEATURE

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<222> (15)..(16)
 <223> X15, X16 are D, F, H, L, N, P, R, S, W, or Y

5 <400> 12
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

10 <210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> variegation template for phage display library

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)
 <223> X1, X2 are A, D, F, G, H, L, N, P, R, S, W, or Y

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X3 is any amino acid except cysteine (Cys)

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(14)
 <223> X5-X14 are any amino acid except cysteine (Cys)

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> X16 are any amino acid except cysteine (Cys)

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(18)
 <223> X17, X18 are A, D, F, G, H, L, N, P, R, S, W, or Y

45 <400> 13
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15

50 Xaa Xaa

55 <210> 14
 <211> 18

60

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
5 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 14
10 Arg Arg Ala Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala
1 5 10 15

Gly His
15

<210> 15
<211> 18
<212> PRT
20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide

25 <400> 15
Trp Gly Glu Cys Thr Val Thr Ser Tyr Gly Glu Leu Ile Trp Cys Gly
1 5 10 15

30 Gly Leu

35 <210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

40 <220>
<223> Fc region binding polypeptide

<400> 16
45 Ser Ser Ala Cys Ala Phe Asp Pro Met Gly Ala Val Ile Trp Cys Thr
1 5 10 15

50 Tyr Asp

<210> 17
<211> 18
55 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
60 <223> Fc region binding polypeptide

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<400> 17
 Leu Leu Glu Cys Ala Tyr Asn Thr Ser Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asn
 1 5 10 15
 5
 Gly Ser

10
 <210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

20
 <400> 18
 Pro Asp Asp Cys Ser Ile His Phe Ser Gly Glu Leu Ile Trp Cys Glu
 1 5 10 15
 25 Pro Leu

30
 <210> 19
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 35
 <400> 19
 Leu Gly Glu Cys Thr Val Thr Ser Tyr Gly Glu Leu Ile Trp Cys Gly
 1 5 10 15
 40
 Gly Leu

45
 <210> 20
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 50
 <400> 20
 Trp Gly Glu Cys Thr Val Thr Ser Tyr Gly Glu Leu Ile Trp Cys Gly
 1 5 10 15
 55
 60

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Gly His

5 <210> 21
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 21

15 Asp His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp
 1 5 10 15

20 Asp His

<210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 22

Trp Gly Glu Cys Thr Val Thr Ser Tyr Gly Glu Leu Ile Trp Cys Gly
 1 5 10 15

35 Gly Leu

40 <210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 23

50 Cys Arg Ala Cys Ser Arg Asp Trp Pro Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala
 1 5 10 15

55 Gly His

60 <210> 24
 <211> 18

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
5 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 24
10 Arg Arg Ala Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala
   1           5           10           15
    Gly His
15
<210> 25
<211> 18
<212> PRT
20 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
25 <400> 25
    Leu His Ala Cys Ala Phe Asp Pro Met Gly Ala Val Ile Trp Cys Thr
    1           5           10           15
30 Tyr Asp
35 <210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
40 <220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 26
45 Asp His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Met Trp Cys Asp
   1           5           10           15
50 Asn His
<210> 27
<211> 18
55 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
60 <223> Fc region binding polypeptide

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<400> 27
 Pro Pro Thr Cys Thr Trp Asp Trp Gln Gly Ile Leu Val Trp Cys Ser
 1 5 10 15
 5
 Gly His
 10
 <210> 28
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 28
 20
 Ser Asn Lys Cys Ser Asn Thr Trp Asp Gly Ser Leu Ile Trp Cys Ser
 1 5 10 15
 25 Ala Asn
 30
 <210> 29
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 35
 <400> 29
 Phe Pro Glu Cys Thr Phe Asp Met Glu Gly Phe Leu Ile Trp Cys Ser
 1 5 10 15
 40
 Ser Phe
 45
 <210> 30
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 50
 <400> 30
 His Asp Leu Cys Ala Gln Ala Pro Phe Gly Asp Ala Thr Trp Cys Asp
 1 5 10 15
 60

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Leu Arg

5 <210> 31
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 31

15 Pro Asn His Cys Ser Tyr Asn Leu Lys Ser Glu Leu Ile Trp Cys Gln
 1 5 10 15

Asp Leu

20

<210> 32
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide

30 <400> 32

Pro Leu Asp Cys Ala Arg Asp Ile His Asn Ser Leu Ile Trp Cys Ser
 1 5 10 15

Leu Gly

40

<210> 33
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

45 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 33

50 Gly Ser Glu Cys Ser Trp Thr Ser Leu Asn Glu Leu Ile Trp Cys Ala
 1 5 10 15

55 His Trp

60 <210> 34
 <211> 18

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
5 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 34
10 Trp Pro Asp Cys Ser Phe Thr Val Gln Arg Asp Leu Ile Trp Cys Glu
1 5 10 15
Ala Leu
15
<210> 35
<211> 18
<212> PRT
20 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
25 <400> 35
Ser His Ser Cys Ala Tyr Asp Tyr Ala His Met Leu Val Trp Cys Thr
1 5 10 15
30 His Phe
35
<210> 36
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
40 <220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 36
45 Asp His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp
1 5 10 15
50 Asn His
55
<210> 37
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
60 <220>
<223> Fc region binding polypeptide

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<400> 37
Arg Pro Asn Cys Thr Phe Ala Ala Ser Gly Glu Leu Ile Trp Cys Met
1      5      10      15
5
His Tyr

10
<210> 38
<211> 18
<212> PRT
15 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
20 <400> 38
Trp Trp Gly Cys Gln Phe Asp Trp Arg Gly Glu Leu Val Trp Cys Pro
1      5      10      15
25 Tyr Leu

30
<210> 39
<211> 18
<212> PRT
35 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
40 <400> 39
Gly Gly Val Cys Ser Tyr Ser Gly Met Gly Glu Ile Val Trp Cys Arg
1      5      10      15
Trp Phe

45
<210> 40
<211> 18
50 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
55 <400> 40
Ala Leu Met Cys Ser His Asp Met Trp Gly Ser Leu Ile Trp Cys Lys
1      5      10      15
60

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

His Phe

5 <210> 41
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 41

15 Trp Trp Asn Cys His Asn Gly Trp Thr Trp Thr Gly Gly Trp Cys Trp
 1 5 10 15

20 Trp Phe

25 <210> 42
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 42

35 Tyr His Val Cys Ala Arg Asp Ser Trp Asp Gln Leu Ile Trp Cys Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

40 <210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

45 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 43

50 Asn Tyr Trp Cys Asn Phe Trp Gln Leu Pro Thr Cys Asp Asn Leu
 1 5 10 15

55 <210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

60 <220>

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<223> Fc region binding polypeptide
<400> 44
5 Tyr Trp Tyr Cys Lys Trp Phe Ser Glu Ser Ala Ser Cys Ser Ser Arg
  1           5           10           15

<210> 45
10 <211> 16
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence

<220>
15 <223> Fc region binding polypeptide
    <400> 45

Tyr Trp Tyr Cys Lys Trp Phe Glu Asp Lys His Pro Cys Asp Ser Ser
20 1           5           10           15

<210> 46
25 <211> 16
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Fc region binding polypeptide
    <400> 46

Tyr Trp Tyr Cys Ser Trp Phe Pro Asp Arg Pro Asp Cys Pro Leu Tyr
35 1           5           10           15

<210> 47
40 <211> 16
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Fc region binding polypeptide
    <400> 47

Asn Tyr Trp Cys Asn Val Trp Leu Leu Gly Asp Val Cys Arg Ser His
50 1           5           10           15

<210> 48
55 <211> 18
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence

<220>
60 <223> Fc region binding polypeptide
    <400> 48

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

Leu Tyr Trp Cys His Val Trp Phe Gly Gln His Ala Trp Gln Cys Lys
1      5      10      15
5 Tyr Pro

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 49
Tyr Trp Lys Cys Lys Trp Met Pro Trp Met Cys Gly Phe Asp
20 1      5      10
<210> 50
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 50
Asp Asp His Cys Tyr Trp Phe Arg Glu Trp Phe Asn Ser Glu Cys Pro
35 1      5      10      15
His Gly

40
<210> 51
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
45
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 51
Asn Tyr Trp Cys Asn Ile Trp Gly Leu His Gly Cys Asn Ser His
50 1      5      10      15
55
<210> 52
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
60
<220>

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<223> Fc region binding polypeptide
 <400> 52
 5 Tyr Trp Phe Cys Gln Trp Phe Ser Gln Asn His Thr Cys Phe Arg Asp
 1 5 10 15
 <210> 53
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 15 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 53
 His Tyr Trp Cys Asp Ile Trp Phe Gly Ala Pro Ala Cys Gln Phe Arg
 20 1 5 10 15
 <210> 54
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 30 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 54
 Ser Gly Asp Cys Gly Phe Trp Pro Arg Ile Trp Gly Leu Cys Met Asp
 1 5 10 15
 35 Asn
 40
 <210> 55
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 55
 50 Phe Trp Tyr Cys Lys Trp Phe Tyr Glu Asp Ala Gln Cys Ser His Asp
 1 5 10 15
 55 <210> 56
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 60 <220>

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<223> Fc region binding polypeptide
<400> 56
5 Tyr Tyr Trp Cys Asn Tyr Trp Gly Leu Cys Pro Asp Gln
  1           5           10

<210> 57
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 57
20 Ser Tyr Trp Cys Lys Ile Trp Asp Val Cys Pro Gln Ser
  1           5           10

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 58
30 Lys Tyr Trp Cys Asn Leu Trp Gly Val Cys Pro Ala Asn
  1           5           10

<210> 59
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 59
45 Gln Tyr Trp Cys Tyr Gln Trp Gly Leu Cys Gly Ala Asn
  1           5           10

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 60
60

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

Lys Tyr Trp Cys Gln Trp Gly Val Cys Asn Gly Ser
1           5           10

5 <210> 61
  <211> 13
  <212> PRT
  <213> Artificial Sequence

10 <220>
   <223> Fc region binding polypeptide

   <400> 61

15 Lys Tyr Trp Cys Val Gln Trp Gly Val Cys Pro Glu Ser
   1           5           10

   <210> 62
   <211> 13
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> Fc region binding polypeptide

25 <400> 62

30 Lys Tyr Trp Cys Met Gln Trp Gly Leu Cys Gly Trp Glu
   1           5           10

   <210> 63
   <211> 13
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> Fc region binding polypeptide

40 <400> 63

   His Phe Trp Cys Glu Val Trp Gly Leu Cys Pro Ser Ile
   1           5           10

45 <210> 64
   <211> 13
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> Fc region binding polypeptide

50 <400> 64

   Gln Tyr Trp Cys Thr Lys Trp Gly Leu Cys Thr Asn Val
   1           5           10

60

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 65
10 Ala Tyr Trp Cys Lys Val Trp Gly Leu Cys Gln Gly Glu
1 5 10
15 <210> 66
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 66
25 Lys Tyr Trp Cys Asn Leu Trp Gly Val Cys Pro Ala Asn
1 5 10
30 <210> 67
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
35
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 67
40 Gln Tyr Trp Cys Asn Val Trp Gly Val Cys Leu Pro Ser
1 5 10
45 <210> 68
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
50
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 68
55 His Tyr Trp Cys Gln Gln Trp Gly Ile Cys Glu Arg Pro
1 5 10
60 <210> 69
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
5 <400> 69
Arg Tyr Trp Cys Asn Ile Trp Asp Val Cys Pro Glu Gln
1           5           10
10
<210> 70
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
15
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 70
20
Gln Tyr Trp Cys Thr His Trp Gly Leu Cys Gly Lys Tyr
1           5           10
25
<210> 71
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
30
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 71
35
Thr Tyr Trp Cys Thr Lys Trp Gly Leu Cys Pro His Asn
1           5           10
40
<210> 72
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
45
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 72
50
Phe Tyr Trp Cys Gly Gln Trp Gly Leu Cys Ala Pro Pro
1           5           10
55
<210> 73
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
60
<220>
<223> Fc region binding polypeptide

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<400> 73
 Gly Tyr Trp Cys Asn Val Trp Gly Leu Cys Ser Thr Glu
 1 5 10
 5

<210> 74
 <211> 13
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide

15 <400> 74
 Arg Tyr Trp Cys Gly Val Trp Gly Val Cys Glu Ile Asp
 1 5 10
 20

<210> 75
 <211> 13
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide

30 <400> 75
 Lys Phe Trp Cys Thr Ile Trp Gly Val Cys His Met Pro
 1 5 10
 35

<210> 76
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 76
 45 His Tyr Trp Cys Gln Gln Trp Gly Ile Cys Glu Arg Pro
 1 5 10

<210> 77
 <211> 13
 <212> PRT
 50 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide

55 <400> 77
 Arg Tyr Trp Cys Asn Ile Trp Asp Val Cys Pro Glu Gln
 1 5 10
 60

WO 02/086070

PCT/US02/12492

5 <210> 78
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 10 <400> 78
 Phe Tyr Trp Cys Ser Gln Trp Gly Leu Cys Lys Tyr Asp
 1 5 10
 15 <210> 79
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 20 <400> 79
 His Tyr Trp Cys Glu Lys Trp Gly Leu Cys Leu Met Ser
 1 5 10
 25 <210> 80
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 30 <400> 80
 His Tyr Trp Cys Gln Lys Trp Gly Val Cys Pro Thr Asp
 1 5 10
 35 <210> 81
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 40 <400> 81
 His Tyr Trp Cys Ser Leu Trp Gly Val Cys Asp Ile Asn
 1 5 10
 45 <210> 82
 <211> 12
 50 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 55 <400> 82
 His Tyr Trp Cys Ser Leu Trp Gly Val Cys Asp Ile Asn
 1 5 10
 60 <210> 82
 <211> 12

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<212> FRT
<213> Artificial Sequence

<220>
5 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 82
Arg Phe Trp Cys Ser Ala Trp Gly Val Cys Pro Ala
10 1 5 10
<210> 83
<211> 13
15 <212> FRT
<213> Artificial Sequence
<220>
20 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 83
Ser Tyr Trp Cys Lys Ile Trp Asp Val Cys Pro Gln Ser
25 1 5 10
<210> 84
<211> 13
30 <212> FRT
<213> Artificial Sequence
<220>
35 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 84
Gln Tyr Trp Cys Ser Ile Trp Lys Val Cys Pro Gly Arg
40 1 5 10
<210> 85
<211> 13
45 <212> FRT
<213> Artificial Sequence
<220>
50 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 85
Tyr Trp Tyr Cys Glu Trp Phe Gly Ala Cys Ile Asn Asp
1 5 10
55 <210> 86
<211> 14
<212> FRT
<213> Artificial Sequence
60 <220>

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<223> Fc region binding polypeptide
<400> 86
5  Glu Tyr Trp Cys Lys Tyr Trp Gly Leu Glu Cys Val His Arg
   1           5           10

<210> 87
10 <211> 14
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence

<220>
15 <223> Fc region binding polypeptide
    <400> 87

Lys Tyr Trp Cys Thr Gln Trp Gly Leu Lys Cys Asp Lys Gln
20 1           5           10

<210> 88
25 <211> 13
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Fc region binding polypeptide
    <400> 88

Lys Tyr Trp Cys Ser Phe Trp Gly Leu Gln Cys Lys Thr
35 1           5           10

<210> 89
<211> 14
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
45 <400> 89

Arg Tyr Trp Cys Asn Phe Trp Gly Val Asn Cys Asp Ala Asn
50 1           5           10

<210> 90
<211> 14
<212> PRT
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
60 <400> 90

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

Asn Tyr Trp Cys Thr His Trp Gly Val Met Cys Leu Asp His
1           5           10

5 <210> 91
  <211> 14
  <212> PRT
  <213> Artificial Sequence

10 <220>
   <223> Fc region binding polypeptide

   <400> 91

15 Tyr Trp Phe Cys Lys Trp Phe Pro Ser Gln Cys Gln Phe Met
   1           5           10

20 <210> 92
  <211> 14
  <212> PRT
  <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> Fc region binding polypeptide

   <400> 92

30 Ala Tyr Trp Cys Lys Gln Trp Gly Leu Lys Cys Gln Leu Gly
   1           5           10

   <210> 93
   <211> 14
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> Fc region binding polypeptide

40 <400> 93

   Lys Tyr Trp Cys Lys Phe Trp Gly Leu Glu Cys Lys Val Gly
   1           5           10

45 <210> 94
  <211> 14
  <212> PRT
  <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> Fc region binding polypeptide

55 <400> 94

   Asn Tyr Trp Cys Thr Glu Trp Gly Leu Asn Cys Asn Asn Lys
   1           5           10

60

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<210> 95
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 95
 10 Ser Tyr Trp Cys Glu Lys Trp Gly Leu Thr Cys Glu Thr His
 1 5 10
 15 <210> 96
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 96
 25 Glu Tyr Trp Cys Arg Ile Trp Gly Leu Gln Cys Asn Met Val
 1 5 10
 30 <210> 97
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 97
 40 Lys Tyr Trp Cys Lys Lys Trp Gly Val Asn Cys Asp Phe Asn
 1 5 10
 <210> 98
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 50 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 98
 55 Lys Tyr Trp Cys Ser Val Trp Gly Val Gln Cys Pro His Ser
 1 5 10
 <210> 99
 <211> 14
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 5 <400> 99
 Phe Tyr Trp Cys Thr Lys Trp Gly Leu Glu Cys Ile His Ser
 1 5 10
 10
 <210> 100
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 100
 20
 His Tyr Trp Cys Gln Gln Trp Gly Leu Met Cys Phe Glu Thr
 1 5 10
 25
 <210> 101
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 101
 35
 Lys Tyr Trp Cys Lys Arg Trp Gly Leu Met Cys Asn Gly Gly
 1 5 10
 40
 <210> 102
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 102
 45
 Ala Tyr Trp Cys Met Thr Trp Gly Val Pro Cys Ile Ser Trp
 1 5 10
 50
 <210> 103
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 55
 60

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<400> 103
Lys Tyr Trp Cys Lys Lys Trp Gly Val Asn Cys Asp Phe Asn
1      5      10
5

<210> 104
<211> 14
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide

15 <400> 104
Lys Tyr Trp Cys Ser Val Trp Gly Val Gln Cys Pro Asp Ser
1      5      10
20

<210> 105
<211> 14
<212> PRT
25 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide

30 <400> 105
Lys Tyr Trp Cys Ser Val Trp Gly Val Gln Cys Pro His Ser
1      5      10
35

<210> 106
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

40 <220>
<223> Fc region binding polypeptide

<400> 106
45 Leu Tyr Trp Cys Thr Lys Trp Gly Val Thr Cys Gln Lys Asp
1      5      10

<210> 107
<211> 14
<212> PRT
50 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide

55 <400> 107
Thr Tyr Trp Cys His Lys Trp Gly Val Lys Cys Ala Thr Thr
1      5      10
60

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

5  <210> 108
   <211> 14
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> Fc region binding polypeptide
10 <400> 108

   Thr Tyr Trp Cys Thr Phe Trp Glu Leu Pro Cys Asp Pro Ala
   1             5             10
15

   <210> 109
   <211> 14
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> Fc region binding polypeptide
20 <400> 109

   Lys Tyr Trp Cys Thr Lys Trp Gln Leu Asn Cys Glu Glu Val
   1             5             10
25

   <210> 110
   <211> 14
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> Fc region binding polypeptide
30 <400> 110

   Asn Tyr Trp Cys His Phe Trp Gln Val Pro Cys Leu Glu Gln
   1             5             10
35

   <210> 111
   <211> 14
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> Fc region binding polypeptide
40 <400> 111

   Thr Tyr Trp Cys Val Val Trp Asn Val Pro Cys Ser Thr Asp
   1             5             10
45

   <210> 112
   <211> 14

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
5 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 112
Asn Phe Trp Cys His Thr Trp Gly Leu Gln Cys Asn Asp Leu
1 5 10

<210> 113
<211> 14
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
20 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 113
Phe Trp Tyr Cys Tyr Trp Phe Asn Glu Lys Cys Lys Thr Pro
1 5 10

<210> 114
<211> 14
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
35 <400> 114
Gly Phe Trp Cys Thr Phe Trp Gly Val Thr Cys Glu Ala Gly
1 5 10

40 <210> 115
<211> 14
<212> PRT
45 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
50 <400> 115
Pro His Asn Cys Asp Asp His Tyr Trp Tyr Cys Lys Trp Phe
1 5 10

55 <210> 116
<211> 14
<212> PRT
60 <213> Artificial Sequence

<220>

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<223> Fc region binding polypeptide
<400> 116
5  Glu Met Thr Cys Ser Ser His Tyr Trp Tyr Cys Thr Trp Met
  1          5          10

<210> 117
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 117
20 His Ile Asp Cys Lys Thr Asn Tyr Trp Trp Cys Arg Trp Thr
  1          5          10

<210> 118
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 118
35 Glu Met Arg Cys Gly Gln His Phe Trp Tyr Cys Glu Trp Phe
  1          5          10

<210> 119
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 119
45 Asn Tyr Trp Cys Asn Phe Trp Gln Leu Pro Thr Cys Asp Asn Leu
  1          5          10          15

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 120
60

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Tyr Trp Tyr Cys Gln Trp Phe Gln Glu Val Asn Lys Cys Phe Asn Ser
 1 5 10 15

5 <210> 121
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 121

15 Tyr Trp Tyr Cys Arg His Trp Phe Pro Asp Phe Asp Cys Val His Ser
 1 5 10 15

20 <210> 122
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 122

30 Tyr Trp Tyr Cys Ser Trp Phe Pro Asp Arg Pro Asp Cys Pro Leu Tyr
 1 5 10 15

35 <210> 123
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 123

45 Tyr Trp Tyr Cys Val Trp Phe Asp Asn Ala Asp Gln Cys Val His His
 1 5 10 15

50 <210> 124
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

55 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 124

60 Ala Ala Thr Cys Ser Thr Ser Tyr Trp Tyr Tyr Gln Trp Phe Cys Thr
 1 5 10 15

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Asp Ser

5 <210> 125
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 125

15 Tyr Trp Ala Cys Val Trp Gly Leu Lys Ser Cys Val Asp Arg
 1 5 10

20 <210> 126
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 126

30 Tyr Trp Arg Cys Val Trp Phe Pro Ala Ser Cys Pro Thr
 1 5 10

35 <210> 127
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 127

45 Asp Trp Gln Cys Leu Trp Trp Gly Asn Ser Phe Trp Pro Tyr Cys Ala
 1 5 10 15

Asn Leu

50 <210> 128
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

55 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 128

60

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Phe Trp Arg Cys His Trp Trp Pro Glu Arg Cys Pro Val Asp
 1 5 10

5 <210> 129
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 129

15 Asn Pro Met Cys Trp Lys Lys Ser Trp Trp Glu Asp Ala Tyr Cys Ile
 1 5 10 15

20 Asn His

<210> 130
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

30 <400> 130

Ser Trp Val Cys Trp Lys Ala Lys Trp Trp Glu Asp Lys Arg Cys Ala
 1 5 10 15

35 Pro Phe

40 <210> 131
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

45 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 131

50 Ser Arg Gln Cys Trp Lys Glu Leu Trp Trp Thr Asp Gln Met Cys Leu
 1 5 10 15

55 Asp Leu

60 <210> 132
 <211> 16

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
5 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 132
10 Ser Phe Arg Cys Gln Ser Ser Phe Pro Ser Trp Tyr Cys Asp Tyr Tyr
   1           5           10           15

<210> 133
<211> 16
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
20 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 133
25 Ser Trp His Cys Gln Asn Thr Tyr Pro Glu Trp Tyr Cys Gln Trp Tyr
   1           5           10           15

<210> 134
<211> 17
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
35 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 134
40 Gly Ser Lys Cys Lys Gln Thr Gly Phe Pro Arg Trp Trp Cys Glu His
   1           5           10           15
   Tyr

<210> 135
<211> 18
45 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 135
55 Asp Gly Val Cys Gly Pro Arg Gly Phe Gly Pro Ala Trp Phe Cys Met
   1           5           10           15
   His Tyr
60

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

5 <210> 136
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

15 <400> 136
 Tyr Ser His Cys Ala Thr His Tyr Pro Thr Trp Tyr Cys Leu His Phe
 1 5 10 15

20 <210> 137
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

30 <400> 137
 Phe Cys Asn Cys Trp Gly Ser His Glu Phe Thr Phe Cys Val Asp Asp
 1 5 10 15

35 <210> 138
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

45 <400> 138
 Pro Gly Trp Cys Tyr Ser Asp Ile Trp Gly Phe Lys His Phe Cys Asn
 1 5 10 15

50 Leu Asp

55 <210> 139
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

60 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 139
 Asp Ser Ser Cys Ile Lys His His Asn Lys Val Thr Cys Phe Phe Pro
 1 5 10 15

WO 02/086070

PCT/US02/12492

5 <210> 140
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 140
 Arg Trp Ser Cys Trp Gly Val Trp Gly Cys Val Trp Val
 1 5 10

15 <210> 141
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

25 <400> 141
 Pro Val Asp Cys Lys His His Phe Trp Trp Cys Tyr Trp Asn
 1 5 10

30 <210> 142
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

35 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

40 <400> 142
 Ser Trp Asn Cys Ala Phe His His Asn Glu Met Val Trp Cys Asp Asp
 1 5 10 15

45 Gly

50 <210> 143
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

55 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 143
 Tyr Trp Tyr Cys Trp Phe Pro Asp Arg Pro Glu Cys Pro Leu Tyr
 1 5 10 15

WO 02/086070

PCT/US02/12492

5 <210> 144
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 10 <400> 144
 Gly Asp Asp His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp
 1 5 10 15
 15 Cys Asp Asn His Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25
 20 <210> 145
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 145
 30 Gly Asp Arg Arg Ala Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp
 1 5 10 15
 35 Cys Ala Gly His Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25
 40 <210> 146
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 45 <400> 146
 Ala Gly Lys Tyr Trp Cys Ser Phe Trp Gly Leu Gln Cys Lys Thr Gly
 50 1 5 10 15
 Thr Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 55 20 25
 60 <210> 147
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 5 <400> 147
 Ala Gly Ser Tyr Trp Cys Lys Ile Trp Asp Val Cys Pro Glu Ser Pro
 1 5 10 15
 10 Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20
 15 <210> 148
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 148
 25 Ala Gly Lys Tyr Trp Cys Asn Leu Trp Gly Val Cys Pro Ala Asn Pro
 1 5 10 15
 30 Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20
 <210> 149
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 40 <400> 149
 Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Thr Phe Trp Glu Leu Pro Cys Asp Pro Ala
 1 5 10 15
 45 Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20
 50 <210> 150
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 55 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 150
 60

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Ala Gly Pro His Asn Cys Asp Asp His Tyr Trp Tyr Cys Lys Trp Phe
 1 5 10 15

5 Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20

<210> 151
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 151

Ala Gly Ala Ala Thr Cys Ser Thr Ser Tyr Trp Tyr Tyr Gln Trp Phe
 1 5 10 15

Cys Thr Asp Ser Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

25

<210> 152
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 152

Ala Gly Tyr Trp Tyr Cys Trp Phe Pro Asp Arg Pro Glu Cys Pro Leu
 1 5 10 15

40 Tyr Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

45 <210> 153
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 153

55 Ala Gly Pro Val Asp Cys Lys His His Phe Trp Trp Cys Tyr Trp Asn
 1 5 10 15

60 Gly Thr Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<210> 154
 <211> 29
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 10
 <400> 154

 Gly Asp Asp Asp His Cys Tyr Trp Phe Arg Glu Trp Phe Asn Ser Glu
 1 5 10 15

 Cys Pro His Gly Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25
 20
 <210> 155
 <211> 25
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 155
 30 Ala Gly Tyr Tyr Trp Cys Asn Tyr Trp Gly Leu Cys Pro Asp Gln Gly
 1 5 10 15

 Thr Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25
 35

 <210> 156
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40

 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 156
 45
 Gly Asp Ser Trp Val Cys Trp Lys Ala Lys Trp Trp Glu Asp Lys Arg
 50 1 5 10 15

 Cys Ala Pro Phe Gly Thr Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30
 55

 <210> 157
 <211> 30
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
5 <400> 157
Gly Asp Asn Pro Met Cys Trp Lys Lys Ser Trp Trp Glu Asp Ala Tyr
1 5 10 15
10 Cys Ile Asn His Gly Thr Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
20 25 30
15 <210> 158
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 158
25 Gly Asp Ser Trp Asn Cys Ala Phe His His Asn Glu Met Val Trp Cys
1 5 10 15
30 Asp Asp Gly Gly Thr Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
20 25
<210> 159
<211> 29
35 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
40 <400> 159
Gly Asp Trp Gly Glu Cys Thr Val Thr Ser Tyr Gly Glu Leu Ile Trp
1 5 10 15
45 Cys Gly Gly Leu Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
20 25
50 <210> 160
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
55 <220>
<223> Fc region binding polypeptide
60 <400> 160

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Gly Asp Asn Pro Met Cys Trp Arg Ala Ser Trp Trp Glu Asp Ala Tyr
 1 5 10 15

5 Cys Ile Asn His Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Lys
 20 25

<210> 161
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 161

Gly Asp Asn Pro Met Cys Trp Arg Ala His Trp Trp Glu Asp Ala Tyr
 1 5 10 15

Cys Ile Asn His Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Lys
 20 25

<210> 162
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 162

Gly Asp Asp His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp
 1 5 10 15

40 Cys Asp Asn His Glu Pro Gly Pro Glu Gly
 20 25

<210> 163
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide

<400> 163

Gly Asp Asp His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp
 1 5 10 15

60 Cys Asp Asn His Glu Pro Gly
 20

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<210> 164
 <211> 23
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 10 <223> Fc region binding polypeptide

 <400> 164
 Gly Asp Asp His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp
 1 5 10 15
 15 Cys Asp Asn His Glu Pro Gly
 20

 20 <210> 165
 <211> 20
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

 <400> 165
 30 Gly Asp Asp His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp
 1 5 10 15

 35 Cys Asp Asn His
 20

 40 <210> 166
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 45 <223> Fc region binding polypeptide

 <400> 166
 Gly Asp Asp His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp
 50 1 5 10 15

 Cys Asp Asn His
 20
 55

 <210> 167
 <211> 20
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 5 <400> 167
 Gly Asp Asp His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp
 1 5 10 15
 10 Cys Asp Asn His
 20
 15 <210> 168
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> c-terminal linker peptide
 <400> 168
 25 Pro Glu Gly Gly Lys
 1 5
 30 <210> 169
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 169
 Asp His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp
 40 1 5 10 15
 Asn His Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Lys
 20 25
 45 <210> 170
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 55 <400> 170
 Glu His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp
 1 5 10 15
 60

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

Asn His Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
      20                25

5  <210> 171
   <211> 25
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

10 <220>
    <223> Fc region binding polypeptide

    <400> 171

15 Ala Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp Asn His
   1                5                10                15

    Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
   20                25

   <210> 172
   <211> 25
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> Fc region binding polypeptide

30 <400> 172

   Thr Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp Asn His
   1                5                10                15

   Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
   20                25

40 <210> 173
   <211> 25
   <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

45 <220>
    <223> Fc region binding polypeptide

    <400> 173

50 Glu Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp Asn His
   1                5                10                15

55 Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
   20                25

60 <210> 174
   <211> 25

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
5 <223> Fc region binding polypeptide
<400> 174
Val Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp Asn His
10 1 5 10 15
Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
15 20 25
<210> 175
<211> 24
<212> PRT
20 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
25 <400> 175
Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp Asn His Glu
1 5 10 15
30 Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
20
35 <210> 176
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
40 <220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 176
45 Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp Asn His Glu
1 5 10 15
50 Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
20
55 <210> 177
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
60 <220>
<223> Fc region binding polypeptide

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<400> 177
 Ser Arg Ala Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala
 1 5 10 15
 5
 Gly His Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Lys
 20 25
 10
 <210> 178
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 178
 20
 Arg Arg Ala Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala
 1 5 10 15
 25
 Gly His Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Lys
 20 25
 30
 <210> 179
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 35
 <400> 179
 40
 Glu Arg Ala Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala
 1 5 10 15
 Gly His Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Lys
 20 25
 45
 <210> 180
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 50
 <400> 180
 55
 Ala Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala Gly His
 1 5 10 15
 60

WO 02/086070

PCT/US02/12492

Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

5 <210> 181
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 181

15 Thr Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala Gly His
 1 5 10 15

20 Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

25 <210> 182
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 182

35 Glu Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala Gly His
 1 5 10 15

40 Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

45 <210> 183
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 183

55 Val Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala Gly His
 1 5 10 15

60 Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

<210> 184
 <211> 25

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 5 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 184
 Gly Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala Gly His
 1 5 10 15
 Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 15 20 25
 <210> 185
 <211> 24
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 25 <400> 185
 Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala Gly His Glu
 1 5 10 15
 30 Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20
 35 <210> 186
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide
 <400> 186
 45 Asn Pro Met Cys Trp Arg Ala Ser Trp Trp Glu Asp Ala Tyr Cys Ile
 1 5 10 15
 50 Asn His
 <210> 187
 <211> 18
 55 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 60 <223> Fc region binding polypeptide

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<400> 187
 Asn Pro Met Cys Trp Arg Ala His Trp Trp Glu Asp Ala Tyr Cys Ile
 1 5 10 15
 5 Asn His

 10 <210> 188
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> Fc region binding polypeptide

 20 <400> 188
 Glu His Met Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp
 1 5 10 15
 25 Asn His

 30 <210> 189
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Fc region binding polypeptide

 <400> 189
 Ala Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp Asn His
 40 1 5 10 15

 45 <210> 190
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 50 <223> Fc region binding polypeptide

 <400> 190
 Thr Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp Asn His
 1 5 10 15
 55

 <210> 191
 <211> 16
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
5 <400> 191
Glu Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp Asn His
1 5 10 15
10
<210> 192
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
15
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
20 <400> 192
Val Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp Asn His
1 5 10 15
25
<210> 193
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
30
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 193
35 Cys Val Tyr Thr Thr Trp Gly Glu Leu Ile Trp Cys Asp Asn His
1 5 10 15
40
<210> 194
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
45
<220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 194
50 Ser Arg Ala Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala
1 5 10 15
Gly His
55
<210> 195
<211> 18
<212> PRT
60 <213> Artificial Sequence

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

```

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
5 <400> 195
Glu Arg Ala Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala
1 5 10 15
10 Gly His

15 <210> 196
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 196
25 Ala Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala Gly His
1 5 10 15

30 <210> 197
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 197
40 Thr Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala Gly His
1 5 10 15

45 <210> 198
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Fc region binding polypeptide
<400> 198
55 Glu Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala Gly His
1 5 10 15

60 <210> 199
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

WO 02/086070

PCT/US02/12492

<220>
<223> Fc region binding polypeptide
5 <400> 199
Val Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala Gly His
1 5 10 15
10 <210> 200
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
15 <220>
<223> Fc region binding polypeptide
20 <400> 200
Gly Cys Ser Arg Asp Trp Ser Gly Ala Leu Val Trp Cys Ala Gly His
1 5 10 15

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
// C 0 7 K 16/00	G 0 1 N 33/566	
	C 0 7 K 16/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,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,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ウー,チー-ロン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 5 ブライトン,メイキン ストリート 1 1

(72)発明者 レイ,アーサー,シー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 6 5 ニュートン,アデナ ロード 1 2 2

(72)発明者 ストックル,マーク
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 7 6 3 エヌ.アトルバロ,アキレス ウェイ 1 2 1

(72)発明者 ランゾホフ,トーマス,シー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 7 3 レキシントン,ウインター ストリート 7 4

(72)発明者 ポッター,エム.,ダニエル
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 2 0 アクトン,ハイ ストリート 1 7 6

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02
 4B065 AA98X AB01 CA24 CA44 CA46
 4H045 AA10 AA11 BA10 BA61 BA62 BA63 DA75 EA20 EA50 FA74
 GA26

专利名称(译)	Fc区多肽的结合分子		
公开(公告)号	JP2005503344A	公开(公告)日	2005-02-03
申请号	JP2002583585	申请日	2002-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	戴埃克斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	模具斧公司		
[标]发明人	ロンドンイサクジェズ ウーチャーロン レイアーサーシー ストックルマーク ランゾホフトーマスシー ポッターエムダニエル		
发明人	ロンドン,イサク,ジェズ ウー,チャー,ロン レイ,アーサー,シー. ストックル,マーク ランゾホフ,トーマス,シー. ポッター,エム.,ダニエル		
IPC分类号	G01N33/50 C07K7/08 C07K14/735 C07K16/00 C12N7/00 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/70535		
FI分类号	C07K7/08.ZNA C12N7/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C07K16/00		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA61 4H045/BA62 4H045/BA63 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/284534 2001-04-18 US		
其他公开文献	JP4229704B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了用于检测或分离免疫球蛋白Fc区多肽的结合分子及其使用方法。优选公开了优选的Fc区结合多肽，表达Fc区结合多肽的重组噬菌体和展示该多肽的分离培养基。

表1： 低イオン強度バッファー中でのIgGアイソフォームと合成ペプチド間の解離定数 (K_D)

タンパク質標的	pH [†]	K _D (μM) [‡]		
		DX249	DX252	DX254
IgG1	5.7	0.074 ± 0.053*	0.1 ± 0.056	0.09 ± 0.09
IgG2	5.7	0.068 ± 0.045	>1	>1
IgG3	5.7	>10	0.06 ± 0.1	0.3 ± 0.3
IgG4	5.7	0.3 ± 0.3	>10	>10
IgG1	7.4	0.4 ± 0.06	2.1 ± 2	1.8 ± 0.6
IgG2	7.4	1.8 ± 0.6	3.4 ± 1.5	2 ± 0.7
IgG3	7.4	>10	2.3 ± 0.4	>10
IgG4	7.4	1.9 ± 0.4	3.2 ± 2.6	2.9 ± 1.6
IgG1	9.3	>10	>10	0.4 ± 0.4
IgG2	9.3	>10	>10	2 ± 2.7
IgG3	9.3	>10	>10	>10
IgG4	9.3	>10	>10	>10

[†]使用したバッファー: 1) pH 5.7, 0.01 M Tris-酢酸
2) pH 7.4, 0.01 M Tris-HCl
3) pH 9.3, 0.01 M 重炭酸ナトリウム