

(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2013-529903

(P2013-529903A)

(43) 公表日 平成25年7月25日(2013.7.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
<b>C 0 7 K 5/113 (2006.01)</b>	C 0 7 K 5/113 Z N A	4 B 0 6 5
<b>C 0 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-511675 (P2013-511675)	(71) 出願人	509333933 フエー・イー・ペー・フエー・ゼット・ウ エー
(86) (22) 出願日	平成23年5月25日 (2011.5.25)		ベルギー国、ペー-9052・ヘント、レ イファイセストラート・120
(85) 翻訳文提出日	平成25年1月17日 (2013.1.17)	(71) 出願人	509333922 フリエ・ユニベルシテイ・ブリュッセル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/058591		ベルギー国、ペー-1050・ブリュッセル、 プレインラーン・2
(87) 国際公開番号	W02011/147890	(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成23年12月1日 (2011.12.1)	(72) 発明者	パルドン, エルス ベルギー国、ペー-3210・ルブベーク 、スターツバーン・85
(31) 優先権主張番号	1008682.5		
(32) 優先日	平成22年5月25日 (2010.5.25)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフィニティに基づく用途のためのエピトープタグ

## (57) 【要約】

本発明は、アフィニティに基づく用途において有用なエピトープタグに関する。本発明は更に、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、これらの融合タンパク質をコードする核酸分子およびこれらの核酸分子を含有する組換え宿主細胞を含む。本発明はまた、前記エピトープタグを特異的に認識するナノボディおよび他のアフィニティリガンド、ならびにアフィニティに基づく用途におけるそれらの使用に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 により定められる 4 アミノ酸の配列からなるエピトープタグ。

## 【請求項 2】

請求項 1 記載のエピトープタグと標的タンパク質とを含む、天然に存在しない融合タンパク質。

## 【請求項 3】

前記エピトープタグが前記標的タンパク質の C 末端に直接的に又はリンカーを介して結合している、請求項 2 記載の天然に存在しない融合タンパク質。

## 【請求項 4】

請求項 1 記載のエピトープタグをコードする、または請求項 2 もしくは 3 記載の融合タンパク質をコードする単離された核酸配列。

## 【請求項 5】

請求項 4 記載の核酸配列を含むベクター。

## 【請求項 6】

請求項 5 記載のベクターまたは請求項 4 記載の核酸配列を含む宿主細胞。

## 【請求項 7】

請求項 1 記載のエピトープタグに特異的に結合する、または請求項 2 もしくは 3 のいずれか 1 項に記載の天然に存在しない融合タンパク質に含まれるエピトープタグに特異的に結合するアフィニティリガンド。

## 【請求項 8】

前記アフィニティリガンドが抗体または抗体フラグメントまたはナノボディである、請求項 7 記載のアフィニティリガンド。

## 【請求項 9】

( i ) 請求項 7 または 8 のいずれか 1 項に記載のアフィニティリガンドと、( i i ) 請求項 2 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の天然に存在しない融合タンパク質と、( i i i ) 場合によっては、天然に存在しない前記融合タンパク質に含まれる標的タンパク質に結合するリガンドとの複合体。

## 【請求項 10】

前記複合体が結晶性である、請求項 9 記載の複合体。

## 【請求項 11】

例えばアフィニティークロマトグラフィー、アフィニティ精製、免疫沈降、インビボイメージング、縦列アフィニティ精製、タンパク質検出、免疫化学、表面提示、FRET 型用途、共結晶化等のアフィニティに基づく用途の、請求項 1 記載のエピトープタグおよび/または請求項 7 または 8 のいずれか 1 項に記載のアフィニティリガンドおよび/または請求項 9 記載の複合体の使用。

## 【請求項 12】

前記タンパク質検出を ELISA 検出アッセイまたはウエスタンブロット分析において行う、請求項 11 記載の使用。

## 【請求項 13】

前記アフィニティ精製をカラム上またはビーズ上で行う、請求項 11 記載の使用。

## 【請求項 14】

天然に存在しない融合タンパク質を精製するための方法であって、

a) 請求項 2 または 3 のいずれか 1 項に記載の天然に存在しない融合タンパク質を含有する溶液を、請求項 7 または 8 のいずれか 1 項に記載の固定化アフィニティリガンドを有する固体支持体に適用する段階、

b) 前記固定化アフィニティリガンドと前記融合タンパク質との間で複合体を形成させる段階、

c) 弱く結合したまたは未結合の分子を除去する段階、および

d) 結合分子を溶出する段階

10

20

30

40

50

を含む、前記方法。

【請求項 15】

天然に存在しない融合タンパク質を固体支持体上に固定化し、および/または捕捉するための方法であって、

a) 天然に存在しない融合タンパク質を含有する溶液を、請求項 7 または 8 のいずれか 1 項に記載の固定化アフィニティリガンドを有する固体支持体に適用する段階、

b) 前記固定化アフィニティリガンドと前記融合タンパク質との間で複合体を形成させる段階、および

c) 弱く結合したまたは未結合の分子を除去する段階

を含む、前記方法。

10

【請求項 16】

請求項 7 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のアフィニティリガンドを使用することにより、サンプルまたは組成物中の天然に存在しない融合タンパク質を検出するための方法。

【請求項 17】

請求項 1 記載のエピトープタグ、および/または請求項 2 もしくは 3 のいずれか 1 項に記載の天然に存在しない融合タンパク質、および/または請求項 4 記載の核酸配列、および/または請求項 5 記載のベクター、および/または請求項 7 もしくは 8 のいずれか 1 項に記載のアフィニティリガンド、および/または請求項 9 記載の複合体を含むキット。

【請求項 18】

例えばアフィニティークロマトグラフィー、アフィニティ精製、免疫沈降、インビボイメージング、縦列アフィニティ精製、タンパク質検出、免疫化学、表面提示、FRET 型用途、共結晶化等のアフィニティに基づく用途に使用するための、請求項 17 記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アフィニティに基づく用途において有用なエピトープタグに関する。本発明は更に、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、これらの融合タンパク質をコードする核酸分子およびこれらの核酸分子を含有する組換え宿主細胞を含む。本発明はまた、前記エピトープタグを特異的に認識するナノボディ (nanobody) および他のアフィニティリガンド、ならびにアフィニティに基づく用途におけるそれらの使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

エピトープタグ化 (epitope tagging、エピトープタグging) は、既知エピトープタグ (典型的に 6 ~ 30 アミノ酸) を組換えタンパク質に融合させる技術であり、これは、前記エピトープをコードする配列を前記タンパク質の同一オープンリーディングフレーム内で遺伝子操作により置換することにより行われる。前記技術は、対応抗体が利用可能であるエピトープタグを選択することにより、対応抗体が利用可能でないタグ化タンパク質を検出することを可能にする。適当なエピトープタグと抗体とのペアの選択により、ウエスタンブロット分析、免疫沈降、免疫化学、アフィニティ精製などのような所望の実験用途に適した特性を有する組合せを見出すことが可能である。

40

【0003】

最初の商業的に入手可能なタグは、本来タンパク質精製を意図したものであった。これらの初期の市販製品には、FLAG、6xHis およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 系が含まれる。FLAG タグ化系は、その最初の形態においては、カルシウム依存的結合を示す抗 FLAG M1 モノクローナル抗体を含んでいた。FLAG タグ化タンパク質は EDTA で前記 M1 抗体から溶出されうる (Hoppら, 1988)。同様に、6xHis タグは金属キレートクロマトグラフィーによる組換えタンパク質の精製に使用される (Hochuliら, 1988)。同様に、GST タグ化タンパク質は、グルタチオンアガロースを使用して精製されうる (Smithら, 1988)。前記市販

50

タグに加えて、HA (Fieldら, 1988) および c-myc (Evansら, 1985) のような他のタグの開発も報告されている。研究が進展し、組換えDNA技術が進歩するにつれて、タンパク質相互作用の研究におけるエピトープタグの有用性が認識されるようになった。例えば、抗FLAG M2モノクローナル抗体が、6xHisタグに対するモノクローナル抗体 (Kaufmannら, 2002)、HAタグおよびc-mycタグと同様に、商業的に入手可能となった (Brizzardら, 1994)。現在では、多様な用途に適した種々の特徴を有する多数のタイプのタグが存在する (JarvikおよびTelmer 1998)。

#### 【0004】

伝統的な抗体とエピトープとの組合せに加えて、他のタイプのエピトープタグが見出されている。初期の一例はプロテインAタグであり、これはIgGに結合する (Uhlenら, 1983)。他の例には、ストレプトアビジン (SchmidtおよびSkerra 2007) とビオチン (TuckerおよびGrisshammer 1996) との相互作用に基づくもの、マルトース結合性ペプチド (MBPタグ) とマルトースとの相互作用に基づくもの (di Guanら, 1988)、キチン結合性ドメイン (CBD) とキチンとの相互作用に基づくもの (Chongら, 1997)、およびカルモジュリンに結合するカルモジュリン結合性タンパク質に基づくもの (Rigautら, 1999) が含まれる。もう1つのタイプのタグは、膜RNアーゼAに由来するS-タンパク質に結合するS-ペプチドタグである (Hackbarthら, 2004)。

#### 【0005】

この分野における更なる進歩は、シグナル強度およびシグナル対ノイズ比を増強するための複数のエピトープタグの使用、例えば、複数コピーのFLAG、His、c-mycおよびHAタグの使用、または縦列コピーの異なるタグの使用である。例えば、タンパク質ネットワークの研究に使用される縦列アフィニティ精製 (TAP) においては、介在するタバコ腐食ウイルス (TEV) プロテアーゼ切断部位を伴うカルモジュリン結合性ペプチドおよびIgG結合性ドメインが使用される (Rigautら, 1999)。最近、より短いTAPタグ、すなわち、SF-TAPタグが記載されており (Gloecknerら, 2007)、この場合、2つの縦列コピーのStrept-タグIIがFLAGタグと組合された。

#### 【0006】

エピトープタグ化の利用は、新たに発見されたタンパク質の研究および特徴づけを促進するが、前記技術は幾つかの欠点を有する。エピトープタグの挿入は、特に大きなタグが使用される場合 (例えば、GSTおよびMBPタグ)、タンパク質の機能を変化させる。注目すべきことに、比較的短いエピトープタグ、例えばFLAGは、関心のある異種タンパク質の特性にめったに影響を及ぼさず、それらのそれぞれの一次抗体に対して非常に特異的である。しかし、抗体アフィニティクロマトグラフィーは、しばしば、融合タンパク質の特性に不可逆的に影響を及ぼしうる低または高pH溶出を伴う。また、それは、再利用性が限られている樹脂を使用する。組換えポリペプチドのNまたはC末端に付加された、典型的にはヘキサ-Hisタグの形態であるポリ-ヒスチジンは、固定化金属イオンクロマトグラフィー (IMAC) を使用して組換えタンパク質を精製するために広く使用されている。しかし、(His)6タグを使用した場合、大腸菌 (*Escherichia coli*) 抽出物からは中等度の純度で回収されるに過ぎず、そして酵母、ドロソフィラ (*Drosophila*) およびHeLa抽出物からは比較的劣悪な精製が得られるに過ぎない (Lichtyら, 2005)。また、異種発現 (His)6タグ化タンパク質のIMAC調製物においては混入タンパク質 (例えば、大腸菌 (*E. coli*) SlyD、プロリルイソメラーゼ) の非特異的結合がしばしば観察され、これは、これらのタンパク質上の内因性金属結合部位またはヒスチジンクラスターによるものである。更に、文献に記載されているタグのうちでハイスループットの状況で試験されたものはほとんどない。FLAG-タグ、カルモジュリン結合性ペプチド、Strept-タグまたはStrept tag II およびビオチン受容ペプチドのようなペプチドエピトープは全て、それらの対

10

20

30

40

50

応結合相手に対して高度の特異性を示す。しかし、それらが相互作用する樹脂（固定化タンパク質）は高価な傾向にあり、簡単に詰まり、比較的低い結合能を有し、したがって、ハイスループット用途に理想的であるとは言えない。エピトープタグ化の幾つかの他の利点および欠点はJarvikおよびTelmer（1998）、KimpleおよびSondek（2004）、Wauugh（2005）、Brizzard（2008）に挙げられている。

#### 【0007】

エピトープタグ化が機能的ゲノミクスおよびプロテオミクスの新たな分野に大きな貢献をする可能性を有することを考慮すると、代替的エピトープタグが依然として必要とされている。実際、これらの分野における将来の用途は、組合せて使用されうる複数のエピトープタグを要する個々のタンパク質の別々のタグ化に益々依存するであろう。

10

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

##### 発明の概括

タンパク質は、それらの多様な物理化学的特性のため、本来はハイスループット分析に適さない。したがって、エピトープタグは、構造的および機能的プロテオミクスの先導のための不可欠な手段となっている。ハイスループットなタンパク質製造および分析は、ほぼ自明のこととして、汎用的な精製方法を含む必要がある。これは明らかに、エピトープタグが鍵的役割を果たすものである。

20

#### 【0009】

本発明の小さな4アミノ酸のタグは、組換えタンパク質内に組み込み操作されうるHisタグおよび他のペプチドタグに代わる良好な代替手段となる。特に、C末端EPEA-タグ（配列番号1）は短く、タグ化タンパク質の精製において使用される有効なアフィニティ樹脂を与えるように固定化されうる小さな単ドメイン抗体フラグメントにより特異的に認識される。更に例示されるとおり、EPEA-タグ（配列番号1）は、タグ化タンパク質の可視化/特定（ELISA、ウエスタンブロット）、タンパク質複合体の同時精製（Tap-タグの適用）、（インピボ）イメージング、細胞内のタンパク質の局在化、他のタンパク質との相互作用の特定/サブユニット構造の決定、タンパク質の機能およびそれが細胞条件の変化にどのように応答するのかの決定、細胞の寿命中にタンパク質に生じることの決定、クローン化遺伝子に由来する新規タンパク質の特徴づけ、および他の多数の用途に使用されうる。

30

#### 【0010】

第1の態様においては、本発明のエピトープタグは4アミノ酸の配列からなり、前記配列はEPEA（配列番号）により定められ、または配列番号1に対して少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列により、または前記アミノ酸の少なくとも50%もしくは75%が同類アミノ酸により置換されているアミノ酸配列により定められる。

#### 【0011】

1つの実施形態においては、本発明は、本発明のエピトープタグと標的タンパク質とを含む、天然に存在しない融合タンパク質に関する。この場合、前記エピトープタグは前記標的タンパク質のC末端に直接的に又はリンカーを介して結合している。

40

#### 【0012】

もう1つの実施形態においては、本発明は、前記エピトープタグまたは融合タンパク質をコードする単離された核酸配列に関する。前記核酸配列を含むベクターおよび前記ベクターまたは前記核酸配列を含む宿主細胞も本発明の一部を構成する。

#### 【0013】

もう1つの態様においては、本発明は、前記エピトープタグに特異的に結合するアフィニティリガンドに関する。特に、アフィニティリガンドは抗体または抗体フラグメントまたはナノボディでありうる。特定の実施形態においては、本発明はまた、本明細書に記載のアフィニティリガンドをコードする単離された核酸配列、ならびに前記核酸配列を含むベクターおよび前記ベクターまたは前記核酸配列を含む宿主細胞に関する。

50

## 【0014】

もう1つの態様においては、本発明は、(i)本明細書に記載のアフィニティリガンドと、(ii)本明細書に記載の天然に存在しない融合タンパク質と、(iii)場合によっては、天然に存在しない前記融合タンパク質に含まれる標的タンパク質に結合するリガンドとの複合体に関する。前記複合体は結晶性でありうる。

## 【0015】

もう1つの態様においては、本発明は、アフィニティに基づく用途、例えばアフィニティークロマトグラフィー、アフィニティ精製、免疫沈降、インビボイメージング、縦列アフィニティ精製、タンパク質検出、免疫化学、表面提示、FRET型用途、共結晶化のための、前記エピトープタグおよび/またはアフィニティリガンドおよび/または前記複合体の使用に関する。前記タンパク質検出はELISA検出アッセイまたはウエスタンブロット分析において行われうる。前記アフィニティ精製はカラム上またはビーズ上で行われうる。

10

## 【0016】

また、本発明の一部は、

a)本明細書に記載の天然に存在しない融合タンパク質を含有する溶液を、本明細書に記載の固定化アフィニティリガンドを有する固体支持体に適用する段階、および

b)前記固定化アフィニティリガンドと前記融合タンパク質との間で複合体を形成させる段階、および

c)弱く結合した又は未結合の分子を除去する段階、および

d)結合分子を溶出する段階

20

を含む、天然に存在しない融合タンパク質を精製するための方法である。

## 【0017】

更に、本発明はまた、

a)天然に存在しない融合タンパク質を含有する溶液を、本明細書に記載の固定化アフィニティリガンドを有する固体支持体に適用する段階、および

b)前記固定化アフィニティリガンドと前記融合タンパク質との間で複合体を形成させる段階、および

c)弱く結合した又は未結合の分子を除去する段階

を含む、天然に存在しない融合タンパク質を固体支持体上に固定化し、および/または捕捉するための方法に関する。

30

## 【0018】

また、本発明の一部は、本発明のアフィニティリガンドを使用することにより、サンプル中の天然に存在しない融合タンパク質を検出するための方法である。

## 【0019】

更にもう1つの態様においては、本発明は、本明細書に記載のエピトープタグ、および/または本明細書に記載の天然に存在しない融合タンパク質、および/または本明細書に記載の核酸配列、および/または本明細書に記載のベクター、および/または本明細書に記載のアフィニティリガンド、および/または本明細書に記載の複合体を含むキットを提供する。前記キットは、アフィニティに基づく用途、例えばアフィニティークロマトグラフィー、アフィニティ精製、免疫沈降、インビボイメージング、縦列アフィニティ精製、タンパク質検出、免疫化学、表面提示、FRET型用途、共結晶化に使用されうる。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0020】

【図1】 - シヌクレイン(synuclein)に特異的に結合する種々のナノボディのアミノ酸配列。

【図2-1】NMR分光法を用いる化学シフトマッピングによる - シヌクレインと一連の - シヌクレイン特異的ナノボディとの間の相互作用の分析。上パネルは、1当量のNbSyn2、Nb85またはNb87の非存在下(赤)または存在下(青)で得られた<sup>15</sup>N標識 - シヌクレインのHSQCスペクトルを表す。下パネルは種々のナノボディの

50

結合の際の相対的強度変化を表す。相対的強度 ( $I/I_0$ ) は遊離 - シヌクレイン ( $I_0$ ) およびナノボディ結合 - シヌクレイン ( $I$ ) のプロトン - 窒素交差ピークから各アミノ酸に関して計算され、残基番号に対してプロットされた。

【図2-2】NMR分光法を用いる化学シフトマッピングによる - シヌクレインと一連の - シヌクレイン特異的ナノボディとの間の相互作用の分析。上パネルは、1当量の NbSyn2、Nb85またはNb87の非存在下(赤)または存在下(青)で得られた  $N^{15}$  標識 - シヌクレインのHSQCスペクトルを表す。下パネルは種々のナノボディの結合の際の相対的強度変化を表す。相対的強度 ( $I/I_0$ ) は遊離 - シヌクレイン ( $I_0$ ) およびナノボディ結合 - シヌクレイン ( $I$ ) のプロトン - 窒素交差ピークから各アミノ酸に関して計算され、残基番号に対してプロットされた。

10

【図2-3】NMR分光法を用いる化学シフトマッピングによる - シヌクレインと一連の - シヌクレイン特異的ナノボディとの間の相互作用の分析。上パネルは、1当量の NbSyn2、Nb85またはNb87の非存在下(赤)または存在下(青)で得られた  $N^{15}$  標識 - シヌクレインのHSQCスペクトルを表す。下パネルは種々のナノボディの結合の際の相対的強度変化を表す。相対的強度 ( $I/I_0$ ) は遊離 - シヌクレイン ( $I_0$ ) およびナノボディ結合 - シヌクレイン ( $I$ ) のプロトン - 窒素交差ピークから各アミノ酸に関して計算され、残基番号に対してプロットされた。

【図3】ナノボディNb85、Nb87、Nb88またはNbSyn2と複合体化したEPEAタグ化GFPのIMAC精製。精製複合体はSDS-PAGE分析により分析された。パネル(A)レーン1~4: CA1508、CA1509、CA1510またはCA1511と複合体化したNb85; レーン5~8: CA1508、CA1509、CA1510またはCA1511と複合体化したNb87; レーン9: タンパク質マーカー。パネル(B)レーン1: タンパク質マーカー; レーン2~5: CA1508、CA1509、CA1510またはCA1511と複合体化したNb88; レーン6~9: CA1508、CA1509、CA1510またはCA1511と複合体化したNbSyn2。

20

【図4】樹脂に結合したNbSyn2を使用するタグ化GFP(CA1508)のアフィニティ精製。アフィニティ精製タグ化GFPをSDS-PAGE分析により分析した。レーン1: タンパク質マーカー; レーン2: 塩の非存在下の50mM Tris HCl (pH7.5)での洗浄; レーン3: 1M NaClを含有する50mM Tris HCl (pH7.5)での溶出; レーン4: 1M NaClを含有する50mM Tris HCl (pH7.5)での溶出; レーン5: 0.5M アジピン酸を含有する50mM Tris HCl (pH7.5)での溶出。

30

【図5】樹脂に結合したNbSyn2を使用するタグ化GFP(CA1508)のアフィニティ精製。アフィニティ精製タグ化GFPをSDS-PAGE分析により分析した。レーン1: タンパク質マーカー; レーン2: フロースルー; レーン3および4: 50mM Tris HCl (pH7.5)での洗浄; レーン5: 750 $\mu$ M ペプチドGYQDYEPEAを含有する溶出; レーン6: 2M NaClを含有する50mM Tris HCl (pH7.5)での溶出; レーン7: タンパク質マーカー。

【図6】シヌクレインのC末端ペプチド(GYQDYEPEA - 配列番号2)と複合体化した単ドメインのラクダ科動物抗体フラグメントNbSyn2の構造。パネル(A)は前記複合体の概要図を示す。前記骨格は灰色で表されており、CDR1、CDR2およびCDR3ループはそれぞれ緑色、赤色および黄色で表されている。前記ペプチドは紫色に着色されている。パネル(B)は前記ナノボディと前記ペプチドとの間の分子的相互作用を示す。

40

【図7】前記ペプチドの残基とNbSyn2との間の側鎖相互作用の詳細な図。前記ペプチドの残基は棒として表されており、NbSyn2の残基は線として描かれている。原子は以下のとおり色分けされている: C: 緑色; N: 桃色; O: 黄色。1の等高線がつけられた2F<sub>o</sub> - F<sub>c</sub>地図が淡青色の網目として表されている。各側鎖に関する相互作用が種々のパネル(左から右へ、上パネル: Asp135、Tyr136、Glu137; 下パネル: Pro138、Glu139、Ala140)において表されている。Tyr

50

136の側鎖は対称性関連NbSyn2分子の残基と相互作用することに注目されたい。

【図8】樹脂に結合したNbSyn2を使用するタグ化ナノボディ(Nb458)のアフィニティ精製。Nb458のアフィニティ精製タグ化形態をSDS-PAGE分析により分析した。レーン1: Nb458-GYQDYEP EA; レーン2: タンパク質マーカー; レーン3: フロースルー; レーン4: Nb458-gaaEP EA; レーン5: Nb458-gaaEP EA。

【図9】自製NbSyn2アルカリホスファターゼコンジュゲートを使用するELISAにおけるEP EAタグ化ナノボディの検出。Nb458-GYQDYEP EA(CA2944)、Nb458-gaaEP EA(CA2945)および2つのHisタグ化ナノボディ(Nb458-配列番号66およびNb196-配列番号65)を、ELISAプレートの、異なるウェル内でコートした。自製NbSyn2アルカリホスファターゼコンジュゲートを加えた。p-ニトロフェニルホスファートを基質として使用して、前記ELISAを現像した。

【図10】ウエスタンブロットにおけるEP EAタグ化タンパク質の検出。GYQDYEP EAタグ化GFP(レーン1および4)、シヌクレイン(レーン3)およびタンパク質マーカー(レーン2)をSDS-PAGE上で分離し、ニトロセルロースシートに移した。Hisタグ化NbSyn2を一次抗体として使用して、前記ウエスタンブロットを現像した。Nb190は、無関係な抗原を認識するHisタグ化ナノボディである。

【図11】ウエスタンブロットにおけるEP EAタグ化タンパク質の検出。Nb458-gaaEP EA(レーン1)、Nb458-GYQDYEP EAタグ化(レーン2)およびタンパク質マーカー(レーン3)をSDS-PAGE上で分離し、ニトロセルロースシートに移した。NBT/BCIPと共に結合された自製NbSyn2アルカリホスファターゼを使用して、前記ウエスタンブロットを現像した。

【図12】EP EAタグを含有する一群のVHHの、ELISAを使用するハイスループットスクリーニング。抗原をELISAプレートの+で示された行のウェルにコートした。ファージ提示により選択された48個のナノボディを、前記コート化ウェル、および抗原を含有しない対照ウェル(-で示されている)に加えた。本発明者らの自製NbSyn2アルカリホスファターゼコンジュゲートおよび基質としてのp-ニトロフェニルホスファートを使用して、抗原特異的ナノボディを検出した。

【図13】NbSyn2-GFP融合体またはNbSyn2-mKO1でのHeLa細胞内のEP EAタグ化HIV-Revタンパク質の可視化。上パネル: HeLa細胞系をNbSyn2-GFPで、それぞれ、単独で、ならびにHIV-Rev-GYQDYEP EAおよびHIV-Rev-EP EAと共に、トランスフェクトした。下パネル: HeLa細胞系をNbSyn2-mKO1で、それぞれ、単独で、ならびにHIV-Rev-GYQDYEP EAおよびHIV-Rev-EP EAと共に、トランスフェクトした。

【図14】自製NbSyn2アルカリホスファターゼコンジュゲートを使用するELISAにおけるEP EAタグ化ナノボディの検出。Nb458-gaaEP EA(CA2945)をELISAプレートのウェル当たりの種々の濃度(0, 1 $\mu$ gまたは0, 01 $\mu$ g/ウェル)でコートした。自製NbSyn2アルカリホスファターゼコンジュゲートまたはNbSyn2アルカリホスファターゼコンジュゲートを以下の種々の希釈度で加えた: 1/250、1/500、1/1000、1/2000および1/4000。p-ニトロフェニルホスファートを基質として使用して、前記ELISAを現像した。OD405値を、(A)60分間のインキュベーションの後、および(B)一晚のインキュベーションの後に測定した。

【図15】ウエスタンブロットにおけるEP EAタグ化膜タンパク質CsgGの検出。タンパク質マーカー(レーン2)、EP EAタグ化CsgGのクローン1~4(レーン2~5)および陽性対照(EP EAタグ化ナノボディ)(レーン6)をSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロースシートに移した。自製NbSyn2アルカリホスファターゼコンジュゲートを使用して、前記ウエスタンブロットを現像した。

【図16】樹脂に結合したNbSyn2を使用するタグ化膜タンパク質(CsgG)のア

10

20

30

40

50

フィニティ精製。アフィニティ精製物質を SDS - PAGE により分析した：レーン 1：精製前のサンプル、Nb 458 - GYQDYEP EA；レーン 2：フロースルー；レーン 3：タンパク質マーカー；レーン 4：洗浄；レーン 5：Cs g G g g E P E A。

【発明を実施するための形態】

【0021】

発明の詳細な説明

本発明を、特定の実施形態に関して、および或る図面を参照して、詳細に説明することとするが、本発明はそれらに限定されるものではなく、特許請求の範囲のみにより限定される。特許請求の範囲におけるいずれの参照記号も前記範囲を限定するとは解釈されないものとする。記載されている図面は概要図に過ぎず、限定的なものではない。前記図面においては、要素の幾つかのサイズは例示目的で誇張されている場合があり、原寸法で描かれていない場合がある。「含む」なる語が本明細書および特許請求の範囲において用いられている場合、それは他の要素または段階を除外するものではない。単数名詞を指す表現が用いられている場合、これは、特に示されていない限り、その名詞の複数形を含む。更に、本明細書および特許請求の範囲における第 1、第 2、第 3 などの語は、類似要素を区別するために用いられており、必ずしも、連続的順序または年代順を示すために用いられているのではない。そのように用いられている語は、適当な状況においては交換可能であり、本明細書に記載の本発明の実施形態は、本明細書に記載または例示されている以外の他の順序で実施可能であると理解されるべきである。

10

【0022】

本明細書中に特に示されていない限り、本発明に関して用いられている科学技術用語および表現は、当業者により一般に理解されている意味を有するものとする。一般に、分子生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸の化学およびハイブリダイゼーションに関して用いられている命名法ならびにそれらの技術は、当技術分野において良く知られており一般的に用いられているものである。特に示されていない限り、本発明の方法および技術は、一般に、当技術分野で良く知られている、ならびに本明細書の全体にわたって引用され記載されている種々の一般的小およびより専門的な参考文献に記載されている通常の方法により行われる。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992, および 2002 に対する補遺) を参照されたい。

20

30

【0023】

本発明の第 1 の態様においては、4 アミノ酸の配列からなるエピトープタグが特定されており、この場合、前記配列は E P E A (配列番号) により定められ、または配列番号 1 に対して少なくとも 25%、少なくとも 50%、好ましくは少なくとも 75% の配列同一性を有するアミノ酸配列により、または前記アミノ酸の少なくとも 25%、少なくとも 50% もしくは少なくとも 75% が同類アミノ酸により置換されているアミノ酸配列により定められる。

40

【0024】

本明細書中で用いる「エピトープタグ」または「アフィニティタグ」なる語は、タンパク質またはリガンドとの特異的相互作用を可能にする短いアミノ酸配列またはペプチドを意味する。

【0025】

本明細書中で用いる同類置換 (保存的置換) は、前記アミノ酸配列内の少なくとも 1 つの残基が除去され、異なる残基がその位置に挿入されることを意味する。そのような置換は一般に表 1 に従い行われる。表 1 は、タンパク質内のアミノ酸の代わりに使用可能であり同類置換であると典型的にみなされうるアミノ酸を示す。

【0026】

50

## 【表 1】

表 1

残基	同類置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Gln	Asn
Cys	Ser
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr, Gly
Thr	Ser, Val
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

10

20

## 【0027】

本明細書中で用いる、2以上のポリペプチド配列の場合における「同一」または「同一性(%)」なる語は、2以上の配列または部分配列が同一であること、あるいは配列比較アルゴリズムを用いた又は手動アライメントおよび目視検査による測定において比較ウィンドウまたは指定領域にわたって最大一致が得られるように比較され整列(アライメント)された場合に、2以上の配列または部分配列が、特定された割合の同一アミノ酸残基を有する(例えば、特定された領域にわたって75%の同一性)ことを意味する。特に、前記同一性は、4アミノ酸長である領域にわたって存在する。

30

## 【0028】

第2の態様においては、前記エピトプタグは分子に連結または結合されており、前記組合せは本明細書中では「融合分子」または「融合構築物」と称される。したがって、本発明は、本明細書に記載のエピトプタグを含む融合分子に関する。好ましくは、前記アフニティタグは、関心のあるタンパク質または「標的タンパク質」に連結されている。前記エピトプタグは前記分子に直接的または間接的に連結されうる。前記タグは前記分子のいずれかの部位に、例えば前記分子の末端付近に、1以上の内部部位に、側鎖に、またはアミノ末端アミノ酸(N末端)に、またはカルボキシ末端アミノ酸(C末端)に連結されうる。また、2以上のエピトプタグが前記分子に連結されうる。好ましい実施形態においては、前記エピトプタグは、当業者によく知られた技術である遺伝的操作により前記組換えタンパク質の同じオープンリーディングフレーム内に前記エピトプタグをコードするDNA配列を配置することにより、標的タンパク質のC末端に連結されうる。

40

## 【0029】

本明細書中で用いる「融合分子」または「融合構築物」なる語は、一般に、天然に存在しない組成物、または天然に存在しない融合分子もしくは融合構築物を示す。

## 【0030】

50

間接的連結の場合、適当なリンカー配列は所望の分子と前記エピトープタグとの間に挿入される。ついで、前記リンカー配列内に切断部位が存在する場合、前記エピトープタグは、当技術分野で公知の方法を用いて、化学的または酵素的に除去されうる。好ましいリンカーは1～30アミノ酸長のペプチドであり、ペプチドE E G E P K (K j e l d s e n ら, W O 9 8 / 2 8 4 2 9 ; 配列番号13)またはE E A E P K (K j e l d s e n ら, W O 9 7 / 2 2 7 0 6 ; 配列番号14); G G G G S (配列番号81)イムノサイレント(免疫不活性)リンカー(S E Q I D N O : 81); プロテアーゼ切断部位、例えば、配列I E G R (配列番号15)を有する因子X a切断部位、配列L V P R (配列番号16)を有するトロンピン切断部位または配列D D D D K (配列番号17)を有するエンテロキナーゼ切断部位を含むが、これらに限定されるものではない。他の適当なリンカーとしては、炭水化物、P E Gに基づくリンカー、および当技術分野で利用可能な他のリンカーが挙げられる。好ましくは、前記アミノ酸リンカー配列は短く、前記タンパク質の生物活性および抗体フラグメントとの特異的相互作用を妨げない。適当な短いリンカー配列の非限定的な例は実施例(例えば、G A AおよびG A G A (配列番号12))および表2に記載されている。

10

20

30

40

50

**【0031】**

本明細書中で用いる「分子」なる語は、抗体および酵素を含むタンパク質、ペプチド、ヌクレオチド、脂質、炭水化物、薬物ならびに補因子またはそれらの組合せを意味する。前記分子の性質は本発明にとって重要ではない。前記分子は種々の長さ、サイズまたは分子量のものであることが可能であり、当業者に公知の及び/又は望まれるいずれかの活性を有しうる。

**【0032】**

特定の実施形態においては、前記分子はタンパク質である。より詳しくは、本発明のエピトープタグはタンパク質またはその断片に結合され、前記組合せは融合タンパク質とも称される。実際、本明細書中で用いる「融合タンパク質」は、異種源に由来する2つのアミノ酸配列の融合体を含むポリペプチドを意味し、したがって「天然に存在しない融合タンパク質」と称されうる。前記タンパク質は、当業者に公知の及び/又は望まれるいずれかの活性、例えば免疫原性活性、酵素活性または結合活性を有しうる。前記タンパク質はまた、構造タンパク質でありうる。本発明のエピトープタグに連結されうる具体的なタンパク質(その断片を含む)には、例えば、ホルモン、酵素、サイトカイン、細胞内シグナルリングペプチド、受容体、抗体、増殖因子、血液因子、ワクチン、レポータータンパク質、合成ペプチドが含まれる。具体的なタンパク質の非限定的な例は実施例に記載されており、例えば、とりわけ、蛍光タンパク質、抗体フラグメント、ウイルス調節タンパク質、膜タンパク質、細胞周期タンパク質である。特定の実施形態においては、前記タンパク質は細菌、酵母、ウイルス、哺乳動物、植物、昆虫などに由来する。

**【0033】**

本明細書中で用いる「ポリペプチド」、「タンパク質」、「ペプチド」なる語は互換的に用いられ、コード化および非コード化アミノ酸、化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸ならびに修飾ペプチドバックボーンを有するペプチドを含みうる任意の長さのアミノ酸の重合形態を意味する。

**【0034】**

当業者に明らかなおりとおり、本明細書に記載のタンパク質の種々の断片は組合せられうる。前記断片は種々の長さのものでありうるが、これらは少なくとも4アミノ酸長であり、タンパク質の全長までであることが一般に好ましい。

**【0035】**

本発明の融合分子の製造は、当技術分野で公知の標準的な組換えDNA法を用いて行われうる。

**【0036】**

もう1つの実施形態においては、本発明は、本明細書に記載のエピトープタグをコードする単離された核酸断片、前記核酸断片を含む単離された核酸、本発明の融合分子をコー

ドする単離された核酸、およびそのような核酸分子を含む組成物に関する。本明細書中で用いる「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「ポリ核酸」なる語は互換的に用いられ、任意の長さのヌクレオチド、すなわち、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、またはそれらの組合せおよび/または類似体の重合形態を意味する。前記分子および前記エピトプタグをコードする核酸セグメントは、前記コードセグメントの転写および/または翻訳産物において前記セグメントが並置されるように、連続的でありうる。幾つかの実施形態においては、本発明のタグのコード配列と分子のコード配列とは、リンカーをコードする核酸配列により、または1以上の非コード配列により隔てられていることが可能である。したがって、本発明は、DNA分子からRNA分子へと転写され次いで前記RNA分子からタンパク質への翻訳の前に除去(例えば、スプライシング)されうる1以上の介在配列(例えば、イントロン)を含有する核酸分子を含む。本発明の核酸分子はインビトロで、インビボで、または無細胞転写の作用により合成されうる。好ましくは、まず、前記エピトプタグをコードするヌクレオチド配列が合成され、ついで、所望の分子またはタンパク質をコードするヌクレオチド配列に連結される。このようにして得られたハイブリッド遺伝子は、標準的な方法を用いて発現またはクローニングベクター内に組込まれうる。本発明のこの態様のベクターは二本鎖または一本鎖であることが可能であり、直鎖状、環状、コイル状、スーパーコイル状、ねじれ状、ニック状など(これらに限定されるものではない)を含むいずれかのコンホメーションのDNA、RNAまたはDNA/RNAハイブリッド分子でありうる。本発明のこれらのベクターには、プラスミドベクターおよびウイルスベクター、例えばバクテリオファージ、バキュロウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、セムリキ森林ウイルスおよびアデノ随伴ウイルスベクター(これらに限定されるものではない)が含まれ、これらの全ては良く知られており、商業的供給源から購入可能である。本発明の方法において使用される融合分子を構築するためには、任意のベクターが使用されうる。特に、当技術分野で公知のベクターおよび商業的に入手可能なベクター(およびそれらの変異体または誘導体)は、本発明に従い、本発明の方法で使用される1以上の組換え部位を含むように操作されうる。特に関心が持たれるベクターの一般的クラスには、原核性および/または真核性クローニングベクター、発現ベクター、融合ベクター、ツーハイブリッドまたは逆ツーハイブリッドベクター、ファージおよびリボソーム提示ベクター、TAPベクター、シャトルベクター(種々の宿主において使用されるもの)、突然変異誘発ベクター、転写ベクター、大きなインサートを受け入れるためのベクターなどが含まれる。関心のある他のベクターには、ウイルス由来ベクター(M13ベクター、細菌ファージ8ベクター、アデノウイルスベクターおよびレトロウイルスベクター)ならびに高い、低い、および調節可能なコピー数のベクターが含まれる。必要な方法のほとんどはAusubelら、2007に見出されうる。

#### 【0037】

原核性または真核性宿主内への導入のために調製されるベクター構築物は、典型的に、本発明の融合分子をコードする意図されるDNA断片を含む前記宿主により認識される複製系を含み、好ましくは、前記分子をコードするセグメントに機能的に連結された転写および翻訳開始調節配列をも含む。発現系は、例えば、複製起点または自律複製配列(ARS)および発現制御配列、プロモーター、エンハンサーおよび必要なプロセシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、転写終結配列およびmRNA安定化配列を含みうる。適当な場合には、前記タンパク質が細胞膜を越え及び/又は細胞膜内に留まること、あるいは前記細胞から分泌されることを可能にする、同一または関連種の分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドも含まれうる。

#### 【0038】

適当なプロモーターおよび他の必要なベクター配列は、前記宿主において機能するように選択される。細胞系と発現ベクターとの機能可能な組合せの例はSambrookら(1989)、Ausubelら(編)(2007)およびMetzgerら(1988)に記載されている。細菌、酵母、真菌、哺乳類、昆虫、植物または他の細胞における発現

のための多数の有用なベクターが当技術分野で良く知られている。また、前記構築物を増幅可能遺伝子（例えば、DHFR）に連結して、前記遺伝子の複数のコピーが生じうるようにすることが可能である。適当なエンハンサーおよび他の発現制御配列に関しては、Enhancers and Eukaryotic Gene Expression (1983) Cold Spring Harbor Press, N.Y.をも参照されたい。そのような発現ベクターは自律複製可能であり、また、それよりは好ましくはないが、それらは、宿主細胞のゲノム内に挿入されることにより複製可能である。

#### 【0039】

発現およびクローニングベクターは、選択可能なマーカー、すなわち、前記ベクターで形質転換された宿主細胞の生存または成長に必要なタンパク質をコードする遺伝子を含有しうる。そのようなマーカー遺伝子は、宿主細胞内に共導入された別のポリヌクレオチド配列上に含有されうるが、それは最も頻繁には前記クローニングベクター上に含有される。前記マーカー遺伝子が導入された宿主細胞のみが選択条件下で生存および/成長する。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質、例えばカナマイシン、テトラサイクリンなど、または他の毒性物質に対する耐性を付与するタンパク質、(b) 栄養要求性欠損を相補するタンパク質、あるいは(c) 複合培地からは利用可能でない決定的に重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。適切な選択可能なマーカーの選択は宿主細胞に左右され、種々の宿主に対する適当なマーカーは当技術分野において公知である。

#### 【0040】

この場合における組換え宿主細胞は、本発明の単離されたDNA分子を含有するように遺伝的に修飾されているものである。前記DNAは、個々の細胞型に適した、当技術分野で公知のいずれかの手段により、例えば形質転換、リポフェクション、エレクトロポレーションまたはウイルス媒介性形質導入（これらに限定されるものではない）により導入されうる。本発明の融合分子の発現を可能にするDNA構築物は、当技術分野で公知の技術、例えばクローニング、ハイブリダイゼーションスクリーニングおよびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により容易に調製されうる。クローニング、DNA単離、増幅および精製、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどが関わる酵素反応ならびに種々の分離技術のための標準的な技術は、当業者に公知であり一般に用いられているものである。多数の標準的な技術がSambrookら(1989)、Maniatisら(1982)、Wu(編)(1993)およびAusubelら(1992)に記載されている。

#### 【0041】

本明細書中で用いる「単離されたポリペプチド」または「単離されたポリヌクレオチド」は、それぞれ、天然に存在しない又はそれが元々存在していた天然環境中にはもはや存在しないアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列を意味する。

#### 【0042】

もう1つの実施形態においては、本発明は、本発明の1以上の核酸分子（例えば、本発明の1以上の融合分子をコードする核酸分子）を含む宿主細胞を含む。本発明で使用される代表的な宿主細胞には、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞および動物細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明での使用に適した細菌宿主細胞には、エシェリキア属種(*Escherichia* spp.)細胞、バシラス属種(*Bacillus* spp.)細胞、ストレプトマイセス属種(*Streptomyces* spp.)細胞、エルウィニア属種(*Erwinia* spp.)細胞、クレブシエラ属種(*Klebsiella* spp.)細胞、セラチア属種(*Serratia* spp.)細胞、シュードモナス属種(*Pseudomonas* spp.)細胞およびサルモネラ属種(*Salmonella* spp.)細胞が含まれる。本発明での使用に適した動物宿主細胞には、昆虫細胞（最も格別なものは、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)細胞、スポドプテラ・フルジペルダ(*Spodoptera frugiperda*) Sf9およびSf21細胞ならびにトリコプルサ(*Trichoplusia*) High-Five細胞)、線虫細胞（特に、シー・エレガント(*C.*

10

20

30

40

50

elegant)細胞)、鳥類細胞、両生類細胞(特に、アフリカツメガエル(Xenopus laevis)細胞)、爬虫類細胞および哺乳類細胞(最も格別なものは、チャイニーズハムスター由来のもの(例えば、CHO)、サル由来のもの(例えば、COSおよびVero細胞)、乳児ハムスター腎(BHK)由来のもの、ブタ腎由来のもの(PKI5)、ウサギ腎13細胞(PKI3)、ヒト骨肉腫細胞系143B、ヒト細胞系HeLaおよびヒト肝癌細胞系、例えばHep G2)が含まれる。本発明での使用に適した酵母宿主細胞には、サッカロミセス(Saccharomyces)、シゾサッカロミセス(Schizosaccharomyces)、クライベロミセス(Kluyveromyces)、ピチア(Pichia)(例えば、ピチア・パストリス(Pichia pastoris))、ハンゼヌラ(Hansenula)(例えば、ハンゼヌラ・ポリモルフア(Hansenula polymorpha))、ヤロウシア(Yarrowia)、シュワニオミセス(Schwaniomyces)、シゾサッカロミセス(Schizosaccharomyces)、ザイゴサッカロミセス(Zygosaccharomyces)などが含まれる。サッカロミセス・セレビスエ(accharomyces cerevisiae)、エス・カールスパーゲンシス(S. carlsbergensis)およびケイ・ラクチス(K. lactis)は最も一般的に使用される酵母宿主であり、簡便な真菌宿主である。前記宿主細胞は懸濁またはフラスコ培養物、組織培養物、器官培養物などとして提供されうる。あるいは、前記宿主細胞はまた、トランスジェニック動物でありうる。

10

20

**【0043】**

本発明の核酸分子および/またはベクターの1以上を含む宿主細胞を製造するために本発明の核酸分子および/またはベクターを本明細書に記載の宿主細胞内に導入するための方法は当業者に良く知られている。例えば、本発明の核酸分子および/またはベクターは、感染、形質導入、トランスフェクションおよび形質転換良く知られた技術を用いて宿主細胞内に導入されうる。本発明の核酸分子および/またはベクターは、単独で、あるいは他の核酸分子および/またはベクターと共に導入されうる。あるいは、本発明の核酸分子および/またはベクターは、沈殿物、例えばリン酸カルシウム沈殿物として、または脂質との複合体として、宿主細胞内に導入されうる。

**【0044】**

本発明の核酸分子および/またはベクターを宿主内に導入するためには、エレクトロポレーションも用いられうる。同様に、そのような分子は、化学的にコンピテントな細胞、例えば大腸菌(E. coli)内に導入されうる。前記ベクターがウイルスである場合、それはインビトロでパッケージ化(パッケージング)され、またはパッケージング細胞内に導入されることが可能であり、そのパッケージ化ウイルスは細胞内に形質導入されうる。したがって、本発明のこの態様に従い本発明の核酸分子および/またはベクターを細胞内に導入するのに適した多種多様な技術は良く知られており、当業者にとって常套的なものである。そのような技術は、例えばSambrookら(1989)、Watsonら(1992)およびWinnacker(1987)に詳細に概説されており、これらは、これらの技術を詳述する多数の実験的マニュアルの一例であり、それらの全体をそれらの関連開示に関して参照により本明細書に組み入れることとする。

30

40

**【0045】**

もう1つの態様においては、本発明は、前記エピトープタグに特異的に結合するアフィニティリガンドに関する。本明細書中で用いる「アフィニティタグ」は本発明のタグに非共有結合し、任意の分子であることが可能であり、より詳細には、金属アフィニティリガンド、抗体、抗体フラグメント、ナノボディ、小分子または合成アフィニティリガンドでありうる。好ましい実施形態においては、前記アフィニティリガンドは、前記エピトープタグに特異的に結合するナノボディである。前記エピトープタグが標的分子に直接的または間接的に結合する場合、前記エピトープタグへの前記アフィニティリガンドの特異的結合が本発明において特に想定されることが明らかなはずである。

**【0046】**

50

本明細書中で用いる「特異的に結合する」および「特異的結合」なる語は、抗体、抗体フラグメントまたはナノボディが、種々の抗原の不均一混合物中に存在する特定の抗原に優先的に結合しうることを意味する。ある実施形態においては、特異的結合相互作用は、サンプル中の望ましい抗原と望ましくない抗原とを、幾つかの実施形態では約10～100倍以上（例えば、約1000倍または10,000倍以上）で識別する。「特異性」は、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンフラグメント、例えばナノボディが、1つの抗原標的に、異なる抗原標的と比べて優先的に結合しうることを意味し、必ずしも高いアフィニティを示唆するとは限らない。

#### 【0047】

本明細書に記載のタグに特異的に結合する抗体も本発明の一部である。抗体はポリクローナルおよび/またはモノクローナルでありうる。本明細書中で用いる「抗体」(Ab)は、一本鎖全抗体を含む全抗体および抗原結合性フラグメントを含むと意図される。幾つかの実施形態においては、抗原結合性フラグメントは、Fab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>、Fd、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、およびVLまたはVHドメインのいずれかを含むフラグメント、ならびにナノボディ(これらに限定されるものではない)を含む哺乳類抗原結合性抗体フラグメントでありうる(更に本明細書を参照されたい)。本発明のエピトープタグおよび/または融合分子の1以上は、当技術分野で良く知られている技術(Harlow & Lane, 1988)を用いて、エピトープタグおよび/または融合分子に結合しうるポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体を製造するための免疫原として使用されうる。簡潔に説明すると、抗体は、本発明のエピトープタグおよび/または融合分子の全部または一部で適当な対象(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギなど)を免疫化することにより製造される。前記エピトープタグおよび/または融合分子あるいはそれらの断片が十分に免疫原性である場合、それは、前記対象を免疫化するために使用されうる。免疫原性を増強するために必要または望ましい場合には、前記エピトープタグおよび/または融合分子あるいは断片は適当な担体分子(例えば、BSA、KLHなど)に結合されうる。

#### 【0048】

したがって、特定の実施形態においては、本発明はまた、  
 (i) 本発明のエピトープタグ、および/または本発明のエピトープタグを含む(融合)タンパク質で動物を免疫化し、  
 (ii) 前記エピトープタグに特異的に結合する抗体に関してスクリーニングする段階を含む、前記エピトープタグに特異的に結合する抗体を製造するための方法を含む。

#### 【0049】

モノクローナル抗体は、例えばKohlerおよびMilstein(1975)に記載されているような通常の方法を用いて、本発明の1以上のエピトープタグおよび/または融合分子の全部または一部で免疫化された動物(例えば、マウス、ラットなど)の免疫細胞から製造されうる。したがって、本発明は、本発明のエピトープタグおよび/または融合分子に特異的なモノクローナル抗体、ならびにそのようなモノクローナル抗体を産生する細胞系を提供する。本発明の抗体は、鳥類および哺乳類を含むいずれかの動物から製造されうる。

#### 【0050】

ナノボディ(Nb)は、天然に存在する一本鎖抗体の最小機能性断片または単一可変ドメイン(V<sub>H</sub>H)であり、当業者に公知である。それらは、ラクダ科動物において見られる、重鎖のみの抗体に由来する(Hamers-Castermanら, 1993; Desmyterら, 1996)。「ラクダ」科動物においては、軽ポリペプチド鎖を欠く免疫グロブリンが存在する。「ラクダ(科動物)」は旧世界ラクダ科動物(カメルス・バクトリアヌス(Camelus bactrianus)およびカメルス・ドロメダリウス(Camelus dromedarius))および新世界ラクダ科動物(例えば、ラマ・パッコス(Lama paccos)、ラマ・グラマ(Lama glama)、ラマ・グアニコエ(Lama guanicoe)およびラマ・ビクグナ(Lama vi

10

20

30

40

50

c u g n a ) ) を含む。前記単一可変ドメイン重鎖抗体は本明細書においてはナノボディまたはV<sub>H</sub>H抗体と称される。ナノボディ ( N a n o b o d y ) ( 商標 )、ナノボディズ ( N a n o b o d i e s ) ( 商標 ) およびナノクローン ( N a n o c l o n e ) ( 商標 ) は A b l y n x N V ( B e l g i u m ) の商標である。

【 0 0 5 1 】

N b s の小さいサイズおよび特有の生物物理的特性は、一般的でない又は隠れたエピトープの認識に関して、およびタンパク質標的の腔または活性部位内への結合に関して、通常の抗体フラグメントを凌駕する。更に、N b s は二重特異性および二価抗体として設計されることが可能であり、またはレポーター分子に結合されうる ( C o n r a t h ら , 2 0 0 1 ) 。 N b は安定であり、胃腸系内で存在し続け、容易に製造されうる。したがって、N b s は、薬物発見および治療を含む多数の用途で使用されうる ( S a e r e n s ら , 2 0 0 8 ) 。

10

【 0 0 5 2 】

本明細書中で用いる「エピトープ」はポリペプチドの抗原決定基を意味する。エピトープは、前記エピトープに特有な空間的コンホメーションにおいて3個のアミノ酸を含みうるであろう。一般に、エピトープは少なくとも4個、5個、6個、7個のそのようなアミノ酸からなり、より通常は、少なくとも8個、9個、10個のそのようなアミノ酸からなる。アミノ酸の空間的コンホメーションを決定する方法は当技術分野で公知であり、例えばX線結晶解析および二次元核磁気共鳴を包含する。

【 0 0 5 3 】

本発明のナノボディは、一般に、4個の「フレームワーク配列」またはFRと3個の「相補性決定領域」またはCDRとを含むと考えられうる単一アミノ酸鎖を含む。「相補性決定領域」または「CDR」なる語はナノボディにおける可変領域を意味し、抗原性標的に特異的に結合しうるアミノ酸配列を含有する。これらのCDR領域は個々の抗原決定基構造に対するナノボディの基本的特異性をもたらすと考えられる。そのような領域は「超可変領域」とも称される。ナノボディは3個のCDR領域を有し、それぞれはその他のもの ( C D R 1、C D R 2、C D R 3 と称される ) に対して非連続性である。本発明の幾つかの好ましいナノボディおよびそれらのCDRが本明細書に記載されている ( 表3および4を参照されたい ) 。前記CDR配列の記載はVドメインおよびV様ドメインに関するI M G T 固有付番系 ( I M G T u n i q u e n u m b e r i n g s y s t e m ) に基づいている ( L e f r a n c ら , 2 0 0 3 ) 。

20

30

【 0 0 5 4 】

特定の実施形態においては、本発明のナノボディは二価であり、化学的に又は組換えDNA技術により、重鎖の2つの一価単一ドメインを互いに結合させることにより形成される。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のナノボディは二重特異性であり、それぞれが異なる特異性を有する2つの重鎖可変ドメインを互いに結合させることにより形成される。同様に、多価または多重特異性ナノボディを含むポリペプチドが、この場合に非限定的な例として含まれる。

【 0 0 5 5 】

前記ナノボディの例には、配列番号18~26 ( 図1 ; 表3を参照されたい ) により定められるナノボディが含まれるが、これらに限定されるものではない。二価ナノボディの非限定的な一例は配列番号68により定められる。もう1つの実施形態においては、前記ナノボディは、配列番号27~42 ( 図1 ; 表4を参照されたい ) から選択されるアミノ酸配列を有する相補性決定領域 ( C D R ) の少なくとも1つを含みうる。より詳しくは、前記ナノボディは、配列番号18~26 ( 図1 ; 表3を参照されたい ) からなる群から選択されうる。

40

【 0 0 5 6 】

本明細書中で広義で用いるナノボディなる語は、特定の生物起源または特定の製造方法に限定されないことに注目すべきである。例えば、本発明のナノボディは、一般に、( 1 ) 天然に存在する重鎖抗体のV<sub>H</sub>Hドメインを単離することにより、( 2 ) 天然に存在す

50

るV<sub>H</sub>Hドメインをコードするヌクレオチド配列の発現により、(3)天然に存在するV<sub>H</sub>Hドメインの「ヒト化」により、またはそのようなヒト化V<sub>H</sub>Hドメインをコードする核酸の発現により、(4)いずれかの動物種からの、特に哺乳類種からの、例えばヒトからの天然に存在するV<sub>H</sub>Hドメインの「ラクダ化」により、またはそのようなラクダ化V<sub>H</sub>Hドメインをコードする核酸の発現により、(5)当技術分野で記載されている「ドメイン抗体」もしくは「D a b」の「ラクダ化」により、またはそのようなラクダ化V<sub>H</sub>Hドメインをコードする核酸の発現により、(6)自体公知のタンパク質、ポリペプチドまたは他のアミノ酸配列を製造するための合成または半合成技術を用いることにより、(7)自体公知の核酸合成のための技術を用いて、ナノボディをコードする核酸を製造し、ついで、このようにして得られた核酸を発現させることにより、および/または(8)前記の1以上のいずれかの組合せにより得られうる。

【0057】

本明細書に記載の本発明の抗体の天然または合成類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子、ホモログおよびオルソログ(本明細書中では「類似体」と総称される)を使用することも本発明の範囲内である。したがって、本発明の1つの実施形態においては、「本発明の抗体」なる語は、その最も広い意味においては、そのような類似体をも含む。一般に、そのような類似体においては、本明細書に記載の本発明の抗体と比較して、1以上のアミノ酸残基が置換、欠失および/または付加されていることが可能である。

【0058】

非限定的な例を挙げると、置換は、例えば、同類置換(前記のもの;表1も参照されたい)であることが可能であり、および/またはアミノ酸残基は、同じ位置に天然で存在する別のアミノ酸残基により置換されうる。したがって、本発明の抗体の特性を改善する、あるいは少なくとも、本発明の抗体の所望の特性または所望の特性のバランスもしくは組合せを大きく(すなわち、前記抗体が、その意図される用途に、もはや適さない程度まで)損なわない、いずれかの1以上の置換、欠失もしくは挿入またはそれらのいずれかの組合せは、本発明の範囲内に含まれる。当業者は、一般に、本明細書の開示に基づいて、そして場合によっては限られた程度の通常の実験(これは、例えば、限られた数の可能な置換を導入し、このようにして得られた抗体の特性に対するそれらの影響を決定することを含みうる)の後、適当な置換、欠失もしくは挿入またはそれらの適当な組合せを決定し選択することが可能であろう。

【0059】

更にもう1つの修飾は、標識抗体の、意図される用途に応じて、1以上の検出可能な標識または他のシグナル生成基もしくは部分の導入を含みうる。適当な標識、ならびにそれを結合させ、使用し、および検出するための技術は、当業者に明らかであり、例えば、蛍光標識(例えば、フルオレセイン、イソチオシアナート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒドおよびフルオレスカミン、ならびに蛍光金属、例えばEuまたはランタニド系列からのその他の金属)、りん光標識、化学発光標識または生物発光標識(例えば、ルミナル、イソルミノール、サーロマティック(theromatic))アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、シュウ酸エステル、ジオキセタンまたはGFPおよびその類似体)、放射性同位体、金属、金属キレートもしくは金属カチオン、またはインビボ、インビトロまたはインシトウイメージングに特に適した他の金属もしくは金属カチオン、ならびに発色団および酵素(例えば、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ-グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ピオチナビジンペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-VI-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ)を含むが、これらに限定されるものではない。他の適当な標識は当業者に明らかであり、例えば、NMRまたはESR分光法を用いて検出されうる部分を含

10

20

30

40

50

む。本発明のそのような標識抗体は、具体的な標識の選択に応じて、例えばインビトロ、インビボまたはインシトゥアッセイ（自体公知のイムノアッセイ、例えばE L I S A、R I A、E I Aおよび他の「サンドイッチアッセイ」などを含む）ならびにインビボイメージング目的に使用されうる。当業者に明らかなくあり、別の修飾は、例えば、前記の金属または金属カチオンの1つをキレート化するためのキレート化基の導入を含みうる。適当なキレート化基には、例えば、ジエチレントリアミン五酢酸（D T P A）またはエチレンジアミン四酢酸（E D T A）が含まれるが、これらに限定されるものではない。更にもう1つの修飾は、特異的な結合ペア、例えばビオチン - （ストレプト）アビイン結合ペアの一部である官能基の導入を含みうる。そのような官能基は、本発明の抗体を、前記結合ペアの残り半分に結合した別のタンパク質、ポリペプチドまたは化合物に連結する（すなわち、結合ペアの形成により連結）ために利用されうる。例えば、本発明の抗体をビオチンに対してコンジュゲート化（結合）し、アビジンまたはストレプトアビジンに対してコンジュゲート化した別のタンパク質、ポリペプチド、化合物または担体に連結することが可能である。例えば、そのようなコンジュゲート化抗体は、例えば、検出可能なシグナル生成物質がアビジンまたはストレプトアビジンにコンジュゲート化されている系において、レポーターとして使用されうる。

10

20

30

40

50

#### 【0060】

更にもう1つの実施形態においては、本明細書に記載の抗体、抗体フラグメントおよび/またはナノボディのいずれかをコードする核酸配列（本明細書に定められているもの）も目的となる。更に、本明細書に記載の抗体、抗体フラグメントおよび/またはナノボディのいずれかをコードする核酸配列を含むベクター（本明細書に定められているもの）、ならびにそのようなベクターまたはそのような核酸を含む宿主細胞（本明細書に定められているもの）をも提供する。

#### 【0061】

本発明のもう1つの態様においては、(i)前記のアフィニティリガンドと、(ii)前記の天然に存在しない融合タンパク質と、(iii)場合によっては、天然に存在しない前記融合タンパク質に含まれる標的タンパク質に特異的に結合するリガンドとの複合体をも提供する。特定の実施形態においては、前記複合体は結晶性である。本明細書中で用いる「リガンド」なる語は、標的タンパク質に特異的に結合する分子を意味する。リガンドは、例えば、ポリペプチド、脂質、小分子、抗体または抗体フラグメント（例えば、ナノボディ）でありうる。リガンドはまた、天然標的タンパク質に対する内因性天然リガンドであるリガンドである「天然リガンド」を含む。

#### 【0062】

本明細書中で用いる「複合体」なる語は2以上の会合分子の一群を意味する。好ましい実施形態においては、複合体はタンパク質複合体でありうる。本明細書中で用いる「タンパク質複合体」または「多タンパク質複合体」なる語は、2以上の会合ポリペプチド鎖の一群を意味する。タンパク質複合体におけるタンパク質は非共有結合性タンパク質 - タンパク質により連結される。四次構造は前記タンパク質複合体における会合折り畳みタンパク質の構造形態である。

#### 【0063】

本発明のエピトープタグ、およびこれらのエピトープタグに特異的に結合するアフィニティリガンド、およびエピトープタグとアフィニティリガンドとの複合体、および/またはそれらのいずれかの組合せは、以下のものを含む（それらに限定されるものではない）いずれかの目的を果たしうる：

- ・アフィニティ精製法に適した融合分子を製造する、
- ・前記エピトープタグに特異的に結合するアフィニティリガンドでの共精製に適した融合分子を製造する、
- ・アフィニティ精製法に適した融合分子を含有する、タンパク質および/または核酸の複合体を製造する、
- ・共有結合性または非共有結合性固定化に適した融合分子を製造する、

- ・ サンプルまたは組成物中に融合分子が存在するかどうかを確認することを可能にする、
- ・ 組織内の融合分子を局在化することを可能にする、
- ・ 細胞内に融合分子を局在化する、
- ・ 前記融合分子と他のタンパク質/タンパク質複合体との相互作用を特定する、
- ・ 融合タンパク質の機能およびそれが細胞状態の変化にどのように応答するのかを決定する、
- ・ 細胞の寿命の間に前記融合タンパク質に何が生じるのかを決定する、
- ・ クローン化遺伝子から誘導された新規タンパク質を特徴づける、
- ・ 前記エピトープタグに特異的に結合するナノボディとの共結晶化に適した融合分子を製造する。

10

## 【0064】

特に、本発明のエピトープタグ、およびこれらのエピトープタグに特異的に結合するアフィニティリガンド、およびエピトープタグとアフィニティリガンドとの複合体、および/またはそれらのいずれかの組合せは、アフィニティに基づく用途、例えばアフィニティクロマトグラフィー、アフィニティ精製、免疫沈降、インビボイメージング、縦列アフィニティ精製、タンパク質検出、免疫化学、表面提示、FRET型用途、結晶学などに使用されうる。前記用途における本明細書に開示されている汎用エピトープタグの有用性は実施例において非限定的に更に例示されている。

## 【0065】

特定の実施形態においては、本発明は、本発明の1以上のエピトープタグを含む融合分子の精製のための、前記エピトープタグおよび/またはアフィニティリガンドのいずれかの使用に関する。したがって、通常のコロマトグラフィーに関連した高度に特別設計された方法ではなく一般化されたプロトコルを用いて、分子を精製することが可能である。融合分子は、宿主細胞から、またはそれが分泌された宿主細胞培養から精製されうる。典型的には、宿主細胞からの精製の場合、前記宿主細胞を、標準的な技術(例えば、酵素消化、音波処理、フレンチプレスなど)を用いて細胞溶解して、前記融合分子を含むライセートを形成させる。ライセートまたは宿主細胞培地を適当なコロマトグラフィー媒体と、前記コロマトグラフィー媒体への前記融合分子の結合に適した条件下で接触させることにより、前記ライセートまたは宿主細胞培地から前記融合分子を精製することが可能である。パッチワイズ技術(例えば、コロマトグラフィー培地を前記ライセートまたは培地と混合することによるもの)またはカラム技術で、前記ライセートまたは培地をコロマトグラフィー媒体と接触させることが可能である。樹脂に結合した融合分子を1回以上洗浄して、いずれかの弱く結合した物質、すなわち、前記コロマトグラフィー媒体へ前記融合分子ほどは強固に結合しない物質を除去することが可能である。ついで、前記媒体を、当業者に公知の適当な溶出バッファーと接触させることにより、前記分子を前記媒体から溶出することが可能である。前記カラムからの前記分子の溶出は、一定pHにおいて、または直線的な若しくは不連続的に減少もしくは増加するpH勾配で行われうる。最適溶出条件は、存在する不純物の量およびタイプ、精製すべき物質の量、カラム寸法、使用するコロマトグラフィー樹脂などに左右され、場合に応じて通常の実験により容易に決定される。

20

30

## 【0066】

特定の実施形態においては、本発明は、

- a) 本明細書に記載のエピトープタグに連結された分子を含有する溶液を、本明細書に記載の固定化アフィニティリガンドを有する固体支持体に適用する段階、および
- b) 前記固定化アフィニティリガンドと前記分子との間で複合体を形成させる段階、および
- c) 弱く結合した又は未結合の分子を除去する段階、および
- d) 結合分子を溶出する段階

を含む、天然に存在しない融合タンパク質を精製するための方法に関する。

40

## 【0067】

本明細書に記載されているとおり、融合分子は、例えば本発明のタグと対象分子との間

50

に位置する、プロテアーゼに対する切断部位を含みうる。前記クロマトグラフィー媒体からの溶出の後または前記媒体に尚も結合している間に、本発明の融合分子を、前記切断部位において切断するプロテアーゼ酵素を含む溶液と接触させることが可能である。したがって、特定の実施形態においては、前記精製方法は更に、前記エピトープタグを除去する段階を含む。

**【0068】**

前記精製方法は、当技術分野で公知の任意の方法でありうる。適当な精製方法は、アフィニティークロマトグラフィー（例えば、免疫アフィニティークロマトグラフィー、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー（IMAC））、金属アフィニティ沈降、固定化金属イオンアフィニティ電気泳動および免疫沈降を含むが、これらに限定されるものではない。

10

**【0069】**

アフィニティークロマトグラフィーの場合、前記アフィニティ媒体は、以下のアフィニティリガンドの1以上に結合した固体支持体（例えば、樹脂、磁性ビーズなど）を含有する：Fe、Co、Ni、Cu、ZnまたはAl充填IMACリガンド、抗体、抗体フラグメント、ナノボディ、小分子または合成アフィニティリガンド（例えば、Versaffm（商標）を使用して誘導されたリガンドまたはアダプター）。

**【0070】**

本明細書に示されているとおり、精製のための本発明のエピトープタグおよび/またはアフィニティリガンドの使用は、高度に精製されたタンパク質を良好な収率で与える。本明細書においてタンパク質に適用された場合の「純度」または「精製（された）」なる語は、所望のタンパク質が、好ましくは、全タンパク質成分の少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より一層好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%を含むことを示唆する。

20

**【0071】**

前記溶出段階は、とりわけ、小さな化合物、ペプチドを使用して、または高いイオン強度の溶液を使用して、またはpHを変化させることにより行われうる。特定の実施形態においては、前記融合分子は、過剰量の前記エピトープタグまたは過剰量の前記アフィニティリガンドによりアフィニティークロマトグラフィー媒体から溶出されうる。

**【0072】**

本発明は更に、

a) 本明細書に記載のエピトープタグに連結された分子を含有する溶液を、固定化アフィニティリガンドを有する固体支持体に適用する段階、

b) 前記固定化アフィニティリガンドと前記分子との間で複合体を形成させる段階、および

c) 弱く結合した分子を除去する段階

を含む、天然に存在しない融合タンパク質を固体支持体上に固定化し、および/または捕捉するための方法を含む。

30

**【0073】**

前記方法は、固定化要素を使用して行われることが可能であり、前記固定化は、種々の固体支持体（例えば、カラム、ビーズ、吸着剤、ニトロセルロース紙など）上で種々の固定化手段を用いて行われうる。前記固定化アッセイは、例えば、前記タグに連結された分子に対する抗体に関してサンプルまたは組成物をスクリーニングするために用いられることが可能であり、あるいは試験化合物（例えば、薬物、新規抗生物質など）の大きなライブラリーをスクリーニングするためのスクリーニングアッセイの一部でありうる。前記スクリーニングアッセイは、好ましくは、マイクロプレート形態で行われる。任意の検出手段または方法が用いられうる。例えば、前記検出手段はプレートリーダー、シンチレーションカウンター、質量分析計または蛍光光度計でありうるであろう。

40

**【0074】**

本発明は更に、サンプルまたは組成物中に分子が存在するかどうかを確認するための方

50

法に関する。例えば、本発明のエピトープタグは、レポーター分子（放射能標識、アルカリホスファターゼ、GFP、ペルオキシダーゼなど；前記を参照されたい）に融合したアフィニティリガンドを使用する融合分子の検出において使用されうる。特定の実施形態においては、本発明は、前記エピトープタグに特異的に結合する抗体での本発明の融合タンパク質の検出に関する。この実施形態は、組織または細胞下局在化実験、ELISA、ウエスタンブロットイングまたは他の免疫分析方法において有用でありうる。

【0075】

特定の実施形態においては、抗体（抗体フラグメントまたはナノボディを含む）は、イムノアッセイ、ELISA、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイにおいて前記エピトープタグの検出に使用されることが可能であり、免疫細胞化学的方法において使用されうる。幾つかの実施形態においては、抗タグ抗体が溶液中に存在することが可能であり、認識されるべきタグが溶液中に存在することが可能であり（例えば、免疫沈降）、あるいは固体表面上に存在する又は固体表面に結合していることが可能である（例えば、ウエスタンブロット）。他の実施形態においては、前記抗体は固体表面に結合していることが可能であり、前記タグは溶液中に存在することが可能である（例えば、免疫アフィニティクロマトグラフィーまたはELISA）。

10

【0076】

本発明のタグおよび/または融合分子に対する抗体（抗体フラグメントまたはナノボディを含む）は、サンプル中の1以上の分子の存在、非存在または量を決定するために使用されうる。特異的に結合したタグおよび/または融合分子の量は、レポーター分子（例えば、放射性、蛍光または酵素標識）が結合している抗体を使用して決定されうる。あるいは、特異的抗体とポリペプチドとのポリペプチド-抗体複合体を検出するために、標識された二次抗体（例えば、前記ポリペプチドに特異的な抗体を認識する抗体）が使用されうる。

20

【0077】

本明細書に開示されているエピトープタグを使用する前記方法はハイスループットアプローチにも用いられうるが、当業者に明らかにはずである。更に、組合せタグ化も本発明の一部を構成する。

【0078】

もう1つの特定の実施形態においては、本発明のエピトープタグは、短いタグが好ましい又はタグが存在しないことが好ましい、タンパク質の結晶学においても有用でありうる。通常、タンパク質において非構造的な部分が存在することは結晶化に不都合であるため、タグは除去される。前記柔軟性部分を除去するためには、限定的なプロテアーゼが使用される。タンパク質が本発明のエピトープタグでタグ化されたら、アフィニティリガンド、特にナノボディが前記タグに結合して、前記複合体全体をより可溶性にし、結晶化しやすくし、前記複合体の構造を解析するのを助ける。Nbは、柔軟性ループを固定し又は結晶接触をもたらすことにより、結晶化を促すことが示されている（Lorissら、2003、Korotkovら、2009）。

30

【0079】

更にもう1つの特定の実施形態においては、本発明はまた、天然条件下でタンパク質複合体を精製するための縦列アフィニティ精製（Tandem Affinity Purification）（TAP）方法における、本発明のエピトープタグおよび/またはアフィニティリガンドの使用を提供する。TAPタグ化方法（Rigautら、1999；Puiçら、2001）は酵母プロテオームに非常に首尾よく適用されることが可能であり、種々の細胞および生物に適合化されている。しかし、前記方法は本質的に妥当なものであるが、それは幾つかの欠点を有する。特に、TAPタグのサイズは21kDaの範囲でありうる。タグが大きくなればなるほど、それが、単離されるべきポリペプチドの機能または構造を阻害する、あるいは前記ポリペプチド標的により切断または消化される可能性が大きくなる。TAPのための一般に使用されるタグの組合せは良く知られており、Li（2010）に要約されている。本発明のエピトープタグは、アフィニティに基づく

40

50

用途のための T A P タグの開発に組込まれうる。

【 0 0 8 0 】

もう 1 つの態様においては、本発明はまた、本明細書に記載のアフィニティに基づく用途のいずれかにおける使用のためのキットを提供する。そのようなキットは、限定的なものではないが、以下の要素の 1 以上を含みうる：

- ・ 場合によっては検出可能な様態で標識されている、および場合によっては不溶性マトリックスまたは固体支持体に結合している、本発明の 1 以上の ( ポリ ) ペプチド、
- ・ 場合によっては不溶性マトリックスまたは固体支持体に予め固定化されている、本発明の 1 以上のアフィニティリガンド、
- ・ 本発明の核酸、
- ・ 本発明のベクター構築物、
- ・ 当技術分野で公知の標識試薬、
- ・ 1 組の説明、
- ・ 当技術分野で公知のバッファー、溶出成分、検出成分。

10

【 0 0 8 1 】

好ましい実施形態、特定の構造および構成ならびに物質 ( 材料 ) が本発明の方法および手段に関して本明細書に記載されているが、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、形態および詳細における種々の変更または修飾が施されうる、と理解されるべきである。したがって、本発明は、本明細書に添付されている特許請求の範囲のみにより限定される。

20

【 0 0 8 2 】

【 表 2 】

表 2. エピトープタグ、ペプチド、リンカー配列

アミノ酸配列	配列番号
EPEA	1
GYQDYEPEA	2
DYEPEA	3
YQDYEPEA	4
QDYEPEA	5
GYQDYEPE	6
SEEGYQDYEPEA	7
GAAEPEA	8
GAGAEPEA	9
GAGAGYQDYEPEA	10
YEPEA	11
GAGA	12
EEGEPK	13
EEAEPK	14
IEGR	15
LVPR	16
DDDDK	17

30

40

【 0 0 8 3 】

## 【表 3】

表 3： $\alpha$ -シヌクレインに特異的に結合するナノボディ

名称 (図 1 参照)	アミノ酸の数	配列番号
Nb85	127	18
Nb88	127	19
NbSyn2 PstI	126	20
NbSyn2	126	21
NbSyn1b	126	22
NbSyn1c	126	23
NbSyn1a	126	24
Nb86	124	25
Nb87	122	26

10

## 【 0 0 8 4 】

## 【表 4】

表 4： $\alpha$ -シヌクレインに特異的に結合するナノボディの CDR

ナノボディ (図 1 参照)	CDR1	CDR2	CDR3
Nb85	GLTYSNYC (配列番号 27)	ISTRGIKT (配列番号 28)	AAVIYPGYGDSCPWTTSVNY (配列番号 29)
Nb88	GYTSRIC (配列番号 30)	ISTRGIKT (配列番号 28)	AAVIYPGYGDSCPWTTSVNY (配列番号 29)
NbSyn2 PstI	GIDSSSYC (配列番号 31)	INGLGGVKT (配列番号 32)	AAKFSPGYCGGSWSNFGY (配列番号 33)
NbSyn2	GIDSSSYC (配列番号 31)	INGLGGVKT (配列番号 32)	AAKFSPGYCGGSWSNFGY (配列番号 33)
NbSyn1b	GLNASSYC (配列番号 34)	INGNAGIKT (配列番号 35)	AAKSSPGYCGGNWDNFGY (配列番号 36)
NbSyn1c	GLNASSYC (配列番号 34)	INGNAGIKT (配列番号 35)	AAKSSPGYCGGNWDNFGY (配列番号 36)
NbSyn1a	GLNASSYC (配列番号 34)	INGNAGIKT (配列番号 35)	AAKSSPGYCGGNWDNFGY (配列番号 36)
Nb86	GYTFRGNR (配列番号 37)	INTGGVNT (配列番号 38)	AADLTGWRPVGFSGYNY (配列番号 39)
Nb87	GYSY (配列番号 40)	IYRGDKIT (配列番号 41)	AARRVVADSPLLSKTYAY (配列番号 42)

20

30

40

## 【実施例】

## 【 0 0 8 5 】

実施例 1 . - シヌクレインに対するナノボディの単離、発現および精製

ラクダ科動物ナノボディ、例えば NbSyn1a、NbSyn1b、NbSyn1c および NbSyn2、Nb85、Nb86、Nb87 および Nb88 を、 - シヌクレイン (UniProt アクセション番号 P37840) で免疫化されたヒトコブラクダ、または 2 つのタンパク質、すなわち、 - シヌクレイン A1a53Thr 突然変異体および - シヌクレイン (UniProt アクセション番号は Q16143 である) で免疫化

50

されたヒトコブラクダから単離した。 - シヌクレインと - シヌクレインとは前記タンパク質のN末端部分においては85%の同一性を有するが、C末端部分においては両タンパク質はそれほど相同ではない(±40%)。両タンパク質は同じC末端EPEA配列を共有する。実質的に公開プロトコル(Lauweraysら, 1998; Conrathら, 2001)に従うことにより、または「材料および方法」に記載されているとおり、ファージ提示により全てのナノボディを選択した。固定化 - シヌクレイン上のインビトロ選択は1つの結合物質ファミリー、すなわち、NbSyn1a、NbSyn1bおよびNbSyn1cを示したに過ぎなかった。10μMのNbSyn1aの存在下、固定化 - シヌクレイン上で第2のインビトロ選択を行った。この選択から、3ラウンドのパンニングの後にNbSyn2を得た。2つのタンパク質(- シヌクレインA53T突然変異体および - シヌクレイン)で免疫化されたヒトコブラクダから、10<sup>7</sup>個の独立クローンの、1つの独立したファージディスプレイライブラリーを構築した。このライブラリーを、2つの別々のインビトロ選択において、 - シヌクレインおよび - シヌクレインA53T突然変異体に対して並行してパンニングした。前記ベータ - シヌクレインパンニングからNb85、Nb86およびNb87が回収された。また、これらの結合物質の2つ(Nb85、Nb86)をAla53Thr - シヌクレイン上で選択した。1つの添加結合物質Nb88も前記Ala53Thr - シヌクレインパンニングから回収された。したがって、Nb85およびNb86は - シヌクレインだけでなく - シヌクレインA53Tにも結合するらしい。Nb88は、フレームワーク1およびCDR1における少数の点突然変異においてNb85と異なるに過ぎず、一方、CDR2とCDR3とは同一である(図1)。全てのナノボディを、C末端に6個のヒスチジンを有するようにpHEN6内に再クローニングした。実質的に公開プロトコル(Conrathら, 2001)に従い、固定化金属アフィニティクロマトグラフィー(IMAC)およびサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製を行った。

10

20

30

40

50

#### 【0086】

##### 実施例2 . シヌクレインに対するナノボディのエピトープの特徴づけ

バックボーンアミド共鳴に対する摂動を観察することにより、 - シヌクレイン上のNbSyn2、Nb85およびNb87のエピトープをマッピングするために、<sup>15</sup>N - <sup>1</sup>H異種核単一光子相関分光法(HSQC)を用いた。未標識Nbの、<sup>15</sup>N標識 - シヌクレイン中への滴定は、後者のHSQCスペクトルにおける特異的共鳴の広がり及びシフトの両方を引き起こした。標識 - シヌクレインのHSQCスペクトルに対するNbSyn2、NbSyn85およびNb87の結合の効果を図2に示す。前記上パネルは、Nbの添加に際して得られた生スペクトルを表し、ここで、赤色ピークは遊離体に対応し、青色ピークは、種々のナノボディと複合体化している - シヌクレインのシグナルに対応する。図2の下パネルは、滴定剤とほぼ等しい乃至等しいモル濃度のNbを使用した滴定実験を要約している。用いた濃度範囲では、標識 - シヌクレインの、影響を受けたHSQC交差ピークのほとんどは完全に消失するか(中間的な交換)、または前記スペクトルの異なる領域に再出現した(遅い交換)。これは、結合の際の安定複合体の形成に非常に合致する。前記遊離および結合スペクトルにおける遊離シヌクレインのスペクトルのピークの相対強度を前記配列に沿って各アミノ酸に関してプロットした場合(図2の下パネル)、前記C末端領域は、前記ナノボディのそれぞれの結合に際して、化学シフトまたは強度に関して最大摂動に付される。これらのデータは、3つ全てのNbが - シヌクレインのC末端領域に結合することを示した。

#### 【0087】

##### 実施例3 . - シヌクレインと相互作用するナノボディのアフィニティ測定

- シヌクレインへのNbSyn2の結合をモニターするために、等温滴定熱量測定(ITC)を用いた。20 ~ 37 の温度で測定を行った。前記データは、各場合において、NbSyn2と - シヌクレインとの間の1:1の二分子会合に合致しており、それぞれ20、25、30 および37 において106 ± 21 nM、130 ± 23 nM、99 ± 17 nMおよび260 ± 69 nMのKd値を示した。

【 0 0 8 8 】

【 表 5 】

表 5 : 等温熱量測定(ITC)により測定された NbSyn2:  $\alpha$ -シヌクレイン相互作用の熱力学パラメータ

リガンド	T (K)	$\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta S$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	化学量論	Kd (nM)	$\Delta C_p$ (kcal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
ペプチド	293.1	-11.20 ± 0.24	2.31 ± 0.25	-8.88 ± 0.07	0.98 ± 0.01	240 ± 26	-0.22 ± 0.01
	298.1	-12.44 ± 0.35	3.28 ± 0.36	-9.16 ± 0.09	0.99 ± 0.01	190 ± 30	
	303.1	-13.50 ± 0.76	4.72 ± 0.77	-8.78 ± 0.14	0.94 ± 0.02	460 ± 110	
	310.1	-14.89 ± 0.83	6.29 ± 0.84	-8.61 ± 0.09	0.92 ± 0.03	850 ± 130	
完全長 $\alpha$ -シヌクレイン	293.1	-18.00 ± 0.53	8.65 ± 0.55	-9.35 ± 0.12	0.99 ± 0.01	106 ± 21	-0.23 ± 0.01
	298.1	-19.05 ± 0.45	9.67 ± 0.46	-9.39 ± 0.10	0.93 ± 0.01	130 ± 23	
	303.1	-20.32 ± 0.42	10.61 ± 0.43	-9.71 ± 0.10	0.87 ± 0.01	99 ± 17	
	310.1	-21.79 ± 1.23	12.47 ± 1.24	-9.33 ± 0.16	0.91 ± 0.03	260 ± 69	

10

<sup>a</sup>  $\Delta H$  の値に対するプロトン化の寄与を、10mM トリス-HCL バッファー 100mM NaCl(pH 7.4)を使用して測定したところ、有意でないことが判明した。

<sup>b</sup> ペプチド N-YEPEA-C(配列番号 11)の配列は完全長  $\alpha$ -シヌクレインの残基 Y136-A140 に対応する。

20

【 0 0 8 9 】

NbSyn2、および  $\alpha$ -シヌクレイン配列の pD135 - A140 (NH<sub>2</sub> - DYEP EA - COOH) を含む  $\alpha$ -シヌクレインのペプチド断片を使用して、「材料および方法」に記載されているとおりに、同様の ITC 測定を行った。同様の結合特性が観察された。このことは、このペプチドが  $\alpha$ -シヌクレイン上に NbSyn2 のエピトープを含有することを示している(実施例 4 を参照されたい)。本発明者らは、対応するアフィニティおよび  $C_p$  値が完全長  $\alpha$ -シヌクレインとの相互作用の場合に非常に類似していることを見出した(表 5)。この知見は、 $C_p$  値が、 $\alpha$ -シヌクレインの C 末端ペプチド内に位置するこれらの残基への NbSyn2 の直接的結合から圧倒的に生じ、前記分子の残部内の有意なコンホメーション変化の結果として生じるのではないことを証明している。

30

【 0 0 9 0 】

実施例 4 . NbSyn2 - ペプチド複合体の結晶化

もう 1 つの実験において、本発明者らは、 $\alpha$ -シヌクレインの残基 132 - 140 に対応するペプチド NH<sub>2</sub> - GYQDYEP EA - COOH と複合体化している NbSyn2 を結晶化した(図 6)。前記複合体の X 線構造において、本発明者らは、前記ペプチドの最後の 6 つの C 末端残基に関してのみ、有意な電子密度を観察している。前記ペプチドの残りの残基は前記電子密度においては視認できず、このことは、それらが前記複合体において高度に柔軟性であり無秩序であることを示しており、それらが NbSyn2 との特異的相互作用に関与しないことを示唆している。残基 Asp135 のみが不明瞭な電子密度を示しており(図 7 : 上の第 1 パネル)、Tyr136 に関しては明らかな密度が存在するが、この残基は対称性関連複合体との結晶充填接触に関与しており(図 7 : 上の第 2 パネル)、このことは、Tyr136 の側鎖のコンホメーションが、溶液中で、より柔軟性でありうることを示している。原子レベルでの前記構造の分析は、前記ペプチドが、NbSyn2 の CDR3 および CDR2 ループの残基により形成されるポケットにおいて NbSyn2 に結合することを示している。CDR2 および CDR3 ループの残基は、前記ペプチドの残基 Tyr136、Glu137、Pro138、Glu139 および Ala140 との接触をもたらす。前記結合は主に側鎖相互作用によりもたらされ、本質的に主に静電的である。尤も、前記ペプチドの Pro138 と NbSyn2 の Tyr105 との

40

50

間で重要な疎水性相互作用が生じ、この場合、Pro138の環状脂肪族環のC および C はTy r 1 0 5の芳香環に対して垂直に積み重なる。Al a 1 4 0のC は前記ナノボディのCD R 3およびCD R 2ループにより形成されるポケットにおいて深く潜っており(図6b)、Al a 1 4 0のC末端のカルボニル基はNb S y n 2のA r g 5 0と塩橋を形成する(図7)。Nb S y n 2の残基と直接的な水素結合をもたらす、Al a 1 4 0のカルボニル基ならびにPro138およびG l u 1 3 7のカルボニル酸素とは別に、ペプチド主鎖原子は溶媒に露出され、または架橋水分子を介して前記ナノボディとの間接的接触をもたらす。 -シヌクレイン(PDB-コード2x6M)の9個のC末端残基を含むペプチドに結合したNb S y n 2の結晶構造の決定は、Nb S y n 2が シヌクレインの最後の4つのC末端残基に、より詳細には、C末端配列E P E A(配列番号1)に結合することを証明している(図6)。

10

【0091】

実施例5 . タグ化GFPのアフィニティ精製

NMR実験(実施例2)およびICTデータ(実施例3)は、ナノボディNb S y n 2、Nb 8 5およびNb 8 7が -シヌクレインのC末端に結合することを示している。X線構造(実施例4)は、Nb S y n 2が主に最後の4つのアミノ酸と相互作用することを証明している。これらのナノボディがこのC末端直鎖状4アミノ酸エピトープに結合することを更に確認するために、本発明者らは、種々のGFP-ペプチドハイブリッドを構築することを決めた。標準的なDNAクローニング技術により、C末端において種々のタグに融合したGFP(緑色蛍光タンパク質)の、4つの異なる構築物を作製した。

20

【0092】

【表6】

- |    |               |          |
|----|---------------|----------|
| 1. | GFP-GYQDYEPEA | (CA1508) |
| 2. | GFP-YQDYEPEA  | (CA1509) |
| 3. | GFP-QDYEPEA   | (CA1510) |
| 4. | GFP-GYQDYEPE  | (CA1511) |

【0093】

それらの4つの構築物を、「材料および方法」に記載されているとおりにp B A D m y c H i sベクター内にクローニングした。全てのGFPハイブリッドを大腸菌(E . c o l i)の細胞質内で発現させた。構築物CA 1 5 1 0で形質転換された細胞においては緑色蛍光は観察され得なかった。このことは、この融合タンパク質が十分には発現されないことを示している。しかし、これらの構築物で形質転換された誘導細胞の緑色蛍光により示されるとおり、CA 1 5 0 8、CA 1 5 0 9およびCA 1 5 1 1に関しては機能性GFP発現を得ることが可能であった。ナノボディNb 8 5、Nb 8 7、Nb 8 8およびNb S y n 2を大腸菌(E . c o l i)のペリプラズムにおいて標準的な方法により発現させた。次に、前記ナノボディの1つを含有するペリプラズム画分を、4つのタグ化GFPタンパク質の1つを含有する細胞ライセートと混合し、1時間インキュベートした。ついで、それらの種々のGFP-融合体を、IMACにより、これらの混合物からHisタグ化ナノボディと共に同時精製した。この同時精製実験においては、非特異的結合を避けるために高塩(1M NaCl)を加えた。次に、同時精製されたNb-GFP複合体をイミダゾールによりカラムから溶出し、溶出画分をSDS-PAGEにより分析した(図3)。Nb 8 5またはNb S y n 2を使用して、CA 1 5 0 8およびCA 1 5 0 9によりコードされるタグ化GFPを粗細胞ライセート混合物から同時精製することが可能であった。最後のアラニンが前記タグから欠失しているGFP構築物(CA 1 5 1 1)を回収することはできなかった。このことは、このC末端Al aが、Nb 8 5またはNb S y n 2によるこれらのGFP融合体の結合に決定的に重要であることを示している。第2段階において、Nb S y n 2をセファロースマトリックス上に固定化することにより、アフィニティカラムを調製した。製造業者の説明に従い、Nb S y n 2をCNBr活性化セファロースに結合させた。別の実験において、GYQDYEPEAタグに融合したGFP(構築物C

30

40

50

A1508)を大腸菌(E. coli)内で発現させた。細胞を遠心分離により回収し、細胞溶解させた。ついで、前記タグ化GFP(構築物CA1508)を含有するこの粗ライセートを、固定化NbSyn2を含有するアガローススラリーと混合し、4で1時間インキュベートした。次に全てのビーズを小カラム内のフィルター上に回収し、非特異的結合を防ぐために10カラム体積(cv)の50mM Tris(pH7.5)で、そして10cvの50mM Tris/1M NaCl(pH7.5)で洗浄し、50mM Tris(pH7.5)で平衡化した。GYQDYEP EAタグ化GFPを種々のバッファー(その全ては50mM TrisHClを含有する)で溶出することを試み、pH7.5:0.5M クエン酸、0.5M N-L-a-アスパルチル-L-フェニルアラニン-1-メチルエステル(アスパルテーム)、0.5M アスパラート(aspartat)/チロシン、0.5M グルタミン酸/チロシン、0.5M ギ酸または0.5M アジピン酸に対して滴定した。前記溶出液の蛍光を測定することにより、前記GFP融合体の溶出をモニターした。アジピン酸およびNaClは前記タグ化GFPを前記アフィニティマトリックスから溶出することが判明した。次に溶出液をSDS-PAGE上で分析し、この観察を証明した。前記GFP融合体に対応する分子量を有する1つの特異的バンドをSDS-PAGE上で特定することが可能であった(図4)。別の実験において、GFP-GYQDYEP EA融合体を粗ライセートからNbSyn2アフィニティカラム上に捕捉し、それを10cvのバッファーで洗浄し、前記タグ化GFPを750μMの(合成)遊離NH<sub>2</sub>-GYQDYEP EA-COOHペプチドで成功裏に溶出した(図5)。この場合、SDS-PAGE上で前記GFP融合体に対応する分子量を有する1つのバンドをも特定した。第2の高塩洗浄(2M NaCl)では、残りのタンパク質は前記カラムからほとんど溶出され得なかった。このことは、前記ペプチドがGYQDYEP EAタグ化タンパク質を前記合成GYQDYEP EAペプチドの存在下に定量的に溶出することを示している。結論としては、NbSyn2アフィニティカラムを使用して、GFP-GYQDYEP EA融合体(CA1508)を細胞ライセートから捕捉し、それをモル濃度のNaClもしくはアジピン酸で又はミリモル濃度の合成NH<sub>2</sub>-GYQDYEP EA-COOHペプチドで前記アフィニティカラムから溶出することが可能であった。

#### 【0094】

##### 実施例6. タグ化ナノボディのアフィニティ精製

もう1つの実施例として、ナノボディ(これは別のタンパク質に特異的である)をタグ化し、それを、NbSyn2アフィニティ樹脂を使用して精製した。タグ化ナノボディを得るために、「材料および方法」に詳細に記載されている2つの新たなプラスミドpMESy1およびpMESy2を構築した。pMESy1においては、元のHisタグを、より長いGYQDYEP EAにより置換した。pMESy2においては、4アミノ酸のEP EAタグを小さなGAAリンカーの後方にクローニングした。1つのVHH、Nb458(無関係な抗原、すなわち、ピチア・パストリス(Pichia pastoris)のAox1を認識するもの;配列番号66)を、PstIおよびEco91I部位を用いて、両方のベクターにおいてクローニングした。Nb458の両方のタグ化形態を大腸菌(E. coli)のペリプラズムにおいて発現させた。新鮮なペリプラズム画分を調製し、実施例4に記載されているとおりにセファロース-ビーズに架橋されたNbSyn2のスラリーと混合した。前記セファローススラリーを小カラムのフィルター上に集め、50mM TrisHCl(pH7.5)で洗浄した。両方のタグ化ナノボディは、1MのNaClで、これらのカラムから成功裏に溶出されることが可能であった(図8)。結論としては、NbSyn2アフィニティカラムを使用して、Nb458-GYQDYEP EA融合体およびNb458-gaaEP EA融合体を細胞ライセートから捕捉し、それをモル濃度のNaClで前記アフィニティカラムから溶出することが可能であった。

#### 【0095】

##### 実施例7: ELISAにおけるEP EA-タグの適用

まず、96ウェルプレートの種々のウェルを、それぞれ、C末端においてGYQDYEP EAでタグ化されたNb458で、およびGgaaEP EAタグでタグ化されたNb4

58でコートした。次に、前記プレートにPBS中の乳でブロッキングした。Hisタグ化NbSyn2(NbSyn2のC末端にHisタグ)を使用し、ついで抗Hisマウスモノクローナル抗体および抗マウスアルカリホスファターゼコンジュゲートを使用して、両方の固定化EPEAタグ化Nb458が検出された。GYQDYEP EAでC末端においてタグ化されたNb458で、またはgaaEPEAでタグ化されたNb458でコートされたウェルにおいてのみ、乳でブロッキングされただけのブランクウェルと比較して有意なアルカリホスファターゼ活性を検出することが可能であった。次に、ELISAプレートの種々のウェルを(1)ヘキサヒスチジン-エピトプタグを有するNb458、(2)GYQDYEP EAタグ、および(3)gaaEPEAタグを有するNb458でコートした。全てのウェルを乳でブロッキングした。この実験においては、自製NbSyn2アルカリホスファターゼコンジュゲートでEPEAタグ化ナノボディを検出することはできたが、Hisタグ化ナノボディを検出することはできなかった。GYQDYEP EAおよびgaaEPEAタグ化構築物に関してのみ、明らかなシグナルが得られた(図9)。したがって、組換え発現されたタンパク質をELISAにおいて検出するために、短いEPEAタグをNbSyn2と共に使用することが可能のようである。

10

20

30

40

50

#### 【0096】

##### 実施例8：ウエスタンブロットにおけるEPEA-タグの適用

ウエスタンブロット分析においてEPEA-タグNbSyn2の組合せを試験した。第1の実験において、GYQDYEP EAタグ化GFP(CA1508)およびシヌクレインをSDS-PAGE上で泳動させ、ニトロセルロースシートへ移した。一次抗体としてHisタグ化NbSyn2を、二次抗体としてマウスモノクローナル抗His-タグ抗体を、そしてブロットを現像するためにNBTおよびBCIPと共に抗マウスアルカリホスファターゼコンジュゲートを使用することにより、両方のブロット化タンパク質を可視化することが可能であった(図10)。類似したウエスタンブロット実験において、本発明者らの自製NbSyn2-アルカリホスファターゼコンジュゲート(NbSyn2-AP)をNBTおよびBCIPと共に使用する単一段階で、ブロット化GYQDYEP EAタグ化Nb458(CA2944)、そしてまた、Nb458-gaaEPEA(CA2945)を可視化することが可能であった(図11)。したがって、組換え発現されたタンパク質をウエスタンブロットにおいて検出するために、短いEPEAタグをNbSyn2と共に使用することが可能のようである。

#### 【0097】

##### 実施例9：EPEAタグでの大きなタンパク質ライブラリーのインビトロ検出および分析

C末端EPEAタグ化タンパク質はNbSyn2-APでELISAにおいて検出されることが実施例7から明らかである。このタグがハイスループット用途においても機能することを確認するために、本発明者らは、EPEAタグ化VHHの大きなファージ提示ライブラリーをスクリーニングするためにNbSyn2を使用した。この目的のために、ファージ提示ベクターpMESy2において(免疫化ラマの)VHH(ナノボディ)ライブラリーをクローニングした。2つの異なる抗原に対するナノボディのサブセットを選択するために、ファージ提示による2つの異なるインビトロ選択を行った。1つの抗原に特異的であるナノボディに関するクローンのこれらのサブセットのスクリーニングを以下のとおりELISAにより行った。抗原を96ウェルプレート上にコートし、プレートをブロッキングし、EPEAタグと融合した異なるVHH遺伝子を発現する別のクローンのペリプラズマ画分と共に各ウェルをインキュベートした。NbSyn2-APコンジュゲートで検出を行った(図12)。両方の実験において、種々の特異的結合物質を特定した。したがって、ファージ提示ライブラリーの及び他のゲノミクスまたはプロテオミクスアプローチにより作製された組換えタンパク質のライブラリーのハイスループット分析において、組換え発現されたタンパク質を検出するために、短いEPEAタグをNbSyn2と共に使用することが可能のようである。

#### 【0098】

#### 実施例 10 . NbSyn2 での EPEA タグ化タンパク質のインビボ検出

もう一つの一連の実験において、(生きた)真核細胞内の組換えタンパク質の発現を検出/可視化するための、EPEA タグの使用を検討した。この目的のために、2つの異なるタンパク質(HIV-Rev および GFP)を EPEA タグ化(Rev-GAGAGYQDYEPEA、Rev-GAGAEPEA、GFP-GYQDYEPEA および GFP-GAAEPEA)し、真核細胞内の一過性発現のために pcDNA トランスフェクションベクター内にクローニングした。EPEA タグ化タンパク質の検出を可能にするために、NbSyn2 または NbSyn1a を mKO1 または GFP に融合させ、pcDNA 内にクローニングして NbSyn1a-mKO1、NbSyn1a-GFP および NbSyn2-GFP 融合体を得た。HeLa 細胞をこれらのベクターで又はこれらのベクターの組合せでトランスフェクトして、NbSyn1a または NbSyn2 に融合した GFP または mKO1 を使用して前記発現を検出し前記 EPEA タグ化タンパク質の位置を特定することが可能かどうかを調べた。図 13 は、mKO1 または GFP に融合した NbSyn2 または NbSyn1a でトランスフェクトされた細胞が前記細胞において均一に着色していることを示している。Rev-GAGAGYQDYEPEA または Rev-GAGAEPEA と、mKO1 または GFP に融合した NbSyn2 または NbSyn1a とで二重トランスフェクトされた細胞は、核において、より濃い色を示す。野生型 Rev は細胞の核と細胞質との間を往来し、前記タンパク質の大部分は核内に局在することが公知である(Perkins ら, 1989)。したがって、前記蛍光ナノボディ融合体および前記 EPEA タグ化 Rev タンパク質は二重トランスフェクト化細胞の核内に共局在し、このことは、GYQDYEPEA および EPEA タグの両方が、たとえ細胞の核内であっても、NbSyn2 または NbSyn1a 融合体によりインビボで認識されることを証明している(図 13)。

10

20

#### 【0099】

#### 実施例 11 . 二価ナノボディを使用するインビトロ検出の感度の改良

前記 EPEA タグがハイスループット用途において機能することは実施例 9 から明らかである。ELISA の感度を改良するために、biNbSyn2 (配列番号 68) と称される、NbSyn2 の二価形態を構築した。この目的のために、NbSyn2 遺伝子を増幅し、それを、両方の NbSyn2 配列の間に GGGGSGGG (配列番号 69) リンカーを含有する二価構築物として、ファージ提示ベクター pMES4 内にクローニングした。biNbSyn2 の発現、精製およびアルカリホスファターゼに対するコンジュゲート化は、実施例の「材料および方法」に記載されているとおりに行った。一価 NbSyn2 を二価「biNbSyn2」と比較するために、ELISA を以下のとおりに行った。抗原 Nb458-gaaEPEA を種々の濃度で 96 ウェルプレート上にコートし、プレートをブロッキングした。前記 NbSyn2-AP コンジュゲートまたは前記 biNbSyn2-AP コンジュゲートで検出を行った。この実験から、biNbSyn2 を使用することにより、検出感度が増加することが明らかである(図 14A、B)。

30

#### 【0100】

#### 実施例 12 . タグ化膜タンパク質の検出およびアフィニティ精製

もう一つの実施例として、タグ化膜タンパク質が検出されアフィニティ精製により精製されうるかどうかをも試験した。したがって、膜タンパク質 CsgG をタグ化し、その発現をウエスタンブロットにより調べ、NbSyn2 アフィニティ樹脂を使用してそれを部分精製した。pTrc99a (pMC2; Robinson ら, 2006) において trc プロモーターの後に自身の天然 RBS と共にクローニングされた大腸菌(E. coli) UTI89 CsgG を、C 末端 EPEA アフィニティタグを含むように修飾した。SLIM (部位特異的連結非依存的突然変異誘発; Chiura, 2004) 法を用いて、「材料および方法」に詳細に記載されているとおりに、この C 末端 His タグを、GGEP E A をコードする配列(配列番号 70)で置換した。大腸菌(E. coli)細胞の小規模培養を成長させ、IPTG を加えて EPEA タグ化 CsgG (配列番号 72)の産生を誘導した。前記 CsgG タンパク質の存在を証明するために、この構築物の、4つの個々

40

50

のクローン上で、ウエスタンブロットを行った。適切な高さで泳動している明らかなバンドを検出することができた(図15)。前記EPEAタグ化Cs g Gの、より大規模な製造のために、前記プラスミドをBL21細胞に形質転換した。「材料および方法」に記載されているとおりに、細胞膜を調製した。最後に、前記膜を1% n-ドデシル-D-マルトシド(DDM)中、一晩にわたって可溶化し、前記可溶化物質を、実施例4に記載されているとおりにセファロース-ビーズに架橋されたNbSyn2を含有する小さなカラム上で移動させた。前記ビーズを25mM Tris(pH8)、1mM DTT、0.02% DDM、1% C8E4、5mM LDAOで洗浄した。小さな合成NH<sub>2</sub>-SEPEA-COOHペプチド(配列番号71)での溶出の後、前記膜タンパク質の明らかな富化を認めることが可能であった。このことは、1% 界面活性剤溶液からのEPEAタグ化膜タンパク質の捕捉が可能であることを示している(図16)。

10

## 【0101】

実施例に関する材料および方法

全ての制限酵素、T4 DNAリガーゼはFermentasから購入した。

## 【0102】

細菌株およびプラスミド

使用した大腸菌(*Escherichia coli*)株はTG1:supE thi-1(lac-proAB)(mcrB-hsdSM)5(rk<sup>-</sup>mk<sup>-</sup>)[F'trad36 proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15]、Top10[mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC)80lacZ M15 lacX74 deoR recA1 araD139(ara-leu)7697 galU galK rpsL(=Str<sup>R</sup>)endA1 nupG](Invitrogen, Basel, Switzerland)、WK6[(lac-proAB)、galE、strA/F'lacI<sup>q</sup>、lacZ M15、proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>](Zell & Fritz, 1987)およびBL21細胞(Invitrogen)であった。

20

## 【0103】

プラスミドpHEN4(Ghahroudiら, 1997)、pHEN6(Lauwe reysら, 1998)、pMES4(genbank GQ907248)、pBad MycHis(Invitrogen)、pcDNA3.1(Invitrogen)およびpMC2(Robinsonら, 2006)を使用した。

30

## 【0104】

-シヌクレインに対するナノボディの免疫化、単離、発現および精製

ヒトコブラクダ(1)を-シヌクレインで皮下に6週間で6回免疫化した。もう1頭のヒトコブラクダ(2)を-シヌクレインAla53Thrおよび-シヌクレインで免疫化した。両方の動物から、ChomczynskiおよびSacchi(1987)に記載されているとおりに、約10<sup>7</sup>個のリンパ球から全RNAを単離した。dN6プライマーおよびsuperscript RTを製造業者(Invitrogen)の説明に従い使用して、第1鎖cDNA合成を行った。ヒトコブラクダ1から、VHH遺伝子をコードする遺伝子断片を、既に記載されているとおりに(Conradら, 2001)、特異的プライマーを使用するPCRにより増幅した。ネスティッドPCRのために、フレームワーク1においてアニールする1つのプライマー(5'-GATGTGCAGCTG-CAGGAGTCTGGRGGAGG-3') (配列番号43)、および重鎖ヒトコブラクダ免疫グロブリン(Conradら, 2003)の重鎖の種々のヒンジ領域においてアニールする3つの他のプライマー(5'-GTAGCGGCGCTGGGGTCTTCGGGGTGGT-GCGCTGAGGAGACGGTGACCTGGGT-3'、5'-GTAGCGGCGCTTGGTGGGGTATCTTGGGTCTTGAGGAGA-CGGTGACCTGGGT-3'、5'-GTAGCGGCGCTTACTTCATTTCGTTCTGAGGAGACGGTGAC-CCTGGGT-3') (配列番号44、45および46)を使用した。VHH遺伝子を、NcoIおよびNotI制限酵素を使用してpHEN4ベクター(Ghahroudiら, 1997)内にクローニン

40

50

グシ、標準的な方法によりTG1細胞 (genepulser, Biorad) 内に形質転換した。ヒトコブラクダ2から、VHH遺伝子をコードする遺伝子断片を増幅し、クローニングした (Conradら, (2001) に記載されているとおりに行った)。M13K07での重感染の後、両方のライブラリーのVHHレパトワを前記ファージ上で発現させた。第1ライブラリーからのインビトロ選択を、マキシソープ (maxisorp) マイクロタイターウェル (Nunc) のウェルにおいて - シヌクレイン (10 µg / ウェル) でコートされた固相上で、または第2ライブラリーに関して - シヌクレイン Al 53 Thr もしくは - シヌクレインでコートされた固相上で行った。結合ファージを100 mM トリエチルアミン (pH 11) で溶出した。後続段階、選択された結合物質の再クローニング、発現および精製は、Conradら, (2001) に記載されているとおりに行った。

10

## 【0105】

EPEAタグを使用するライブラリー構築およびファージ提示

前記のとおり、cDNAライブラリーを構築し、全てのVHH遺伝子を増幅した。VHH遺伝子をpMESy2内にクローニングするために、ベクターおよびPCR産物をPstIおよびEco91I制限酵素で消化し、精製し、T4 DNAリガーゼで一晩連結した。プライマーRPおよびGIIIを使用するPCRにより、インサートの分析を行った。ヘルパーファージでの重感染の後、前記ライブラリーのVHHレパトワを前記ファージ上で発現させた。マキシソープ (maxisorp) マイクロタイターウェル (Nunc) のウェルにおいてタンパク質 (2 × 5 µg / ウェル) でコートされた固相上のライブラリーから、特異的結合物質をインビトロで選択した。前記コート化ウェルを100 mM トリエチルアミン (pH 10) と共に10分間インキュベートすることにより、ファージを回収し、溶出物 (ファージを含有するもの) を、TrisHCl (pH 6.8) を加えることにより中和した。この溶出物を、新たに増殖させたTG1細胞に加えた。ついで前記コート化ウェルをTrisHCl (pH 6.8) で1回およびPBSで数回洗浄し、新たに増殖させたTG1細胞を前記ウェルに加えて、未溶出ファージを回収した。特異的結合物質に関するコロニースクリーニングを、前記のとおり、NbSyn-APを使用するELISAにより行った。

20

## 【0106】

ヘキサヒスチジンタグとEPEAタグとを併せ持つ新たなファージ提示ベクターを以下のとおりに構築した。pMESy4 (CA3198と称される) を以下のとおりに調製した。プライマーEP177: (5' - GTCACCGTCT - CCTCACACCAACAATCACCAATCACGAACCTGAAGCCTAGTACCC - 3') (配列番号47) およびEP178: (5' - GTACGGGTACTAG - GCTTTCAGGTTCTGTGATGGTGTGGTGTGGTGTGAGGAGACG - 3') (配列番号48) を50 µMの濃度で互いに混合した。両方のプライマーを水浴中で95 °Cに加熱し、非常にゆっくりと室温に冷却した。ついで前記プライマーを1 µMの濃度に希釈した。BslWIおよびEco91Iで切断された精製されたpMES4の100 ngまたは0.034 pmolを1.7 pmolのプライマーと混合し、T4 DNAリガーゼで連結した。WK6大腸菌 (E. coli) 細胞を形質転換し、PCRのより分析し、配列決定した。

30

40

## 【0107】

NMR測定

全てのNMR実験は、低温プローブを備えたBruker Avance 500 MHzまたは700 MHz分光計を使用して行った。ついで全てのNMRデータを、NMRpipe72を使用して処理し、前記データの分析のためにプログラムSPARKY73を使用した。

## 【0108】

<sup>14</sup>N NbSyn2の存在下または非存在下の標識 - シヌクレインの結合形態の<sup>1</sup>  
<sup>5</sup>N - <sup>1</sup>H HSQC測定および帰属

50

低温プローブを備えた Bruker Avance 700 MHz 装置で、標準的な  $^1\text{H}$  -  $^{15}\text{N}$  HSQC 実験を行った。NbSyn2 の小容量の濃縮ストック溶液の滴定により、種々のモル当量の未標識 NbSyn2 (0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、1.75、2.0、2.5、3.0、3.25) において、 $^{15}\text{N}$  標識 - シヌクレインのスペクトルを記録した。全ての実験を 10 mM リン酸バッファー (pH 7.4) 中、10 で記録した。アミド共鳴ならびに C および C 化学シフトは予め決定されており (Dedmonら, 2005a; 2005b)、それらを前記データの更なる解析に使用した。NbSyn2 と複合体化している - シヌクレイン共鳴の化学シフトを、一連の標準的な 3D 実験 (CBCA (CO) NH および HNCACB) を用いて帰属した。各 3D 実験の実験と実験との間およびそれらの後、 $^{15}\text{N}$  -  $^1\text{H}$  HSQC スペクトルを記録することにより、サンプルの完全性の検査を行った。

10

## 【0109】

$^{14}\text{N}$  NbSyn2 の存在下または非存在下の  $^{15}\text{N}$   $^{13}\text{C}$  標識 - シヌクレインの  $^{13}\text{C}$  -  $^{15}\text{N}$  CON 測定  
 $^{13}\text{C}$  -  $^{15}\text{N}$  CON 実験は残基 n の  $^{13}\text{C}$  カルボニル化学シフトを残基 n + 1 の  $^{15}\text{N}$  化学シフトと関連させるものであり、前記実験を、既に記載されている (Bermeilら, 2006) とおりに行った。前記スペクトルにおける全ての交差ピークの帰属は Bermeilら, 2006 から得た。合わせて 2 つの CON スペクトルを、 $^{15}\text{N}$   $^{13}\text{C}$  標識 - シヌクレインの遊離体および 1 当量の  $^{14}\text{N}$  NbSyn2 の添加後のものに関して記録した。前記スペクトルは、低温プローブを備えた 500 MHz Bruker Avance 分光計で記録した。サンプルバッファーは 10 mM リン酸バッファー (pH 7.4) であり、温度は 283 K に設定した。結合形態の - シヌクレインの CON 交差ピークの帰属は、結合 - シヌクレインに関する帰属  $^{15}\text{N}$  -  $^1\text{H}$  HSQC スペクトルにおける対応ピークに関する  $^{15}\text{N}$  化学シフトを比較することにより得た。

20

## 【0110】

完全長 - シヌクレインおよび - シヌクレインのペプチド断片に結合した  $^{15}\text{N}$   $^{13}\text{C}$  標識 NbSyn2 の  $^{15}\text{N}$  -  $^1\text{H}$  HSQC 測定および帰属  
 本発明者らは NbSyn2 のバックボーン共鳴の帰属を報告している (Vucheleinら, 2009)。 - シヌクレインに結合した 20 mM リン酸バッファー (pH 7.4) 中の 0.3 mM の  $^{15}\text{N}$   $^{13}\text{C}$  標識 NbSyn2 のサンプルのバックボーン帰属を、低温プローブを備えた Bruker Avance 700 MHz 分光計を使用する HNCACB 実験により得た。完全長  $^{14}\text{N}$  - シヌクレインおよび  $^{14}\text{N}$  12 - 残基ペプチド N-SEEGYQDYEEA-C (Genemed Synthesis, Inc, New York) の滴定を 20 mM リン酸バッファー (pH 7.4) 中の 0.3 mM の  $^{15}\text{N}$  標識 NbSyn2 で 298 および 283 K で行った。

30

## 【0111】

## 等温熱量測定

MCS - ITC 熱量計 (MicroCal, LLC, Northampton, MA, USA) を使用して、熱量測定を記録した。75  $\mu\text{M}$  の濃度の 273  $\mu\text{l}$  の NbSyn2 の溶液を 10  $\mu\text{l}$  のアリコートにおいて、1.4 ml の 5  $\mu\text{M}$  - シヌクレインを含有する熱量測定セル中に滴定した。測定前に、10 mM リン酸塩、150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.4) を含有する全く同じバッファー中で両方のタンパク質を透析した。所望の温度で 4 分ごとに各注入を行った。バッファーのみを含有するサンプルセルにおける NbSyn2 の滴定を、解析前に実際の結合実験から差し引いた。Microcal 解析ソフトウェア (Origin 7.0) を 1:1 結合モデルで使用して、熱力学的解析を行った。H の温度依存性は、 $C_p = H / T$  関係により、 $C_p$  の計算を可能にした。H へのプロトン化の寄与を、10 mM Tris-HCl バッファー 100 mM NaCl (pH 7.4) を使用して評価した。

40

## 【0112】

タグ化 GFP のクローニング、大腸菌 (E. coli) における発現および精製

50

Takara Ex Taqポリメラーゼ (TAKARA BIO INC) を使用する PCR により、4つの異なるタグを gfp 遺伝子に結合させた。同じ特異的プライマー EP124 (5' TAATCATGAGCAAGGAGAAAGAACTTTTCAC 3') (配列番号67) を全ての構築物において使用した。それは前記遺伝子のN末端においてアニールする。C末端において種々のタグのコード配列を融合させるために、種々のプライマーを使用した。GYQDYEP EAには、プライマーEP126 (5' - TTCGAATT - CATTACGCTTCCGGTTCATAATCCTGATATCC TTTGTAGAGCTCATCCATGC 3') (配列番号49) を使用し、YQDYEP EAには、プライマーEP127 (5' - TTCGAATT CATTACGCTTCCGGTTCATAATCCTGATATTTGTAGAGCT - CATCCATGC C - 3') (配列番号50) を使用し、QDYEP EAには、プライマーEP128 (5' - TTCGAATT CATTACGCTTCCGGTTCATAAT - CCTGTTTGTAGAGCTCATCCATGCC - 3') (配列番号51) を使用した。増幅条件は94 で4分、28回 (94 で40秒、50 で40秒、72 で1分) および72 で10分であった。種々のエピトプタグを有するGFP融合分子をコードする増幅gfp融合体をBspHIおよびEcoRIで切断した。前記PCR産物を、NcoIおよびEcoRIで開裂されたpBADmycHisベクター内に連結した。最後に、前記連結産物を大腸菌 (E. coli) TOP10内に形質転換した。GYQDYEP EAタグを有するGFPを構築するために、1μlの前記EP124 - EP126増幅GFP断片を、プライマーEP124およびEP129 (5' TTCGAATT CATTATTCCTGGTTCATAATCCTG 3') (配列番号52) を使用する更なるPCRのための鋳型として使用した。前記増幅PCR産物を、前記のとおり、pBADmycHisベクターにクローニングした。様々にタグ化されたGFP融合体を発現させるために、大腸菌 (E. coli) 細胞培養をOD<sub>600</sub> = 0.7の細胞密度で0.02% アラビノースの添加により誘導し、37 で更に一晚インキュベートした。330mlのLB培養からの細胞を遠心分離 (10分間、4000rpm、4 ) により回収し、ペレットを、1mM PMSTを含有する20mlの50mM Tris - HCl (pH7.5) に再懸濁させた。C5 Emulsiflex High Pressure Homogeniser 86 - 001 (AVESTIN, Germany) により細胞を細胞溶解させた。不溶性物質を遠心分離 (30分間、4000rpm、4 ) によりペレット化し、上清 (細胞質画分) を集めた。ヘキサヒスチジンタグ化 (Hisタグ化) NbSyn2と複合体化しているタグ化GFPを精製するために、Hisタグ化NbSyn2のペリプラズム画分を各タグ化GFPの1つの細胞質画分と混合した。前記のとおりにIMACを行った。NbSyn2 - GFPタグ化融合複合体を1M イミダゾールで溶出した。

### 【0113】

VHH - EP EAタグ化融合体のクローニング、大腸菌 (E. coli) における発現および精製

1ngのpMES4a上で、pMESy1 (CA2857) を構築するためにEP138 (5' - ACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCCTAGTACC CGTACGACGT) (配列番号53) およびFP (5' - CGCCAGGGTTTCCAGTCAAGAC - 3') (配列番号54) を使用して、そしてpMESy2 (CA2741) を構築するためにプライマーEP139 (5' - ACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGGGGCAGCGGAACCTGAAGCCTAGTACC CGTACGACGTTTC - 3') (配列番号55) およびFPを使用して、Takara Ex TaqポリメラーゼでPCRを行った。増幅条件は94 で4分、28回 (94 で40秒、55 で40秒、72 で1分) および72 で10分であった。両方のPCR産物およびpMES4ベクターをBamHIおよびEco91Iで切断し、精製した。50ngのPCR産物への100ngのベクターの、T4 DNAポリメラーゼでの連結を、4 で一晚行った。前記混合物をWK6細胞内に形質転換し、37 で一晚増殖させた。プライマーMP57 (5' - TTAG

CTTCCGGCTCGTATG - 3') (配列番号56) およびGIII (5' - CCACAGACAGCCCTCATAG - 3') (配列番号57) を使用するPCRならびにSpeI消化により分析を行った。クローンを配列決定し、適切なものから、DNAを調製した(Qiagen)。Nb458を、プライマーRPおよびプライマーEP101 (5' - TGAGGAGACGGTGACCTGGGT - 3') (配列番号58) を使用して、前記と同じ増幅条件で増幅し、PstIおよびEco9I制限酵素を使用してpMESy1 (CA2857) またはpMESy2 (CA2741) ベクター内にクローニングした。インサートの分析を、プライマーRPおよびGIIIを使用するPCRにより行った。Conradら, (2001) に記載されているとおりに、発現を行った。pMESy1内のNb458はGYQDYEP EA タグの配列に融合され、CA2944と称される。一方、pMESy2においては、それはgaaEPEA タグを有し、CA2945と称される。

10

## 【0114】

## NbSyn2アフィニティカラム精製

精製されたHisタグ化NbSyn2をCNBr活性化セファロース(GE Health care Life science)に、前記製造業者の説明に従い結合させた。カラムを50mM TrisHCl (pH7.5) で平衡化した。タグ化融合体(GFPまたはVHH)のライセートをビーズ上に1時間接触させた。前記カラムを10カラム体積(cv)の50mM TrisHCl (pH7.5) で洗浄し、全てpH7.5の追加化合物(実施例を参照されたい)の存在下の10cvの50mM TrisHClで溶出を行った。最後の実験においては、溶出バッファーは1Mまたは2M NaClの存在下の50mM TrisHCl (pH7.5)、0.5M アジピン酸の存在下の50mM TrisHCl (pH7.5)、または750μMのペプチド(GYQDYEP EA)の存在下の50mM Tris-HCl (pH7.5)であった。

20

## 【0115】

## Hisタグ化NbSyn2を使用する固相ELISA

マキシソルブ(Maxisorb)96ウェルプレート(Nunc)をNb458-gaaEPEAまたはNb458-GYQDYEP EA調製物で、炭酸水素ナトリウムバッファー(pH8.2)中、2μg/mlで4で一晚コートした。前記ウェル内の残留タンパク質結合部位をPBS中の2% 乳で室温で2時間ブロックした。NbSyn2-His6タグを0.2% 乳と共にPBS中の2μg/mlで加えた。マウス抗ヒスチジン-タグ(Serotec)を使用して、NbSyn2ナノボディの検出を行った。アルカリホスファターゼ抗マウスIgGコンジュゲート(Sigma)を使用して、前記マウス抗his抗体の後続検出を行った。酵素基質p-ニトロフェニルホスファートの添加の15分後に405nmにおける吸光度を測定した。

30

## 【0116】

アルカリホスファターゼにコンジュゲート化されたNbSyn2を使用する固相ELISA、ウエスタンブロット

PBS中の0.5mgのHisタグ化NbSyn2を、Harlow & Lane (1988) に記載されているとおりに、0.5mlの最終体積中の2.5mgのアルカリホスファターゼにコンジュゲート化した。マキシソルブ(Maxisorb)96ウェルプレート(Nunc)を、炭酸水素ナトリウムバッファー(pH8.2)中の2μg/mlのタンパク質調製物で4で一晚コートした。SDS-PAGEおよびウエスタンブロットを標準的なプロトコールに従って行った。前記ウェル内または膜上の残留タンパク質結合部位をPBS中の2% 乳で室温で2時間ブロックした。前記タグの検出を1/1000の希釈度のNbSyn2-APコンジュゲートで行った。ELISAのために、酵素基質p-ニトロフェニルホスファートの添加の15~分後に405nmの吸光度を測定した。ウエスタンのために、NBT/BCIP基質(Roché)を、前記製造業者が記載しているとおりに使用した。

40

## 【0117】

50

## NbSyn2 - ペプチド複合体の結晶化

合成ペプチド (配列 NH<sub>2</sub> - GYQDYEP EA - COOH) (BIO-SYNTHESIS, INC., Texas) と複合体化している NbSyn2 の結晶化を、結晶化ロボット Phoenix (Art Robbins Instruments) およびシッティング・ドロップ (sitting drop) 蒸気拡散アッセイを用いて行った。まず、133 μl の 10 mg/ml の NbSyn2 を 15 μl のペプチド (20 mg/ml) と混合した後、JB Classic 1-4 (G10) スクリーン (Jena Biosciences) に分散させた。100 nL の滴を 100 nL の沈殿溶液と混合した。以下の条件下で結晶を得た: 25% w/v PEG 6000、100 mM HEPES (pH 7.5) および 100 mM LiCl。ついで結晶を集め、凍結保護溶液 (25% w/v PEG 6000、100 mM HEPES (pH 7.5) および 100 mM LiCl および 10% PEG 400) に移し、データ収集のために液体窒素中で瞬間冷凍した。

10

## 【0118】

## データ収集および構造解析

NbSyn2 - ペプチド複合体の凍結結晶の回折パターンを、Deutsches Elektronen Synchrotron (DESY Hamburg, Germany) を使用して、European Molecular Biology Laboratory (EMBL) において、MAR555 検出器を備えた X11 ビーム線で得た。Mosfilm 65 および Pointless を使用してデータを処理し、Scala を使用して空間群を決定し、データをそれぞれ基準化 (scale) し合体させた。プログラム Phaser 66、および NbSyn2 に関するモデル、すなわち、pbd エントリー 1HCV 67 を使用する分子置換を用いて、構造因子に関連した相情報を得た。プログラム Arp/Warp 68 および Refmac 569 を使用して、モデル構築および精密化を行った。電子密度地図を解釈するため、および前記モデルの精密化のために、グラフィックスプログラム Coot 70 を使用した。NbSyn2: - シヌクレイン複合体の形成の際の溶媒接近可能表面積 (ASA) における変化を、ウェブベースサーバー PRTORP 71 を使用して計算した。

20

## 【0119】

HeLa 細胞内での発現のための長いタグ (GYQDYEP EA) および短いタグ (EPEA) のクローニング

30

Takara Ex Taq ポリメラーゼ (TAKARA BIO INC) を使用する PCR により、2つの異なるタグ GYQDYEP EA および EPEA を C 末端において Rev に融合させた。GYQDYEP EA の DNA 配列に C 末端において融合された rev 遺伝子を増幅するために、プライマー T7 (5' - ATTAATACGACTCACTATAGG - 3') (配列番号 59) およびプライマー EP136 (5' - TCGAGCGGCCGCTTAGGCTTCAAGGTTCTAGTCTTGATACCCCTGAAGCTCCTGCACCATTCCTC - 3') (配列番号 60) を使用して、Dirk Daeleman により快く贈呈された pcDNA Rev - mKO1 上で PCR を行った。EPEA タグを Rev に融合させるために、プライマー T7 および EP176 (5' - TCGAGCGGCCGCTTAGGCTTCAAGGTTCTAGCTCCTGCACCATTCCTC - 3') (配列番号 61) を使用した。増幅条件は 94 で 2 分、25 回 (94 で 30 秒、52 で 30 秒、72 で 1 分) および 72 で 10 分であった。前記増幅 DNA 断片を KpnI および NotI で切断し、pcDNA 3.1 ベクター内に連結した。前記連結産物を大腸菌 (E. coli) Top10 内にエレクトロポレーションした。PCR および配列分析によりクローンを分析した。また、同時に、前記のとおり両方のタグを GFP に融合させた。前記融合は、それを GYQDYEP EA に融合させるためにプライマー EP180 (5' - GCTTGGTACCTCATGAGCAAGGAGAGAAC - 3') (配列番号 62) およびプライマー EP126 (5' - TTCGAATTCATTACGCT - TTCGGTTCATAATCCTGATATCCTTT

40

50

G T A G A G C T C A T C C A T G C - 3 ' ) ( 配列番号 6 3 ) を使用して、そして G F P を E P E A に融合させるためにプライマー E P 1 8 0 およびプライマー E P 1 8 1 ( 5 ' - T T C G A A T T C A T T A C G C T T C C G G T T C T - G C G G C T C C T T T G T A G A - G C T C A T C C A T G C C - 3 ' ) ( 配列番号 6 4 ) を使用して行った。前記増幅 DNA 断片を K p n I および E c o R I で切断し、p c D N A 3 . 1 ベクター内に連結した。ついで前記連結産物を大腸菌 ( E . c o l i ) T o p 1 0 内にエレクトロポレーションし、クローンを P C R および配列分析により分析した。

#### 【 0 1 2 0 】

##### HeLa細胞のトランスフェクション

HeLa ( ヒト上皮細胞 ) を、標準的な方法を用いて、10% ウシ胎児血清を含有する D M E M 培地内でコンフルエントになるまで維持した。HeLa におけるプラスミド DNA のトランスフェクションのために、細胞をトリプシン / E D T A 処理により集め、計数し、ガラス底マイクロウェルディッシュ ( M a t T e k c o r p o r a t i o n ) 上でプレATINGした。製造業者のマニュアルに従いトランスフェクションを行った。4 × 1 0 <sup>5</sup> 個の細胞を 3 5 m m ディッシュ内に播いた。1 . 2 μ g の DNA、または2つの異なるプラスミドを2回コトランスフェクトする場合には1 μ g の DNA を、4 . 5 μ l の T r a n s f e c t ( Q i a g e n V a l e n c i a , C a l i f o r n i a ) と混合し、前記細胞上に滴下し、一晚インキュベートした。

10

#### 【 0 1 2 1 】

##### 共焦点顕微鏡法

トランスフェクト化 He L a 細胞を、H C X P L A P O × 6 3 ( N A 1 . 2 ) 水中浸漬対物拡大を用いて、A F 6 0 0 0 顕微鏡および A O B S を備えたレーザー走査 S P 5 共焦点顕微鏡 ( L e i c a M i c r o s y s t e m s ) でイメージングした。励起のために 4 8 8 n m 線を使用して、A r レーザーで G F P をモニターし、4 9 2 ~ 5 7 0 n m で発光を検出した。励起のために D P S S - 5 6 1 n m レーザーを使用して、m K u s a b i r a オレンジ蛍光タンパク質 ( m K O ) をイメージングし、5 7 0 ~ 6 7 5 n m で発光を検出した。

20

#### 【 0 1 2 2 】

二価 b i N b S y n 2 のクローニング、大腸菌 ( E . c o l i ) 内での発現および精製  
2 n g の p H e n 6 ( c ) N b S y n 2 ベクター ( E P 3 5 8 ) 上で、k a p a T a q ポリメラーゼで2つの異なる P C R を行った。前記 P C R においては、N b S y n 2 遺伝子を増幅するために、1回、プライマー S M 1 7 ( 5 ' - C G C G G C C C A G C C G G C C A T G G C T - G A T G T G C A G C T G G T G - G A G T C T G G - 3 ' ) ( 配列番号 7 3 ) およびプライマー V H H 1 - リバース - 5 G S - B a m H I ( 5 ' - A G T A G G A T C C G C C A C C T C C T G A G G A G A C C G T G A C C T G G G T - 3 ' ) ( 配列番号 7 4 ) を使用し、1回、プライマー V H H 2 - フォワード - 4 G S - B a m H I ( 5 ' - T C T T G G A T C C G G C G G A G G T A G T C A G G T G C A G C T G C A G G A G T C T G G G G G A G G - 3 ' ) ( 配列番号 7 5 ) およびプライマー V H H 2 - リバース - T V S S - B s t e I I ( 5 ' - T G A G G A G A C G G T G A C C T G G G T - 3 ' ) ( 配列番号 7 6 ) を使用した。増幅条件は 9 4 ° C で 2 分、2 8 回 ( 9 4 ° C で 4 0 秒、5 5 ° C で 4 0 秒、7 2 ° C で 1 分 ) および 7 2 ° C で 1 0 分であった。プライマー S M 1 7 および V H H 1 - リバース - 5 G S - B a m H I を使用することにより得られた P C R 産物を N c o I および B a m H I で切断し、プライマー V H H 2 - フォワード - 4 G S - B a m H I および V H H 2 - リバース - T V S S - B s t e I I を使用することにより得られた第 2 の P C R 産物を B a m H I および E c o 9 1 I で切断した。p M E S 4 ベクターを N c o I および B a m H I および E c o 9 1 I で切断した。全ての消化物を精製し、DNA 濃度を測定した。3 0 n g の両方の P C R 産物への 1 0 0 n g のベクターの、T 4 DNA ポリメラーゼでの 3 点連結を、1 0 μ l 中で室温で 2 時間行った。前記混合物を希釈し、X b a I で切断して、自己連結ベクターを除去した。前記消化物を精製し、W K 6 細胞内に形質転換し、3 7 ° C で一晚増殖させた。プライマー M P 5 7 ( 5 ' 40

30

40

50

- T T A T G C T T C C G G C T C G T A T G - 3 ' ) ( 配列番号 5 6 ) および G I I I ( 5 ' - C C A C A G A C A G C C C T C A T A G - 3 ' ) ( 配列番号 5 7 ) を使用する P C R ならびに B a m H I 消化により、分析を行った。B a m H I 部位を含有する適切な P C R 断片サイズを有するクローンから前記 P C R 断片を配列決定し、適切なものから、プラスミド DNA を調製し ( Q i a g e n )、p M E S 4 b i N b S y n 2 ( C A 4 3 9 4 ) と命名した。C o n r a d ら、( 2 0 0 1 ) に記載されているとおり、発現および精製を行った。I M A C 精製後、前記サンプルを濃縮し、分取用スーパーデックス ( s u p e r d e x ) 7 5 サイズ排除カラム上で移動させて、前記二価 b i N b S y n 2 を混入物または分解産物から分離した。

#### 【 0 1 2 3 】

アルカリホスファターゼにコンジュゲート化された b i N b S y n 2 を使用する固相 E L I S A

P B S 中の 0 . 6 6 m g の H i s タグ化 b i N b S y n 2 を 1 . 7 m g のアルカリホスファターゼにコンジュゲート化し、並行実験において、0 . 3 3 m g の一価 N b S y n 2 を 1 . 7 m g のアルカリホスファターゼにコンジュゲート化した。どちらの場合も、最終体積は 0 . 3 3 m l であり、前記コンジュゲート化は、H a r l o w & L a n e ( 1 9 8 8 ) に記載されているとおりに行った。マキシソルブ ( M a x i s o r b ) 9 6 ウェルプレート ( N u n c ) を、炭酸水素ナトリウムバッファー ( p H 8 . 2 ) 中、1 μ g / m l または 0 . 1 μ g / m l の濃度の 1 0 0 μ l のタンパク質調製物で 4 で一晚コートした。前記ウェル内の残留タンパク質結合部位を P B S 中の 2 % 乳で室温で 2 時間ブロッキングした。前記タグの検出を、N b S y n 2 - A P コンジュゲートおよび b i N b S y n 2 - A P の両方の 1 / 2 5 0 ~ 1 / 4 0 0 0 の希釈度で行った。E L I S A のために、酵素基質 p - ニトロフェニルホスファートの添加の 6 0 分後および一晚のインキュベーションの後、4 0 5 n m における吸光度を測定した。

#### 【 0 1 2 4 】

C s g G 膜タンパク質のクローニング、大腸菌 ( E . c o l i ) 内での発現およびその検出 / 精製

C s g G の C 末端 H i s タグを、G G E P E A をコードする配列で置換するために、以下のプライマー：5 ' - G G C G G C G A A C C G G A A G C G T G A C T G C A G G C A T G C A A G C T T G G C T - 3 ' ( 配列番号 7 7 )、5 ' - T G A C T G C A G G C - A T G C A A G C T T G G C T - 3 ' ( 配列番号 7 8 )、5 ' - C G C T T C C G G T T C G C C G C C A T G G T G A T G G T G A T G G T G G G A T T C C - 3 ' ( 配列番号 7 9 )、5 ' - A T G G T G A T G G T G A T G G T G G G A T T C C 3 ' ( 配列番号 8 0 ) を使用して、p M C 2 プラスミドを S L I M 法 ( C h i u ら、2 0 0 4 ) において使用した。P C R および配列分析は適切な置換を証明した。C s g G タンパク質の発現を確認するために、同じ構築物の、4 つの異なるクローンを拾い、2 5 m l の大腸菌 ( E . c o l i ) 培養を成長させ、誘導した。細胞を集め、S D S - P A G E により分離し、ニトロセルロース膜に移した。前記プロットを 2 % 乳でブロッキングし、2 0 m l の P B S / T w e e n で 5 回洗浄した。N b S y n 2 - A P コンジュゲート ( 一価 ) を P B S 中の 0 , 2 % 乳中で 5 0 0 倍希釈し、1 時間振とうした。前記プロットを更に 5 回洗浄し、N B T / B C I P 基質 ( R o c h e ) で前記製造業者の説明のとおり現像した。発現された E P E A タグ化 C s g G を精製するために、1 1 0 g の凍結細胞ペレットを 3 3 0 m l の 5 0 m M T r i s、1 5 0 m M N a C l、1 m M D T T、1 m M E D T A ( p H 8 . 0 ) に再懸濁させた。ペレット 1 g 当たり 2 0 μ g の D N A ーゼおよびバッファー 1 m l 当たり 0 . 1 m g のリゾチームを加えた。細胞をフレンチプレスにより細胞溶解し、細胞残渣を短い遠心分離段階 ( 7 , 5 0 0 g、4 で 1 2 分間 ) により除去した。ついで前記上清を高速で遠心分離 ( 1 0 0 0 0 0 g、4 で 5 0 分間 ) して、膜を取り出した。0 . 5 % サルコシンを含有する 1 0 0 m l の 2 5 m M T r i s、1 5 0 m M N a C l、1 m M D T T、1 m M E D T A ( p H 8 . 0 ) 中で膜をホモジナイズした。前記懸濁液を高速で遠心分離 ( 1 0 0 0 0 0 g、4 で 5 0 分間 ) し、ペレット ( =

10

20

30

40

50

外膜)を集めた。ホモジナイザーを使用して、前記ペレットを、2 mM LDAOを含有する100 mlの25 mM Tris、150 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM EDTA (pH 8.0)に再懸濁させた。遠心分離後、前記ペレット(膜)を、0.02% DDMを含有する50 mlの25 mM Tris、150 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM EDTA (pH 8.0)にそれを再懸濁させることにより、洗浄した。懸濁液を遠心分離(100000 g、4 で50分間)して、外膜を集めた。これらを100 mlの25 mM Tris、150 mM NaCl、1 mM DTTおよび1% DDMに再懸濁させ、4 で一晩振とうして前記膜を可溶化した。最後の1つの遠心分離段階(100000 g、4 で50分間)を行って、不溶性部分を除去した。実施例4に記載されているとおりにセファロース-ビーズに架橋された1 mlのCNBr-NbSyn2を含有する小さなカラム内で上清を移動させた。前記ビーズを5 mlの25 mM Tris (pH 8)、1 mM DTT、0.02% DDM、1% C8E4、5 mM LDAOで洗浄した。750  $\mu$ Mの小さな合成NH<sub>2</sub>-SEPEA-COOHペプチドを含有する1 mlの25 mM Tris (pH 8)、150 mM NaCl、1 mM DTT、0.02% DDMで結合タンパク質の溶出を2回行った。

【0125】

## 【表 7】

## 参考文献

- Ausubel et al. (1992) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene/Wiley, New York, N.Y.
- Ausubel, F. M., et al. Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (2007). *Current Protocols in Molecular Biology*; John Wiley and Sons, Inc.
- Bermel, W., Bertini, I., Felli, I.C., Lee, Y.M., Luchinat, C. & Pierattelli, R. (2006). Protonless NMR experiments for sequence-specific assignment of backbone nuclei in unfolded proteins. *J Am Chem Soc.* 128, 3918-9. 10
- Brizzard, B.L., R.G. Chubet, and D.L. Vizard (1994). Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *BioTechniques* 16:730-735.
- Brizzard, B. (2008). Epitope Tagging. *BioTechniques* 44:693-695 (25th Anniversary Issue, April 2008)
- Chiu J, March PE, Lee R, Tillett D. Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h *Nucleic Acids Res.* 2004, 32:e174. 20
- Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, p. 156
- Chong, S., F.B. Mersha, D.G. Comb, M.E. Scott, D. Landry, L.M. Vence, F.B. Perler, J. Benner, et al. (1997). Single-column purification of free recombinant proteins using self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene* 192:271-281.
- Conrath, K. E., Lauwereys, M., Galleni, M., Matagne, A., Frere, J. M., Kinne, J., Wyns, L. & Muyldermans, S. (2001). Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**, 2807-12 30
- Conrath, K. E., Wernery U., Muyldermans S. and Nguyen V. K. (2003). Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 87-103.
- Davis et al., (1999) New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.* **65**, 382–388.
- Dedmon, M.M., Christodoulou, J., Wilson, M.R. & Dobson, C.M. (2005a). Heat shock protein 70 inhibits alpha-synuclein fibril formation via preferential binding to prefibrillar species. *J Biol Chem.* 280, 14733 40
- Dedmon, M.M., Lindorff-Larsen, K., Christodoulou, J., Vendruscolo, M. & Dobson, C.M. (2005b). Mapping long-range interactions in alpha-synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc.* 127, 476-7
- Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA, Thi MH, Poortmans F, Hamers R, Muyldermans S, Wyns L. (1996) Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol.* 3, 803-11.

- di Guan, C., P. Li, P.D. Riggs, and H. Inouye (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67:21-30.
- Evan, G.I., G.K. Lewis, G. Ramsay, and J.M. Bishop. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 5:3610-3616.
- Field, J., J. Nikawa, D. Broek, B. MacDonald, L. Rodgers, I.A. Wilson, R.A. Lerner, and M. Wigler. 1988. Purification of RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165. 10
- Ghahroudi M.A., Desmyter A., Wyns L., Hamers R., Muyldermans S. (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* 414, 521-526
- Giliams T, Degenst E & Dobson, C.M. (2010) Nanobodies to Investigate the Mechanisms Underlying the  $\alpha$ -Synuclein Related Parkinson's Disease. First year report
- Gloeckner, C.J., K. Boldt, A. Schumacher, R. Roepman, and M. Ueffing (2007). A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation of native protein complexes. *Proteomics* 7:4228-4234. 20
- Hackbarth, J.S., S.H. Lee, X.W. Meng, B.T. Vroman, S.H. Kaufmann, and L.M. Karnitz (2004). S-peptide epitope tagging for protein purification, expression monitoring, and localization in mammalian cells. *BioTechniques* 37:835-839.
- Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G, Hamers C, Songa E.B., Bendahman N. and Hamers R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446-8. 30
- Harlow, E. & Lane, D. P. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- Hochuli, E., W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, and D. Stuber (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate. *BioTechnology* 6:1321-1325.
- Hopp et al. "A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification", *Nature Biotechnology*, vol. 6, pp. 1204-1210 (1988).
- Jarvik, J.W. and C.A. Telmer (1998). Epitope tagging. *Annu. Rev. Genet.* 32:601-618. 40
- Kapust, R.B & Waugh, D.S. (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused, *Protein Sci.* 1668–1674.
- Kaufmann, M., P. Linder, A. Honegger, K. Blank, M. Tschopp, G. Capitani, A. Pluckthun, and M.G. Grutter (2002). Crystal structure of the anti-His tag antibody 3D5 single-chain fragment complexed to its antigen. *J. Mol. Biol.* 318:135-147.

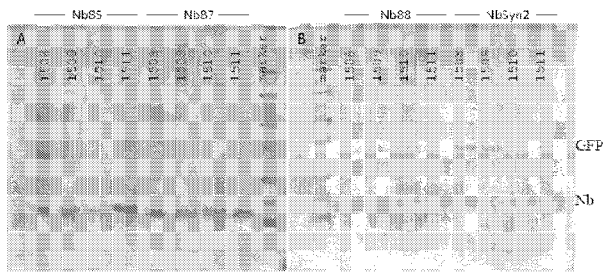
- Kim TD, Paik SR, Yang CH. (2002) Structural and functional implications of C-terminal regions of alpha-synuclein. *Biochemistry* 41(46):13782-90.
- Kimple ME, Sondek J (2004). Overview of affinity tags for protein purification. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2004 Sep;Chapter 9:Unit 9.9.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256, pp. 495-497 (1975).
- Korotkov KV, Pardon E, Steyaert J, Hol WG. Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. *Structure*. 2009, **17**, 255-265. 10
- Lauwereys, M., Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Kinne, J., Hölzer, W., De Genst, E., Wyns, L. & Muyldermans, S. (1998). Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J.* **17**, 3512-3520
- Lefranc MP, Duprat E, Kaas Q, Tranne M, Thiriot A, Lefranc G. (2005) IMGT unique numbering for MHC groove G-DOMAIN and MHC superfamily (MhcSF) G-LIKE-DOMAIN. *Dev Comp Immunol.* 29, 917-38. 20
- Li Y, (2010). Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. *Biotechnol Appl Biochem* 55, 73-83.
- Lichty J.J. et al., *Protein Expression and Purification*, 41, May 2005, Pages 98-105.
- Loris R, Marianovsky I, Lah J, Laeremans T, Engelberg-Kulka H, Glaser G, Muyldermans S, Wyns L. Crystal structure of the intrinsically flexible addiction antidote MazE. *J Biol Chem.* 2003 **278**, 28252-28257.
- Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; DNA cloning: A practical approach, volumes I and II (1985) (Glover, ed.). 30
- Metzger et al. (1988) *Nature* 334:31-36.
- Park SM, Jung HY, Kim TD, Park JH, Yang CH, Kim J. (2002) Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. *J Biol Chem.* 277(32), 28512-20.
- Perkins A., Cochrane A.W., Ruben S.M., Rosen C.A.(1989). Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus rev protein. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **2**, 256-263. 40
- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Séraphin B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods.* 24, 218-29.

- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* 17:1030-1032.
- Rivers, R.C., Kumita, J.R., Tartaglia, G.G., Dedmon, M.M., Pawar, A., Vendruscolo, M. & Dobson, C.M. Christodoulou, J. (2008). Molecular determinants of the aggregation behavior of alpha- and beta-synuclein. *Protein Sci.* 17, 887-98.
- Robinson LS, Ashman EM, Hultgren SJ, Chapman MR. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol Microbiol.* 2006, 59:870-81. 10
- Saerens D, Ghassabeh GH, Muyldermans S (2008). Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 8, 600-8.
- Sambrook et al. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 16.30-16. 55 (1989)
- Schmidt, T.G.M. and A. Skerra (2007). The Streptag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protocols* 2:1528-1535. 20
- Smith, M. C, Furman, T.C., Ingolia, T.D., Pidgeon, C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 7211-7215
- Tucker, J. and R. Grisshammer. 1996. Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 317:891-899.
- Uhlén, M., B. Nilsson, B. Guss, M. Lindberg, S. Gaténbeck, and L. Philipson. 1983. Gene fusion vectors based on the gene for staphylococcal protein A. *Gene* 23:369-378.
- Van Leene, J., *et al.* (2008) Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends in plant science* 13, 517-520
- Van Leene, J., *et al.* (2010) Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol* 6, 397 30
- Vuchelen, A., O'Day, E., De Genst, E., Pardon, E., Wyns, L., Dumoulin, M., Dobson, C.M., Christodoulou J. & Hsu, S.T. (2009). (1)H, (13)C and (15)N assignments of a camelid nanobody directed against human alpha-synuclein. *Biomol NMR Assign.* 3, 231-3.
- Watson, J. D., *et al.*, *Recombinant DNA*, 2nd Ed., New York: W. H. Freeman and Co. (1992)
- Waugh, D. (2005) Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology* 23, 316-320
- Winnacker, E., *From Genes to Clones*, New York: VCH Publishers (1987) 40
- Wu (ed) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y. (1993)
- Y-B. Zhang *et al.* (2004) Protein aggregation during overexpression limited by peptide extensions with large net negative charge, *Protein Expr. Purif.* 36, 207–216.
- Zell, R & Fritz H. J. (1987). DNA mismatch-repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *EMBO J.* 6, 1809–1815.



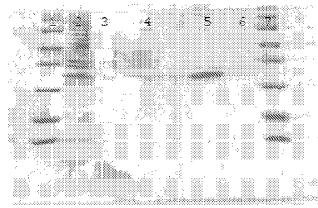
【 図 3 】

Figure 3



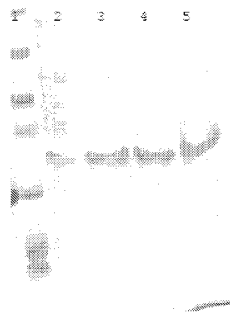
【 図 5 】

Figure 5



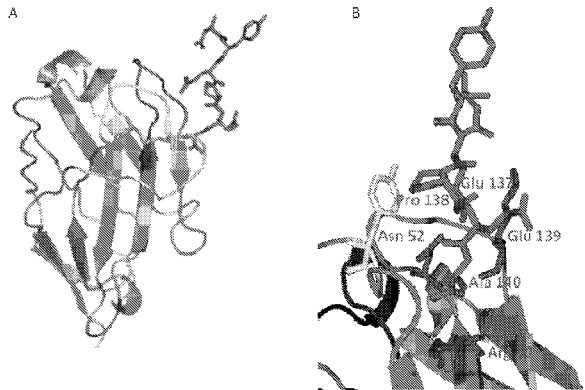
【 図 4 】

Figure 4



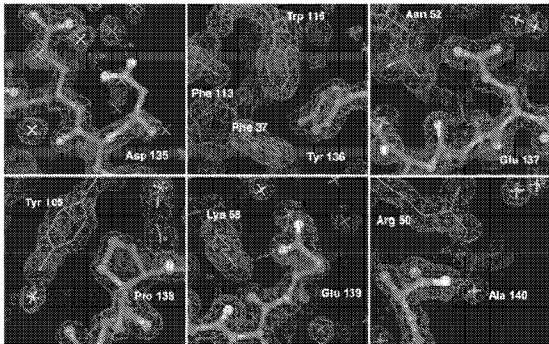
【 図 6 】

Figure 6



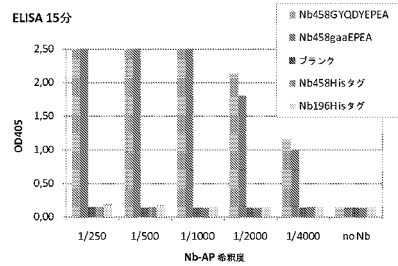
【 図 7 】

Figure 7



【 図 9 】

Figure 9



【 図 8 】

Figure 8



【 図 10 】

Figure 10



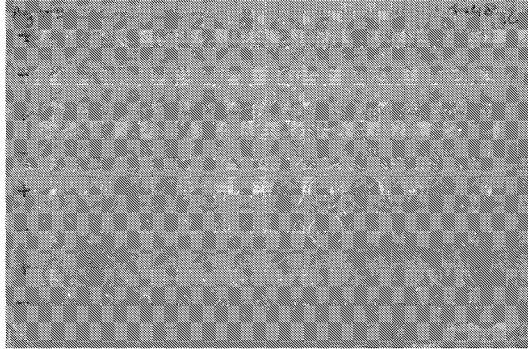
【 図 1 1 】

Figure 11



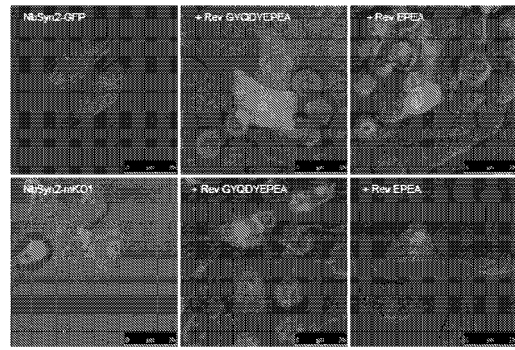
【 図 1 2 】

Figure 12



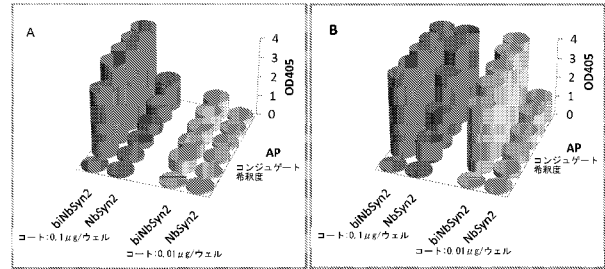
【 図 1 3 】

Figure 13



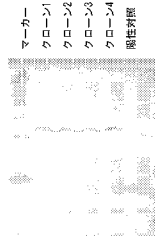
【 図 1 4 】

Figure 14



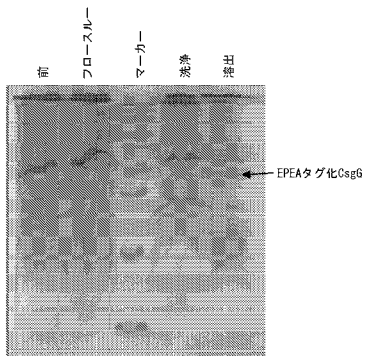
【 図 1 5 】

Figure 15



【 図 1 6 】

Figure 16



【配列表】

2013529903000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/058591
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K14/47 C07K5/10 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95/10532 A1 (PEPTIDE THERAPEUTICS LTD [GB]; LEWIN IAN VICTOR [GB]; STANWORTH DENIS) 20 April 1995 (1995-04-20) abstract example 4; table 5; compound F255 -----	1, 11, 12, 17, 18
X	WO 2004/016230 A2 (UNIV DUKE [US]; PIZZO SALVATORE V [US]; GONZALEZ-GRONOW MARIO [US]) 26 February 2004 (2004-02-26) sequence 52 -----	1, 4-6, 17, 18
X	WO 2006/045037 A2 (ELAN PHARM INC [US]; CHILCOTE TAMIE J [US]; GOLDSTEIN JASON [US]; ANDE) 27 April 2006 (2006-04-27) the whole document ----- -/--	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 August 2011		22/08/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Pilat, Daniel

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/058591
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VUCHELEN ANNELEEN ET AL: "H-1, C-13 and N-15 assignments of a camelid nanobody directed against human alpha-synuclein", BIOMOLECULAR NMR ASSIGNMENTS, vol. 3, no. 2, December 2009 (2009-12), pages 231-233, XP000002656431, ISSN: 1874-2718 the whole document	7-10
X	YONEMOTO ISAAC T ET AL: "A general strategy for the bacterial expression of amyloidogenic peptides using BCL-XL-1/2 fusions", PROTEIN SCIENCE, vol. 18, no. 9, September 2009 (2009-09), pages 1978-1986, XP000002656432, ISSN: 0961-8368 the whole document tables 1,2	2-6,17, 18
X	US 2003/219854 A1 (GUARNA MARIA MARTA [CA] ET AL) 27 November 2003 (2003-11-27) paragraphs [0008] - [0011]; claims; examples 2,4; tables 2,3	2-6,17, 18
X	US 2004/001827 A1 (DENNIS MARK S [US]) 1 January 2004 (2004-01-01)  the whole document	2-7,9, 11,12, 17,18
X,P	DE GENST E J ET AL: "Structure and Properties of a Complex of alpha-Synuclein and a Single-Domain Camelid Antibody", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 402, no. 2, 17 September 2010 (2010-09-17), pages 326-343, XP027292401, ISSN: 0022-2836 [retrieved on 2010-07-08] the whole document	1-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/058591

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9510532	A1	20-04-1995	AU 7820094 A	04-05-1995
			CA 2173856 A1	20-04-1995
			EP 0723553 A1	31-07-1996
			JP 9505563 T	03-06-1997
-----				
WO 2004016230	A2	26-02-2004	AU 2003265559 A1	03-03-2004
			US 2004096444 A1	20-05-2004
-----				
WO 2006045037	A2	27-04-2006	AU 2005295248 A1	27-04-2006
			CA 2584512 A1	27-04-2006
			EP 1809341 A2	25-07-2007
			EP 2272539 A2	12-01-2011
			JP 2008517928 A	29-05-2008
			US 2009035217 A1	05-02-2009
			US 2006259986 A1	16-11-2006
-----				
US 2003219854	A1	27-11-2003	NONE	
-----				
US 2004001827	A1	01-01-2004	US 2005287153 A1	29-12-2005
			US 2007020264 A1	25-01-2007
			US 2010104588 A1	29-04-2010
-----				

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	
C 0 7 K	1/22	(2006.01)	C 0 7 K	1/22		
C 0 7 K	1/32	(2006.01)	C 0 7 K	1/32		
C 0 7 K	1/13	(2006.01)	C 0 7 K	1/13		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		D
G 0 1 N	30/88	(2006.01)	G 0 1 N	30/88	2 0 1 R	
			G 0 1 N	30/88		J

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

(72)発明者 ステヤエルト, ヤン

ベルギー国、ペー - 1 6 5 2 ・ ベールセル、ブーケンボスストラート・ 1 0 8

(72)発明者 ウィンス, ローデ

ベルギー国、ペー - 2 0 0 0 ・ アントウエルペン、オットー・ベニウスストラート・ 1 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA42 BA61 CA07 EA02 EA03 EA04 GA11

HA01 HA04 HA15

4B065 AA26X AA90Y AB01 AC14 BA02 BD14 CA24 CA25 CA44

4H045 AA11 AA20 AA30 AA40 BA13 BA41 DA75 DA86 EA34 EA50

FA74 GA05 GA26

专利名称(译)	基于亲和力的应用程序的表位标签		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013529903A</a>	公开(公告)日	2013-07-25
申请号	JP2013511675	申请日	2011-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	色调过基础的电子色相超过Zetsu牵引器 穿插海胆贝尔DF要鱒Yutsu细胞		
申请(专利权)人(译)	FUE怡裴FUE-Zetsuto - 百汇 穿插-Uniberushiteito-Buriyutsuseru		
[标]发明人	パルドンエルス ステヤエルトヤン ウインスローデ		
发明人	パルドン,エルス ステヤエルト,ヤン ウインス,ローデ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K5/113 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K1/22 C07K1/32 C07K1/13 G01N33/53 G01N30/88		
CPC分类号	C07K5/1021 C07K1/22 C07K2319/40		
FI分类号	C12N15/00.A C07K5/113.ZNA C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K1/22 C07K1/32 C07K1/13 G01N33/53.D G01N30/88.201.R G01N30/88.J		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA42 4B024/BA61 4B024/CA07 4B024/EA02 4B024 /EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA04 4B024/HA15 4B065/AA26X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/BA13 4H045/BA41 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA34 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA05 4H045/GA26		
优先权	2010008682 2010-05-25 GB		
其他公开文献	JP6053672B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及可用于基于亲和力的应用的表位标签。本发明还包括融合蛋白，制备融合蛋白的方法，编码这些融合蛋白的核酸分子和含有这些核酸分子的重组宿主细胞。本发明还涉及特异性识别所述表位标签的纳米抗体和其他亲和配体及其在基于亲和力的应用中的用途。