

(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2008-504802
(P2008-504802A)

(43) 公表日 平成20年2月21日(2008.2.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 14/415 (2006.01)	C07K 14/415	4B063
C07K 1/22 (2006.01)	C07K 1/22	4C085
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z	4G066
A61K 39/00 (2006.01)	A61K 39/00 D	4H045

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-541372 (P2006-541372)
 (86) (22) 出願日 平成16年11月18日 (2004.11.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年7月24日 (2006.7.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/038700
 (87) 国際公開番号 W02005/051985
 (87) 国際公開日 平成17年6月9日 (2005.6.9)
 (31) 優先権主張番号 60/523,881
 (32) 優先日 平成15年11月20日 (2003.11.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

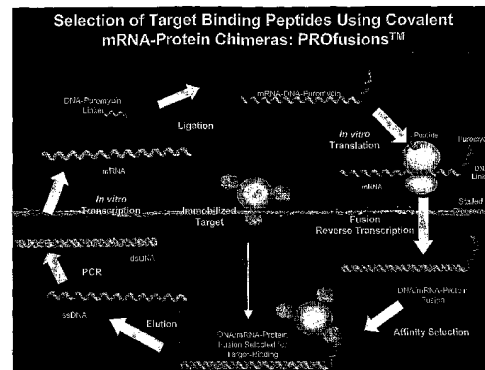
(71) 出願人 506121342
 サノフィ パストゥール インコーポレイ
 テッド
 SANOFI PASTEUR, INC
 .
 アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 1
 8370 スウィフトウォーター ディス
 カヴァリー ドライヴ
 (74) 代理人 100073184
 弁理士 柳田 征史
 (74) 代理人 100090468
 弁理士 佐久間 剛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 百日咳毒素を精製する方法およびそれに有用なペプチド

(57) 【要約】

本発明は百日咳毒素 (PT) を精製するための試薬および方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記のペプチドから選択され、百日咳毒素を結合させる能力を有することを特徴とするペプチド：

R S S H C R H R N C H T I T R G N M R I E T P N N I R K D A (p p 2 6 - 5) ；

S T M N T N R M D I Q R L M T N H V K R D S S P G S I D A (p p 2 6 - 6) ；

R S N V I P L N E V W Y D T G W D R P H R S R L S I D D D A (p p 2 6 - 9) ；

R S W R D T R K L H M R H Y F P L A I D S Y W D H T L R D A (p p 2 6 - 1 5) ；

S G C V K K D E L C A R W D L V C C E P L E C I Y T S E L Y A T C G (G - 9) ；

10

S G C V K K D E L C E L A V D E C C E P L E C F Q M G H G F K R C G (G - 1 0)

S G C V K K D E L C S Q S V P M C C E P L E C K W F N E N Y G I C G S (G - 1 5) ； および、

S G C V K K D E L C E L A I D E C C E P L E C T K G D L G F R K C G (G - 1 9)

【請求項 2】

R S N V I P L N E V W Y D T G W D R P H R S R L S I D D D A (p p 2 6 - 9) または S G C V K K D E L C S Q S V P M C C E P L E C K W F N E N Y G I C G S (G - 1 5) であることを特徴とする請求項 1 記載のペプチド。

20

【請求項 3】

DNA - ペプチド融合物を作製する方法であって：

(a) ペプチド受容体に結合した核酸逆転写プライマーを、ペプチドをコードする RNA に共有結合させ；

(b) 前記 RNA を翻訳して、逆転写プライマーに共有結合しているペプチドを生じさせ；さらに、

(c) 前記 RNA を逆転写して、DNA - ペプチド融合物を生じさせる；工程を含み、前記ペプチドが百日咳毒素に対する結合親和性を有することを特徴とする方法。

【請求項 4】

30

DNA - ペプチド融合物を作製する方法であって：

(a) RNA - ペプチド融合物を作製し；

(b) 核酸逆転写プライマーを前記融合物にハイブリダイズさせ；

(c) 前記プライマーを前記融合物に共有結合させ；さらに

(d) 前記 RNA - ペプチド融合物の RNA を逆転写して DNA - ペプチド融合物を生じさせる；工程を含み、

前記ペプチドが百日咳毒素に対する結合親和性を有することを特徴とする方法。

【請求項 5】

DNA - ペプチド融合物を作製する方法であって：

(a) ペプチド受容体に共有結合した RNA 分子を提供し；

40

(b) 核酸逆転写プライマーを前記 RNA 分子に共有結合させ；

(c) 前記 RNA 分子を翻訳してペプチドを生じさせ；さらに

(d) 前記 RNA 分子を逆転写して DNA - ペプチド融合物を生じさせる；工程を組み合わせ含み、

前記ペプチドが百日咳毒素に対する結合親和性を有することを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 3 から 5 いずれか 1 項記載の方法を用いて調製された DNA - ペプチド融合物。

【請求項 7】

請求項 3 から 5 いずれか 1 項記載の方法を用いて同定された百日咳毒素に対する親和性を有するペプチド。

50

【請求項 8】

ビオチン化されていることを特徴とする請求項 1、2 または 7 記載のペプチド。

【請求項 9】

百日咳毒素を含む生物溶液に、固相担体に結合した請求項 1、2 または 7 記載の少なくとも 1 つのペプチドを接触させて百日咳毒素 - ペプチド複合体を形成し、さらにその複合体を前記生物溶液中の他の成分から単離する工程を含むことを特徴とする百日咳毒素を精製する方法。

【請求項 10】

百日咳毒素を前記複合体から遊離させさらに単離することを特徴とする請求項 9 記載の方法。

10

【請求項 11】

前記複合体の周囲環境の pH を変化させることによって、百日咳毒素を該複合体から遊離させることを特徴とする請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

酸性 pH を有する溶液に前記複合体をさらすことを特徴とする請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

塩基性 pH を有する溶液に前記複合体をさらすことを特徴とする請求項 11 記載の方法

【請求項 14】

複合体の周囲環境のイオン強度を変化させることによって、百日咳毒素を該複合体から遊離させることを特徴とする請求項 10 記載の方法。

20

【請求項 15】

高濃度の 1 以上のイオン塩を有する溶液に前記複合体をさらすことによって、イオン強度を変化させることを特徴とする請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

前記イオン塩が、塩化ナトリウムまたは塩化マグネシウムの少なくとも 1 つであることを特徴とする請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

前記イオン塩が塩化マグネシウムであることを特徴とする請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

前記固相担体がビーズであることを特徴とする請求項 9 ~ 17 いずれか 1 項記載の方法

30

【請求項 19】

前記固相担体がセファロースを含むことを特徴とする請求項 9 ~ 17 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 20】

前記固相担体がストレプトアビジンセファロースから成ることを特徴とする請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

前記ペプチドがビオチン化されており、該ペプチド上のビオチン部分とストレプトアビジンセファロース上のストレプトアビジン部分との相互作用を介してペプチドが固相担体に結合していることを特徴とする請求項 20 記載の方法。

40

【請求項 22】

百日咳毒素に対する結合親和性を有するペプチドの DNA - ペプチド融合物を単離する方法であって：

(a) ペプチド受容体に結合した核酸逆転写プライマーを、ペプチドをコードする RNA に共有結合させ；

(b) RNA を翻訳して、逆転写プライマーに共有結合したペプチドを生じさせ；さらに

(c) RNA を逆転写して、DNA - ペプチド融合物を生じさせ；

50

(d) DNA - ペプチド融合物に、固相担体に結合した百日咳毒素を接触させて、DNA - ペプチド融合物 - 百日咳毒素複合体を形成し；

(e) 前記複合体を、百日咳毒素と複合体形成しなかったDNA - ペプチド融合物から単離し；さらに

(f) DNA - ペプチド融合物をDNA - ペプチド融合物 - 百日咳毒素複合体から単離する；工程を組み合わせて含むことを特徴とする方法。

【請求項 23】

百日咳毒素に対する結合親和性を有するペプチドを同定する方法であって、請求項 22 記載の方法を実施し、さらに、DNA - ペプチド融合物のペプチド部分のアミノ酸配列を特定する工程を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 24】

百日咳毒素に対する結合親和性を有するペプチドをコードするDNA配列を同定する方法であって、請求項 22 記載の方法を実施し、さらに、DNA - ペプチド融合物のDNA部分のヌクレオチド配列を特定する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 25】

請求項 10 記載の方法によって単離された百日咳毒素を含む免疫組成物。

【請求項 26】

百日咳毒素を結合させる能力を有し、さらに図 3 ~ 14 のいずれかに示されるペプチドのアミノ酸配列を有することを特徴とするペプチド。

20

【請求項 27】

前記百日咳毒素に対する結合親和性を有するペプチドのアミノ酸配列が、グマリンまたはPP26に由来するアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項 3 ~ 5 または 9 ~ 24 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 28】

前記百日咳毒素に対する結合親和性を有するペプチドをコードするヌクレオチド配列が、グマリンまたはPP26に由来するヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項 3 ~ 5 または 9 ~ 24 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 29】

百日咳毒素を結合させる能力を有し、さらにアミノ酸配列LGHGLGYAYを含むことを特徴とするペプチド。

30

【請求項 30】

アミノ酸配列ELAVD、ELAID、またはARWDLVをさらに含むことを特徴とする請求項 29 のペプチド。

【請求項 31】

百日咳毒素を結合させる能力を有し、さらにアミノ酸配列TTASKSまたはKWTNEHFGTの少なくとも 1 つを含むことを特徴とするペプチド。

【請求項 32】

アミノ酸配列TTASKSおよびKWTNEHFGTを含むことを特徴とする請求項 31 記載のペプチド。

【請求項 33】

百日咳毒素を結合させる能力を有し、さらに下記の群から選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とするペプチド：

40

NV I P L N E V W Y D T G W D R P H R S R L S I D D ;
 V G T T I R I A Q D T E H Y R N V Y H K L S Q Y S R ;
 W T S M Q G E T L W R T D R L A T T K T S M S H P P ;
 L S A L R R T E R T W N T I H Q G H H L E W Y P P A ;
 L S R L A R T E R T W D R I H Q G H H L E W H P P A ;
 T M N T N R M D I Q R L M T N H V K R D S S P G S I ;
 L S A L M R T E R T W N T I H Q G H H L E W Y P P A ;
 C L A T R N G F V M N T D R G T Y V K R P T V L Q ; および

50

C L A T R N G F V Q M N T D R G T Y V K R P T V L Q。

【請求項 34】

百日咳毒素を結合させる能力を有し、さらにアミノ酸配列 X X A X R X X X X X X N T X X X X X X X X X T、または X X A X R X X X X X X N T X X X X X X X X X Y を含み、ここで X は任意のアミノ酸であることを特徴とするペプチド。

【請求項 35】

百日咳毒素を結合する能力を有し、さらにアミノ酸配列 V X X X X X X X X D T X X X X R X X X X X L S を有し、ここで X は任意のアミノ酸であることを特徴とするペプチド。

10

【請求項 36】

少なくとも 1 つのアミノ酸が保存的に置換されていることを特徴とする請求項 29 ~ 35 いずれか 1 項記載のペプチド。

【請求項 37】

ビオチン化されていることを特徴とする請求項 29 ~ 36 いずれか 1 項記載のペプチド。

【請求項 38】

百日咳毒素を含む生物溶液に、固相担体に結合した請求項 29 ~ 37 に記載の少なくとも 1 つのペプチドを接触させて百日咳毒素 - ペプチド複合体を形成し、さらにその複合体を前記生物溶液中の他の成分から単離する工程を含むことを特徴とする、百日咳毒素を精製する方法。

20

【請求項 39】

前記百日咳毒素を複合体から遊離させさらに単離することを特徴とする請求項 38 記載の方法。

【請求項 40】

前記複合体の周囲環境の pH を変化させることによって、百日咳毒素を該複合体から遊離させることを特徴とする請求項 39 記載の方法。

【請求項 41】

酸性 pH を有する溶液に前記複合体をさらすことを特徴とする請求項 40 記載の方法。

【請求項 42】

塩基性 pH を有する溶液に前記複合体をさらすことを特徴とする請求項 40 記載の方法。

30

【請求項 43】

複合体の周囲環境のイオン強度を変化させることによって、百日咳毒素を該複合体から遊離させることを特徴とする請求項 39 記載の方法。

【請求項 44】

高濃度の 1 以上のイオン塩を有する溶液に前記複合体をさらすことによって、イオン強度を変化させることを特徴とする請求項 43 記載の方法。

【請求項 45】

前記イオン塩が、塩化ナトリウムまたは塩化マグネシウムの少なくとも 1 つであることを特徴とする請求項 44 記載の方法。

40

【請求項 46】

前記イオン塩が塩化マグネシウムであることを特徴とする請求項 45 記載の方法。

【請求項 47】

前記固相担体がビーズであることを特徴とする請求項 38 ~ 46 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 48】

前記固相担体がセファロースを含むことを特徴とする請求項 38 ~ 46 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 49】

50

前記固相担体がストレプトアビジンセファロースから成ることを特徴とする請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 0】

前記ペプチドがビオチン化されており、該ペプチド上のビオチン部分とストレプトアビジンセファロース上のストレプトアビジン部分との相互作用を介してペプチドが固相担体に結合していることを特徴とする請求項 4 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、百日咳毒素 (PT) を精製するための試薬および方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) によって産生される百日咳毒素 (PT) は、百日咳に対する全てのワクチンの主成分である。PT は典型的には破傷風トキソイドおよびジフテリアトキソイドと併用される。PT の工業生産は、典型的には百日咳菌を規定の培地で培養することによって達成される。PT は次いで周知の技術 (すなわち、特許文献 1 ; 特許文献 2 ; および非特許文献 1 ; 非特許文献 2) を用いて上清から単離および精製される。公知の方法の多くはそれぞれ、マトリクス結合ウシフェチュイン (BF) またはアシアロフェチュインの使用を必要とし、その起源および純度が重要である。ウシ由来試薬の使用は、ウシ海綿状脳症 (BSE) といったウシ関連疾患に関する幾分の懸念に結びついている。

20

【0003】

従って、当業者は、BF に依存しなで PT を精製する方法を求めている。1 つのそのような方法は、Bogdanら (非特許文献 2) によって記載されている。PT を結合させることによってウシフェチュインのグリコシド部分を模倣する能力を有するペプチドが、ファージディスプレイシステムを用いて同定された。共通配列 XGSFSGX (X は任意のアミノ酸である) を有する 3 つのペプチド (3G5 : NGSFSGF ; 3G8 : NGSFSGC ; および、3G2 : DGSFSGF) が、PT - 結合能を有するとして同定された。3G2 は、部分精製された PT 調製物から PT を精製するためのアフィニティカラムにおも利用された。

30

【特許文献 1】米国特許第 6,399,076 号明細書

【特許文献 2】米国特許第 5,877,298 号明細書

【非特許文献 1】Sekura, et al. *J. Biol. Chem.* 258: 14647-14651, 1983

【非特許文献 2】Bogdan, et al. *Appl. Env. Micro.* 69 (10): 6272-6279, Oct. 2003

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

ウシ製品の不在下で PT を精製するためのペプチドを設計および使用するための他の方法が当業者に望まれている。いずれの形態でもフェチュインを使用しない、PT のアフィニティ精製のための試薬および方法を提供する。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は百日咳毒素 (PT) を精製するための方法に関する。一実施形態では、ペプチド受容体に結合した核酸逆転写プライマーを RNA に共有結合させ、その RNA を翻訳してタンパク質産物がプライマーに共有結合するようにペプチド産物を生じさせ、RNA を逆転写して DNA - タンパク質融合物を生じさせ、さらにその融合産物を試験して PT 結合ペプチドを含有する融合産物を同定することによって、DNA - タンパク質融合物を作製する方法を提供する。その後、ペプチドの配列を配列決定によって同定する。他の実施形態では、PT - 結合能を有し、かつ複雑な生物液から PT を精製するのに有用であるペプチドを提供する。また、複雑な生物液から PT を精製するのに使用するための固相担体

50

および/またはクロマトグラフィー媒体に結合したペプチド、およびそのような精製を実施する方法も提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

本発明は、百日咳毒素 (PT) を精製するための新規な方法のための試薬および方法論を提供する。上記の通り、1つのそのような方法は Bogdan, et al. によって示されている。その方法では、ファージディスプレイが PT 結合ペプチドを特定するために利用されている。本発明を実施する上で、PT は、自然に発現された PT、無毒化 PT (遺伝子組換えによりまたはその他)、天然またはその他の PT 変異体、組換え PT、PT 断片、または他の種類の PT を含む (例えば、米国特許第 6,399,076 号; 第 6,168,928 号; 第 6,018,022 号; 第 5,977,304 号; 第 5,965,385 号; 第 5,856,122 号; 第 5,877,298 号; 第 5,433,945 号; 第 5,358,868 号; 第 5,332,583 号; 第 5,244,657 号; 第 5,221,618 号; 第 5,085,862 号; 第 4,997,915 号明細書を参照)。ほとんどの場合において、PT の精製後に化学的無毒化が実施される。任意の形態の PT が、本明細書に記載の試薬がその特定の形態の PT を結合させる能力を有する限り、本発明の実施における使用に適している。本明細書中では、全ての引用文献、特許、および出願特許は参照により本開示に含まれる。

10

【0007】

本発明はまた、PT-結合ペプチドを同定するための組換え技術の使用に関する。本発明は、当業界で既に公知である方法を越える効果をもたらす。加えて、PT の精製に有用である新規なペプチドを提供する。一実施形態では、ペプチド受容体に結合した核酸逆転写プライマーを RNA に結合させ、その RNA を翻訳してタンパク質産物がプライマーに共有結合しているようにペプチド産物を生じさせ、RNA を逆転写して DNA-タンパク質融合物を生じさせ、さらに融合産物を試験して PT 結合ペプチドを含む産物を同定することによって、DNA-タンパク質融合物を作製する方法を提供する。その後、ペプチドの配列を配列決定によって同定する。一部の実施形態では、RNase H といった RNA 分解化合物を用いた処理によって、RNA 部分を複合体から除去することができる。光架橋試薬およびペプチド受容体もまた本発明の実施に有用である。この系および関係する試薬は他では例えば、米国特許第 6,416,950 号 (Lohse, et al.); 第 6,429,300 号 (Kurz, et al.); 第 6,436,665 号 (Kuimelis, et al.); 第 6,602,685 号 (Lohse, et al.); および、第 6,623,926 号明細書 (Lohse, et al) に記載されている。

20

30

本発明の実施において、核酸、ペプチド、融合、リガンド、アフィニティ複合体などの試薬は、拡散しないように固相担体に結合または付着させてもよい。拡散しないように結合または接着させるために、試薬が液体の存在下で試薬の高濃度の領域から試薬の低濃度の領域へ移動しないように試薬を固相担体と化学的または物理的に結合させる。固相担体は任意のカラム (すなわち、非充填または充填クロマトグラフィー媒体、カラム材料)、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、固相粒子 (すなわち、アガロースまたはセファロース)、マイクロチップ (すなわち、シリコン、シリコンガラス、または金チップ)、膜 (すなわち、リポソームまたは小胞の膜)、あるいは、直接的または間接的に (例えば、抗体、プロテイン A、プロテイン G、ストレプトアビジン、ビオチンといった他の結合パートナー媒介物を介して) 試薬を結合または付着させることができる他の媒体である。

40

【0008】

好ましい実施形態では、試薬は PT を結合させる能力を有する物質または化合物である。より好ましくは、試薬は PT を可逆的に結合させる能力を有する物質または化合物である。さらにより好ましくは、試薬は、PT 以外の成分を含む液体中で、PT を少なくとも結合させ、さらにより好ましくは可逆的に結合させる能力を有するペプチドである。PT を可逆的に結合させる試薬は、一定の条件下で PT を結合 (吸着) させ、さらに別の条件下で

50

P Tを遊離（脱離）させるものである。例えば、その試薬は、中性pH条件に曝露されたときにP Tを結合させ、かつ酸性または塩基性pHの条件への曝露の後P Tを遊離させることができる。従って、試薬がP Tを結合させる能力（すなわち、平衡解離定数または K_d ）は、試薬をP Tと接触させる条件を変化させることによって操作することができる。本分野で公知な他の条件でも特に、温度、イオン強度（すなわち、例えば塩化ナトリウムまたは塩化マグネシウムといったイオン塩の濃度）、溶媒濃度、競合試薬/遊離リガンド/アナログの存在または不在、イオン化特性などの、他の条件を変化させてもよい。

【0009】

一部の実施形態では、アフィニティマトリクス（すなわち、固相担体に結合したP T結合ペプチド）を利用して目的成分（すなわち、P T）を生物学的液体またはその他の液体中に見出される複雑な混合物から分離する。一部の場合には、（例えばSDS-PAGEによって測定して）P Tが液体中の主成分を構成しない細菌溶解物またはその他の組成物といった複雑な生物学的液体からP Tを精製することが好ましい場合がある。別の場合には、P Tは、液体中の成分の大半がP Tで表されるようにP Tについて部分精製された組成物（P T約50%以上から成る組成物）から単離してもよい。例えば、SDS-PAGEで測定してP Tが組成物中の総タンパク質の約50%以上から成る組成物は、殆どの状況下で、部分精製されていると考えられる。

10

【0010】

P Tを精製するために、P Tを含む組成物を、固相担体に結合しているP T結合試薬、好ましくは可逆的に結合させるP T結合試薬と、P TとP T結合試薬とが互いに結合して複合体を形成するように十分な時間接触させる。次に非P T成分を洗浄除去する。その後、P T-P T結合試薬の結合の K_d が増大するように1つ以上の条件（すなわち、pH）を変化させ、P Tが複合体から遊離される。次に、遊離されたP Tを回収し、さらなる使用のために調製する。そのような分離はアフィニティ精製と称され、そのように精製された産物はアフィニティ精製されていると称される。

20

【0011】

アフィニティ精製法よりも選択性が低いと当業者に一般的に考えられているクロマトグラフィー法もまた、本発明の実施に用いることができる。本分野で公知であるように、そのような方法は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、および疎水性相互作用クロマトグラフィーを含む。これらの方法のうちの任意のもの（アフィニティ精製を含む）は、例えば低圧クロマトグラフィー（LPC）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、またはFast Protein Liquid Chromatography（FPLC）に設置した適当な固相担体を用いて実施できる。そのような方法を実施するための適当な固相担体および装置は本分野で広く利用可能である。本発明の実施において、アフィニティクロマトグラフィーおよびより一般化された方法の両方を必要に応じて組み合わせ、開始材料（すなわち、細菌溶解物といった複雑な生物学的液体）を部分精製したり、材料を精製したり、あるいはアフィニティ精製または他の方法で精製された材料（すなわち、アフィニティ精製P T）をさらに精製することができる。

30

【0012】

P Tを結合させるペプチドが同定されており、本明細書で開示されている。ある種のペプチドは高い親和性でP Tを結合させることが分かっている。そのような好ましいP T結合ペプチドとして、下記のペプチドが挙げられる：

40

R S S H C R H R N C H T I T R G N M R I E T P N N I R K D A （ p p 2 6 - 5 ） ；

S T M N T N R M D I Q R L M T N H V K R D S S P G S I D A （ p p 2 6 - 6 ） ；

R S N V I P L N E V W Y D T G W D R P H R S R L S I D D D A （ p p 2 6 - 9 ） ；

R S W R D T R K L H M R H Y F P L A I D S Y W D H T L R D A （ p p 2 6 - 1 5 ）

；

S G C V K K D E L C A R W D L V C C E P L E C I Y T S E L Y A T C G （ G - 9 ）

；

S G C V K K D E L C E L A V D E C C E P L E C F Q M G H G F K R C G （ G - 1 0

50

)
 S G C V K K D E L C S Q S V P M C C E P L E C K W F N E N Y G I C G S (G - 1
 5) ; および、
 S G C V K K D E L C E L A I D E C C E P L E C T K G D L G F R K C G (G - 1 9
) 。

これらのうち、特に好ましいペプチドは下記を含む：

R S N V I P L N E V W Y D T G W D R P H R S R L S I D D D A (p p 2 6 - 9) ;
 および、
 S G C V K K D E L C S Q S V P M C C E P L E C K W F N E N Y G I C G S (G - 1
 5) 。

10

例えば、ペプチドの少なくとも1つの特徴または活性(すなわち、活性、抗原性)を有する、例えば、断片、変異体オルソログ、ホモログ、および誘導体といった関連ペプチドもさらに考慮される。断片は、ペプチドの配列(すなわち、核酸またはポリペプチド)の、アミノ末端(リーダー配列を有するかまたは有しない)および/またはカルボキシ末端での切断を含む。断片はまた、変異体、オルソログ、ホモログ、および親配列と比較して1つ以上のアミノ酸付加または置換または内部欠失を有する他の変異体を含む。好ましい実施形態では、切断および/または欠失は、アミノ酸約11個、アミノ酸2個、アミノ酸5個、アミノ酸10個、アミノ酸20個、アミノ酸30個、アミノ酸40個、アミノ酸50個、またはそれ以上を含む。変異体とは、親配列と比較して1つ以上の配列の置換、欠失および/または付加を有する配列である。変異体は、天然に存在するかまたは人工的に構築できる。そのような変異体は、対応する核酸分子から調製できる。好ましい実施形態では、変異体は、1から3、または1から5、または1から10、または1から15、または1から20、または1から25、または1から30、または1から40、または1から50、または50を超えるアミノ酸の置換、挿入、付加および/または欠失を有する。

20

【0013】

置換は、保存的、または非保存的、またはその任意の組み合わせであってよい。ポリペプチドの配列への保存的アミノ酸修飾(およびそれをコードするヌクレオチドへの対応する修飾)は、親ポリペプチドと同様の機能的および化学的特徴を有するポリペプチドを生じ得る。例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基のサイズ、極性、電荷、疎水性、または親水性に対して影響がほとんどまたはまったく無い、および特に免疫原性の低下を結果として生じないような、天然アミノ酸残基の非天然残基での置換を含む。適当な保存的アミノ酸置換を表Iに示す：

30

表I

元の残基	典型的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

30

P Tのような成分は、もともと共存しているタンパク質、脂質、糖質、または他の材料（すなわち、細菌溶解物）の少なくとも約50%から分離されている場合に、精製されていると称される。成分は、例えば、SDS-PAGEで測定して組成物の総タンパク質含量の少なくとも約95~100%、90~95%、80~90%、70~80%、60~70%または50~60%から分離されていることが好ましい。一部の実施形態では、精製成分とは、その成分が単独でまたは他の物質と組み合わせて投与された宿主において免疫反応を誘導するのに有用なものである。免疫反応は、例えば、P Tまたは百日咳菌の少なくとも1つのエピトープに結合する抗体の産生および/またはP Tを発現する細胞に対する細胞性免疫反応の誘導を含むであろう。免疫反応は、例えば、抗体産生の増加、抗原に対するより高い親和性を有する抗体の産生、または細胞性反応の増大（すなわち、T細胞の増加）を生じることによる、現在の免疫反応の増進である。免疫反応の他の指標は本分野で公知であり、免疫反応が生じているかどうかを判定するのに適している。

【0014】

本明細書に記載の方法を用いて単離されたP Tは、医薬組成物として調製することができる。好ましい医薬組成物は、例えば、懸濁剤、シロップ剤、またはエリキシル剤といった液体調製物中にP Tを含む。好ましい注射用調製物は、例えば、滅菌懸濁剤または乳剤といった、非経口、皮下、皮内、筋肉内または静脈内投与に適したペプチドを含む。例えば、P Tは、滅菌水、生理食塩水、グルコースなどといった、適当なキャリアー、希釈剤、または添加物と混合した組成物として調製することができる。組成物はまた、例えば、等張水性生理食塩水緩衝液中での再構成のための凍結乾燥形で提供してもよい。そのような組成物はまた、例えば、米国特許第5,877,298号および第6,399,076号明細書（Vose, et al.）および国際出願番号第PCT/CA96/00278号に記載のようなワクチンとして調製および利用することができる。本明細書に記載のように調製されたP Tはまた、本分野で公知である他のものの中でも特に、コリネバクテリウム（すなわち、ジフテリア）、クロストリジウム（すなわち、破傷風）、ポリオウイルス（すなわち、IPV、OPV）、肝炎ウイルス、ナイセリア（すなわち、髄膜炎菌）、ストレプトコッカス、ヘモフィルス、または他の百日咳抗原（すなわち、繊維状赤血球

40

50

凝集素、パータクチン、および凝集原)といった疾患の原因となる生物に由来する他の抗原と組み合わせてもよい。

【0015】

本発明およびその多数の利点は、例示として示される下記の実施例からより詳細に理解できるであろう。

【実施例】

【0016】

材料および方法

A. 百日咳毒素 (PT)

PTはMW109kDのヘテロオリゴマータンパク質複合体である(6個のサブユニットS1、S2、S3、S4×2、S5から成る)。硫酸アンモニウム沈澱物として調製された高純度(>99.99%)調製物を使用した。天然の六量体複合体を認識するPT特異的リガンド(アシアロフェチュイン)もまた使用した。アシアロフェチュインは可溶性型およびセファロス固定化型で入手可能である。

10

【0017】

B. グマリンライブラリ選択

グルマリンは、ガガイモ科のつる性植物 *Gymnea sylvestre* に由来する35残基のポリペプチドである。グルマリンは、ラットにおいて甘味物質に対する神経反応を選択的に阻害する能力のため、甘味伝達の研究における薬理学的手段として利用されている。グルマリンはヒトにおいて明らかな作用を持たない。グルマリンの味覚抑制は、甘味受容体に直接結合するかまたは甘味伝達系の下流標的と相互作用することによって、そのペプチドが原因となり得ることが示唆されている(1)。

20

【0018】

グルマリンは、通常40残基未満の長さの構造的に関連するタンパク質の群である「ノッチン(knottins)」ファミリーに属する。ノッチンはタンパク質、糖質および脂質を含む幅広い分子標的に結合するが、しかし小さい三重鎖逆平行シートおよびジスルフィド結合骨格を含む共通の足場(scaffold)を共有する(2,3)。

下記の通り、15個のランダム化されたアミノ酸位置を有する特殊なグルマリンライブラリを設計した:

野生型グルマリン: q q C V K K D E L C I P Y Y L D C C E P L E C K K V N W W D H K C i g

30

グルマリンコア: C V K K D E L C X X X X X X C C E P L E C X X X X X X X X X C

グルマリンコア配列中で、Xは任意のアミノ酸を表す。このライブラリは、タンパク質標的に対する高親和性結合物質(binder)をもたらすことが確認された。グルマリンライブラリは、少なくとも下記の理由のために、PT毒素に対する選択のための最良の選択肢となる一連の利点を併せ持つ: 制限された自由度(flexibility): 標的トポロジーへの適合における高エントロピーコストを埋め合わせる; リニアライブラリよりも理論的に少数のアミノ酸で高い親和性; プロテアーゼに対する耐性; および下流用途における酸化還元溶出条件に対する感受性。グルマリンライブラリは図1に示す工程を用いて構築された。

40

【0019】

1. 開始オリゴヌクレオチドのPCR

3種類のゲル精製オリゴを用いて、2つのランダム化ループを有するグルマリンライブラリを構築した。1nmolのグルマリンテンプレート(約 6×10^{14} 配列) 5'-A G T G G C T C A A G C T C A G G A T C A G G C T G C G T C A A G A A A G A C G A G C T C T G C N N S N N S N N S N N S N N S T G C T G T G A G C C C C T C G A G T G C N N S N N S N N S N N S N N S N N S N N S T G C G G C A G C G G C A G T T C T G G G T C T A G C - 3'を、1 μ Mの5'-Hisタグプライマー5'-T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A C A A T T A C T A T T T A C A A T T A C A A T G C A C C A T C A C C A T C A C C A T A G T G G C T C A A G C T C A

50

G G A T C A - 3'および1 μMの3' - プライマー5' - T T T T A A A T A G C G G A T G C T A C T A G G C T A G A C C C A G A A C T G C C G C T - 3' を使用して、Taq - ポリメラーゼを用いて、6回のPCR(94 で1分間; 65 で1分間; 72 で1分間)で増幅し、さらに2%アガロースゲルで分析し、ゲルは代表的ライブラリが構築されていたことを示した。

【0020】

2. In vitro 転写

dsDNAを、Promega社のRiboMax Express In vitro 転写キットを用いてRNAに転写した。37 で45分間インキュベート後、DNase Iを添加し、さらに37 でインキュベートをさらに15分間続けた。この混合物にフェノール/クロロホルム抽出を施した。過剰のNTPは、NAP-5ゲルろ過(Pharmacia)によって除去した。RNAを6% - TBU - ゲルで分析し、dsDNAが効率的に転写されたことが示唆された。

10

【0021】

3. RNAとピューロマイシン - オリゴヌクレオチドリンカーとの化学カップリング
精製RNAを、1.5倍過剰のピューロマイシン - オリゴヌクレオチドリンカーPEG2A18:5' - ソラレン - UAG CGG AUG C A₁₈ (PEG-9)₂ CC ピューロマイシン (斜体で示されるヌクレオチドは2' - O - メチル - 誘導体を表す) にアニーリングさせる(85 で1分間、0.3 / 秒のペースで25 まで冷却)。共有結合カップリングは、室温で(RT)15分間、UV光(365 nm)照射によって実施した。反応産物を6% - TBUゲルで分析し、結合反応が効率的に進んだことが示唆された。

20

4. In vitro 翻訳

ライゲーションしたRNAを、Promega社のウサギ網状赤血球溶解物を用いて15 μCi³⁵S - メチオニン(1000 Ci / mmol)の存在下で翻訳した。30 で30分間インキュベートした後、KClおよびMgCl₂をそれぞれ終濃度530 mMおよび150 mMになるように添加し、さらに試料を4~20% Tris / グリシン - SDS - PAGEで分析した。ゲルは翻訳反応が成功したことを示唆した。

【0022】

5. オリゴdT精製

分子(mRNA - タンパク質融合物)を、オリゴdT磁気ビーズ(Miltenyi)を含むインキュベート緩衝液(100 mM Tris - HCl pH 8.0、10 mM EDTA、1 mM NaClおよび0.25% Triton X - 100)と共に4 で5分間インキュベートすることによって単離した。PROfusion(登録商標)分子は、MiniMACS - カラム(Miltenyi)を介したろ過、インキュベート緩衝液での洗浄および水での溶出によって単離した。試料を4~20% Tris / グリシン - SDS - PAGEで分析し、反応が成功したことが示唆された。

30

【0023】

6. 逆転写

対応するcDNA鎖は、SuperScript II逆転写酵素(GibcoBRL)を用いた逆転写によって取扱説明書の条件下で、5倍過剰の3' - プライマーを用いて作製した。試料を4~20% Tris / グリシン - SDS - PAGEで分析し、反応が成功したことが示唆された。

40

【0024】

7. His タグ精製

逆転写されたPROfusion(登録商標)分子を、Ni - NTA - アガロース(50 μl / 10 pmol PROfusion)(QIAGEN)を含むHBS緩衝液(20 mM HEPES pH 7.0、150 mM NaCl、0.025% Triton X - 100、100 μg / ml 断片化サケ精子DNA、1 mg / ml BSA)と混合し、さらに室温で60分間緩やかに振とうさせながらインキュベートした。次に、Ni - NTAを

50

A18 : 5' - ソラレン - UAG CGG AUG C A₁₈ (PEG-9)₂ CC ピューロマイシン (斜体で示されるヌクレオチドは 2' - O - メチル - 誘導体を表す) とアニーリングさせた (85 °C で 1 分間、0.3 °C / 秒のペースで 25 °C まで冷却)。共有カップリングは、室温 (RT) で 15 分間 UV 光 (365 nm) 照射によって実施した。反応を 6% - TBU - ゲルでの反応産物の分析によって確認した。

【0030】

4. In vitro 翻訳

ライゲーションした RNA を、Promega 社のウサギ網状赤血球溶解物を用いて、15 μCi ³⁵S - メチオニン (1000 Ci / mmol) の存在下で翻訳した。30 °C で 30 分間インキュベートした後、KCl および MgCl₂ をそれぞれ終濃度 530 mM および 150 mM になるように添加し、さらに翻訳を 4 ~ 20% Tris / グリシン - SDS - PAGE での分析によって確認した。

10

【0031】

5. オリゴ dT 精製

分子 (mRNA - タンパク質融合物) を、オリゴ dT 磁気ビーズ (Miltenyi) を含むインキュベート緩衝液 (100 mM Tris - HCl pH 8.0、10 mM EDTA、1 mM NaCl および 0.25% Triton X - 100) と共に 4 °C で 5 分間インキュベートすることによって単離した。PROfusion (登録商標) 分子は、MiniMACS - カラム (Miltenyi) を介したろ過、インキュベート緩衝液での洗浄および水での溶出によって単離した。反応を確認するために、試料を 4 ~ 20% Tris / グリシン - SDS - PAGE で分析した。

20

【0032】

6. 逆転写

対応する cDNA 鎖は、取扱説明書の条件下で、5 倍過剰の 3' - プライマーを用いて、SuperScript II 逆転写酵素 (GibcoBRL) を用いた逆転写によって作製した。転写を確認するために、試料を 4 ~ 20% Tris / グリシン - SDS - PAGE で分析した。

【0033】

7. His タグ精製

逆転写された PROfusion (登録商標) 分子を、Ni - NTA - アガロース (50 μl / 10 pmol PROfusion) (QIAGEN) を含む HBS 緩衝液 (20 mM HEPES pH 7.0、150 mM NaCl、0.025% Triton X - 100、100 μg / ml 断片化サケ精子 DNA、1 mg / ml BSA) と混合し、さらに室温で 60 分間緩やかに振とうさせながらインキュベートした。次に、Ni - NTA をろ過し、HBS / 5 mM イミダゾールで洗浄し、さらに PROfusion を HBS / 150 mM イミダゾールで溶出した。反応を確認するために、試料を 4 ~ 20% Tris / グリシン - SDS - PAGE で分析した。20 pmol (約 1 × 10¹³ 種の配列) の分子を、各選択についてインプット (投入) として用いる。

30

【0034】

C. 標的調製

PROfusion (登録商標) 技術では、最大 10¹³ 種の異なる PROfusion 分子 (mRNA - タンパク質融合物) から成る高度に多様な物質ライブラリが、高アフィニティ結合に関して所望の標的 (タンパク質、糖質または脂質) に対して選択される。この工程で、標的は通常、固相に固定化される。これらの固相は好ましくは、選択処理中の迅速および効率的な取り扱いを可能にしさらに低バックグラウンドをもたらす磁気ビーズである。

40

【0035】

1. ヌクレアーゼ活性に関して標的を試験

標的 (5 μg の PRP および 0.5 μg の PT) を、0.12 pmol の放射性標識化 PROfusion ライブラリ分子とそれぞれ 4 °C および室温 (RT) で接触させ、次いで

50

1時間および16時間インキュベートした。インキュベート後の分子の完全性は、4~20% Tris / グリシン SDS - PAGE および続くオートラジオグラフィーによって確認した。PROfusion分子の分解は検出されず、従って標的はヌクレアーゼを含まないことが実証された。

【0036】

2. プロテアーゼ活性に関して標的を試験

標的(5μgのPRPおよび0.5μgのPT)を、1μgの精製GST-タンパク質とそれぞれ4および室温で接触させ、次いで1時間および16時間インキュベートした。インキュベート後のGST-タンパク質の完全性は、4~20% Tris / グリシン SDS - PAGE および続くクマシーブリリアントブルー染色によって分析した。GST-タンパク質分子の分解は検出されず、従って標的はプロテアーゼを含まないことが実証された。

10

【0037】

D. PTの固定化

1. PTの再構成

Aventis Pasteur社から入手した沈澱物500μl(2.26mg/ml)を21.400xgで室温にて45分間遠心分離した。上清を廃棄し;沈澱を1100μlのCTW緩衝液(0.286g NaHCO₃、0.170g Na₂CO₃、50μl Tween-80、50mlのMilliQ H₂Oに加える)に溶解させた。このPT調製物の品質を検査するため、一連の希釈物(250ng、500ng、1μg、2.5μg、5μgおよび15μg)を、MES緩衝液で泳動する4~12% BisTris SDS - PAGEで分離した。少なくとも4本のバンドが明瞭に分離でき、サブユニットS1(28kD)、S2(23kD)、S3(22kD)およびS4(11.7kD)に対応した。PT-複合体中の最小のタンパク質5(9.3kD)は見られなかった。おそらく、このバンドはこのゲルシステム中で、わずかだけ大きいS4サブユニットと共に移動する。

20

【0038】

2. カップリング戦略

磁気粒子へのタンパク質の固定化のためのいくつかの方法が確立された。原理的に二つの主な戦略が用いられる: 標的タンパク質の一級アミン基およびスルフヒドリル基をエポキシ活性化磁気ビーズ(Dynal)に共有結合でつなぎ、安定なアミド結合またはチオエーテル結合を形成する。この反応は、反応を促進するため硫酸アンモニウムの存在下で実施され、さらに通常、標的タンパク質の非常に効率的なカップリングを結果として生じる。いずれにしろ、ある種のタンパク質はこれらの条件下で構造変化を受けるように思われ、結合しているが天然でないおよび/または不活性な立体構造を結果として生じる; さらに、標的タンパク質の一級アミノ基およびスルフヒドリル基を、NHSエステル活性化ピオチン誘導体(Pierce)に共有結合によってつなぎ、その後、ピオチン化されたタンパク質をストレプトアビジン磁気ビーズ(Dynal)に固定化させる。

30

【0039】

通常、所定の標的に反応条件が適している場合は、エポキシビーズへの標的タンパク質のカップリングが好ましく、それはビーズ上に標的だけが提示されることをこの方法が確実にするからである。ピオチン/ストレプトアビジンカップリングの場合は、ビーズはストレプトアビジンも提示し、選択中に抗ストレプトアビジン結合物質の濃縮をもたらし得る。従って、Phyllosは、PROfusionライブラリからストレプトアビジン結合物質を予め除いて、所定の標的について高品質の結果を得るための特化した方法を確認している。しかし全体として、共有結合カップリングは通常、標的的特異的結合物質のより迅速な濃縮を結果として生じる。具体的にPTの場合には、硫酸アンモニウムインキュベートはPT-タンパク質の機能に影響しないことが知られているため、共有結合カップリング戦略で開始するのが非常に合理的である。

40

【0040】

50

3. エポキシビーズ (Dyna1) へのカップリング条件の最適化

PTのためのカップリング条件をいくつかの独立した実験で最適化した(様々な硫酸アンモニウム濃度(0.5~2.0M)および様々なビーズ/標的比、ならびに時間および温度依存性(2分間~16時間; 8~RT)を用いて)。下記の反応条件で最良の結果が観察された: PT 100 μg、ビーズ 3.3×10^8 個および硫酸アンモニウム終濃度 1Mから成る終容量 300 μlを室温で2分間から60分間2mlエッペンドルフチューブ中でインキュベートした。インキュベート後、チューブを磁石中に4分間置いてビーズを落とし、さらに上清を続くゲル分析のために保存した。ビーズを1mlのHEPES緩衝液(20mM HEPES pH7.0、150mM NaCl、0.025% Triton X100)で1回洗浄し、さらにビーズの一部(ビーズの5%)を4~12% BisTris SDS-PAGEで分析して、結合したタンパク質の量を測定した。PTのエポキシビーズへのカップリングは、ほんの2分間の反応後でさえ非常に効率的に生じることが認められた。

10

【0041】

4. エポキシビーズへのPTの半予備カップリング

2.6mgの乾燥エポキシ活性化ビーズ(M-270、Dyna1)(~ビーズ 1.7×10^8 個)を1mlリン酸緩衝液(19mM NaH_2PO_4 、81mM Na_2HPO_4 、pH7.4)に再懸濁させ、さらに10分間平衡化させた。新しいリン酸緩衝液を用いて平衡化を2回繰り返した。続いてビーズを、480 pmolの再構成PT(1 μg/μlを含むCTW緩衝液)を含む1M硫酸アンモニウム(終容量157 μl)とのカップリング反応に直接用いた。室温で15分間連続攪拌しながらインキュベートした後、ビーズを300 μlのHBS緩衝液で洗浄し、次いでHEPES緩衝液での3回の洗浄工程を実施し、さらに最後に240 μlのHEPES緩衝液に再懸濁させ、小分けして4で保存した。カップリング反応の効率は、全ての洗浄画分、カップリング反応の上清、および洗浄したビーズからSDS装填緩衝液(loading buffer)によって除去可能なPTの画分の、SDS-ポリアクリルアミドゲル分析によって確認した。

20

【0042】

5. エポキシ-ビーズ固定化PTのアシアロフェチュインへの結合についての分析

40 μlのPT誘導体化ビーズを、320 pmolのアシアロフェチュインを含むHEPES緩衝液(20mM HEPES pH7.0、150mM NaCl、0.025% Triton-X100)と室温で1時間インキュベートし(反応終容量200 μl)、200 μlのHEPES緩衝液で2~7回洗浄し、さらに最後に30 μlのHEPES緩衝液に再懸濁させた。ビーズの50%をSDS-PAGEで分析して反応を確認した。

30

【0043】

4で1週間保存後のこれらのPT誘導体化ビーズの試験は、アシアロフェチュイン結合能の低下を示し、材料が長期保存によってその性能を失うことを示した。従って、PT誘導体化ビーズは、選択の各回について新しく調製および品質管理しなければならない。この手順は非常に時間がかかるため、PTのビオチン化を含む代替的な固定化戦略を調べた。

【0044】

6. PTの半予備ビオチン化

ビオチン化反応は、0.4mg(~3.65 nmol)の再構成PT(1 μg/μlを含むCTW緩衝液)を、25 μgのEZ-リンカー-スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン(PIERCE)と、終容量740 μl(50mM HEPES、150mM NaCl、0.2% Triton-X100)中でインキュベートすることによって実施した。2時間氷上で連続攪拌しながらインキュベート後、ビオチン化反応を74 μlの1M Tris/HCl pH7.0の添加によって停止した。続いて、タンパク質をHEPES緩衝液(20mM HEPES pH7.0、150mM NaCl、0.025% Triton X100)に対して4でSlide-a-lyzerカセット(PIERCE、3500 MWCO 0.5~3ml)を用いて透析し、過剰のビオチン化試薬を除去した。ビ

40

50

オチン化PTを透析カセットから取り出し、さらに小分けにして - 20 で保存した。

【0045】

7. BIAcore装置を用いたビオチン化PTの品質管理

ビオチン化反応の品質は、ビオチン化PTとBIAcoreストレプトアビジンチップとの相互作用を、BIAcore装置(BIAcore 2000)を用いて分析することによって管理した。チップに固定化されたビオチン化PTへのアシアロフェチュインの結合を検出することもまた可能であった(固定化PTへの結合シグナル~400RU; 対照細胞への非特異的結合~100RU)。

【0046】

F. ストレプトアビジン磁気ビーズおよびアシアロフェチュインへの結合についてのビオチン化PTの分析

1. ストレプトアビジン磁気ビーズへのビオチン化PTの結合

20 μ lのストレプトアビジン磁気ビーズ(Dynal)を、20pmolのビオチン化PTを含む1xHBS緩衝液(20mM HEPES pH7.0、150mM NaCl、1mg/ml BSA、100 μ g/ml サケ精子DNA、0.025% Triton-X100)と室温で1時間インキュベートし、HEPES緩衝液(20mM HEPES pH7.0、150mM NaCl、0.025% Triton X100)で3回洗浄し、さらに16 μ lのSDS-ゲル装填緩衝液に再懸濁させた。8 μ lをSDS-PAGEによって分析して結合を確認した。同等の条件下での陰性対照実験で、遊離PT(非ビオチン化)はストレプトアビジン磁気ビーズと相互作用しなかった。

【0047】

2. ビーズ固定化されたビオチン化PTへのアシアロフェチュインの結合

20 μ lのストレプトアビジン磁気ビーズ(Dynal)を、20pmolのビオチン化PTを含む1xHBS緩衝液と室温で1時間インキュベートし、HEPES緩衝液(20mM HEPES pH7.0、150mM NaCl、0.025% Triton X100)で4回洗浄した。続いて、ビオチン化PTを担持するビーズを、40pmolのアシアロフェチュインを含むHEPES緩衝液と室温で1時間インキュベートした。HEPES緩衝液で4回洗浄後、ビーズを16 μ lのSDS-ゲル装填緩衝液に再懸濁させた。8 μ lをSDS-PAGEで分析して、結合を確認した。ビオチン化PTおよびアシアロフェチュインの、ストレプトアビジン磁気ビーズに対する連続インキュベートでなく同時インキュベートは、同じくアシアロフェチュインのビオチン化PTへの結合を結果として生じた。同等の対照実験で、アシアロフェチュインはストレプトアビジン磁気ビーズと非特異的に相互作用しないと判定された。1週間-20にて保存されていたビオチン化PTを用いた同様の品質対照は、ストレプトアビジンおよび/またはアシアロフェチュイン結合能に有意な低下を示さなかった。従って、その後の選択ではビオチン化PTが標準の標的として用いられた。

【0048】

実施例2

PTに対して選択的なペプチドの単離

グルマリンPROfusionライブラリおよび磁気ビーズに固定化されたPTを、精密に調節された厳しい条件下で接触させた。これらの条件は、PTに対する親和性の上昇を示すPROfusionライブラリの変異体が標的に結合するのを可能にする。望ましくない非特異的結合変異体を希釈する多数の洗浄後、結合したPROfusion-分子をビーズから溶出し、さらに図2に示すように、新しいPROfusion形成サイクルを施す。厳しい条件を細かく適合させると共に、選択および再増幅を連続して実施することによって、所定の標的への高度に特異的な結合分子の集団が濃縮される(10)。続いて、この集団のDNA部分をE.coliプラスミドベクターにクローニングし、配列決定によって詳細に分析できる個々の変異体を単離する。

【0049】

固定化PTに対する連続した6回の選択を、グルマリンPROfusion(登録商標

）ライブラリを用いて実施した。上記の概念に従って、ストレプトアビジンビーズに固定化されたビオチン化 P T を、これらの選択に用いた（表 1）。4 回目の選択で、グルマリンプルのストレプトアビジンビーズへの低バックグラウンド結合が観察され、ビーズおよび/またはストレプトアビジン結合グルマリン変異体の濃縮開始が示唆された。従って、続く 5 回目の選択では、ビオチン/ストレプトアビジン固定化 P T をそれぞれ標的およびエポキシビーズカップリング P T として用いて、2 つの個別の選択を実施した。両方の選択で、標的結合の明らかなバックグラウンド修正された濃縮が観察された（表 1）。この傾向は、ビオチン/ストレプトアビジン固定化 P T を用いた 6 回目の選択で確認され、P T 結合変異体の蓄積を明らかに示した（表 1）。

【表 1】

標的：百日咳毒素		ライブラリ：ガマルリン									
		R1	R2	R3	R4	Epoxy-PT R5a	biot PT R5b	biot PT R6a from R5a	R6b from R6b		
1.	PCR										
1.1.	分析 RT-PCR										
	x 回の PCR 後の特異的シグナル	18		24	24	24		24	15		
	y 回の PCR 後の対照シグナル	21		27	24	27		27	24		
1.2.	予備 PCR										
	2 回の PCR を実施	36		30	30	32		30	30		
2.	in vitro 転写										
	スケール	2x 500 µl		1x 500 µl	1x 500 µl	1x 500 µl		1x 500 µl	1x 500 µl		
	実施した DNase 消化	無		有	有	有		有	有		
3.	NAP5 ガル通										
	投入/E1/E2/E3	500/300/400/200		500/300/400/200	500/300/400/200	500/300/400/200		500/300/400/200	500/300/400/200		
	プールした E1 中の精製 RNA 収量 (OD260)	20 nmol		13 nmol	12.7 nmol	11.6 nmol		16.3 nmol	17.6 nmol		
	残存物質										
4.	リンカーカップリング										
	リンカーの種類	PEG2A18		PEG2	PEG2	PEG2		PEG2	PEG2		
	投入量	6 nmol		5 nmol	5 nmol	5 nmol		5 nmol	5 nmol		
	カップリング効率	70%		70%	70%	70%		70%	70%		
	リンカーカップリング RNA の収量	4.2 nmol		3.5 nmol	3.5 nmol	3.5 nmol		3.5 nmol	3.5 nmol		
5.	in vitro 翻訳および PROfusion 形成										
	投入量	4.2 nmol		3.5 nmol	3 nmol	3 nmol		3 nmol	3 nmol		
	RNA / 溶解物 200 µl	260 pmol		280 pmol	250 pmol	250 pmol		250 pmol	250 pmol		
	-20℃での塩インキュベート	1 晩		1 晩	1 晩	1 晩		1 晩	1 晩		
6.	オリゴ (dT) 精製										
	x 個のカラムで精製	7		4	4	4		4	4		
	効率	4.5%		4.4%	2.7%	7.2%		3.3%	2.7%		
	収量	187 pmol		156 pmol	81.1 pmol	217 pmol		97.6 pmol	81.1 pmol		
7.	逆転写										
	条件	1 mM DTT		1 mM DTT	1 mM DTT	1 mM DTT		1 mM DTT	1 mM DTT		
	投入量	168 pmol (3/4)		72.6 pmol (1/2)	50.4 pmol (3/4)	50 pmol		40 pmol	50 pmol		
8.	His タグ精製										
	投入量	168 pmol		90.75 pmol (72 pmol + 18 pmol ohne RT)	61.9 pmol (3/4 RT + 1/4 Odt)	43 pmol RT + 27.6 pmol RNA		35 pmol RT + 15 pmol	43 pmol RT + 19 pmol		
	効率	34%		78%	43%	41%		36%	43%		
	収量	55 pmol		59.2 pmol	26.4 pmol	27.6 pmol		18 pmol	26.4 pmol		
	容量	450 µl		450 µl	450 µl	450 µl		450 µl	450 µl		
9.	選択										
	選択容量	1 ml		1 ml	1 ml	1 ml		1 ml	1 ml		
	投入量	18 pmol		5 pmol	5 pmol	5 pmol		5 pmol	5 pmol		
	イミダゾール-β の最終濃度	45 mM		6 mM	6 mM	11.4 mM		18.8 mM	21.5 mM		
	前処理	3x 100 µl HBS ブロックした ストレプト アビジンビーズ	3x 100 µl HBS ブロックした ストレプト アビジンビーズ	3x 100 µl HBS ブロックした エボキシビーズ	3x 100 µl HBS ブロックした アビジンビーズ	2x 100 µl HBS ブロックした エボキシビーズ	3x 100 µl HBS ブロックした アビジンビーズ	3x 100 µl HBS ブロックした アビジンビーズ	3x 100 µl HBS ブロックした アビジンビーズ		
	最初の前処理結合	0%	バックグラウンド	バックグラウンド	バックグラウンド	23/24 dpm	80/50/32 dpm	37/33/34 dpm	72/30/37 dpm		
	ピオチンのパルスで飽和されたビーズ	有	有	無	有	無	有	有	有		
	PT の有効濃度	100 nM (50 nM)	100 nM (50 nM)	50 nM	100 nM (50 nM)	50 nM	100 nM (50 nM)	100 nM (50 nM)	100 nM (50 nM)		
	条件	100 nM (50 nM)	100 nM (50 nM)	90 min at RT	60 min at RT	90 min at RT	90 min at RT	90 min at RT	90 min at RT		
	特異的結合 %				0.2%	1.0%	5.2%	9.4%	11.6%		

A. 選択されたグルマリン結合物質プールのクローニング

選択回数 R 4、R 5 および R 6 の結果として得られたグルマリン DNA - プールを、pCR (登録商標) 2.1 - TOPO (登録商標) ベクターに、TOPO TA Cloning (登録商標) キット (Invitrogen) を用いてクローニングした。グルマリン DNA を、pCR (登録商標) 2.1 - TOPO ベクターに異なる濃度でライゲーションした。6 μ l の反応に、0.5 μ l、2 μ l および 4 μ l のグルマリンプール DNA をそれぞれ用いた。ライゲーションは取扱説明書に従って実施した。

【0051】

これらのライゲーション溶液 2 μ l で、20 μ l の E. coli Top10 F' コンピテント細胞 (Invitrogen) を形質転換し、さらに、50 μ g/ml カナマイシンおよび 0.5% グルコースを含む LB 平板へ播種した。これらの形質転換させた試料のそれぞれから、150 個の単一コロニーを、T7 依存性タンパク質発現を抑制する 50 μ g/ml カナマイシンおよび 0.5% グルコースを含むマスタープレート、およびブルーホワイトスクリーニングのための X-Gal および IPTG を含む第 2 のプレートに採取した。形質転換のそれぞれについて、ブルーホワイト試験からのホワイトコロニーに対応する抑制マスタープレート由来のコロニー 96 個を用いて 96 ウェル LB 寒天平板および 500 μ l 液体培養 (50 μ g/ml カナマイシンおよび 0.5% グルコースを含む LB) に播種した。96 ウェル寒天平板は委託配列決定に送付した。液体培養は 500 μ l の 40% グリセロールと混合し、液体窒素中において凍結させさらに -80 で保存した。

【0052】

個々の各クローンから、プラスミド DNA を調製し、さらに M13 - プライマー 5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3' を用いた自動化 DNA 配列決定手順に供した。図 3 ~ 8 に示す通り、単一のグルマリン配列変異体が 4 回目の選択で顕著に濃縮され始め、さらに 6 回目の選択後には全配列の 90% 超に相当する。これは、この変異体がおそらく最高の親和性で PT を結合させることを明らかに示す。この最も重要な配列変異体に加えて、共通配列モチーフを部分的に共有するさまざまな他のグルマリン配列が濃縮されている。この知見は、これらの他の配列が PT への親和性を同様に示すことを示唆する。

【0053】

B. 固定化 PT に対する PP26 アフィニティ選択

グルマリン選択と平行して、固定化 PT に対する連続 6 回の選択を、PP26 Profusion (登録商標) ライブラリについて実施した。ストレプトアビジンビーズに固定化されたビオチン化 PT を、これらの選択に用いた (表 2)。4 回目の選択で、グルマリンプールのストレプトアビジンビーズへの低バックグラウンド結合が観察され、ビーズおよび/またはストレプトアビジン結合 PP26 変異体の濃縮開始が示唆された。従って、続く 5 回目の選択では、2 つの個別の選択を、一方でビオチン/ストレプトアビジン固定化 PT を標的としておよび他方でエポキシビーズカップリング PT としてそれぞれ用いて実施した。両方の選択で、標的結合の明らかなバックグラウンド修正された濃縮が観察された (表 2)。この傾向は、ビオチン/ストレプトアビジン固定化 PT を用いた 6 回目の選択で確認され、従って、PT 結合変異体の蓄積を明らかに示した。

選択の回 R 4、R 5 および R 6 の結果として得られた P P 2 6 D N A - プールを、p C R (登録商標) 2 . 1 - T O P O (登録商標) ベクターに、T O P O T A C l o n i n g (登録商標) キット (I n v i t r o g e n) を用いてクローニングした。P P 2 6 D N A を p C R (登録商標) 2 . 1 - T O P O ベクターに異なる濃度でライゲーションした。6 μ l の反応に、0 . 5 μ l、2 μ l および 4 μ l のグルマリンプール D N A をそれぞれ用いた。ライゲーションは取扱説明書に従って実施した。これらのライゲーション溶液の 2 μ l で、2 0 μ l の E . c o l i T o p 1 0 F ' コンピテント細胞 (I n v i t r o g e n) を形質転換し、さらに、5 0 μ g / m l カナマイシンおよび 0 . 5 % グルコースを含む L B 平板へ播種した。これらの形質転換のそれぞれから、1 5 0 個の単一コロニーを、T 7 依存性タンパク質発現を抑制する 5 0 μ g / m l カナマイシンおよび 0 . 5 % グルコースを含むマスタープレート、およびブルーホワイトスクリーニングのための X - G a l および I P T G を含む第 2 のプレートに採取した。形質転換のそれぞれについて、ブルーホワイト試験からのホワイトコロニーに対応する抑制マスタープレート由来のコロニー 9 6 個を用いて 9 6 ウェル L B 寒天平板および 5 0 0 μ l 液体培養 (5 0 μ g / m l カナマイシンおよび 0 . 5 % グルコースを含む L B) に播種した。9 6 ウェル寒天平板は委託配列決定に送付した。液体培養は 5 0 0 μ l の 4 0 % グリセロールと混合し、液体窒素中で凍結し、さらに - 8 0 で保存した。

10

【 0 0 5 5 】

D . 各結合物質変異体の配列決定

個々の各クローンから、プラスミド D N A を調製し、さらに M 1 3 - プライマー 5 ' - T G T A A A A C G A C G G C C A G T - 3 ' を用いる自動化 D N A 配列決定手順に供した。図 9 ~ 1 4 に示す通り、2 つの主な変異体が各回の選択中に濃縮された。両方の変異体は保存された配列モチーフを共有する。この知見は、保存されたアミノ酸の側鎖が P T 表面領域の一部と直接の相互作用を確立すると推定されることを示す。さらに、少なくとも 4 種類の別の変異体がより低い程度で濃縮されている。これらの変異体は上述の保存された配列モチーフを含まないため、これらの変異体は P T の異なる表面領域に結合する可能性がある結論できる。

20

【 0 0 5 6 】

E . 選択された P T 結合グルマリン - および P P 2 6 - 変異体の確認

選択は P R O f u s i o n (登録商標) 分子 - m R N A - ペプチド融合物を用いて実施したため、選択後分析の第一段階に、標的に結合する能力について遊離ペプチドを検査する必要がある。次の段階で、核酸部分でなくペプチドを介した標的結合を確認した変異体を、A P 処理液の存在下で特異性試験に供する。この方法によって、A P 処理に最も適した変異体が特定される。

30

【 0 0 5 7 】

1 . P T への結合能に関する遊離ペプチドの試験

グルマリン - および P P 2 6 - 結合物質変異体の単一の濃縮された遊離ペプチドの定性的結合検定のために、T N T T 7 カップリング R e t i c o l o c y t e L y s a t S y s t e m (P r o m e g a 社、品番 L 5 5 4 0) を下記の通り用いた。単一の結合物質候補の D N A を、コロニー P C R によって、結合物質クローンのグリセロールストックから増幅させた。P C R 中の突然変異を回避するために、ブルーフリーディングポリメラーゼ (P w o) を使用した。P C R 産物を 2 % アガロースゲルで分析した。P C R 産物 5 . 0 μ l を、T N T 系を用いたカップリング i n v i t r o 転写 / 翻訳反応のテンプレートとして、終容量 5 3 μ l で取扱説明書に従って用いた。発現された結合物質候補を続いて N i - N T A キレートクロマトグラフィー (Q I A G E N) によって精製した。放射性標識化した H i s タグ精製結合物質候補 (各ペプチドの ~ 4 0 ~ 7 0 f m o l) を、ストレプトアビジン - 磁気ビーズ上に固定化したビオチン化 P T と室温で 1 時間インキュベートした。ビーズを H B S 緩衝液で 3 回洗浄し、次いで水に再懸濁させ、さらに液体シンチレーションカウンターで分析した。対照実験では各候補をストレプトアビジンビーズのみ (P T 無し) とインキュベートした。P P 2 6 およびグルマリンの最良の結合物質候補を

40

50

特定し(表3および4、下記)および以降の特異性試験に供した。

【0058】

2. 処理液の存在下でのグルマリンおよびPP26変異体の特異性試験

Aventis Pasteur 処理液の存在下での遊離グルマリンおよびPP26ペプチドの半定量的結合および特異性検定のために、ペプチドをまずPROfusionとして作製し、精製して均一にし、さらに次いでS1-ヌクレアーゼ消化によって遊離ペプチドとした。選択された結合物質変異体(10種類のグルマリンクローンおよび7種類のPP26クローン)のDNAの十分量の増幅のため、TNT発現に由来するPCR産物をテンプレートとして用いてPCRを実施した。10サイクルのPCR(94 30秒間; 60 30秒間; 72 30秒間)の後、試料を2%アガロースゲルで分析した。dsDNA(PCR産物)を、Promega社のRiboMax Express In vitro転写キットを用いてRNAへ転写した。45分間37にてインキュベート後、DNase Iを添加し、さらに37にてインキュベートをさらに15分間続けた。この混合物をフェノール/クロロホルム抽出に供した。過剰のNTPはNAP-5ゲルろ過(Pharmacia)によって除去した。RNAを6%-TBU-ゲルで分析した。

10

【0059】

精製RNAを1.5倍過剰のピューロマイシン-オリゴヌクレオチドリンカーPEG2A18:5'-ソラレン-UAGCGG AUGCA₁₈(PEG-9)₂CCピューロマイシン(斜体で示されるヌクレオチドは2'-O-メチル-誘導体を表す)とアニリングさせた(85 1分間、25 へ0.3 /秒の傾きで冷却)。共有結合カップリングは15分間室温にて(RT)UV光(365nm)照射によって実施した。反応産物を6%-TBUゲルで分析した。ライゲーションしたRNAを、Promega社のウサギ網状赤血球溶解物を用いて15μCi³⁵S-メチオニン(1000Ci/mmol)の存在下で翻訳した。30分間30にてインキュベート後、KClおよびMgCl₂をそれぞれ終濃度530mMおよび150mMとなるよう加え、さらに試料を4~20%Tris/グリシン-SDS-PAGEで分析した。mRNA-タンパク質融合物(PROfusion(登録商標))を、オリゴdT磁気ビーズ(Miltényi)を含むインキュベート緩衝液(100mM Tris-HCl pH8.0、10mM EDTA、1mM NaClおよび0.25% Triton X-100)と4で5分間インキュベートすることによって単離した。分子は、MiniMACS-カラム(Miltényi)を介したろ過、インキュベート緩衝液での洗浄および水での溶出によって単離した。試料は4~20%Tris/グリシン-SDS-PAGEで分析した。

20

30

【0060】

RNA-タンパク質融合物のRNA部分を除去するため、オリゴdT精製分子をS1-ヌクレアーゼ(S1-ヌクレアーゼはピューロマイシンリンカーのDNA部分を切断する)で取扱説明書に従って消化した。S1消化の前および後のPROfusion分子の試料を4~12%Bis/Tris SDS-PAGEで分析した。ストレプトアビジンビーズ(M280 Dynal)をHBSで洗浄し、さらに4で一晩インキュベートした。ビオチン化PT(900pmol)を900μlのStrept beads(HBS緩衝液で予備ブロックした)と共に室温で1時間インキュベートした。PTの固定化後、ビーズをビオチン(2mMビオチンを含むHBS)で1分間ブロックし、さらに直ちにHBS緩衝液で4回洗浄してビオチンの痕跡を除去した。対照ビーズ(PT無し)をビオチンで同様にブロックした。

40

【0061】

選択されたペプチドの結合分析のために、いくつかの平行反応を下記の通り設定した: ビオチンブロックしたストレプトアビジンビーズのみを用いる陰性対照; ストレプトアビジンビーズ上に固定化したPTを用いる陽性対照; ビオチンブロックしたビーズを1/4容のAventis Pasteur 試料溶液C(素通り1.AFCラム)と組み合わせて用いるバックグラウンド対照; 1/4容の試料溶液Cと組み合わせたPTの混合物; ビオチンブロックビーズを1/4容のAventis Pasteur 試料溶液E(培地)と組

50

み合わせて用いるバックグラウンド対照；1/4容の試料溶液Eと組み合わせたPTの混合物；反応3～6は、選択されたペプチドがAventis Pasteurによって提供される試料の存在下でPTと特異的に結合する能力を評価するために実施した。結合は、室温で1時間、ペプチドの分解を回避するためプロテアーゼ阻害剤混合物（complete mini（登録商標）ROCHE社）の存在下で実施した。HBS溶液で洗浄後、ビーズをシンチレーションカウンターによって分析した。

【0062】

表3に示す通り、試験した10種類のグルマリン変異体のうち3つ（9、10、19番）が、AP処理液のどれにも影響されないPTへの標的結合を示す。これらの変異体は、AP処理中のアフィニティクロマトグラフィー用途のための最も有望な候補である。

10

【0063】

表4に示す通り、試験した7種類のPP26変異体のうち3つ（5、6、9番）が、AP処理液によって低下しないPTへの標的結合を示す。これらの変異体は、AP処理中のさらなるアフィニティクロマトグラフィー用途のための最も有望な候補である。

【表3】

表3
グルマリン変異体の選択後分析*

#	配列番号	ペプチド配列	試験1	試験2
1	194227	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCAAGSVGHCEPLECLRRFLNLRWCGSGSSGSS	-	n.d.
2	194238	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELICVMRAPCEPLECLRRYMLKHMCGSGSSGSS	-	n.d.
3	194239	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCKAFRYSCEPLECLRKWLKARFCGSGSSGSS	-	n.d.
4	194251	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCLRSSIDCEPLECLYKWMQRRRLCGSGSSGSS	-	n.d.
5	194210	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCPRRHKCEPLECLLEMLERKRCGSGSSGSS	-	n.d.
6	194261	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCSMACVCEPLECKYHGYFWLWCGSGSSGSS	-	n.d.
7	194214	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCAVWFDVCEPLECTYQSGYYWLCGSGSSGSS	-	n.d.
8	194226	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCEPWYWRCEPLECVYTSGYYSYCGSGSSGSS	-	n.d.
9	194259	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCAWDLVCEPLECIYTSELYATCGSGSSGSS	√	√
12	194297	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELGVFFPNCCEPLECRVWVNDNYGWCWCGSGSSGSS	√	-
13	194330	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCSMACVCEPLECKYHGYFWLWCGSGSSGSS	√	-
14	194479	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCTTASKSCEPLECKWTNEHFGTCGSGSSGSS	√	-
15	194511	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCSQSVPMCEPLECKWFNENYGCWCGSGSSGSS	√	-
16	194533	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCAWDLVCEPLECIYTSELYATCGSGSSGSS	√	-
17	194486	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCAWDLVCEPLECLGHGLGYAYCGSGSSGSS	-	n.d.
18	194668	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCSREVCCEPLECYTGWYWACGSGSSGSS	-	-
10	194264	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCELAVDCEPLECFQMGHGFKRCGSGSSGSS	√	√
19	194737	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCELAVDCEPLECTKCDLCPKCCGCGSSGSS	√	√
20	194716	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCELAIDVCEPLECLGHGLGYAYCGSGSSGSS	√	n.d.
21	194720	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCELAIDVCEPLECLGHGLGYAYCGSGSSGSS	-	-
11	194328	MHHHHHSGSSSGSGCVKKDELCAWDLVCEPLECLGHGLGYAYCGSGSSGSS	√	n.d.

20

30

*試験1は遊離ペプチドの標的結合能力を示し(○)、試験2はAP処理液の存在下での変異体の結合特異性を示す(○)。両方のアッセイで陽性である変異体が9,10,および19である。n.d.= 検出されず。

【表 4】

表 4
PP26 変異体の選択後分析*

#	配列番号	ペプチド配列	試験 1	試験 2
1	197569	MGRGSHHHHHHARS DWELSPPHVAITTRHLINCTDGPLLRDANAPKASAI	-	n.d.
2	197536	MGRGSHHHHHHARSLNGESTSNILTTSRKVTETWGTASVDANAPKASAI	-	n.d.
3	197611	MGRGSHHHHHHARSQVTWHHLADTVTTKNRRCCTDSYIGWNXANAPKASAI	-	n.d.
4	197530	MGRGSHHHHHHARSIIVIHNAIQHTHPQVSIWCPPKHNRDANAPKASAI	-	n.d.
5	197557	MGRGSHHHHHHARSSHCRHRNCHTITRGNMRIETPNNIRK DANAPKASAI	√	√
6	197596	MGRGSHHHHHHARSTMNTNRMDIQR LMTNHVKRDS SPGSI DANAPKASAI	√	√
7	197552	MGRGSHHHHHHARSLSALRRTER TWNTIHQGHLEWYPPADANAPKASAI	-	n.d.
8	197541	MGRGSHHHHHHARSWTSMQGETLWRTDRLATTKTSM SHPPDANAPKASAI	-	n.d.
9	197588	MGRGSHHHHHHARSNVIPLNEVWYDTGWDRPHRSRLSIDDANAPKASAI	√	√
10	197635	MGRGSHHHHHHARSCLATRNGFV.MNDRGT YVVKRPTVLQDANAPKASAI	√	-
11	197797	MGRGSHHHHHHARSWGLSGTQTWKITKLATRLHHP EFETNDANAPKASAI	-	n.d.
12	197888	MGRGSHHHHHHARSWRWHNWGLSDTVASHPDASNSLNMMYDANAPKASAN	-	n.d.
13	197897	MGRGSHHHHHHLDLWGPSPGSPRTRSTTGTSTTSSPSTPGTLTLRRHPH	-	n.d.
14	197825	MGRGSHHHHHHARSWQFEVKMSSLVDT SQTVGAAVETRTTDANAPKASA	√	-
15	198000	MGRGSHHHHHHARSWRDTRK LHMRYHFPLAIDSYWDHTLRDANAPKASAI	√	-
16	197983	MGRGSHHHHHHARSWTSMQGETLWRTDRLATTKTSM SHPPDANAPKASAI	-	n.d.
17	197998	MGRGSHHHHHHARSPLWYHYNCWDTICLADWLKDRPHGVYDANAPKASA	-	n.d.
18	197947	MGRGSHHHHHHARSVGT TIRIAQDTEHYRNVYHKLSQYSRDANAPKASAI	√	-
19	197954	MGRGSHHHHHHARSVGT TIRIAQDTEHYRNVYHKLSQYSRDANAPKASAI	-	n.d.
20	197971	MGRGSHHHHHHARSNVIPLNEVWYDTGWDRPHRSRLSIDDANAPKASAI	-	n.d.

*試験 1 は遊離ペプチドの標的結合能力を示し (0) および試験 2 は A P 処理液の存在下での変異体の結合特異性を示す (0)。両方のアッセイで陽性である変異体は 5,6 および 9 である。n.d.= 検出されず。

【0064】

F. 化学合成によるペプチド作製

8 種類の異なるペプチドが化学合成によって N 末端ビオチン化ペプチドの形で作製された。ビオチン基は短い親水性リンカー (P E G 2 = 8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクタン酸) をスペーサーとした。これらの 8 つのペプチドのうち 2 つ (P P 2 6 - 5 c およびグマリン - 9 c) をさらに、C 末端タグ化ビオチン化ペプチド (追加の C 末端リジンを介して) の形で合成した。ペプチドは S h e p p a r d に従って F m o c / B u t 戦略を用いて自動合成し、H P L C によって精製し、さらに続いて凍結乾燥した。全ての精製ペプチドの品質は質量分析によって確認した。各ペプチド合成の標的量は精製ペプチド 5 m g であった。精製後の合成ペプチドの収量および純度についての概要を表 5 に示す。

【表 5】

表 5
百日咳毒素結合ペプチドのペプチド合成*

選択	クローン	配列番号	配列	純度 (%)	収量 (mg)
pp26	5 c	197557	RSSHCRHRNCHTITRGNMRIETPNNIRKDAK	90 - 95	7,7
pp26	5 n	197557	RSSHCRHRNCHTITRGNMRIETPNNIRKDA	90 - 95	7,6
pp26	6 n	197596	RSTMNTNRMDIQR LMTNHVKRDS SPGSI DA	90 - 95	6,3
pp26	9 n	197588	RSNVIPLNEVWYDTGWDRPHRSRLSIDD DA	90 - 95	5,8
pp26	15 n	198000	RSWRDTRK LHMRYHFPLAIDSYWDHTLR DA	90 - 95	4,8
gumarin	9 c	194259	SGCVKKDEL CARWDLVCCPELECIYTSELYATCGK	70	1,0
gumarin	9 n	194259	SGCVKKDEL CARWDLVCCPELECIYTSELYATCG	80 - 90	4,0
gumarin	10 n	194264	SGCVKKDELCELA VDECCEPLECFQM GHGFKRCG	90 - 95	4,9
gumarin	15 n	194511	SGCVKKDELCSQSVP M CCEPLECKWFNENY GICGS	90 - 95	6,3
gumarin	19 n	194737	SGCVKKDELCELAIDECCEPLECTKGD LGFRKCG	90 - 95	6,7

*クローン名の略語 c は C 末端ビオチン化ペプチドを表し、略語 n は N 末端ビオチン化ペプチドを表す。

【0065】

全ての p p 2 6 ペプチドを、1 0 0 m M H E P E S、p H 7 . 4、2 0 0 m M N a C l に終濃度 1 0 0 μ M で溶解させた。全てのグマリンペプチドを、1 0 0 m M H E P E S、p H 7 . 4、2 0 0 m M N a C l、2 m M G S H、1 m M G S S G に終濃度 1 0

0 μMで溶解させ、さらに続いて窒素下で少なくとも48時間インキュベートして構造的折りたたみを可能にした。

【0066】

G. 細菌発現によるペプチド産生

百日咳毒素に対する結合物質として同定されたペプチドを、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)の読み枠内にサブクローニングし、さらに細菌で発現させた。GSTタグは溶解度を高め、さらにグルタチオンセファロースを用いる精製を可能にする。特異的PreScission(登録商標)プロテアーゼによって認識される遺伝子組換えによるプロテアーゼ切断部位は、GSTタグの除去を可能にし、ペプチドを遊離させる。PreScissionプロテアーゼ自体がGSTおよびヒトライノウイルス(HRV)14型3Cプロテアーゼの融合タンパク質であり、さらに配列Leu-Phe-Gln*Gly-Proを特異的に認識してGlnおよびGly残基の間を切断する。切断後、切断されない産物およびプロテアーゼは、グルタチオンセファロースを用いて切断反応物から除去できる。

10

【0067】

H. 発現ベクターの構築

1. pp26変異体についてGST融合物の構築

PCR用のテンプレートとして、PTに対する同定されたpp26結合物質の配列を含むpCR2.1ベクターを用いた。オリゴヌクレオチド467番(5'-CATGCCATGGGACGTGGCTCACATCATC-3')および468番(5'-リン酸-GGGTTAAATAGCGGATGCCTTCGGAGCGTTAGCGTC-3')をPwoDNAポリメラーゼ(Roche)と共に用いてPCRで得られた産物を、NcoI(New England Biolabs)で消化した。修飾ベクター(追加のNcoI部位を含むpGEX6P(Amersham/Pharmacia)をNcoI/SmaI(New England Biolabs)で消化し、さらにPCR産物をこのベクターのNcoI/SmaI部位へ定方向クローニングした。TOP10(Invitrogen)での形質転換後、陽性クローンをコロニーPCRによって特定し、さらに配列決定によって確認した。

20

【0068】

2. グルマリン変異体についてGST融合物の構築

PCR用のテンプレートとして、PTに対する同定されたグルマリン結合物質の配列を含むpCR2.1ベクターを用いた。オリゴヌクレオチド464番(5'-GGAGATCTCATATGCACCATCACCATCACCATAGTGGC-3')および465番(5'-リン酸-GGGTTAAATAGCGGATGCTACTAGGC-3')をPwoDNAポリメラーゼ(Roche)と共に用いてPCRで得られた産物を、NdeI(New England Biolabs)で消化した。修飾ベクター(追加のNdeI部位を含むpGEX6P(Amersham/Pharmacia))をNdeI/SmaI(New England Biolabs)で消化し、さらにPCR産物をこのベクターのNdeI/SmaI部位へ定方向ライゲーションした。TOP10(Invitrogen)での形質転換後、陽性クローンをコロニーPCRによって特定し、さらに配列決定によって確認した(表6)。

30

40

【表 6】

表 6
細菌発現に使用したベクター

プラスミド番号	pp26
pS840	pGEX6P-(His) ₆ -pp26 K5
pS850	pGEX6P-(His) ₆ -pp26K6
pS841	pGEX6P-(His) ₆ -pp26K9
pS842	pGEX6P-(His) ₆ -pp26K15
	グルマリン
pS836	pGEX6P-(His) ₆ -グルマリン K9
pS837	pGEX6P-(His) ₆ -グルマリン K10
pS838	pGEX6P-(His) ₆ -グルマリン K15
pS839	pGEX6P-(His) ₆ -グルマリン K19

10

【0069】

3. GSTpp26 融合物の発現および精製

細菌株 Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) を、プラスミド DNA (表参照) を用いて形質転換した。pp26 変異体の形質転換株を 37 250 rpm にて OD₆₀₀ ~ 0.5 まで増殖させ、さらに 1 mM IPTG の添加によって 4 時間誘導した。グルマリン-GST 融合物の場合には、誘導は 0.33 mM IPTG を用いて 2.5 時間実施した。細菌を採集後、細胞を 1 mM 2-メルカプトエタノール、プロテアーゼ阻害剤および 1 mM リゾチームを含む PBS-KMT (10 mM Naリン酸、pH 7.5、130 mM NaCl、3 mM KCl、1 mM MgCl、0.1% Tween-20) に再懸濁し、30 分間室温にてインキュベートし、さらに超音波処理によって破壊した。遠心分離後に可溶性の上清を GSH セファロースカラムへ精製のために移した。カラムをカラムの 10 倍容の 20 mM Hepes、pH 7.5、150 mM NaCl で洗浄後、GST 融合物タンパク質を 20 mM GSH で溶出し、さらに SDS ゲルで分析して発現を確認した。

20

【0070】

4. PreScission (登録商標) プロテアーゼを用いた切断による GST タグの除去によるペプチド生成

あるペプチドの GST-ペプチド融合物からの PreScission 切断の一例を下記に示す。GST タグは PreScission プロテアーゼ (Amersham Pharmacia) とのインキュベートによって除去された：融合物タンパク質 2.5 mg を 160 U の PreScission とインキュベートし、さらに 5 で 16 時間、結合した GST 融合物タンパク質を含む密封 GSTrapFF カラムで消化した。一晚インキュベート後、第 2 の GSTrapFF カラムを接続して GST タグ化プロテアーゼ PreScission を除去した。試料を流速 0.2 ml / 分で加え、素通り画分を小部分試料として回収し、SDS ゲル電気泳動によって分析し、さらにペプチドの量を OD₂₈₀ 測定によって計算した (約 700 μg)。

30

【0071】

実施例 3

PT のアフィニティ精製

A. 変性ゲルでの発酵上清の分析

処理液は、アフィニティクロマトグラフィー処理用の可能な開始材料と考えられた：
試料 A 10 ~ 50 μg / ml (~ 0.09 ~ 0.45 μM) の粗 PT を含む濃縮培養液、発酵上清
試料 B 9 ~ 45 μg / ml (~ 0.08 ~ 0.4 μM) の粗 PT を含む吸収クロマトグラフィー上清

40

これらの処理液の複雑さを視覚化するため、両方の試料を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析した。試料 A の主に高分子量成分が吸収クロマトグラフィーによ

50

て除去される（試料 B）。

【0072】

B．合成ビオチン化コアペプチドのストレプトアビジンセファロースへの固定化および精製 PT との結合の確認

1．ストレプトアビジンセファロースへのペプチド固定化

ビオチン化ペプチドのストレプトアビジンセファロース（Amersham High Performance 71-5004-40）への結合のため、予洗浄したストレプトアビジンセファロースの 50% スラリー 200 μ l を、1 nmol のペプチド（100 μ M ペプチド溶液 10 μ l）と 1 ml HEPES 緩衝液（20 mM HEPES、pH 7.5、150 mM NaCl、0.025% Triton X-100）中 4 でインキュベートした。使用した条件下では、ストレプトアビジンセファロースの高結合能はビオチン化ペプチドの 100% の固定化を可能にすべきである（充填セファロース 1 μ l 当たりペプチド 10 pmol）。

10

【0073】

2．固定化ペプチドへの精製 PT の結合

ペプチドを装填したセファロース 200 μ l（10% i g e スラリー、固定化ペプチド 200 pmol を含む）を Mobicol カラム（MoBiTec、10 μ m フィルター）へ移し、さらに上清を 1 分間 2000 rpm で遠心分離によって除去した。HEPES 緩衝液で 4 回洗浄後、セファロースを、精製百日咳毒素 100 pmol を含む 200 μ l の HEPES 緩衝液に再懸濁し、さらに回転ホイール上で 1 時間室温にてインキュベートした。結合しない画分を遠心分離によって分離した（結合後の上清；ゲル分析に使用）。続いてペプチド-ストレプトアビジンセファロースを冷 HEPES 緩衝液（各 200 μ l）で 3 回洗浄し、さらに 20 μ l の装填緩衝液（30 mM Tris、pH 6.8、1% SDS、1% P-メルカプトエタノール、12.5% グリセロール、0.005% ブロモフェノールブルー）に再懸濁して、結合した PT を溶出した。95 で 5 分間インキュベート後、装填緩衝液を遠心分離によって回収し、さらに続いてゲル分析に用いた（図 15）。対照として、ペプチドを伴わないストレプトアビジンセファロースを同一の条件下で PT と接触させた。使用した条件下では、百日咳毒素ペプチド結合物質クローン pp265n、5c、9n、15n およびグルマリンクローン 10n、19n、15n、9n は精製 PT への明らかな結合を示す。全ての陽性な結合物質候補は、未変性六量体 PT を結合させることができた。

20

30

【0074】

C．合成ビオチン化コアペプチドのストレプトアビジンセファロースへの固定化および発酵上清からの PT との結合の確認

ストレプトアビジンセファロースへのペプチド固定化および発酵上清からの PT との結合分析を、ペプチドストレプトアビジンセファロースを 200 μ l の試料 A（発酵上清）または 200 μ l の試料 B（吸収クロマトグラフィー上清カラム、0 章参照）とインキュベートし、続いて HEPES 緩衝液で 4 回室温で洗浄した以外は 0 章に記載の通り実施した。結合分析の結果を図 16 に示す。使用した条件下では、百日咳毒素 pp26 結合物質クローン 9n、15n およびグルマリンクローン 9n、15n は、発酵上清試料 A および試料 B から未変性 PT 六量体を非常に効率的に結合できた。使用した条件下では、pp26 結合物質クローン 5 およびグルマリン結合物質クローン 10 および 19 はより低い親和性で PT に結合することに注意する。試料 A および試料 B からこれらのペプチドへの PT 結合はその条件下では検出されなかったが、これらの結合物質はアフィニティークロマトグラフィーカラムにおけるリガンドとしての用途になお適するであろう（カラムは再結合作用による PT の保持を可能にし、従って k_{off} の問題を最小化する）。

40

【0075】

D．固定化ペプチドに関する熱力学データ

ペプチド結合能の推定のために、セファロース固定化ペプチド 20 pmol を、過剰量の PT 100 pmol を含む容量 200 μ l の HEPES 緩衝液（PT 500 nM に相当）

50

とインキュベートした。洗浄後、ペプチド - ストレプトアビジンセファロース結合PTの画分をゲル分析によって定量した。これは、使用した条件下での結合活性ペプチドの画分を直接計算するのを可能にする (PT / ペプチド結合比は1 : 1と仮定)。PT 500 nMの濃度は全てのペプチドについて B_{max} に達するのに十分高いという仮定に基づく。分析の結果を表7に示す。表に示す値は、ペプチドの期待可能な結合能の推定である。大部分の適当な結合物質の結合能 (B_{max}) および解離定数 (K_D) の正確な評価も実施できる。

【表7】

表7
使用した実験条件下での結合活性ペプチドの画分についての概要

ペプチド名	pp26 5n	pp26 9n	pp26 15n	グルマリン 9n	グルマリン 10n	グルマリン 15n	グルマリン 19n
結合活性 ペプチドの画分	>5% ¹	>50%	>12,5%	>12,5%	>5% ¹	>50%	>5% ¹

¹シグナルが検出限界に近かったため計算が困難

10

【0076】

E. 許容されるグレードの原材料に対して保健当局の基準を用いた、規定の緩衝液条件 (pH、塩濃度、界面活性剤) 下での精製百日咳毒素六量体の安定性の分析

20

百日咳毒素六量体安定性を幅広いpHおよび塩条件下でBIACore 2000装置で試験した。この目的で、2000RUまでのピオチン化PTをストレプトアビジンチップに装填した。続いて異なる緩衝液をチップ固定化PTに、2分間流速30 μ l / 分で加えた。各緩衝液注入の終了後に、チップをHBS / EP分析緩衝液で平衡化した (0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005% ポリソルベート 20 (v/v)、少なくとも2分間、流速30 μ l / 分)。緩衝液注入の前および後の測定されたRUシグナルの差は、チップ上のPT六量体の減少と相関する。この減少は、使用した緩衝液条件下でのPT六量体の安定性の損失と解釈された。

【0077】

30

分析したpH範囲はpH 2から10.5で下記の緩衝液を用いた：10 mM グリシン緩衝液 (BIACore、pH 2 ; 2.5 ; 3)、10 mM 酢酸緩衝液 (BIACore、pH 4 ; 4.5 ; 5 ; 5.5)、50 mM Tris / HCl (pH 8.5) および100 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6 および10.5)。PT六量体安定性に及ぼすpHの影響を示すBIACore測定図が作製され、さらにBIACore分析の結果を表8に要約する。使用した条件下で、百日咳毒素六量体はpH 2.5 ~ 10.5の幅広いpH範囲で安定であることが示された。

【表8】

表8
様々なpH条件下での百日咳毒素六量体の安定性

pH	2	2.5	3	4	4.5	5	5.5	8.5	9.6	10.5
PT六量体の 安定性 (%)	93	98	100	100	100	100	100	100	98	95

40

【0078】

PT六量体安定性に及ぼす異なる塩条件の影響を、NaCl、KClおよびMgCl₂ についてそれぞれpH 5.0 (10 mM 酢酸緩衝液) およびpH 8.5 (50 mM Tr

50

is / HCl) で、BIAcore 2000 装置での類似の実験で調査した。使用した塩条件下での PT 六量体安定性についての概要を表 9 に示す。六量体は最高 2.5 M の NaCl または最高 2 M の KCl を含む緩衝液 (pH 5 および 8.5 にて) 中で安定であった。MgCl₂ の場合には、PT 六量体は最高 2 M の MgCl₂ を含む緩衝液中で pH 8.5 にて安定であった。

【表 9】

表 9
様々な塩条件下での百日咳毒素六量体の安定性

PT 六量体の安定性	pH 5	pH 8.5
NaCl	0 - 2.5 M 安定	0 - 2.5 M 安定
KCl	0 - 2.0 M 安定	0 - 2.0 M 安定
MgCl ₂	Nd	0 - 2.0 M 安定

10

20

【0079】

F. 発酵上清からの PT の特異的アフィニティ精製を可能にする規定の洗浄および溶出条件を設定 (pH、塩濃度、界面活性剤)

百日咳毒素六量体が安定である条件の決定後、次の段階は、固定化ペプチド pp26 クローン 9 および 15 およびグルマリンクローン 9 および 15 に結合した百日咳毒素についての洗浄および溶出条件を調べることであった。

【0080】

1. BIAcore 2000 装置を用いた PT / ペプチド安定性の評価

PT / ペプチド複合体の安定性を、BIAcore 2000 装置を用いて、PT 六量体安定性に干渉しないことが示された異なる pH および塩条件下で調べた。500 ~ 1000 RU の合成ペプチドを BIAcore ストレプトアビジンチップ上に固定化した。固定化ペプチドへの PT の結合を可能にするため、20 nM の精製 PT を含む HEPES 緩衝液を 1 分間注入した。HBS / EP 分析緩衝液 (0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005 % ポリソルベート 20 (v/v)) で平衡化後、PT / ペプチド複合体を、以下の緩衝液の注入によって洗浄した：

30

(a) 100 mM 炭酸緩衝液 pH 10.5 および 9.5

(b) 10 mM 酢酸緩衝液 pH 5.5、5.0、4.5、および 4.0

(c) 10 mM グリシン緩衝液 pH 3.0 および 2.5

(d) 0.5、1.0、1.5、2.0 M NaCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液緩衝液、pH 6.0、

40

(e) 0.5、1.0、1.5、2.0 M NaCl を含む 50 mM Tris / HCl 緩衝液、pH 8.5、

(f) 0.5、1.0、1.5、2.0 M KCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0、

(g) 0.5、1.0、1.5、2.0 M KCl を含む 50 mM Tris / HCl 緩衝液、pH 8.5、

(h) 0.5、1.0、1.5、2.0 M NaCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0、

(i) 0.5、1.0、1.5、2.0 M NaCl を含む 50 mM Tris / HCl 緩衝液、pH 8.5。

50

【0081】

各緩衝液注入の終了後にチップをHBS/E P分析緩衝液で平衡化した。使用した緩衝液条件下でのチップ上のPT六量体の損失(緩衝液注入の前および後の測定されたR Uシグナルの差)はPT/ペプチド複合体安定性を反映する。全てのPT/ペプチド複合体のpH範囲安定性および塩安定性に関する概要を表10に要約する。全てのPT/ペプチド複合体は、100mM炭酸、pH10.5および10mMグリシン、pH2.5の存在下で完全に不安定化された。グルマリンペプチド9について、2.5M NaClまたは少なくとも0.5M MgCl₂を含む緩衝液はPT/ペプチド複合体安定性に干渉する。グルマリンペプチド15とのPT複合体はさらに少なくとも1.5M MgCl₂の存在下で50mM Tris/HCl、pH8.5中で不安定化された)。

【表10】

表10
様々なpHおよび塩条件がPT/ペプチド複合体の安定性に及ぼす作用

	pp26 ペプチド9		pp26 ペプチド15		グルマリンペプチド9	グルマリンペプチド15	
pH範囲 複合体の 安定性	3-9 安定、 pH2.5または 10.5で不安定		3-9 安定、 pH2.5または 10.5で不安定		3-9 安定、 pH2.5または 10.5で不安定	3-9 安定、 pH2.5または 10.5で不安定	
	pH 6	pH 8,5	pH 6	pH 8,5	pH 8,5	pH 6	pH 8,5
NaCl 複合体の 安定性	2M 安定	2M 安定	2M 安定	2M 安定	塩に強い感受性	塩に感受性	
KCl 複合体の 安定性	2M 安定	2M 安定	2M 安定	2M 安定	塩に強い感受性	塩に感受性	
MgCl ₂ 複合体の 安定性	安定	125mMから 感受性、 完全溶出 ≧2M	2Mまで 安定	溶出≧1.5、 しかし不完全	溶出≧0.5M	溶出≧1M、 完全溶出 ≧2M	溶出≧1M、 完全溶出≧2M

【0082】

2. ペプチドストレプトアビジンセファロース上のPTの精製のための洗浄条件の評価
アジアロフェチンでの百日咳毒素精製処理のための確立された条件に近い洗浄条件の適用を試みた(1M NaClを含むかまたは含まない50mM Tris/HCl、pH7.5で洗浄)。百日咳毒素精製手順はペプチドpp26クローン9および15およびグルマリンククローン9および15について最適化した。セファロース20μl上に固定化した各ペプチド200pmolを100μlの50mM Tris/HCl、pH7.5および100μlの試料Aまたは試料Bとインキュベートし、PTを結合させた。続いて結合したPT画分を有するペプチドセファロースを下記に示す3つの異なる条件下で洗浄した:

- (a) 200μlの50mM Tris/HCl、pH7.5で3回;
- (b) 200μlの50mM酢酸pH6.0で3回; および、
- (c) 200μlの50mM酢酸pH6.0で6回。

【0083】

洗浄後、残存物質をセファロースから、20μlの装填緩衝液(30mM Tris、pH6.8、1% SDS、1%-メルカプトエタノール、12.5%グリセロール、0.005%プロモフェノールブルー)で溶出した。全ての溶出液を続いてPAGEによって12%Bis-Tris-ゲル(MES泳動緩衝液)および銀染色で分析した(図17)

。

【0084】

50 mM 酢酸、pH 6.0での洗浄がより厳しいものでありおよび50 mM Tris / HCl、pH 7.5で洗浄するよりも効率的に高分子量不純物のバックグラウンドを低減する。しかしこれらの洗浄条件下では、特にグルマリンペプチド9および50 mM 酢酸、pH 6.0での反復洗浄(6回洗浄)の場合には、PT/ペプチド複合体はより不安定である。50 mM Tris / HCl、pH 7.5とは対照的に、ペプチド固定化PTの損失は、50 mM 酢酸、pH 6.0での洗浄を10から20回反復した際により劇的であった(例としてpp 26ペプチド9について図18で示す)。

【0085】

3. ペプチドストレプトアビジンセファロース上のPTの精製のための溶出条件の評価
ペプチドセファロースからのPTの溶出を、六量体安定性と類似の条件下で試験した。

【0086】

a. MgCl₂による溶出

BIAcore 2000測定によって上に示す通り、全てのPT/ペプチド複合体は、PT六量体安定性には決定的でないことが示された条件である2 M MgCl₂に感受性であった。規定のMgCl₂濃度の溶出効率を、ストレプトアビジンセファロースへ4種類の固定化合成ペプチドのうちの一つを介して結合したPTについて評価した。セファロース20 μl上に固定化した各ペプチド400 pmolを100 μlの50 mM Tris / HCl、pH 7.5および100 μlの試料AとインキュベートしてPTを結合させた。50 mM Tris / HCl、pH 7.5(各200 μl)で4回洗浄後、PTの結合した画分を、下記の緩衝液の20 μlを3回連続で用いて溶出した。

【0087】

- (a) 0.2 M MgCl₂を含む50 mM Tris / HCl、pH 8.5、または
- (b) 0.5 M MgCl₂を含む50 mM Tris / HCl、pH 8.5、または
- (c) 1.0 M MgCl₂を含む50 mM Tris / HCl、pH 8.5、または
- (d) 1.5 M MgCl₂を含む50 mM Tris / HCl、pH 8.5、または
- (e) 2.0 M MgCl₂を含む50 mM Tris / HCl、pH 8.5。

【0088】

残存物質をその後、ペプチドストレプトアビジンセファロースから20 μlの装填緩衝液(30 mM Tris、pH 6.8、1% SDS、1% -メルカプトエタノール、12.5%グリセロール、0.005%プロモフェノールブルー)で溶出した。全ての溶出液を続いてPAGEによって12% Bis-Tris-ゲル(MES泳動緩衝液)および銀染色で分析した(図19)。本実験で示される通り、MgCl₂での溶出はグルマリンペプチドについてのほうがpp 26ペプチドについてよりも効率的であったが、相当な量のPTがなおペプチドストレプトアビジンセファロース上に残存した。

【0089】

b. pH変化による溶出

BIAcore測定は、PTは全てのペプチドから、PT六量体安定性には決定的に重要でない酸性(pH 2.5)または塩基性(pH 10.5)緩衝液条件を用いて溶出可能であったことを明らかにした(100 mM炭酸緩衝液、pH 10.5よりもPT六量体安定性に穏和な50 mMグリシン、pH 2.5、xxxを参照)。セファロース20 μl上に固定化した各ペプチド200 pmolを100 μlの50 mM Tris / HCl、pH 7.5および100 μlの試料Aとインキュベートし、PTを結合させた。50 mM Tris / HCl、pH 7.5(各200 μl)で4回洗浄後、PTをペプチドストレプトアビジンセファロースから、50 mMグリシン、pH 2.5、または100 mM炭酸緩衝液、pH 10.5での40 μlの溶出の連続3回によって溶出した。残存物質を続いてペプチドストレプトアビジンセファロースから、20 μlの装填緩衝液(30 mM Tris、pH 6.8、1% SDS、1% -メルカプトエタノール、12.5%グリセロール、0.005%プロモフェノールブルー)で溶出した。全ての溶出液をPAGEによって

10

20

30

40

50

12% Bis-Tris-ゲル(MES泳動緩衝液)および銀染色で分析した(図20)。ほぼ全てのPTがペプチドストレプトアビジンセファロースから、50mMグリシン、pH2.5を用いておよび100mM炭酸緩衝液、pH10.5を用いて溶出可能であった。

【0090】

4.最適化された条件を小スケール精製計画に適用し、結合能を確認

a.最適化された洗浄および溶出条件下での試料BからのPTの精製(4 μ lカラム)最適化された洗浄および溶出条件を組み合わせ、ペプチドストレプトアビジンセファロース上での試料BからのPTの精製を可能にした。PTの非特異的結合を低減するために、ペプチド/ストレプトアビジンセファロースの最適比を先に各ペプチドについて滴定した。続いて試料B/ペプチドストレプトアビジンセファロース比を、ペプチドの予想される高(中)インプット当たりの高回収量に関して最適化した。これらの条件を下記の小スケールカラム精製に適用した。

10

【0091】

pp26ペプチド9およびグルマリンペプチド15については、ストレプトアビジンセファロースへの固定化は、ストレプトアビジンセファロース16 μ lのペプチド1600pmolとのインキュベーションによって実施した。pp26ペプチド15の場合には、ストレプトアビジンセファロース16 μ lをペプチド6000pmolとインキュベーションした(pp26/15はストレプトアビジンセファロースとより低い効率で結合し、不完全なペプチドビオチン化によって説明される)。グルマリンペプチド9については、8000pmolがストレプトアビジンセファロース80 μ l上に固定化された。続いて洗浄したペプチドストレプトアビジンセファロースを等分し、さらに4つのMobilcomカラム(10 μ Mフィルター付き)へ移した。

20

【0092】

各カラム(pp26/9およびgur/15についてはセファロース4 μ lとペプチド400pmol;4 μ lと不確定量の結合ペプチドpp26/15;gur/9については20 μ lとペプチド2000pmolを含む)を400 μ lの試料B(HClの添加によってpH7.0~7.5に調整)とインキュベーションしてPTを結合させた。50mM Tris、pH7.5(各100 μ l)で5回洗浄後、PTをペプチドストレプトアビジンセファロースから下記の通り連続溶出によって溶出した(pp26/9およびgur/15について3回溶出;pp26/15およびgur/9について4回溶出):

30

(a)カラム1の場合、50mMグリシン、pH2.5(各20 μ l)で、または

(b)カラム2の場合、100mM炭酸緩衝液、pH10.5(各20 μ l)で、または

は

(c)カラム3の場合、2M MgCl₂を含む50mM Tris、pH8.5(各20 μ l)で。

【0093】

カラム1~3およびカラム4上の残存物質を続いてペプチドストレプトアビジンセファロースから20 μ l装填緩衝液(30mM Tris、pH6.8、1%SDS、1%-メルカプトエタノール、12.5%グリセロール、0.005%プロモフェノールブルー)での溶出によって溶出した。全ての溶出液をPAGEによって12%Bis-Tris-ゲル(MES泳動緩衝液)および銀染色で分析した(図21、22)。ペプチドストレプトアビジンセファロースでの精製後のPTの収量を計算するため、プールした溶出液1~3をPAGEおよび銀染色によって分析し、さらに同じゲル上で分離した規定量の精製PTと比較して推定を可能にした(図21Bおよび22B)。ゲル推定に基づき、精製PTの収量は表11に示す通り計算された。

40

【表 1 1】

表 1 1
 アフィニティリガンドとして pp26 ペプチド 9 またはグルマリンペプチド 15 を
 用いた試料 B からの小スケールカラム精製後の百日咳毒素収量の計算

ペプチド	溶出	図 13B および 14B からの推定	PT の 総収量	試料 B 中の PT 投入量に 対する収率*	セファロース結合 ペプチド量に 対する収率
pp26 ペプチド 9	グリシン pH2.5	ブールした溶出液の 3/120 中に 2pmol PT	80 pmol	> 48%	20%
	炭酸塩 pH10.5 溶出	ブールした溶出液の 3/120 中に 2pmol PT	80 pmol	> 48%	20%
	MgCl ₂	ブールした溶出液の 6/120 中に 1pmol PT	20 pmol	> 12%	5%
グルマリン ペプチド 15	グリシン pH2.5	ブールした溶出液の 3/120 中に 2pmol PT	80 pmol	> 48%	20%
	炭酸塩 pH10.5 溶出	ブールした溶出液の 3/120 中に 2pmol PT	80 pmol	> 48%	20%
	MgCl ₂	ブールした溶出液の 3/120 中に 1pmol PT	40 pmol	> 24%	10%

*PT 関連の文書によると試料 B の予測 PT 濃度は 9 ~ 45g/ml であり、0.8 ~ 0.41pmol/l に相当する。
 計算は下記の通り実施した：試料 B 400 μl × 0.41pmol/μl = 164pmol PT 投入量

【 0 0 9 4 】

b . アフィニティ精製中にストレプトアビジンセファロース上のさまざまなペプチド密度を用いた P T 収量の測定

ペプチドストレプトアビジンセファロースに結合した P T を、ストレプトアビジンセファロース上にアフィニティリガンドとして固定化されたペプチドのさまざまな濃度への依存性について調べた。固定化のために 1 μ l 容のストレプトアビジンセファロースを漸増量のペプチド p p 2 6 / 9 またはグルマリン / 1 5 (ペプチド 1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、1 0 0 0 p m o l) とインキュベートした。ペプチドの非結合画分をセファロースから、5 0 m M T r i s / H C l、p H 7 . 5 (カラム上)での洗浄 3 回によって除去した。続いて各ペプチドストレプトアビジンマトリクスを 6 0 0 μ l の試料 A とインキュベートして P T を結合させた。8 0 分後、各マトリクスを 5 0 m M T r i s / H C l、p H 7 . 5 (各 2 0 0 μ l) で 4 回洗浄し、さらに続いて 2 0 μ l のゲル装填緩衝液 (3 0 m M T r i s、p H 6 . 8、1 % S D S、1 % -メルカプトエタノール、1 2 . 5 % グリセロール、0 . 0 0 5 % プロモフェノールブルー；インキュベート 1 0 分間 9 5 にて) で溶出した。溶出液を P A G E によって 1 2 % B i s - T r i s - ゲル (M E S 泳動緩衝液) および銀染色で分析した (図 2 3)。ペプチドストレプトアビジンセファロースに結合した P T の量をデンストメトリー評価によって計算し、さらにストレプトアビジンセファロースへの固定化に最初に用いたペプチドの量の関数としてプロットした (p p 2 6 / 9 について図 2 3 に示す)。ペプチド 3 0 0 ~ 4 0 0 p m o l がストレプトアビジンセファロース 1 μ l への固定化に用いられた場合に最高の P T 結合に達した。より多量のペプチドは、おそらく P T の立体障害の作用を反映して、より多い P T 結合を結果として生じなかった。

【 0 0 9 5 】

ペプチド 4 0 0 p m o l のインプットがストレプトアビジンセファロース 1 μ l への固定化に用いられた場合のペプチド (p p 2 6 / 9 またはグルマリン / 1 5) の有効に結合した画分を、P A G E によって 1 2 % B i s - T r i s - ゲル (M E S 泳動緩衝液) および銀染色で、ゲル装填緩衝液を用いた溶出 (9 5 にて 1 0 分間加熱) 後に評価した。溶出可能なペプチドの量は、同一ゲル上の規定量の精製 P T との直接比較によって推定した (データ記載せず) : p p 2 6 / 9 について 1 0 0 ~ 1 5 0 p m o l ; グルマリン / 1 5 について 5 0 p m o l 。

【 0 0 9 6 】

10

20

30

40

50

c. アフィニティ精製中に一定濃度のペプチドセファロースにてさまざまな量の試料 B を用いた P T 収量の測定

ペプチド固定化のために 400 pmol の pp26/9 または グルマリン/15 を 1 μl の ストレプトアビジンセファロースと 1 時間室温にてインキュベートした。ペプチドセファロースを 200 μl の 50 mM Tris pH 7.5 緩衝液で 3 回洗浄し、さらに続いてさまざまな量の試料 B (50、66、100、200、400、600 μl、HCl の添加によって pH 7.0 ~ 7.5 に予め調整) と 1 時間室温にてインキュベートした。アフィニティマトリクスを 100 μl の 50 mM Tris/HCl、pH 7.5 で 4 回洗浄し、さらに 100 mM 炭酸緩衝液 pH 10.5 (各 20 μl) での 4 回連続溶出によって溶出した。プールした溶出液 (計 80 μl) のうち 5 μl を PAGE によって 12% Bis-Tris-ゲル (MES 泳動緩衝液) および銀染色で分析した。溶出した P T の量は、質量標準としての同一ゲル上の規定量の精製 P T との直接比較を基礎として計算した (図 24、表 12)。

【表 12】

表 12

ペプチド 16K9 投入量 (pmol)	PT 投入量 (pmol)	ペプチド : P T の比率	結合した PT の量 (pmol)	PT の投入量に対する PT の収率
100	300	1 : 3	~100	33%
100	200	1 : 2	~88	44%
100	100	1 : 1	~40	40%
100	50	2 : 1	~24	48%
100	33,3	3 : 1	~16	48%
100	25	4 : 1	~24	96%

ペプチド 17K15 投入量 (pmol)	PT 投入量 (pmol)	ペプチド : P T の比率	結合した PT の量 (pmol)	PT の投入量に対する PT の収率
100	300	1 : 3	~80	27%
100	200	1 : 2	~64	32%
100	100	1 : 1	~56	56%
100	50	2 : 1	~16	32%
100	33,3	3 : 1	~16	32%
100	25	4 : 1	~8	32%

アジアロフェチュインの投入量 (pmol)	PT 投入量 (pmol)	ペプチド : P T の比率	結合した PT の量 (pmol)	PT の投入量に対する PT の収率
100	200	1 : 2	~8	4%
100	100	1 : 1	~16	16%
100	85,6	20 : 17	~8	9%
100	50	2 : 1	~8	16%
100	33,3	3 : 1	~8	24%
100	25	4 : 1	~8	35%

【0097】

ペプチドストレプトアビジンセファロースの精製効率をアジアロフェチュインセファロースと比較するために、アジアロフェチュインセファロースを用いた滴定実験を類似の条件下で平行して実施した (セファロース上に固定化された、反応当たり等しい量のアフィニティリガンド、セファロースへ有効に結合したアフィニティリガンド 100 pmol に相当)。これは 6.85 μl のアジアロフェチュインセファロース (バッチ番号 FA053198 : 密度 1.1 mg/ml、14.6 pmol/l) の、さまざまな量の試料 B (50、66、100、171.3、200、400 μl、HCl の添加によって pH 7.0 ~ 7.5 に予め調整) との 1 時間室温にてのインキュベートによって達成された。続いてアジアロフェチュインセファロースを洗浄し、さらに結合 P T を溶出し、さらに上記の

通り分析した。使用した精製条件下でのストレプトアビジンセファロースのペプチド結合効率、アジアロフェチュインセファロースの結合効率よりも有意に高かった。

【0098】

d. 繰り返しPT結合および溶出のためのペプチドセファロースの再使用

PTの繰り返し結合および溶出のためのペプチド装填セファロース(pp26/9およびグルマリン/15)の再使用性を調べるため、セファロースをPT結合、溶出および再生の反復サイクルに用いた(計4回)。ペプチド固定化のために、600 pmolのpp26/9またはグルマリン/15をストレプトアビジンセファロース2 μ lと一晚室温にてインキュベートし、さらに続いてHEPES緩衝液で3回洗浄した。PTの結合のために、各ペプチドストレプトアビジンセファロースを400 μ lの試料B(HClの添加によってpH7.0~7.5に調整)と1時間室温にてインキュベートし、さらに50 mM Tris/HCl、pH7.5(各200 μ l)で4回洗浄した。PTは100 mM炭酸緩衝液pH10.5(各20 μ l)での4回連続溶出によって溶出した。続いてカラムマトリクスを10 mM HCl(1 \times 20 μ l、2 \times 100 μ l)での洗浄3回によって再生し、さらにその後、200 μ lの50 mM Tris/HCl、pH7.5での洗浄2回によって中性化した。この結合、溶出および再生手順をペプチドセファロースにさらに3回適用した。プールした溶出液(計80 μ l)のうち4 μ l、各結合/溶出/再生サイクルからの1回目の再生緩衝液のうち7 μ lをPAGEによって12% Bis-Tris-ゲル(MES泳動緩衝液)で分析および銀染色し、ペプチドセファロースは再使用されることを示した(図25)。

【0099】

5. PTの大スケールFPLC精製

PT結合および溶出のための最適化された条件を、下記の通り大スケールFPLC精製(0.5 mlカラム)に適用した:

A) ビオチン化ペプチドのストレプトアビジン-セファロースへの固定化: 200 nmolのペプチドpp26/9を1時間30分間室温にて回転ホイール上で1 mlの50%ストレプトアビジン-セファロースと10 ml容(HEPES緩衝液)中でインキュベートした。インキュベート後、セファロースを50 mM Tris pH7.5で3回洗浄した。

【0100】

B) PTの結合(試料Bから): セファロース500 μ lに有効に固定化されるペプチドの推定量は50 nmolであった。ペプチド-セファロースを試料B 25 mlと1時間30分間室温にて倒立回転機中でインキュベートした(PT推定濃度~0.5 pmol/ μ l、25 ml中に12.5 nmolに相当、固定化ペプチド対PT量の比4:1に相当)。

【0101】

C) FPLC-カラム: インキュベート後、セファロースをカラム(Pharmacia HR5/5)に移した。カラムの充填中、セファロースを50 mM Tris pH7.5(2~3 ml)で洗浄した。続いてカラムを流路に接続し、さらにカラムの20倍容(10 ml)の50 mM Tris pH7.5で洗浄した。固定化PTを11 mlの100 mM炭酸緩衝液pH10.5で溶出した。溶出画分を500 μ l画分として回収し(PharmaciaフラクションコレクターFRAC-100)および溶出プロファイルを280 nmでのUV吸収の測定によって評価した。溶出後、カラムを1.5 mlの50 mM Tris pH7.5で洗浄し、さらに続いて2.5 mlの10 mM HClで再生し、その後10 mlの50 mM Tris pH7.5での中性化を実施した。

【0102】

D) 溶出画分の分析および収量の計算: 溶出画分をPAGE(12% Bis-Tris-ゲル、MES泳動緩衝液)および銀染色によって分析した(図26)。PTの濃度は、溶出画分の280 nmでの吸収(A₂₈₀)を測定、さらにこれらの結果を精製PTを用いて作製した校正曲線と比較することによって測定した(図

10

20

30

40

50

26中の表を参照)。

【0103】

PTの量はさらに、同一ゲル上の質量標準としての規定量の精製PTとの直接比較に基づいて計算した。ゲル推定はPT 8100 pmolの収量を導く。これはA₂₈₀を用いた濃度測定と非常に良く相関する。25mlの試料Bは1125 µgのPTを含むと推定されるならば、PTの69%~72%以上がこれらの条件下で溶出される。この結果は、再生後の同一のペプチド-セファロースを用いて25mlの試料BからPTを結合させるFPLC分析の反復によって確認された。この実験では、803 µgのPTが精製された(A₂₈₀) (表13)。

【表13】

表13
A₂₈₀を用いた溶出画分中のPT濃度の測定 (FPLC分析2回目)

	A ₂₈₀	µg/ml
Elu1	0	0
Elu2	0	0
Elu3	0,091	85
Elu4	0,4185	391
Elu5	0,354	331
Elu6	0,2835	265
Elu7	0,212	198
Elu8	0,148	138
Elu9	0,0975	91
Elu10	0,0585	55
Elu11	0,0315	29
Elu12	0,025	23
3-12の合計		= 803 µg

【表14】

表14
PT精製結果の要約

	12×0.5ml画分 (6ml)中のPT収量	PTの投入量(25ml中1125µg) に対する相対的収量 (pmol/pmolまたはµg/µg)	純度
精製1回目	772 - 813 µg	69% - 72%	アシアロフェチュイン セファロースで精製した PTと同等、100%
精製2回目	803 µg	71%	アシアロフェチュイン セファロースで精製した PTと同等、100%

【0104】

6 . pp26ペプチド9 / 百日咳毒素複合体形成の平衡定数および速度定数の評価
pp26K9 / PT複合体形成に関する平衡定数および速度定数を、BIACore2000装置を用いてHBS / EP分析緩衝液(0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% (v/v) ポリソルベート20)中で室温にて評価した。さまざまな濃度のpp26-K9(濃度2.5nMから100nM)の

10

20

30

40

50

、CM5チップ上に固定化されたPT（アミンカップリング法による6000RUの固定化）への結合は、流速30 μ l/分にて分析した。PT結合ペプチドの定量的溶出は3mM HCl、pH 2.5を用いて得られた。推論できる平衡定数および速度定数をBIAevaluationソフトウェアを用いて分析し、その結果を下記に示す：

解離平衡定数 K_D $7.5 \times 10^{-9} M$

結合平衡定数 K_A $1.3 \times 10^{-8} M^{-1}$

結合速度定数 k_{on} $1.3 \times 10^5 M^{-1} \times s^{-1}$

解離速度定数 k_{off} $10^{-3} S^{-1}$

本発明は好ましい実施形態に関して記載されている一方、当業者は変化および修飾を考へることが理解される。従って、付属の請求項は、請求される通りの本発明の範囲内にあるそのような同等の変化の全てを包含することが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】A) グルマリンライブラリの模式図。ライブラリのアミノ酸配列に翻訳される位置が強調表示されている。タンパク質部分の配列（アミノ酸59個の長さ）は1文字アミノ酸コードで表され、Xは任意のアミノ酸を示す。ライブラリの翻訳されない部分は灰色の囲みで示す。(a) T7-ライブラリの最適な*in vitro*転写のためのプロモーター、(b) TMV-ライブラリの完全な*in vitro*翻訳のためのタバコモザイクウイルス翻訳開始配列、(c) PROfusion（登録商標）ライブラリの効率的なアフィニティ精製のためのHis₆タグ、(d) 構造的な柔軟なリンカー、(e) アミノ酸をそれぞれ5個および9個含む2つのランダム化ループを有するグルマリンコア、(f) 構造的な柔軟なリンカーおよび(g) ピューロマイシン受容体分子との効率的なカップリングのための最適化されたリンカー。B) グルマリンPROfusionライブラリの構築は下記の反応を含む多段階工程である：PCR、*in vitro*転写、RNAのピューロマイシン-オリゴヌクレオチドリンカーとの化学的ライゲーション、*in vitro*翻訳、オリゴdT精製、逆転写およびHisタグ精製。

【図2】PROfusion（登録商標）選択サイクルの略図。

【図3】PTに対する結合活性を試験すべき選択されたグルマリン変異体。保存された配列モチーフが色付き囲みで強調表示されている。

【図4】PTに対する第4回のグルマリン選択の配列分析。各変異体のアミノ酸配列を1文字アミノ酸コードで示す。ライブラリの定常隣接領域およびグルマリン足場の定常領域が強調表示されている。ランダム化ループ1および2の位置が示されている。

【図5】PT（エポキシ）に対する第5a回のグルマリン選択の配列分析。各変異体のアミノ酸配列を1文字アミノ酸コードで示す。ライブラリの定常隣接領域およびグルマリン足場の定常領域が強調表示されている。ランダム化ループ1および2の位置が示されている。

【図6】PT（strept）に対する第5b回のグルマリン選択の配列分析。各変異体のアミノ酸配列を1文字アミノ酸コードで示す。ライブラリの定常隣接領域およびグルマリン足場の定常領域が強調表示されている。ランダム化ループ1および2の位置が示されている。

【図7】PT（strept）に対する第6a回のグルマリン選択の配列分析。各変異体のアミノ酸配列を1文字アミノ酸コードで示す。ライブラリの定常隣接領域およびグルマリン足場の定常領域が強調表示されている。ランダム化ループ1および2の位置が示されている。

【図8】PT（strept）に対する第6b回のグルマリン選択の配列分析。各変異体のアミノ酸配列を1文字アミノ酸コードで示す。ライブラリの定常隣接領域およびグルマリン足場の定常領域が強調表示されている。ランダム化ループ1および2の位置が示されている。

【図9】PTに対する結合活性を試験すべき選択されたPP26変異体。保存された配列モチーフが強調表示されている。

10

20

30

40

50

【図10】PTに対する第4回のPP26選択の配列分析。各変異体のアミノ酸配列を1文字アミノ酸コードで示す。ライブラリの定常隣接領域が強調表示されている。

【図11】PT(エポキシ)に対する第5a回のPP26選択の配列分析。各変異体のアミノ酸配列を1文字アミノ酸コードで示す。ライブラリの定常隣接領域を淡黄色囲みで示す。保存された配列モチーフが強調表示されている。

【図12】PT(strep)に対する第5b回のPP26選択の配列分析。各変異体のアミノ酸配列を1文字アミノ酸コードで示す。ライブラリの定常隣接領域を淡黄色囲みで示す。保存された配列モチーフが強調表示されている。

【図13】PTに対する第6a回のPP26選択の配列分析。各変異体のアミノ酸配列を1文字アミノ酸コードで示す。ライブラリの定常隣接領域を淡黄色囲みで示す。保存された配列モチーフが強調表示されている。

【図14】PTに対する第6b回のPP26選択の配列分析。各変異体のアミノ酸配列を1文字アミノ酸コードで示す。ライブラリの定常隣接領域が強調表示されている。

【図15】合成ビオチン化コアペプチドのストレプトアビジンセファロースへの固定化および精製PTとの結合の確認。PTの非結合画分を、結合後の上清の1/40容の12% NuPageゲルでのMES泳動緩衝液を用いた分離によって分析した(上側ゲル)。セファロースに結合したPTを分析するため、溶出液の50%を12% NuPageゲルでMES泳動緩衝液を用いて分離した(下側ゲル)。検出は銀染色によって実施した。グルマリンペプチド15および9を除いて、規定量の精製PTを定量の標準として使用した。

【図16】試料A(左側ゲル)および試料B(右側ゲル)からのPTの精製。セファロースに結合したPTを分析するため、溶出液の50%を12% NuPageゲルでMES泳動緩衝液を用いて分離した(下側ゲル)。検出は銀染色によって実施した。グルマリンペプチド9を除いて、規定量の精製PTを定量の標準として使用した。

【図17】試料AまたはBから固定化ペプチドpp26クローン9および15およびグルマリンククローン9および15に結合したPTの洗浄条件の、50mM Tris/HCl、pH7.5または50mM酢酸、pH6の洗浄3回を用いた最適化。PTを12% BisTrisゲルで分析しおよび銀染色によって可視化した。PPM: protein perfectマーカー。

【図18】試料Bから固定化ペプチドpp26クローン9に結合したPTの洗浄条件の、50mM Tris/HCl、pH7.5または50mM酢酸、pH6の洗浄3~20回を用いた最適化。を12% BisTrisゲルで分析しおよび銀染色によって可視化した。

【図19】ペプチドストレプトアビジンセファロースからの、0.2から2.0M MgCl₂を含む50mM Tris/HClを用いたPTの溶出。ペプチドに結合したPTをペプチド-ストレプトアビジンセファロースから、表示の溶出緩衝液(各20μl)での3回連続洗浄によって置換した。残存物質を続いてゲル装填緩衝液で溶出した。全ての溶出液を12% BisTrisゲル(1xMES泳動緩衝液)で分析しおよび銀染色によって可視化した。

【図20】酸性(50mMグリシン、pH2.5)または塩基性(100mM炭酸緩衝液pH10.5)条件下でのペプチドストレプトアビジンセファロースからのPTの溶出。ペプチドに結合したPTをペプチドストレプトアビジンセファロース(1種類のペプチド200pmolまでを含む20μl)から、表示の溶出緩衝液(各40μl)での3回連続洗浄によって置換した。残存物質を続いてゲル装填緩衝液で溶出した。全ての溶出液を12% BisTrisゲル(1xMES泳動緩衝液)で分析しおよび銀染色によって可視化した。ペプチドストレプトアビジンセファロースの試料Aとのインキュベート後の素通り画分の1/40容を、各ペプチドについて同一ゲルで分析した。

【図21】アフィニティリガンドとして固定化pp26ペプチド9を有するストレプトアビジンセファロースでの、試料BからのPTの小スケールカラム精製(A)、精製PTの収量のゲル推定(B)。

【図22】アフィニティリガンドとしてグルマリンペプチド15を有するストレプトアビ

10

20

30

40

50

ジンセファロースでの、試料 B からの P T の小スケールカラム精製 (A)、精製 P T の収量のゲル推定 (B)。

【図 2 3】ストレプトアビジンセファロース (1 m l 当たり) への固定化に用いられたさまざまな量のペプチド (表示の通り) に依存する、ペプチドストレプトアビジンセファロースへの P T 結合。結合した P T の量は、同一ゲル上の規定量の精製 P T との直接比較によって定量した。例として、 p p 2 6 / 9 を、 m l 当たりのストレプトアビジンセファロースに固定化に用いたペプチドの量に対してプロットする。最高の結合は P T 約 1 0 0 ~ 1 5 0 p m o l で生じると推定された。

【図 2 4】ペプチドストレプトアビジンセファロース 1 μ l 当たり、または 6 . 8 5 R I アシアロフェチュインセファロース 6 . 8 5 μ l 当たりの、さまざまな量のインプット材料 (試料 B) の関数としての P T 収量。溶出した P T の量は同一ゲル上の規定量の精製 P T との直接比較を基礎として計算し、および表 1 2 に列記する。

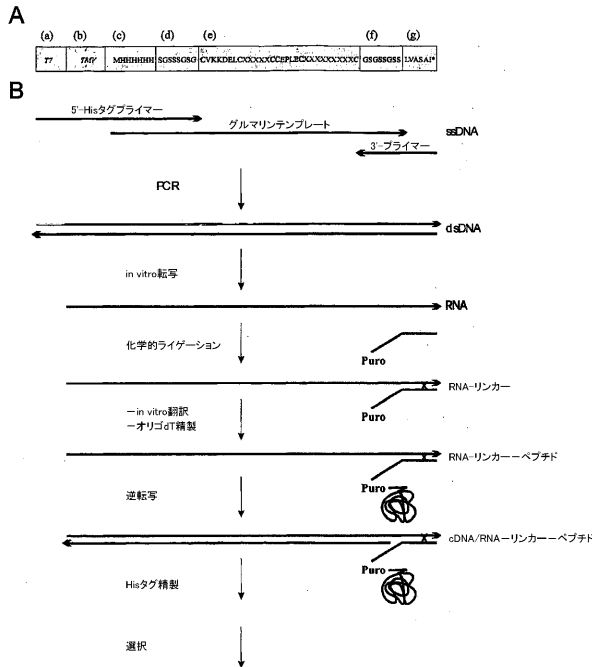
【図 2 5】繰り返し P T 結合および溶出のためのペプチドセファロース再使用。ストレプトアビジンセファロースに結合した P T を、 1 0 0 m M 炭酸緩衝液 p H 1 0 . 5 を用いて 4 回溶出し、およびカラムマトリクスを 1 0 m M H C l で再生した。

【図 2 6】試料 B からの p p 2 6 / 9 ペプチドストレプトアビジンセファロース (0 . 5 m l) での F P L C カラム精製後の P T 溶出画分。溶出画分 (溶出液各 5 0 0 μ l のうち 0 . 5 μ l) を P A G E (1 2 % B i s - T r i s - ゲル、 M E S 泳動緩衝液) および銀染色によって分析した。規定量の精製 P T を直接比較のために同一ゲル上で分離した。 P T の濃度は溶出画分の 2 8 0 n m での吸収 (A _{2 8 0}) を測定することによって測定し、および精製 P T 標準と比較した (表参照) 。

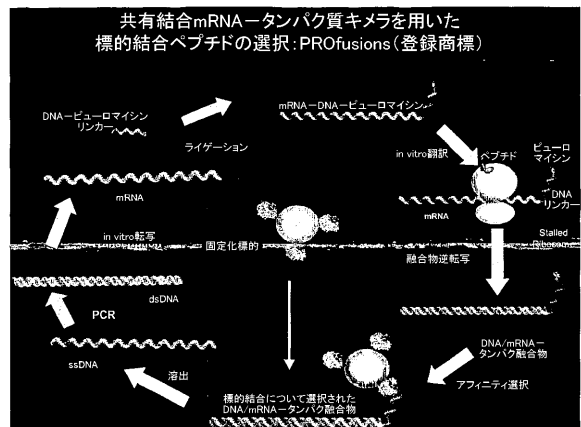
10

20

【図 1】

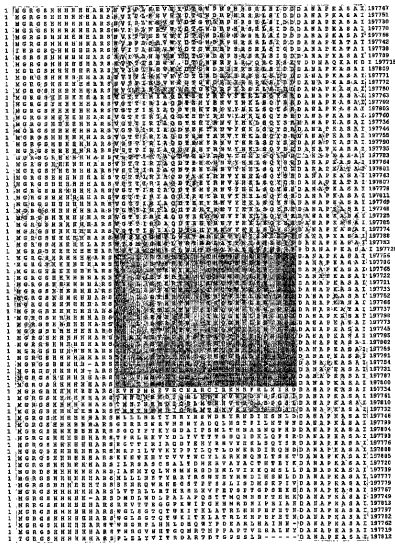


【図 2】



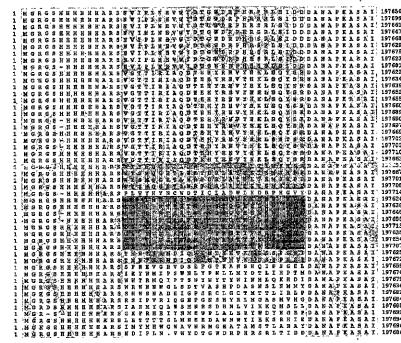
【 図 1 1 】

FIGURE 11



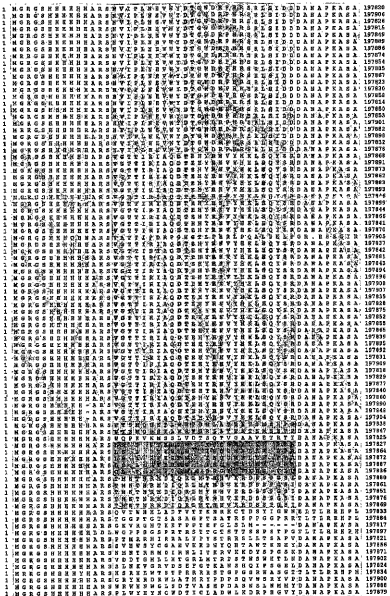
【 図 1 2 】

FIGURE 12



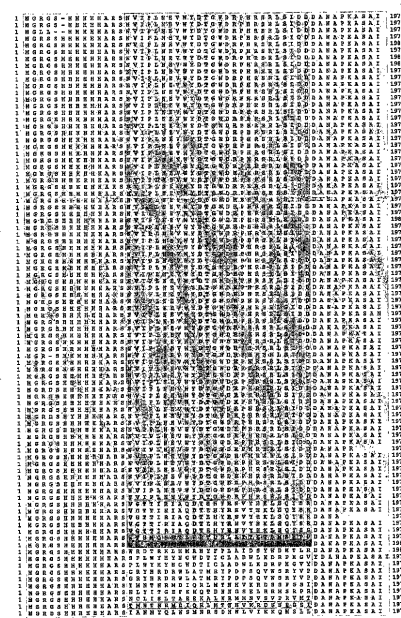
【 図 1 3 】

FIGURE 13

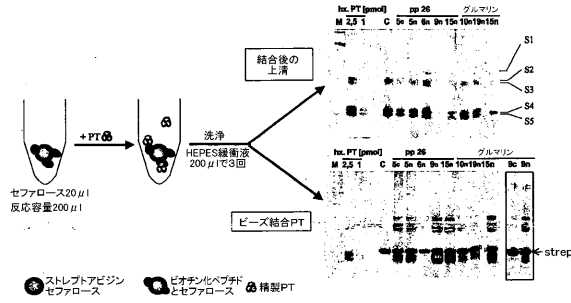


【 図 1 4 】

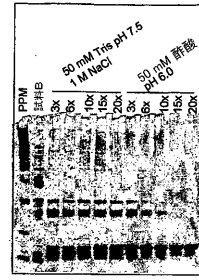
FIGURE 14



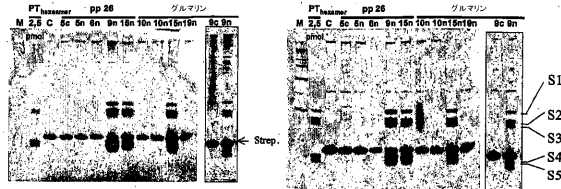
【 図 1 5 】



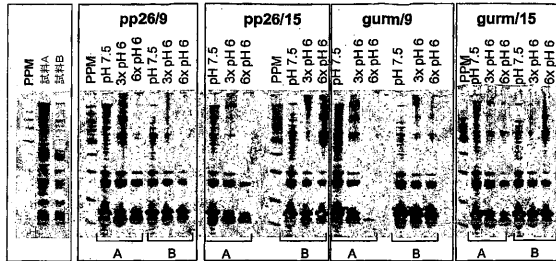
【 図 1 8 】



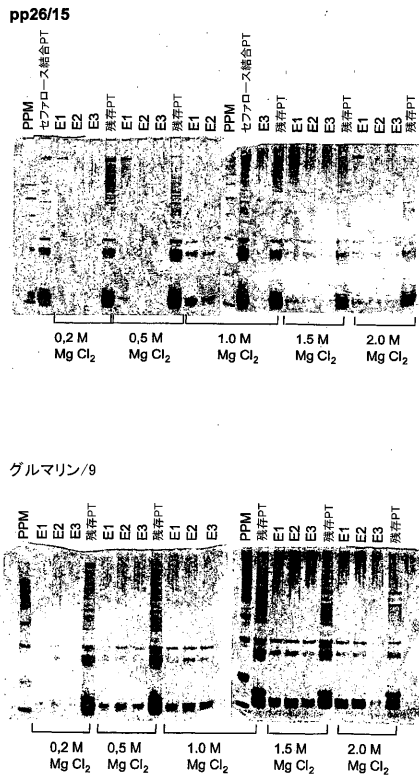
【 図 1 6 】



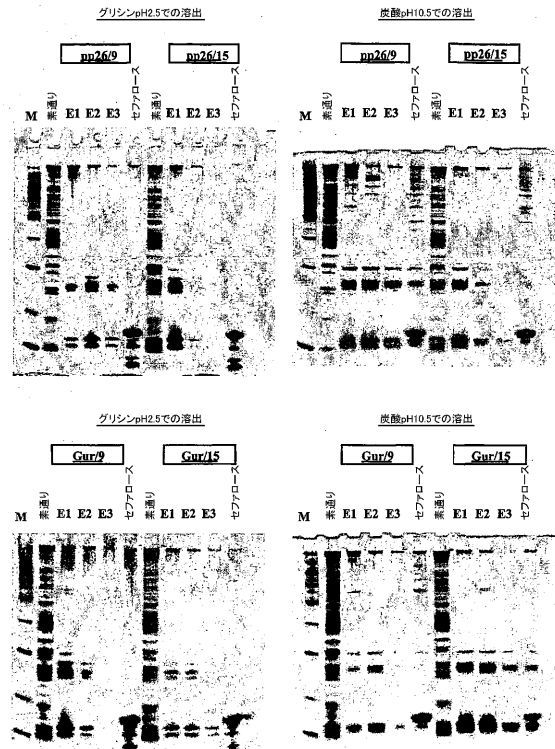
【 図 1 7 】



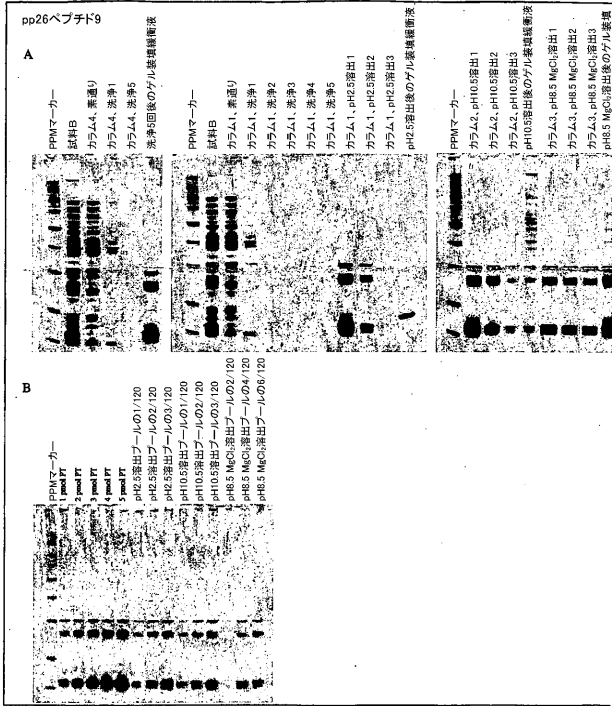
【 図 1 9 】



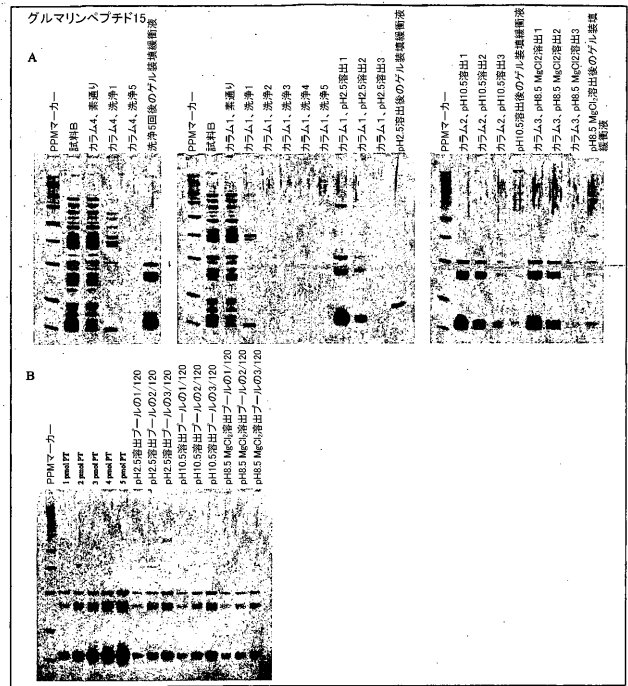
【 図 2 0 】



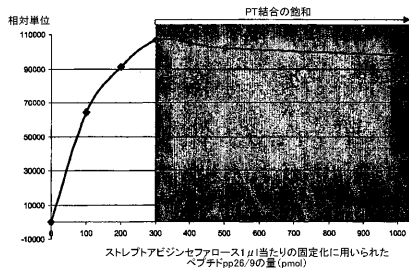
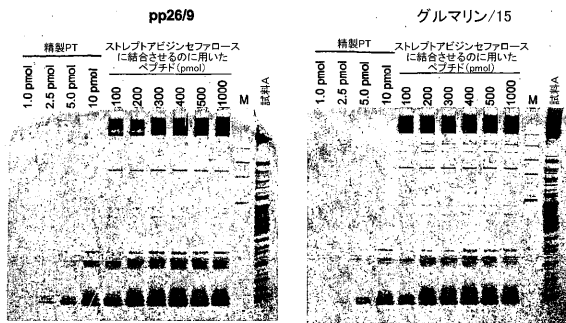
【 図 2 1 】



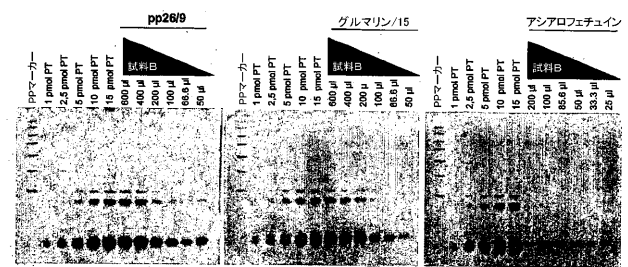
【 図 2 2 】



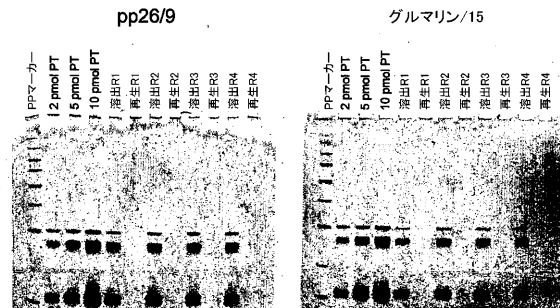
【 図 2 3 】



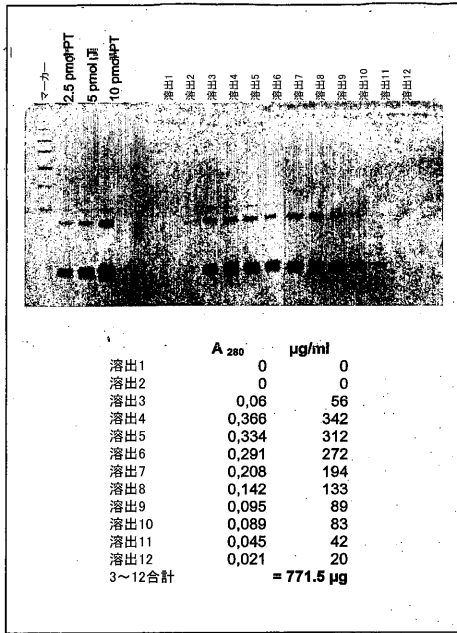
【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



【 図 2 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT, 2004/038700
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C12P19/34 C12P21/06 G01N33/547 C07K14/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q C12P G01N 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, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU R ET AL: "19 OPTIMIZED SYNTHESIS OF RNA-PROTEIN FUSIONS FOR IN VITRO PROTEIN SELECTION" METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, vol. 318, 2000, pages 268-293, XP002909305 ISSN: 0076-6879 page 289 - page 290; figures 2,3 ----- -/--	3-25, 27, 28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 22 June 2005		Date of mailing of the international search report 09/08/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mabit, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern:	pplication No
PCT, J04/038700	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KURZ M ET AL: "cDNA - protein fusions: covalent protein - gene conjugates for the in vitro selection of peptides and proteins." CHEMBIOCHEM : A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY. 3 SEP 2001, vol. 2, no. 9, 3 September 2001 (2001-09-03), pages 666-672, XP002332971 ISSN: 1439-4227 figure 2</p>	3-25,27, 28
A	<p>US 6 602 685 B1 (LOHSE PETER) 5 August 2003 (2003-08-05)</p>	
A	<p>BOGDAN JOHN A ET AL: "Identification of peptides that mimic the pertussis toxin binding site on bovine fetuin." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 69, no. 10, October 2003 (2003-10), pages 6272-6279, XP002332972 ISSN: 0099-2240 cited in the application</p>	

International Application No. PCT/US2004 /038700

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1, 2, 26, 29-51

The specific sequences of claims 1, 2, 26, 29-51 have, according to PCT Rule 13ter.1.c, not been searched since the Sequence Listing as present in the description does not comply with WIPO Standard ST25 prescribed in the administrative instructions under Rule 5.2. The Sequence Listing has been furnished neither in paper form nor in machine readable form as provided for in the same instructions and the Applicant has not remedied the disclosed deficiencies within the time limit fixed in the invitation pursuant to PCT Rule 13ter.1.a. Therefore, claims related to specific sequences were not searched. The Attention to the Applicant is drawn to the fact that in addition claims 8 and 9 were searched only partially, i.e. when they do not related to said specific sequences.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US2004/038700
Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1, 2, 26, 29-51
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/038700

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6602685	B1	05-08-2003	AU 757955 B2	13-03-2003
			AU 6129699 A	06-03-2000
			CA 2337490 A1	24-02-2000
			EP 1105360 A1	13-06-2001
			JP 2002522057 T	23-07-2002
			WO 0009464 A1	24-02-2000

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
A 6 1 K	39/10	(2006.01)	A 6 1 K	39/10	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	39/02	(2006.01)	A 6 1 P	39/02	
B 0 1 J	20/24	(2006.01)	B 0 1 J	20/24	C
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
			G 0 1 N	33/53	U

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

(72) 発明者 ユングブルート, アンドレーアス

ドイツ連邦共和国 6 6 5 7 1 エッペルボルン - フォーム シュタイナカーシュトラッセ 6 0

(72) 発明者 シュナイダー, エーバーハルト

ドイツ連邦共和国 3 8 3 2 1 デンクテ アム ゴールベルク 4

(72) 発明者 ヴァーグナー, ペーター

ドイツ連邦共和国 3 8 1 2 6 ブラウンシュヴァイク ラントヴェールシュトラッセ 7アー

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA38 BA80 CA01 CA11 HA03 HA08

4B063 QA13 QA18 QQ42 QQ79 QR06 QR08 QR32 QR35 QR42 QR56

QR62 QS25 QS34 QX02

4C085 AA03 AA05 BA17 CC07 CC24 DD33 DD51 DD61 EE01

4G066 AC02C AC03B BA09 CA20 DA07 GA11

4H045 AA10 AA20 AA30 BA13 BA14 BA15 BA18 BA54 CA30 EA31

EA65 FA33 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2008504802A5	公开(公告)日	2008-06-26
申请号	JP2006541372	申请日	2004-11-18
[标]申请(专利权)人(译)	赛诺菲巴斯德有限公司		
申请(专利权)人(译)	赛诺菲巴斯德公司		
[标]发明人	ユングブルートアンドレーアス シュナイダーエーバーハルト ヴァーグナーペーター		
发明人	ユングブルート,アンドレーアス シュナイダー,エーバーハルト ヴァーグナー,ペーター		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/415 C07K1/22 C12Q1/68 A61K39/00 A61K39/10 A61P31/04 A61P39/02 B01J20/24 G01N33/53		
CPC分类号	C12N9/1048 C07K14/003 C07K14/235		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/415 C07K1/22 C12Q1/68.Z A61K39/00.D A61K39/10 A61P31/04 A61P39/02 B01J20/24.C G01N33/53.D G01N33/53.U		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA38 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA03 4B024/HA08 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR06 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C085/AA03 4C085/AA05 4C085/BA17 4C085/CC07 4C085/CC24 4C085/DD33 4C085/DD51 4C085/DD61 4C085/EE01 4G066/AC02C 4G066/AC03B 4G066/BA09 4G066/CA20 4G066/DA07 4G066/GA11 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA18 4H045/BA54 4H045/CA30 4H045/EA31 4H045/EA65 4H045/FA33 4H045/GA26		
代理人(译)	佐久间刚		
优先权	60/523881 2003-11-20 US		
其他公开文献	JP2008504802A JP4885729B2		

摘要(译)

本发明涉及纯化百日咳毒素 (PT) 的试剂和方法。