

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/159655

発行日 平成31年3月14日 (2019.3.14)

(43) 国際公開日 平成29年9月21日 (2017.9.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/00 (2006.01)	C07K 14/00 ZNA	4H045
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/09 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

出願番号 特願2018-505936 (P2018-505936)	(71) 出願人 505127721 公立大学法人大阪府立大学 大阪府堺市中区学園町1番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/010115	
(22) 国際出願日 平成29年3月14日 (2017.3.14)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-49153 (P2016-49153)	(74) 代理人 100104307 弁理士 志村 尚司
(32) 優先日 平成28年3月14日 (2016.3.14)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 藤井 郁雄 大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学 法人大阪府立大学内
	Fターム(参考) 4H045 AA10 BA19 BA32 EA22 FA33

最終頁に続く

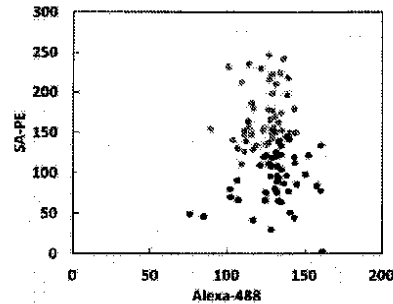
(54) 【発明の名称】 I g G結合性ペプチド

(57) 【要約】

【課題】免疫グロブリンG (I g G) に対する結合性が強いペプチドを提供する。

【解決手段】本発明に係るペプチドは配列番号1に示すアミノ酸配列を有する。但し、同アミノ酸配列中、N末端のアミノ酸から16番目のアミノ酸 (X16) がL、M、I又はFであり、N末端のアミノ酸から17番目のアミノ酸 (X17) がR、K、Y又はQであり、N末端のアミノ酸から19番目のアミノ酸 (X19) は任意のアミノ酸であり、N末端のアミノ酸から20番目のアミノ酸 (X20) は任意のアミノ酸であり、N末端のアミノ酸から26番目のアミノ酸 (X26) はG又はE若しくは欠失しており、N末端のアミノ酸から29番目のアミノ酸 (X29) は任意のアミノ酸であり、N末端のアミノ酸から30番目のアミノ酸 (X30) は任意のアミノ酸であり、N末端のアミノ酸から32番目のアミノ酸 (X32) は任意のアミノ酸であり、N末端のアミノ酸から33番目のアミノ酸 (X33) が任意のアミノ酸である。

【選択図】図3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列を有するペプチド。

但し、同アミノ酸配列中、

N 末端のアミノ酸から 16 番目のアミノ酸 (X16) が L、M、I 又は F であり、
 N 末端のアミノ酸から 17 番目のアミノ酸 (X17) が R、K、Y 又は Q であり、
 N 末端のアミノ酸から 19 番目のアミノ酸 (X19) は任意のアミノ酸であり、
 N 末端のアミノ酸から 20 番目のアミノ酸 (X20) は任意のアミノ酸であり、
 N 末端のアミノ酸から 26 番目のアミノ酸 (X26) は G 又は E 若しくは欠失しており、
 N 末端のアミノ酸から 29 番目のアミノ酸 (X29) は任意のアミノ酸であり、
 N 末端のアミノ酸から 30 番目のアミノ酸 (X30) は任意のアミノ酸であり、
 N 末端のアミノ酸から 32 番目のアミノ酸 (X32) は任意のアミノ酸であり、
 N 末端のアミノ酸から 33 番目のアミノ酸 (X33) が任意のアミノ酸である。

10

【請求項 2】

配列番号 1 のアミノ酸配列を有するペプチド。

但し、同アミノ酸配列中、

N 末端のアミノ酸から 16 番目のアミノ酸 (X16) が L、M、I 又は F であり、
 N 末端のアミノ酸から 17 番目のアミノ酸 (X17) が R、K、Y 又は Q であり、
 N 末端のアミノ酸から 19 番目のアミノ酸 (X19) が V、A、L、M、F 又は I であり

20

N 末端のアミノ酸から 20 番目のアミノ酸 (X20) は任意のアミノ酸であり、
 N 末端のアミノ酸から 26 番目のアミノ酸 (X26) は G 又は E 若しくは欠失しており、
 N 末端のアミノ酸から 29 番目のアミノ酸 (X29) が I、A、L、V、M 又は F であり

N 末端のアミノ酸から 30 番目のアミノ酸 (X30) が任意のアミノ酸であり、
 N 末端のアミノ酸から 32 番目のアミノ酸 (X32) が A、L、F、M 又は I であり、
 N 末端のアミノ酸から 33 番目のアミノ酸 (X33) が N、D、H、A、T 又は G である

請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

30

配列番号 1 のアミノ酸配列中、

N 末端のアミノ酸から 16 番目のアミノ酸 (X16) が L 又は M であり、
 N 末端のアミノ酸から 17 番目のアミノ酸 (X17) が R 又は K であり、
 N 末端のアミノ酸から 19 番目のアミノ酸 (X19) が V、A、L 又は M であり、
 N 末端のアミノ酸から 29 番目のアミノ酸 (X29) が I、A、L、V 又は M であり、
 N 末端のアミノ酸から 32 番目のアミノ酸 (X32) が A、L 又は F であり、
 N 末端のアミノ酸から 33 番目のアミノ酸 (X33) が N、D、H、A 又は T である、

請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 4】

40

配列番号 1 のアミノ酸配列中、

N 末端のアミノ酸から 16 番目のアミノ酸 (X16) が L 又は M であり、
 N 末端のアミノ酸から 17 番目のアミノ酸 (X17) が R 又は K であり、
 N 末端のアミノ酸から 19 番目のアミノ酸 (X19) が A 又は V であり、
 N 末端のアミノ酸から 20 番目のアミノ酸 (X20) が G、Q、R 又は A であり、
 N 末端のアミノ酸から 26 番目のアミノ酸 (X26) は G であり、
 N 末端のアミノ酸から 29 番目のアミノ酸 (X29) が I、A、L 又は V であり、
 N 末端のアミノ酸から 30 番目のアミノ酸 (X30) が A、T、Q、E 又は S であり、
 N 末端のアミノ酸から 32 番目のアミノ酸 (X32) が A、L 又は F であり、
 N 末端のアミノ酸から 33 番目のアミノ酸 (X33) が A 又は N である、

請求項 1 に記載のペプチド。

50

【請求項 5】

前記アミノ酸配列中、N末端のアミノ酸から12番目のアミノ酸(I12)が任意のアミノ酸である請求項1~4の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項 6】

前記アミノ酸配列中、N末端のアミノ酸から12番目のアミノ酸(I12)がAである請求項1~4の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項 7】

前記アミノ酸配列中、N末端のアミノ酸から39番目のアミノ酸(L39)がAである請求項1~6の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項 8】

前記アミノ酸配列中、N末端から5番目のシステインとC末端のシステインがジスルフィド結合した請求項1~7の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項 9】

前記アミノ酸配列中、N末端から5番目のシステイン及び/又はC末端のシステインが任意のアミノ酸で置換された請求項1~7の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項 10】

前記アミノ酸配列中、N末端から5番目のシステイン及び/又はC末端のシステインがグルタミンで置換された請求項1~7の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項 11】

ヒト免疫グロブリンGに対する解離定数(K_D)が、3000nM以下、好ましくは1000nM以下、望ましくは100nM以下である請求項1~10の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項 12】

配列番号2~51の何れかのアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項 13】

配列番号2~51の何れかのアミノ酸配列を有し、アミノ酸配列のN末端から5番目のシステインと、同アミノ酸配列のC末端のシステインがジスルフィド結合したペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫グロブリンGに対する結合性を有するペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

血液や血漿などの体液成分から、免疫グロブリンG(IgG)を本体とする自己抗体及び免疫複合体を特異的に吸着体に吸着除去することで、生体免疫機能に関係した自己免疫疾患の進行を防止し、疾患の症状を軽減せしめる方法が知られている。

【0003】

このような目的に使用されうる吸着材として、例えば特許文献1には、ヘリックス-ループ-ヘリックス構造を有するIgG結合性ペプチドをIgG型抗体として担体に結合させたIgG型抗体吸着材が開示されている。また、非特許文献1にも、同じくヘリックス-ループ-ヘリックス構造を有するIgG結合性ペプチドが開示されている。

【0004】

しかしながら、これらのIgG結合性ペプチドのIgGに対する結合性はまだ十分であるとは言えず、更に結合性の高いIgG型抗体が求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2015-74626号公報

【非特許文献】

【0006】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】K. Kawabata, et ail., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 22(2014), 1845-1849

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、さらに結合性の強いヘリックス-ループ-ヘリックス構造のIgG結合性ペプチドを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本願発明に係るペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列を有する。ここで配列番号1に示すアミノ酸配列中のアミノ酸Xは下記のとおりである。

【発明の効果】

【0009】

本願発明に係るペプチドは、ヒト免疫グロブリン(IgG)に対して強い結合性を示す。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は本発明に係るペプチドのデザインを示す図である。同図(A)は基本構造となるHLHの構造を、同図(B)はデザインされたペプチドの構造を示す。

【図2】図2はIgG結合性ペプチドライブラリーのスクリーニングを示す図であって、(A)は参考となるIgG結合性ペプチド(FK60)の結果を、(B)は第1ラウンド後の結果を、(C)は第2ラウンド後の結果を、(D)は第3ラウンド後の結果を示す。

【図3】図3は蛍光プレートリーダーによるIgG結合性ペプチドの活性を示す図である。

【図4】図4は選択された強いIgG結合性を有するペプチドの改変部位におけるアミノ酸の出現頻度を表す図である。

【図5】図5は得られたIgG結合性ペプチドのCDスペクトルである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明に係るペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列(FNMQCQAEFYELHEXXAXXGGGGGXGKXXAXXAKIAALRDAC:但しXは下記に示す。)を有する。当該ペプチドは、非環状ペプチドであるか、配列番号1に示すアミノ酸配列のN末端から5番目のシステイン(C5:アミノ酸コードに付加された数字は各アミノ酸配列におけるN末端からの位置を示す(以下同じ。))とC末端のシステインがジスルフィド結合により環状化した環状ペプチドである。

【0012】

本発明に係るペプチドは、各種動物、特にヒトのIgGに対して強い結合性を示す。本発明において結合性はヒトIgGに対する解離定数(K_D)で評価される。解離定数の算出方法は当業者に公知であり、例えば実施例に記載の測定方法により求められる。好ましい解離定数(K_D)は3000nM以下であり、好ましくは1000nM以下、より好ましくは100nM以下、望ましくは50nM以下、さらに望ましくは10nM以下である。

【0013】

本発明に係るペプチドは、論理的にはN末端側及びC末端側のそれぞれ14アミノ酸残基からなる2本のヘリックスが6つ又は7つのグリシン残基で結合したヘリックス-ループ-ヘリックス構造(HLH構造)を有する。このHLH構造を有するペプチドでは、2本のヘリックスは、内側に存在するロイシン側鎖の疎水相互作用等により安定なHLH構造を形成し、さらに、N末端およびC末端にシステインを導入して分子内ジスルフィド架橋することでさらに立体構造の安定性が向上する(Suzuki, N., Fujii, I., Optimization of the loop length for folding of a helix-loop-helix peptide, Tetrahedron Lett. 40, 6013 (1999)、Fujii I, Takaoka Y., Suzuki K., Tanaka, T., A Conforma

10

20

30

40

50

tionally Purified - Helical Peptide Library, Tetrahedron Lett. 42, 3323 (2001))。本発明においては、このようなH L H構造を有するペプチドが好ましいが、I g G結合性を有する限り必ずしもこのようなH L H構造を有するペプチドでなくとも差し支えない。

【0014】

本発明に係るペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列を有する。このアミノ酸配列中のXはそれぞれ、X16(配列番号1に示すN末端のアミノ酸から16番目のアミノ酸)がL、M、I又はFであり、X17(配列番号1に示すN末端のアミノ酸から17番目のアミノ酸)がR、K、Y又はQであり、X19(配列番号1に示すN末端のアミノ酸から19番目のアミノ酸)、X20(配列番号1に示すN末端のアミノ酸から20番目のアミノ酸)、X29(配列番号1に示すN末端のアミノ酸から29番目のアミノ酸)、X30(配列番号1に示すN末端のアミノ酸から30番目のアミノ酸)、X32(配列番号1に示すN末端のアミノ酸から32番目のアミノ酸)及びX33(配列番号1に示すN末端のアミノ酸から33番目のアミノ酸)はそれぞれ任意のアミノ酸である。また、X26(配列番号1に示すN末端のアミノ酸から26番目のアミノ酸)はG又はEあるいは欠失している。

10

【0015】

本願発明に係るペプチドは、上記ペプチドの中でも、好ましくはX16がL、M、I又はFであり、X17がR、K、Y又はQであり、X19がV、A、L、M、F又はIであり、X29がI、A、L、V、M又はFであり、X32がA、L、F、M又はIであり、X33はN、D、H、A、T又はGである。さらには、X16がL又はMであり、X17がR又はKであり、X19がV、A、L又はMであり、X29がI、A、L、V又はMであり、X32がA、L又はFであり、X33はN、D、H、A又はTであるペプチドがより好ましい。また、上記ペプチドの中でも、X16がL又はMであり、X17はR又はKであり、X19がA又はVであり、X20がG、Q、R又はAであり、X26がGであり、X29がI、A、L又はVであり、X30がA、T、Q、E又はSであり、X33はA又はNであるペプチドが好ましい。より具体的にはペプチドは配列番号2~51に示すペプチドが好ましく、特に好ましいペプチドは配列番号9(FK6014:FNMQCQAEFYELHELRAVGGGGGGGKVAALNAKIAALRDAC)、配列番号21(FK6032:FNMQCQAEFYELHEMRAVQGGGGGGGKITALNAKIAALRDAC)、配列番号33(FK6053:FNMQCQAEFYELHELKAVRGGGGGGGKIQALNAKIAALRDAC)、配列番号41(KF6063:FNMQCQAEFYELHEMRAVAGGGGGGGKLEAFNAKIAALRDAC)、配列番号43(FK6065:FNMQCQAEFYELHELRAVQGGGGGGKISALNAKIAALRDAC)の何れかの配列番号に示されるアミノ酸配列を有する。

20

30

【0016】

さらに、本発明のペプチドは、配列番号1において、I12(配列番号1に示すN末端のアミノ酸から12番目のアミノ酸であるイソロイシン)及びノ又はL39(配列番号1に示すN末端のアミノ酸から39番目のアミノ酸であるロイシン)が任意のアミノ酸であるペプチドでもあり得る。例えば12番目のアミノ酸及びノ又は39番目のアミノ酸がアラニンであるペプチドである。

【0017】

本発明において、上記ペプチドを構成するアミノ酸は、ペプチドが所望のI g G結合性を有する限り、天然アミノ酸であっても、天然アミノ酸の誘導体や非天然アミノ酸であってもよい。好ましくは、上記ペプチドを構成するアミノ酸は天然アミノ酸である。天然アミノ酸の誘導体としては、例えば、ヒドロキシ基が導入されたアミノ酸であるヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン等、アミノ基が導入されたアミノ酸であるジアミノプロピオン酸等が挙げられるがこれらに限定されない。非天然アミノ酸の例としては、主鎖の構造が天然型と異なる、 β -二置換アミノ酸(β -メチルアラニンなど)、N-アルキル-L-アミノ酸、D-アミノ酸、 α -アミノ酸、 α -ヒドロキシ酸など；側鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸(ノルロイシン、ホモヒスチジンなど)、側鎖に余分のメチレンを有するホモアミノ酸(ホモフェニルアラニン、ホモヒスチジンなど)及び側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換されるアミノ酸(システイン酸など)などが挙げられるがこれらに限定されない。

40

50

【 0 0 1 8 】

また、本発明に係るペプチドは、配列番号 1 の何れかに示すアミノ酸配列のシステイン C5 と C 末端のシステイン C がジスルフィド結合して環状化したものが好ましい。環化することでペプチドの立体構造がより安定化する。環化に際しては、好ましくは環状化に利用される N 末端側のシステインと、H L H 構造の N 末端側の α -ヘリックスの N 末端アミノ酸の間に 1 ~ 3 個程度のアミノ酸を有し、H L H 構造の C 末端側の α -ヘリックスの C 末端アミノ酸と環状化に利用される C 末端側のシステインとの間に 1 ~ 3 個程度のアミノ酸が挿入され得る。例えば、配列番号 1 のアミノ酸配列では、環状化に利用される N 末端のシステイン C5 と α -ヘリックスの N 末端のアラニン A7 の間にグルタミン Q6 を、環状化に利用される C 末端のシステイン C43 と α -ヘリックスの C 末端のアスパラギン酸 D41 の間にアラニン A42 を有する。また、配列番号 1 ~ 5 1 に何れかに記載のアミノ酸配列中、N 末端から 5 番目及び C 末端の 2 つのシステインは、相互に結合して環状ペプチドを形成するアミノ酸でそれぞれ置換されていてもよく、置換されたペプチドの相互結合により環化され得る。

10

【 0 0 1 9 】

本発明に係るペプチドは、配列番号 1 ~ 5 1 の何れかに記載のアミノ酸配列中、N 末端から 5 番目のシステイン及び C 末端のシステインのいずれか又は両方が任意のアミノ酸（例えば、荷電を有さないアミノ酸、好ましくは Q）で置換されたペプチドでもあり得る。本発明者らは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するペプチドと構造が類似し、N 末端から 5 番目及び C 末端にシステインを有するペプチドにおいて、5 番目のシステインを同じく荷電を有さないグルタミンに置換しても、I g G に対する解離定数に大きな影響がなかったことを確認している。

20

【 0 0 2 0 】

本発明に係るペプチドは、配列番号 1 ~ 5 1 のアミノ酸配列に 1 ~ 数個、好ましくは 1 ~ 3 個のアミノ酸が付加又は欠損、置換されたペプチドでもあり得る。アミノ酸配列の全長は 3 8 以上、5 0 以下である。

【 0 0 2 1 】

上記ペプチドのうち非環状のペプチドは、種々の公知であるペプチド合成方法に従って合成することが出来る。例えば F m o c 固相合成法、フラグメント縮合法等の液相合成法が挙げられる。操作が簡便である点から、固相合成法が好ましく用いられる。また、環状のペプチドは、非環状のペプチドを得た後これを環化して得ることができる。例えば、アミノ酸配列中の 2 つのシステイン間に、公知の手法によってジスルフィド結合を形成することにより環化できる。また、公知の手法によって、分子内でチオエステルやチオエーテル結合を形成することによっても環化できる。さらに、例えば高度希釈法など公知の手法により分子内でカルボキシ基とアミノ基を縮合させることで環化してもよい。

30

【 0 0 2 2 】

非環状ペプチドは、上述の固相合成法及び液相合成法等の化学合成法によらず、遺伝子工学的手法を用いることでも製造できる。例えば、前記アミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸を適切な発現ベクターに組み込み、得られた発現ベクターによって適切な宿主細胞（例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、大腸菌）を形質転換する。そして、上記宿主細胞をペプチドの発現に適する条件下で培養した後、培養物からペプチドを分離すればよい。

40

【 0 0 2 3 】

以下、下記の実施例に基づき本願発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されないのは言うまでもない。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 4 】

〔ペプチドライブラリーの作製〕

特許文献 1 に記載された H L H 構造を有する非環状ペプチド（配列番号 5 2 に示すアミノ酸配列を有する）に種々の改変を加えて、環状構造を有する環状ペプチドライブラリー

50

(配列番号1に示すアミノ酸配列を有する)を作製した(図1参照)。なお、ここでは配列番号1に示すアミノ酸配列中のX16, X19, X29, X32はPhe、Leu、Ile、Met、Valの何れかのアミノ酸となり、X17, X20, X30, X33は天然タンパク質に見いだされる20種類のアミノ酸のいずれか1種となり、X26は、Gly又はGlu若しくは欠失するようにライブラリーを構成した。ペプチドライブラリーを構成する各ペプチドは、 α -ヘリックス部分のN末側にペプチドを環化するための2つのアミノ酸(C5とQ6)と3つのアミノ酸からなるスペーサ(N2、M3、Q4)を介して結合したフェニルアラニン(F1)と、 β -ヘリックス部分のC末側にペプチドを環化するための2つのアミノ酸(A42とC43(X26が欠失している場合は41番目のA及び42番目のCを示す。))を有し、2つのシステインC5、C43はジスルフィド結合している。

10

【0025】

(1) L-Random酵母表層ペプチドライブラリーの構築

overlap extension PCR および2nd PCRにより上記で設計したアミノ酸配列を有するL-Random ペプチドライブラリーをコードした遺伝子断片を作製し、制限酵素NcoIおよびXhoIで処理した。同様に処理した酵母表層提示用ベクターpYD11-BxXNとライゲーションすることによりL-Randomペプチドライブラリーのプラスミドを構築した。大腸菌にエレクトロポレーション法により形質転換して増幅した後、酵母細胞に酢酸リチウム法により形質転換することで 9.4×10^6 のライブラリーサイズをもつL-Random酵母表層提示ペプチドライブラリーを得た。

20

【0026】

(2) human IgG-Fcに対するスクリーニング

得られたライブラリーに対してセルソーターBD FACSAria(登録商標)II(BDバイオサイエンス社)を用いてhuman IgG-Fcに対する結合性スクリーニングを行った。ペプチドファイブラリーをSG/RCAA培地(で培養することでペプチドの細胞表層への提示を誘導した。PBSで洗浄した後、bio-human IgG-Fc(最終濃度100nM: Bethyl laboratory社)およびmouse anti-FLAG抗体(Sigma社)と反応させた後、SA-PE(Streptavidin-R-phycoerythrin: Invitrogen社)およびanti-mouse-Alexa488(Alexa Flour(商標名)488 goat anti-mouse IgG(H+L): Invitrogen社)を結合させることで蛍光ラベルした。BD FACSAria(商標名)を用いて3回ソートした。

30

【0027】

このとき、human IgG-Fcに対する解離定数(KD)が既知である配列番号53で示されるアミノ酸配列(FNMQCQAEFYEILHESAADEGGGGGGGKEAARNAKIAALRDAC)を有するペプチド(FK60)が提示したクローンの蛍光強度よりも高い領域(P5領域)に設定して、スクリーニングを行った。なお、このペプチドFK60は、配列番号52に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを改変することで得られた。

【0028】

Round1では、 1×10^8 細胞をBulk sortモードによりソートし、全体の0.4%に設定したP5エリアに存在する細胞群 1.4×10^5 細胞を回収した。Round2ではRound1で回収した細胞を全てBulk sortモードでソートし、P5エリアを全体の9%に設定して9000細胞を回収した。さらに、Round3ではRound2で回収した細胞をsingle-cell sortモードでソートし、P5エリアを全体の13%に設定して96細胞を96 well SDプレート培地に回収した(図2参照)。RoundごとにP5のエリアを狭めて、蛍光強度の高い酵母細胞のみを選別した。これを30で2日間培養した。

40

【0029】

(3) human IgG-Fc結合性クローンの活性解析

前記(2)のRound3で96well SDプレートに回収した酵母細胞96クローンをSDCAA培地で培養して増幅させた後、SG/RCAA培地で再び提示を誘導して、それぞれのbio-human IgG-Fcに対する結合活性を、蛍光プレートリーダー(Varioskan)を用いて測定した。結合活性を示すR-PEの相対蛍光強度(RFU)と同時に測定したペプチドの提示量を示すAlexa-488の相対蛍光強度(RFU)との関係を図にプロットした(図3参照)。そのうち、R-PEの相対

50

蛍光強度の高い約50のクローン（図に薄い黒丸で示される）を選択して、コロニー-PCRによってそれぞれのクローンが保持するペプチドをコードした遺伝子断片を増幅させた。得られた遺伝子断片を鋳型としてシーケンシング反応を行い、遺伝子断片のDNA配列を解析することで提示するクローンが保持するペプチドのアミノ酸配列を決定した（表1）。そして、スクリーニングによって得られたペプチドのアミノ酸の出現頻度をweb logoを用いて調べたところ、図4に示す結果となった。

【0030】

【表 1】

library	FNMQCQAEFYELLHEXXXGGGGGXGKXXAKIAALRDAC	配列番号 1
FK6001	-----MR-MK-----G--IS-LN-----	配列番号 2
FK6006	-----LK-FN-----G--VP-LN-----	配列番号 3
FK6007	-----LR-VS-----G--IS-LH-----	配列番号 4
FK6008	-----LR-LG-----G--IS-LN-----	配列番号 5
FK6009	-----MR-I-----G--LQ-MN-----	配列番号 6
FK6010	-----LR-VR-----G--IH-LN-----	配列番号 7
FK6011	-----LR-VE-----G--LA-LN-----	配列番号 8
FK6014	-----LR-VG-----G--VA-LN-----	配列番号 9
FK6015	-----IR-VG-----G--MR-LN-----	配列番号 10
FK6016	-----IR-VR-----G--II-MN-----	配列番号 11
FK6017	-----MK-MS-----G--IP-LN-----	配列番号 12
FK6018	-----MR-VA-----G--IT-FD-----	配列番号 13
FK6019	-----MK-VA-----G--II-LD-----	配列番号 14
FK6022	-----LR-VV-----G--IR-LN-----	配列番号 15
FK6024	-----IR-LG-----G--LQ-FN-----	配列番号 16
FK6025	-----IK-VR-----G--MA-LN-----	配列番号 17
FK6026	-----LK-VL-----G--LI-LN-----	配列番号 18
FK6029	-----LK-LQ-----G--VP-LN-----	配列番号 19
FK6031	-----LK-VL-----G--VT-LH-----	配列番号 20
FK6032	-----MR-VQ-----G--IT-LN-----	配列番号 21
FK6033	-----MR-IR-----G--LQ-LN-----	配列番号 22
FK6034	-----MR-LE-----G--IR-LN-----	配列番号 23
FK6035	-----LR-VS-----G--MA-LN-----	配列番号 24
FK6036	-----IK-VH-----G--LT-LN-----	配列番号 25
FK6037	-----LR-LG-----G--VK-LN-----	配列番号 26
FK6038	-----MK-LK-----G--FS-LN-----	配列番号 27
FK6039	-----MR-VR-----G--LP-LD-----	配列番号 28
FK6041	-----FK-VY-----G--LK-LN-----	配列番号 29
FK6044	-----LR-MG-----G--VT-LN-----	配列番号 30
FK6045	-----MK-VG-----G--LK-LG-----	配列番号 31
FK6052	-----MR-LS-----G--LN-LN-----	配列番号 32
FK6053	-----LK-VR-----G--IQ-LN-----	配列番号 33
FK6054	-----LK-MG-----G--IR-LN-----	配列番号 34
FK6055	-----LR-VR-----G--VA-LN-----	配列番号 35
FK6056	-----MR-VE-----G--LI-LN-----	配列番号 36
FK6058	-----MR-VD-----G--MQ-LA-----	配列番号 37
FK6059	-----LY-VQ-----G--IV-IN-----	配列番号 38
FK6060	-----LR-LR-----G--IP-LN-----	配列番号 39
FK6062	-----MK-VG-----G--MP-LD-----	配列番号 40
FK6063	-----MR-VA-----G--LE-FN-----	配列番号 41
FK6064	-----MR-LR-----G--MQ-LN-----	配列番号 42
FK6065	-----LR-VQ-----G--IS-LN-----	配列番号 43
FK6067	-----LR-VQ-----G--IN-LT-----	配列番号 44
FK6069	-----LK-VS-----G--VA-LN-----	配列番号 45
FK6072	-----MR-VE-----G--MS-LA-----	配列番号 46
FK6076	-----LQ-VL-----G--VL-LN-----	配列番号 47
FK6080	-----LR-VA-----G--VT-LN-----	配列番号 48
FK6083	-----LK-VL-----G--VD-FN-----	配列番号 49
FK6091	-----LR-LR-----G--VL-LH-----	配列番号 50
FK6092	-----LR-LR-----G--VP-LN-----	配列番号 51

10

20

30

40

【0031】

(4) human IgG-Fc結合性ペプチドの結合性

(解離定数の算出)

アミノ酸配列を決定したhuman IgG-Fc結合性ペプチドのうちランダムに5個(FK6014、

50

FK6032、FK6053、FK6063、FK6065) を選択し、アミドレジンを用いて0.023 μmol スケールでFmoc固相合成法によりそれぞれを化学合成し、SPR法を用いてhuman IgG-Fcに対する結合活性測定を行った。

【0032】

100mgのFmoc-PAL-PEG-PS(商標名)アミドレジン(置換率:0.2 mmol/g)をリアクションベッセル量り取り、ペプチド自動合成機PSSM-8(SHIMAZU社)のプロトコルに従ってそれぞれのFmocアミノ酸(10equiv.)を、HCTU(10equiv)、DIEA(20equiv)、30%ピペリジン、5%無水酢酸を調製して、各ペプチドを化学合成した。終了後、レジンをジエチルエーテルで洗浄し乾燥させ、クリベージ溶液(TFA:EMS:Anisole:EDT=93:3:3:1)を2 mL添加して、室温で4時間反応させた。クリベージ溶液をろ過したのち、氷冷したジエチルエーテルを過剰量添加することでペプチドを析出させた。氷上で10分間静置し、6500rpm、4 で10分間遠心分離して上清を捨てた。回収した沈殿物に再び氷冷したジエチルエーテルを加えて激しく攪拌させた後、氷上で10分間静置して6500rpm、4 で10分間遠心分離して上製を除去することで沈殿物を洗浄した。この洗浄行為を2回繰り返した。沈殿物を減圧下で乾燥させたのち、2 mLの滅菌水に溶解し、0.22 μm のフィルターでろ過してペプチド溶液(非環状ペプチド)を得た。ペプチド溶液をRP-HPLCで精製し、MALDI-TOF-MSで質量分析したところ、ほぼ計算値どおりの実測値が得られたことで目的とするペプチドが合成されたことを確認した。

10

【0033】

その後、滅菌水で溶解したペプチド溶液を30mM Tris-HCl(pH8.5)に常温で一晩かけて滴下しながら攪拌することで酸化反応させ、分子内ジスルフィド架橋を施した。反応溶液をRP-HPLCを用いて上記と同様の条件で精製した。MALDI-TOF-MSで質量分析したところ、ほぼ計算値どおりの実測値が得られたことで目的とするペプチドが合成されたことを確認した。

20

【0034】

得られた環状ペプチドを、Biacore T200(GEヘルスケア社)とThiol coupling kit(GEヘルスケア社)を用いて5つのペプチドの各濃度における結合活性を測定した。全ての工程において、ランニングバッファーはHBS-EP+を用いた。Serise S CM5 センサーチップに、human IgG-Fcの固定化用としてフローセル2を用いて、流速10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、25 の条件で行った。予備試験によりhuman IgG-Fcの固定化に最適なpHを決定した後、フローセル2に前記キット中のEDCとNHSを混合した(容量比で1:1)液を調製し、7分間センサーチップに流すことでカルボキシル基を活性化させた。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ human IgG-Fcを10mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)で調製し、活性化させたフローセル2に7分間流すことでhuman IgG-Fcを固定化した。固定化量は2000RUであった。未反応の活性化されたカルボキシル基はエタノールアミンを7分間流すことによって、全て不活性化した。フローセル1をEDCおよびNHSによる活性化とエタノールアミンによるブロッキングを施すことでリファレンスセルとして使用した。各ペプチドをHBS-EP+バッファーで0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 μM に段階希釈し、流速30 $\mu\text{L}/\text{min}$ でそれぞれの結合活性を測定した。測定結果は、BIA evaluation 4.1ソフトウェアで、平衡値解析により解離定数(K_D)を算出した。その結果を表2に示した。

30

40

【0035】

5つのペプチドはどれも非常に高い結合活性(FK6014: $K_D=9\text{ nM}$ 、FK6032: $K_D=8\text{ nM}$ 、FK6053: $K_D=5\text{ nM}$ 、FK6063: $K_D=12\text{ nM}$ 、FK6065: $K_D=8\text{ nM}$)を示した。比較対照としたペプチドFK60($K_D=21\text{ }\mu\text{M}$)や非特許文献1に記載された環状化されたペプチド($K_D=19\text{ }\mu\text{M}$)に比べて1000倍以上結合活性が向上した。

【0036】

【表 2】

Peptide	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
FK6014	9.43×10^7	0.8542	9
FK6032	8.36×10^7	0.627	7
FK6053	1.18×10^{12}	0.6204	5
FK6063	2.6×10^7	0.2893	12
FK6065	7.57×10^7	0.6047	8

【 0 0 3 7 】

(CDスペクトルの測定)

各ペプチドのCDスペクトルを測定した。ペプチドを20mM Phosphate buffer (pH7.4) に最終濃度20 μ Mとなるように調製し、円二色性分散計J-720 (JASCO社)、温度コントローラ Peltier PTC-423L (TOMY SEIKO)を用いて、20 の温度における190nmから260nmの波長でのCDスペクトルを0.2nm間隔で測定した。その結果を図5に示す。それぞれのペプチドは208nmおよび222nmに明瞭な負の極大を有しており、安定な α -ヘリックス構造を保持していることがわかった。 α -ヘリックスの内側の適切な位置に疎水性アミノ酸が配置されるようデザインしたことにより、 α -ヘリックス構造の形成に必要な両親媒性を獲得し、安定な立体構造を形成しているものと推測される。

【実施例 2】

【 0 0 3 8 】

次に、2本の α -ヘリックスの内側に位置すると考えられる数カ所のアミノ酸をそれぞれアラニンに置換して、IgGに対する結合性を測定した。測定に際しては、実施例1で得られたペプチドのうち、最もIgGに最も高い結合活性を示したFK6053を用いた。結合性は、当該ペプチドのN末端のアミノ酸にチオレドキシンを融合したチオレドキシ融合ペプチドを用い、FK6053を用いた場合との相对比较を行った。下記方法に従いチオレドキシ融合ペプチドを作製し、実施例1に記載の方法に準じて表面プラズモン共鳴法によりHuman IgG-Fcに対する結合活性(解離定数 K_D)を測定した。FK6053のチオレドキシ融合ペプチドのアミノ酸配列を配列番号54に示した。置換したアミノ酸はFK6053におけるN末端から12番目のイソロイシン(I12)、同じく19番目のバリン(V19)、同じく20番目のアルギニン(R20)、同じく29番目のイソロイシン(I29)、同じく30番目のグルタミン(Q30)、同じく32番目のロイシン(L32)、同じく33番目のアスパラギン(N33)、同じく39番目のロイシン(L39)である。置換後のFK6053のペプチドに対応するアミノ酸配列及び比較試験の結果を表3に示した。結果は、FK6053における結合活性と同程度の場合を「+++」とし、結合活性がその1/10~1/100となった場合を「++」として表した。IgGに対して高い結合性を示した場合、アラニンと置換した位置のアミノ酸は、その安定な立体構造からIgGへの結合性に影響を与えることが小さく、当該位置のアミノ酸は任意のアミノ酸に置換し得るものと考えられる。

10

20

30

【表 3】

Clone	Sequence	Binding activity
FK6053	FNMQCQAEFYEILHELKAVRGGGGGGGGKIQALNAKIAALRDAC (配列番号 3 3)	+++
I12A	FNMQCQAEFYEA L HELKAVRGGGGGGGGKIQALNAKIAALRDAC (配列番号 5 5)	+++
V19A	FNMQCQAEFYEILHELKA A RGGGGGGGGGKIQALNAKIAALRDAC (配列番号 5 6)	+++
R20A	FNMQCQAEFYEILHELKAV A GGGGGGGGGGKIQALNAKIAALRDAC (配列番号 5 7)	+++
I29A	FNMQCQAEFYEILHELKAVRGGGGGGGGK A QALNAKIAALRDAC (配列番号 5 8)	+++
Q30A	FNMQCQAEFYEILHELKAVRGGGGGGGGKI A ALNAKIAALRDAC (配列番号 5 9)	+++
L32A	FNMQCQAEFYEILHELKAVRGGGGGGGGKIQA A NAKIAALRDAC (配列番号 6 0)	++
N33A	FNMQCQAEFYEILHELKAVRGGGGGGGGKIQAL A AKIAALRDAC (配列番号 6 1)	++
L39A	FNMQCQAEFYEILHELKAVRGGGGGGGGKIQALNAKIA A ARDAC (配列番号 6 2)	++

10

【 0 0 3 9 】

(結合活性測定用チオレドキシシン融合ペプチドの作製)

20

ペプチドFK6053とその変異体のTrx融合ペプチドを、pETシステムで合成した。宿主大腸菌には、BL21 CodonPlus (DE3)-RPを、ベクターにはpET32a(+)(Navagen)を使用した。FK6053の遺伝子が導入されたpET32a(+)-ベクターを鋳型として、メガプライマー法により変異体のDNAを作製し、PCRを実施した。反応終了後、3%アガロース電気泳動で分離し、目的のバンドを切り出し、Gel Extraction Kit (QIAGEN)で精製した。精製したPCR産物をメガプライマーとし、再びPCRを実施した。反応終了後、先ほどと同様に目的のPCR産物をアガロースゲル電気泳動に供し、目的のバンドを切り出し精製した。精製したDNAは、制限酵素(NcoIとXhoI)で処理し、同様に制限酵素処理したpET32a(+)-とライゲーションすることでFK6053変異体のTrx融合ペプチド発現用ベクターを構築した。構築したベクターを用いて形質転換した宿主大腸菌をLB培地/Ampで培養した。その後、培地を18℃に冷却し、10μLの1M IPTGを加え、18℃で一晩振とう培養した。培養終了後、培養液を遠心(4℃、6000g、10分)して沈殿をPBSに懸濁した。大腸菌を超音波破碎して遠心分離した後、その上清をフィルター(0.45μm)でろ過して、精製用サンプルを得た。精製用サンプルを、25mMイミダゾールで平衡化したNi Sepharose High Performance (GE Healthcare)をした充填カラムに吸着させた後、500mMイミダゾールで溶出した。得られた溶出液をPBS中4℃でセルロース膜(Spectra/Par MWCO:6-8000, Spectrum Laboratories Inc.)で透析し、その後遠心フィルター(Amicon Ultra-0.5, 3K device, Millipore)を用いて濃縮し、結合活性用のサンプルとした。

30

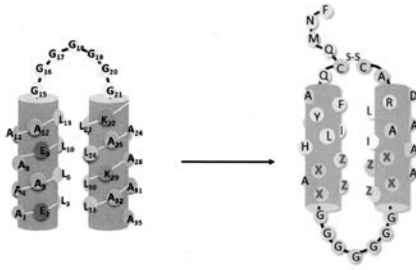
【産業上の利用可能性】

【 0 0 4 0 】

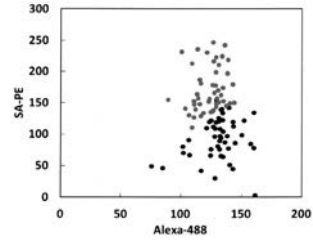
本発明は、IgGに対して強い結合性を有するIgG結合性ペプチドを提供する。

40

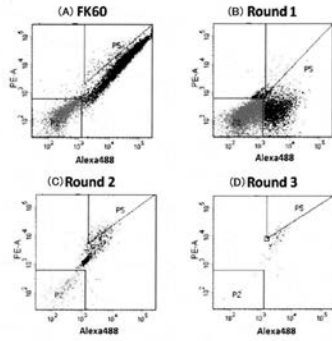
【 図 1 】



【 図 3 】



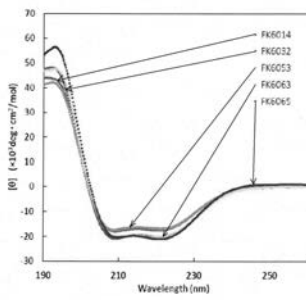
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2017159655000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年8月31日(2017.8.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチド。

但し、同アミノ酸配列中、

N末端のアミノ酸から16番目のアミノ酸(X16)がL、M、I又はFであり、

N末端のアミノ酸から17番目のアミノ酸(X17)がR、K、Y又はQであり、

N末端のアミノ酸から19番目のアミノ酸(X19)は任意のアミノ酸であり、

N末端のアミノ酸から20番目のアミノ酸(X20)は任意のアミノ酸であり、

N末端のアミノ酸から26番目のアミノ酸(X26)はG又はE若しくは欠失しており、

N末端のアミノ酸から29番目のアミノ酸(X29)は任意のアミノ酸であり、

N末端のアミノ酸から30番目のアミノ酸(X30)は任意のアミノ酸であり、

N末端のアミノ酸から32番目のアミノ酸(X32)は任意のアミノ酸であり、

N末端のアミノ酸から33番目のアミノ酸(X33)が任意のアミノ酸である。

【請求項2】

配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチド。

但し、同アミノ酸配列中、

N末端のアミノ酸から16番目のアミノ酸(X16)がL、M、I又はFであり、

N末端のアミノ酸から17番目のアミノ酸(X17)がR、K、Y又はQであり、

N末端のアミノ酸から19番目のアミノ酸(X19)がV、A、L、M、F又はIであり、

N末端のアミノ酸から20番目のアミノ酸(X20)は任意のアミノ酸であり、

N末端のアミノ酸から26番目のアミノ酸(X26)はG又はE若しくは欠失しており、

N末端のアミノ酸から29番目のアミノ酸(X29)がI、A、L、V、M又はFであり、

N末端のアミノ酸から30番目のアミノ酸(X30)が任意のアミノ酸であり、

N末端のアミノ酸から32番目のアミノ酸(X32)がA、L、F、M又はIであり、

N末端のアミノ酸から33番目のアミノ酸(X33)がN、D、H、A、T又はGである、

請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】

配列番号1のアミノ酸配列中、

N末端のアミノ酸から16番目のアミノ酸(X16)がL又はMであり、

N末端のアミノ酸から17番目のアミノ酸(X17)がR又はKであり、

N末端のアミノ酸から19番目のアミノ酸(X19)がV、A、L又はMであり、

N末端のアミノ酸から29番目のアミノ酸(X29)がI、A、L、V又はMであり、

N末端のアミノ酸から32番目のアミノ酸(X32)がA、L又はFであり、

N末端のアミノ酸から33番目のアミノ酸(X33)がN、D、H、A又はTである、

請求項1に記載のペプチド。

【請求項4】

配列番号1のアミノ酸配列中、

N末端のアミノ酸から16番目のアミノ酸(X16)がL又はMであり、

N末端のアミノ酸から17番目のアミノ酸(X17)がR又はKであり、

N末端のアミノ酸から19番目のアミノ酸(X19)がA又はVであり、

N末端のアミノ酸から20番目のアミノ酸(X20)がG、Q、R又はAであり、

N末端のアミノ酸から26番目のアミノ酸(X26)はGであり、

N末端のアミノ酸から29番目のアミノ酸(X29)がI、A、L又はVであり、

N末端のアミノ酸から30番目のアミノ酸(X30)がA、T、Q、E又はSであり、

N末端のアミノ酸から32番目のアミノ酸(X32)がA、L又はFであり、

N末端のアミノ酸から33番目のアミノ酸(X33)がA又はNである、

請求項1に記載のペプチド。

【請求項5】

前記アミノ酸配列中、N末端のアミノ酸から12番目のアミノ酸(I12)が任意のアミノ酸である請求項1～4の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項6】

前記アミノ酸配列中、N末端のアミノ酸から12番目のアミノ酸(I12)がAである請求項1～4の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項7】

前記アミノ酸配列中、N末端のアミノ酸から39番目のアミノ酸(L39)がAである請求項1～6の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項8】

前記アミノ酸配列中、N末端から5番目のシステインとC末端のシステインがジスルフィド結合した請求項1～7の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項9】

前記アミノ酸配列中、N末端から5番目のシステイン及び/又はC末端のシステインが任意のアミノ酸で置換された請求項1～7の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項10】

前記アミノ酸配列中、N末端から5番目のシステイン及び/又はC末端のシステインがグルタミンで置換された請求項1～7の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項11】

ヒト免疫グロブリンGに対する解離定数(K_D)が、3000nM以下、好ましくは1000nM以下、望ましくは100nM以下である請求項1～10の何れか1項に記載のペプチド。

【請求項12】

配列番号2～51の何れかのアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項13】

配列番号2～51の何れかのアミノ酸配列を有し、アミノ酸配列のN末端から5番目のシステインと、同アミノ酸配列のC末端のシステインがジスルフィド結合したペプチド。

【請求項14】

配列番号9、配列番号21、配列番号33、配列番号41、配列番号43の何れかのアミノ酸配列を有するペプチド。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/010115
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/00(2006.01)i, A61K38/16(2006.01)n, A61P7/00(2006.01)n, A61P37/06(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n 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) C07K14/00, A61K38/16, A61P7/00, A61P37/06, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAWABATA, K., et al., Peptide-based immunoadsorbents: Molecular grafting of IgG-Fc-binding epitopes of Protein A onto a de novo-designed helix-loop-helix peptide, 2014, Bioorganic and Medicinal Chemistry, Vol.22, p.1845-1849, abstract, page 1845, right column, 3rd paragraph to page 1846, left column, 2nd paragraph, fig. 1a, 1b	1-13
A	Kumiko KAWABATA et al., "Protein Grafting ni yoru Hito IgG Fc Ryoiki Ketsugosei Peptide no Design", 2013, The 13th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan Program Yoshishu, page 109, 2P-115, entire text	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 06 June 2017 (06.06.17)		Date of mailing of the international search report 13 June 2017 (13.06.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/010115

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2015-074626 A (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), 20 April 2015 (20.04.2015), entire text (Family: none)	1-13
A	JP 2015-073692 A (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), 20 April 2015 (20.04.2015), entire text (Family: none)	1-13

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 0 1 1 5									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/00(2006.01)i, A61K38/16(2006.01)n, A61P7/00(2006.01)n, A61P37/06(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/00, A61K38/16, A61P7/00, A61P37/06, C12N15/09											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2017年										
日本国実用新案登録公報	1996-2017年										
日本国登録実用新案公報	1994-2017年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq, PubMed											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	KAWABATA, K., et al., Peptide-based immunoadsorbents: Molecular grafting of IgG-Fc-binding epitopes of Protein A onto a de novo-designed helix-loop-helix peptide, 2014, Bioorganic and Medicinal Chemistry, Vol.22, p.1845-1849 要約、第1845頁右欄第3段落-第1846頁左欄第2段落、図1a、図1b	1-13									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 06.06.2017		国際調査報告の発送日 13.06.2017									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 福澤 洋光 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3963								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2017/010115
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	川端久美子, et al., プロテイングラフィックによるヒト IgG Fc 領域結合性ペプチドのデザイン, 2013, 第 13 回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集, p109, 2P-115 全文	1-13
A	JP 2015-074626 A (旭化成メディカル株式会社) 2015.04.20, 全文 (ファミリーなし)	1-13
A	JP 2015-073692 A (旭化成メディカル株式会社) 2015.04.20, 全文 (ファミリーなし)	1-13

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。