(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4174071号
(P4174071)
(45)発行日　平成20年10月29日(2008.10.29)　(24)登録日　平成20年8月22日(2008.8.22)

(51)Int.Cl.　　F I
C07K 1/04 (2006.01)　　C07K 1/04
G01N 33/544 (2006.01)　　G01N 33/544

請求項の数 8　(全 15 頁)

(21)出願番号	特願平3-513489
(86)(22)出願日	平成3年8月12日(1991.8.12)
(65)公表番号	特表平6-500539
(43)公表日	平成6年1月20日(1994.1.20)
(86)国際出願番号	PCT/EP1991/001529
(87)国際公開番号	WO1992/004366
(87)国際公開日	平成4年3月19日(1992.3.19)
審査請求日	平成9年11月13日(1997.11.13)
審判番号	不服2005-15640(P2005-15640/J1)
審判請求日	平成17年8月15日(2005.8.15)
(31)優先権主張番号	P4027675.9
(32)優先日	平成2年8月31日(1990.8.31)
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)

(73)特許権者　505307884
イェリニ・アクチェンゲゼルシャフト
ドイツ連邦共和国　１０１１５　ベルリン、インヴァリデンシュトラーセ　１３０
(74)代理人　100102842
弁理士　葛和　清司
(74)代理人　100133134
弁理士　高河原　芳子
(72)発明者　フランク，ロナルド
ドイツ連邦共和国　デー―３３００　ブラウンシュヴァイク、マシェローデル・ヴェーク　１

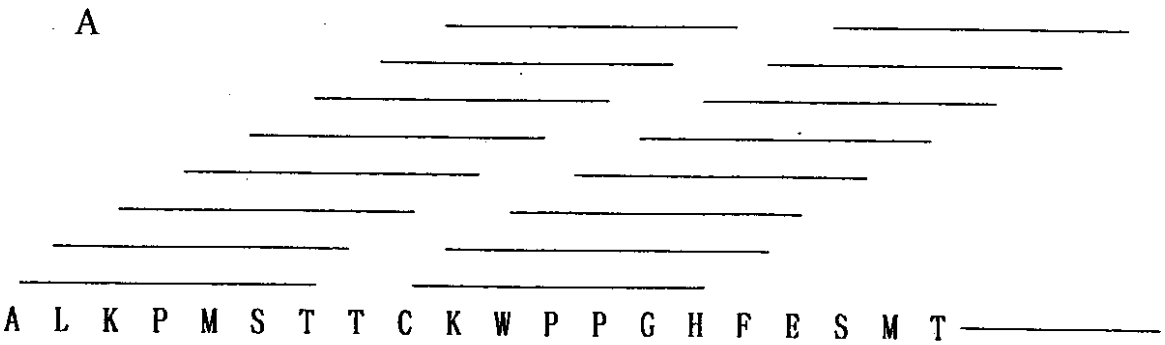
最終頁に続く

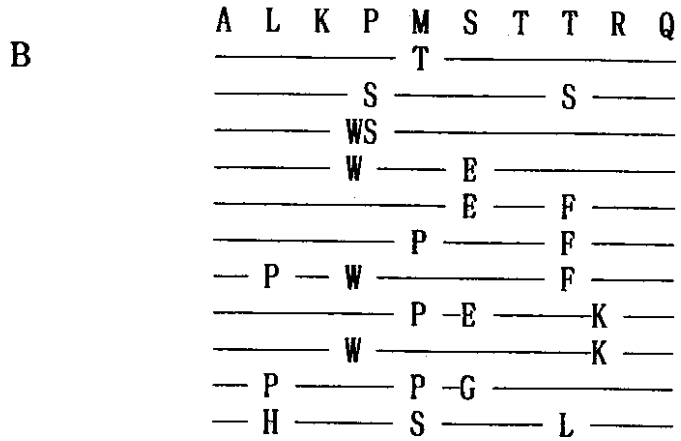
(54)【発明の名称】担体に結合した又は遊離のペプチド類又はオリゴヌクレオチド類の迅速合成方法、本方法により調製された偏平材料とその使用、並びに本方法を実施するための装置

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
数種乃至非常に多種の異なるペプチド類をメリフィールド（Merrifield）原理に従って同時並行的に合成する方法であって、
ａ）多孔性のフィルム、メンブラン、および紙からなる群より選択される単一の扁平材料であって、該扁平材料の面積当たり１ｐｍｏｌ～１μｍｏｌ／ｃｍ^{2}の、合成されるべきペプチドのＣ末端が共有結合することができる化学的に反応可能な一種又は数種の官能基を有する、前記扁平材料を担体とし、
ｂ）Ｎ－保護基を有する活性化した誘導体の形のＣ末端アミノ酸残基あるいはＣ末端アミノ酸残基を含むＮ－保護基を有する活性化した誘導体の形のジペプチド又はオリゴペプチドの溶液の１０ｎｌ～１０μｌのアリコートを、前記扁平材料の予め定めた各スポットに重なることがないように間隔を置いて滴下してしみこませ、濡れることにより前記扁平材料の表面および内部において形成される限られた大きさの反応面においてカップリング反応を実施することによって、合成されるべき各ペプチドの配列のＣ末端アミノ酸残基を各スポットにおいて前記官能基に共有結合させ、
ｃ）分離液で処理することにより、前記官能基に結合したアミノ酸残基またはペプチドのＮ－保護基を分離し、
ｄ）Ｎ－保護基を有する活性化した誘導体の形のアミノ酸残基又はジペプチド又はオリゴペプチドの溶液の１０ｎｌ～１０μｌのアリコートを、前記予め定めたスポットに滴下してしみこませ、濡れることにより前記扁平材料の表面および内部において形成される限ら

れた大きさの反応面においてカップリング反応を実施することによって、合成されるべき各ペプチドの配列中のさらなるアミノ酸残基を各スポットのＮ－保護基が分離されたアミノ酸残基またはペプチドに共有結合させてペプチド化合物を形成し、
ｅ）分離液で処理することにより、各スポットのペプチドのＮ末端に存在するＮ－保護基を分離する、
ことを含み、
ここで、ｄ）およびｅ）の反応段階を各ペプチドが完成するまで１回または２回以上周期的に実施することにより、単一の扁平材料上に多種の異なるペプチドを合成することを特徴とする、前記方法。
【請求項２】
扁平材料が紙であることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項３】
官能基が、アミノプロピル基、グリシン又はジグリシンのアンカー基であることを特徴とする請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
合成しようとするペプチドを、（ａ）Ｃ末端を直接扁平材料と結合するか或いは（ｂ）該扁平材料と一種のリンカーを介して結合して構成することを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
数種乃至非常に多種の異なるペプチド類をメリフィールド（Merrifield）原理に従って同時並行的に合成するためのスポッティング方法であって、
ａ）多孔性のフィルム、メンブラン、および紙からなる群より選択される単一の扁平材料であって、該扁平材料の面積当たり１ｐｍｏｌ～１μｍｏｌ／ｃｍ^{2}の、合成されるべきペプチドのＣ末端が共有結合することができる化学的に反応可能な一種又は数種の官能基を有する、前記扁平材料を担体とし、
ｂ）Ｎ－保護基を有する活性化した誘導体の形のＣ末端アミノ酸残基あるいはＣ末端アミノ酸残基を含むＮ－保護基を有する活性化した誘導体の形のジペプチド又はオリゴペプチドの溶液の１０ｎｌ～１０μｌのアリコートを、前記扁平材料の予め定めた各スポットに重なることがないように間隔を置いて滴下してしみこませ、濡れることにより前記扁平材料の表面および内部において形成される限られた大きさの反応面においてカップリング反応を実施することによって、合成されるべき各ペプチドの配列のＣ末端アミノ酸残基を各スポットにおいて前記官能基に共有結合させ、
ｃ）分離液で処理することにより、前記官能基に結合したアミノ酸残基またはペプチドのＮ－保護基を分離し、
ｄ）Ｎ－保護基を有する活性化した誘導体の形のアミノ酸残基又はジペプチド又はオリゴペプチドの溶液の１０ｎｌ～１０μｌのアリコートを、前記予め定めたスポットに滴下してしみこませ、濡れることにより前記扁平材料の表面および内部において形成される限られた大きさの反応面においてカップリング反応を実施することによって、合成されるべき各ペプチドの配列中のさらなるアミノ酸残基を各スポットのＮ－保護基が分離されたアミノ酸残基またはペプチドに共有結合させてペプチド化合物を形成し、
ｅ）分離液で処理することにより、各スポットのペプチドのＮ末端に存在するＮ－保護基を分離する、
ことを含み、
ここで、ｄ）およびｅ）の反応段階を各ペプチドが完成するまで１回または２回以上周期的に実施することにより、単一の扁平材料上に多種の異なるペプチドを合成することを特徴とする、前記方法。
【請求項６】
請求項１～４のいずれか１項に記載の方法を実施するための装置であって、
－　該装置に備えられた担体としての多孔性のフィルム、メンブラン、および紙からなる群より選択される単一の扁平材料、

－　ペプチドを合成するためのアミノ酸又はジペプチド又はオリゴペプチドの各溶液を収納するための小さな密閉可能な容器、
－　前記扁平材料上の点状又は線状のスポットへ１０ｎｌから１０μｌの少量アリコートを分配する自動ピペット操作装置、
－　前記自動ピペット操作装置に備えられた洗浄又は濾過装置、
－　前記扁平材料を通過する洗浄溶液のための手段、及び
－　前記扁平材料を乾燥空気で乾燥するためのドライヤー
を備え、前記ペプチドを合成するためのアミノ酸又はジペプチド又はオリゴペプチドの溶液を前記扁平材料上のスポットへ分配、塗布し、洗浄溶液を追加し、かつ他の反応溶液を追加する、
自動装置であることを特徴とする前記装置。
【請求項７】
請求項１～４のいずれか１項に記載の方法により調製された多種の異なるペプチド類を結合した、多孔性のフィルム、メンブラン、および紙からなる群より選択される単一の扁平材料。
【請求項８】
細菌又はウイルスの感染に由来する抗体と、請求項７に記載の扁平材料に結合された、該抗体に反応し得るペプチド類とを接触させることを含む、前記抗体の検出方法。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は、担体に結合した又は遊離のペプチド類又はオリゴヌクレオチド類を迅速に合成する方法、本方法により調製された偏平材料とその使用、並びに本方法を実施するための装置に関する。
背景技術
タンパク質は実際に全ての生物学的プロセス、例えば酵素触媒反応、輸送、貯蔵、相関運動、機械的支持機能、免疫保護、神経刺激誘導、成長と分化の制御等に於いて重要な役割を果たしている。タンパク質は１個または数個の線状ポリペプチド鎖により構成され、その各種の機能はこれらの鎖の３次元の折りたたみと会合によってもたらされる。折りたたみ及び３次元の構造は鎖のアミノ酸一次配列により決定される。自然界に見られる多彩なタンパク質の構造は20個のアミノ酸構成成分の組み合わせにより作られる。短い部分配列（オリゴペプチド類）はタンパク質全体の配列の一部の構造と機能をまねることができ、又オリゴペプチドは化学的合成法により作ることができる。従って、合成オリゴペプチドはタンパク質の構造分析の際の重要な補助手段の一つである。





タンパク質の大きさと複雑さのためにその系統的研究には非常に多くのペプチドを必要とする。

A）オーバーラップしたペプチドによるかなりの長さのタンパク質鎖の内部に於ける一つの官能性部位の局在化（M. Z. Atassi, Eur. J. Biol. 145, 1-20（1984）；H. M. Geysen, R. H. Meloen a nd S. J. Barteling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998（1984）参照）。

B）機能に対して必須のアミノ酸残基の置換分析による解読（R. A. Houghton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5131（1985）；H. M. Geysen, R. H. Meloen and S. J. Barteling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998（1984）参照）。

酵素反応、抗体結合のような微生物学的試験反応は非常に敏感であるから、ごく少量（ng乃至μg）のペプチド基質で充分である。そのような試験を迅速に簡単に実施するためには、ペプチド基質を一つの固体の担体材料に固定化して反応溶液から容易に取り出し得るようにするのが有利である。そうすればペプチドとの反応は残留した反応溶液の中で、或いは担体に結合した物質を後から分析することにより定量的に測定することができる。

このような系統的研究を実施し得る範囲は、主としてペプチド合成の速さと担体の技術的／化学的構想に左右される。迅速なペプチド合成は、Merrifieldの開発した逐次合成の原理に従って固相で実施できる（R. B. Merrifield, J. Amer.Chem. Soc. 85, 2149（1963）参照）。

発明の開示

次に、試験の目的に必要な量の、適当な担体材料又は偏平材料に固定化したオリゴペプチドを、１作業日に付き非常に多く（数百）生産する有利な方法に付いて述べる。

それは本発明によれば、一種又は数種の官能基を付与した担体から始めて、与えられたアミノ酸配列に応じて逐次的に合成されるペプチドをメリフィールド（Merrifield）原理に従って合成する、担体に結合した又は遊離のペプチド類を迅速に合成する方法に於いて、

－　数種乃至非常に多種の異なるペプチドを一つの扁平材料の上で同時に並べて、相互に接触しない点状又は線状の反応面上で合成すること、

－　該偏平材料は前記担体として使用され、

－　カップリングのために、活性化した誘導体の形の、前記ペプチドを合成するためのア

ミノ酸又はジペプチド又はオリゴペプチドの溶液の少量のアリコートを該扁平材料の上に点状又は線状に塗布し、
- 濡れることにより生成した反応面の中でカップリング反応を実施することを特徴とする前記方法を提供する。また、前記方法において、必要に応じて生成したペプチドを適当な分離剤を用いて該扁平材料から分離することができる。
更に一つの特殊の実施態様によれば、偏平材料としてアミノ酸又はペプチドのカップリングに適した化学反応性官能基を有する多孔性又は非多孔性フィルム、メンブラン、又はそのような紙を使用する。
担体材料としては、機械的に安定で使用する試薬や溶剤に化学的に不活性の偏平材料が用いられる。これは多孔性又は非多孔性の材料で、要望により下地に貼りつけたものでも、又自立性であってもよい。例えばフィルム、シート、メンブラン、紙等が使用できる。ここで重要なことは、この偏平材料が化学的に反応可能のグループ（官能基）を有し、ここにペプチド構成用のＣ末端を備えた構成成分（保護されたアミノ酸、ジペプチド、又はオリゴペプチドが適している）が共有結合し得ることである。
化学合成に用いられる本担体材料は利点として微生物学的試験反応での使用にも適している。ペプチドと担体材料との間の結合がペプチド合成の間全ての化学反応に対して安定であるならば、調製されたペプチドを分離又はその後の固定化を行わずに直接使用することが可能である。
担体材料が多孔性であればその内部の表面も合成に利用できる。その場合の洗浄操作は溶剤を担体材料に充分含浸させて行えばよい。非多孔性の担体材料では表面積が非常に小さくなる。洗浄操作としては簡単にすすぐだけでよい。
出願した方法によるペプチド合成に対しては、例えばセルロース（官能基としてヒドロキシル基を有し直接使用可能）、ガラス又は合成樹脂、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、テフロン等の偏平材料で、その表面に適当な化学的官能基を、例えばアクリル酸又はその誘導体のグラフト共重合により導入した材料が適している。更に例えばアミノプロピル基、或いはグリシン又はジグリシンのアンカー基の導入によっても表面に官能基を付与することができる。
それぞれの反応面の大きさは、担体にもたらされた容積、担体材料の吸収特性及び溶剤の揮発性によって決まる。選択した担体、例えば紙製担体の特異的官能性と関連して、その都度の液体の容積は勿論ペプチド合成の選定したスケールにも左右される。又その都度の液体の容積は、２個の反応面の間の最小間隔、従って間接的に与えられた１個の担体の上に設けることのできる反応面の数を決定する。例えば表２参照。
担体の使用形態と化学的前処理に応じて、単位面積当たりの反応性官能基の付着量を広い範囲で変えることができる（例えば１pmol～１μmol/cm^2）。
使用し得る紙の好例としてはWhatman Chrl, Whatman 540, Whatman 3 MMがある。Whatman 540の方がWhatman Chrlよりも機械的に安定であるので好ましい。紙片の大きさ及び反応面、或いは斑点又はスポットの配置は自由に選定できる。免疫学者は８個のスポット用のミクロ点滴板の寸法を優先する。この場合には標準のミクロ点滴板を選び、その窪みの中心に小さい穴を開けて、一枚の紙片（8.5×12.5cm）を裁断してそのスポットの位置に鉛筆で印をつけるための見本としてこの標準のミクロ点滴板を使用すればよい。
ペプチドは逐次的に、予め定めた配列に従って、公知の固相ペプチド合成法

(E. Wünsch et al. in Houben-Wevl: Methoden der organischen Chemie, 第４版、15巻（編集者 E. Müller), Thieme, Stuttgart, 1974; G. Barany, R. B. Merrifield in The Peptides, ２巻（編集者 E. Gross, U. Meienhofer), Acad-emic Press, New York, 1970, p. 1)

により表面の官能基の所で構成される。その操作はFmoc/tBu-法（C.-D. Chang, U. Meien

hofer, Int. J. Peptide Pro- tein Res. 11, 246（1978）; E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. J. Williams, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 537（1978））によるのが好ましい。20個の必須アミノ酸の他に、任意の修飾したアミノ酸及び人工のアミノ酸を組み込むことができる。

ペプチドの化学的構成に必要なアミノ酸の構成成分（適当に保護した活性化したアミノ酸誘導体）は、好ましくは沸点の高い蒸発速度の低い適当な溶剤（例えばN-メチルピロリジノン、沸点203℃）の濃縮した溶液（0.1～0.3M）として密栓できる小さい容器に収める。

アミノ酸のペプチドへの結合は、C末端から始めて逐次的に、場合によっては多くのペプチドに対して平行してそれぞれ同一の２個の反応段階の周期的実施によって行われる。次にその結合を説明すれば例えば次の通りである。

1）ペプチド化合物の形成: 活性化したアミノ酸溶液の１アリコート（0.1～10μｌ）を平面状担体の予め定めた点又は線の上に滴下する。濡れることによって加えた容積により限られた大きさの反応面（スポット）が形成される。種々の多くのペプチドを平行して相当する大きさの一つの担体表面上で合成しようとする場合には、反応面が重なることのないように、間隔を置いて滴下位置を定める。反応時間は例えば５～30分である。続いて担体を適当な密栓できる容器に収めるか或いは濾過装置の上で例えばジメチルホルムアミド（DMF）を用いて数回洗浄する。滴下位置は担体に印（例えばセルロース紙に鉛筆による印）を付けて設定できる。指示薬を用いて（例えばブロモフェノールブルー; V. Krchnak, J. Vagner, P. Safar, M. Lebl, Collect. Czech. Chem. Commun. 53, 2542（1988））反応面上の遊離のアミノ官能基を直接着色することも可能であり、その場合には印をつける必要はない。

2）N末端保護基の分離: このためには担体を分離液で充分処理する。有利な方法であるFmoc/tBu-法ではFmoc-保護基を例えばピペリジンの20% DMF-溶液で分離し、例えば２～10分後にDMFで数回洗浄する。場合によっては次に指示薬溶液により反応面が現れてくるまで処理する。続いて例えばエタノールで数回洗浄後空気中（場合によっては最高40℃のヘアドライヤー）で乾燥する。

全てのペプチド配列が完成したならば、好ましくはN末端のアミノ基を例えば無水酢酸によりアシル化してブロックする。それには担体をアシル化溶液（例えば無水酢酸５%とジイソプロピルエチルアミン５%とのDMF-溶液）で処理してからDMFとエタノールで数回洗浄する。

次にアミノ酸側鎖の保護基を（選定した合成方法に相当した）適当な酸処理によって分離する。それには担体を分離溶液で処理する。Fmoc/tBu-法を用いた特殊の実施態様によれば（使用したアミノ酸誘導体の次のリスト参照）、例えば10分間トリフルオロ酢酸（TFA）50%、アニソール５%、チオアニソール１%のジクロロメタン溶液で処理する。続いて担体を先ずジクロロメタン、次にDMF、更にエタノールで数回洗浄してから空気中で乾燥する。保護基の分離には又TFA50%、トリイソブチルシラン２%のDCM-溶液で約60分間処理し、続いてDCM、DMF、エタノールで洗浄してもよい。

ペプチドはこうして生物学的に使用可能の固定化した基質として調製される。ここでペプチドを共有結合した担体を全体として例えば試験反応溶液で処理することもでき、或いはシートを切り抜いて個々の反応面を分離し、個別に処理してもよい。

ペプチドを上記のように担体に構成する最も簡単な方法は、相当するC末端のアミノ酸構成成分を安定なアミノ結合又はエステル結合を介して直接担体表面の反応性官能基に結合する方法である。更に特殊の実施態様によれば、先ず所謂二官能リンカー試薬（E. Atherton et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 538- 546（1981）参照）を担体の官能基に結合する。ここに形成されたペプチドを次にペプチド・リンカー結合の化学的性質に応じて例えば適当な反応条件下でC末端のカルボキシル基又はカルボキシアミド基を用いて分離し、可溶性の形で試験の目的に使用することができる（不安定なリンカー！）。しかし、リンカー試薬は又大きな反応の相手、例えば抗体又は酵素へのペプチドの接近を容易にするためにスペーサー（spacer）として用いることも可能である（安定なリンカー！）。

紙製担体の使用の場合には２段階に実施する。

第一段階（A）： 先ず再活性化したアミノ官能基を一様に分布する。それには普通セルロースのヒドロキシル基をN-Fmocで保護したアミノ酸誘導体によりエステル化し、続いてピペリジンの20% DMF-溶液で処理して遊離する。
第二段階（B）： もう一つのN-Fmoc-アミノ酸を導入したアミノ官能基に点状又は線状につなげる。次に残りの全てのアミノ官能基をアシル化してブロックし、Fmocを分離する。
本発明の範囲内で又両方の誘導体導入の段階にFmoc-グリシンも使用された。しかしFmoc-保護解除と暫くの保存の間に恐らくジケトピペラジン生成の結果として少なくない量のGly-Gly-アンカーが失われた。更にペプチドのGly-Gly-末端は抗体の結合を妨げるようであり、又いくつかの血清は非特異的にAc-Gly-Glyに結合するようである。Fmoc-β-Alaの方が適している。β-アラニンは普通のアミノ酸ではなく、天然のタンパク質には存在しない。この場合β-Ala-β-Ala-アンカーはジケトピペラジンを形成せず、スペーサーにより延長されている。β-Ala-β-Alaのスポットを設けてBPBで着色した乾燥偏平材料では-20℃で数箇月保存してもそのアミノ酸官能基の損失は見られなかった。30℃までの温度での暫くの保存に対してFmocで保護したアンカーは安定である。その説明には図６を参照されたい。この図は紙片の上のスポットの典型的な配置（BPBで着色したβ-Ala-β-Ala-アンカー）を示す。この寸法はこの場合96個のスポットのためのミクロ点滴板に合わせた。
ここで提示した方法は従来の技術（Geysen et al. 1984; Frank and Krause, ドイツ特許出願P 39 35 572.1）に比べて次のような利点を有する。
- 極めて簡単な取扱: アミノ酸誘導体を化学的にカップリングしてペプチドを生成するには、活性化したアミノ酸溶液の少量を表面状担体の上に滴下するだけでよい。
- 更に少量の反応容積、例えば0.1～１μｌ、が可能で、高価なアミノ酸誘導体の使用を更に削減できる。
- セルロース紙又はグラスファイバー紙のような担体は容易に入手又は購入できる。
- 個々のペプチドの合成スケールは、反応性官能基の面積当たりの付着量を変え得るので、広い範囲内で選定できる。
- ピペット操作の段階を（特に自動操作の場合）非常に迅速に実施できるので、単位時間当たり更に多くのペプチドを調製することができる。
上記の方法は又相当するやり方をとれば担体に結合した或いは遊離のオリゴヌクレオチドの迅速合成にも適用することができる。オリゴヌクレオチド合成の化学的機序と経過に就いては例えば欧州特許84 100 059.9を参照されたい。
前述の方法は又自動化も可能である。それには、活性化したアミノ酸溶液又はヌクレオチド溶液のアリコート分取と滴下に対して、又はその他の洗浄溶液と反応溶液の供給に対して自動ピペット装置が使用できる。その場合平面状担体は適当な洗浄、濾過装置に取り付ける必要がある。
市販のx/y-プログラム可能のTLC-スポッター又はピペット操作ワークステーションは本発明の方法の自動化に適した装置である。10nｌまでの容積を任意の位置に正確にもたらすことが可能で、その際数千のペプチドを１個の取扱の容易な偏平材料担体の上で合成することができる。それにはFondo et al., Science, 251, 767-773（1991）のリソグラフィーの技術による二つのオーダーがある。最小の液量（約10nｌ）の場合でも、各ペプチドがn-molの量作られるので、分離と詳細なキャラクタリゼーションにはその量で充分である。

発明を実施するための最良の形態

実施例１

シトメガロウイルスの36/40 K-タンパク質の免疫原の断片（CMV26）の分析。図１: クローン化した免疫原の断片CMV26のアミノ酸一次配列。それから、それぞれ１個のアミノ酸だけずれた、重複したデカペプチド配列が導かれた。図２Ａ－Ｃ: 合成しようとする全てのデカペプチドと割り当てた番号のリスト及びアミノ酸カップリングを同時に平行して実施するための仕様書。
平面状担体: セルロース紙（Whatman Shrl又は540, イギリス製）を5.5×10.5cmの寸法に裁断し、その上に鉛筆で１cmの間隔で50個の点の印を付け、この紙片をすり合わせの栓で

密閉可能の円筒状のガラス容器に入れ、
Fmoc-グリシン 0.2M
ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）0.3M
ジイソプロピルカルボジイミド（DICD）0.24M
N-メチルイミダゾール （MeIm）0.2M
のDMF-溶液１ml
で室温で３時間処理した後、DMF各10mlで３回洗浄した。続いてピペリジンの20% DMF-溶液で10分処理（Fmoc-基の分離）した後、DMF各10mlで３回、無水エタノール各10mlで２回洗浄し、ヘアドライヤーで乾燥した。こうしてセルロース紙のヒドロキシル基にエステル化したグリシン（遊離のアミノ基）の量は定量の結果0.2～0.3μmol/cm^2であった。
この紙片をガラス又はポリエチレンの平らなシャーレに入れ、Fmoc-グリシン0.3M、HOBt 0.45M、DICD 0.36MのN-メチルピロリジノン（MPD）溶液の各アリコート１μｌ）を紙片の印を付けた点に塗布し、シャーレにガラス板をかぶせた。20分後紙片をガラスシリンダーに入れてDMF各10mlで３回洗浄した。続いて紙片に残った、最初のグリシンカップリングの遊離のアミノ基を全てアシル化でブロックした。それには無水酢酸５%、ジイソプロピルエチルアミン５%のDMF-溶液３mlで10分処理した。続いてDMF各10mlで３回洗浄、ピペリジンの20% DMF-溶液で処理、再度DMFで３回洗浄した。次にブロモフェノールブルー（BPB）の0.3% DMF-溶液３mlを加えて、２回目のグリシンカップリングの反応面を青に着色した。続いてエタノール各10mlで２回洗浄し乾燥した。
このように前処理したセルロース平面状担体は印を付けた反応面の所に、ペプチドの形成用の遊離の一次のアミノ官能基を有するジグリシンアンカー基を提供する。図２Ａに示した49個のデカペプチドに通し番号を付けて、相当する番号の反応面に於いて前述のように同時に平行して合成した。活性化したアミノ酸溶液の分布は図２Ｂと２Ｃとに示したリストを基にして実施した。
合成方法: Fmoc/tBu-法
使用したアミノ酸誘導体:
Fmoc Ala
Fmoc-Arg（Pmc）
Fmoc-Asn（Tmob）
Fmoc-Asp（OtBu）
Fmoc-Cys（Butthio）
Fmoc-Gln（Tmob）
Fmoc-Glu（OtBu）
Fmoc-Gly
Fmoc-His（Boc）-Pfp
Fmoc-Ile
Fmoc-Leu
Fmoc-Lys（Boc）
Fmoc-Met
Fmoc-Phe
Fmoc-Pro
Fmoc-Ser（tBu）
Fmoc-Thr（tBu）
Fmoc-Trp
Fmoc-Tyr（tBu）
Fmoc-Val
アミノ酸側鎖（-）のCysのButthio以外の全ての保護基はTFA 20～50%のジクロロメタン溶液により分離できる。Butthio-基はその後で例えばジチオトレイトール（DTT）又はジチオエリトリトール（DTE）により除くことができる。
アミノ酸誘導体は標準の方法、例えば1-ヒドロキシベンゾチアゾール（HOBt）の1.5倍の

過剰量とジイソプロピルカルボジイミド（DICD）の1.2倍の過剰量とのN-メチルピロリジノン溶液を用いた１時間の処理により活性化できる。その他の活性化の方法として例えば対称的無水物、ペンタフルオロフェノールエステル又はBOPを用いても同様に可能である。予め算定した消費量に応じて溶液0.2～１mlを作った。アリコート１μｌを塗布した。BPBで青色に染めた反応面が５～20分後に黄色に変色したが、これは遊離のアミノ基が完全に反応したことを示した。Fmoc-保護基の分離はピペリジンの20% DMF-溶液を用いて５分間実施した。生成したペプチドの末端アセチル化は無水酢酸５%、ジイソプロピルエチルアミン５%のDMF-溶液により10分間で達成された。アミノ酸側鎖の保護基をTFA20%、トリイソブチルシラン１%のジクロロメタン溶液により20分で分離した後、担体を各10mlのジクロロメタンで３回、DMFで３回、エタノールで３回洗浄し、乾燥した。

このペプチドを用いて、例えばラビット血清中の抗CMV26抗体の配列特異性結合を呈色試験により検出した。

図３：呈色試験の系統的表示。表面に結合したペプチド（P）をラビット抗CMV 26血清によりインキュベートし、過剰の血清を洗い流してから、酵素βガラクドシダーゼと共有結合したヤギ由来の抗ラビット抗体によりインキュベートする。抗CMV26抗体がペプチドと結合できる場合にのみ第２の抗体を介して酵素が結合され、この酵素は5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシドの分割の際のその活性によって検出される。その際ヘキサシアノ鉄（III）カリウムのような穏やかな酸化剤の存在下で水及びアルコールに不溶の青いインジゴ色素が形成される。

図４：呈色試験後の偏平なセルロース担体の写真。反応面11乃至16及び31乃至33の箇所のペプチドはポジティブに反応する。

合成洗剤（例えば尿素、ドデシル硫酸ナトリウム、メルカプトエタノール）で担体を処理すれば、結合した抗体は再び分離し、インジゴ色素はDMFで洗い落とすことができる。その後で固定化したペプチドを備えた担体を再度使用することができる。この操作はペプチドが分離又は破壊されるような反応条件に用いられない限り、何度でも繰り返すことが可能である。同一の担体で10回以上抗体結合試験を実施した後いくつかの反応面を切り取ってペプチドをNaOH １Mで分離した。このCMV26-Gly-Gly-ペプチドはHPLC-分析並びに高速原子衝撃質量分析法（FAB）によりはっきりと検出された。

実施例２

シトメガロウイルスの36/40 K-タンパク質の同じ免疫原の断片（CMV26）の分析。平面状担体：グラスファイバー紙（Whatman QM-A，イギリス製）を5.5×10.5cmの寸法に裁断し、その上に鉛筆でそれぞれ１cmの間隔で50個の点の印を付け、この紙片をすり合わせの栓付きの三角フラスコ（250ml）の中で、アミノプロピルトリエトキシシランの２%無水トルエン溶液50mlにより１晩還流冷却器を付けて煮沸した。その後担体を各10mlのトルエンで３回、アセトンで３回洗浄し、110℃で１時間乾燥した。こうして導入されたアミノプロピル基（遊離のアミノ基）の量は定量の結果30～50nmol/cm^2であった。

全ての化学的操作を、実施例１で第１のグリシンカップリングの後のセルロース紙に対して記述したのと全く同じように実施した。抗体結合試験の結果は同一であった。

実施例１及び２は、本出願の方法により調製された、結合したペプチドを備えた偏平材料に対して一つの重要な応用の可能性を実証する。即ちこの材料は、人間医学及び獣医学の分野に於いて細菌及びウイルスの感染を非常に特異的に検出するための診断の目的に用いることができる。そのような感染は、罹った生物体の免疫反応によってウイルス又は細菌のタンパク質に対する抗体の形成を引き起こす。ウイルス又は細菌に特異性のあるペプチドにより血清中のそのような抗体を検出し、それによって病原体の種類と亜綱とを決定することが可能になる。この特異性のあるペプチドの発見に対しても、（実施例で示したように）偏平材料に結合した一連のペプチドを調製し試験することにより、この同じ方法が使用できる。

実施例３

CMV26に関連のある４個のオリゴペプチドを、Boc-Lys-Pro-誘導体を備えた紙製担体の上のスポットで合成し、ジケトピペラジンの形成によりこれらを担体から分離した。詳細を

図５Ａ－Ｂ及び表１に示す。ここで
図５Ａ：粗ペプチドのHPLCのトレース、
図５Ｂ：ペプチド15の高速原子衝撃質量分析（陽イオンベース）、

表１：合成したペプチド類の一覧表

Peptid No.	配列	分子量[a] 理論値	[M+H]+	アミノ酸分析[b] D	S	G	A	L	P	K	量(nmol)	—
14	Ac-G-G-S-L-S-S-DKP	755.4	756.4	-	2.88	1.98	-	1.00	x	x	66	
15	Ac-G-S-L-S-S-L-DKP	811.4	812.4	-	2.90	0.97	-	2.00	x	x	52	
16	Ac-S-L-S-S-L-A-DKP	825.4	826.4	-	2.90	-	0.99	2.00	x	x	54	
17	Ac-L-S-S-L-A-N-DKP	852.4	853.4	0.89	1.98	-	1.00	2.00	x	x	57	
R	Ac-DKP	268.2	267.2	-	-	-	-	-	x	x	約 75	

(a) Ac-DKPは高速原子衝撃質量分析では陰イオンベースで $[M-H]^-$ としてのみ測定された。
(b) DKP-部分は標準加水分解の条件では完全には分解しなかった。x は、Pro と Lys が等量存在したが、ペプチド鎖のアミノ酸残基に関しては等モルではないことを示す。

実施例４

プロピレン製チップを備えた普通のミクロピペットを用いて0.1μｌ迄の容積を手で滴下した。２種類の材質の紙を使用した場合の典型的な測定データの一部を表２に示す。

表２：滴下容積、プロットの大きさ及び官能性の間の関係

A: Whatman 540 容積 [μℓ]	直径 [mm]	β-ala-アンカー [μmol]	B: Whatman 3 MM 前処理 容積 [μℓ]	直径 [mm]	β-ala-アンカー [μmol]
0.1	3	0.02	1	4	0.10
0.5	5	0.07	5	7	0.45
1.0	7	0.13	10	10	0.85
2.0	9	0.25	20	14	1.70
5.0	12	0.60	50	22	4.40

値の範囲　± 5 %

実施例５

一般式N_2pN_1の16個のジヌクレオシドモノリン酸の全てを調製した。その際化学的機序に関しては、欧州特許84 100 059.9並びにFrank et al. in Nucleic Acids Res., 11 (1983) 4365-4377に準拠した。又使用した担体は実施例１によったが、細部に就いては次の点を挙げておく。

平面状担体としては、実施例１のジ-β-Ala-アンカーを備えたWhatman 540紙片を用いる。最初の開始構成成分N_1としてそれぞれ5’-DMTr-ヌクレオシド-3’-コハク酸（NMP溶液）を使用し、実施例１にならって滴下によりアミノアンカーにカップリングする（DICDとHOBt使用）。これらのコハク酸塩は不安定なリンカーの一例である。続いて引用した従来の技術により公知のキャップ形成を行う。DMTr基はジクロロ酢酸の３%ジクロロメタン溶液により分離できる。カップリングには第２の構成成分N_2pとして5’-DMTr-ヌクレオシド-3’-o-リン酸クロロフエニルを（MSNTのピリジン溶液と併用）、空気中の湿度を避けるためにアルゴン雰囲気中で滴下する。DMTr基を前述のように分離する。

得られたスポットを打ち抜き、それぞれ30%のアンモニア水で処理し、その上清を反応生成物（ジヌクレオシドモノリン酸）に就いて、高速原子衝撃質量分析によりGrotjahn et al., Nucleic Acids Res., 10（1982）4671-4678に準じて調べる。

【図１】



【図２Ａ】

A:CMV26PEP

		Len	M.W.	保護/修正
1- 1A	IBIRGKSRGG	10	1015.6	
2- 2A	BIRGKSRGGG	10	959.6	
3- 3A	GRGKSRGGGG	10	887.6	
4- 4A	RGKSRGGGGG	10	887.6	
5- 5A	GKSRGGGGGG	10	788.5	
6- 6A	KSRGGGGGGG	10	788.5	
7- 7A	SRGGGGGGGS	10	747.4	
8- 8A	RGGGGGGGSL	10	773.5	
9- 9A	GGGGGGGSLS	10	704.4	
10- 10A	GGGGGGSLSS	10	734.4	
11- 11A	GGGGGSLSSL	10	790.5	

12- 12A	GGGGSLSSLA	10	804.5	
13- 13A	GGGSLSSLAN	10	861.5	
14- 14A	GGSLSSLANA	10	875.5	
15- 15A	GSLSSLANAG	10	875.5	
16- 16A	SLSSLANAGG	10	875.5	
17- 17A	LSSLANAGGL	10	901.6	
18- 18A	SSLANAGGLH	10	925.6	
19- 19A	SLANAGGLHD	10	953.6	
20- 20A	LANAGGLHDD	10	981.5	
21- 21A	ANAGGLHDDG	10	925.5	
22- 22A	NAGGLHDDGP	10	951.5	
23- 23A	AGGLHDDGPG	10	894.5	
24- 24A	GGLHDDGPGL	10	936.5	

25- 25A	GLHDDGPGLD	10	994.5	
26- 26A	LHDDGPGLDN	10	1051.6	
27- 27A	HDDGPGLDND	10	1053.5	
28- 28A	DDGPGLDNDL	10	1029.5	
29- 29A	DGPGLDNDLM	10	1045.5	
30- 30A	GPGLDNDLMN	10	1044.5	
31- 31A	PGLDNDLMNE	10	1116.6	
32- 32A	GLDNDLMNEP	10	1116.6	
33- 33A	LDNDLMNEPM	10	1190.6	
34- 34A	DNDLMNEPMG	10	1134.5	
35- 35A	NDLMNEPMGL	10	1132.6	
36- 36A	DLMNEPMGLG	10	1075.6	
37- 37A	LMNEPMGLGG	10	1017.6	

38- 38A	MNEPMGLGGL	10	1017.6	
39- 39A	NEPMGLGGLG	10	943.5	
40- 40A	EPMGLGGLGG	10	886.5	
41- 41A	PMGLGGLGGG	10	814.5	
42- 42A	MGLGGLGGGG	10	774.5	
43- 43A	GLGGLGGGGG	10	700.4	
44- 44A	LGGLGGGGGG	10	700.4	
45- 45A	GGLGGGGGGG	10	644.4	
46- 46A	GLGGGGGGGG	10	644.4	
47- 47A	LGGGGGGGGK	10	715.5	
48- 48A	GGGGGGGGKK	10	730.5	
49- 49A	GGGGGGGKKH	10	810.5	

: A=18 D=36 E=11 G=185 H=9 I=1 K=9 L=63 M=18 N=27 P=1

Cycle 0
G: 1 2 3 4 5 6 15 16 21 23 34 36 37 39 40 41 42 43 44 45 46 (21/0)
L: 8 11 17 24 28 35 38 (7/0)
D: 19 20 25 27 (4/0)
N: 13 26 30 (3/0)
S: 7 9 10 (3/0)
A: 12 14 (2/0)
M: 29 33 (2/0)
H: 18 49 (2/0)
P: 22 32 (2/0)
K: 47 48 (2/0)
E: 31 (1/0)

Cycle 1
G: 1 2 3 4 5 6 7 16 17 22 24 35 37 38 40 41 42 43 44 45 46 47 (22/0)
L: 9 12 18 25 29 36 39 (7/0)
D: 20 21 26 28 (4/0)
N: 14 27 31 (3/0)
S: 8 10 11 (3/0)
M: 30 34 (2/0)
K: 48 49 (2/0)
P: 23 33 (2/0)
A: 13 15 (2/0)
E: 32 (1/0)
H: 19 (1/0)

Cycle 2
G: 2 3 4 5 6 7 8 17 18 23 25 36 38 39 41 42 43 44 45 46 47 48 (22/0)
L: 10 13 19 26 30 37 40 (7/0)
D: 21 22 27 29 (4/0)
N: 15 28 32 (3/0)
S: 9 11 12 (3/0)
A: 14 16 (2/0)
P: 24 34 (2/0)
M: 31 35 (2/0)
K: 49 (1/0)
E: 33 (1/0)
R: 1 (1/0)
H: 20 (1/0)

Cycle 3
G: 3 4 5 6 7 8 9 18 19 24 26 37 39 40 42 43 44 45 46 47 48 49 (22/0)
L: 11 14 20 27 31 38 41 (7/0)
D: 22 23 28 30 (4/0)
S: 1 10 12 13 (4/0)
N: 16 29 33 (3/0)
A: 15 17 (2/0)
P: 25 35 (2/0)
M: 32 36 (2/0)
H: 21 (1/0)
R: 2 (1/0)
E: 34 (1/0)

Cycle 4
G: 4 5 6 7 8 9 10 19 20 25 27 38 40 41 43 44 45 46 47 48 49 (21/0)
L: 12 15 21 28 32 39 42 (7/0)
D: 23 24 29 31 (4/0)
S: 2 11 13 14 (4/0)
N: 17 30 34 (3/0)
A: 16 18 (2/0)
P: 26 36 (2/0)
M: 33 37 (2/0)
K: 1 (1/0)
E: 35 (1/0)
R: 3 (1/0)
H: 22 (1/0)

Cycle 5
G: 1 5 6 7 8 9 10 11 20 21 26 28 39 41 42 44 45 46 47 48 49 (21/0)
L: 13 16 22 29 33 40 43 (7/0)
D: 24 25 30 32 (4/0)
S: 3 12 14 15 (4/0)
N: 18 31 35 (3/0)
A: 17 19 (2/0)
P: 27 37 (2/0)
M: 34 38 (2/0)
K: 2 (1/0)
E: 36 (1/0)
R: 4 (1/0)
H: 23 (1/0)

Cycle 6
G: 2 6 7 8 9 10 11 12 21 22 27 29 40 42 43 45 46 47 48 49 (20/0)
L: 14 17 23 30 34 41 44 (7/0)
D: 25 26 31 33 (4/0)
S: 4 13 15 16 (4/0)
N: 19 32 36 (3/0)
A: 18 20 (2/0)
P: 28 38 (2/0)
R: 1 5 (2/0)
M: 35 39 (2/0)
E: 37 (1/0)
H: 24 (1/0)
K: 3 (1/0)

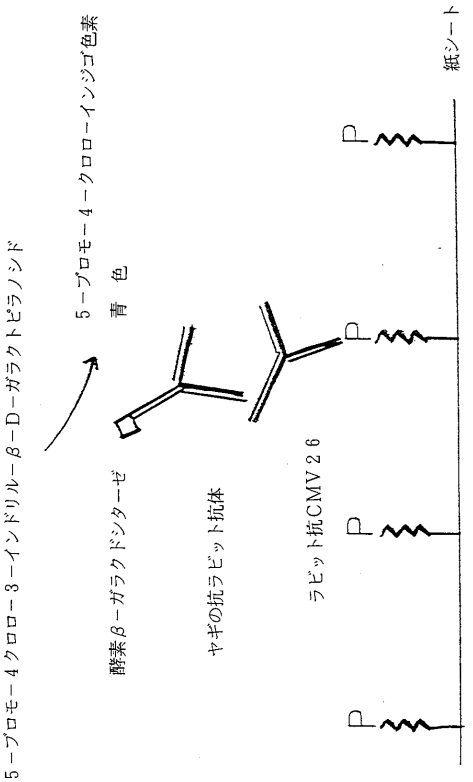
Cycle 7
G: 1 3 7 8 9 10 11 12 13 22 23 28 30 41 43 44 46 47 48 49 (20/0)
L: 15 18 24 31 35 42 45 (7/0)
D: 26 27 32 34 (4/0)
S: 5 14 16 17 (4/0)
N: 20 33 37 (3/0)
A: 19 21 (2/0)
P: 29 39 (2/0)
R: 2 6 (2/0)
M: 36 40 (2/0)
E: 38 (1/0)
H: 25 (1/0)
K: 4 (1/0)

Cycle 8
G: 2 4 8 9 10 11 12 13 14 23 24 29 31 42 44 45 47 48 49 (19/0)
L: 16 19 25 32 36 43 46 (7/0)
D: 27 28 33 35 (4/0)
S: 6 15 17 18 (4/0)
N: 21 34 38 (3/0)
M: 37 41 (2/0)
A: 20 22 (2/0)
P: 30 40 (2/0)
R: 3 7 (2/0)
E: 1 39 (2/0)
H: 26 (1/0)
K: 5 (1/0)

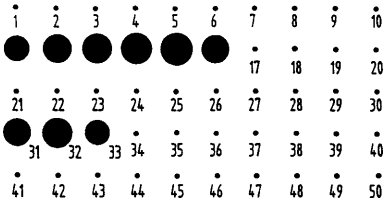
(18/18)

Cycle 9
G: 3 5 9 10 11 12 13 14 15 24 25 30 32 43 45 46 48 49
L: 17 20 26 33 37 44 47 (7/7)
D: 28 29 34 36 (4/4)
S: 7 16 18 19 (4/4)
N: 22 35 39 (3/3)
M: 38 42 (2/2)
A: 21 23 (2/2)
P: 31 41 (2/2)
R: 4 8 (2/2)
E: 2 40 (2/2)
H: 27 (1/1)
I: 1 (1/1)
K: 6 (1/1)

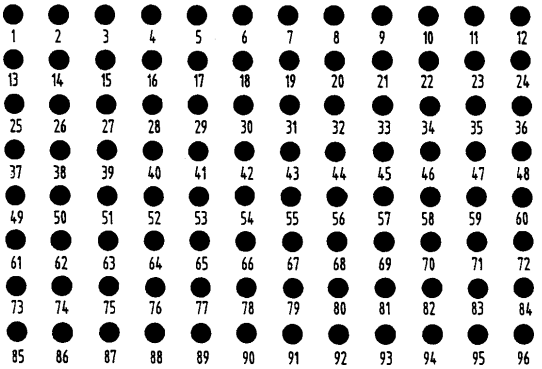
【図３】



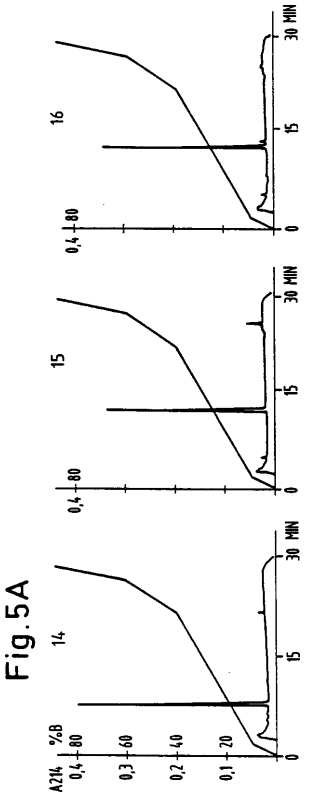
【図４】
Fig.4



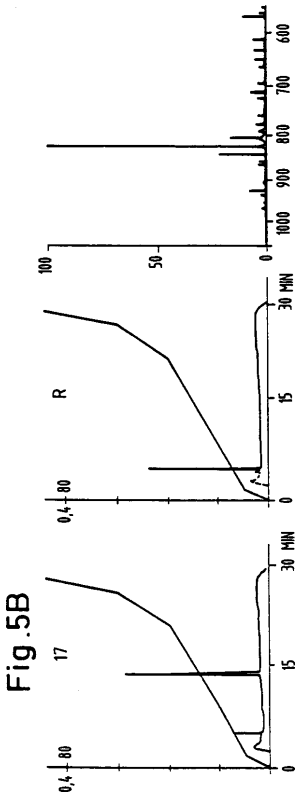
【図６】
Fig.6



【図５Ａ】


Fig.5A
A214
%B
0,4 80
0,3 60
0,2 40
0,1 20
0
14
15
16
30 MIN

【図５Ｂ】


Fig.5B
0,4 80
0
17
R
100
50
600
700
800
900
1000
30 MIN

フロントページの続き

(72)発明者　ギーラー，シナン
ドイツ連邦共和国　デー－３３００　ブラウンシュヴァイク、マシェローデル・ヴェーク　１

合議体
審判長　平田　和男
審判官　鵜飼　健
審判官　小暮　道明

(56)参考文献　特表昭６０－５００６８４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第８９／１０９７７（WO，Ａ１）
東独国特許出願第２７２８５５号明細書
Ｃｏｌｌｅｃｔ．ｃｚｅｃｈ．Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．，Ｖｏｌ．５４（１９８９）ｐ．１７４６－１７５２
Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９（１９９０Ｊｕｌ．２７）ｐ．３８６－３９０
Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　ａｎｄ　ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ，４（１９８９）ｐ．５９－７８

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07K1/04
G01N33/544
Medline