

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4750187号  
(P4750187)

(45) 発行日 平成23年8月17日(2011.8.17)

(24) 登録日 平成23年5月27日(2011.5.27)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/531 (2006.01)		GO 1 N 33/531	Z
GO 1 N 37/00 (2006.01)		GO 1 N 37/00	1 O 2
GO 1 N 33/543 (2006.01)		GO 1 N 33/543	5 2 5 G

請求項の数 36 (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2008-529069 (P2008-529069)	(73) 特許権者	000005049
(86) (22) 出願日	平成18年12月19日 (2006.12.19)		シャープ株式会社
(65) 公表番号	特表2009-519433 (P2009-519433A)		大阪府大阪市阿倍野区長池町2番2号
(43) 公表日	平成21年5月14日 (2009.5.14)	(74) 代理人	110000338
(86) 国際出願番号	PCT/JP2006/325698		特許業務法人原謙三国際特許事務所
(87) 国際公開番号	W02007/072976	(72) 発明者	サリー アンダーソン
(87) 国際公開日	平成19年6月28日 (2007.6.28)		イギリス オーエックス2 6アールキュー
審査請求日	平成20年6月13日 (2008.6.13)		ー, オックスフォード, キングストン
(31) 優先権主張番号	0525918.9		ロード 32
(32) 優先日	平成17年12月20日 (2005.12.20)	(72) 発明者	ミハエル エー. リーヴ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		イギリス アールジー9 1ピーエル, オ
			ックスフォードシャー, ヘンリー-オン-
			テムズ, セントアンドリュース ロード
			118

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リガンド結合用多量体型捕捉剤の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リガンド結合用多量体型捕捉剤の作製方法であって、

上記捕捉剤は、少なくとも第1単量体ユニットおよび第2単量体ユニットを含んでおり、

上記第1単量体ユニットは、第1リガンド結合部分、第1反応基および付着部分をさらに含んでおり、

上記第2単量体ユニットは、第2リガンド結合部分および第2反応基をさらに含んでおり、

上記第1反応基および第2反応基は、互いに同じか、または互いに異なるものであり、  
以下の(a)および(b)の工程を含んでおり、

(a) 上記第1単量体ユニットにある反応基と第2単量体ユニットにある反応基とが反応して多量体型捕捉剤を形成するように、上記第1単量体ユニットと上記第2単量体ユニットとを反応させる工程、

(b) 上記付着部分を介して、上記第1単量体ユニットを担体上に固定化する工程、  
工程(a)は、工程(b)よりも前に、または工程(b)と同時に、または工程(b)の後におこなわれ、

上記第1単量体ユニットおよび第2単量体ユニットはそれぞれ、第1ペプチドおよび第2ペプチドであり、

上記第1ペプチドは、

10

20

( i ) X1-R-X1-X2-X1-X3、  
( ii ) X1-R-X1-X2-X1-X3-X1-X4、または  
( iii ) X1-R-X1-X2-X1-X3-X1-X4-X1-X5  
 で表されるアミノ酸配列を有しており、  
X1は、疎水性アミノ酸であり、Rは第1反応基を含むアミノ酸であり、X2～X5はリガ  
ンド結合残基であり、  
上記第1反応基は、チオール、マレイミド、シクロペンタジエン、アジド、ホスフィン  
酸チオエステル、チオエステル、および(ニトロ)チオピリジン活性化チオールからなる  
群より選択されることを特徴とする作製方法。

【請求項2】

リガンド結合用多量体型捕捉剤の作製方法であって、  
 上記捕捉剤は、少なくとも第1単量体ユニットおよび第2単量体ユニットを含んでおり、  
 上記第1単量体ユニットは、第1リガンド結合部分、第1反応基および付着部分をさらに含んでおり、  
 上記第2単量体ユニットは、第2リガンド結合部分および第2反応基をさらに含んでおり、  
 上記第1反応基および第2反応基は、互いに同じか、または互いに異なるものであり、  
 上記第1単量体ユニットにある反応基と第2単量体ユニットにある反応基とが反応して多量体型捕捉剤を形成するように、上記第1単量体ユニットと上記第2単量体ユニットとを反応させる工程を含んでおり、

上記第1単量体ユニットおよび第2単量体ユニットはそれぞれ、第1ペプチドおよび第2ペプチドであり、  
 上記第1ペプチドは、

( i ) X1-R-X1-X2-X1-X3、  
( ii ) X1-R-X1-X2-X1-X3-X1-X4、または  
( iii ) X1-R-X1-X2-X1-X3-X1-X4-X1-X5  
 で表されるアミノ酸配列を有しており、  
X1は、疎水性アミノ酸であり、Rは第1反応基を含むアミノ酸であり、X2～X5はリガ  
ンド結合残基であり、  
上記第1反応基は、チオール、マレイミド、シクロペンタジエン、アジド、ホスフィン  
酸チオエステル、チオエステル、および(ニトロ)チオピリジン活性化チオールからなる  
群より選択されることを特徴とする作製方法。

【請求項3】

上記多量体型捕捉剤を、上記付着部分を介して担体上に固定化する工程をさらに含んでいることを特徴とする請求項2に記載の作製方法。

【請求項4】

少なくとも上記第1単量体ユニットおよび第2単量体ユニットは、合成されることを特徴とする請求項1～3の何れか1項に記載の作製方法。

【請求項5】

第1ペプチドおよび第2ペプチドは、それぞれ、第1アミノ酸群および第2アミノ酸群から生成されることを特徴とする請求項1～4の何れか1項に記載の作製方法。

【請求項6】

上記第1アミノ酸群と第2アミノ酸群とは、異なるものであることを特徴とする請求項5に記載の作製方法。

【請求項7】

各アミノ酸残基は、実質的に鏡像異性的に単一であることを特徴とする請求項1～6の何れか1項に記載の作製方法。

【請求項8】

実質的に鏡像異性的に単一である各アミノ酸は、20種未満のアミノ酸からなる群より

10

20

30

40

50

選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 9】

実質的に鏡像異性的に単一である各アミノ酸は、4 種のアミノ酸からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 10】

実質的に鏡像異性的に単一である各アミノ酸は、L 型アミノ酸、D 型アミノ酸、アミノ酸模倣物、スパーサーアミノ酸、ベータアミノ酸または他のキラルアミノ酸単量体からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 9 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 11】

実質的に鏡像異性的に単一である上記アミノ酸は、L 型アミノ酸および D 型アミノ酸の少なくとも何れかであることを特徴とする請求項 1 ~ 10 の何れか 1 項に記載の作製方法。

10

【請求項 12】

上記第 1 ペプチドおよび第 2 ペプチドは、互いに異なるアミノ酸配列を有していることを特徴とする請求項 1 ~ 11 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 13】

上記第 2 ペプチドは、2 ~ 50 個のアミノ酸を含んでいることを特徴とする請求項 1 ~ 12 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 14】

上記反応基は、チオール、マレイミド、シクロペンタジエン、アジド、ホスフィン酸チオエステル、チオエステル、および(ニトロ)チオピリジン活性化チオールからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 13 の何れか 1 項に記載の作製方法。

20

【請求項 15】

上記反応基は、チオール基であることを特徴とする請求項 1 ~ 14 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 16】

上記チオール基は、チオニトロピリジル基またはチオピリジル基によって活性化されていることを特徴とする請求項 1 ~ 15 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 17】

上記捕捉剤は、上記担体に共有結合していることを特徴とする請求項 1 ~ 16 の何れか 1 項に記載の作製方法。

30

【請求項 18】

上記ペプチドは、上記捕捉剤のリガンド結合領域において、1 アミノ酸おきのみアミノ酸が異なるように合成されていることを特徴とする請求項 1 ~ 17 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 19】

上記第 2 ペプチドは、少なくとも 1 つの疎水性アミノ酸残基を含んでおり、  
上記疎水性アミノ酸残基および上記リガンド結合部分は、疎水性面および実質的に非疎水性であるリガンド結合面を有する捕捉剤を形成するように、上記ペプチドの一次構造中に配置されていることを特徴とする請求項 1 ~ 16 の何れか 1 項に記載の作製方法。

40

【請求項 20】

上記第 2 ペプチドの上記疎水性面が、上記付着部分を形成していることを特徴とする請求項 19に記載の作製方法。

【請求項 21】

第 2 ペプチドは、上記付着部分を形成している複数の疎水性アミノ酸を含んでいることを特徴とする請求項 19 または 20に記載の作製方法。

【請求項 22】

上記第 2 ペプチドは、1 ~ 6 個の疎水性アミノ酸残基を含んでいることを特徴とする請求項 19 ~ 21の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 23】

50

上記疎水性アミノ酸は、ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、メチオニン、チロシン、トリプトファンおよびフェニルアラニンからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 22 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 24】

上記疎水性アミノ酸は、フェニルアラニンであることを特徴とする請求項 1 ~ 23 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 25】

上記第 2 ペプチドは、10 個以下のリガンド結合残基を含んでいることを特徴とする請求項 1 ~ 24 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 26】

上記第 1 ペプチドは、配列番号 1 に示される配列を有していることを特徴とする請求項 1 ~ 25 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 27】

上記第 2 ペプチドは、配列番号 2 に示される配列を有していることを特徴とする請求項 19 ~ 26 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 28】

上記捕捉剤は、上記担体上にてアセンブルされていることを特徴とする請求項 1 ~ 27 の何れか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 28 の何れか 1 項に記載の方法によって生成される多数の捕捉剤が固定化されているアレイを作製する作製方法であって、

アドレス可能な空間符号化アレイを形成するために、請求項 1 ~ 28 の何れか 1 項に記載の方法により生成した捕捉剤を、適した担体上に供給する工程を含むことを特徴とするアレイの作製方法。

【請求項 30】

上記アレイが個別のアドレス可能な空間符号化部位を複数含んでいることを特徴とする請求項 29 に記載のアレイの作製方法。

【請求項 31】

上記アレイ上の所定の部位にある上記捕捉剤の実質的に全てが、実質的に同一であることを特徴とする請求項 29 または 30 に記載のアレイの作製方法。

【請求項 32】

上記アレイ上の各部位には、互いに異なる捕捉剤が含まれていることを特徴とする請求項 31 に記載のアレイの作製方法。

【請求項 33】

関心のあるリガンドに結合している多量体型捕捉剤の検出方法であって、請求項 1 ~ 28 の何れか 1 項に記載の方法により生成したコンビナトリアル捕捉剤のアレイを作製する工程と、

上記関心のあるリガンドを上記アレイに接触させる工程と、上記リガンドが結合している捕捉剤を検出する工程と、を含むことを特徴とする検出方法。

【請求項 34】

請求項 2、4 ~ 16 の何れか 1 項に記載の方法により生成した多量体型捕捉剤と、固定化に適した担体とを含んでいることを特徴とするキット。

【請求項 35】

請求項 1、2、4 ~ 16 の何れか 1 項に記載の方法により生成した第 1 単量体ユニットおよび第 2 単量体ユニットを含んでいることを特徴とするキット。

【請求項 36】

適した担体をさらに含んでいることを特徴とする請求項 35 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【0001】

## 〔技術分野〕

本発明は、二量体型、またはより高次である多量体型捕捉剤を表面に作製する新規な方法、その新規な方法により製造される捕捉剤、およびその捕捉剤のアレイに関する。

## 【0002】

## 〔背景技術〕

ペプチドなどの分子のコンビナトリアル生成 (combinatorial production) は周知の技術である。この技術は強力なツールを提供し、ハイスループットスクリーニングなどの技術に用いることができる分子の巨大ライブラリーの作製を可能にしている。このような技術の例、およびこれらに関心のある分子の同定に利用している例は、例えば、J. Org. Chem., 63, 8969, (1998) に開示されている。この文献においては、3merの1,000ペプチドライブラリーを、ダンシル「ピンセット」(dansyl 'tweezer') 分子と水中で反応させている。ライブラリー中の3%が、「ピンセット」と結合している。J. Comb. Chem., 5, 794, (2003) には、スプリットおよび混合合成のための、三脚シクロトリペラトリレン骨格 (tripodal cyclotriveratrylene scaffold) が記載されており、~2,000の構成を含むライブラリーが記載されている。

10

## 【0003】

Nature Biotechnology, 22, 568, (2004), Darío Neri et al. には、DNAタグが付着した有機分子結合剤の二つのライブラリーが記載されている。より多様性に富んだライブラリーを作製するために、DNAの相補性が用いられている。さらなるライブラリーがまた、三重らせん形成を用いて作製されている。24merオリゴが、複合体アセンブリに用いられている。有機分子の解析は、付着しているDNAタグの配列を調べることにより、または、オリゴヌクレオチドアレイに結合させることによりおこなわれている。結合剤は、nMのアフィニティを有するタンパク質となるように産出される。

20

## 【0004】

Bioconjugate Chem., 12, 346, (2001) には、ペプチドマイクロアレイおよび低分子マイクロアレイの作製についての記載がある。この文献にはまた、化学選択的ライゲーションが、ペプチドおよびスライド表面に用い得ることが開示されている。この技術においては、N末端システイン残基が、スライド表面のアルファケトアルデヒドと反応してチアゾリジン環を形成する。他にも、遊離チオールとマレイミドとの間での遊離ラジカルマイケル付加が用いられている。

30

## 【0005】

さらに、Chem. Commun., 581, (2005) には、フォトリソグラフィー合成により、環状ペプチドの複合体ライブラリーを表面上に構築するストラテジーが記載されている。あらかじめ作製されているコアに側鎖をコンビナトリアル付加するために、ディファレンシャルプロテクション (differential protection) ストラテジーが利用されている。

## 【0006】

有意義なライブラリーに必要とされる多様性を獲得するためには、公知の技術では、多数の合成をおこなう必要があり、それにより要する時間およびライブラリー作製のコストが増加する。

40

## 【0007】

## 〔発明の開示〕

本発明の目的は、必要とされる多様性を有する分子のライブラリーを、高速かつ安価に作製する方法を提供することである。

## 【0008】

本発明の第1の態様によれば、リガンド結合用多量体型捕捉剤の作製方法であって、上記捕捉剤は、少なくとも第1単量体ユニットおよび第2単量体ユニットを含んでおり、上

50

記第1単量体ユニットは、第1リガンド結合部分、第1反応基および付着部分をさらに含んでおり、上記第2単量体ユニットは、第2リガンド結合部分および第2反応基をさらに含んでおり、上記第1反応基および第2反応基は、互いに同じか、または互いに異なるものであり、以下の(a)および(b)の工程を含んでおり、

(a) 上記第1単量体ユニットにある反応基と第2単量体ユニットにある反応基とが反応して多量体型捕捉剤を形成するように、上記第1単量体ユニットと上記第2単量体ユニットとを反応させる工程、

(b) 上記付着部分を介して、上記第1単量体ユニットを担体上に固定化する工程、

工程(a)は、工程(b)よりも前に、または工程(b)と同時に、または工程(b)の後におこなわれることを特徴とする作製方法が提供される。

10

【0009】

捕捉剤は、担体上にてアSEMBルされることが好ましい。

【0010】

本発明に係る捕捉剤の可能な作製方法の概略は、図1、2および3に示されており、また実施例1において説明されている。

【0011】

本発明の別の実施形態では、リガンド結合用多量体型捕捉剤の作製方法であって、上記捕捉剤は、少なくとも第1単量体ユニットおよび第2単量体ユニットを含んでおり、上記第1単量体ユニットは、第1リガンド結合部分、第1反応基および付着部分をさらに含んでおり、上記第2単量体ユニットは、第2リガンド結合部分および第2反応基をさらに含んでおり、上記第1反応基および第2反応基は、互いに同じか、または互いに異なるものであり、(a) 上記第1単量体ユニットにある反応基と第2単量体ユニットにある反応基とが反応して多量体型捕捉剤を形成するように、上記第1単量体ユニットと上記第2単量体ユニットとを反応させる工程、を含んでいることを特徴とする作製方法もまた提供される。

20

【0012】

この別の実施形態においては、上記捕捉剤を担体上に固定化する工程をさらに含むことが好ましい。

【0013】

本発明の様々な実施形態は、以下に、より詳細に明確にされる。明確にされた各実施形態は、任意の他の実施形態と組み合わせることができ、また、明らかに反対のことが示されていない限り複数の実施形態を組み合わせることができる。とりわけ、好ましいまたは有利であると示されたいかなる特徴も、好ましいまたは有利であると示された他の任意のまたは複数の特徴と組み合わせることができる。

30

【0014】

ある好ましい実施形態において、第1単量体ユニットと第2単量体ユニットとは、共有結合している。

【0015】

付着部分は、捕捉剤を担体上に固定化する任意の適した手段を含んでいることが、理解される。固定化は、例えば、共有結合相互作用、イオン相互作用、疎水性相互作用、極性相互作用、ストレプトアビジン - ビオチン相互作用、アビジン - ビオチン相互作用、または他の高アフィニティな非共有結合相互作用によるものであることが理解される。

40

【0016】

好ましくは、付着部分は、捕捉剤を担体上に固定化するために、共有結合による手段または疎水性相互作用による手段を含んでいる。

【0017】

単量体ユニットが任意の適した種類の分子であり得ることは、理解される。好ましくは、単量体ユニットは、ヌクレオチドまたはアミノ酸である。より好ましくは、単量体ユニットは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。最も好ましくは、単量体ユニットは、ポリペプチドである。

50

## 【0018】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチドについては、それぞれ2つ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の鎖を意味している。

## 【0019】

第1単量体ユニットおよび第2単量体ユニットは、合成されることが好ましい。第1単量体ユニットおよび第2単量体ユニットは固相上に合成され、互いに同じかまたは異なるものであることがより好ましく、単量体ユニットは、第1の態様における使用の前に固相から切り離されることがさらに好ましい。

## 【0020】

ポリヌクレオチド合成およびポリペプチド合成は当業者にとって周知の技術である。

10

## 【0021】

固相ペプチド合成および液相ペプチド合成などの、ペプチドおよびそれらの塩ならびにそれらの誘導体の合成は、十分に確立されている。例えば、Stewart, et al. (1984) Solid Phase Peptide Synthesis (2nd Ed.); および、Chan (2000) "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach," Oxford University Press 参照。ペプチドは、自動ペプチド合成装置（例えば、Pioneer（登録商標）ペプチド合成機、アプライドバイオシステムズ社、フォスターシティ、カリフォルニア）を用いて合成できる。例えば、Fmoc固相ペプチド合成によりペプチドをリンクアミド樹脂上に調製した後に、トリフルオロ酢酸（95%）により保護をはずし、樹脂から切り離す。

20

## 【0022】

捕捉剤がペプチド多量体を含んで構成されている場合に、第1ペプチドおよび第2ペプチドが、同じかまたは異なる一次アミノ酸配列を有し得ることは、一見して明白である。

## 【0023】

第1ペプチドおよび第2ペプチドが、第1アミノ酸群および第2アミノ酸群から合成され得ること、ならびに、各アミノ酸群は、同じであってもよくまたは異なるものであってもよいことは、さらに明白である。

## 【0024】

第1ペプチドおよび第2ペプチドは、2~100アミノ酸の長さであることが好ましく、2~50アミノ酸の長さであることがより好ましく、5~25アミノ酸の長さであることが最も好ましい。

30

## 【0025】

リガンド結合部分を形成する各アミノ酸は、好ましくは、本質的に20種未満のアミノ酸からなる群から選択され、より好ましくは、12種未満のアミノ酸からなる群から選択され、さらに好ましくは、6種未満のアミノ酸からなる群から選択され、最も好ましくは、4種のアミノ酸からなる群から選択される。

## 【0026】

群 (set) に含まれている各アミノ酸は、L型アミノ酸、D型アミノ酸、アミノ酸模倣物 (amino acid mimetic)、スパーサーアミノ酸、ベータアミノ酸または他のキラルアミノ酸単量体であり得ることが理解される。好ましくは、アミノ酸は、L型アミノ酸およびD型アミノ酸の少なくとも何れかである。

40

## 【0027】

好ましくは、群に含まれている各アミノ酸は、実質的に鏡像異性的に単一である。

## 【0028】

本発明に係る方法に用いる第1ペプチドおよび第2ペプチドのそれぞれは、好ましくは10個以下のリガンド結合残基を含んでおり、より好ましくは8個以下のリガンド結合残基を含んでおり、より好ましくは6個以下のリガンド結合残基を含んでおり、さらに好ましくは4個以下のリガンド結合残基を含んでおり、最も好ましくは3個以下のリガンド結合残基を含んでいる。

50

## 【0029】

好ましい実施形態においては、反応基は、ペプチド合成の間は保護されており、第1の態様における捕捉剤の生成に使用する前に、保護がはずされる。このような技術は当業者において周知であり、例えば、FMOCに基づく標準的な固相ペプチドアセンブリが挙げられる。この技術によれば、側鎖が保護されているとともにアミノ末端がフリーである樹脂結合ペプチドを産出できる。N末端のアミノ基は、その後、標準的なペプチド合成条件下において、共役できるカルボン酸反応基共役の任意のものと反応し得る。例えば、トリチルまたはメトキシトリチルによって保護されたチオール基を有するシステインが、組み込まれ得る。トリフルオロ酢酸を用いた脱保護により、保護されていないペプチドが、溶液中に生じる。

10

## 【0030】

本発明の任意の実施形態に用いる上記反応基としては、チオール基、マレイミド、シクロペンタジエン、アジド、ホスフィン酸チオエステル、チオエステル、および(ニトロ)チオピリジル活性化チオールから選択されることが好ましいが、これらに限定されるものではない。上記反応基としては、チオール基がより好ましい。好ましくは、反応基がチオール基である場合には、少なくとも1つのチオール基は活性化チオールである。好ましくは、チオール基は、ニトロチオピリジル基またはチオピリジル基で活性化されている。

## 【0031】

反応スキームの概略を示す図4には、さまざまな反応基を含むペプチドを産出する、可能な反応経路が示されている。

20

## 【0032】

多量体型捕捉剤を形成するために、任意の適した反応を本発明の方法に用いることができることは理解され、例えば、シクロペンタジエニル官能化ペプチドとマレイミド官能化ペプチドとの間のディールス-アルダー反応、チオール官能化ペプチドとマレイミド官能化ペプチドとの間のマイケル反応、チオール官能化ペプチドと活性化チオール基(例えば、(ニトロ)チオピリジン部分によって活性化)含有ペプチドとの間でジスルフィドを形成する反応、アジド官能化ペプチドとホスフィン酸チオエステル官能化ペプチドとの間のシュタウディングー(S t a u d i n g e r)ライゲーション、およびチオエステルとN末端システインとの間のネイティブケミカルライゲーションが、挙げられる。

## 【0033】

ペプチド内にあるアミノ酸残基によって、捕捉剤が異なる特性を有するようになることは明白である。例えば、側鎖はリガンド結合のための正電荷を提供し得る。正電荷は、好ましくは、リシン残基(ペプチド鎖と正電荷との間に四つの $\text{CH}_2$ 基)、オルニチン残基(ペプチド鎖と正電荷との間に三つの $\text{CH}_2$ 基)によってもたらされ、最も好ましくは、ジアミノブチリル残基(ペプチド鎖と正電荷との間に二つの $\text{CH}_2$ 基を有する)によってもたらされる。

30

## 【0034】

アミノ酸は、あるいは、リガンド結合のための水素結合供与体および/または受容体としての役割を果たすことができる水酸基を提供し得る。水酸基は、好ましくは、セリン残基(ペプチド鎖とOH基との間に一つの $\text{CH}_2$ 基)によってもたらされ、より好ましくは、ホモセリン残基(ペプチド鎖とOH基との間に二つの $\text{CH}_2$ を有する)によってもたらされる。

40

## 【0035】

アミノ酸は、リガンド結合のための疎水性部分を提供し得る。好ましくは、アラニン残基(ペプチド鎖とメチル基との間に一つも $\text{CH}_2$ 基がない)が疎水性部分をもたらす、より好ましくは、アミノブチリル残基(ペプチド鎖とメチル基との間に一つの $\text{CH}_2$ 基を有する)が疎水性部分をもたらす。

## 【0036】

また、アミノ酸は、リガンド結合のための負電荷を提供し得る。負電荷は、好ましくは、グルタミン酸残基(ペプチド鎖とカルボキシレート基(carboxylate group)との間に

50

二つの $\text{CH}_2$ 基)によってもたらされ、より好ましくは、アスパラギン酸残基(ペプチド鎖とカルボキシレート基との間に一つの $\text{CH}_2$ 基)によってもたらされる。

【0037】

好ましくは、当業者において周知のように、ペプチドは、コンビナトリアル方式(comb inatorial manner)によりアミノ酸の群(set)から生成され、それにより群内にあるアミノ酸の可能な組み合わせの全てを生成することができる。例えば、群内にN種のアミノ酸があり、ペプチドの長さがLである場合には、完全な群は、 $N^L$ 種類のペプチドを含むことになる。

【0038】

好ましい実施形態において、任意の所定のアミノ酸群から生成され得る可能なコンビナトリアルペプチドの、副群(subset)を用いることができる。副群は、ペプチド合成において特定のルールを含めて決定することができ、例えば、群内における各アミノ酸の最大レベルおよび最小レベルを規定することができ、または、組み込まれる疎水性アミノ酸の割合の最大レベルおよび最小レベルを規定することができる。

10

【0039】

本発明の方法により、多様性が増大した捕捉剤が生成される。これは、本方法により生成されるコンビナトリアル作製捕捉剤は、多量体型であるという事実によるものである。例えば、多量体型捕捉剤が二量体の場合には、リガンド結合部分の任意の所定の長さにおける可能な多様性は、二つのペプチド鎖があることにより、二乗した数になる。したがって、初期合成の数を減らして合成することが必要である。

20

【0040】

好ましい実施形態において、リガンド結合に好ましいように側鎖が配置するように、ペプチドを固定化する。

【0041】

捕捉剤が共有結合相互作用によって固定化されている場合には、これは、例えば、図5に示すように、L型アミノ酸とD型アミノ酸とを交互に有するペプチドを合成することによって実現する。

【0042】

または、図6に示すように、ベータアミノ酸を含む群を用いてペプチドを合成してもよく、または、ペプチドの繰り返し単位あたり偶数個の原子を有する他のキラルアミノ酸単量体を用いて合成してもよい。

30

【0043】

ある好ましい実施形態においては、図7に示すように、リガンド結合領域にあるアミノ酸が一アミノ酸おききのみ異なるようにペプチドを合成する。

【0044】

この実施形態は、リガンド結合にとって最も自然で最も有利な間隔にて側鎖が配置されている点において有利である。

【0045】

各ペプチドは、上述した種類のアミノ酸の一つ以上を含み得ること、および、用いられる特定の組み合わせが、様々なペプチド鎖を含む捕捉剤の特性に影響を与えることは、当業者にとって明らかである。

40

【0046】

担体への捕捉剤の固定化が共有結合によりなされている場合には、捕捉剤を担体上に「配列」させることができ、また、アレイは任意の使いやすい形態をとることができる。したがって、本発明の方法は、一分子アレイを含め、「高密度」アレイの全ての種類に適用できる。

【0047】

好ましくは、第1の態様の方法によって生成され、共有結合により固定化されている捕捉剤は、アレイ上の個別の空間符号化部位(spatially encoded loci)に配置されている。好ましくは、アレイ上の所定の部位にある上記捕捉剤の全ては、ペプチドの同じ対を含

50

んで構成されている。より好ましくは、アレイ上の各部位には、互いに異なる捕捉剤が含まれている。

【0048】

分子（例えばペプチド）の担体への固定化に関して、用語「固定化した」および「付着した」は、本明細書および本実施形態において、交換可能に使用され、いずれの用語とも、明白にまたは前後関係から他の内容が示されていない限り、直接的または間接的な、共有結合を包含することを意図している。

【0049】

本発明の特定の実施形態では、「官能化された」不活性な担体またはマトリクス（例えばガラススライド、ポリマービーズなど）を含んで構成されている担体を使用しており、官能化は、例えば、ペプチドなどの生体分子への共有結合を可能とする反応基を含む介在物質の層またはコーティングを塗布することによってなされる。そのような支持体の例としては、ガラスなどの不活性担体上に支持されているポリアクリルアミドヒドロゲルが挙げられるが、これに限定されるものではない。そのような実施形態においては、生体分子（例えばペプチド）は介在物質（例えばヒドロゲル）に直接共有結合をしているが、介在物質そのものは担体またはマトリクス（例えばガラス担体）に非共有結合で結合しているもよい。用語「担体に共有結合」には、適宜、この種の処理を包含していると解釈すべきである。

【0050】

マルチペプチドアレイにおいては、アレイ上の個別の領域には複数のペプチド分子が含まれている。好ましくは、アレイ上の各部位には、単一のペプチド二量体が多コピー含まれている。

【0051】

捕捉剤を担体に共有結合させるための好ましい反応スキームとしては、スルフヒドリル（sulfhydryls）とマレイミド誘導化表面との間の反応、マレイミド誘導化表面とジエン官能化捕捉剤との間のディールス - アルダー反応、アジドおよびアセチレン 3 + 2 付加環化反応、チアゾリジン環形成、ならびに改変シュタウディンガーライゲーションが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、担体への捕捉剤の共有結合は、入れ換えた方法、例えば、チオール誘導化表面とマレイミド置換ペプチドとの間の反応によっても、成立し得る。

【0052】

特に好ましい実施形態においては、捕捉剤を担体に共有結合させるために、チオエステル誘導化捕捉剤と、アミノ基およびシステインのスルフヒドリル基の両方が存在するシステイン誘導化表面との間のネイティブケミカルライゲーションが用いられる。

【0053】

最も好ましい反応スキームでは、図 8 に示すように、N 末端システインを有する捕捉剤とチオエステル誘導化表面との間のネイティブケミカルライゲーションを用いている。

【0054】

ネイティブケミカルライゲーションでは、ペプチド上の N 末端システインと表面付着チオエステルとの間のペプチド結合が形成される。本発明のこの実施形態における特に有利な点は、ペプチド側鎖の保護が必要ないという点である。本発明のこの実施形態におけるさらに特に有利な点は、形成される表面付着ペプチドが、ジスルフィド結合形成による二量体レセプターの形成に利用され得る内部システイン、またはチオールとマレイミド官能化ペプチドとの間の反応に利用され得る内部システインを保持する点である。

【0055】

チオエステル官能化ガラス表面の調製における好ましい反応スキームを図 9 に示す。

【0056】

捕捉剤を担体表面にてアSEMBルさせる場合における、好ましい反応スキームは図 10 に示されている。この実施形態においては、第 1 ペプチドは、チオエステル基と N 末端システイン残基との間のネイティブケミカルライゲーション反応を介して、官能化担体に共

10

20

30

40

50

有結合している。多量体型捕捉剤は、ペプチド間でジスルフィド結合を形成することによって生成される。

【0057】

チオエステル表面を調製するためのより好ましい経路としては、アミノ化表面と下記種類のチオラン2,4-ジオンとの間の反応が挙げられる。

【0058】

【化1】



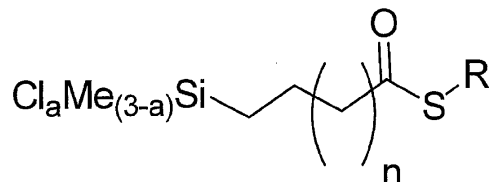
10

チオエステル表面は、下記種類のチオエステルシリルクロライド共役を用いた水酸化表面の誘導化によっても形成できる。

20

【0059】

【化2】



R = alkyl, phenyl, benzyl

n = 1-10

共有結合によって捕捉剤が担体に固定化されている場合には、二量体が形成されており、第1ペプチドおよび第2ペプチドのそれぞれは、リガンド結合部位のN末端側もしくはリガンド結合部位のC末端側にあるペプチド配列中に、または二分されたりリガンド結合部位に挟まれた内側に、チオール基（活性化されていても、活性化されていなくてもよい）を保持している。これらの実施形態のいずれにおいても、チオール基部分はリガンド結合残基と同じ配向性または反対の配向性を有していてもよく、また、第1ペプチドおよび第2ペプチド内の各チオール基の位置は独立であることは、明らかである。

30

【0060】

別の一実施形態において、捕捉剤は、捕捉剤と担体との間の疎水性相互作用によって、担体に固定化されている。

【0061】

本実施形態において、本発明の方法に従って作製された捕捉剤は、少なくとも2つの単量体ユニットを含んでおり、第1単量体ユニットおよび第2単量体ユニットは、それぞれ、少なくとも1つの疎水性部分と、少なくとも1つの反応基と、少なくとも1つのリガンド結合部分とを含んでいる。

40

【0062】

好ましくは、本発明に従って作製した捕捉剤は、少なくとも2つのペプチドを含んでおり、上記第1ペプチドおよび第2ペプチドは、それぞれ、少なくとも1つの疎水性アミノ酸残基と、少なくとも1つの反応基と、少なくとも1つのリガンド結合部分とを含んでおり、上記少なくとも1つの疎水性アミノ酸残基および上記少なくとも1つのリガンド結合部分は、疎水性面および実質的に非疎水性であるリガンド結合面を形成するように、上記ペプチドの一次構造中に配置されている。

【0063】

50

本発明に係る方法の本実施形態において、上記ペプチドの上記疎水性面が、上記付着部分を形成していることが理解される。

【0064】

好ましくは、各ペプチドは、付着部分を形成している複数の疎水性アミノ酸を含んでいる。

【0065】

好ましくは、本発明の本方法に用いる上記第1ペプチドは4～40個の疎水性アミノ酸残基を含んでおり、より好ましくは、6～25個の疎水性アミノ酸残基を含んでおり、最も好ましくは、6～12個の疎水性アミノ酸残基を含んでいる。

【0066】

好ましくは、リガンド結合部分は、少なくとも1つのアミノ酸を含んでいる。より好ましくは、リガンド結合部分は、複数のアミノ酸を含んでいる。

【0067】

リガンド結合面に位置しているアミノ酸は、例えばアミノ酪酸残基などの疎水性残基もまた含まれていてよいことが理解される。

【0068】

図11に示すように、本実施形態に用いている各ペプチドは、疎水性アミノ酸残基と非疎水性アミノ酸残基とを交互に含む一次構造を含んで構成されていることが好ましい。

【0069】

疎水性面および実質的な非疎水性面となるような側鎖の配置となる他のペプチド配列を容易に設計できることは、当業者によって理解される。例えば、疎水性残基の間にある3つの非疎水性アミノ酸残基、または奇数個のアミノ酸の任意の組み合わせが挙げられる。または、ペプチドは、結果として疎水性面および実質的な非疎水性面となるように、例えば、L型アミノ酸、D型アミノ酸およびベータアミノ酸の組み合わせを含んでいてもよい。

【0070】

リガンド結合面に存在するように配置されている各アミノ酸は、好ましくは、本質的に20種未満のアミノ酸からなる群より選択され、より好ましくは、12種未満のアミノ酸からなる群より選択され、さらに好ましくは、6種未満のアミノ酸からなる群より選択され、最も好ましくは、4種のアミノ酸からなる群より選択される。

【0071】

本実施形態に用いる各ペプチドは、好ましくは、疎水性アミノ酸残基を10%～90%含んでおり、より好ましくは、20%～80%含んでおり、さらに好ましくは、30%～70%含んでおり、最も好ましくは、40%～60%含んでいる。

【0072】

特に好ましい実施形態において、第1ペプチドは、50%の疎水性アミノ酸残基を含んでいる。

【0073】

疎水性アミノ酸は、ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン(norleucine)、バリン、ノルバリン(norvaline)、メチオニン、チロシン、トリプトファンおよびフェニルアラニンからなる群より選択されることが好ましい。より好ましくは、疎水性アミノ酸は、フェニルアラニンである。

【0074】

好ましい実施形態においては、捕捉剤は、実質的に非疎水性であるリガンド結合面がリガンド結合に好ましいように、疎水性担体上に配置している。

【0075】

本方法に用いる担体としては任意の適した疎水性担体、例えば、疎水性有機チオール処理によって修飾された金、表面処理により修飾されたガラスまたはプラスチックが使用可能であることが理解される。好ましくは、担体はプラスチックである。

【0076】

10

20

30

40

50

または、実質上水性である溶媒の存在下において、捕捉剤を自身に固定化できる疎水性化合物によって、担体をコートしてもよい。

【0077】

好ましい実施形態において、本発明の本実施形態に用いる第2ペプチドは、第1ペプチドよりもアミノ酸の数が少なく、また、ペプチドと疎水性面との間の相互作用が相対的に弱くなるように、疎水性残基の数がより少なくなっている。

【0078】

第1ペプチドおよび第2ペプチドの長さならびに担体上に保持されるのに必要な疎水性アミノ酸残基の数は、表面の疎水性ならびに第1ペプチドおよび第2ペプチド内の疎水性アミノ酸次第であり、また結合されるリガンドの性質にもよることは、当業者にとって明白である。

10

【0079】

担体に保持されるペプチドの量は、担体が供される洗浄のストリンジェンシー次第であることは、当業者にとって、一見して明白である。ペプチドの固定化の後、担体を例えば、10mM tris-HCl (pH 8.0) 中の1.0M NaClにより洗浄することが好ましい。

【0080】

第2ペプチドは、疎水性面に、好ましくは、1~6個の疎水性アミノ酸残基を含んでおり、より好ましくは、2~5個の疎水性アミノ酸残基を含んでおり、最も好ましくは、2~4個の疎水性アミノ酸残基を含んでいる。

20

【0081】

好ましくは、リガンド結合残基は、実質的に非疎水性であるリガンド結合面に位置している。

【0082】

捕捉剤が疎水性相互作用によって担体に固定化されている場合に、反応基は、第1ペプチドおよび第2ペプチドの一次ペプチド構造中において、任意の適した場所に位置することができる。例えば、反応基は、一次ペプチド配列中において、ペプチドの実質的に非疎水性であるリガンド結合面に位置するように、かつリガンド結合部位のN末端側に位置するように、配置され得る。

【0083】

または、反応基がペプチドの実質的に非疎水性であるリガンド結合面に配置され、第1ペプチドにおいては、反応基がリガンド結合部位のN末端側に位置するように、また第2ペプチドにおいては、反応基がリガンド結合部位のC末端側に位置するように、反応基が第1ペプチドおよび第2ペプチドの一次ペプチド構造中に配置され得る。

30

【0084】

さらなる実施形態では、第1ペプチドにおいては、反応基がペプチドの実質的に非疎水性であるリガンド結合面に位置するように、かつリガンド結合部位のN末端側に位置するように、また第2ペプチドにおいては、反応基がリガンド結合部位に対して反対側の(疎水性の)面に位置するように、かつリガンド結合部位のC末端側に位置するように、反応基が第1ペプチドおよび第2ペプチドの一次ペプチド構造中に配置され得る。

40

【0085】

好ましい実施形態においては、図10に示すように、第1ペプチドの反応基は、一次アミノ酸構造中において、実質的に非疎水性であるリガンド結合面上、リガンド結合部位のN末端側に位置しており、第2ペプチド中において、疎水性面中、リガンド結合部位のN末端側に位置している。

【0086】

好ましくは本実施形態において、捕捉剤は、アレイを形成するように担体に結合している。アレイが任意の使いやすい形態をとることができることは理解される。したがって、本発明の方法は、一分子アレイを含め、「高密度」アレイの全ての種類に適用できる。

【0087】

50

アレイは、個別のアドレス可能な空間符号化部位を複数含んでいることが好ましい。好ましくは、アレイ上の各部位には、異なる捕捉剤が含まれており、より好ましくは、各部位には、多コピーの捕捉剤が含まれている。

【0088】

分子（例えばペプチド）の担体への固定化に関して用語「固定化した」および「付着した」は、本明細書において交換可能に使用され、いずれの用語とも、明白にまたは前後関係から他の内容が示されていない限り、疎水性相互作用を包含することを意図している。通常、分子（例えばペプチド）は、例えばペプチドリガンド結合を必要とする用途などに、担体の使用を意図している条件下において、担体に固定化されている状態または付着している状態にとどまりさえすればよい。

10

【0089】

本発明の特定の実施形態では、「官能化された」不活性な担体またはマトリクス（例えばガラススライド、ポリマービーズなど）を含んで構成されている固体支持体を使用してもよい。この官能化は、例えば、ペプチドなどの疎水性結合を可能とする反応基を含む存在物質の層またはコーティングを塗布することによってなされる。

【0090】

マルチペプチドアレイにおいては、アレイ上の個別の領域には複数のペプチド分子が含まれている。好ましくは、アレイ上の各部位には、単一のペプチドが多コピー含まれている。

【0091】

特に好ましい実施形態において、第1ペプチドは、配列番号1に示される構造を有している；

20

$$(Phe - Gly)_n - Phe - Cys - Phe - X - Phe - Y - Phe - Z - Phe - Gly - Phe$$

ここでX、YおよびZはリガンド結合残基であり、Cysは二量体形成に用いられる求核チオールを提供する。

【0092】

第2ペプチドは、配列番号2に示される好ましい構造を有している；

$$CysS(N)P - X' - Phe - Y' - Phe - Z' - Phe$$

ここで、X'、Y'およびZ'はリガンド結合残基であり、CysS(N)Pは二量体形成に用いられる活性化チオール（最も好ましくは、チオニトロピリジル基またはチオピリジル基のいずれかで活性化されているチオール）である。

30

【0093】

上記の好ましい実施形態は、例示のみを目的としており、限定して解釈すべきではないことは理解すべきである。多くの他の反応基および活性化基を本発明の方法に採用できることは、当業者にとって明白である。

【0094】

最も好ましい実施形態においては、本発明の方法により作製された捕捉剤は、組み合わせが多様な二量体の、アドレス可能な空間符号化アレイを形成するために、適した担体上に分配される。好ましくは、ペプチドは、非接触型ディスペンサー（例えばPiez or ray System、PerkinElmer LAS）を用いて個々に担体上に分配され、in situでアセンブルされる。

40

【0095】

本発明の第2の態様によれば、本発明の第1の態様の方法により作製された捕捉剤が提供される。

【0096】

本発明の第3の態様によれば、第1の態様の方法により作製された少なくとも1つの捕捉剤が固定化されている、担体が提供される。

【0097】

上記捕捉剤は、共有結合相互作用または疎水性相互作用によって固定化されていること

50

が好ましい。

【0098】

本発明は、本発明の方法により作製した多量体型捕捉剤と、固定化に適した担体とを含んでいるキットもまた提供する。

【0099】

あるいは、キットは、本発明の方法に使用するために生成された第1単量体ユニットおよび第2単量体ユニットを含んでいてもよい。キットには、適した担体がさらに含まれていることが好ましい。

【0100】

本発明によれば、関心のあるリガンドを結合している、本発明の方法により作製された多量体型捕捉剤の検出方法であって、上述した任意の態様に係るコンビナトリアル捕捉剤のアレイを作製する工程と、上記関心のあるリガンドを上記アレイに接触させる工程と、上記リガンドが結合している捕捉剤を検出する工程と、を含むことを特徴とする検出方法もまた提供される。

10

【0101】

任意の実施形態において、固定化したペプチドへのリガンドの結合に関して用語「結合」とは、明白にまたは前後関係から他の内容が示されていない限り、直接的または間接的な、共有結合または非共有結合を包含することを意図している。本発明の特定の実施形態においては、共有結合が好ましい。しかしながら、例えばリガンド-レセプター相互作用を必要とする用途などの、担体の使用を意図している条件下において、リガンドが、固定化されているペプチドに結合している状態に通常とどまりさえすればよい。

20

【0102】

捕捉剤へのリガンドの結合を当該技術分野において周知であるさまざまな方法によって同定できることは、当業者にとって明白であり、例えば、リガンドが結合しているアレイ上の位置を同定できるように、リガンドまたは捕捉剤を標識してもよい。この標識は、例えば、放射性標識、または、例えば蛍光体 (fluorophore) を用いた蛍光標識であり得る。または、関心のあるリガンドの捕捉剤への結合を、当該技術分野において周知の他のさまざまな技術を用いて検出してもよく、例えば、熱量測定、吸光光度法、NMR法、原子間力顕微鏡および走査型トンネル顕微鏡を用いた方法、電気泳動またはクロマトグラフィー、質量分析、キャピラリー電気泳動、表面プラズモン共鳴検出、弾性表面波検出ならびにマイクロカンチレバーに基づく多くのアプローチがある。

30

【0103】

捕捉剤が結合する特定のリガンドは、捕捉剤を形成しているペプチドの長さおよび配列によって決まるので、本発明の方法により作製した多量体型捕捉剤および多量体型捕捉剤のアレイは、選択した任意の検出物質 (analyte of choice) の同定に使用できる。好ましい実施形態においては、リガンドとしては、真核細胞、原核細胞、ウイルス、バクテリオファージ、プリオン、孢子、花粉粒、アレルゲン、核酸、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、有機化合物または無機化合物が含まれる。リガンドは、好ましくは、生理代謝産物または薬理代謝産物であり、最も好ましくは、診断または予後医療マーカーとして用いることができる、人もしくは動物の体液中にある生理代謝産物または薬理代謝産物である。

40

【0104】

本発明のさらなる目的、特徴および長所は、以下の記述で明らかになるであろう。さらに、本発明の利点は、図面を参照する以下の説明によって明らかになる。

【0105】

〔発明を実施するための最良の形態〕

ここで使用される用語「スペーサーアミノ酸」は、側鎖がリガンド結合に関与しないアミノ酸であって、アミノ酸、合成アミノ酸、アミノ酸類似物またはアミノ酸模倣物を意図する。

【0106】

50

ここで使用される用語「捕捉剤」は、リガンドが当該捕捉剤に接触したとき、リガンドと結合するような構造を有する多量体分子を意図する。

## 【0107】

ここで使用される用語「ペプチド」は、2つ以上のアミノ酸残基を含む鎖を意図し、合成アミノ酸、アミノ酸類似物、アミノ酸模倣物、またはこれらのいずれかの組み合わせを意図する。用語「ペプチド」、「オリゴペプチド」および「ポリペプチド」は、本明細書中において、交換可能に使用される。

## 【0108】

ここで使用される用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は、2つ以上のヌクレオチドを含む鎖を称し、本明細書中において、交換可能に使用される。

10

## 【0109】

ここで使用される用語「実質的に鏡像異性的に単一」は、残基が実質的に1種類の異性体を含み、他の種類の異性体は不純物としてのみ含むことを意図する。

## 【0110】

ここで使用される用語「リガンド結合に好ましいように配置する」は、多量体捕捉剤を形成するペプチドの側鎖が、リガンドに接触し相互作用し得るように配置することを意図する。

## 【0111】

ここで使用される用語「実質的に非疎水性」は、疎水性残基よりも親水性残基を実質的に多く含むことを意図する。

20

## 【0112】

〔実施例1〕

図1は、本発明に係る捕捉剤の生成方法の概略を示す図である。

## 【0113】

単量体ユニット(A)の第1群を固相上に調製する。この単量体ユニットはリガンド結合部分(R1 - R4)および反応基Xを含んでいる。所望であれば、合成の間はXを保護し、その後、使用する前に保護をはずしてもよい。

## 【0114】

単量体ユニット(B)の第2群を固相上に調製する。これらの単量体ユニットは、リガンド結合部分(R'1 - R'4)、反応基Y、および付着部分Zを含んでおり、上記反応基Yは合成の間は保護され、その後、使用する前に保護がはずされるものであってもよい。所望であれば、合成の間Zも保護し、その後、使用する前に保護をはずしてもよい。

30

## 【0115】

群(A)の単量体ユニットのそれぞれを、固体支持体から切り離し、溶液中に単量体ユニット(C)を得る。

## 【0116】

群(B)の単量体ユニットのそれぞれを、固体支持体から切り離し、溶液中に単量体ユニット(D)を得る。

## 【0117】

次いで、群Dの単量体ユニットのそれぞれを、アレイ上の空間符号化部位において、固体支持体(E)表面と接触させ、このときに上記表面への付着にZが用いられるようにする。

40

## 【0118】

次いで、残基Xと残基Yとが反応して固相に結合している二量体構造(G)を形成するように、群D由来の表面結合単量体ユニット(F)を、過剰量または等モル量の所定の液相単量体ユニット(C)と反応させる。

## 【0119】

配列され、空間符号化された二量体構造(G)は、その後、選択性および適したアフィニティをもって結合する関心のあるリガンドとの結合に使用できる。

## 【0120】

50

図2は、本発明に係る捕捉剤のさらなる生成方法の概略を表す図である。

【0121】

この実施形態においては、単量体ユニット(A)の第1群を固相上に調製する。この単量体ユニットは、リガンド結合部分(R1 - R4)および反応基Xを含んでいる。合成の間は反応基Xを保護し、その後、使用する前に保護をはずしてもよい。

【0122】

また、単量体ユニット(B)の第2群を固相上に調製する。これらの単量体ユニットは、リガンド結合部分(R'1 - R'4)、反応基Y、および付着部分Zを含んでいる。合成の間、リガンド結合部分(R'1 - R'4)および反応基Yを保護し、その後、使用する前に保護をはずしてもよい。所望であれば、合成の間はZも保護し、その後、使用する前に保護をはずしてもよい。

10

【0123】

単量体ユニット(B)のそれぞれを、固体支持体から切り離し、溶液中に単量体ユニット(C)を得る。次いで、残基Xと残基Yとが反応して固相に結合している二量体構造(D)を形成するように、群(A)由来の所定の固相結合単量体ユニットと、過剰量の所定の液相単量体ユニット(C)とを反応させる。

【0124】

次いで、固相に結合している各二量体構造(D)を固体支持体から切り離し、溶液中に二量体構造(E)を得る。

【0125】

二量体構造が部分Zを用いて固体表面(F)に付着するように、各液相二量体構造(E)を、最終的に、アレイの空間符号化部位にて固体表面(F)と接触させる。

20

【0126】

配列され、空間符号化された二量体構造(G)は、その後、選択性および適したアフィニティをもって結合する関心のあるリガンドとの結合に使用できる。

【0127】

図に示したX、YおよびZの位置は説明のための単なる例示であり、本発明はこれに限定されない。

【0128】

図3は、第3の態様における捕捉剤のさらなる作製方法の概略を示す図である。

30

【0129】

単量体ユニット(A)の第1群を固相上に調製する。この単量体ユニットは、リガンド結合部分(R1 - R4)および反応基Xを含んでいる。所望により、合成の間はXを保護し、その後、使用する前に保護をはずしてもよい。

【0130】

単量体ユニット(B)の第2群を固相上に調製する。これらの単量体ユニットは、リガンド結合部分(R'1 - R'4)、反応基Y、および付着部分Zを含んでいる。合成の間は反応基Yを保護し、その後、使用する前に保護をはずしてもよい。所望により、合成の間はZも保護し、その後、使用する前に保護をはずしてもよい。

【0131】

群(A)の単量体ユニットのそれぞれを、固体支持体から切り離し、溶液中に単量体ユニット(C)を得る。

40

【0132】

群(B)の単量体ユニットのそれぞれを、固体支持体から切り離し、溶液中に単量体ユニット(D)を得る。

【0133】

次いで、二量体構造がZを用いて固体表面(F)に付着するように、また、残基Xと残基Yとが反応して固相に結合している二量体構造(G)を形成するように、群Dの単量体ユニットを、過剰量または等モル量の所定の液相単量体ユニット(C)に接触させ、アレイの空間符号化部位において、固体支持体(E)の表面に接触させる。

50

## 【 0 1 3 4 】

配列され、空間符号化された二量体構造 (G) は、その後、選択性および適したアフィニティをもって結合する関心のあるリガンドとの結合に使用できる。

## 【 0 1 3 5 】

本発明の最も重要な利点は、アレイ表面における単量体ユニットの対 (またはさらに大きい数) のコンビナトリアル結合によって、配列の多様性が「二乗化」 (またはさらに高い次数のべき乗化) されることである。

## 【 0 1 3 6 】

## 〔 実施例 2 〕

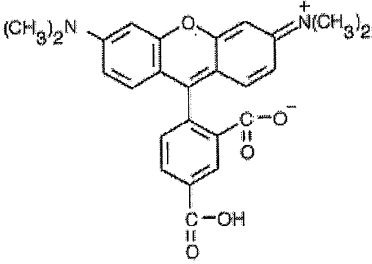
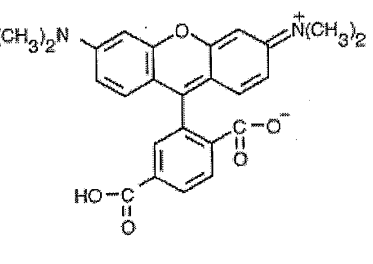
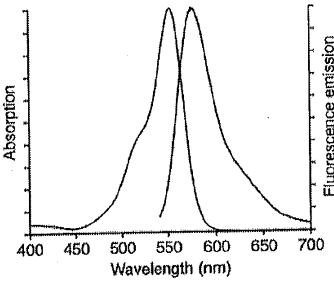
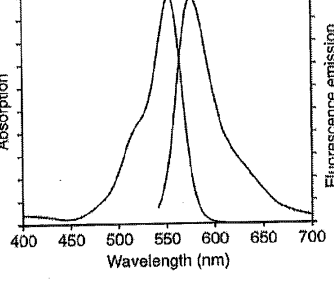
有機溶媒層中または疎水性表面上におけるペプチドのセルフアセンブリを実証するために、以下の一連のペプチドを合成した。ペプチドのセルフアセンブリは、上記有機溶媒層または疎水性表面に接触する水溶性溶媒中において、エントロピー効果により引き起こされる。

## 【 0 1 3 7 】

全てのペプチドの N 末端を、ローダミン色素 TAMRA で標識した。5 - TAMRA および 6 - TAMRA 異性体の混合物を標識に用いた。

## 【 0 1 3 8 】

## 【 表 1 】

5-カルボキシテトラメチルローダミン (5-TAMRA)	6-カルボキシテトラメチルローダミン (6-TAMRA)
	
スペクトル	スペクトル
	

以下では、紙面の前に突き出す残基の側鎖は、組み合わせ多様な「リガンド結合面」に相当する。紙面の後ろへ突き出す残基の側鎖は、「疎水性面 (あるいはネガティブコントロール残基)」に相当する。

## 【 0 1 3 9 】

ペプチド 2DOS - 1 ~ 2DOS - 8 の群において、4 つの側鎖 (アスパラギン酸、アラニン、セリン、およびリシン) の混合物を用いた。ペプチド 2DOS - 9 ~ 2DOS - 16 の群において、4 つの親水性 (アスパラギン酸) の鎖を用いた。

## 【 0 1 4 0 】

ペプチド 2DOS - 1 ~ 2DOS - 4 の群、およびペプチド 2DOS - 9 ~ 2DOS - 12 の群において、5 残基の側鎖を「疎水性面 (またはネガティブコントロール残基)」

10

20

30

40

50

に用いた。ペプチド2DOS-5~2DOS-8の群、およびペプチド2DOS-13~2DOS-16の群において、3残基の側鎖を「疎水性面（またはネガティブコントロール残基）」に用いた。

【0141】

ペプチド2DOS-1、2DOS-5、2DOS-9、および2DOS-13においては、ノルロイシン残基を「疎水性面」に用いた。ペプチド2DOS-2、2DOS-6、2DOS-10、および2DOS-14においては、フェニルアラニン残基を「疎水性面」に用いた。ペプチド2DOS-3、2DOS-7、2DOS-11、および2DOS-15においては、セリン残基を、「疎水性面」に対する弱いネガティブコントロールとして用いた。ペプチド2DOS-4、2DOS-8、2DOS-12、および2DOS-16においては、アスパラギン酸残基を、「疎水性面」に対する強いネガティブコントロールとして用いた。

10

【0142】

【表2】

表1

ペプチド名	ペプチド配列	ペプチド構造
2DOS-1	N-TAMRA- Norleu-Asp- Norleu-Ala- Norleu-Ser- Norleu-Lys- Norleu-C	
2DOS-2	N-TAMRA- Phe-Asp- Phe-Ala- Phe-Ser- Phe-Lys- Phe-C	
2DOS-3	N-TAMRA- Ser-Asp- Ser-Ala- Ser-Ser- Ser-Lys- Ser-C	
2DOS-4	N-TAMRA-Asp-Asp-Asp- p-Ala-Asp-Ser-Asp-Lys- Asp-C	
2DOS-5	N-TAMRA- Asp-Norleu- Ala-Norleu- Ser-Norleu- Lys-C	

20

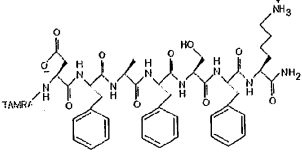
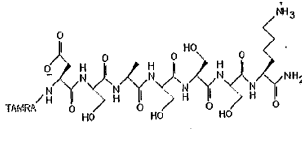
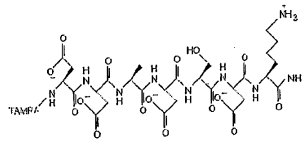
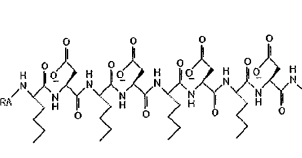
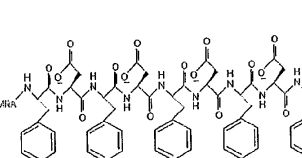
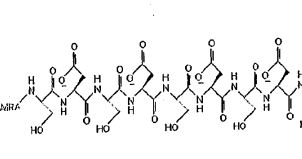
30

40

【0143】

【表 3】

表 1

2DOS-6	N-TAMRA- Asp-Phe- Ala-Phe- Ser-Phe- Lys-C	
2DOS-7	N-TAMRA- Asp-Ser- Ala-Ser- Ser-Ser- Lys-C	
2DOS-8	N-TAMRA- Asp-Asp- Ala-Asp- Ser-Asp- Lys-C	
2DOS-9	N-TAMRA- Norleu-Asp- Norleu-Asp- Norleu-Asp- Norleu-Asp- Norleu-C	
2DOS-10	N-TAMRA- Phe-Asp- Phe-Asp- Phe-Asp- Phe-Asp- Phe-C	
2DOS-11	N-TAMRA- Ser-Asp- Ser-Asp- Ser-Asp- Ser-Asp- Ser-C	

10

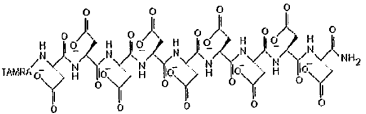
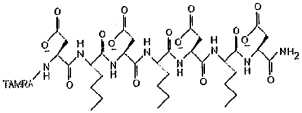
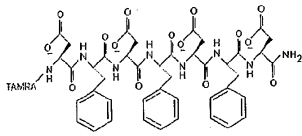
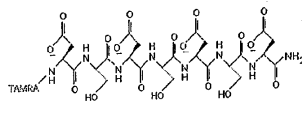
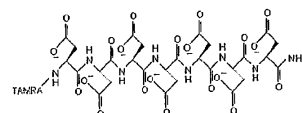
20

30

40

【表 4】

表 1

2DOS-12	N-TAMRA- Asp-Asp- Asp-Asp- Asp-Asp- Asp-Asp- Asp-C		
2DOS-13	N-TAMRA- Asp-Norleu- Asp-Norleu- Asp-Norleu- Asp-C		10
2DOS-14	N-TAMRA- Asp-Phe- Asp-Phe- Asp-Phe- Asp-C		20
2DOS-15	N-TAMRA- Asp-Ser- Asp-Ser- Asp-Ser- Asp-C		
2DOS-16	N-TAMRA- Asp-Asp- Asp-Asp- Asp-Asp- Asp-C		30

標準 Fmoc chemistry (Alta Bioscience) を用いて、ペプチドを  $2 \mu\text{mol}$  スケールで合成し、 $50\%$  (v/v) 水溶性アセトニトリル中に  $10 \mu\text{M}$  になるように溶解した。

【0145】

疎水性面 (ポリプロピレンマイクロタイタープレートのウェル) 上におけるペプチド 2DOS-1 ~ 2DOS-16 の保持を調べた。

【0146】

$50\%$  (v/v) 水溶性アセトニトリル中の  $10 \text{mM}$  tris-HCl (pH 8.0) を、ペプチドおよび TAMRA の溶媒として用いた。 40

【0147】

$10 \mu\text{M}$  のペプチド 2DOS-1 ~ 2DOS-16 および  $10 \mu\text{M}$  の TAMRA を、 $100 \mu\text{l}$  ずつ等分し、図 13 に示すように、Costar マイクロタイタープレートのウェルに入れた。

【0148】

このマイクロタイタープレートを、Typhoon Trio Plus variable mode imager (Amersham Biosciences) にて、解像度  $200 \mu\text{m}$  で画像化した。このとき、以下に示す PMT 電圧、標準感度で、緑色 ( $532 \text{nm}$ ) レーザーおよび  $580 \text{BP}$  30 フィルターを用いた。走査高さ (scan h 50

eight) を + 3 mm に設定し、スキヤニング中、サンプルを加圧した。

【 0 1 4 9 】

ペプチドが乾燥するように、一晩中暗所で蒸発乾燥させ、マイクロタイタープレートを再び上述したようにスキヤニングした。

【 0 1 5 0 】

次いで、250  $\mu$ L の水でウェルを10回洗浄した。

【 0 1 5 1 】

残りの表面結合ペプチドを、最後に、100  $\mu$ l の、50% (v/v) アセトニトリル水溶液中の10 mM tris-HCl (pH 8.0) に再懸濁し、マイクロタイタープレートを、再び、上述したようにスキヤニングした。

【 0 1 5 2 】

蛍光画像は、ImageQuant TL v2003.03 (Amersham Biosciences) を用いて解析した。

【 0 1 5 3 】

3回の実験で得られた、600 V、500 V、400 V および 300 V の PMT 電圧でスキヤニングしたマイクロタイタープレートの蛍光画像を図14に示す。

【 0 1 5 4 】

定量化データ (400 V でスキャンしたときのデータを用いた) を表2に示し、グラフを図15に示した。

【 0 1 5 5 】

【表5】

表2

ペプチド	初期蛍光 ( $\times 10^3$ )	再生蛍光 ( $\times 10^3$ )	再生率
2DOS-1	33,015	7,459	23
2DOS-2	32,492	15,704	48
2DOS-3	32,913	8	0
2DOS-4	32,313	0	0
2DOS-5	32,473	1,270	4
2DOS-6	33,853	1,455	4
2DOS-7	29,134	0	0
2DOS-8	33,615	3	0
2DOS-9	34,587	2,382	7
2DOS-10	28,479	2,884	10
2DOS-11	26,860	0	0
2DOS-12	26,433	1	0
2DOS-13	26,181	25	0
2DOS-14	28,071	283	1
2DOS-15	30,845	2	0
2DOS-16	30,335	3	0

この結果は、フェニルアラニン残基は、ノルロイシン残基よりも強い保持を引き起こすことを示している。この結果は、さらに、5つの疎水性「アンカー残基」を有するペプチドの方が、3つの疎水性「アンカー残基」を有する同等ペプチドよりもよく保持されることを示している。リガンド結合残基を、アスパラギン酸、アラニン、セリンおよびリシンから、4つのアスパラギン酸残基が連続したものに変更すると、ポリプロピレン表面における保持の低下が引き起こされる。

【 0 1 5 6 】

表3に示すペプチドP1-1~P1-5およびペプチドP2-1~P2-2の、ポリプロピレン表面における保持を調べるために、さらなる実験を行った。

【0157】

【表6】

表3

ペプチド	配列
P1-1	TAMRA-F-G-F-S-F-A-F-D-F-G-F
P1-2	TAMRA-F-G-F-G-F-S-F-A-F-D-F-G-F
P1-3	TAMRA-F-G-F-G-F-G-F-S-F-A-F-D-F-G-F
P1-4	TAMRA-F-G-F-G-F-G-F-G-F-S-F-A-F-D-F-G-F
P1-5	TAMRA-F-G-F-G-F-G-F-G-F-G-F-S-F-A-F-D-F-G-F
P2-1	TAMRA-G-S-F-A-F-D-F
P2-2	TAMRA-G-S-G-A-F-D-F

10

ポリプロピレンシートを、使用前に50%(v/v)アセトニトリル水溶液を用いて拭いた。

【0158】

ジメチルスルホキシド(DMSO)中のペプチドP1-1~P1-5 1 $\mu$ M、およびペプチドP2-1~P2-2 1 $\mu$ M、ならびにTAMRA 1 $\mu$ Mの、8 $\times$ 複製20nl量を、Piezorray system(PerkinElmer LAS)を用いて、1mm間隔で、3"  $\times$  1"  $\times$  1mmポリプロピレンシートに分注した。「サイドシュート」オプションを用いて、前もって500滴分注した。また、チューニングを30 $\mu$ s、72Vに設定した。

20

【0159】

このスライドを、Typhoon Trio Plus variable mode imager(Amersham Biosciences)にて、解像度10 $\mu$ mで画像化した。このとき、600VのPMT電圧、標準感度で、緑色(532nm)レーザーおよび580 BP 30フィルターを用いた。走査高さをプラテン(platen)に設定し、スキャン中、サンプルを加圧した。蛍光画像をImageQuant TL v2003.03(Amersham Biosciences)を用いて分析した。

30

【0160】

スライドの下半分(テストアレイを含む)を10mM tris HCl(pH8.0)を含む100mlの1M NaCl中で1分間洗浄し、上述したように再スキャンした。

【0161】

同じスライドの半分を、10mM tris HCl(pH8.0)を含む100mlの1M NaCl中で30分間、2回目の洗浄を行い、上述したように再スキャンした。

【0162】

同じスライドの半分を、100mlの水で30分間、3回目の洗浄を行い、上述したように再スキャンした。

40

【0163】

様々なアレイの蛍光画像を図16Aおよび図16Bに示す。

【0164】

図16Aおよび図16Bに示した、配列した様々なペプチドからの蛍光値を、以下の表4~6に示す。

【0165】

1回目の洗浄後のデータを表4aおよび4bに示す。

【0166】

50

## 【表 7】

表 4 a

コントロールアレイ		
ペプチド	平均蛍光値	修正シグナル
P1-1	244,263,013	97,571,341
P1-2	200,280,129	53,588,457
P1-3	192,743,469	46,051,796
P1-4	187,287,630	40,595,958
P1-5	199,347,483	52,655,810
平均スライドバック グラウンド=	146,691,673	

10

## 【 0 1 6 7 】

## 【表 8】

表 4 b

テストアレイ			
ペプチド	平均蛍光値	修正シグナル	再生率
P1-1	157,624,537	3,126,578	3
P1-2	170,078,218	15,580,260	29
P1-3	171,197,973	16,700,014	36
P1-4	189,823,310	35,325,352	87
P1-5	201,991,732	47,493,774	90
平均スライドバック グラウンド=	154,497,959		

20

2 回目の洗浄後のデータを表 5 a および表 5 b に示す。

30

## 【 0 1 6 8 】

## 【表 9】

表 5 a

コントロールアレイ		
ペプチド	平均蛍光値	修正シグナル
P1-1	225,863,933	88,584,083
P1-2	196,080,891	58,801,042
P1-3	187,310,655	50,030,806
P1-4	179,942,418	42,662,569
P1-5	190,847,825	53,567,975
平均スライドバック グラウンド=	137,279,849	

40

## 【 0 1 6 9 】

## 【表 1 0】

表 5 b

テストアレイ			
ペプチド	平均蛍光値	修正シグナル	再生率
P1-1	127,216,792	-5,230,512	-6
P1-2	135,695,639	3,248,336	6
P1-3	148,725,456	16,278,152	33
P1-4	159,100,527	26,653,223	62
P1-5	167,865,473	35,418,169	66
平均スライドバック グラウンド=	132,447,303		

10

3 回目の洗浄後のデータを表 6 a および表 6 b に示す。

## 【 0 1 7 0】

## 【表 1 1】

表 6 a

コントロールアレイ		
ペプチド	平均蛍光値	修正シグナル
P1-1	218,342,010	84,434,769
P1-2	185,727,868	51,820,628
P1-3	184,219,147	50,311,907
P1-4	176,102,487	42,195,247
P1-5	183,492,293	49,585,053
平均スライドバック グラウンド=	133,907,240	

20

30

## 【 0 1 7 1】

## 【表 1 2】

表 6 b

テストアレイ			
ペプチド	平均蛍光値	修正シグナル	再生率
P1-1	124,941,941	644,716	1
P1-2	126,193,156	1,895,931	4
P1-3	125,717,642	1,420,417	3
P1-4	135,681,173	11,383,947	27
P1-5	147,812,043	23,514,817	47
平均スライドバック グラウンド=	124,297,225		

40

これらの結果をグラフ化し、図 1 7 に示す。

## 【 0 1 7 2】

この図は、ペプチド鎖長の増加に伴ってペプチドの保持が増加することを明確に示している。明確に示すように、19 アミノ酸の鎖長を有するペプチド P 1 - 5 が、最も高い保持を有する。

50

## 【0173】

## 〔実施例3〕

ポリプロピレン疎水性表面上に付着させたペプチド2DOS-2(上記参照)のpH耐性を調べた。

## 【0174】

50%(v/v)アセトニトリル水溶液中の10mM tris-HCl(pH8.0)中の、ペプチド2DOS-2を、50μlずつ12等分し、Costarマイクロタイタープレートのウェル中で乾燥させた。

## 【0175】

ペプチドサンプルが乾燥するように、暗所で蒸発乾燥させた。

10

## 【0176】

最初の11ウェル中にある乾燥したペプチドサンプルを、表3に示すスキームにしたがって、200μlの100mMリン酸緩衝液中で、室温にて30分間インキュベートした。

## 【0177】

## 【表13】

表7

ウェル	100mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> の液量(μl)	100mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> の液量(μl)	観測pH
1	1,000	0	4.51
2	900	100	5.65
3	800	200	6.02
4	700	300	6.25
5	600	400	6.47
6	500	500	6.62
7	400	600	6.79
8	300	700	6.98
9	200	800	7.18
10	100	900	7.47
11	0	1,000	8.52

20

上清を全てピペットで吸取り、12ウェルの全てにおいて残留する表面結合ペプチドを、最後に、50%(v/v)アセトニトリル水溶液中の10mM tris-HCl(pH8.0)50μlに再懸濁した。そして、このマイクロタイタープレートを、Typhoon Trio Plus variable mode imager(Amersham Biosciences)にて、解像度200μmで画像化した。このとき、以下に示すPMT電圧、標準感度で、緑色(532nm)レーザーおよび580BP30フィルターを用いた。走査高さを+3mmに設定し、スキャン中、サンプルを加圧した。

40

## 【0178】

蛍光画像を、ImageQuant TL v2003.03(Amersham Biosciences)を用いて分析した。

## 【0179】

ポリプロピレン上に付着した2DOS-2のpH耐性を示す蛍光画像を、図19に示す。

## 【0180】

ペプチド2DOS-2の保持に関する定量化データ(300Vでスキャンしたデータを使用)を表8に示し、グラフ化したものを図19に示す。

## 【0181】

50

【表 1 4】

表 8

ウェル	洗浄 pH	非処理時の蛍光値	保持された蛍光値	保持率
1	4.51	815,706	681,015	83
2	5.65	815,706	582,482	71
3	6.02	815,706	548,329	67
4	6.25	815,706	542,595	67
5	6.47	815,706	589,528	72
6	6.62	815,706	566,496	69
7	6.79	815,706	576,655	71
8	6.98	815,706	570,653	70
9	7.18	815,706	586,083	72
10	7.47	815,706	614,028	75
11	8.52	815,706	661,781	81

この結果は、ポリプロピレン表面上におけるペプチド 2 D O S - 2 の保持は、幅広い pH 範囲において安定しており、低 pH および高 pH において保持が最大となり、おおよそ pH 6 . 5 で保持が最小となることを示している。

【 0 1 8 2 】

〔実施例 4〕

ポリプロピレン疎水性表面上に付着したペプチド 2 D O S - 2 ( 上記参照 ) の時間依存持続性を、水性バッファの存在下で、以下に示すように調べた。

【 0 1 8 3 】

75% ( v / v ) アセトニトリル水溶液中の 5 mM tris - HCl ( pH 8 . 0 ) 中の、5 μ M のペプチド 2 D O S - 2 を、100 μ l ずつ 12 等分し、Costar マイクロタイタープレートの上部横列のウェルに分注した。

【 0 1 8 4 】

ペプチドサンプルが乾燥するように、暗所で蒸発乾燥させた。

【 0 1 8 5 】

ウェル 1 ~ 10 中で乾燥させたペプチドサンプルを、10 mM tris - HCl ( pH 8 . 0 ) 中で、250 μ l の 1 M NaCl と共に、以下に示す時間、室温でインキュベートした。インキュベーション後、全ての上清を、ピペットにより 8 回出し入れし、その後取り出して、マイクロタイターの下横列のウェルに入れた。

【 0 1 8 6 】

12 ウェル全てに残留する表面結合ペプチドを、最後に、50% ( v / v ) アセトニトリル水溶液中の 10 mM tris - HCl ( pH 8 . 0 ) 50 μ l 中に再懸濁し、Typhoon Trio Plus variable mode imager ( Amersham Biosciences ) にて、解像度 200 μ m で画像化した。このとき、以下に示す PMT 電圧、標準感度で、緑色 ( 532 nm ) レーザーおよび 580 B P 30 フィルターを用いた。走査高さを + 3 mm に設定し、スキャン中、サンプルを加圧した。

【 0 1 8 7 】

蛍光画像を、ImageQuant TL v2003.03 ( Amersham Biosciences ) を用いて分析した。

【 0 1 8 8 】

ポリプロピレン疎水性表面上に付着したペプチド 2 D O S - 2 の、水性バッファ存在下における時間依存持続性に対する蛍光データを、図 20 に示す。

【 0 1 8 9 】

ペプチド 2 D O S - 2 の保持に関する定量化データ ( 300 V でスキャンしたデー

10

20

30

40

50

タを使用)を表9および図21に示す。

【0190】

【表15】

表9

ウェル	1M NaCl/10mM tris-HCl (pH8.0)中の時間 (分)	非処理時の蛍光値 (平均)	保持された蛍光値	保持率
1	0	1,000,613	904,211	90
2	2.5	1,000,613	902,082	90
3	5	1,000,613	847,767	85
4	10	1,000,613	792,427	79
5	20	1,000,613	749,522	75
6	40	1,000,613	769,659	77
7	80	1,000,613	740,227	74
8	160	1,000,613	739,600	74
9	320	1,000,613	805,530	81
10	510	1,000,613	803,741	80

この結果は、疎水性ポリプロピレン表面上におけるペプチド2DOS-2の保持は、1 M NaCl / 10 mM tris - HCl (pH 8.0) 中への懸濁時間を増加させても、安定であることを示している。

【0191】

〔実施例5〕

異なる形状のポリプロピレンウェル上における、ペプチド2DOS-1~2DOS-16 (上記参照)の保持を調べた。

【0192】

50% (v/v) アセトニトリル水溶液中の10 mM tris - HCl (pH 8.0) を、ペプチドおよびTAMRAのための溶媒として用いた。

【0193】

10 μMのペプチド2DOS-1~2DOS-16、および10 μMのTAMRAを、1 μlずつ等分し、図22に示すスキームに従って、Costar V底ポリプロピレンマイクロタイタープレート、およびGreiner平底ポリプロピレンマイクロタイタープレートにピペットで入れた。

【0194】

ペプチドサンプルが乾燥するように、暗所で蒸発乾燥させた。

【0195】

マイクロタイタープレートの上部横2列のペプチドサンプルを、10 mM tris - HCl (pH 8.0) 中の、250 μlの1 M NaCl中で、室温で15分間インキュベートした。インキュベート後、上清を除去する前のウェル中で、洗浄バッファーをピペットにて8回出し入れした。

【0196】

洗浄ペプチドサンプルおよび非処理のペプチドサンプルを、50% (v/v) アセトニトリル水溶液中の、50 μlの10 mM tris - HCl (pH 8.0) 中に再懸濁した。

【0197】

マイクロタイタープレートを、Typhoon Trio Plus variable mode imager (Amersham Biosciences)にて、解像度200 μmで画像化した。ここで、以下に示すPMT電圧、標準感度で、緑色(532 nm)レーザーおよび580 BP 30フィルターを用いた。走査高さをプラテンに設

10

20

30

40

50

定し、スキャンニング中、サンプルを加圧した。

【0198】

蛍光画像を、ImageQuant TL v2003.03 (Amersham Biosciences) を用いて分析した。

【0199】

PMT電圧600Vおよび500Vにおいてスキャンニングしたプレートの蛍光画像を、図23に示す。

【0200】

V底ウェルにおける定量化データ(500Vでスキャンニングしたデータを使用)を表10および図24に示す。

【0201】

【表16】

表10

ペプチド	非処理時の蛍光値	保持された蛍光値	保持率
2DOS-1	9,550,835	6,641,271	70
2DOS-2	9,495,183	8,127,309	86
2DOS-3	9,020,171	1,951,694	22
2DOS-4	8,265,596	159,080	2
2DOS-5	8,664,667	3,116,833	36
2DOS-6	9,141,290	3,527,116	39
2DOS-7	8,674,544	746,596	9
2DOS-8	10,130,734	202,943	2
2DOS-9	11,662,691	1,608,482	14
2DOS-10	8,445,090	2,773,876	33
2DOS-11	9,705,293	192,272	2
2DOS-12	6,777,661	52,365	1
2DOS-13	7,623,227	806,022	11
2DOS-14	7,641,246	1,018,179	13
2DOS-15	10,493,100	122,851	1
2DOS-16	9,782,527	44,420	0
TAMRA	12,610,993	640,684	5
TAMRA	15,392,751	686,863	4
TAMRA	17,471,866	998,320	6

平底ウェルにおける定量化データ(500Vでスキャンニングしたデータを使用)を表11および図25に示す。

【0202】

10

20

30

【表 17】

表 1 1

ペプチド	非処理時の蛍光値	保持された蛍光値	保持率
2DOS-1	14,949,396	2,157,124	14
2DOS-2	15,820,680	14,665,720	93
2DOS-3	14,152,875	2,836,015	20
2DOS-4	11,885,905	198,507	2
2DOS-5	14,337,629	6,492,170	45
2DOS-6	14,539,109	5,256,539	36
2DOS-7	10,189,473	1,303,195	13
2DOS-8	17,576,485	637,350	4
2DOS-9	13,456,698	2,148,849	16
2DOS-10	13,661,609	5,353,630	39
2DOS-11	13,960,552	476,318	3
2DOS-12	12,982,170	106,741	1
2DOS-13	12,935,739	2,162,164	17
2DOS-14	15,090,582	670,341	4
2DOS-15	15,290,885	104,523	1
2DOS-16	15,555,465	229,090	1
TAMRA	18,396,859	0	0
TAMRA	20,662,891	935,664	5
TAMRA	20,649,165	678,001	3

この結果は、異なる形状のポリプロピレンウェル上における、ペプチド 2DOS-1 ~ 2DOS-16 の保持は同等であり、ペプチドの保持は、V 底形状のウェルでの乾燥に依存しないことが示している。

## 【0203】

〔実施例 6〕

ポリプロピレンおよびポリスチレン表面におけるペプチド 2DOS-1 ~ 2DOS-16 (上記参照) の保持を比較した。

## 【0204】

75% (v/v) アセトニトリル水溶液中の 5mM tris-HCl (pH 8.0) を、ペプチドおよび TAMRA のための溶媒として用いた。

## 【0205】

5 μM のペプチド 2DOS-1 ~ 2DOS-16、および 5 μM の TAMRA を、20 μl ずつ等分し、Costar V 底ポリプロピレンマイクロタイタープレート、Greiner V 底ポリプロピレンマイクロタイタープレート、および Greiner V 底ポリスチレンマイクロタイタープレートに、図 26 に示すスキームに従って、ピペットで

## 【0206】

ペプチドサンプルが乾燥するように、暗所で蒸発乾燥させた。

## 【0207】

マイクロタイタープレートの横列の上部 2 列におけるペプチドサンプルを、10mM tris-HCl (pH 8.0) 中の、250 μl の 1M NaCl 中において、15 分間、室温でインキュベートした。インキュベート後、上清を除去する前のウェル中において、ピペットで 8 回洗浄バッファーを出し入れした。

## 【0208】

洗浄および非処理のペプチドサンプルを、50% (v/v) アセトニトリル水溶液中の

10

20

30

40

50

、50  $\mu$ lの10 mM tris - HCl (pH 8.0) 中に再懸濁した。

【0209】

マイクロタイタープレートを、Typhoon Trio Plus variable mode imager (Amersham Biosciences) にて、解像度200  $\mu$ mで画像化した。このとき、以下に示すPMT電圧、標準解像度で、緑色(532 nm)レーザーおよび580BP30フィルターを用いた。走査高さを+3 mmに設定し、スキャン中、サンプルを加圧した。

【0210】

蛍光画像を、ImageQuant TL v2003.03 (Amersham Biosciences) を用いて分析した。

10

【0211】

600 V、500 Vおよび400 VのPMT電圧でスキャンしたスライドの蛍光画像を図27に示す。

【0212】

プレートの上側半分のペプチドサンプルを洗浄し、プレートの下側半分のペプチドサンプルを非処理とした。

【0213】

Costar ポリプロピレンV底ウェルにおける定量化データ(400 Vでスキャンしたデータを使用)を、表12に示す。

【0214】

20

【表18】

表12

ペプチド	非処理時の蛍光値	保持された蛍光値	保持率
2DOS-1	6,458,364	3,366,403	52
2DOS-2	5,692,134	5,349,601	94
2DOS-3	5,660,618	673,940	12
2DOS-4	5,661,181	74,143	1
2DOS-5	5,331,763	1,651,850	31
2DOS-6	5,733,046	1,256,204	22
2DOS-7	5,139,578	326,328	6
2DOS-8	6,587,741	93,455	1
2DOS-9	7,102,251	1,184,648	17
2DOS-10	6,043,214	1,439,375	24
2DOS-11	5,327,435	102,040	2
2DOS-12	4,432,090	18,180	0
2DOS-13	4,886,617	387,738	8
2DOS-14	5,331,894	595,959	11
2DOS-15	6,488,130	50,584	1
2DOS-16	5,387,850	16,194	0
TAMRA	11,786,211	386,629	3

30

Greiner ポリプロピレンV底ウェルにおける定量化データ(400 Vでスキャンしたデータを使用)を、表13に示す。

【0215】

40

【表 19】

表 13

ペプチド	非処理時の蛍光値	保持された蛍光値	保持率
2DOS-1	3,328,960	1,235,460	37
2DOS-2	3,512,023	2,731,827	78
2DOS-3	3,583,352	342,889	10
2DOS-4	3,937,734	50,669	1
2DOS-5	3,817,250	1,048,978	27
2DOS-6	3,889,995	849,582	22
2DOS-7	3,751,280	205,430	5
2DOS-8	3,903,470	80,770	2
2DOS-9	3,621,913	439,252	12
2DOS-10	3,043,118	654,623	22
2DOS-11	3,510,896	86,818	2
2DOS-12	3,235,590	20,175	1
2DOS-13	3,635,229	378,287	10
2DOS-14	3,612,113	461,468	13
2DOS-15	4,771,265	65,142	1
2DOS-16	3,813,060	25,885	1
TAMRA	6,199,206	64,916	1

10

20

Greiner ポリスチレンV底ウェルにおける定量化データ(400Vでスキニングしたデータを使用)を、表14に示す。

【0216】

【表 20】

表 14

ペプチド	非処理時の蛍光値	保持された蛍光値	保持率
2DOS-1	640,145	225,686	35
2DOS-2	614,203	392,422	64
2DOS-3	744,747	37,388	5
2DOS-4	783,885	6,714	1
2DOS-5	745,029	171,500	23
2DOS-6	666,352	167,118	25
2DOS-7	706,200	15,766	2
2DOS-8	842,984	5,071	1
2DOS-9	626,304	62,023	10
2DOS-10	602,771	100,265	17
2DOS-11	675,269	7,365	1
2DOS-12	684,832	3,788	1
2DOS-13	708,162	62,590	9
2DOS-14	860,811	75,304	9
2DOS-15	868,334	5,116	1
2DOS-16	789,858	3,864	0
TAMRA	1,051,154	10,004	1

30

40

これらのグラフを図28に示す。

50

【 0 2 1 7 】

この結果は、3つの全ての表面において、同様のペプチドの挙動が見られることを示しており、さらに、保持は、ある特定のプラスチック表面に特有の性質というよりもむしろ、ペプチドの配列特異的な性質であることを示している。

【 0 2 1 8 】

〔実施例7〕

7つのフェニルアラニン残基からなる「表面結合面」を有する4つのペプチドを合成した。これらのペプチドはまた、帯電残基および非帯電残基からなる中央領域と、末端から2番目の可変残基とを有している。末端から2番目の可変残基は、アラニン、セリン、システイン、またはニトロピリジルチオ活性化システイン残基である。

10

【 0 2 1 9 】

さらに、TAMRA 標識した4つの蛍光ペプチドもまた合成した。これらの蛍光ペプチドは、可変C末端残基に結合しているグリシン残基に結合しているN末端TAMRA 蛍光体を含んでいる。可変C末端残基は、アラニン、セリン、システイン、またはニトロピリジルチオ活性化システイン残基である。

【 0 2 2 0 】

実施例1に示した5-TAMRA 異性体および6-TAMRA 異性体の混合物を標識として用いた。

【 0 2 2 1 】

8つのペプチドの全ての群を表15および16に示す。

20

【 0 2 2 2 】

【表21】

表15

ペプチド	配列	構造
SB-1	N-Phe-Gly-Phe-Lys- Phe-Gly-Phe-Asp- Phe-Gly-Phe-Ala-Phe-C	
SB-2	N-Phe-Gly-Phe-Lys- Phe-Gly-Phe-Asp- Phe-Gly-Phe-Ser-Phe-C	
SB-3	N-Phe-Gly-Phe-Lys- Phe-Gly-Phe-Asp- Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-C	
SB-4	N-Phe-Gly-Phe-Lys- Phe-Gly-Phe-Asp- Phe-Gly-Phe-CysNP-Phe-C	

30

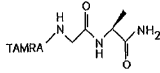
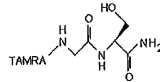
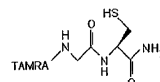
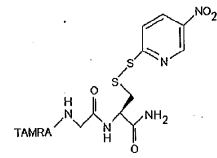
40

【 0 2 2 3 】

50

【表 2 2】

表 1 6

ペプチド	配列	構造
TLSP-1	N-TAMRA-Gly-Ala-C	
TLSP-2	N-TAMRA-Gly-Ser-C	
TLSP-3	N-TAMRA-Gly-Cys-C	
TLSP-4	N-TAMRA-Gly-CysSNP-C	

ペプチドSB-1～SB-4、およびペプチドTLSP-1～TLSP-4を二量体形成の調査に用いた。

## 【0224】

2つの異なるプロトコールを使用した。「液相」プロトコールでは、SBペプチドをポリプロピレン表面上で乾燥させた。次いで、水溶液中にTLSPペプチドを添加した後、ウェルを洗浄して、保持された蛍光材料を分析した。

## 【0225】

「共乾燥」プロトコールでは、SBペプチドとTLSPペプチドとを混合し、これらの両方をポリプロピレン表面上で共に乾燥させた後、ウェルを洗浄し、保持された蛍光材料を分析した。

## 【0226】

SBペプチドとTLSPペプチドとを水溶液中で混合して、ペプチド二量体を生成させるために反応させ、ポリプロピレン表面上で乾燥させる、さらに他のプロトコールは、当業者により容易に行い得る。

## 【0227】

「液相」プロトコールでは、50% (v/v) アセトニトリル水溶液中の1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>中の、10 μMのSB-1ペプチド～SB-4ペプチド 50 μlを、表17に示す配列に従って、Costar V底マイクロタイタープレートのウェルに添加した。

## 【0228】

10

20

30

40

## 【表 2 3】

表 1 7

SB-1	SB-2	SB-3	SB-4	-	-	-	-	-	-	-	-
SB-1	SB-2	SB-3	SB-4	-	-	-	-	-	-	-	-
SB-1	SB-2	SB-3	SB-4	-	-	-	-	-	-	-	-
SB-1	SB-2	SB-3	SB-4	-	-	-	-	-	-	-	-
SB-1	SB-2	SB-3	SB-4	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10

サンプルを一晩、暗所にて乾燥させた。10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  中の100  $\mu\text{M}$ のペプチド TLSP-1 ~ TLSP-4 50  $\mu\text{l}$ を、表 1 8 に示すスキームに従って、ウェルに添加した。

【0 2 2 9】

## 【表 2 4】

表 1 8

TLSP-1	TLSP-1	TLSP-1	TLSP-1	TLSP-1	-	-	-	-	-	-	-
TLSP-2	TLSP-2	TLSP-2	TLSP-2	TLSP-2	-	-	-	-	-	-	-
TLSP-3	TLSP-3	TLSP-3	TLSP-3	TLSP-3	-	-	-	-	-	-	-
TLSP-4	TLSP-4	TLSP-4	TLSP-4	TLSP-4	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

20

サンプルを室温で1時間、暗所にてインキュベートした。上清を除去し、10 mM  $\text{tris-HCl}$  (pH 8.0) 中の、200  $\mu\text{l}$ の1M  $\text{NaCl}$ を用いて、ウェルを2回洗浄した。50% (v/v) アセトニトリル水溶液中の、50  $\mu\text{l}$ の10 mM  $\text{tris-HCl}$  (pH 8.0) を、最後にウェルに添加した。

30

【0 2 3 0】

マイクロタイタープレート *Typhoon Trio Plus variable mode imager* (Amersham Biosciences) にて、解像度 200  $\mu\text{m}$  で画像化した。ここで、PMT 電圧 500 V、標準感度で、緑色 (532 nm) レーザーおよび 580 BP 30 フィルターを用いた。走査高さを +3 mm に設定し、スキャン中、サンプルを加圧した。蛍光画像を、*ImageQuant TL v 2003.03* (Amersham Biosciences) を用いて分析した。

【0 2 3 1】

40

「共乾燥」プロトコールでは、50% (v/v) アセトニトリル水溶液中の 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  中の、10  $\mu\text{M}$  のペプチド SB-1 ~ SB-4 50  $\mu\text{l}$  を、表 1 9 に示すスキームに従って、*Costar V* 底マイクロタイタープレートのウェルに添加した。

【0 2 3 2】

## 【表 2 5】

表 1 9

SB-1	SB-2	SB-3	SB-4	-	-	-	-	-	-	-	-
SB-1	SB-2	SB-3	SB-4	-	-	-	-	-	-	-	-
SB-1	SB-2	SB-3	SB-4	-	-	-	-	-	-	-	-
SB-1	SB-2	SB-3	SB-4	-	-	-	-	-	-	-	-
SB-1	SB-2	SB-3	SB-4	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10

50% (v/v) アセトニトリル水溶液中の 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  中の、 $100 \mu\text{M}$  のペプチド TLSP-1 ~ TLSP-4  $50 \mu\text{l}$  を、表 20 に示すスキームに従って、ウェルに添加した。

## 【0 2 3 3】

## 【表 2 6】

表 2 0

TLSP-1	TLSP-1	TLSP-1	TLSP-1	TLSP-1	-	-	-	-	-	-	-
TLSP-2	TLSP-2	TLSP-2	TLSP-2	TLSP-2	-	-	-	-	-	-	-
TLSP-3	TLSP-3	TLSP-3	TLSP-3	TLSP-3	-	-	-	-	-	-	-
TLSP-4	TLSP-4	TLSP-4	TLSP-4	TLSP-4	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

20

サンプルを一晩、暗所で乾燥させた。

## 【0 2 3 4】

ウェルを、10 mM tris-HCl (pH 8.0) 中の、 $200 \mu\text{l}$  の 1 M NaCl で 2 回洗浄した。50% (v/v) アセトニトリル水溶液中の、 $50 \mu\text{l}$  の 10 mM tris-HCl (pH 8.0) を、最後にウェルに添加した。

30

## 【0 2 3 5】

マイクロタイタープレートを、Typhoon Trio Plus variable mode imager (Amersham Biosciences) にて、解像度  $200 \mu\text{m}$  で画像化した。ここで、PMT 電圧 500 V、標準感度で、緑色 ( $532 \text{nm}$ ) レーザーおよび 580 BP 30 フィルターを用いた。走査高さを +3 mm に設定し、スキャン中、サンプルを加圧した。蛍光画像を、ImageQuant TL v2003.03 (Amersham Biosciences) を用いて分析した。

40

## 【0 2 3 6】

「液相」プロトコールを用いた実験から得られたマイクロタイタープレートの蛍光画像を図 29 A に示す。

## 【0 2 3 7】

「液相」プロトコールにより得られた蛍光データを表 2 1 に示す。

## 【0 2 3 8】

## 【表 2 7】

表 2 1

	SB-1 (F7-Me)	SB-2 (F7-OH)	SB-3 (F7-SH)	SB-4 (F7-SNP)	ブランク
TLSP-1 (TAMRA-Me)	505,542	328,552	494,464	940,493	250,236
TLSP-2 (TAMRA-OH)	875,810	495,642	790,731	574,079	279,409
TLSP-3 (TAMRA-SH)	1,024,752	1,449,785	4,531,849	4,101,860	341,250
TLSP-4 (TAMRA-SNP)	1,021,924	1,357,602	7,434,703	5,378,576	522,053
ブランク	266,620	246,461	285,687	265,120	203,597

結果をグラフ化し、図 2 9 B に示す。

## 【 0 2 3 9 】

「共乾燥」プロトコルを用いた実験から得られたマイクロタイタープレートの蛍光画像を図 3 0 A に示す。

## 【 0 2 4 0 】

「共乾燥」プロトコルにより得られた蛍光データを表 2 2 に示す。

## 【 0 2 4 1 】

## 【表 2 8】

表 2 2

	SB-1 (F7-Me)	SB-2 (F7-OH)	SB-3 (F7-SH)	SB-4 (F7-SNP)	ブランク
TLSP-1 (TAMRA-Me)	719,315	906,087	919,079	807,652	970,904
TLSP-2 (TAMRA-OH)	816,019	1,165,325	1,458,222	1,163,929	892,135
TLSP-3 (TAMRA-SH)	3,301,896	7,778,287	9,886,083	7,559,276	2,317,125
TLSP-4 (TAMRA-SNP)	2,862,439	5,555,447	13,506,288	12,389,014	2,876,776
ブランク	258,401	295,964	366,184	378,912	231,826

結果をグラフ化し、図 3 0 B に示す。

## 【 0 2 4 2 】

ポリプロピレン表面と蛍光標識したペプチドとの両方に結合可能な非標識ペプチドの存在下で、蛍光標識されたペプチドの保持によって、二量体の収率を分析した。

## 【 0 2 4 3 】

「液相」プロトコルにおける二量体の収率は、「共乾燥」プロトコルにおける二量体の収率よりも低いですが、二量体の化学特異性はより優れていた。最大となる二量体形成は、表面ペプチドが遊離チオール基を有するとき、および溶液ペプチドが S - ニトロピリジル活性チオール基を有するときに観察された。表面ペプチドが S - ニトロピリジル活性チオール基を有し、溶液ペプチドが S - ニトロピリジル活性チオール基を有するときの二量体形成、表面ペプチドが遊離チオール基を有し、溶液ペプチドが遊離チオール基を有する

10

20

30

40

50

ときの二量体形成、および表面ペプチドがS - ニトロピリジル活性チオール基を有し、溶液ペプチドが遊離チオール基を有するときの二量体形成も観察された。

【0244】

遊離チオールによる遊離チオールへの結合は、ジスルフィド結合を形成する、単純な好気性酸化によるものであってよい。S - ニトロピリジル活性チオールによるS - ニトロピリジル活性チオールへの結合は、残りのS - ニトロピリジル活性チオールと反応し得るいくつかの遊離チオールを残すような、不完全なチオール活性の結果によるもの、またはいくつかの他のメカニズムによるものであってよい。

【0245】

「共乾燥」プロトコールの結果は、上述した結果に酷似している。この方法においては、二量体の収率は徐々に高くなるが、非特異的結合もまた高くなる。特に、表面に付けられたヒドロキシル化ペプチドと、遊離チオール基およびS - ニトロピリジル活性チオール基の両方を含む溶液ペプチドとの間で、いくつかの反応性が観察された。

10

【0246】

〔実施例8〕

本実施例では、Piezorrayer (PerkinElmer LAS) 非接触ディスプレイペンサーを用いて、平面プラスチック表面上においてペプチド二量体を形成した。Piezorrayer (PerkinElmer LAS) は、高密度アレイに、ナノリットル量をピペットで移すように厳密に設計されている。液量を、圧電性電動チップにより制御した。Piezorrayerシステムは、ソースプレートホルダー、超音波ウォッシュボウル、コンピュータおよびモニタならびにシステム液体ボトルを含む。

20

【0247】

ポリプロピレンシートをSBAプラスチック (<http://www.sba.co.uk/>, Propylex Natural Polypropylene Sheet 2440 x 1220 x 1mm) から得た。このポリプロピレンシートを、使用前に、50% (v/v) アセトニトリル水溶液によりふき取った。

【0248】

表23に示すスキームに従って、Piezorrayerシステムを用いて、50% (v/v) アセトニトリル水溶液中またはコントロール溶液中の1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 中の、100 μMのペプチドSB-1 ~ SB-3 5 n lの6つの10 x 10アレイを、3" x 1" にカットされた1mmポリプロピレンシートに、分配した。

30

【0249】

【表29】

表23

50%(v/v)アセトニトリル水溶液中の 1mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
50%(v/v)アセトニトリル水溶液中の 1mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ペプチドSB-1
ペプチドSB-1
ペプチドSB-3
ペプチドSB-3

40

表24に示すスキームに従って、Piezorrayerシステムを用いて、50% (v/v) アセトニトリル水溶液中の1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 中、あるいは、50% (v/v) アセトニトリル水溶液および10% (v/v) グリセロール中の1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 中のいずれかにおける、100 μMのペプチドTLSP-4 5 n lの6つの10 x 10アレイを、上記スポット上に分配した。

【0250】

## 【表 3 0】

表 2 4

ペプチド TLSP-4
10%グリセロール中のペプチド TLSP-4
ペプチド TLSP-4
10%グリセロール中のペプチド TLSP-4
ペプチド TLSP-4
10%グリセロール中のペプチド TLSP-4

サンプルを室温で 30 分間、暗所においてインキュベートした。スライドを、10 mM tris-HCl (pH 8.0) 中の、100 ml の 50 mM NaCl で洗浄し、スライド上に水道水を 1 分間流した。

10

## 【0251】

マイクロタイタープレートを、Typhoon Trio Plus variable mode imager (Amersham Biosciences) にて、解像度 10  $\mu$ m で画像化した。ここで、PMT 電圧 400 V、標準感度で、緑色 (532 nm) レーザーおよび 580 BP 30 フィルターを用いた。走査高さをプラテンに設定し、スキャニング中、サンプルを加圧した。蛍光画像を、ImageQuant TL v 2003.03 (Amersham Biosciences) を用いて分析した。

## 【0252】

ポリプロピレンスライドの蛍光画像を図 31 に示した。

20

## 【0253】

ポリプロピレン表面および蛍光標識したペプチドの両方に結合可能な非標識ペプチドの存在下にて、蛍光標識したペプチドの保持によって、二量体収率を分析した。

## 【0254】

表面ペプチドが遊離チオール基を有し、溶液ペプチドが S-ニトロピリジル活性チオール基を有するときに、二量体形成が観察された。単純なプロトコル (蒸発を防ぐためのグリセロールなしで) により、より高い二量体収率が得られた。

## 【0255】

## 〔実施例 9〕

本実施例では、ペプチド L1-P1-1 ~ L1-P1-16、およびペプチド L1-P2-1 ~ L1-P2-16 を含む二量体の、20 個の 256 成分マイクロアレイ (256-element microarrays) を、同時に作製した。

30

## 【0256】

1 mm ポリプロピレンシートを、136 mm x 80 mm にカットし、ガラスペーパーで軽く研磨し、使用前に 50% (v/v) アセトニトリル水溶液でふき取った。

## 【0257】

Piezorray システム (PerkinElmer LAS) を用いて、表 25 に示すように、P1 ペプチドの 18 x 6 nl 等分を、0.72 mm 間隔にて、ポリプロピレンスライドの縦列に配列した。

40

## 【0258】

【表 3 1】

表 2 5

縦列番号	P1 ペプチド	溶媒
1	2 $\mu$ M P1-5	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0)
2	20 $\mu$ M L1-P1-1	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
3	20 $\mu$ M L1-P1-2	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
4	20 $\mu$ M L1-P1-3	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
5	20 $\mu$ M L1-P1-4	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
6	20 $\mu$ M L1-P1-5	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
7	20 $\mu$ M L1-P1-6	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
8	20 $\mu$ M L1-P1-7	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
9	20 $\mu$ M L1-P1-8	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
10	20 $\mu$ M L1-P1-9	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
11	20 $\mu$ M L1-P1-10	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
12	20 $\mu$ M L1-P1-11	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
13	20 $\mu$ M L1-P1-12	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
14	20 $\mu$ M L1-P1-13	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
15	20 $\mu$ M L1-P1-14	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
16	20 $\mu$ M L1-P1-15	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
17	20 $\mu$ M L1-P1-16	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0), 2mM TCEP
18	2 $\mu$ M P1-5	90%(v/v) DMSO, 1mM tris-HCl (pH 8.0)

D M S O = ジメチルスルホキシド ( dimethyl sulfoxide )

T C E P = トリス ( 2 - カルボキシエチル ) ホスフィン ( tris ( 2-carboxyethyl ) phosphine )

P 1 ペプチドの配列 :

P1-5 TAMRA-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Ser-Phe-Ala-Phe-Asp-Phe-Gly-Phe

L1-P1-1 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-DAB-Phe-DAB-Phe-Gly-Phe

L1-P1-2 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-DAB-Phe-Hse-Phe-Gly-Phe

L1-P1-3 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-DAB-Phe-Abu-Phe-Gly-Phe

L1-P1-4 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-DAB-Phe-Asp-Phe-Gly-Phe

L1-P1-5 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Hse-Phe-DAB-Phe-Gly-Phe

L1-P1-6 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Hse-Phe-Hse-Phe-Gly-Phe

L1-P1-7 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Hse-Phe-Abu-Phe-Gly-Phe

L1-P1-8 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Hse-Phe-Asp-Phe-Gly-Phe

L1-P1-9 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Abu-Phe-DAB-Phe-Gly-Phe

L1-P1-10 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Abu-Phe-Hse-Phe-Gly-Phe

10

20

30

40

50

L1-P1-11 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Abu-Phe-Abu-Phe-Gly-Phe

L1-P1-12 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Abu-Phe-Asp-Phe-Gly-Phe

L1-P1-13 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Asp-Phe-DAB-Phe-Gly-Phe

L1-P1-14 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Asp-Phe-Hse-Phe-Gly-Phe

L1-P1-15 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Asp-Phe-Abu-Phe-Gly-Phe

L1-P1-16 Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-Cys-Phe-Asp-Phe-Asp-Phe-Gly-Phe

10

サンプルを乾燥させた後、Piezorraysystem (PerkinElmer LAS) を用いて、表 26 に示すように、0.72 mm 間隔にて、90% (v/v) DMSO、1 mM tris-HCl (pH 8.0) 中の L1-P2 ペプチドの 18 x 12 nl 等分を、ポリプロピレンスライドの横列に沿って配列した。

【0259】

【表32】

表 26

横列番号	非標識P2ペプチド	標識P2ペプチド
1	-	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
2	50 μM L1-P2-1	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
3	50 μM L1-P2-2	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
4	50 μM L1-P2-3	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
5	50 μM L1-P2-4	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
6	50 μM L1-P2-5	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
7	50 μM L1-P2-6	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
8	50 μM L1-P2-7	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
9	50 μM L1-P2-8	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
10	50 μM L1-P2-9	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
11	50 μM L1-P2-10	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
12	50 μM L1-P2-11	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
13	50 μM L1-P2-12	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
14	50 μM L1-P2-13	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
15	50 μM L1-P2-14	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
16	50 μM L1-P2-15	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
17	50 μM L1-P2-16	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物
18	-	総合濃度が25 μMのL1-P2-17/18/19/20混合物

20

30

40

P 2 ペプチドの配列：

- L1-P2-1 CysSTP-DAB-Phe-DAB-Phe-Gly-Phe
- L1-P2-2 CysSTP-DAB-Phe-Hse-Phe-Gly-Phe
- L1-P2-3 CysSTP-DAB-Phe-Abu-Phe-Gly-Phe
- L1-P2-4 CysSTP-DAB-Phe-Asp-Phe-Gly-Phe
- L1-P2-5 CysSTP-Hse-Phe-DAB-Phe-Gly-Phe
- L1-P2-6 CysSTP-Hse-Phe-Hse-Phe-Gly-Phe
- L1-P2-7 CysSTP-Hse-Phe-Abu-Phe-Gly-Phe

50

L1-P2-8 CysSTP-Hse-Phe-Asp-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-9 CysSTP-Abu-Phe-DAB-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-10 CysSTP-Abu-Phe-Hse-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-11 CysSTP-Abu-Phe-Abu-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-12 CysSTP-Abu-Phe-Asp-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-13 CysSTP-Asp-Phe-DAB-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-14 CysSTP-Asp-Phe-Hse-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-15 CysSTP-Asp-Phe-Abu-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-16 CysSTP-Asp-Phe-Asp-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-17 TAMRA-CysSTP-DAB-Phe-DAB-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-18 TAMRA-CysSTP-Hse-Phe-Hse-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-19 TAMRA-CysSTP-Abu-Phe-Abu-Phe-Gly-Phe  
 L1-P2-20 TAMRA-CysSTP-Asp-Phe-Asp-Phe-Gly-Phe

10

サンプルを乾燥した後、0.1% (v/v) の Tween-20 を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 50 ml 中で、スライドを 10 分間洗浄した。

【0260】

スライドを、Typhoon Trio Plus variable mode imager (Amersham Biosciences) にて、解像度 10 μm で画像化した。ここで、PMT 電圧 500 V、標準感度で、緑色 (532 nm) レーザーおよび 580 BP 30 フィルターを用いた。走査高さをプラテンに設定した。蛍光画像を、ImageQuant TL v2003.03 (Amersham Biosciences) を用いて分析した。

20

【0261】

二量体の 1 枚の 18 × 18 アレイの蛍光画像およびコントロールスポットを図 32 に示す。

【0262】

配列させて分配した各 L1-P1 ペプチドの縦列の蛍光シグナルを観察することができる。この結果は、L1-P1 ペプチドのそれぞれが、首尾よく分配され、二量体の形成が可能であったことを示している。また、配列させて分配した L1-P2 ペプチドの横列の蛍光シグナルも観察することができる。この結果は、L1-P2 ペプチドのそれぞれが、首尾よく分配され、二量体の形成が可能であったことを示している。

30

【0263】

L1-P1 ペプチドのチオール基と競合 (compete) する、非標識 P2 ペプチドおよび TAMRA 標識された P2 ペプチドの両方を用いて作製された 16 × 16 アレイの二量体蛍光と比較して、TAMRA 標識した P2 ペプチドのみを有するサンプルの二量体蛍光はより強かった。この結果は、L1-P2 ペプチドは全て、TAMRA 標識されたそのカウンターパートと首尾よく競合し、それゆえに、16 個の全ての L1-P1 ペプチドと、16 個の全ての L1-P2 ペプチドとの間で、首尾よくペプチド二量体が形成されることを示している。

40

【0264】

上述した本発明は、同様の方法が、多くの方法に変更され得ることは明確である。このような変更は発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者にとって明白なこのような変更のすべてが、本発明の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【産業上の利用可能性】

【0265】

本発明は、配列多様性が増大した合成捕捉剤を提供する。本発明に係る捕捉剤は、例えばガラスまたはシリコンのような様々な表面を機能化し得るので、上記表面へのリガンド結合を可能にし、または様々な種類のアレイを形成する。

【図面の簡単な説明】

【0266】

50

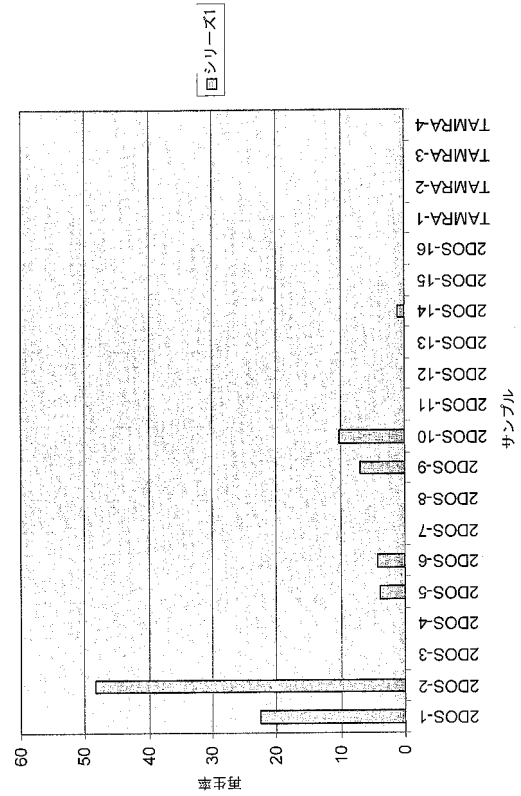
- 【図 1】本発明に係る捕捉剤の第 1 の作製方法の概略を示す図である。
- 【図 2】本発明に係る捕捉剤の第 2 の作製方法の概略を示す図である。
- 【図 3】本発明に係る捕捉剤のさらなる作製方法の概略を示す図である。
- 【図 4】様々な反応基を含むペプチドを形成するための可能な経路を示す図である。
- 【図 5】L 型アミノ酸と D 型アミノ酸とを交互に含むペプチドを示す図である。
- 【図 6】ベータアミノ酸を含むペプチドを示す図である。
- 【図 7】一アミノ酸おきにアミノ酸が異なるペプチドを示す図である。
- 【図 8】N 末端システインを保持する捕捉剤とチオエステル誘導化表面との間のネイティブケミカルライゲーションの方法を模式的に示す図である。
- 【図 9】チオエステル官能化ガラスを調製するための好ましい反応スキームを示す図である。 10
- 【図 10】担体表面に二量体型捕捉剤を調製するための好ましい反応スキームを示す図である。
- 【図 11】疎水性アミノ酸と非疎水性アミノ酸とを交互に含むペプチドを示す図である。
- 【図 12】疎水性面および実質的に非疎水性であるリガンド結合面を有する二量体型捕捉剤の一例を示す図である。
- 【図 13】96 ウェルプレート中のさまざまな疎水性捕捉剤の場所を示す図である。
- 【図 14】ウェル中に様々なペプチドがあることを示している、図 11 の 96 ウェルプレートの蛍光画像を示す図である。
- 【図 15】図 14 の 400 V スキャンを定量化した結果を示すグラフである。 20
- 【図 16 A】ポリプロピレン表面上に、ペプチド P 1 - 1 ~ P 1 - 5 および P 2 - 1 ~ P 2 - 2 を保持していることを示す蛍光画像である。
- 【図 16 B】ポリプロピレン表面上に、ペプチド P 1 - 1 ~ P 1 - 5 および P 2 - 1 ~ P 2 - 2 を保持していることを示す蛍光画像である。
- 【図 17】図 16 A および図 16 B を定量化した結果を示すグラフである。
- 【図 18】ポリプロピレン疎水性表面上に分配したペプチド 2 DOS - 2 の pH 抵抗性を示す蛍光画像である。
- 【図 19】図 18 の 300 V スキャンを定量化した結果を示すグラフである。
- 【図 20】水性バッファ存在下における、ポリプロピレン疎水性表面上に沈着させたペプチド 2 DOS - 2 の時間依存持続性を示す蛍光画像である。 30
- 【図 21】図 20 の 300 V スキャンの結果を示すグラフである。
- 【図 22】平底 96 ウェルプレートおよび V 底 96 ウェルプレートに添加した様々な疎水性ペプチドの場所を示す図である。
- 【図 23】洗浄ありおよび洗浄なしの条件における疎水性ペプチドの保持を示す図 22 のプレートの蛍光画像である。
- 【図 24】図 23 の V 底プレートにおける 500 V スキャンの結果を示すグラフである。
- 【図 25】図 23 の平底プレートにおける 500 V スキャンの結果を示すグラフである。
- 【図 26】ポリプロピレンおよびポリスチレン V 底 96 ウェルプレートに添加した様々な疎水性ペプチドの場所を示す図である。
- 【図 27】洗浄ありおよび洗浄なしの条件における疎水性ペプチドの保持を示す図 26 のプレートの蛍光画像である。 40
- 【図 28】図 26 のポリプロピレンプレートおよびポリスチレンプレートにおける、洗浄後のさまざまなペプチドの保持率をパーセント表示したグラフである。
- 【図 29 A】「液相」プロトコルを用いた実験から得られるマイクロタイタープレートの蛍光画像である。
- 【図 29 B】表 2 1 に示す蛍光画像のデータを示すグラフである。
- 【図 30 A】「共乾燥」プロトコルを用いた実験から得られるマイクロタイタープレートの蛍光画像である。
- 【図 30 B】表 2 2 に示す蛍光画像のデータを示すグラフである。
- 【図 31】ポリプロピレンシート上における二量体形成を示す蛍光画像である。 50



【 図 1 4 】

	600V	500V	400V	300V
原溶液中のペプチド				
乾燥後のペプチド				
原溶液中の再生ペプチド				

【 図 1 5 】



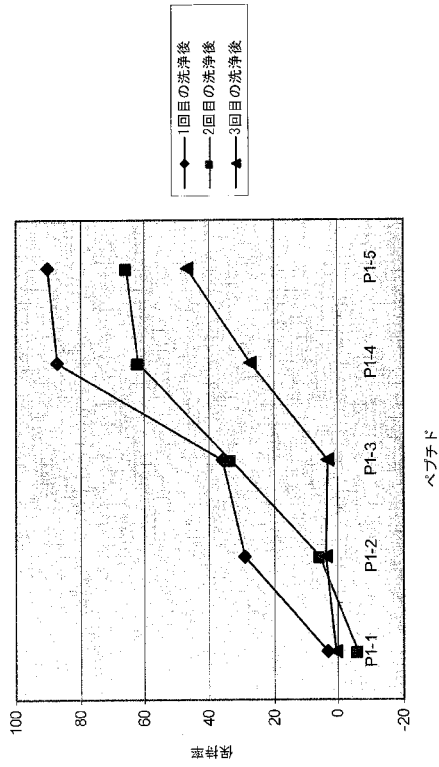
【 図 1 6 A 】

	スライド 01
アレイ作製後	コントロールアレイ  テストアレイ 
処理後	コントロールアレイ  テストアレイ 
1回目の洗浄後	コントロールアレイ  テストアレイ 

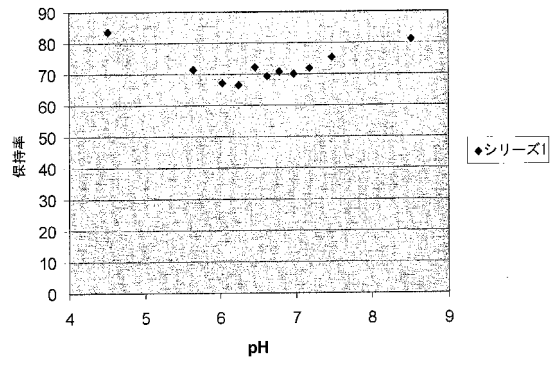
【 図 1 6 B 】

2回目の洗浄後	コントロールアレイ  テストアレイ 
3回目の洗浄後	コントロールアレイ  テストアレイ 

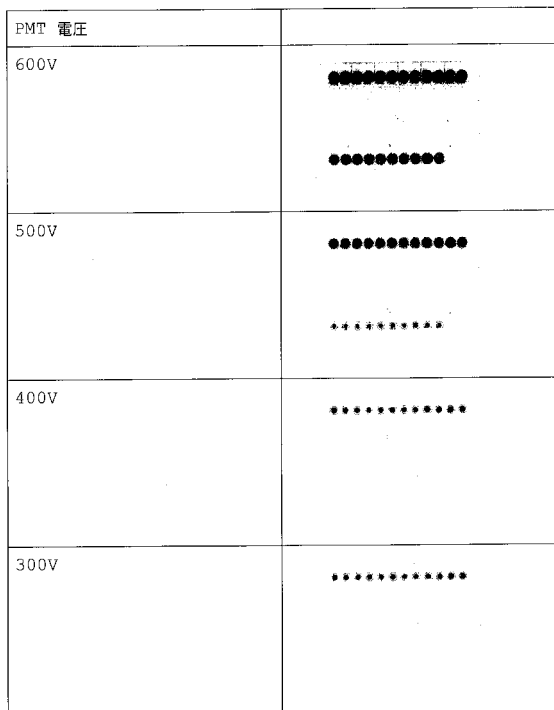
【 図 17 】



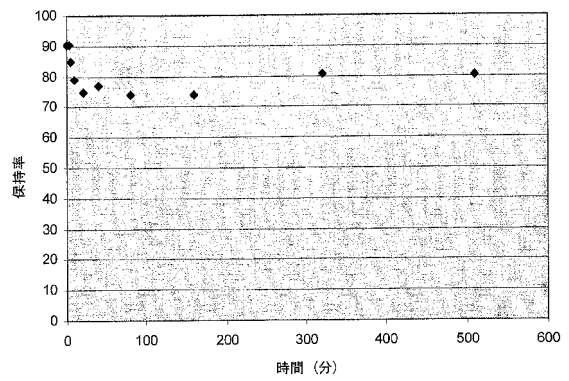
【 図 19 】



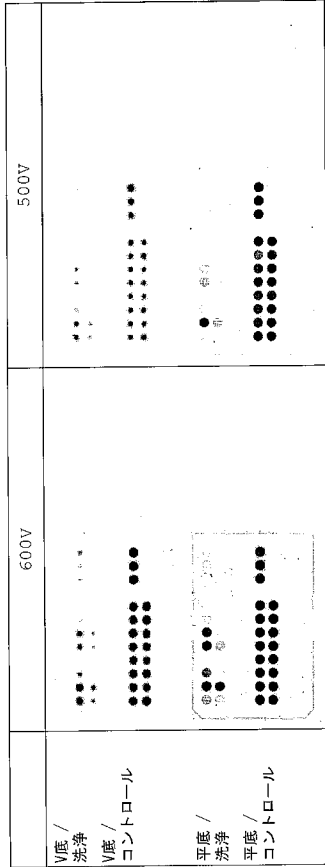
【 図 20 】



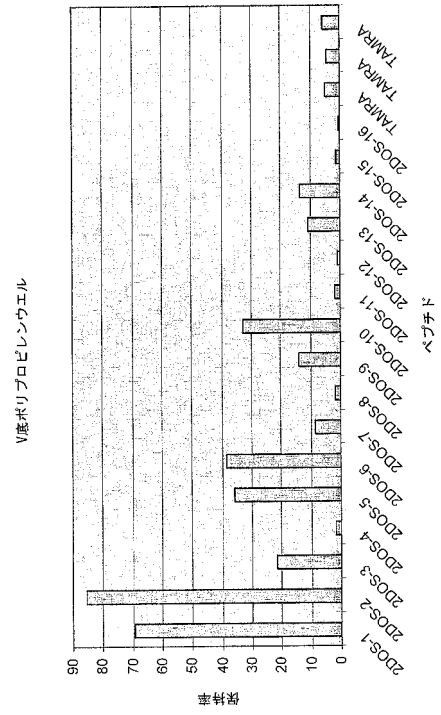
【 図 21 】



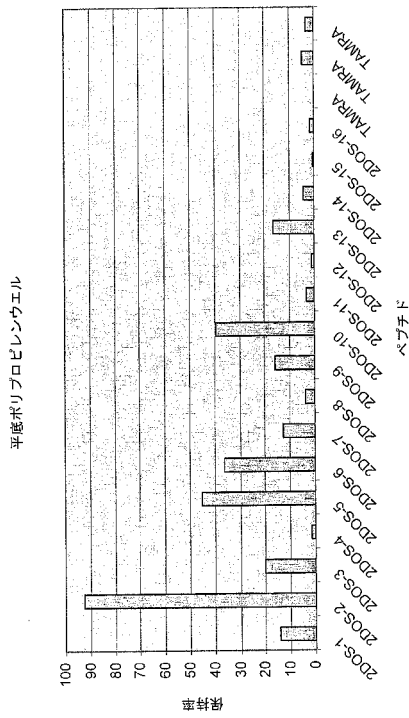
【図23】



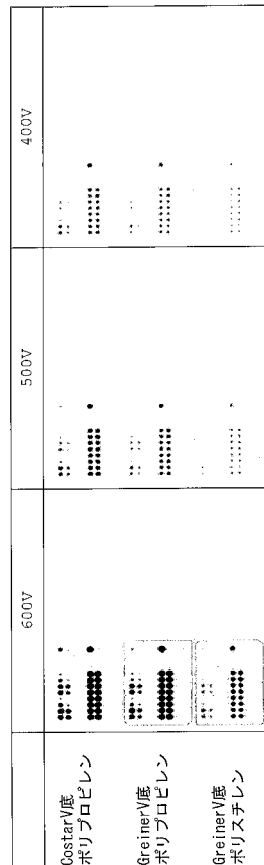
【図24】



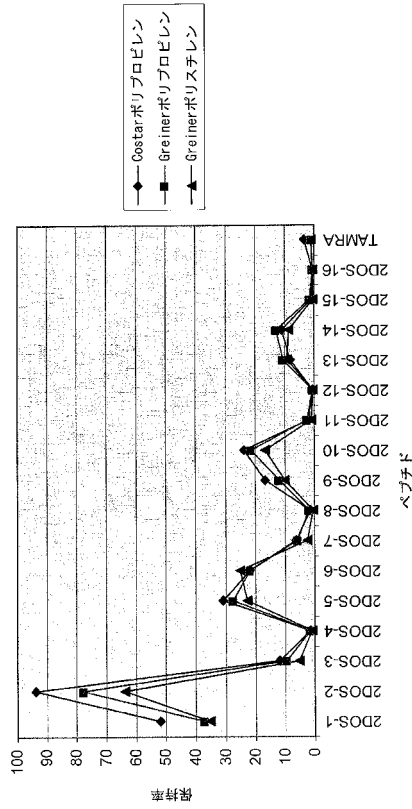
【図25】



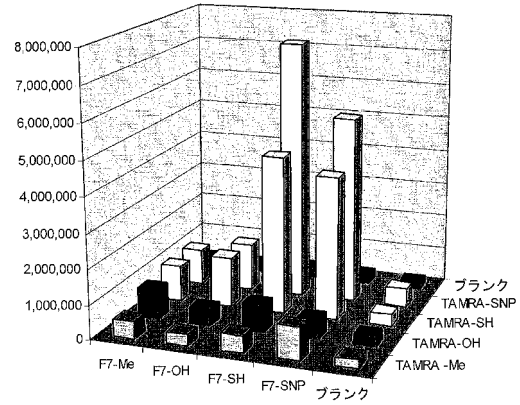
【図27】



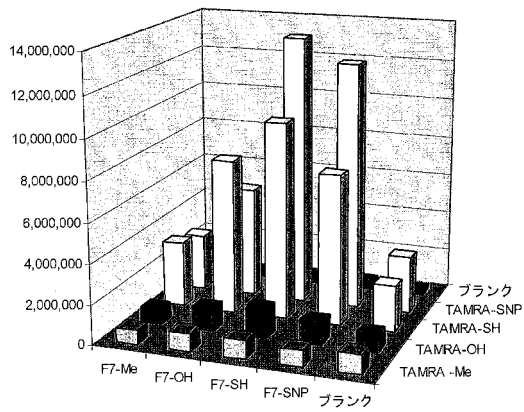
【図28】



【図29B】



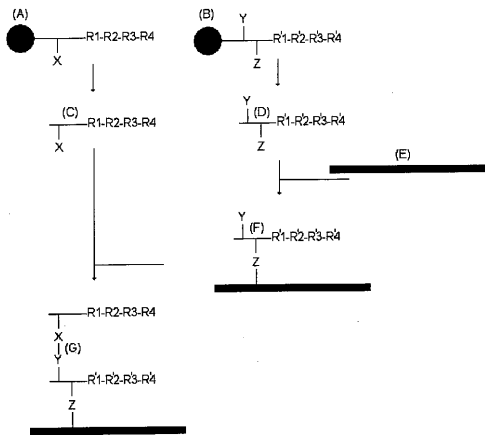
【図30B】



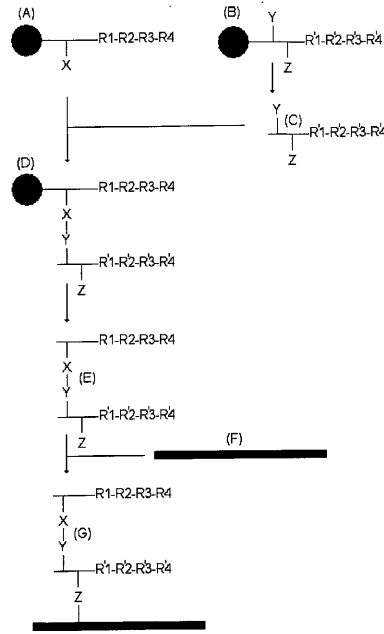
【図31】

1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 50% (v/v) アセトニトリル水溶液	ペプチド TLSP-4	
1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 50% (v/v) アセトニトリル水溶液	ペプチド TLSP-4 in 10%グリセロール	
ペプチド SB-1	ペプチド TLSP-4	
ペプチド SB-1	ペプチド TLSP-4 in 10%グリセロール	
ペプチド SB-3	ペプチド TLSP-4	
ペプチド SB-3	ペプチド TLSP-4 in 10%グリセロール	

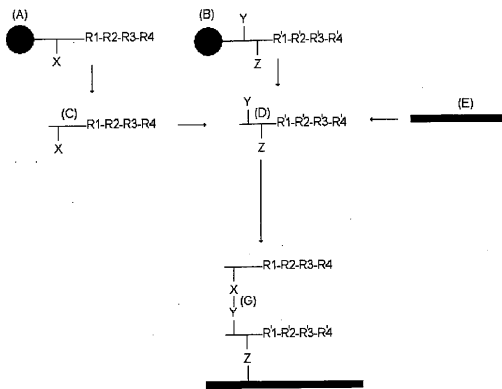
【 図 1 】  
FIG. 1



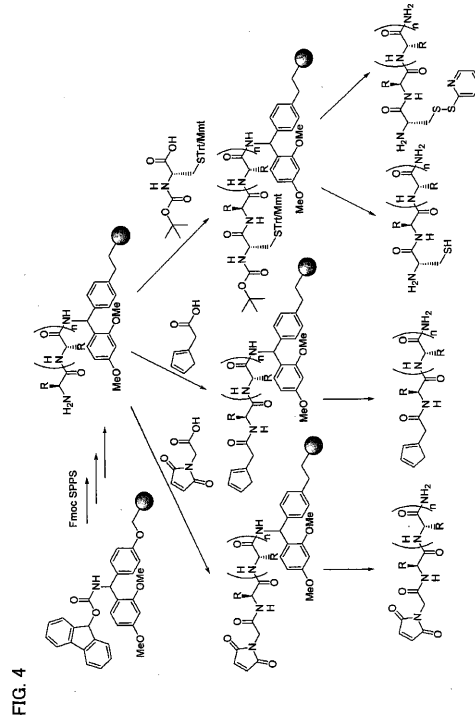
【 図 2 】  
FIG. 2



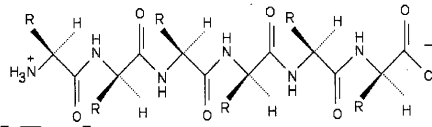
【 図 3 】  
FIG. 3



【 図 4 】



【 5 】  
FIG. 5



【 6 】

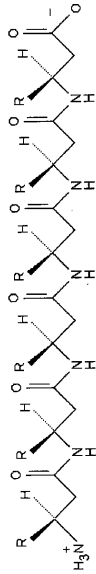
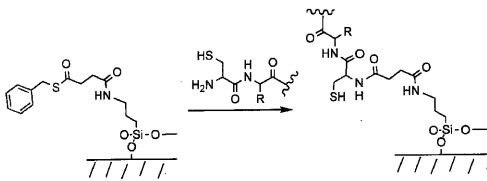


FIG. 6

【 8 】  
FIG. 8



【 7 】

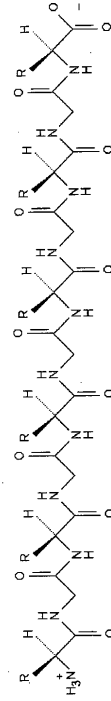


FIG. 7

【 9 】

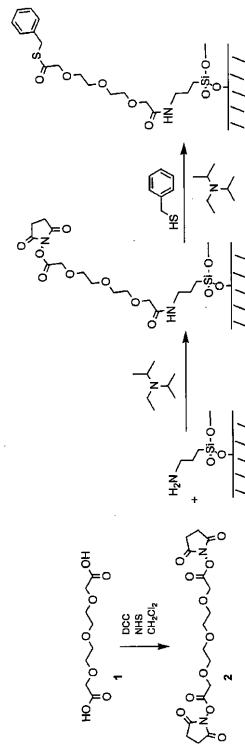
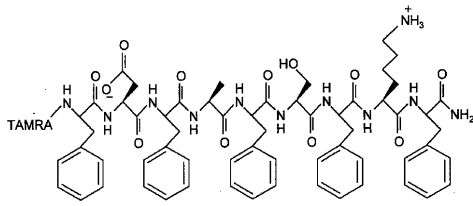


FIG. 9

【 1 1 】  
FIG. 11

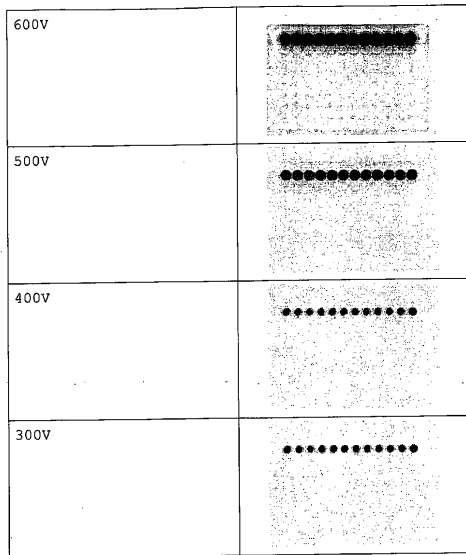


【 1 3 】

2DOS-1	2DOS-2	2DOS-3	2DOS-4	2DOS-5	2DOS-6	2DOS-7	2DOS-8
2DOS-9	2DOS-10	2DOS-11	2DOS-12	2DOS-13	2DOS-14	2DOS-15	2DOS-16
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA	-	-	-	-

FIG. 13

【 1 8 】  
FIG. 18



【 2 2 】

2DOS-1	2DOS-2	2DOS-3	2DOS-4	2DOS-5	2DOS-6	2DOS-7	2DOS-8	TAMRA	TAMRA	TAMRA
2DOS-9	2DOS-10	2DOS-11	2DOS-12	2DOS-13	2DOS-14	2DOS-15	2DOS-16	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2DOS-1	2DOS-2	2DOS-3	2DOS-4	2DOS-5	2DOS-6	2DOS-7	2DOS-8	TAMRA	TAMRA	TAMRA
2DOS-9	2DOS-10	2DOS-11	2DOS-12	2DOS-13	2DOS-14	2DOS-15	2DOS-16	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 22

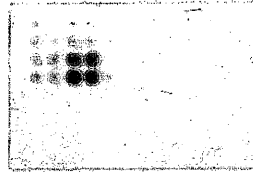
【 26 】

2DOS-1	2DOS-2	2DOS-3	2DOS-4	2DOS-5	2DOS-6	2DOS-7	2DOS-8		TAMBA
2DOS-9	2DOS-10	2DOS-11	2DOS-12	2DOS-13	2DOS-14	2DOS-15	2DOS-16		-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2DOS-1	2DOS-2	2DOS-3	2DOS-4	2DOS-5	2DOS-6	2DOS-7	2DOS-8		TAMBA
2DOS-9	2DOS-10	2DOS-11	2DOS-12	2DOS-13	2DOS-14	2DOS-15	2DOS-16		-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 26

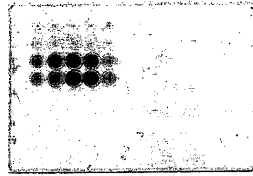
【 29 A 】

FIG. 29A



【 30 A 】

FIG. 30A



【 32 】

P1-5 L1-P1-16 L1-P1-15 L1-P1-14 L1-P1-13 L1-P1-12 L1-P1-11 L1-P1-10 L1-P1-9 L1-P1-8 L1-P1-7 L1-P1-6 L1-P1-5 L1-P1-4 L1-P1-3 L1-P1-2 L1-P1-1	<p>L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-1 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-2 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-3 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-4 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-5 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-6 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-7 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-8 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-9 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-10 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-11 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-12 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-13 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-14 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-15 + L1-P2-17/18/19/20</p> <p>L1-P2-16 + L1-P2-17/18/19/20</p>
---	---

FIG. 32

【配列表】

0004750187000001.app

---

フロントページの続き

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 国際公開第2005/014615(WO, A1)

特表平04-506511(JP, A)

特開2001-131208(JP, A)

特開2003-284552(JP, A)

特表2005-524057(JP, A)

特開平02-079975(JP, A)

特表2005-519579(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

G01N 37/00