

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4510292号  
(P4510292)

(45) 発行日 平成22年7月21日 (2010. 7. 21)

(24) 登録日 平成22年5月14日 (2010. 5. 14)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/566 (2006. 01)

GO 1 N 33/566

GO 1 N 33/15 (2006. 01)

GO 1 N 33/15 Z

GO 1 N 33/50 (2006. 01)

GO 1 N 33/50 Z

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/68 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 M

請求項の数 11 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-582803 (P2000-582803)  
 (86) (22) 出願日 平成11年11月15日 (1999. 11. 15)  
 (65) 公表番号 特表2002-531809 (P2002-531809A)  
 (43) 公表日 平成14年9月24日 (2002. 9. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/NL1999/000700  
 (87) 国際公開番号 W02000/029851  
 (87) 国際公開日 平成12年5月25日 (2000. 5. 25)  
 審査請求日 平成18年11月10日 (2006. 11. 10)  
 (31) 優先権主張番号 98203830. 9  
 (32) 優先日 平成10年11月13日 (1998. 11. 13)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 501191720  
 ベプスカン システムズ ビー. ブイ.  
 オランダ国, 8 2 1 9 ビーエイチ レ  
 リスタッド, エデルヘルトウェヒ 1 5  
 (74) 代理人 100085545  
 弁理士 松井 光夫  
 (72) 発明者 スルートストラ, ジェレ, ウーター  
 オランダ国, 8 2 3 2 エージェイ レ  
 リスタッド, スコウ 3 9 - 2 3  
 (72) 発明者 プイク, ウーター, コルネリス  
 オランダ国, 8 2 4 3 ブイゼット レ  
 リスタッド, スコーナー 4 3 - 4 0

審査官 白形 由美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミモトープシーケンスを決定するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レセプターのためのミモトープシーケンスを決定するための方法であって、

(a) アミノ酸、モノサッカライド及びヌクレオチドからなる群から選択される構成ブロックから構成されるテストシーケンスのライブラリーを用意すること、

(b) レセプターに対するライブラリーの各テストシーケンスの活性を決定すること、  
 (c) ステップ (b) の結果に従い、該レセプターに対する結合活性を示す、構成ブロックを或るポジションに含むテストシーケンスを同定すること、

(d) 同定されたテストシーケンスの選択されたポジションの構成ブロックを選択された構成ブロックで置換することにより、ステップ (c) で同定された前記テストシーケンスに基づきテストシーケンスの次のライブラリーを用意すること、

(e) レセプターに対する、ステップ (d) で用意されたライブラリーの各テストシーケンスの活性を決定すること、(f) ステップ (e) の結果に従い、該レセプターに対する結合活性を示す、構成ブロックを或るポジションに含むテストシーケンスを同定すること、(g) レセプターに対する閾値活性を与えるミモトープシーケンスがステップ (f) で見つけられるまで、ステップ (d) で用意されたテストシーケンスのライブラリーについてステップ (d) ~ (f) のサイクルを繰り返すこと、それにより該レセプターに対するテストシーケンスの活性を決定する為に用いられるレセプターの量がそれぞれのサイクルにおいて低くされる、

10

20

のステップを含み、各テストシーケンスがミニカード又はフラットサポート媒体上に位置しているところの方法。

【請求項 2】

ステップ (a) で用意されるテストシーケンスの化学組成が公知であるところの請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ (e) においてレセプターのある量が活性を決定するために使用され、ここで該量は、ステップ (b) で使用されるレセプター量よりも小さい、かつステップ (g) における前記量は、前記ステップ (g) の直前のサイクルのステップ (e) における前記量よりも小さいところの請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【請求項 4】

ステップ (e) で活性を決定するために使用されるレセプターの量は、ステップ (b) で使用される前記量より 5 ~ 1 0 0 0 倍 小さく、かつステップ (g) における前記量は、前記ステップ (g) の直前のサイクルのステップ (e) における前記量より 5 から 1 0 0 0 倍 小さいところの請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ (e) で活性を決定するために使用されるレセプターの量は、ステップ (b) で使用される前記量より 1 0 ~ 1 0 0 倍 小さく、かつステップ (g) における前記量は、前記ステップ (g) の直前のサイクルのステップ (e) における前記量より 1 0 から 1 0 0 倍 小さいところの請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

少なくとも一つの構成ブロックが、構成ブロックの群により置換されるところの少なくとも一つのステップ (d) を含む請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 7】

テストシーケンスが 3 ~ 2 0 個の構成ブロックを含むところの請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 8】

ステップ (a) のテストシーケンスのライブラリーが 5 0 0 ~ 1 0 , 0 0 0 個のテストシーケンスを含むところの請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 9】

レセプターが、モノクロナール抗体、酵素または他のタンパク質、細胞、ホルモンレセプター及び微生物からなる群より選択されるところの請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【請求項 10】

活性が、免疫アッセイ法、生体分子相互作用解析装置又は原子間力顕微鏡を使用して決定されるところの請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 11】

ライブラリーの各テストシーケンスが前記ライブラリーの他のテストシーケンスから物理的に分離されるところの請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ミモトープシーケンスを決定するための方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、ランダムダイバーシティーライブラリーが、診断、薬剤及びワクチンのためのリード分子を同定するために幅広く使用されている。リード分子がペプチドである場合、リード分子を同定するために使用される方法は、ペプスキャン (pepscan) 方法としてしばしば言及されている。

【0003】

50

ペプスキャン方法は、1980年代初めから知られている。これらの方法の背後にある基本的な理論は、欧州公開特許公報第0,138,855号及び欧州公開特許公報第0,190,205号に記載されている。

【0004】

ランダムダイバーシティーライブラリーのスクリーニングの2つのきわめて重要な局面は、それらのサイズ、すなわち、リード分子を同定するためにどのくらい多くの異なる化合物が必要とされるか、及びリード分子の構造又はシーケンスの最適化の方法である。文献に記載されているたいていの方法は、ランダムダイバーシティーライブラリーがより大きければ、良いリード分子を見つけるためのチャンスがより高くなるという考えに基づいていると思われる。

10

【0005】

公知の方法が最も様々であることに関連する局面は、リード分子の最適化の方法である。いったん、ランダムダイバーシティーライブラリーが合成されれば、それはその望ましい活性のために試験されることができる。もちろん、リード化合物として、前記望ましい活性の最も高い値を示すランダムダイバーシティーライブラリーのメンバーを単純に選択することが可能である。しかしながら、たいていの方法は、一層高い活性を示すリード分子に到達するために、最も高い活性を示す前記メンバーの構造を最適化するためのステップを含む。

【0006】

たった数千のペプチドからなるミニペプスキャンライブラリーは、数百万の化合物からなるライブラリーから開始して達成される分子の活性と類似のそれを有する分子に迅速に最適化されたリード分子を同定するために使用されてきた。このことは、Slootstraら、「Molecular Diversity」, 1巻, (1995年b), 87~96頁、及びSlootstraら、「J. Mol. Recogn.」, 10巻, 217~224頁, (1997年)に記載されている。これらの論文は、ペプスキャンに基づく最適化方法と組み合わせられた小さいライブラリーが、リード分子を同定しかつ最適化する価値ある手段であることを示している。

20

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、リード分子を同定しかつ最適化するために改善された方法を提供することを目的とする。

30

【0008】

目的の改善は、公知のテスト分子のライブラリーから開始し、前記ライブラリーの活性を評価することにより、かつ最も高い活性を示す少数のテスト分子の構造を最適化すること、テスト分子の構造の各々の構成ブロックを全ての他の可能な構成ブロックで系統的に置換することにより達成されることがわかった。

【課題を解決するための手段】

【0009】

このように、本発明はレセプターのためのミモトープシーケンスを決定するための方法であって、

(a) アミノ酸、モノサッカライド及びヌクレオチドからなる群から選択される構成ブロックから構成されるテストシーケンスのライブラリーを用意すること、

40

(b) レセプターに対するライブラリーの各テストシーケンスの活性を決定すること、

(c) ステップ(b)の結果に従い、該レセプターに対する結合活性を示す、構成ブロックを或るポジションに含むテストシーケンスを同定すること、

(d) 同定されたテストシーケンスの選択されたポジションの構成ブロックを選択された構成ブロックで置換することにより、ステップ(c)で同定された前記テストシーケンスに基づきテストシーケンスの次のライブラリーを用意すること、

(e) レセプターに対する、ステップ(d)で用意されたライブラリーの各テストシーケンスの活性を決定すること、

(f) ステップ(e)の結果に従い、該レセプターに対する結合活性を示す、構成プロ

50

ックを或るポジションに含むテストシーケンスを同定すること、

(g) レセプターに対する閾値活性を与えるミモトープシーケンスがステップ(f)で見つけられるまで、ステップ(d)で用意されたテストシーケンスのライブラリーについてステップ(d)~(f)のサイクルを繰り返すこと、それにより該レセプターに対するテストシーケンスの活性を決定する為に用いられるレセプターの量がそれぞれのサイクルにおいて低くされる、

のステップを含み、各テストシーケンスがミニカード又はフラットサポート媒体上に位置しているところの方法に関する。

【0010】

本発明の方法は、簡便な様式で、望ましいレセプターへの非常に高い結合強度を有するミモトープシーケンスへ導くことがわかった。正確なエピトープ(すなわち、抗体に結合することを提供する抗原の部分的なシーケンス)が公知であるいくつかの場合に、本方法は、ほんの数ステップでエピトープの正確な構造を導くことがわかった。

【0011】

本発明によれば、レセプターのためのミモトープシーケンスが決定される。この文脈において、ミモトープシーケンスは、所定のレセプターの存在下で或る、最小の、望ましい活性を示す分子として定義される。この例は、或る抗体のための抗原のエピトープシーケンスの決定である。しかしながら、いくつかの場合、正確なエピトープがまねられるなら、レセプターへの見つけられた分子のわずかにより少ない結合強度が十分であることが満足でありうる。

【0012】

ミモトープシーケンスは、構成ブロックの数及び順序が分子の特性を制御する多くの構成ブロックからなる分子である。本発明により決定されてもよいミモトープシーケンスの型の例は、ペプチドに結合しているステロイド又はサッカライド様構造をおそらく有するペプチド、サッカライド、DNA(オリゴヌクレオチド)、およびPNA(ペプチド様核酸)を含む。このように、構成ブロックは、アミノ酸(天然及び非天然アミノ酸の両方)、モノサッカライド、及びヌクレオチドの群から選択される。

【0013】

ミモトープシーケンスが、本発明により決定されるところレセプターは、ミモトープシーケンスのタイプの一つが結合活性のような測定しうるある活性をそれに対して示しうるところの任意の化合物、組成物、微生物、又は組織サンプルでよい。レセプターの適切な例は、抗体(モノクローナル及びポリクローナルの両方)、タンパク質たとえば酵素、細胞、ホルモンレセプター、及び微生物を含む。

【0014】

本発明による方法の最初のステップは、テストシーケンスのライブラリーの用意である。もちろん、これらのテストシーケンスは、目的のミモトープシーケンスと同じタイプ又はクラスの構成ブロックからなる。好ましくは、テストシーケンスは、それらは無作為に選択されてもよいが、それらの組成及び構造は公知であるという点で知られている。このことは、多くのシーケンスを、例えば手動によって又はコンピュータによって生成し、かつこのように得られたシーケンスを合成することにより達成されてもよい。レセプターに対する好都合な活性を有すると知られている化合物からテストシーケンスのライブラリーを誘導することも可能である。原則として、ライブラリーを作成するためにテストシーケンスの選択をする任意の公知の方法が適している。

【0015】

テストシーケンスの長さは、シーケンスを構成する構成ブロックの性質、及びレセプターの性質、前記レセプターに対する望ましい活性に依存している。たいいていの目的のために、3~20個の間の構成ブロックの長さが適している。

【0016】

ライブラリーを構成するテストシーケンスの数は、許容できる回数のステップ/サイクルで、良いミモトープシーケンスに至るために十分なデータを提供するために十分な大きさ

10

20

30

40

50

である。他方では、前記シーケンス数は得られたデータが極めて便宜に扱われ得ることを保証するべく十分に小さい。普通は、ライブラリー中のテストシーケンスの数は、500～100,000の間、好ましくは1,000～10,000の間にある。

【0017】

テストシーケンスの望ましい数が生成された後、前記テストシーケンスは合成されうる。このことは、例えば、Slootstraら、「Molecular Diversity」、1巻、(1995年b)、87～96頁に記載されているような任意の公知の方法でおこなわれうる。もちろん、すでに利用できるライブラリー（例えば、本方法の前の実行の中で使用されていた故に）を使用することがまた可能である。その場合、テストシーケンスは合成される必要はない。

【0018】

便利さの理由のために、テストシーケンスは好ましくは、オランダ国特許出願公報第10,019703号に記載されているようにミニカード又はフラットサポートを使用して合成される。

【0019】

本発明による方法の次のステップは、レセプターに対するライブラリーの各テストシーケンスの活性を決定することである。この決定が実行されるところの方法は、ミモトープシーケンスと目的とされるレセプターの間の特定の相互作用、及びレセプター及びミモトープシーケンスの構成ブロックの性質に依存する。例えば、望ましい活性がレセプターへのミモトープシーケンスの結合であり、かつ該ミモトープシーケンスがペプチドであり並びに該レセプターがモノクローナル抗体である場合、該決定は溶液中又は固形サポート上のいずれかにおいてELISAテストで適切に行われうる。活性を決定する他の適当な方法は、生体分子相互作用解析装置(BIACORE)及び原子間力顕微鏡(AFM)を含む。当業者は、或るレセプター及びミモトープシーケンスの性質が与えられたなら、活性の決定の適切な方法を選択することができる。

【0020】

ライブラリーのテストシーケンスの活性の決定の結果から、少なくとも一つのテストシーケンスが、本方法の残りのステップのための基礎を形成するために選択される。本発明によれば、前記少なくとも一つのテストシーケンスが、或るポジションにおいて、活性の決定の結果からあらわれるように、前記ポジションで好都合な構成ブロックを同定することにより選択される。この点に関して、語句「或るポジションにおいて、前記ポジションで好都合な構成ブロックを」により、前記構成ブロックを前記ポジションに有するテストシーケンスが、見つかった他の活性と比較してレセプターに対し高い活性を示すことが意味される。

【0021】

同定された少なくとも一つのテストシーケンスは、レセプターに対するその活性を試験され、かつ見つかった他の活性と比較して高い活性をそれ自身示すことが可能である。

【0022】

同定された少なくとも一つのテストシーケンスがその自体試験されなかったということもまた可能である。このことは、次のように説明されることができる。例えば、ポジション2で構成ブロックAを有するテストシーケンスが、レセプターに対する非常に高い活性を示すことがみつけれられるかもしれない。さらに、ポジション4で構成ブロックBを有するテストシーケンスが、レセプターに対する非常に高い活性をまた示すことがみつけれられるかもしれない。同定されるべき少なくとも一つのテストシーケンスは、その後、ポジション2で構成ブロックAをかつポジション4で構成ブロックBを含むシーケンスでありうる。しかしながら、このシーケンス自身は、レセプターに対するその活性のためにまだ評価されていないということも大いにありうる。

【0023】

一般に、本発明による方法の残りのステップを基礎づけるための同定されたテストシーケンスの数は、1～150の間である。選択されたテストシーケンスのより大きい数はより良い結果に導くが、取り扱うのが比較的より煩わしい。好ましくは、前記数は、1～25

10

20

30

40

50

の間である。当業者は、該方法の結果の望ましい質かつ方法を実行するために可能な設備に依存して、選択されたテストシーケンスの数を決定することが出来る。

【0024】

同定されたテストシーケンスを基礎として、テストシーケンスの次のライブラリーがいわゆる置換分析で用意される。このことは、同定されたテストシーケンスの複数ポジションで構成ブロックを変化させることによって、すなわち、同定されたテストシーケンスの選択されたポジションにおける構成ブロックを、選択された構成ブロックで置換することによっておこなわれる。

【0025】

例えば、その最も簡単な形式において、置換分析は次のようにして実行される。テストシーケンスが天然のアミノ酸のドデカペプチドである場合、最初に、選択されたドデカペプチドの一つのポジション1における構成ブロックは、20個の天然に生じるアミノ酸の各々へと変えられることができ、20個の新しいテストシーケンスをもたらす。このことは、ドデカペプチドの各ポジションで繰り返されて、 $20 \times 12 = 240$ 個のテストシーケンスをもたらす。これらの240個のシーケンスのうち、オリジナルのデカペプチドは、12倍存在する。この過程は、各々の選択されたドデカペプチドについて繰り返される。このようにして、240～3600の新しいテストシーケンスを含む次のライブラリーが得られる。

10

【0026】

この置換分析のより複雑な形式は、例えば、或る構成ブロックが構成ブロックの群により置換されることを許容すること（例えば、2又はそれ以上のアミノ酸による一つのアミノ酸の置換）により実行されてもよい。通常、複数の構成ブロックによるそのような置換は、あまり使用されない。好ましくは、本方法の異なるサイクルの少なくとも一つの置換分析において、少なくとも一つの構成ブロックが構成ブロックの群により置換される。各置換分析において、あまりに多い複数の構成ブロックが導入され、するとシーケンスの長さに関する問題が起こるということがないように注意すべきである。同じ理由のために、構成ブロックの複数の群は、好ましくはあまり長くないべきである。当業者は、該分野での彼らの経験を基礎として、複数の構成ブロックのどのくらいのサイズ及び数が導入されてもよいか判断することができる。

20

【0027】

置換分析において空白により構成ブロックを置換することがまた可能である。そのようにして、シーケンスは一つの構成ブロックだけ短くなる。あまりに多い構成ブロックが、同時に空白により置換されてはならないことは明らかである。なぜなら、このことは望ましくなく短い（又は全くない）テストシーケンスをもたらすからである。当業者は、いつそしてどのポジションでテストシーケンスの中に空白を導入することが有益であるかを判断することができる。

30

【0028】

加えて、置換分析において選択された構成ブロックのみの導入を許容すること又はテストシーケンス中の選択されたポジションで構成ブロックを置換することのみが可能である。ときには、例えばテストシーケンスの望ましい3次元構造を維持するために、或るポジションで或る構成ブロックを維持することが好ましい。置換分析をおこなうことのこの方法の利点は、用意されるべきテストシーケンスの総数が制限されていることである。しかしながら、一般に、テストシーケンスの全てのポジションの構成ブロックが全ての可能な構成ブロックにより置換された場合、望ましい3次元構造を有するテストシーケンスがまた用意されるであろう。再び、どのような場合に選択されたポジションのみで置換を実行することが有益であるかもしれないことを判断することは、当業者のスキルの範囲内のことである。彼は、どのポジションへこれを適用しうるか判断し、かつどの構成ブロックが置換のために使用されてもよいか、かつどの構成ブロックが置換で（或るポジションで）使用されないのが最も良いかをまた判断することができる。

40

【0029】

50

少なくとも一つの同定されたテストシーケンスの置換分析を基礎として用意される次のライブラリーのテストシーケンスは、レセプターに対するそれらの活性を試験される。テストシーケンスが、レセプターに対する十分な活性を示すこのライブラリーのテストシーケンス間に存在する場合、該方法は終了され、かつ望ましいミモトープシーケンスが得られる。或る活性が十分と考えられるか否かは、活性のタイプ、レセプター、ミモトープシーケンス、及びミモトープシーケンスの目的の応用に依存することは明らかである。環境が決められると、当業者は望ましい活性のための閾値を選択することができる。

#### 【0030】

テストシーケンスのいずれもがレセプターに対する十分な活性を示さない場合、他のサイクルが実行される。本発明によれば、好ましくは少なくとも2つのサイクル、すなわち2つの置換分析が実行される。このように、テストシーケンスの次のライブラリーは、上に述べられたように、最も高い活性を示した先行のライブラリーの10～15個のテストシーケンスに基づき用意される。この次のライブラリーにおけるテストシーケンスはそれらの活性について評価され、以下同様である。

#### 【0031】

実行されなければならないサイクルの数は、レセプターに関して見つけれられるべきミモトープシーケンスの活性の望ましい程度に依存する。約4500個のランダムに選択されたドデカペプチドから開始すると、3サイクル未満でモノクロナール抗体に関してピッタリのエピトープシーケンスに到達することが可能であることがわかった。

#### 【0032】

本発明の好ましい実施態様において、前記レセプターに対するテストシーケンスの活性を決定するために使用されるレセプターの量は、各サイクルで低下される。最初のサイクルで必須と思われる構成ブロックは、さらなるサイクルで必須でなくなるかもしれないことが見い出された。言い換えれば、前記最初のサイクルで、その後の一又は複数のサイクルにおいて克服されうる局所的な最適化は見い出されうる。テストシーケンスの活性の決定におけるレセプターの量を低下することは、そのような局所的な最適化を克服することを支援することがみつけられた。好ましくは、ライブラリー中のテストシーケンスの活性の決定に使用されるレセプターの量は、50～100、より好ましくは10～100のファクターだけ減少される。

#### 【0033】

本発明は次に、次の非制限的な実施例によりさらに説明される。

#### 【0034】

##### 【実施例】

記載される例は、ペプチドライブラリーの様々な型から、ペプチド、タンパク質、ウィルス、バクテリア、糖類及びステロイド類に対して起こる抗体（モノクロナール及びポリクロナール）で同定されるリードペプチドに成功裡に適用された本発明の最適化方法の6個のバリエーションを説明する。付加的なバリエーションは可能であることが意図されうる。これらのバリエーションを支配する概念は、1又はそれ以上のリードペプチド上での置換分析の繰り返しである。局所的最小が克服され、かつエピトープとミモトープが同定される。

#### 【0035】

##### 材料及び方法

ミニカードライブラリーの合成及びスクリーニング（実施例1, 2, 5, 6で使用される）

#### 【0036】

20個の天然のL-アミノ酸を使用して、4550個のランダムなドデカペプチド（12マー）が、486DX2（66MHz）コンピュータシステムで走るクイックベーシック（Quick Basic）でプログラムされたランダム発生機で生成された。このライブラリーでは、各残基の頻度はほぼ5%である。シーケンスのこのセットは、付加的なライブラリーを設計するために使用された。全てのシーケンスがD-アミノ酸型であるもの、2番目及

10

20

30

40

50

び11番目のポジションがシステインにより保持されているもの、及び3番目及び10番目のポジションがシステインにより保持されているもの。後の2つ目的は、ループとしてペプチドを表わすべきペプチド中にジスルフィドブリッジを導入することである。ここで非常に重要なのは、システインの中及び外のアミノ酸のシーケンスは4550個のドデカペプチドの最初のセットのそれに等しいということである。このようにして、ドデカペプチドのこれらのセットの活性は比較されうる。実施例1は、3番目及び10番目のポジションがシステインにより保持されている合成ペプチドライブラリーを用いて得られた結果を記載する。実施例2は、4550個のランダムなドデカペプチド(12マー)からなる合成ペプチドライブラリー(すなわちシステイン又は何らかの他のモチーフが使用されていない)で得られた結果を記載する。

10

#### 【0037】

ライブラリーは、以前に記載されているように(Slootstraら, 1995年b)、クレジットカード型ミニ-ペプスキャンカード(455個のペプチド/カード)を使用して合成されかつスクリーニングされた。実施例1では、各ペプチドに対するモノクロナール抗体26/9の結合は、ペプスキャンを基礎としたエンザイムリンクドイムノアッセイ法(ELISA)で試験された。モノクロナール抗体26/9は、以前に記載されている(Wilsonら, 1984年; Riniら, 1992年; Churchillら, 1994年)。モノクロナール抗体26/9は、インフルエンザウィルス(X47:HA1)の赤血球凝血素タンパク質のペプチドHA175-110に対して生じた(Wilsonら, 1984年)。

#### 【0038】

実施例1では、共有結合したペプチドを含む455個のウェルのクレジットカード型ポリエチレンカードが、抗体26/9(100 µg/ml)とともにインキュベートされた。洗浄後、ペプチドはウサギ抗マウスペルオキシダーゼ(rampo, 1/1000希釈)(Dakopatts製)とともにインキュベートされ(1時間、25 °C)、そして引き続き、洗浄後、ペルオキシダーゼ基質2, 2'-アジノ-ジ-3-エチルベンズチアゾリンサルフォナート(ABTS)及び2 µl/mlの3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が添加された。1時間後、発色現象が測定された。ELISAの発色現象は、CCD-カメラ及びイメージ処理システムで数量化された。装置は、CCD-カメラ及び55 mmレンズ(ソニー製CCDビデオカメラ XC-77R、ニコン製micro-nikkor 55mm f/2.8 レンズ)、カメラアダプター(ソニー製カメラアダプター DC-77RR)及びイメージ処理ソフトウェアパッケージTIM(バージョン3.36)(Dif a Measuring Syatems、オランダ国)からなる。TIMは、486 DX2 (50 MHz) コンピュータシステムで実行する。

20

30

#### 【0039】

4550個のランダムなドデカペプチドからなるドデカペプチドライブラリーは、抗体の比較的に高い濃度でスクリーニングされる(100 µg/ml、より普通には10 µg/ml、実施例2~6参照)。この濃度は、天然のエピトープペプチド(示されていない)を用いて、ELISAで最大の結合活性を得るために要求される濃度の上のほぼ2倍である。100 µg/mlの濃度が、4550個のランダムなドデカペプチドの小さいセットから多くの結合ペプチドを得るために使用された。従来の研究では、好ましくないシグナル/ノイズ比を得ることなしに、そのような手順は、天然のエピトープの小さな直線又は非直線部分に似ている何百の結合ペプチドを生じ得ることが示されていた(Slootstraら, 1995年b; Slootstraら, 1997年)。

40

#### 【0040】

他のペプスキャンライブラリーの合成及びスクリーニング(実施例4で使用される)ランダムなミニペプスキャンライブラリーに加えて、ミモトープは標準のペプスキャンライブラリーからまた同定され得る。これらのライブラリーは、公知のペプチド(Slootstra, 1995年a)の直線シーケンスをカバーするすべての重複する12マー(又はより小さい/より長い)を含む。

#### 【0041】

ペプスキャンでないライブラリーの合成及びスクリーニング(実施例3, 6で使用される

50



)

リードペプチドは、例えばフェーズディスプレイライブラリーのような他のライブラリーの型からまた得られ得る。

#### 【0042】

リード分子のシーケンス分析（実施例5で使用される）

全ての4550個のドデカペプチドは、それらの結合活性により分類された。それらのランキングに従って、共通シーケンス及びモチーフが同定される。トップ50個の分子のシーケンスのみを使用するリード最適化の初期の方法は、Slootstraら（1995年b；1997年）に記載されている。本方法は、全4550個のシーケンスを使用する。まず第一に、単一のアミノ酸及びジペプチドモチーフOO、ジペプチドモチーフOXO及びジペプチドモチーフOXXOの頻度及び/又は分布は、マイクロソフトエクセル4.0を使用して決定された（O、20個の天然L-アミノ酸の一つ；X、任意の残基）。第二に、アミノ酸の特性（疎水性、電荷など）は、分析に含まれている。第三に、全てのこのデータは、トップ10～50個のリード分子の活性を最適化するために使用される。このことは、活性を阻害しかつ結合活性を改善する構成ブロックを含む構成ブロックの置換によりおこなわれる。

10

#### 【0043】

本シーケンス分析は方法は、ライブラリーの全てのシーケンスパートのモチーフ分析を通じてリード分子の活性を改善する。

#### 【0044】

20

置換分析（実施例1, 2, 3, 4, 5, 6で使用される）

置換分析において、各ポジションが他の19個の天然L-アミノ酸の各々により置換されているところのリードペプチドの置換類似体の完全なシリーズの結合活性は、詳細に研究される。加えて、該20個のアミノ酸ならびに他の利用できる非天然アミノ酸を使用することが可能である。改善された結合を生じる置換は、構成ブロックの新しいシーケンスへと結合される。これらの新しいシーケンスは、再び二番目の置換分析で試験される。必要ならば、置換分析のより多いラウンド数がおこなわれる。置換分析の各ラウンド数の後に、抗体（又は他の溶解性レセプター）濃度は最大の結合活性を得るために低下され得る（例えば、実施例1に見られるように、置換分析の二ラウンド目の後に、100 µg/ml ~ 0.01 µg/ml）。

30

#### 【0045】

文献

Churchill M.E.A., Stura E.A., Pinilla C., Appel J.R., Houghten R.A., Kono D.H., Balderas R.S., Fieser G.G., Schulze-Gahmen U. とWilson I.A. (1994年)。抗インフルエンザペプチド抗体Fab 26/9のペプチドコンプレックスの結晶構造。J. Mol. Biol. 241巻、534-556頁。

Rini J.M., Schulze-Gahmen U. とWilson I.A. (1992年)。抗体-抗原相互作用のためのメカニズムとして誘導された適合のための構造的な証拠。Science、255巻、959-965頁。

Slootstra J.W., De Geus P., Haas H. Verrips, C.T. とMeloan R.H. (1995年a)。甘味テイストタンパク質 タウマチンの可能な活性部位。Chemical Senses 20巻、535-543頁

40

Slootstra J.W., Puijk W.C. Ligtoet G.J., Langeveld J.P.M.とMeloan R.H. (1995年b)。小さいランダムペプチドライブラリーを通じて、現される抗体-抗原相互作用の構造的局面。Molecular Diversity 1巻、87-96頁。

Slootstra J.W., Kuperus D., Pluckthun, A. とMeloan R.H. (1996年)。抗FLAGモノクローナル抗体M1, M2及びM5のための特異的な及び選択的な認識特性を有する新しい標識シーケンスの同定。Molecular Diversity 2巻、156-164頁。

Slootstra J.W., Puijk W.C. Ligtoet G.J., Kuperus D., W.M.M. Schaaper とMeloan R.H. (1997年)。ランダムなペプチドの小さいセットのスクリーニング：模擬エピトープであるペプチドを同定するための新しいストラテジー。J. Mol. Recog. 10巻、219-224頁。

50

Wilson I.A., Niman H.L., Houhten R.A., Cherenson A.R., Connolly M.L. と Lerner R.A. (1984年)。タンパク質中の抗原決定基の構造。Cell 37巻、768-778頁。

【0046】

実施例の注意

10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ などは、抗体濃度を意味している。

言葉「改善されたポジション - 01」などは、アミノ酸（下線が引かれている）中のこの変化が、与えられた抗体濃度でペプスキャン E L I S A において結合活性を改善することを意味する。改善され得なかったポジションは、述べられていない（例えば、実施例 - 1の最初の置換ネットにおけるポジション - 08。すなわち、ポジション - 8におけるオリジナル I が最も高い活性を与える）。

10

【0047】

実施例 1

タイトル：4550個のランダムなドデカペプチドから選択されたリードペプチドによるエピトープの同定（モチーフ X X C X X X X X C X X を有するミニペプスキャンライブラリー、X、ランダムに選択されたアミノ酸、「材料及び方法」参照）。

【0048】

道具：リードペプチド G C G A A M N I R C Y A

【0049】

方法：置換分析の2ラウンド

【0050】

結果：実施例 - 1で、リードペプチド C G C A A M N I R C Y A は、第3番目及び第10番目のポジションがシステインで保持されている（上記、「材料及び方法」を参照）ランダムなライブラリーから誘導された（抗体 26 / 9 を用いて）。ランダムなペプチド C G C A A M N I R C Y A の全ての可能な単一置換同族体は、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で抗体 26 / 9 を結合することに関してペプスキャン中で試験された。以下に、これらの結果が詳細に記載されている。

20

【0051】

リードペプチド C G C A A M N I R C Y A の置換分析は、いかなる他の構成ブロック（例えば、Y 及び A）により置換され得ない構成ブロックの同定、及び1又は2個の他の構成ブロック（例えば、N）により置換され得る残基の同定及び多くの他の構成ブロック（例えば、M）により置換され得る残基を生じる。いくつかの置換は、結合活性を相当に改善する（例えば、N を D へ）。

30

【0052】

全てのこれらの置換は、改善されたペプチド E M D E E E D I M N Y A を設計するために使用された。このペプチドは、より低い濃度で抗体 26 / 9 を結合する、すなわち改善された結合活性を有する（C G C A A M N I R C Y A には 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  及び E M D E E E D I M N Y A には 1 . 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）ことに注目しなさい。

【0053】

ペプチド E M D E E E D I M N Y A は、2ラウンドの置換分析を通じて実行された。再びいくつかの置換は、結合活性を相当に改善する。これらの置換は、改善されたペプチド E M D E E E D V P D Y A を設計するために使用された。E M D E E E D I M N Y A の最初の部分、すなわち E M D E E E は重大な残基を含まないが、後半部分、D I M N Y A は重大な残基を含むことが重要である。この後半部分における改善された残基の組み合わせは、シーケンス D V P D Y A を生じる。シーケンス D V P D Y A は、抗体 26 / 9 の直線エピトープと同一である。このように、数千のランダムなドデカペプチドから得られたリードペプチド C G C A A M N I R C Y A は、2ラウンドの置換分析を通じて天然のエピトープシーケンスに変化される。

40

【0054】

## 置換分析 -I

オリジナルリード :	CGCAAMNIRCYA	
	$\geq 100.0 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -01:	EGCAAMNIRCYA	
	$\geq 10.0 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -02:	CMCAAMNIRCYA	
	$\geq 10.0 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -03:	CGDAAMNIRCYA	10
	$\geq 10.0 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -04:	CGCEAMNIRCYA	
	$\geq 10.0 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -05:	CGCAEMNIRCYA	
	$\geq 10.0 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -06:	CGCAAENIRCYA	
	$\geq 10.0 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -07:	CGCAAMD <del>I</del> IRCYA	20
	$\geq 10.0 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -09:	CGCAAMNIMCYA	
	$\geq 10.0 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -10:	CGCAAMNIRN <del>Y</del> A	
	$\geq 10.0 \mu\text{g/ml}$	に活性
組み合わせ改良 :	EMDEEEDIMN <del>Y</del> A	
	$\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$	に活性

10

20

30

## 置換分析 II

組み合わせ置換分析 I:	EMDEEEDIMN <del>Y</del> A	
	$\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -08:	EMDEEEDVMN <del>Y</del> A	
	$\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -09:	EMDEEEDIPN <del>Y</del> A	
	$\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション -10:	EMDEEEDIMD <del>Y</del> A	
	$\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$	に活性
組み合わせ改良 :	EMDEEEDV <del>P</del> D <del>Y</del> A	
	$\geq 0.01 \mu\text{g/ml}$	に活性

40

## 【 0 0 5 5 】

注記：シーケンス D V P D Y A は、オリジナルエピトープである。ペプチド E M D E E E D V P D Y A は、天然のエピトープペプチド Y P Y D V P D Y A S L R S を越える 10 倍の改善された結合アフィニティー（溶液中）を有する。

50

【 0 0 5 6 】

実施例 2

タイトル： 4 5 5 0 個のランダムなドデカペプチド（ランダムミニペプスキャンライブラリー）から選択されたリードペプチドによるミモトープの同定。

【 0 0 5 7 】

道具：リードペプチド A N W P S A I G A F G L

【 0 0 5 8 】

方法：置換分析の 3 ラウンド

【 0 0 5 9 】

結果：実施例 2 では、リードペプチドはランダムミニペプスキャンライブラリーにより同定された。実施例 1 と実施例 2 の違いは、実施例 1 で使用された抗体は直線のエピトープを結合するが、実施例 2 で使用される抗体は非直線のエピトープを結合することである。下記の複数の置換分析が、実施例 1 で検討されたようにおこなわれた。同定されたミモトープは、天然タンパク質の直線シーケンスのいかなる部位にも似ていなかった。

10

【 0 0 6 0 】

## 置換分析 -I

オリジナルリード : ANWPSAIGAFGL  
 $\geq 10.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -01: HNWPSAIGAFGL  
 $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -02: AWWPSAIGAFGL  
 $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -03: ANAPSAIGAFGL  
 $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -04: ANWSSAIGAFGL  
 $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -11: ANWSSAIGAFKL  
 $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

組み合わせ改良 : HWASSAIGAFKL  
 $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

10

20

## 置換分析 -II

組み合わせ置換分析 I: HWASSAIGAFKL  
 $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -01: KWASSAIGAFKL  
 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -02: HYASSAIGAFKL  
 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -03: HWGSSAIGAFKL  
 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -07: HWASSAMGAFKL  
 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性

組み合わせ改良 : KYGSSAMGAFKL  
 $\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$  に活性

30

## 置換分析 -III

組み合わせ置換分析 II: KYGSSAMGAFKL  
 $\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -03: KYFSSAMGAFKL  
 $\geq 0.05 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -06: KYGSSGMGAFKL  
 $\geq 0.05 \mu\text{g/ml}$  に活性

組み合わせ改良 : KYFSSGMGAFKL  
 $\geq 0.01 \mu\text{g/ml}$  に活性

40

50

## 【 0 0 6 1 】

## 実施例 3

タイトル：1,000,000個より大きいランダムなヘキサペプチドからなるファージディスプレイライブラリーから誘導されたリードによるミモトープの同定。

## 【 0 0 6 2 】

道具：リードペプチド S D T R K G \*

## 【 0 0 6 3 】

方法：システイン / グリシンで S D T R K G の左側及び右側を長くし、引き続き 3 ラウンドの置換分析。

## 【 0 0 6 4 】

結果：実施例 3 では、リードペプチドはファージディスプレイにより同定された。隣接したシステイン / グリシンは、結合活性を改善するために添加された。活性が得られた後、複数の置換分析が実施例 1 で検討された様におこなわれた。

## 【 0 0 6 5 】

システイン / グリシンにより長くすること：

ファージディスプレイリード： SDTRKG

10.0  $\mu$ g/ml に活性なし

長くされたリード：

CSDTRKGC

$\geq 10.0$   $\mu$ g/ml に活性

長くされたリード：

CSDTRKGCG

$\geq 10.0$   $\mu$ g/ml に活性

置換分析 -I

長くされたリード：

CSDTRKGCG

$\geq 10.0$   $\mu$ g/ml に活性

改善されたポジション -02：

CTDTRKGCG

$\geq 5.0$   $\mu$ g/ml に活性

改善されたポジション -03：

CSETRKGCG

$\geq 5.0$   $\mu$ g/ml に活性

改善されたポジション -05：

CSDTHKGCG

$\geq 5.0$   $\mu$ g/ml に活性

改善されたポジション -06：

CSDTRYGCG

$\geq 5.0$   $\mu$ g/ml に活性

組み合わせ改良：

CTETHGCG

$\geq 1.0$   $\mu$ g/ml に活性

10

20

30

40

## 置換分析 -II

組み合わせ置換分析 I: CTETHYGCG  
 $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -02: CYETHYGCG  
 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -05: CTETKYGCG  
 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -06: CTETHFGCG  
 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性

組み合わせ改良: CYETKFGCG  
 $\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$  に活性

10

## 置換分析 -III

組み合わせ置換分析 II: CYETKFGCG  
 $\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -01: DYETKFGCG  
 $\geq 0.05 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション -08: CYETKFGNG  
 $\geq 0.05 \mu\text{g/ml}$  に活性

組み合わせ改良: DYETKFGNG  
 $\geq 0.01 \mu\text{g/ml}$  に活性

20

## 【0066】

\*、このリードペプチドは、合成ペプチドとして、活性ではない（ELISA（ペプスキャン又は標準）において、また溶液中において）。このことは、特有ではない。しばしば、ファージ - ペプチドは、ファージ - コートタンパク質の一部としてのみ活性である。他のフォーマットでは、それらはその活性を失う。

30

## 【0067】

## 実施例 4

タイトル：標準のペプスキャン分析から誘導されたリードによるミモトープの同定。

## 【0068】

道具：リードペプチド RVMIKLILVNFR\* 及び天然のタンパク質の完全なシーケンス（使用された部分は、K I Y R V M I K L I L V N F R M Q P である）。

## 【0069】

方法：2 ラウンドの置換分析、引き続き左側及び右側へ長くすること、再び、2 ラウンド以上の置換分析、最終的に引き続き 18 マーミモトープへと長くすること。

40

## 【0070】

結果：実施例 4 では、リードペプチドは標準のペプスキャン分析により同定された。すなわち、抗体はタンパク質の直線シーケンスをカバーするすべての重複する 12 マーについて試験された。下記の 2 ラウンドの置換分析は、実施例 1 に記載されたようにおこなわれた。加えて、ミモトープは、追加の置換分析により、左側及び右側へ長くされた（3 個のアミノ酸、これはさらに長くされてもよい）。

## 【0071】

## 置換分析 -I

オリジナルリード：

RVMIKLILVNFR

 $\geq 10.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション-01：

AVMIKLILVNFR $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション-02：

AIMIKLILVNFR $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション-03：

AVPIKLILVNFR $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション-08：

AVMIKLIRVNFR $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション-11：

AVMIKLILVNR $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

組み合わせ改良：

AIPIKLIRVNR $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

10

20

## 置換分析 -II

組み合わせ置換分析 I：

AIPIKLIRVNR $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション-01：

YIPIKLIRVNR $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性

改善されたポジション-02：

APPIKLIRVNR $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性

組み合わせ改良：

YPPIKLIRVNR $\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$  に活性

30



天然のシーケンスで長くすること：

組み合わせ置換分析II： YPPIKLIIRVNYR

≥ 0.1 μg/ml に活性

長くされた左：

KIYYPPPIKLIIRV

≥ 1.0 μg/ml に活性

長くされた右：

IKLIIRVNYRMPQ

≥ 1.0 μg/ml に活性

## 左を長くされたペプチドの置換分析－Ⅲ：

長くされた左：	KIYYPPIKLIRV ≥ 1.0 μg/ml に活性
改善されたポジション -01：	<u>R</u> IYYPPIKLIRV ≥ 0.5 μg/ml に活性
改善されたポジション -02：	K <u>P</u> YYPPIKLIRV ≥ 0.5 μg/ml に活性
改善されたポジション -03：	KI <u>W</u> YPPIKLIRV ≥ 0.5 μg/ml に活性
改善されたポジション -08：	KIYYPPIS <u>L</u> IRV ≥ 0.5 μg/ml に活性
組み合わせ改良：	<u>R</u> P <u>W</u> YPPIS <u>L</u> IRV ≥ 0.1 μg/ml に活性

10

## 右を長くされたペプチドの置換分析－Ⅳ：

長くされた右：	IKLIRVNYRMQP ≥ 1.0 μg/ml に活性
改善されたポジション -10：	IKLIRVNYR <u>C</u> QP ≥ 0.5 μg/ml に活性
改善されたポジション -11：	IKLIRVNYRME <u>P</u> ≥ 0.5 μg/ml に活性
改善されたポジション -12：	IKLIRVNYRMQ <u>N</u> ≥ 0.5 μg/ml に活性
組み合わせ改良：	IKLIRVNYRC <u>E</u> N ≥ 0.1 μg/ml に活性
組み合わせ全体：	RPWYPPISLIRVNYRCEN ≥ 0.01 μg/ml に活性

20

30

## 【 0 0 7 2 】

\*, リードペプチドは、タンパク質の直線シーケンスをカバーする全ての重複する 12 マーからなるライブラリーから同定される。このことは、隣接したアミノ酸で左側及び右側へペプチドを長くすることを可能にする（この場合、左側に K I Y 及び右側に M Q P）。12 マーの付加的な置換分析（シーケンスの左側へ 3 個又は右側へ 3 個シフトした）は、18 マーミモトープを最終的に生じる。

40

## 【 0 0 7 3 】

## 実施例 5

タイトル：4550 個のランダムなドデカペプチド（ランダムミニペプスキャンライブラリー）から選択された 1 セットの類似したリードによるミモトープの同定。

## 【 0 0 7 4 】

道具：6 個のリードペプチド QNNMKLF RGCVP, RGIKWNE MTDQW, KLLQQNP TFYPPV, TNNCKEFAGIVP, RGILTNI MKDQW, I V

50

Q N N P K F F R G A (潜在的に全 4 5 5 0 個のペプチドまで, 「材料及び方法」参照, この場合また, 「ネガティブ」アミノ酸もリードから除かれる)。

【 0 0 7 5 】

方法: 共通シーケンスの決定、引き続き共通シーケンスの 2 ラウンドの置換分析。

【 0 0 7 6 】

結果: 実施例 5 では、類似のリードペプチドの 1 セットが共通シーケンスを同定するために使用された。共通シーケンスは、材料及び方法で検討されたように同定された。このシーケンスは、置換分析で使用された。

【 0 0 7 7 】

リードペプチドの配列：

QNNMKLFRGCVP  
 RGIKWNEMTDQ  
 KLQONPTFYPPV  
 TNNCKEFAGIVP  
 RGILTNIMKDQ  
IVQNNPKFFRGA

10

共通：ILQNNMKDFRG

置換分析 -I

共通リード：ILQNNMKDFRG  
 $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$  に活性  
 改善されたポジション -03：ILTNNMKDFRG  
 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性  
 改善されたポジション -07：ILQNNMPDFRG  
 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性  
 改善されたポジション -10：ILQNNMKDWRG  
 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  に活性  
 組み合わせ改良：ILTNNMPDWRG  
 $\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$  に活性

20

置換分析 -II

組み合わせ置換分析 I：ILTNNMPDWRG  
 $\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$  に活性  
 改善されたポジション -07：ILTNNMGDWRG  
 $\geq 0.05 \mu\text{g/ml}$  に活性  
 改善されたポジション -11：ILTNNMPDWYG  
 $\geq 0.05 \mu\text{g/ml}$  に活性  
 組み合わせ改良：ILTNNMGDWYG  
 $\geq 0.01 \mu\text{g/ml}$  に活性

30

40

【 0 0 7 8 】

実施例 6

タイトル：1,000,000個を超えるランダムなヘキサペプチドからなるファージ - ディスプレイライブラリーから選択された1セットの種々のリードによるミモトープの同定。

【 0 0 7 9 】

50

道具：3個のリードペプチドのセット（ANWPSA，KLITRW，NVCSWS）。

【0080】

方法：2ラウンドの置換分析（各リードペプチドについて）、引き続き共通シーケンス全体の決定。

【0081】

結果：実施例6では、種々のリードペプチドが共通シーケンスを同定するために使用された。各リードペプチドは、複数の置換分析（2ラウンド）に使用された。改善された活性を有する長くされたミモトープを生じた得られた結果である3個のミモトープが配列された。

【0082】

10

#### 置換分析 -IA

オリジナルリード：	ANWPSA	：	≥10.0	μg/ml	に活性
改善されたポジション-01：	<u>H</u> NWPSA	：	≥ 5.0	μg/ml	に活性
改善されたポジション-02：	A <u>W</u> PSA	：	≥ 5.0	μg/ml	に活性
改善されたポジション-03：	AN <u>A</u> PSA	：	≥ 5.0	μg/ml	に活性
改善されたポジション-04：	ANW <u>S</u> SA	：	≥ 5.0	μg/ml	に活性
組み合わせ改良：	<u>H</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>A</u>	：	≥ 1.0	μg/ml	に活性

20

#### 置換分析 -IIA

組み合わせ置換分析 IA	：	HWASSA	：	≥ 1.0	μg/ml	に活性
改善されたポジション-05：		HWAS <u>P</u> A	：	≥ 0.5	μg/ml	に活性
組み合わせ改良：		HWAS <u>P</u> A	：	≥ 0.5	μg/ml	に活性

#### 置換分析 -IB

オリジナルリード：	KLITRW	：	≥10.0	μg/ml	に活性
改善されたポジション-01：	<u>S</u> LITRW	：	≥ 5.0	μg/ml	に活性
改善されたポジション-02：	K <u>S</u> ITRW	：	≥ 5.0	μg/ml	に活性
改善されたポジション-03：	KL <u>A</u> TRW	：	≥ 5.0	μg/ml	に活性
改善されたポジション-06：	KLIT <u>R</u> <u>Y</u>	：	≥ 5.0	μg/ml	に活性
組み合わせ改良：	<u>S</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>Y</u>	：	≥ 1.0	μg/ml	に活性

30

#### 置換分析 -IIB

組み合わせ置換分析 IB	：	SSATRY	：	≥ 1.0	μg/ml	に活性
改善されたポジション-02：		S <u>P</u> ATRY	：	≥ 0.5	μg/ml	に活性
組み合わせ改良：		S <u>P</u> ATRY	：	≥ 0.5	μg/ml	に活性

40

## 置換分析 -IC

オリジナルリード:	NVCSWS	:	$\geq 10.0$	$\mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション-02:	NICSWS	:	$\geq 5.0$	$\mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション-04:	NVCHWS	:	$\geq 5.0$	$\mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション-06:	NVCSWA	:	$\geq 5.0$	$\mu\text{g/ml}$	に活性
組み合わせ改良:	NICHWA	:	$\geq 1.0$	$\mu\text{g/ml}$	に活性

10

## 置換分析 -IIC

組み合わせ置換分析 IC	:	NICHWA	:	$\geq 1.0$	$\mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション-01:		YICHWA	:	$\geq 0.5$	$\mu\text{g/ml}$	に活性
改善されたポジション-02:		NVCHWA	:	$\geq 0.5$	$\mu\text{g/ml}$	に活性
組み合わせ改良:		YVCHWA	:	$\geq 0.1$	$\mu\text{g/ml}$	に活性

配列 組み合わせ改良 IIA, IIB and IIC:

20

組み合わせ改良 1:	HWASPA
組み合わせ改良 2:	SPATRY
組み合わせ改良 3:	YVCHWA
共通:	YVCHWASSATRY
	$0.01 \mu\text{g/ml}$ に活性

30

---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**G 0 1 N 37/00 (2006.01)** G 0 1 N 33/68 Z N A  
 G 0 1 N 37/00 1 0 3

(56)参考文献 特表昭 6 1 - 5 0 2 8 3 9 ( J P , A )  
 特開平 0 9 - 1 8 3 7 9 6 ( J P , A )  
 H. Saskia de Koster et al. , The use of dedicated peptide libraries permits the discovery of high affinity binding peptides , Journal of Immunological Methods , Elsevier Science B. V. , 1 9 9 5 年 1 1 月 1 6 日 , Vol.187, No.1 , 179-188

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 G01N 33/48 - G01N 33/98  
 G01N 33/15  
 G01N 37/00  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
 PubMed