

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-529482

(P2008-529482A)

(43) 公表日 平成20年8月7日(2008. 8. 7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00 A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/22 (2006.01)	C 0 7 K 16/22 Z N A	4 B 0 2 9
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 B 0 6 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-552076 (P2007-552076)	(71) 出願人	503136174
(86) (22) 出願日	平成18年1月24日 (2006. 1. 24)		ペプスキャン システムズ ベー. フェー
(85) 翻訳文提出日	平成19年9月25日 (2007. 9. 25)		.
(86) 国際出願番号	PCT/NL2006/000036		PEPSCAN SYSTEMS B. V
(87) 国際公開番号	W02006/078161		.
(87) 国際公開日	平成18年7月27日 (2006. 7. 27)		オランダ国 レーリストット エデルヘル
(31) 優先権主張番号	05075174.2		トウェフ 15
(32) 優先日	平成17年1月24日 (2005. 1. 24)		Edelhertweg 15, Lely
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		stad, the Netherland
(31) 優先権主張番号	05077896.2		s
(32) 優先日	平成17年12月16日 (2005.12.16)	(74) 代理人	100075557
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 西教 圭一郎
		(74) 代理人	100072235
			弁理士 杉山 毅至
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 結合化合物、免疫原性化合物およびペプチド模倣体

(57) 【要約】

本発明は、注目する免疫原性化合物および/または結合化合物の存在および/または同定に関して試験するのに適した化合物の生産手段および方法を提供する。免疫原性化合物および組成物も、シスチン - ノットファミリの構成員のペプチド模倣体として、ここで提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫原性化合物および／または結合化合物の存在および／または同定に関する試験に適した化合物の生産方法であって、

少なくとも 1 つのたんぱく性分子の一次配列内の少なくとも 1 つのアミノ酸残基を選択する工程であって、選択されるアミノ酸残基が、他の選択されたアミノ酸残基があれば、そのアミノ酸残基から少なくとも 2 アミノ酸残基離れて位置するように、少なくとも 1 つのアミノ酸残基を選択する工程と、

少なくとも 1 つの選択されたアミノ酸残基の少なくとも 1 つのフランキング配列であって、前記少なくとも 1 つのたんぱく性分子の N-末端および／または C-末端の方向に位置し、2～48 アミノ酸残基の長さを有するフランキング配列を選択する工程と、

10

前記フランキング配列の少なくとも 1 つ、および足場と反応することができる少なくとも 2 つの基を含むペプチドであって、最小で 4 アミノ酸残基、最大で 50 アミノ酸残基の長さを有するペプチドを生産する工程と、

連続結合の形成を促進する結合の形成であって、ペプチドと足場との間の少なくとも 2 つの結合の形成のために、前記ペプチドを前記足場に接触させる工程とを含む方法。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つのたんぱく性分子の一次配列内の少なくとも 2 つのアミノ酸残基が、選択されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 3】

前記ペプチドが前記フランキング配列の少なくとも 2 つを含むことを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記ペプチドが、第 1 に選択されるアミノ酸残基のフランキング配列、および第 2 に選択されるアミノ酸残基のフランキング配列を含むことを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記ペプチドが、最大で 25 アミノ酸残基の長さを有することを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つのたんぱく性分子の一次配列内で選択される前記アミノ酸残基の少なくとも 1 つが、システイン残基であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記フランキング配列の少なくとも 1 つにおける少なくとも 1 つのシステインが、別のアミノ酸残基によって置換されることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

足場と反応することができる前記少なくとも 2 つの基が、同一であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 9】

足場と反応することができる前記少なくとも 2 つの基が、システイン残基であることを特徴とする請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記足場が、(ヘテロ)芳香族分子を含むことを特徴とする請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記足場が、ハロメチルアレーンを含むことを特徴とする請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

50

前記足場が、ビス(プロモメチル)ベンゼン、トリス(プロモメチル)ベンゼン、テトラ(プロモメチル)ベンゼン、またはそれらの誘導体を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記ペプチドの最初および最後のアミノ酸残基が、システインであることを特徴とする請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記ペプチドが、式 $C(X)_x C(X)_y$ または $C(X)_y C(X)_x$ を含み、 C がシステイン残基であり、 $(X)_x$ が前記フランキング配列の少なくとも 1 つを表し、 $(X)_y$ が前記少なくとも 1 つのたんぱく性分子に由来するあらゆる配列を表すことを特徴とする請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

C がシステイン残基であり、 $(X)_x$ および $(X)_y$ がそれぞれ前記フランキング配列の少なくとも 1 つを表すことを特徴とする請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ペプチドが、少なくとも 3 つのシステイン残基、および前記フランキング配列の少なくとも 2 つを含むことを特徴とする請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記ペプチドが、式 $C(X)_x C(X)_y C$ または $C(X)_y C(X)_x C$ を含み、 C がシステイン残基であり、 $(X)_x$ が前記フランキング配列の少なくとも 1 つを表し、 $(X)_y$ が前記少なくとも 1 つのたんぱく性分子に由来するあらゆる配列を表すことを特徴とする請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

$(X)_x$ および $(X)_y$ が、それぞれ前記フランキング配列の少なくとも 1 つを表すことを特徴とする請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ペプチドが、化学式 $C(X)_x C(G)_n C(X)_y C$ または $C(X)_y C(G)_n C(X)_x C$ を含み、 C がシステイン残基であり、 $(G)_n$ がスペースを表し、 $(X)_x$ が前記フランキング配列の少なくとも 1 つを表し、 $(X)_y$ が前記少なくとも 1 つのたんぱく性分子に由来するあらゆる配列を表すことを特徴とする請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 2 0】

$(X)_x$ および $(X)_y$ が、それぞれ前記フランキング配列の少なくとも 1 つを表すことを特徴とする請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

前記ペプチドが、化学式 $C(X)_x C(X)_m (G)_n (X)_p C(X)_y C$ を含み、 C がシステイン残基であり、 $(G)_n$ がスペースを表し、 $(X)_x$ 、 $(X)_m$ 、 $(X)_p$ および $(X)_y$ がそれぞれ前記フランキング配列の少なくとも 1 つを表すことを特徴とする請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記ペプチドが、化学式 $C(X)_m (G)_n (X)_p C(X)_q (G)_r (X)_s C(X)_t (G)_u (X)_v C$ を含み、 C はシステイン残基であり、 $(G)_n$ 、 $(G)_r$ および $(G)_q$ がスペースを表し、 $(X)_m$ 、 $(X)_p$ 、 $(X)_q$ 、 $(X)_s$ 、 $(X)_t$ および $(X)_v$ がそれぞれ前記フランキング配列の少なくとも 1 つを表すことを特徴とする請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 2 3】

前記たんぱく性分子が、システイン-ノットファミリー、膜貫通たんぱく、TNF-アルファ、HGF-SF、FGF-ベータ、インターロイキン、IL-5、ケモカイン、Gたんぱく結合受容体、CCR4、CXCR5、IGF、LMF、エンドセリン-1、VIP、CGRP、PIF、EGF、TGF-アルファ、EGFRファミリー、HER1、HER2/neu、HER3、HER4、p53、コルチコトロピンRF、ACTH、副甲状腺ホルモン、CCK、サブスタンスP、NPY、GRP、ニューロトロフィン、アンジオテン

50

シン-2、アンジオジェニン、アンジオポイエチン、ニューロテンシン、SLC LC、SARS-由来たんぱく、HIV-由来たんぱく、パピローマウイルス-由来たんぱくおよびFMDVから成る群から選択されることを特徴とする請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記少なくとも1つのアミノ酸残基が、前記少なくとも1つのたんぱく性分子の表面露出領域から選択されることを特徴とする請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

前記少なくとも1つのアミノ酸残基が、少なくとも1つの膜貫通たんぱくの配列であって、細胞外ドメイン、前記少なくとも1つの膜貫通たんぱくのN-末端の方向に位置する3つのフランキングアミノ酸残基、および前記少なくとも1つの膜貫通たんぱくのC-末端の方向に位置する3つのフランキングアミノ酸残基を含む配列から、選択されることを特徴とする請求項1～24のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項26】

少なくとも2つのアミノ酸残基が、前記少なくとも1つのたんぱく性分子のSS-架橋配列から選択されることを特徴とする請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

前記SS-架橋の2つのシステインが、位置xおよび(x+n)に位置し、 $n > 21$ であり、前記アミノ酸残基が、アミノ酸位置 $x + [(n - 20) / 2]$ にて開始し、アミノ酸位置 $x + [(n + 20) / 2]$ にて終了する前記SS-架橋配列の領域から、選択されることを特徴とする請求項26記載の方法。

20

【請求項28】

異なる長さの少なくとも2つのペプチドを生産する工程を含むことを特徴とする請求項1～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

前記ペプチドが、溶液中で前記足場にカップリングされることを特徴とする請求項1～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

免疫原性化合物および/または結合化合物の存在および/または同定に関するスクリーニング方法であって、

30

請求項1～29のいずれか1項に記載の方法によって、異なるペプチドを含む複数の化合物を生産する工程と、

前記化合物の少なくとも1つが、前記少なくとも1つのたんぱく性分子に特異的な抗体、その機能部分、誘導体もしくは類似体、または、前記少なくとも1つのたんぱく性分子に特異的なT細胞、その機能部分、誘導体もしくは類似体に、特異的に結合することができるかを試験する工程とを含む方法。

【請求項31】

免疫原性化合物の存在および/または同定に関するスクリーニング方法であって、

請求項1～29のいずれか1項に記載の方法によって、異なるペプチドを含む複数の化合物を生産する工程と、

40

前記化合物の少なくとも1つが、ヒトでない動物において免疫応答を誘導することができるかを試験する工程とを含む方法。

【請求項32】

注目する免疫原性化合物および/または結合化合物を選択する工程を、さらに含むことを特徴とする請求項30または31記載の方法。

【請求項33】

注目する免疫原性化合物および/または結合化合物を選択する工程と、

前記免疫原性化合物を特異的に結合することができる抗体もしくはT細胞、またはそれらの機能部分、誘導体および/もしくは類似体を生産する工程とを、さらに含むことを特徴とする請求項30または31記載の方法。

50

【請求項 3 4】

前記免疫原性化合物および / または結合化合物を同定する工程を、さらに含むことを特徴とする請求項 3 0 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 5】

請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法によって取得可能な免疫原性化合物および / または結合化合物。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法によって取得可能な免疫原性化合物を含むことを特徴とする免疫原性組成物。

【請求項 3 7】

請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法によって取得可能な免疫原性化合物を特異的に結合することができる、単離された抗体もしくは T 細胞、またはそれらの機能部分、誘導体および / もしくは類似体。

【請求項 3 8】

請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法によって取得可能な免疫原性化合物を含み、ならびに / または、請求項 3 7 記載の抗体もしくは T 細胞、または機能部分、誘導体および / もしくは類似体を含むことを特徴とするアレイ。

【請求項 3 9】

シスチン-ノット (成長因子) ファミリの一員のペプチド模倣体であって、前記シスチン-ノット (成長因子) ファミリ構成員のベータ-3 ヘアピン (B 3) ループのアミノ酸配列に由来するポリペプチドを含み、2つのアミノ酸残基が、足場を介して互いに付着される、ポリペプチド中の第 1 および第 2 システイン残基によって置換され、

前記第 1 足場付着システイン残基が、野生型 B 3-ループにおけるアミノ酸 C y s IV に対応する位置から p 残基 C-末端方向に位置する位置 C y s IV + p に導入され、5 p 1 2 であり、

前記第 2 足場付着システイン残基が、野生型 B 3-ループにおけるアミノ酸 C y s V に対応する位置から q 残基 N-末端方向に位置する位置 C y s V - q に導入され、4 q 1 2 であり、(p - q) は - 3, - 2, - 1, 0, 1, 2 または 3 であり、

前記ポリペプチドの長さが、位置 C y s IV + x のアミノ酸から位置 C y s V + y のアミノ酸までであり、x + y = - 1, 0, 1 または 2 の条件下で - 5 x 1 および 1 y 6 であることを特徴とするペプチド模倣体。

【請求項 4 0】

前記ポリペプチドの長さが、C y s IV + 1 から C y s V + 1 まで、C y s IV - 5 から C y s V + 6 まで、C y s IV - 3 から C y s V + 4 まで、C y s IV - 5 から C y s V + 4 まで、または C y s IV - 2 から C y s V + 4 までであり、好ましくは、前記ポリペプチドの長さが、C y s IV + 1 から C y s V + 1 まで、C y s IV - 2 から C y s V + 4 まで、または C y s IV - 5 から C y s V + 4 までであることを特徴とする請求項 3 9 記載のペプチド模倣体。

【請求項 4 1】

前記第 1 および第 2 のシステインの位置が、位置 C y s IV + 1 2 および C y s V - 1 0、C y s IV + 1 1 および C y s V - 1 0、C y s IV + 1 0 および C y s V - 8、C y s IV + 9 および C y s V - 8、C y s IV + 8 および C y s V - 6、C y s IV + 7 および C y s V - 5、C y s IV + 7 および C y s V - 6、C y s IV + 7 および C y s V - 4、C y s IV + 5 および C y s V - 4、または C y s IV + 6 および C y s V - 4 に、好ましくは、位置 C y s IV + 1 0 および C y s V - 8、C y s IV + 7 および C y s V - 6、または C y s IV + 8 および C y s V - 6 に対応することを特徴とする請求項 3 9 または 4 0 記載のペプチド模倣体。

【請求項 4 2】

前記第 1 および第 2 のシステインの位置が、位置 C y s IV + 1 0 および C y s V - 8 に対応することを特徴とする請求項 3 9 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載のペプチド模倣体。

10

20

30

40

50

【請求項 4 3】

前記足場が、(ヘテロ)芳香族分子を、好ましくは、少なくとも2つのベンジルハロゲン置換基を含む(ヘテロ)芳香族分子を、含むことを特徴とする請求項39~42のいずれか1項に記載のペプチド模倣体。

【請求項 4 4】

前記足場が、オルト-、メタ-およびパラ-ジハロキシレンならびに1,2,4,5-テトラハロジュレン、好ましくは、メタ-ジブロモキシレン(m-T2)または1,2,4,5-テトラブロモジュレン(T4)から成る群から選択されることを特徴とする請求項43記載のペプチド模倣体。

【請求項 4 5】

前記ポリペプチドの長さがCysIV+1からCysV+1までであり、前記足場がメタ-ジハロキシレン、好ましくはメタ-ジブロモキシレンであることを特徴とする請求項39~44のいずれか1項に記載のペプチド模倣体。

10

【請求項 4 6】

前記ポリペプチドの長さがCysIV-2からCysV+4までであり、前記足場が1,2,4,5-テトラハロジュレン、好ましくは、1,2,4,5-テトラブロモジュレンであることを特徴とする請求項39~44のいずれか1項に記載のペプチド模倣体。

【請求項 4 7】

シスチン-ノットたんぱくファミリーの前記構成員が、糖たんぱくホルモン-ベータ(GLHB)サブファミリー、血小板由来増殖成長因子(PDGF)サブファミリー、形質転換成長因子(TGF)サブファミリー、神経成長因子(NGF)サブファミリーまたは糖たんぱくホルモン-アルファ(GLHA)サブファミリーの一員であることを特徴とする請求項39~46のいずれか1項に記載のペプチド模倣体。

20

【請求項 4 8】

前記第1システインの位置がアミノ酸位置CysIV+10に対応し、前記第2システインの位置が位置CysV-8に対応し、好ましくは、前記ポリペプチドがGLHBサブファミリー、PDGFサブファミリーまたはTGFサブファミリーの一員のB3-ループに由来することを特徴とする請求項39~47のいずれか1項に記載のペプチド模倣体。

【請求項 4 9】

前記第1システインの位置がアミノ酸位置CysIV+8に対応し、前記第2システインの位置が位置CysV-6に対応し、好ましくは、前記ポリペプチドがGLHAサブファミリーの一員のB3-ループに由来することを特徴とする請求項39~48のいずれか1項に記載のペプチド模倣体。

30

【請求項 5 0】

前記第1システインの位置がアミノ酸位置CysIV+7に対応し、前記第2システインの位置が位置CysV-6に対応し、好ましくは、前記ポリペプチドがNGF-サブファミリーの一員のB3-ループに由来することを特徴とする請求項39~48のいずれか1項に記載のペプチド模倣体。

【請求項 5 1】

前記第1システインの位置がアミノ酸位置CysIV+8に対応し、前記第2システインの位置が位置CysV-6に対応し、前記ポリペプチドがVEGFたんぱくのB3-ループに由来することを特徴とする請求項39~50のいずれか1項に記載のペプチド模倣体。

40

【請求項 5 2】

足場m-T2に付着されるポリペプチドTFEELVYETCRVPGAHHADSLCTYPVATQAH、足場m-T4に付着されるポリペプチドKIQKTATFKELVYETCRVPGAHHADSLCTYPVATQAHAGK、足場m-T2に付着されるポリペプチドTFKCLVYETVRVPGAHHADSLYTYPVACQAH、足場m-T2に付着されるポリペプチドTFKELVYETCRVPGDAHHADSLCTYPVATQAH、足場m-T3に付着されるポリペプチドTFKELVYE

50

TCRVPGAAHHADSLCTYPVATQAH、足場m-T2に付着されるポリペプチドTFKELVYETCRVPGDAHHADKLCCTYPVATQAH、足場m-T2に付着されるポリペプチドTFKELVYETCRVPGDAHKADSLCTYPVATQAH、足場m-T2に付着されるポリペプチドESNCTMQIMRIKPHQGQHIGEMSC LQH、足場m-T2に付着されるポリペプチドEESNCTMQIMRIKPHQGQHIGEMSC LQHN、足場m-T2に付着されるポリペプチドNYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVCSYAVALS AQ、足場m-T2に付着されるポリペプチドVVANYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVCSYAVALS AQ AAL、および2つの足場m-T2に付着されるポリペプチド
 NYRDVEFESCRLPGCPRGVNPVCSYAVALS AQ

10

S
S

NYRDVRFESCRLPGCPRGVNPVCSYAVALS AQ
 から成るペプチド模倣体の群から選択されるペプチド模倣体。

【請求項53】

ポリペプチドおよび足場を用意する工程と、前記ポリペプチドの前記足場への共有結合を許容する条件下で前記ポリペプチドと前記足場とを接触させる工程とを含み、好ましくは、接触は溶液中、より好ましくは水溶液中で実行されることを特徴とする、請求項39～52のいずれか1項に記載のペプチド模倣体の作製方法。

【請求項54】

20

請求項39～52のいずれか1項に記載のペプチド模倣体を含むワクチン組成物。

【請求項55】

前記ペプチド模倣体が担体、好ましくはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)にカップリングされることを特徴とする請求項54記載のワクチン組成物。

【請求項56】

請求項39～52のいずれか1項に記載のペプチド模倣体に特異的に反応する抗体。

【請求項57】

請求項39～52のいずれか1項に記載のペプチド模倣体、または請求項56記載の抗体の、好ましくは抗癌治療における、または避妊用の、治療用分子としての使用。

30

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は結合分子の検出、同定および/または生成に関する。

【0002】

一般に生体分子である結合分子と、それらの対応するリガンドとの間の相互作用は、生命の中核である。細胞はしばしば、たとえばホルモン、ペプチド、薬物、抗原、エフェクタ分子などの別の分子と、または別の受容体分子と特異的に相互作用または結合することができる受容体分子を有しているか、または含んでおり、たとえば、酵素はその基質と結合し、抗体分子および/またはT細胞は抗原と結合し、核酸はたんぱく質と結合する。「相互作用または結合」とは、分子力の範囲内で結合分子およびリガンドが互いに接近し、互いの特性に影響を及ぼし得ることを意味する。この接近は、親密性および相互作用の程度を増大させることを含む分子認識の種々のステージに結合分子およびそのリガンドを導き、これらは、常に不可逆的であるわけではないが、結合する。

40

【0003】

結合分子は、問題となっているリガンドの認識を可能とする明確な結合部位を含むが故に、結合能力を有する。リガンドもまた、対応する結合部位を有し、2つの結合部位が本質的に空間的な相補性によって相互作用し得るときにのみ、2分子は結合することができる。言うまでもなく、分子は三次元を有し、結合部位は三次元の性質であって、しばしば

50

1つの結合部位の1つ以上の表面突出部または突起部分が他方の1つ以上のポケットまたはくぼみに対応して、ときには誘導適合変化をとめない、三次元の鍵と鍵穴配置を形成する。ときには、このような突起部分は、問題となっている分子の単ループを含み、結合部位を本質的に形成するのはこの突起部分のみである。その場合、当業者はしばしばこれらの結合部位が直線状結合部位または連続結合部位を含むと称し、問題となっている分子の直線部分のみが本質的に結合反応の原因である。この専門用語は、たとえば、抗原がたんぱく配列の一部つまり直鎖ペプチドを含んでいる抗体 - 抗原反応を記載するのに広く使用されている。当業者はしばしば、直線状エピトープつまり連続エピトープについて述べることもあり、連続エピトープでは抗原分子の結合部位（エピトープ）は連続して結合したアミノ酸のループによって形成される。しかし、類似した連続結合部位（ここではエピトープおよび結合部位は同じ意味で使われる）は、（T細胞受容体などの）受容体 - 抗原相互作用、ホルモン受容体およびそのアゴニストまたはアンタゴニストなどの受容体 - リガンド相互作用、受容体 - サイトカイン相互作用、またはたとえば酵素 - 基質相互作用もしくは受容体 - 薬物相互作用に見られ、これらの相互作用では分子の直線部分が結合部位として認識される。

10

20

30

40

50

【0004】

しかし、しばしば、そのような突起部分およびくぼみは、問題となっている分子の種々の異なる部分を含み、結合部位を本質的に形成するのは組合わされた部分である。一般に、当業者は問題となっている分子の異なる部分を含むそのような結合部位を、不連続もしくは立体配座結合部位またはエピトープと称する。たとえば、一次構造（たんぱく分子のアミノ酸配列）だけでなく二次および三次構造（分子のアルファらせんまたはベータシートへの折り畳みおよびその全体形）を、ならびにときおり四次構造（他のたんぱく分子との相互作用）さえもを有するたんぱく上にある結合部位は、一次構造内では離れており、ともに折り畳まれて結合部位内で近接するアミノ酸または短ペプチド配列を、必須の突起部分またはくぼみに含んでいる。直線状（連続）結合部位において、抗体との接触を仲介する重要なアミノ酸は、一般に、通常15アミノ酸長以下の一次構造の一部内に位置する。これらの配列全体を含むペプチドは、インタクトなたんぱくのリガンドによって示される範囲内におおよそ位置する標的たんぱくに親和性を有する。しかし、立体配座（不連続）結合部位においては、一般に重要な残基は一次構造内でしばしば離間している2つ以上の結合領域にわたって分布している。折り畳まれると、これらの結合領域は、たんぱく表面で集められて複合の結合部位を形成し得る。たとえ完全な結合部位が高い親和性の相互作用を仲介しても、重複ペプチドの直線スキャンにおいて合成されるような1つの結合領域のみを覆うペプチドは一般に、たとえば標準のELISAまたはBiacore実験において、しばしば測定され得ない非常に低い親和性を有する。

【0005】

生命において結合分子とそのリガンドとが演じる中心的役割によって、結合分子の検出、同定および/または生成への関心がますます拡大しつつある。たとえば結合部位の性質への洞察は、結合分子とそのリガンドとの結合を妨げることのできる化合物を設計できる可能性を提供する。さらに、（複合）分子の結合部位を模倣する結合分子の生成が、広範な種々の応用のために所望されている。たとえば、たんぱく性分子の結合部位を模倣するペプチドは、診断的、治療的および/または予防的利用に適している。このようなペプチドは、たとえばリガンド - 受容体対に対するアゴニストまたはアンタゴニストとしての使用に適している。

【0006】

さらに、免疫原性化合物の検出、同定および/または生成における関心がますます拡大しつつある。免疫原性化合物は、注目する抗体および/またはT細胞を得るのに特に適している。さらに、このような免疫原性化合物は宿主内の免疫応答を喚起するのに適しており、この免疫応答が、好ましくは、免疫原性化合物および/または免疫原性化合物が由来する免疫原によるその後の課題に対して、部分的なまたは完全な保護をもたらす。好ましくは、注目のたんぱく性分子によるその後の課題に対して、宿主内の部分的なまたは完全

な保護的免疫応答をもたらすことのできる免疫原性化合物が生成される。通常、このような免疫原性化合物は、注目のたんぱく性分子に完全にまたは部分的に由来するペプチド配列を含む。

【0007】

一般に、注目する結合化合物および/または免疫原性化合物のスクリーニング方法は、注目の分子を特異的に結合することができる化合物を検出するために、複数の想定される結合部位および/または免疫原性化合物の生産、ならびに、それに続く(たとえばリガンド、抗体および/またはT細胞などの)注目の分子とのインキュベーションを含む。ペプチド分野の初期研究は、たんぱくの活性アミノ酸配列またはペプチドを抗原的に検出または決定する方法に関する、国際公開第8403564号パンフレットである。いわゆるペプスキャン技術をもたらすこの研究は、複数の異なるペプチドの生産を含み、その後、合成されたペプチドがそれぞれ、問題となっている結合分子で試験される。この方法は、たんぱくまたはペプチド配列における連続結合部位および/または連続エピトープの検出を可能とする。広義にとらえたペプスキャン技術は、種々の性質の結合部位、免疫原性部位またはリガンドに本質的に相同であるか、類似しているか、模倣している(直線状ではあるが)ペプチドの試験または同定を提供する(mimotopes、Geyssenら、Mol. Immunol.、第23巻、709-715頁、1986年)。ペプスキャン技術は、迅速で容易な方法で、受容体分子、酵素、抗体などと相互作用する直線状ペプチド配列の同定を可能とし、比較的容易に、問題となっている結合分子との反応性について非常に多くのペプチドの試験を可能とする。

10

20

【0008】

しかし、ペプスキャン技術は非連続結合部位つまり立体配座結合部位の試験には適していない。さらに、ペプスキャン技術は、与えられたたんぱく性分子の一次アミノ酸配列に直接由来しないアミノ酸配列を有するペプチドであって、所望の特性を備えるものを得るには適していない。

【0009】

国際公開第0231510号パンフレットにおいて、不連続結合部位のスクリーニング方法が開示されている。分子ライブラリが生成され、試験物質を形成するために、第1セグメントが第2セグメントのごく近傍にて発見される。その後、異なるセグメントを含む種々の試験物質が、所望の結合部位の存在についてスクリーニングされる。この方法は、注目する化合物内に存在する種々の結合部位の存在についてスクリーニングするのに適している。互いにごく近傍に発見されるセグメントはランダムに合成されるか、たんぱく性分子の公知のアミノ酸配列に由来する。しかし、セグメントがランダムに合成される場合、膨大な量の試験物質を合成する必要があり、困難で時間がかかる。他方、セグメントが注目するたんぱく性分子の一次配列に直接由来する場合は、たんぱく性分子の一次アミノ酸配列に直接由来しないアミノ酸配列を有するペプチドが生産されないので、かなり限られたコレクションが得られる。

30

【0010】

本発明は、注目する結合部位および/または免疫原性部位の存在についてスクリーニングするのに適している化合物の生産方法を提供する。本発明の方法は、一方で、与えられたたんぱく性分子に少なくとも部分的に基づき、他方で、そのたんぱく性分子の一次配列(の一部)に正確に類似する配列を必ずしも含まない化合物を提供する。本発明は、結合化合物および/または免疫原性化合物を体系的に生成して、スクリーニングするために、注目するたんぱく性分子の一次配列に由来する少なくとも1つの配列が使用される方法を提供する。本発明は、注目する元々のたんぱく性分子の結合部位および/または免疫原性部位に匹敵するか、むしろ優れた特性の免疫原性化合物および/または結合化合物を生成、選択および/または同定する効果的な方法を提供する。本発明の方法の好ましい実施形態は、本実施形態が足場に結合されるペプチドを提供するので、所望の結合特性および/または免疫原性についてスクリーニングするのに特に適している。足場の使用は、遊離した直鎖ペプチドと比較して、生物学的に関連する二次構造を有するペプチドをしばしばも

40

50

たらず。さらに、本発明の好ましい足場が使用されると、ペプチドと足場との第1結合の形成がペプチドと足場との第2結合の形成を加速するという事実によって、生産されたペプチドはそれらが足場に付着される前に保護される必要がない。このような好ましい足場は選択的に官能化される必要はない。ゆえに、好ましい実施形態においては、選択されたアミノ酸配列が、煩わしい保護および脱保護手順の必要なく、足場にカップリングされるペプチドに組込まれる効果的な方法が提供される。これらのペプチドは、溶液中で、より好ましくは水溶液中で足場にカップリングされるのが好ましい。水溶液の使用は種々の利点をもたらす。たとえば、水は（たとえばDMFおよびDMSOと比較して）安価で、無毒で、凍結乾燥によって除去するのが容易である。さらに、（バッファ）塩は水に非常によく溶解し、水はまた（非常に疎水性のものを除いて）ほとんどのペプチドについて良好な溶解特性を有している。

10

【0011】

所望の結合特性および/または免疫原性を備える化合物が本発明に従う方法で選択されると、その化合物は、たとえば、免疫原性組成物の調製のための、および/または（たとえば二次、三次および/または四次構造などの）注目のたんぱく性分子の特性へのより深い洞察を得るための、ペプチド模倣体、アゴニスト、アンタゴニストとしての使用に適している。注目するたんぱく性分子内の（不連続）結合部位および/またはエピトープを同定することができるが、与えられたたんぱく性分子と比較して、少なくとも1つの改良特性、好ましくは少なくとも1つの改良免疫原性および/または結合特性を備える化合物を提供するのが好ましい。

20

【0012】

1つの側面において、本発明は、免疫原性化合物および/または結合化合物の存在および/または同定に関する試験に適した化合物の生産方法であって、

少なくとも1つのたんぱく性分子の一次配列内の少なくとも1つのアミノ酸残基を選択する工程であって、選択されるアミノ酸残基が、他の選択されたアミノ酸残基があれば、そのアミノ酸残基から好ましくは少なくとも2アミノ酸残基離れて位置するように、少なくとも1つのアミノ酸残基を選択する工程と、

少なくとも1つの選択されたアミノ酸残基の少なくとも1つのフランキング配列であって、少なくとも1つのたんぱく性分子のN-末端および/またはC-末端の方向に位置し、2～48アミノ酸残基の長さを有するフランキング配列を選択する工程と、

30

フランキング配列の少なくとも1つを含むペプチドであって、最小で4アミノ酸残基、最大で50アミノ酸残基の長さを有するペプチドを生産する工程とを含む方法を提供する。

【0013】

1つの実施形態において、フランキング配列は選択されたアミノ酸残基を含む。しかしながらこれは必須ではない。

【0014】

本発明に従う方法は、注目するたんぱく性分子に少なくとも部分的に由来する配列を含む、少なくとも1つのペプチド、好ましくは複数のペプチドの生産を含んでいる。好ましい実施形態は、（注目するたんぱく性分子に由来する）フランキング配列の系統的な「シャッフリング」を含み、注目の結合化合物および/または免疫原性化合物の存在に関してスクリーニングされるのが好ましい複数のペプチドをもたらす。フランキング配列の長さ、種類および/または量を変化させることによって、複数のペプチドが生産される。ペプチドの量およびペプチド間の差異の程度は、特定の用途に依存して任意に選ばれる。

40

【0015】

本発明に従う方法は、複数の化合物を生産し、少なくとも1つの所望の特性を備える化合物の存在に関して複数の化合物をスクリーニングするのに特に適している。複数の化合物は、所望の特性を備える化合物が生成され選択される機会を増進するために、少なくとも10、より好ましくは少なくとも100、最も好ましくは少なくとも1000の化合物を含むことが好ましい。好ましい実施形態において、複数の化合物は所望の免疫原性を備

50

える化合物の存在に関してスクリーニングされる。これは、たとえば本発明の複数の化合物を抗体および／またはＴ細胞などの結合分子とともにインキュベートし、少なくとも１つの化合物が結合分子を特異的に結合させることができるかを決定することによってなされる。

【００１６】

好ましい実施形態において、宿主において免疫応答を誘導することができる化合物が選択される。この実施形態においては、本発明の少なくとも１つの化合物がヒトではない動物に投与され、免疫応答が誘導されるかが決定される。注目するたんぱく性分子に対して向けられる免疫応答を宿主内にて誘導することができる化合物が選択されるのが最も好ましい。ゆえに、体液性および／または細胞性応答などの免疫応答を宿主内にて誘導することができる化合物が選択されるのが好ましく、免疫応答中に、化合物を特異的に結合させることができるだけでなく、注目のたんぱく性分子をも特異的に結合させることができる抗体および／またはＴ細胞が生産される。本発明の方法が、このような結合化合物および／または免疫原性化合物を生成し検出するのに、特に効果的であることがわかった。好ましい実施形態において、化合物は、ヒトではない動物に投与される前に、抗体および／またはＴ細胞などの結合分子を用いる第１スクリーニング手順中に最初に選択される。ゆえに、この実施形態に従えば、本発明に従うペプチドが最初に生体外でスクリーニングされ、その後有望な候補ペプチドの免疫原性が続いて生体内で調査される２段階手順が好ましい。

10

【００１７】

本発明の方法は、一次配列が少なくとも部分的に知られている、注目するあらゆるたんぱく性分子に応用可能である。本発明の方法が免疫原性化合物および／または結合化合物を生産するために実行される場合、たんぱく性分子の表面露出領域から少なくとも１つのアミノ酸残基を選択することが好ましい。もちろんこれは、たんぱく性分子の（二次、三次および／または四次）構造が少なくとも部分的に知られている場合にのみ可能である。しかし、本発明の方法は、少なくとも部分的に知られている構造を有するたんぱく性分子に制限されない。未知の（二次、三次および／または四次）構造のたんぱく性分子で本発明の方法を実行することも可能である。その場合、もちろん、たんぱく性分子のアミノ酸残基はランダムに選択される。ここで、アミノ酸残基を選択するとは、アミノ酸残基を考慮するという意味である。物理的に単離し、または合成する必要はない。

20

30

【００１８】

アミノ酸残基が選択されると、続いて、アミノ酸残基の少なくとも１つのフランキング配列が選択される。フランキング配列は、注目するたんぱく性分子の一次配列において、選択されたアミノ酸残基から５つ、好ましくは３つのアミノ酸残基内に位置するいくつかの連続アミノ酸残基として定義される。フランキング配列は、選択されたアミノ酸残基に直接隣接して位置するのが好ましい。ゆえに、位置 n のアミノ酸残基が選択されると、 N -末端方向に位置するフランキング配列はアミノ酸位置 $n - 1$ にて終了するのが好ましく、 C -末端方向に位置するフランキング配列はアミノ酸位置 $n + 1$ にて開始するのが好ましい。１つの実施形態においては、フランキング配列は選択されたアミノ酸残基を含む。この実施形態に従えば、 N -末端方向に位置するフランキング配列はアミノ酸位置 n にて終了し、および／または C -末端方向に位置するフランキング配列はアミノ酸位置 n にて開始する。ここで使用されるように、フランキング配列はその最も N -末端のアミノ酸残基にて「開始する」とよばれ、フランキング配列はその最も C -末端のアミノ酸残基にて「終了する」とよばれる。フランキング配列の長さは、２～４８アミノ酸残基であるのが好ましい。好ましくは、その長さは４～３０アミノ酸残基、より好ましくは４～２１アミノ酸残基である。 N -末端方向に位置する選択されたアミノ酸残基のフランキング配列の長さは、 C -末端方向に位置する選択されたアミノ酸残基のフランキング配列の長さと同じである必要はないが、これはもちろん可能である。さらに、選択されたアミノ酸残基の異なるフランキング配列を選択することが可能であり、それらのフランキング配列は N -末端および／または C -末端の方向にあり、異なる長さである。ゆえに、本発明の方法

40

50

はまた、選択されたアミノ酸残基の少なくとも2つのフランキング配列の選択を含み、それら少なくとも2つのフランキング配列は（N-末端またはC-末端の）同じ方向にある。

【0019】

少なくとも1つのフランキング配列が選択されると、フランキング配列の少なくとも1つを含むペプチドが生産される。ここで、ペプチドは、ペプチド結合を介して互いに結合した少なくとも2つの連続アミノ酸残基を含む化合物として定義される。天然のアミノ酸残基の他に、本発明のペプチドは、たとえばD-アミノ酸残基などの、非天然アミノ酸残基を含むことが可能である。フランキング配列の少なくとも1つを含む本発明のペプチドは、たとえば固相合成などの当該技術において公知のあらゆる方法を用いて生産される。ペプチドの長さは4～50アミノ酸残基である。しかし、ペプチドは6～25アミノ酸残基の長さを有するのが好ましい。なぜなら、この長さのペプチドが最適な試験結果をもたらすことが示されたからである。したがって、ペプチドが最大25アミノ酸残基の長さを有する本発明に従う方法が提供される。所望の結合化合物および/または免疫原性化合物を効率的にスクリーニングするために、異なるフランキング配列を有する複数のペプチドが合成されるのが好ましい。

10

【0020】

本発明のペプチドは、生物学的に関連する二次構造を有する化合物を得るために、足場にカップリングされるのが好ましい。さらに、足場-結合ペプチドは、溶液中で遊離するペプチドと比較して、一般により安定である。したがって、1つの実施形態は、ペプチドと足場との少なくとも1つの結合を形成するために、生産されたペプチドを足場に接触させることを含む本発明に従う方法を提供する。束縛された、生物学的に関連する構造を得るために、ペプチドと足場との間に少なくとも2つの結合が形成されるのが好ましい。特に好ましい実施形態において、本発明に従うペプチドは足場にカップリングされ、その際ペプチドと足場との間の第1結合の形成が連続結合の形成を促進する。これは、ペプチドの反応性側鎖が、ペプチドと足場との間のカップリング反応中に、保護基によって保護される必要がないという利点をもたらす。第1結合が一旦形成されると、第2結合は過多の好ましくない副産物の形成が避けられるほど十分に速く形成される。

20

【0021】

したがって、1つの側面における本発明は、免疫原性化合物および/または結合化合物の存在および/または同定に関する試験に適した化合物の生産方法であって、

30

少なくとも1つのたんぱく性分子の一次配列内の少なくとも1つのアミノ酸残基を選択する工程であって、選択されたアミノ酸残基が、他の選択されたアミノ酸残基があれば、そのアミノ酸残基から好ましくは少なくとも2つのアミノ酸残基離れて位置するように、少なくとも1つのアミノ酸残基を選択する工程と、

少なくとも1つの選択されたアミノ酸残基の少なくとも1つのフランキング配列であって、少なくとも1つのたんぱく性分子のN-末端および/またはC-末端の方向に位置し、2～48アミノ酸残基の長さを有するフランキング配列を選択する工程と、

フランキング配列の少なくとも1つおよび足場と反応することができる少なくとも2つの基を含むペプチドであって、最小で4アミノ酸残基、最大で50アミノ酸残基の長さを有するペプチドを生産する工程と、

40

結合の形成が連続結合の形成を促進する、少なくとも2つの結合をペプチドと足場との間に形成するために、ペプチドを足場に接触させる工程とを含む方法を提供する。

【0022】

生産されたペプチドは、ペプチドと足場との間に少なくとも2つの結合を形成するために、足場と接触させるのが好ましく、その際ペプチドと足場との間の結合の形成が、ペプチドと足場との間の連続結合の形成を促進する。ここで、足場は、本発明のペプチドを結合することができるあらゆる固体支持体として定義される。ペプチドが足場に結合された後は、その構造は、溶液中で遊離しているときのペプチドの構造と少なくとも部分的に異なることが好ましい。足場の使用は、生物学的に関連する二次構造を有する本発明のペプチドをもたらす。さらに、結果として生じるペプチド-足場化合物は、通常、遊離ペプチ

50

ドと比較してより安定している。足場に結合されたペプチドの固定構造は、足場-結合ペプチドがリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどの免疫原性化合物および/または結合化合物として使用されるときに、特に適していることが実証された。本発明の任意の複数のペプチドの各ペプチドは、本質的に同じ種類の足場にカップリングされ、それら複数のペプチドの個々のペプチド間での直接の比較を可能とするのが好ましい。同じ種類の足場が使用される場合、その足場およびペプチドを含む種々の化合物間の差異は、ペプチド間の差異に起因しやすい。好ましい実施形態において、本発明の複数のペプチドを含むアレイが生産され、足場に結合された各ペプチドが、多くの試験化合物の中から有望な化合物を迅速に選択することを可能とする。

【0023】

1つの実施形態において、足場と反応することができる少なくとも2つの基が同一である本発明の方法が提供される。これは、ペプチドと足場との間の少なくとも2つの結合が、同じ反応条件下で形成されるという利点をもたらす。結合を容易にするために、本発明のペプチドは少なくとも1つのSH-官能基を含むことが好ましい。より好ましい実施形態において、足場と反応することができる少なくとも2つの基は2つのSH-官能基である。ここで、SH-官能基は、スルフヒドリル基つまりチオール基(SH基)を含むペプチドの一部分(好ましくはアミノ酸残基)として定義される。しかし、他の基も可能である。さらに好ましい実施形態において、少なくとも1つのSH-官能基はシステイン残基である。最も好ましい実施形態においては、足場と反応することができる少なくとも2つの基がシステイン残基である本発明の方法が提供される。1つの実施形態において、足場と反応することができる基はペプチドの第1のアミノ酸位置およびペプチドの最後のアミノ酸位置に位置する。さらなる実施形態において、足場と反応することができ、ペプチドの第1アミノ酸位置および最後のアミノ酸位置に位置する基は、システイン残基である。したがって、1つの実施形態は、ペプチドの第1および最後のアミノ酸残基がシステインである本発明に従うペプチド製造方法を提供する。他の実施形態においては、足場と反応することができる基の少なくとも1つは、本明細書の至るところに詳細に記載されるように、ペプチド配列内に位置する。

【0024】

少なくとも1つのフランキング配列を含む本発明のペプチドは、所望の生物活性を有する安定化合物を得るために、足場にカップリングされる。原則として、あらゆる足場が適している。しかし、好ましくは、本発明のペプチドと足場との間の第1結合の形成が第2結合の形成を促進するような足場が使用される。1つの好ましい実施形態において、本発明のペプチドと足場との間の少なくとも1つの結合はチオエーテル結合を含む。さらに好ましい実施形態において、本発明のペプチドは(ヘテロ)芳香族化合物であって、好ましくは少なくとも2つのベンジル位ハロゲン置換基を含む(ヘテロ)芳香族化合物、好ましくはハロメチルアレーンにカップリングされる。好ましい実施形態において、本発明のペプチドは、ビス(プロモメチル)ベンゼン、トリス(プロモメチル)ベンゼン、テトラ(プロモメチル)ベンゼンまたはそれらの誘導体にカップリングされる。本発明に従うペプチドは、メタ-1,3-ビス(プロモメチル)ベンゼン(m-T2)、オルト-1,2-ビス(プロモメチル)ベンゼン(o-T2)、パラ-1,4-ビス(プロモメチル)ベンゼン(p-T2)、メタ-1,3-ビス(プロモメチル)ピリジン(m-P2)、2,4,6-トリス(プロモメチル)メシチレン(T3)またはメタ-1,3-ビス(プロモメチル)-5-アジドベンゼン(m-T3-N3)にカップリングされるのが最も好ましい。

【0025】

特に好ましい実施形態において、本発明に従うペプチドを足場にカップリングさせるために、国際公開第2004077062号パンフレットに従う求核置換反応が実行される。このようなカップリング反応は求核置換反応を含み、遊離型の求核官能基を有する分子が足場と反応する。好ましい実施形態において、求核官能基はチオール基つまりスルフヒドリル基を含む。チオールは飽和炭素原子上での置換に効果的な求核剤である。一般に、分子に求核官能基を備えるのは困難ではない。たとえば、ペプチドまたはペプチド模倣体

10

20

30

40

50

は、ペプチドアミノ酸配列中にシステイン残基を組み込むことによって、容易にチオール部分を有するように官能化される。

【0026】

もちろん、種々の他の求核官能基を、アルコール(-OH)またはアミン(-NH)部分を有するアミノ酸のように、同様に本発明のペプチドに組み込むことが可能である。しかし、一般にアルコールまたはアミンのカップリング反応に必要とされる化学反応は、SH-官能化ペプチドを使用する提供された方法とは対照的に、非保護ペプチドを使用することを許容しないということは強調されるべきである。したがって、本発明のペプチドは、少なくとも2つのSH-官能基、好ましくは少なくとも2つの遊離型のシステイン スルフィドリル基を含むのが好ましい。本発明に従う方法は非保護ペプチドの使用を許容しており、アミノ酸側鎖には、カップリング反応への不所望の関与を防止ための保護または処理が別になされない。ゆえに、本発明に従う方法は、本発明の本質的には非保護のペプチドを足場に接触させる工程を含むのが好ましい。重要なことには、ここに提供される非保護ペプチドを使用する方法は、無用な時間、努力および資金を省く。なぜなら、多段階の保護/脱保護工程を必要としないからである。

【0027】

好ましい実施形態において、本発明に従うペプチドは、少なくとも2つの求核置換反応によって足場にカップリングされ、ペプチドは足場分子との2つの結合を形成する少なくとも2つの遊離型求核官能基を有する。たとえば、ペプチドは、反応基の一部である、足場の2つ以上の飽和炭素原子と反応する。求核置換はまた、求核剤および脱離基が単一の分子または分子状物質の一部であるとき、分子間過程であり得る。本発明の好ましい実施形態において、足場には、少なくとも1つの分子内求核置換反応を介して、少なくとも1つの分子が提供される。分子内過程は、類似の分子間反応よりもかなり有利なエントロピーを有する。なぜなら、2つの別々の分子が一体となる必要がないからである。

【0028】

飽和炭素上で生じる求核反応の共通した特性は、その炭素原子が、炭素または水素以外の原子であるヘテロ原子にほぼ常に結合することである。さらに、そのヘテロ原子は通常炭素よりも電気陰性度が大きく、置換反応におけるいわゆる脱離基(L)でもある。脱離基は、元々その脱離基を炭素原子に結合させていた電子対とともに外れる。好ましい実施形態において、少なくとも1つのペプチドとの少なくとも2つの結合の形成を促進するために、少なくとも2つの脱離基を含む足場が使用される。脱離基が外れる容易さは基の塩基性に関連し得る。弱い塩基は、効果的に電子対を収容することができるので、通常良好な脱離基である。反応基の反応性は、脱離基の外れる傾向によって大きく左右される。反応基の反応性に幾分関係がある別の要因は、脱離基と炭素原子との間の結合強度である。なぜなら、置換が起こるためにはこの結合は破れなければならないからである。ゆえに、好ましい実施形態では、少なくとも2つの良好な脱離基を含む足場が本発明に従う方法において使用される。通常、良好な脱離基は強酸の共役塩基である。最も重要な脱離基は、pKa値が5未満の酸の共役塩基である。特に興味深い脱離基には、I⁻、Br⁻およびCl⁻などのハロゲン化物イオンが含まれる。ハロゲン化アルキルにおける炭素-ハロゲン(C-X)結合は、分極しており、炭素に部分的な正電荷が、ハロゲンに部分的な負電荷が存在する。ゆえに、炭素原子は求核剤(電子の対をもたらす試薬)による攻撃に敏感で、ハロゲンはC-X結合から2つの電子を獲得して、ハロゲン化物イオン(X⁻)として脱離する。1つの実施形態において、反応基は求核剤による攻撃に敏感な炭素原子を含み、反応基は炭素-ハロゲン結合を含む。好ましい実施形態において、反応基の少なくとも2つを含む足場が、求核剤としてのジ-SH官能化ペプチドと反応するために使用される。本発明のペプチドがハロゲン化アルカンを含む足場にカップリングされる、本発明に従う方法が提供される。ハロゲン化アルカン(ハロアルカンまたはハロゲン化アルキルとしても知られる)は、鎖の1つ以上の炭素原子に結合したハロゲン原子(フッ素、塩素、臭素またはヨウ素)を含む化合物である。ここで提供されるのは、2つのハロゲン原子を含むジハロ足場(dihaloscaffolds)、ならびに、1つ以上のループしたペプチドセグメ

10

20

30

40

50

ントから成る、配座的に束縛されたペプチド構造の合成用のトリ-およびテトラハロ足場である。通常、良好な置換基は、電気陰性であって炭素原子に極性を与え、一度離れてしまうと余剰の電子対で安定し、分極可能であって遷移状態を安定化させる。ヨウ素を除いて、すべてのハロゲンは炭素よりも電気陰性である。塩素および臭素はかなり類似した電気陰性度を有し、かなり同等に炭素との結合に極性を与える。イオン化すると、双方は非常に弱い塩基であり、2つのうちBr⁻はより弱い。臭化イオンはまた、そのより大きなサイズによって、より分極可能である。したがって、提供される方法は、有利には少なくとも2つのCl原子を含む足場を用いて、より好ましくは少なくとも1つのCl原子および少なくとも1つのBr原子を含む足場を用いて、さらに好ましくは少なくともBr原子を含む足場を用いて実行される。

10

【0029】

好ましい実施形態において、足場はアリル系を含む。アリル系においては、3つの炭素原子があり、そのうち2つは炭素-炭素二重結合を介して結合される。好ましい実施形態において、本発明に従う足場とペプチドとの結合の形成は、アリル置換反応を介して生じる。アリル置換反応とは、アリル系の位置1にて生じる置換反応をいい、二重結合は位置2と位置3との間にある。入ってくる基は脱離基と同じく原子1に付着するか、2/3から1/2への二重結合の移動を伴って、入ってくる基は相対位置3に付着する。アリル置換の反応速度は非常に速い。なぜなら、アリルカチオン反応中間体、つまり二重結合した炭素に付いた正電荷を有する炭素原子は、通常安定であるからである。これは、アリル位カチオンが2つの正確に等価な構造の共鳴混成であることによる。寄与構造のいずれかに

20

【0030】

本発明のさらなる実施形態において、炭素-酸素二重結合（つまりカルボニル基）が足場に存在する。アリル系と同様、カルボカチオンの安定化に寄与する共鳴構造を形成することができる。たとえば、足場は、C(O)-CH₂-ハロゲンの構造を有する2つ以上の反応基を含む。

30

【0031】

さらに、求核置換反応において、基質の構造は脱離基の性質と全く同様に重要な役割を果たす。たとえば、求核剤が炭素の背面を攻撃する場合、反応は脱離基がメチル基に結合されていれば妨害なく進み、水素は炭素を攻撃するのに十分な表面を残す。その炭素がより多く置換されていくと、より大きい基は、求核剤が脱離基を置換するために通らなければならない経路を妨害する。これらの理由のため、足場が少なくとも2つのハロメチル基を含むことも有利である。

【0032】

1つの実施形態において、足場は芳香族化合物またはアレーンとしても知られる共役ポリエンを含み、この共役ポリエンに少なくとも2つの反応基が備えられている。芳香族化合物は平坦で、分子平面の上および下に非局在化した環状のπ電子雲を有する。本発明に従う分子の足場は、たとえばハロメチル基のような、少なくとも2つのベンジルハロゲン置換基を含むのが好ましい。適当な例は、これに限定されないが、ジ(ハロメチル)ベンゼン、トリ(ハロメチル)ベンゼンまたはテトラ(ハロメチル)ベンゼン、およびそれらの誘導体を含む。ベンジルハロゲン置換基の利点は、芳香族化合物として知られる共役ポリエンの共鳴に関連する特別な安定性において主に追求することが可能なことである。ベンジルハロゲン原子は、求核置換反応が生じる炭素を脱離するさらに強い傾向を有する。

40

【0033】

SH-SHペプチドなどの適したペプチドの、ハロメチルベンゼン誘導体との反応を含

50

む実施形態は、非常に広い範囲のものである。反応は、少なくとも2つのハロメチル基を有する種々の芳香族化合物で、首尾よく進行する。これらの基はオルト、メタまたはパラ位のいずれかに位置することができる。前述の分子内触媒効果は、各カップリング様式に関して異なる。なぜなら、通常、パラおよびメタ-シクロファンはオルト-シクロファンよりも歪んでいるからである。少なくとも1つのループしたペプチド構造を有する足場の合成のために、オルト、メタまたはパラ-位に少なくとも2つのハロメチル基を有する他のすべての(ヘテロ)芳香族化合物も提供される。

【0034】

本発明に従う方法における使用に適した分子足場はまた、より小さい、またはより大きい環構造の多環芳香族化合物を含む。しかし、本発明に従う方法における使用のための足場は、炭化水素に限定されない。反対に、提供される方法はまた、ヘテロ環芳香族足場 - 環構造中の炭素以外に少なくとも1つの原子、通常窒素、酸素または硫黄、を有する環状分子 - を使用しても、適切に実行される。例には、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、ピラゾール、3-ピロリン、ピリジン、ピリミジン、およびそれらの誘導体が含まれる。ヘテロ環芳香族足場は少なくとも2つのハロメチル基を含むものが好ましいが、これに限定されない。好ましい足場はメタ-ジブromo-ピリジンである。

10

【0035】

別の実施形態において、提供される方法は、縮合環芳香族化合物などの多環芳香族構造に基づく、または、多環芳香族構造から成る足場の使用を含む。炭素-炭素結合を共有する2つの芳香族環は、縮合しているといわれる。適当な縮合環芳香族足場は、それらが少なくとも2つの反応基を含むという条件で、たとえばナフタレン、アントラセンまたはフェナントレン、およびそれらの誘導体を含む。好ましい実施形態において、縮合環芳香族足場は少なくとも2つの反応基を含み、各基は、たとえばハロメチル基といった極めて反応性に富むベンジルハロゲン原子を含む。

20

【0036】

系が炭素原子の対を共有しない、様々な芳香族系または共役系を含む分子もまた、足場分子として有用である。たとえば、足場は多環または縮合環構造を含み、たとえばベンゼンといった芳香環が炭素-炭素結合を介して直接結合した足場が試験され得る。代わりに、環は少なくとも1つの原子を含むリンカーを介して結合される。本発明の方法において適した足場の例は、図4、5および6に与えられている。当業者は、これらの分子のどのバージョンを使用するか選択することができるだろう。商業上の点からみて、本発明に従う足場は、比較的低価格にて市販され、大量に入手することができるのが好ましい。たとえば、ジブromo足場の1,3-ビス(ブromoメチル)ベンゼンは現在、グラムあたり僅か約5ユーロで販売されている。

30

【0037】

ゆえに、国際公開第2004077062号パンフレットに従う方法は、第1および第2の反応基を使用して、本発明に従うペプチドの、足場との簡素で容易なカップリングを可能にする。第1結合の形成は連続的結合の形成を促進する。ゆえに、第1結合の形成は反応の連鎖をもたらし、第1結合の形成は(化学的)結合ともいわれ、第1反応基を介して、第2反応基の反応を増大させるなどする。この化学反応は官能基における変化を含むが、足場の分子骨格は本質的に変化しないままである。国際公開第2004077062号パンフレットに従う方法の利点は、本質的に非保護のペプチドを足場にカップリングすることができ、足場を選択的に官能化する必要がないことである。さらに、国際公開第2004077062号パンフレットに従う方法は、本発明に従うペプチドの水溶液中でのカップリングを可能にするが、他の公知のカップリング手順は、複数の保護-脱保護サイクルを介して有機溶媒中でしばしば実行される。したがって、好ましい実施形態は、ペプチドが足場にカップリングされ、ペプチドと足場との第1結合の形成が、ペプチドと足場との第2結合の形成を促進する本発明に従う方法を提供する。さらに好ましい実施形態は、ペプチドが溶液中で足場にカップリングされる本発明に従う方法を提供する。水溶液が

40

50

使用されるのが最も好ましい。

【0038】

本発明に従う1つの実施形態の非限定的な図解例を、以下に説明する。この例においては、注目するたんぱく性分子の2つのアミノ酸残基が選択される。これらのアミノ酸残基は双方とも、たんぱく性分子の表面露出領域から選択されるのが好ましい。選択されるアミノ酸残基は、第2に選択されるアミノ酸残基を含まない、第1に選択されるアミノ酸残基のフランキング配列を選択することが可能なように、互いから離れて位置する少なくとも2つのアミノ酸残基であるのが好ましい。この図解例において、たんぱく性分子の（一部の）一次配列は、配列 $X_1 \sim X_{24}$ （ X はあらゆるアミノ酸残基を表わす）によって表わされる。

10

【0039】

一次配列

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24}$

【0040】

続いて、たとえばアミノ酸残基 X_{10} および X_{15} を選択する。その後、たとえば以下のフランキング配列を選ぶ。

X_{10} のフランキング配列： $X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ および $X_{11} X_{12}$

X_{15} のフランキング配列： $X_{13} X_{14}$ および $X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20}$

【0041】

続いて、これらのフランキング配列の少なくとも1つ、および足場と反応することができる少なくとも2つの基を含むペプチドを生産する。この例において、足場と反応することができる2つの基は、ペプチドの第1および最後のアミノ酸残基である2つのシステイン残基である。もちろん、多くの別の基を使用することが可能であり、それらの基のペプチド内での位置は変更することができる。この例においては、たとえば以下のペプチドを生成する。

20

【0042】

1つのフランキング配列を含むペプチド：

$C X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 C$

$C X_{11} X_{12} C$

$C X_{13} X_{14} C$

$C X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} C$

2つのフランキング配列を含むペプチド：

$C X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{11} X_{12} C$

$C X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{13} X_{14} C$

$C X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} C$

$C X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} C$

$C X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} C$

$C X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} C$

$C X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} C$

$C X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} C$

$C X_{13} X_{14} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} C$

$C X_{13} X_{14} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} C$

$C X_{13} X_{14} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} C$

$C X_{13} X_{14} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} C$

$C X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{11} X_{12} C$

$C X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{13} X_{14} C$

$C X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} C$

3つのフランキング配列を含むいくつかの可能なペプチド：

30

40

50

C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₁ X₁₂ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₃ X₁₄ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₁ X₁₂ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₁ X₁₂ X₁₁ X₁₂ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₁ X₁₂ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₃ X₁₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₃ X₁₄ X₁₁ X₁₂ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₃ X₁₄ X₁₃ X₁₄ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₃ X₁₄ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₁₁ X₁₂ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₁₃ X₁₄ C
 C X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉

10

X₂₀ C
 C X₁₁ X₁₂ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ C
 C X₁₁ X₁₂ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₁ X₁₂ C
 C X₁₁ X₁₂ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₃ X₁₄ C
 C X₁₁ X₁₂ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ C
 C X₁₁ X₁₂ X₁₁ X₁₂ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ C
 C X₁₁ X₁₂ X₁₁ X₁₂ X₁₁ X₁₂ C
 C X₁₁ X₁₂ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ C
 C X₁₁ X₁₂ X₁₁ X₁₂ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ C

20

など

【0043】

その後、生産されたペプチドは、本発明に従う（試験）化合物を生成するために、足場にカップリングされるのが好ましい。複数の試験化合物を生産するために、複数の異なるペプチドが、足場にカップリングされるのが好ましい。

30

【0044】

さらに、前述の図解例において、3つのフランキング配列の組合せが可能であることが明らかだろう。さらに、4以上のフランキング配列を含む他のペプチドを設計することが可能である。しかし、ペプチドの全長は50アミノ酸残基を超えないのが好ましい。

【0045】

さらに、本発明の種々の実施形態は種々の異なる長さのフランキング配列の選択を含む。たとえば、前述の図解例において、たとえばX₁₀の以下のフランキング配列が選択される：

X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ および / または
 X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ および / または
 X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ および / または
 X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ および / または
 X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ および / または
 X₆ X₇ X₈ X₉ および / または
 X₇ X₈ X₉ および / または
 X₈ X₉ および / または
 X₉ および / または
 X₁₁ X₁₂ X₁₃ および / または
 X₁₁ X₁₂ および / または
 X₁₁

40

50

【0046】

フランキング配列の種類、長さおよび量を変更することによって、異なる種類および/または長さのペプチドが生産される。4~25アミノ酸残基のペプチドが生成されるのが好ましい。

【0047】

与えられたたんぱく性分子の選択されるアミノ酸残基の数は変更することが可能であり、特定の用途に依存する。1つの好ましい実施形態において、少なくとも2つのアミノ酸残基が選択される。ゆえに、少なくとも1つのたんぱく性分子の一次配列内の、少なくとも2つのアミノ酸残基が選択される本発明に従う方法が提供される。効果の観点から、好ましくは、多くても5つのアミノ酸残基が選択される。3または4のアミノ酸残基が選択されるのが好ましい。特に好ましい実施形態においては、2つのアミノ酸残基が選択される。

10

【0048】

もちろん、たんぱく性分子の1つの選択されたアミノ酸残基によって、本発明に従う方法を実行することも可能である。その場合、本発明のペプチドは、その1つの選択されたアミノ酸残基の、たんぱく性分子のN-末端方向に位置する少なくとも1つのフランキング配列、および/または、その1つの選択されたアミノ酸残基の、たんぱく性分子のC-末端方向に位置する少なくとも1つのフランキング配列を含む。もちろん、前述のように、異なる長さの種々のフランキング配列を使用することができる。

20

【0049】

選択されるフランキング配列の数および長さは、特定の用途に依存する。1つの好ましい実施形態において、少なくとも2つのフランキング配列を含むペプチドが生産される。これらのフランキング配列は、互いに異なるか、同じであってもよい。1つの実施形態においては、選択された同じアミノ酸残基の少なくとも2つのフランキング配列が、ペプチドに組込まれる。しかし、別の実施形態においては、第1の選択されたアミノ酸残基のフランキング配列、および第2の選択されたアミノ酸残基のフランキング配列を含むペプチドが生産される。

【0050】

本発明に従う方法では、足場と反応することができる少なくとも2つの基を含むペプチドが生産される。好ましい実施形態においては、それらの基は、少なくとも1つのSH-基、好ましくは少なくとも1つのシステイン残基を含む。なぜなら、SH-基は(ヘテロ)芳香族分子を含む足場にペプチドをカップリングさせるのに特に適しているからである。既に述べたように、(ヘテロ)芳香族分子を含む(好ましくは少なくとも1つのベンジルハロゲン置換基を含む)足場の使用が好ましい。少なくとも1つのSH-基(たとえばシステイン残基)を含む基が、ペプチドの足場とのカップリング反応において使用される場合、そのペプチドは、他の利用可能なシステイン残基の少なくとも一部を欠いているのが好ましい。利用可能なシステイン(残基)は、SH-基が別の基と反応することができるシステインとして定義される。ゆえに、たとえば保護基が設けられていることによって、SH-基が別の基と反応することができないシステイン残基は、「利用可能なシステイン」という用語の対象に含まれない。本発明のペプチドが他の利用可能なシステインを含む場合、足場と反応することを意図した少なくとも1つの基の代わりに、他の利用可能なシステインが足場と反応することができる。このように、ペプチドと足場との非意図的な結合が形成される可能性がある。さらに、他の利用可能なシステインは、足場と反応することを意図したSH-基を含む基と、ジスルフィド結合を形成することができる。その場合もまた、ペプチドと足場とのカップリング反応が歪められる可能性がある。これらの問題は、フランキング領域に存在する少なくとも1つのシステイン残基が、他のスルフィドリル基含有部分と結合を形成することができない基によって置換されると、少なくとも部分的に避けられる。1つの実施形態において、これは保護基または模倣基によって実行される。たとえば、除去可能な保護基によって保護されたシステイン、たとえばCys(S t B u)、または、最も好ましくはシステイン-(アセトアミドメチル)基(Cys(A c m))な

30

40

50

どが使用される。本発明の化合物を生成するための、本発明のペプチドの足場への付着に続いて、保護基は、たとえば還元処理によって、容易に除去される。たとえば、1,4-D D Tまたはエタンジチオールが使用される。フランキング配列のシステイン残基をバイオイソステリックユニット(bioisosteric unit)によって置換することも可能である。バイオイソステリックユニットは類似した大きさおよび物理化学的特性を有する機能団として定義される。

【0051】

フランキング配列の少なくとも1つにおける少なくとも1つのシステインが、たとえばアラニン残基といった、足場と非反応性である別のアミノ酸残基によって置換されるのが最も好ましい。ゆえに、フランキング配列の少なくとも1つにおける少なくとも1つのシステインが、別のアミノ酸残基によって置換される本発明に従う方法が提供される。ペプチドに組み込まれるすべてのフランキング配列におけるすべてのシステインは、足場に結合することを意図したSH基を有する2つの基以外の基を介してペプチドが足場に付着するのを防止するために、使用される足場と非反応性である他のアミノ酸残基によって、置換されるのが最も好ましい。

10

【0052】

1つの好ましい実施形態において、種々の異なる長さのペプチドが、潜在的な結合化合物および/または免疫原性化合物のより多様なコレクションを提供するために合成される。結合分子間の相互作用および免疫原性相互作用は、しばしば非常に特異的である。ゆえに、本発明のペプチドの配列だけでなくその長さもまた、特異的相互作用に関するスクリーニングが実行される場合、しばしば関連性がある。したがって、少なくとも2つの異なる長さのペプチドを生産する工程を含む本発明に従う方法が提供される。6~25アミノ酸残基の長さの複数のペプチドが生成されるのが最も好ましい。注目するたんぱく性分子の二次、三次および/または四次構造が知られている場合、たんぱく性分子の表面露出領域から少なくとも1つのアミノ酸残基を選択することがさらに好ましい。

20

【0053】

しかし、注目するたんぱく性分子の二次、三次および/または四次構造が知られていないか、部分的にしか知られていない場合には、予備スクリーニングを実行することが好ましい。その場合、本質的に同じ長さを有する複数の重複ペプチドが合成されるのが好ましい。2,3または4セットのペプチドが合成され、ペプチドの1セットはほぼ同じ長さのペプチドを含むのが好ましい。たとえば、2セットのペプチドが生産され、1セットは約8アミノ酸残基の長さのペプチドを含み、他のセットは約15アミノ酸残基の長さのペプチドを含む。この実施形態によれば、(好ましくは足場にカップリングされた)複数の重複ペプチドが、所望の官能性(たとえば抗体、T細胞、リガンドまたは受容体などの注目する結合化合物に結合する能力)に関して試験される。1つ以上のペプチドが有望な候補であるとわかった場合、たんぱく性分子のどの領域からその有望な候補が由来しているように思われるのかを、決定するのが好ましい。たんぱく性分子のその領域が同定された後、第2の手順が続くのが好ましい。第2の手順においては、本発明の方法が再び実行される。今回は、第1の手順にて同定された前述の領域の少なくとも1つに存在する、少なくとも1つのアミノ酸残基が選択される。

30

40

【0054】

1つの実施形態において、有望な候補であると思われるペプチドは、第2のペプチド(化学式 $(X)_y$)と組合わされる。第2のペプチドは、同じたんぱく性分子から少なくとも部分的に由来するのが好ましい。たとえば、2つのシステイン残基が足場と反応することができる基として使用される場合、およびスクリーニング中に見つかった有望なペプチドが $(X)_x$ で表わされる場合、化学式 $C(X)_x C(X)_y$ および/または $(X)_x C(X)_y C$ のペプチドが合成されるのが好ましい。この化学式において、Cはシステイン残基であり、 $(X)_x$ は少なくとも1つのフランキング配列を表し、 $(X)_y$ はその少なくとも1つのたんぱく性分子に由来するあらゆる配列を表す。 $(X)_x$ および $(X)_y$ はそれぞれ少なくとも1つのフランキング配列を表すのが好ましい。

50

【 0 0 5 5 】

結果として生じるペプチドは、本発明に従う安定した試験化合物を生産するために、もう一度足場にカップリングされるのが好ましい。試験化合物は、ここでも所望の官能性（たとえば抗体、T細胞、リガンドまたは受容体などの注目する結合化合物に結合する能力）に関してスクリーニングされるのが好ましい。試験化合物は、有望なペプチド $(X)_x$ が選択された第1のスクリーニングと比較して同じ官能性に関して試験されるのが好ましい。本発明のこの実施形態は、二次、三次および/または四次構造が知られていないか、部分的にしか知られていないたんぱく性分子に、少なくとも部分的に由来する免疫原性化合物および/または結合化合物を生産および/または同定するのに特に適している。1つの実施形態によれば、2, 3または4セットのペプチドが合成され、ペプチドの1セットはほぼ同じ長さのペプチドを含み、結果として生じるペプチドは注目する結合分子を使用する第1のスクリーニング検定にかけられる。その後、有望な候補であると思われるペプチドは、化学式 $C(X)_x C(X)_y$ および/または $(X)_x C(X)_y C$ の化合物を生成するために、二次、三次および/または四次構造が知られていないか、部分的にしか知られていないそのたんぱく性分子に由来する第2のペプチドにカップリングされる。その後、結果として生じるペプチドは、再び注目する結合分子を使用する第2のスクリーニング検定によってスクリーニングされる。

10

【 0 0 5 6 】

ゆえに、1つの実施形態は、式 $C(X)_x C(X)_y$ または $C(X)_y C(X)_x$ を含むペプチドが生産される本発明に従う方法を提供し、ここで、Cはシステイン残基であり、 $(X)_x$ はフランキング配列の少なくとも1つを表し、 $(X)_y$ は少なくとも1つのたんぱく性分子に由来するあらゆる配列を表す。 $(X)_x$ および $(X)_y$ はそれぞれフランキング配列の少なくとも1つを表すのが好ましい。

20

【 0 0 5 7 】

ここで、重複ペプチドは、たんぱく性分子の一次配列に由来し、各ペプチドがその一次配列の少なくとも1つのアミノ酸残基を、別のペプチドと共通して有するペプチドとして定義される。たとえば、長さnの複数のペプチドが生産され、第1のペプチドは、たんぱく性分子の一次配列の、位置1にて開始し、位置nにて終了する。第2のペプチドは、たんぱく性分子の一次配列の、位置2にて開始し、位置n+1にて終了する。第3のペプチドは、たんぱく性分子の一次配列の、位置3にて開始し、位置n+2にて終了する、などである。ここでは、本質的に同じ長さを有するペプチドは、アミノ酸残基の量が互いに最大で5アミノ酸残基異なるペプチドとして定義される。これらのペプチドは、正確に同じ量のアミノ酸残基を有するのが好ましい。

30

【 0 0 5 8 】

本発明に従うペプチドは、足場と反応することができる少なくとも2つの基を含むのが好ましい。本発明のペプチドが足場と反応することができる2つの基を有する場合、結合に適した2つの部位を有する足場が使用されるのが好ましい。ここで、「結合に適した部位」および「結合部位」という語句は同じ意味で使用され、足場と反応することができる基を結合することができる部位として定義され、その基は本発明に従うペプチド上に存在する。その基はSH官能基であるのが好ましく、求核置換反応に使用されるのが好ましい。したがって、足場の適した結合部位の例は、炭素よりも電気陰性度が大きいヘテロ原子に結合した飽和炭素である。

40

【 0 0 5 9 】

2つの結合部位を含む足場の例は、2つのハロゲン置換基を含む芳香族分子である。好ましくは、ビス(プロモメチル)ベンゼン、(プロモメチル)(クロロメチル)ベンゼンまたはビス(クロロメチル)ベンゼンが使用される。メタ-ジプロモキシレン(m-T2)が使用されるのが最も好ましい。

【 0 0 6 0 】

1つの実施形態においては、足場と反応することができる少なくとも3つの基を含む、本発明に従うペプチドが生産される。この実施形態は、3つの部位にて足場に結合する本

50

発明のペプチドによって、少なくとも2つのループが形成されるという利点をもたらす。少なくとも2つのループの各々は、連続結合部位および/または免疫原性部位の存在を試験するのに適している。しかし、不連続結合部位および/または免疫原性部位の存在を調査するために、少なくとも2つのループが一緒に試験されるのが好ましい。好ましい実施形態において、各ループはフランキング配列の少なくとも一部を含むので、種々のフランキング配列(の一部)の特性が同時に試験される。ゆえに、本発明のペプチドは、少なくとも2つのフランキング配列、および足場と反応することができる少なくとも3つの基を含むのが好ましい。足場と反応することができる少なくとも3つの基は、システイン残基であるのが好ましい。したがって、ペプチドが少なくとも3つのシステイン残基および少なくとも2つのフランキング配列を含む、本発明に従う方法が提供される。

10

【0061】

もちろん、本発明のペプチドが足場と反応することができる3つの基を含む場合、結合に適した(少なくとも)3つの部位を有する足場が使用されるのが好ましい。たとえば、3つのハロゲン置換基を含む芳香族分子が使用される。この芳香族分子には、好ましくは、トリス(プロモメチル)ベンゼン、ビス(プロモメチル)(クロロメチル)ベンゼン、(プロモメチル)ビス(クロロメチル)ベンゼンまたはトリス(クロロメチル)ベンゼンが含まれる。2,4,6-トリス(プロモメチル)メシチレン(T3)が使用されるのが最も好ましい。

【0062】

同様に、本発明のペプチドが足場と反応することができる4つの基を含む場合、結合に適した4つの部位を有する足場が使用されるのが好ましい。4つのハロゲン置換基を含む芳香族分子が使用されるのが好ましい。この芳香族分子には、好ましくは、テトラ(プロモメチル)ベンゼン、トリス(プロモメチル)(クロロメチル)ベンゼン、ビス(プロモメチル)ビス(クロロメチル)ベンゼン、(プロモメチル)トリス(クロロメチル)ベンゼンまたはテトラ(クロロメチル)ベンゼンが含まれる。1,2,4,5-テトラプロモジュレン(T4)が使用されるのが最も好ましい。

20

【0063】

1つの好ましい実施形態において、化学式 $C(X)_x C(X)_y C$ または $C(X)_y C(X)_x C$ のペプチドが生産される。この化学式において、Cは足場と反応することができる基であり、システイン残基であるのが好ましく、 $(X)_x$ は少なくとも1つのフランキング配列を表し、 $(X)_y$ は注目するたんぱく性分子に由来するあらゆる配列を表す。 $(X)_y$ は $(X)_x$ と同じたんぱく性分子に由来するのが好ましい。 $(X)_x$ および $(X)_y$ はそれぞれ、少なくとも1つのフランキング配列を表すのが好ましい。1つの実施形態において、 $(X)_x$ および $(X)_y$ の長さはほぼ同じであり、 $(X)_x$ のアミノ酸残基量と $(X)_y$ のアミノ酸残基量との差異は5以下であることを意味する。このようなペプチドが足場と結合する場合、本質的に同じ長さの2つのループが形成される。しかし、これは必須ではない。別の実施形態において、 $(X)_x$ および $(X)_y$ の長さは互いにかなり異なり、 $(X)_x$ のアミノ酸残基量と $(X)_y$ のアミノ酸残基量とは互いに6アミノ酸残基以上異なることを意味する。このようなペプチドが足場とカップリングされる場合、かなり異なる長さの2つのループが得られる。

30

【0064】

足場と反応することができる3つの基を含む前述の化学式のペプチドは、3つの結合部位を有する足場にカップリングされるのが好ましい。このペプチドは、好ましくは3つのハロゲン置換基を含む芳香族分子に、より好ましくはトリス(プロモメチル)ベンゼンに、最も好ましくは2,4,6-トリス(プロモメチル)メシチレン(T3)にカップリングされる。これはたとえば図7に表わされる構造をもたらし、1つの足場上の2つのペプチドループを試験するのに特に適している。

40

【0065】

化学式 $C(X)_x C(X)_y C$ または $C(X)_y C(X)_x C$ のペプチドが、種々の実施形態において生産される。1つの実施形態において、注目するたんぱく性分子の種々のフランキング配列が選択され、これらのフランキング配列は、化学式 $C(X)_x C(X)_y C$ またはC

50

(X)_y C(X)_x C のペプチドを生成するために、ランダムに組合わされる。ここで、(X)_x および (X)_y は双方とも、少なくとも 1 つのフランキング配列を含む。そのフランキング配列は、注目するたんぱく性分子の少なくとも 1 つの表面露出領域から選択されるのが好ましい。別の実施形態において、本発明の方法が、複数のペプチドを生産するために初めに実行される。それら複数のペプチドは、所望の免疫原性および / または結合特性を有する化学式 (X)_x の少なくとも 1 つの有望な候補のペプチドを同定するために、たとえば抗体および / または T 細胞などの注目する結合分子でスクリーニングされる。その後、有望な候補のペプチドは、化学式 C(X)_x C(X)_y C または C(X)_y C(X)_x C のペプチドを得るために、化学式 (X)_y の別のペプチドと組合わされる。化学式 (X)_y のペプチドは、化学式 (X)_x の有望な候補のペプチドと同じたんぱく性分子に由来するのが好ましい。

1 つの好ましい実施形態において、化学式 (X)_x の有望な候補のペプチドと同じたんぱく性分子に少なくとも部分的に由来する重複ペプチドを含む化学式 (X)_y の複数のペプチドが生産される。その後、重複ペプチドを含む各ペプチド (X)_y は、化学式 (X)_x の有望な候補のペプチドにカップリングされる。結果として生じるペプチド C(X)_x C(X)_y C または C(X)_y C(X)_x C は、その後、好ましくは化学式 (X)_x の有望な候補のペプチドが選択された同じ種類のスクリーニング検定において、再びスクリーニングされる。少なくとも 1 つのペプチド C(X)_x C(X)_y C または C(X)_y C(X)_x C が所望の免疫原性および / または結合特性を有すると思われる場合、そのペプチドが選択される。

10

【0066】

化学式 C(X)_x C(X)_y C または C(X)_y C(X)_x C のペプチドが膜貫通たんぱくに少なくとも部分的に由来する場合、ペプチド (X)_x および (X)_y はともに、その膜貫通たんぱくの細胞外ループドメインおよび / または遊離 N-末端の双方に由来するのが好ましい。ここで、膜貫通たんぱくの遊離 N-末端は、アミノ酸 1 で開始し、第 1 の膜貫通ドメイン (ほとんど膜貫通らせん) の第 1 アミノ酸残基にて終了する、たんぱくの直鎖 N-末端部分として定義される。1 つの実施形態において、本発明の方法が初めに実行され、膜貫通たんぱくの細胞外ループドメインおよび / または遊離 N-末端に存在する少なくとも 1 つのアミノ酸残基が選択される。本実施形態によれば、細胞外ループドメインおよび / または遊離 N-末端に存在する少なくとも 1 つのフランキング配列を含む生産されたペプチドは、所望の免疫原性および / または結合特性を有する化学式 (X)_x の少なくとも 1 つの有望な候補のペプチドを同定するために、たとえば抗体および / または T 細胞などの注目する結合分子でスクリーニングされる。有望な候補のペプチドは、その後、化学式 C(X)_x C(X)_y C または C(X)_y C(X)_x C のペプチドを得るために、その膜貫通たんぱくの細胞外ループドメインおよび / または遊離 N-末端由来の少なくとも 1 つのフランキング配列を含む化学式 (X)_y の別のペプチドと組合わされる。1 つの実施形態において、(X)_x および (X)_y は、同じ細胞外ループドメインおよび / または遊離 N-末端に由来する少なくとも 1 つのフランキング配列を含む。代わりに、またはさらに、(X)_x および (X)_y は、同じ膜貫通たんぱくの異なるドメインに由来する少なくとも 1 つのフランキング配列を含む。

20

30

【0067】

化学式 C(X)_x C(X)_y C または C(X)_y C(X)_x C のペプチドが、cys-ノットスーパーファミリの一員などの、システイン残基間の少なくとも 2 つの内部シスチン結合を含むたんぱく性分子に少なくとも部分的に由来する場合、ペプチド (X)_x および (X)_y は双方が、そのたんぱく性分子の 1 つ以上のシステイン残基の少なくとも 1 つのフランキング配列を含むのが好ましい。たんぱく性分子のシステイン残基のみが選択される本発明の方法が、実行されるのが好ましい。結果として、少なくとも 1 つのシステイン残基のフランキング配列 (の組合せ) のみを含むペプチドが生産される。

40

【0068】

注目するたんぱく性分子の (二次、三次および / または四次) 構造が知られていなければ、重複ペプチドのセットが生成されるのが好ましい。1 つの実施形態において、足場と反応することができる 3 つの基は、それぞれの重複ペプチド内の 3 つの部位に配置される

50

。結果として生じるペプチドは、その後、本発明に従う試験化合物を提供するために、（少なくとも）3つの結合部位を含む足場にカップリングされるのが好ましい。好ましい実施形態において、足場と反応することができる1つの基は、重複ペプチドの第1のアミノ酸残基に配置され、足場と反応することができる1つの基は、重複ペプチドの最後のアミノ酸残基に配置され、足場と反応することができる1つの基は、足場と反応することができる第1の基と最後の基との間に配置される。足場と反応することができる基はシステイン残基であるのが好ましいため、化学式 $C(X)_x C(X)_y C$ のペプチドが生産されるのが好ましい。ここで、 $(X)_x$ および $(X)_y$ は同じ重複ペプチドの一部であるのが好ましい。このペプチド $C(X)_x C(X)_y C$ は、重複ペプチドの配列の第1のアミノ酸残基と、その重複ペプチドの配列の最後のアミノ酸残基と、第1のアミノ酸残基と最後のアミノ酸残基との間に位置する1つのアミノ酸残基とを、システインで置換することによって生産されるのが好ましい。代わりに、 $(X)_x$ および $(X)_y$ は重複ペプチドをそれぞれ含む。1つの実施形態において、 $(X)_x$ および $(X)_y$ はほぼ同じ量のアミノ酸残基を含む。その場合、 n 個のアミノ酸残基から成る重複ペプチドのセットが生産されるのが好ましく、 n は奇数である。その後、アミノ酸残基1、 $(n+1)/2$ および n がシステインによって置換される。他の利用可能なシステイン残基は、別のアミノ酸残基によって置換されるか、（たとえば保護基によって）不活性にされるのが好ましく、それによって他の利用可能なシステイン残基はペプチドと足場とのカップリング反応を妨げなくなる。結果として生じるペプチド $C(X)_x C(X)_y C$ は、その後、（少なくとも）3つの結合部位を含む足場とカップリングされるのが好ましく、続いて所望の特性に関して試験される。

10

20

【0069】

さらなる実施形態において、化学式 $C(X)_x C(G)_n C(X)_y C$ または $C(X)_y C(G)_n C(X)_x C$ のペプチドが生産される。この化学式において、 C は足場と反応することができる基であり、好ましくはシステイン残基であり、 $(G)_n$ はスペースを表し、 $(X)_x$ は少なくとも1つのフランキンク配列を表し、 $(X)_y$ は少なくとも1つのたんぱく性分子に由来するあらゆる配列を表す。 $(X)_x$ および $(X)_y$ はそれぞれ、注目する同じたんぱく性分子の少なくとも1つのフランキンク配列を表すのが好ましい。

【0070】

もちろん、スペースを別のフランキンク配列 $(X)_z$ によって置換することも可能である。その場合、化学式 $C(X)_x C(X)_z C(X)_y C$ 、 $C(X)_x C(X)_y C(X)_z C$ 、 $C(X)_y C(X)_z C(X)_x C$ 、 $C(X)_y C(X)_x C(X)_z C$ 、 $C(X)_z C(X)_x C(X)_y C$ および / または $C(X)_z C(X)_y C(X)_x C$ のペプチドが生産される。

30

【0071】

前述の化学式のペプチドは、（少なくとも）4つの結合部位を含む足場と、または、それぞれの足場が（少なくとも）2つの結合位置を含む2つの足場と、カップリングするのに特に適している。結果として生じる化合物の限定しない図解例が、図7および8に表わされている。

【0072】

たとえば2つの別々の $m-P$ 2分子など、少なくとも2つの結合部位を有する2つの足場が使用される場合、どのシステイン残基が第1の足場にカップリングされ、どのシステイン残基が第2の足場にカップリングされるのかを、調整することがときおり所望される。たとえば、化学式 $C_1(X)_x C_2(G)_n C_3(X)_y C_4$ のペプチドが使用される場合、 C_1 および C_2 はしばしば第1の足場と結合することが意図され、 C_3 および C_4 は第2の足場と結合することが意図される。これは、たとえば、第2の足場（たとえば C_3 および C_4 ）に結合させようとする2つのシステイン残基に、たとえばメトキシトリチル（ Mmt ）またはトリチル（ Trt ）などの保護基を備えることによって、実行される。第1のカップリング反応において、保護された C_3 および C_4 を含むペプチドは第1の足場とインキュベートされる。その際、 C_1 および C_2 のみが足場と結合することができる。その後、 C_3 および C_4 が脱保護される。結果として生じる複合体が、今度は、第1の足場と同じ種類の足場であってもよい第2の足場とインキュベートされる（これは必須ではな

40

50

く、第2の足場と第1の足場とは互いに異なってもよい)。今回は、 C_3 および C_4 は第2の足場と結合することができる。このようにして、 C_1 および C_2 は第1の足場と結合し、 C_3 および C_4 は第2の足場と結合する。もちろん、他の組合せが可能である。

【0073】

化学式 $C(X)_x C(G)_n C(X)_y C$ 、 $C(X)_y C(G)_n C(X)_x C$ 、 $C(X)_x C(X)_z C(X)_y C$ 、 $C(X)_x C(X)_y C(X)_z C$ 、 $C(X)_y C(X)_z C(X)_x C$ 、 $C(X)_y C(X)_x C(X)_z C$ 、 $C(X)_z C(X)_x C(X)_y C$ または $C(X)_z C(X)_y C(X)_x C$ のペプチドが膜貫通たんばくに少なくとも部分的に由来する場合、ペプチド $(X)_x$ 、 $(X)_y$ および任意で $(X)_z$ は、その膜貫通たんばくの細胞外ループドメインおよび/または遊離N-末端に由来するのが好ましい。1つの実施形態において、化学式 $(X)_x$ の少なくとも1つの有望なペプチドが、前述のように、第1のスクリーニング方法の間に選択され、この化学式 $(X)_x$ のペプチドは、膜貫通たんばくの細胞外ループドメインおよび/または遊離N-末端に由来する少なくとも1つのフランキング配列を含む、本発明の方法が実行される。この化学式 $(X)_x$ の有望なペプチドは、その後、 $C(X)_x C(G)_n C(X)_y C$ 、 $C(X)_y C(G)_n C(X)_x C$ 、 $C(X)_x C(X)_z C(X)_y C$ 、 $C(X)_x C(X)_y C(X)_z C$ 、 $C(X)_y C(X)_z C(X)_x C$ 、 $C(X)_y C(X)_x C(X)_z C$ 、 $C(X)_z C(X)_x C(X)_y C$ および $C(X)_z C(X)_y C(X)_x C$ から成る群から選択される化学式のペプチドを得るために、化学式 $(X)_y$ の別のペプチドおよび/または化学式 $(X)_z$ の別のペプチドと組み合わせられる。1つの実施形態において、 $(X)_x$ 、 $(X)_y$ および任意で $(X)_z$ は、同じ細胞外ループドメインおよび/または遊離N-末端に由来する少なくとも1つのフランキング配列を含む。代わりに、またはさらに、 $(X)_x$ 、 $(X)_y$ および任意で $(X)_z$ は膜貫通たんばくの異なるドメインに由来する少なくとも1つのフランキング配列を含む。

【0074】

$C(X)_x C(G)_n C(X)_y C$ 、 $C(X)_y C(G)_n C(X)_x C$ 、 $C(X)_x C(X)_z C(X)_y C$ 、 $C(X)_x C(X)_y C(X)_z C$ 、 $C(X)_y C(X)_z C(X)_x C$ 、 $C(X)_y C(X)_x C(X)_z C$ 、 $C(X)_z C(X)_x C(X)_y C$ および $C(X)_z C(X)_y C(X)_x C$ から成る群から選択される化学式のペプチドが、たとえばcys-ノットスーパーファミリの一員などの、システイン残基間の少なくとも2つの内部システイン結合を含むたんばく性分子に少なくとも部分的に由来する場合、ペプチド $(X)_x$ 、 $(X)_y$ および任意で $(X)_z$ は、そのたんばく性分子の1つ以上のシステイン残基の少なくとも1つのフランキング配列を含むのが好ましい。たんばく性分子のシステイン残基のみが選択される、本発明の方法が実行されるのが好ましい。結果として、少なくとも1つのシステイン残基のフランキング配列(の組合せ)のみを含むペプチドが生産される。1つの好ましい実施形態においては、たんばく性分子の少なくとも2つのシステイン残基の、少なくとも1つのフランキング配列を含むペプチドが生成される。たんばく性分子の少なくとも2つのシステイン残基の、少なくとも2つのフランキング配列を含むペプチドが生成されるのが最も好ましい。

【0075】

1つの好ましい実施形態において、本発明に従う方法は以下のように実行される。たんばく性分子のSS-架橋の第1のシステインCys-1、Cys-1のフランキング配列 $(X)_x$ であって、C-末端の方向に位置し、xアミノ酸残基の長さを有するフランキング配列 $(X)_x$ を含み、第2のシステインCが続く、n個のグリシン残基 $(G)_n$ が続く、第3のシステインCが続く、そのSS-架橋の第2のシステイン残基Cys-2のフランキング配列 $(X)_y$ であって、N-末端の方向に位置し、yアミノ酸残基の長さを有するフランキング配列 $(X)_y$ が続く、そのSS-架橋の第2のシステインCys-2が続く、複数のペプチドが生産される。結果として生じるペプチドは、化学式 $Cys-1(X)_x C(G)_n C(X)_y Cys-2$ を含む。複数の異なるペプチドが合成されるのが好ましく、0はx、nおよびyよりも小さいかそれらに等しく、x、nおよびyは6よりも小さいかそれに等しい。さらに、 $x+n+y$ は21よりも小さいかそれに等しいのが好ましく、結果として生じるペプチドは25アミノ酸残基よりも小さいかそれに等しい。生産されたペプチドが、その後、所望の免疫原性および/または結合特性に関してスクリーニングされるのが好ましい。

これは、（少なくとも）4つの結合部位を含む足場との、またはそれぞれが（少なくとも）2つの結合部位を含む2つの足場との、そのペプチドのカップリング後に実行されるのが好ましい。そのペプチドがT4足場、または2つのT2足場とカップリングされるのが最も好ましい。それぞれの足場が（少なくとも）2つの結合部位を含む2つの足場が使用される場合、2つのシステイン残基Cys-1およびCys-2は、ループを形成するために同じ足場とカップリングされるのが好ましい。他の2つのシステイン残基は、ループを形成するために別の足場とカップリングされるのが好ましい。既に説明したように、これは、たとえば、Cys-1およびCys-2に保護基を備え、他の2つのシステイン残基を保護されていないままにすることによって、達成される。その場合、非保護システインが、ループを形成するために足場にカップリングされる。その後、Cys-1およびCys-2が脱保護され、別の足場にカップリングされる。

10

【0076】

Cys-1およびCys-2にたとえばTrtなどの第1の種類の保護基を備え、他の2つのシステイン残基にたとえばMmtなどの第2の種類の保護基を備えることも可能である。両種類の保護基は異なる試薬を用いて除去される。このように、どのシステイン残基が足場に結合することができるかを決定することが可能である。

【0077】

さらなる実施形態において、化学式 $C(X)_x C(X)_m (G)_n (X)_p C(X)_y C$ のペプチドが生産される。この化学式において、Cは足場と反応することができる基であり、好ましくはシステイン残基であり、 $(G)_n$ はスペーサを表し、 $(X)_x$ 、 $(X)_m$ 、 $(X)_p$ および $(X)_y$ はそれぞれ注目するたんぱく性分子の少なくとも1つのランキング配列を表す。このペプチドは2つの足場にカップリングするのに特に適しており、各足場は（少なくとも）2つの結合部位を含む。

20

【0078】

好ましい実施形態において、この化学式のペプチドは、（少なくとも）2つのSS-架橋を含む注目するたんぱく性分子のランキング配列を用いて合成され、そのたんぱく性分子の一次配列において、第2のSS-架橋の第1のシステインは第1のSS-架橋の第2のシステインからN-末端方向に位置し、第2のSS-架橋の第1のシステインおよび第1のSS-架橋の第2のシステインは互いから6アミノ酸残基内に位置するのが好ましく、たんぱく性分子の一次配列内のSS-架橋の各システインの位置は知られている。ゆえに、第2のSS-架橋の第1のシステインが位置nに位置する場合、第1のSS-架橋の第2のシステインは、位置n+1、n+2、n+3、n+4、n+5またはn+6に位置するのが好ましい。この実施形態によれば、第1のSS-架橋の第1のシステインCys-1.1、このCys-1.1のランキング配列 $(X)_x$ であって、C-末端の方向に位置し、xアミノ酸残基の長さを有するランキング配列 $(X)_x$ を含み、第2のSS-架橋の第1のシステインCys-1.2が続き、このCys-1.2のランキング配列 $(X)_m$ であって、C-末端の方向に位置し、mアミノ酸残基の長さを有するランキング配列 $(X)_m$ が続き、n個のグリシン残基 $(G)_n$ が続き、一次配列に存在する（第1のSS-架橋の第2のシステイン（Cys-2.1）または第2のSS-架橋の第2のシステイン（Cys-2.2）のいずれかであり得る）第3のシステイン残基のランキング配列であって、N-末端の方向に位置し、pアミノ酸残基の長さを有するランキング配列が続き、その第3のシステイン残基が続き、一次配列に存在する第4のシステイン残基のランキング配列であって、C-末端の方向に位置し、yアミノ酸残基の長さを有するランキング配列が続き、一次配列に存在する第4のシステイン残基であって、第1のSS-架橋の第2のシステイン（Cys-2.1）または第2のSS-架橋の第2のシステイン（Cys-2.2）のいずれかであり得る第4のシステイン残基が続く、複数のペプチドが生産される。

30

40

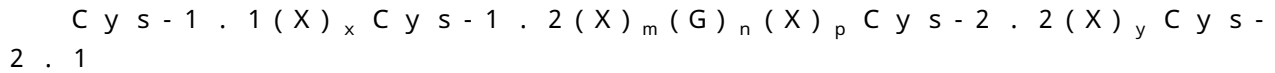
【0079】

結果として生じるペプチドは、化学式

Cys-1.1 $(X)_x$ Cys-1.2 $(X)_m$ $(G)_n$ $(X)_p$ Cys-2.1 $(X)_y$ Cys-2.2

50

または



を含む。

【0080】

複数の異なるペプチドが合成されるのが好ましく、0はx、m、n、pおよびyよりも小さいかそれらに等しく、x、m、n、pおよびyは6よりも小さいかそれに等しい。さらに、 $x + m + n + p + y$ は21よりも小さいかそれに等しいのが好ましく、結果として生じるペプチドは25アミノ酸残基よりも小さいかそれに等しい。生産されたペプチドは、その後、所望の免疫原性および/または結合特性に関してスクリーニングされるのが好ましい。これは、(少なくとも)4つの結合部位を含む足場との、またはそれぞれが(少なくとも)2つの結合部位を含む2つの足場との、ペプチドのカップリング後に実行されるのが好ましい。ペプチドがT4足場または2つのT2足場とカップリングされるのが最も好ましい。それぞれの足場が(少なくとも)2つの結合部位を含む2つの足場が使用される場合、第1のSS-架橋の2つのシステイン残基は、ループを形成するために、同じ足場とカップリングされるのが好ましい。第2のSS-架橋の2つのシステイン残基は、ループを形成するために、別の足場とカップリングされるのが好ましい。これは、既に説明したように実行されるのが好ましい。たとえば、第1のSS-架橋の2つのシステイン残基には保護基が備えられるが、他の2つのシステイン残基は非保護のままである。その場合、非保護システインが、ループを形成するために、足場とカップリングされる。その後、第1のSS-架橋の2つのシステイン残基が脱保護され、別の足場にカップリングされる。

10

20

【0081】

第1のSS-架橋の2つのシステイン残基に、たとえばTrtなどの、第1の種類の保護基を備え、他の2つのシステイン残基に、たとえばMmtなどの、第2の種類の保護基を備えることも可能である。両種類の保護基は異なる試薬を用いて除去される。このように、どのシステイン残基が足場に結合することができるかを決定することが可能である。

【0082】

さらなる実施形態において、化学式 $C(X)_m(G)_n(X)_pC(X)_q(G)_r(X)_sC(X)_t(G)_u(X)_v$ のペプチドが生産される。この化学式において、Cは足場と反応することができる基であり、好ましくはシステイン残基であり、 $(G)_n$ 、 $(G)_r$ および $(G)_q$ はスペースを表し、 $(X)_m$ 、 $(X)_p$ 、 $(X)_q$ 、 $(X)_s$ 、 $(X)_t$ および $(X)_v$ はそれぞれ少なくとも1つのフランキング配列を表す。このペプチドには3つのスペースが備えられており、そのペプチド内での柔軟なループを許容する。この化学式に従うペプチドはまた、2つの足場とカップリングするのに特に適しており、各足場は(少なくとも)2つの結合部位を含む。

30

【0083】

好ましい実施形態において、この化学式に従うペプチドは、(少なくとも)2つのSS-架橋を含む注目するたんぱく性分子のフランキング配列を用いて合成され、そのたんぱく性分子の一次配列内のSS-架橋の各システイン位置は正確に知られておらず、そのたんぱく性分子の一次配列において、2つのシステイン残基は互いから6アミノ酸残基内に位置する。この場合、当業者は予め、第2のSS-架橋の第1のシステインが、第1のSS-架橋の第2のシステインからN-末端方向に位置するか、またはC-末端方向に位置するかを知らない。したがって、前述の化学式の複数の分子を合成するのが好ましく、複数のペプチドは、所望の結合特性および/または免疫原性を有するペプチドをスクリーニングするために、システインおよびフランキング配列の異なる組合せを含む。本発明に従う方法は、SS-架橋のシステイン残基およびそのフランキング配列を選択する工程を含むのが好ましい。なぜなら、たんぱく性分子のシステイン間のSS-架橋はしばしば内部ループをもたらすからである。このようなループは通常、たんぱく性分子と別の化合物との相互作用に関わることがわかっている。ゆえに、SS-架橋のシステイン残基のフランキ

40

50

ング配列は、注目するたんぱく性分子内の他の配列と比較して、結合事象および/または免疫力に関連する機会が増大する。

【0084】

1つの好ましい実施形態において、一次配列にみられる第1のシステイン(C_1)、この C_1 のフランキング配列(X) $_m$ であって、C-末端の方向に位置し、 m アミノ酸残基の長さを有するフランキング配列(X) $_m$ を含み、 n 個のグリシン残基(G) $_n$ が続き、一次配列にみられる第3のシステイン(C_3)のフランキング配列(X) $_p$ であって、N-末端の方向に位置し、 p アミノ酸残基の長さを有するフランキング配列(X) $_p$ が続き、 C_3 が続き、 C_3 のフランキング配列(X) $_q$ であって、C-末端の方向に位置し、 q アミノ酸残基の長さを有するフランキング配列(X) $_q$ が続き、 r 個のグリシン残基(G) $_r$ が続き、一次配列に存在する第2のシステイン残基(C_2)のフランキング配列であって、N-末端の方向に位置し、 s アミノ酸残基の長さを有するフランキング配列が続き、 C_2 (たとえば第1のSS-架橋の第2のシステインまたは第2のSS-架橋の第1のシステインであり得る)が続き、一次配列に存在する C_2 のフランキング配列であって、C-末端の方向に位置し、 t アミノ酸残基の長さを有するフランキング配列が続き、 u 個のグリシン残基(G) $_u$ が続き、一次配列に存在する第4のシステイン残基(C_4)のフランキング配列であって、N-末端の方向に位置し、 v アミノ酸残基の長さを有するフランキング配列が続き、第4のシステイン残基(C_4)が続く、複数のペプチドが生産される。結果として生じるペプチドは、化学式

10

$C_1(X)_m(G)_n(X)_p C_3(X)_q(G)_r(X)_s C_2(X)_t(G)_u(X)_v C_4$
のものである。

20

【0085】

複数の異なるペプチドが合成されるのが好ましく、0は m 、 n 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 、 u および v よりも小さいかそれらに等しく、 m 、 n 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 、 u および v は6よりも小さいかそれに等しい。さらに、 $m+n+p+q+r+s+t+u+v$ は21よりも小さいかそれに等しいのが好ましく、結果として生じるペプチドは25アミノ酸残基よりも小さいかそれに等しい。生産されたペプチドは、その後、所望の免疫原性および/または結合特性に関してスクリーニングされるのが好ましい。これは、(少なくとも)4つの結合部位を含む足場との、またはそれぞれが(少なくとも)2つの結合部位を含む2つの足場との、ペプチドのカップリング後に実行されるのが好ましい。ペプチドがT4足場または2つのT2足場とカップリングされるのが最も好ましい。それぞれの足場が(少なくとも)2つの結合部位を含む2つの足場が使用される場合、 C_1 および C_3 は、ループを形成するために、同じ足場とカップリングされるのが好ましい。 C_2 および C_4 は、ループを形成するために、別の足場とカップリングされるのが好ましい。これは、既に説明したように実行されるのが好ましい。たとえば、 C_1 および C_3 には保護基が備えられるが、他の2つのシステイン残基は非保護のままである。その場合、非保護の C_2 および C_4 が、ループを形成するために、足場とカップリングされる。その後、 C_1 および C_3 が脱保護され、別の足場にカップリングされる。

30

【0086】

C_1 および C_3 に、たとえばTrtなどの、第1の種類の保護基を備え、 C_2 および C_4 に、たとえばMmtなどの、第2の種類の保護基を備えることも可能である。両種類の保護基は異なる試薬を用いて除去される。このように、どのシステイン残基が足場に結合することができるかを決定することが可能である。

40

【0087】

もちろん、他の組合せを生成することも可能である。前述の実施形態は、たとえば、ペプチド内で C_3 、 C_4 およびそれらのフランキング配列の位置が交換されて、たとえば化学式

$C_1(X)_m(G)_n(X)_p C_4(X)_q(G)_r(X)_s C_2(X)_t(G)_u(X)_v C_3$
のペプチドをもたらすように、修正される。

【0088】

50

原則として、本発明に従う方法は、一次配列が知られているあらゆるたんぱく性分子に応用できる。しかし、好ましい実施形態においては、たんぱく性分子が、シスチン-ノットファミリー、膜貫通たんぱく、TNF-アルファ、HGF-SF、FGF-ベータ、インターロイキン、IL-5、ケモカイン、Gたんぱく結合受容体、CCR4、CXCR5、IGF、LMF、エンドセリン-1、VIP、CGRP、PIF、EGF、TGF-アルファ、EGFRファミリー、HER1、HER2/neu、HER3、HER4、p53、コルチコトロピンRF、ACTH、副甲状腺ホルモン、CCK、サブスタンスP、NPY、GRP、ニューロトロフィン、アンジオテンシン-2、アンジオジェニン、アンジオポイエチン、ニューロテンシン、SLCLC、SARS-由来たんぱく、HIV-由来たんぱく、パピロマウイルス-由来たんぱくおよびFMDVから成る群から選択される、本発明に従う方法が提供される。本発明の方法は、その群の一員から少なくとも部分的に由来する免疫原性化合物および/または結合化合物を生成するのに、特に適していることがわかった。

10

20

30

40

50

【0089】

本発明に従う方法が膜貫通たんぱくの一次配列から少なくとも1つのアミノ酸残基を選択する工程を含む場合、細胞外ドメインから少なくとも1つのアミノ酸残基を選択するのが好ましい。しかし、本発明によれば、細胞外ドメインならびにそのような細胞外ドメインのN-末端方向に位置する3つのアミノ酸残基およびC-末端方向に位置する3つのアミノ酸残基から成る膜貫通たんぱくの配列を考慮したときに、最適な試験結果が得られる。したがって、少なくとも1つのアミノ酸残基が、少なくとも1つの膜貫通たんぱくの配列であって、細胞外ドメイン、その少なくとも1つの膜貫通たんぱくのN-末端の方向に位置する3つのフランキングアミノ酸残基、および、その少なくとも1つの膜貫通たんぱくのC-末端の方向に位置する3つのフランキングアミノ酸残基を含む配列から選択される、本発明に従う方法が提供される。

【0090】

1つの特に好ましい実施形態において、本発明の方法は、シスチン-ノットスーパーファミリーの一員から、好ましくはシスチン-ノット成長因子スーパーファミリーの一員から少なくとも部分的に由来する、免疫原性化合物および/または結合化合物の、存在および/または同定に関する試験に適した化合物を生産するために実行される。

【0091】

成長因子は、生体内および生体外の双方で細胞増殖を誘導する特性を共有するポリペプチドの、比較的大きな群を代表している。成長因子間の配列類似レベルは高くないが、成長因子は、それらの構造的および機能的類似性に基づいて、スーパーファミリーに分類することができる。

【0092】

4つの成長因子である、4つの別々のスーパーファミリー由来の神経成長因子(NGF)、形質転換成長因子-ベータ(TGF-ベータ)、血小板由来成長因子(PDGF)およびヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)の結晶構造は、これらのたんぱくが構造的に関連し、共通した総合的なトポロジを共有することを明らかにした。これらのたんぱくは配列相同性をほとんど示さないが、これらはすべて、「シスチン-ノット」配座を形成するように結合した6つのシステインの異常配置を有する。これらたんぱくの活性型はダイマーであり、ホモダイマーまたはヘテロダイマーのいずれかである。それらの形状のため、シスチン-ノット成長因子がダイマーを形成するための固有の要件があると思われる。この組織化の追加のレベルは、この単純な構造モチーフ周辺で構築される構造の多様性を増大させる。

【0093】

形質転換成長因子-ベータ2(TGF-ベータ2)、血小板由来成長因子(PDGF)、神経成長因子(NGF)およびヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)の結晶構造において、6つの保存されたシステイン残基(配列順にCys I~Cys VI)は、ノット様トポロジに配置された3つのジスルフィド結合を形成する。Cys IIとCys Vとの間([Cys

s II ~ V]) および C y s III と C y s VI との間 ([C y s III ~ VI]) の 2 つのジスルフィド結合は、8 つのアミノ酸の環状構造を形成し、この環状構造を、残りの (C y s I と C y s IV との間) のジスルフィド結合が貫通する (図 1 A 参照)。保存されたシステイン I ~ VI のジスルフィド結合に含まれる硫黄 (S) 原子は、通常 S 1 ~ S 6 と呼ばれる。7 以上のシステイン残基を有するシスチンノットドメインを見出すことができる。「追加の」システイン残基は通常、二量化中に、シスチンノットドメイン内または鎖間ジスルフィド結合内に、さらにジスルフィド結合を創出するのに使用される。しかし、相同性およびトポロジに基づいて、どのシステインが 6 つの保存された残基 C y s I ~ C y s VI を表すのかを示すことは常に可能である (さらに以下を参照)。

【0094】

ジスルフィド結合の類似したノット配置が、いくつかの酵素阻害剤および電位依存性の Ca^{2+} チャンネルに結合する神経毒の構造において述べられている (McDonaldら、1993年、Cell、第73巻、421 - 424頁)。しかし、それらの配列においては、シスチントポロジが異なっている。C y s [III ~ VI] は、C y s [I ~ IV] および C y s [II ~ V] によって形成される大環状環を貫通する。ゆえに、シスチン-ノットたんぱくは、2 つの構造的分類、つまり、成長因子型および阻害剤様シスチンノット、に分類される。

【0095】

シスチン-ノット成長因子スーパーファミリーは、糖たんぱくホルモン (たとえば卵胞刺激ホルモン (F S H))、形質転換成長因子ベータ (T G F-ベータ) たんぱく (たとえば骨形成たんぱく 4)、血小板由来成長因子様 (P D G F 様) たんぱく (たとえば血小板由来成長因子 A)、神経成長因子 (N G F) (たとえば脳由来神経栄養因子) を含むサブファミリーに分けられる (表 1 2 も参照)。

【0096】

すべての成長因子シスチンノットの構造は、ノットの「上に」2 つの歪んだベータ-ヘアピン (ベータ-1 およびベータ-3) ループおよびノットの「下に」1 つの (ベータ-2) ループを備える、類似したトポロジを有する。ベータ-1 ループは、C y s I と C y s I I との間の一連のアミノ酸によって形成される。ベータ-2 ループは、C y s I I I と C y s I V との間のアミノ酸によって形成され、ベータ-3 ループは、C y s I V と C y s V との間のアミノ酸によって形成される (図 1 A 参照)。ヘアピンループの大きさ (つまり、示されるシステイン間のアミノ酸の数) は、ファミリーの構成員間でかなり変動することができる。

【0097】

C y s -ノットたんぱくファミリーには、3 つの異なる「フィンガープリント」、つまり、(1) G F C Y S K N O T、(2) G L Y C O H O R M O N E、および (3) N G F がある。これらのフィンガープリントは、主に、C y s -ノット周囲のアミノ酸の (1) 数および (2) 性質において、互いに異なる。フィンガープリントは特定のたんぱく (サブ) ファミリの特徴を含むので、あるたんぱくが、あるたんぱく (サブ) ファミリーに属するかを決定するのに使用することができる。

【0098】

たとえば、「N G F」は、神経成長因子にサインを付与する 4-要素フィンガープリントである。このフィンガープリントは、5 つの配列の初めのアラインメントに由来している。モチーフはそのアラインメントの C-末端部分の保存領域から得られ、それぞれの領域が、ジスルフィド結合形成に含まれる 6 つの C y s -残基の少なくとも 1 つを含んでいた。モチーフ 2 および 3 は、P R O S I T E パターンの N G F によってコードされる領域にわたっている (P S 0 0 2 4 8 ; [G S R]-C y s I I-[K R L]-G-[L I V]-[D E]-x (3)-[Y W]-x-S-x-C y s I I I)。角括弧内のアミノ酸は、その位置でのあり得るアミノ酸を示す。たとえば、C y s I I に対する N-末端残基は、G l y、S e r または A r g のいずれかであり得る。x はあらゆるアミノ酸を示す。O W L 2 2 . 1 アルゴリズムを使用する 2 回の反復が収束に達することが求められて、その点にて 2 8 の配列を含む真のセットが同定された。S T P R 3 7 _ 9 f のアップデート版は、3 3 の配列の真のセットを

10

20

30

40

50

同定した。

【0099】

「GLYHORMONE」は、糖たんぱくホルモンにサインを付与する4-要素フィンガープリントである。このフィンガープリントは、8つの配列の最初のアラインメントに由来している。モチーフは実質的に全アラインメント長に及ぶ保存領域から得られ、モチーフ2および4は、PROSITEパターンのGLY_HORMONE_ALPHA_1 (PS00779: CysII-x-G-C-CysIII-[FW]-S-[EQS]-A-[FY]-P-T-P)、およびGLY_HORMONE_ALPHA_2 (PS00780: N-H-T-x-CysV-x-CysVI-x-T-Cys-x(2)-H-K)によってコードされる領域を含んでいた。OWL22.1の2回の反復が収束に達することが求められて、その点にて23の配列を含む真のセットが同定された。STPR37_9fのアップデート版は、34の配列の真のセットを同定した。

10

【0100】

「GFCYSKNOT」は、成長因子シスチンノットファミリーにサインを付与する2-要素フィンガープリントである。このフィンガープリントは、25の配列の最初のアラインメントに由来している。モチーフ1は、CysII-x-G-x-CysIIIコンセンサスにわたり (PROSITEパターンのPDGF (PS00249: P-[PSR]-Cys-V-x(3)-R-CysII-[GSTA]-G-Cys-CysIII)、TGFBETA (PS00250: [LIVM]-x(2)-P-x(2)-[FY]-x(4)-CysII-x-G-x-CysIII)、GLY_HORMONE_BETA_1 (PS00261: CysII-[STAGM]-G-[H 20 FYL]-CysIII-x-[ST])、およびNGF (PS00248; [GSR]-CysII-[KRL]-G-[LIV]-[DE]-x(3)-[YW]-x-S-x-CysIII) 参照)、モチーフ2はCysV-x-CysVIパターンにわたる。OWL26.0の4回の反復が収束に達することが求められて、その点にて192の配列を含む真のセットが同定された。いくつかの偽陽性も同定され、それらのほとんどが非常に偏った (システイン-リッチ) 配列である (たとえば、メタロチオネインおよびケラチン)。STPR37_9fのアップデート版は、198の配列の真のセットを同定した。

20

【0101】

本発明は、これらの1つ1つの模倣体、および発見されるこれらのファミリーの構成員の1つ1つの模倣体を、設計し生産する方法を提供する。

30

【0102】

現在、たとえばTNF-アルファ、CD (分化抗原のクラスター)-ファミリー、サイトカイン、抗体または細胞表面受容体といった複合たんぱくの結合部位を、合成ペプチドを用いて模倣することが、たんぱく科学および薬剤開発において最も活発な領域の1つである。多くのたんぱくは、露出した表面の比較的小さい領域を含んだ相互作用を介して、生物活性を発現する。したがって、これらの表面エピトープを模倣する分子は非常に興味深い。なぜなら、それらは、たとえば、たんぱくおよびDNAなどの、ある生理学的分子を認識するたんぱくの能力といった完全たんぱくの生物活性を、比較的小さな合成分子において模倣する手段を提供するからである。短い直鎖ペプチドは、固有の可撓性およびたんぱく分解に対する脆弱性のために、この目的には理想的ではない。代わりに、環化反応によって直鎖ペプチドの鎖を、生物学的に関連のある二次構造を有するループしたペプチド化合物に、束縛するのが好ましい。

40

【0103】

本発明は、シスチン-ノット成長因子ファミリー構成員のペプチド模倣体として適しているループしたペプチド構造の設計のための、合理化された戦略を提供する。ここで使用される「ペプチド模倣体」という用語とは、ある生理学的分子を認識するCys-ノットファミリー構成員の能力を模倣する (合成) ペプチド化合物をいう。さらに、本発明は、少なくとも1つのジスルフィド結合を含むたんぱく性分子 (たとえばシスチン-ノットファミリーの一員) に少なくとも部分的に由来する化合物であって、免疫原性化合物および/または結合化合物の存在および/または同定に関する試験に適した化合物の、生産方法を提供

50

する。

【0104】

本発明の1つの実施形態において、注目するたんぱく性分子は、2つのシステイン残基間のジスルフィド結合を含み、ここで、2つのシステイン残基は一次配列において、互いから最小で3アミノ酸残基、最大で21アミノ酸残基離れて位置する（第1のシステインの位置を x 、第2のシステインの位置を $x+n$ とすると、 $3 \leq n \leq 21$ であることを意味する）。この実施形態において、 $(X)_m C_x (X)_{n-1} C_{x+n} (X)_p$ の化学式の少なくとも1つのペプチドが合成されるのが好ましい。ここで、 C_x および C_{x+n} はそれぞれ位置 x および位置 $x+n$ のシステイン残基を表し、 $(X)_m$ は、 m 個のアミノ酸残基から成りN-末端の方向に位置する C_x のフランキング配列を表し、 $(X)_p$ は、 p 個のアミノ酸残基から成りC-末端の方向に位置する C_{x+n} のフランキング配列を表し、 $(X)_{n-1}$ は、たんぱく性分子の一次配列内の第1システイン残基と第2システイン残基との間に位置する $n-1$ 個のアミノ酸残基を表す。1つの実施形態において、第1のシステイン残基と第2のシステイン残基との間に位置するアミノ酸残基の少なくとも1つが修飾されるが、これは必須ではない。

【0105】

既に説明したように、 C_x および C_{x+n} 以外に、そのペプチド内には他のシステイン残基が存在しないのが好ましい。 $(X)_m$ 、 $(X)_{n-1}$ および/または $(X)_p$ の一部である、たんぱく性分子の一次配列における他のシステイン残基は、そのような「付加的」システイン残基と C_x および/または C_{x+n} との相互作用を避けるために、たとえばアラニンなどの別のアミノ酸残基に変更されるか、あるいは、たとえば保護基を用いて不活性にされるのが好ましい。好ましい実施形態において、化学式 $(X)_m C_x (X)_{n-1} C_{x+n} (X)_p$ のペプチドのセットが生産され、フランキング配列 $(X)_m$ および $(X)_p$ は少なくとも部分的に異なる長さのものであり、 m および p は式 $0 \leq m, p \leq 18$ を満たすのが好ましい。さらに、 $m+n+p$ は、25アミノ酸残基以下の長さのペプチドを生産するために、23よりも小さいかそれに等しいのが好ましい。少なくとも1つのペプチドは、その後、足場にカップリングされる。

【0106】

本発明のさらなる実施形態において、注目するたんぱく性分子は、2つのシステイン残基間のジスルフィド結合を含み、ここで、2つのシステイン残基は一次配列において、互いから22アミノ酸残基以上離れて位置している（第1のシステインの位置を x 、第2のシステインの位置を $x+n$ とすると、 $n \geq 22$ であることを意味する）。この実施形態において、たんぱく性分子の一次配列内の位置 $x + [(n-20)/2]$ のアミノ酸残基にて開始し、位置 $x + [(n+20)/2]$ のアミノ酸残基にて終了する、たんぱく性分子の一次配列の一部が考慮されるのが好ましい。ゆえに、本発明の方法は、その部分を用いて実行されるのが好ましく、これは、その部分の少なくとも1つのアミノ酸が選択されたり、そのアミノ酸の少なくとも1つのフランキング配列が選択されたりなどすることを意味する。したがって、1つの実施形態は、少なくとも1つのアミノ酸残基が少なくとも1つのたんぱく性分子のSS-架橋配列から選択される、本発明に従う方法を提供する。SS-架橋の2つのシステインは、位置 x および $(x+n)$ に位置するのが好ましく、 $n \geq 22$ であり、アミノ酸残基は、アミノ酸位置 $x + [(n-20)/2]$ にて開始し、アミノ酸位置 $x + [(n+20)/2]$ にて終了するSS-架橋配列の領域から選択されるのが好ましい。

【0107】

以下の非限定的な例が、この実施形態を明確にする。2つのシステイン残基が、たんぱく性分子の一次配列の位置1および31に位置する場合、以下の値が使用される： $x=1$ 、 $x+n=31$ および $n=30$ 。その後、アミノ酸位置 $1 + [(30-20)/2] = 6$ にて開始し、アミノ酸位置 $1 + [(30+20)/2] = 26$ にて終了する、2つのシステイン残基間の配列が考慮される。ゆえに、たんぱく性分子の一次配列内の位置6～26の配列が考慮される。位置6～26の配列から少なくとも1つのアミノ酸残基が選択されたり、少なくとも1つのその選択されたアミノ酸残基の、少なくとも1つのフランキング配列が選

択されたりなどする。ここでも、好ましくは異なる長さであり、および／または、好ましくは異なるランキング配列を含む、複数のペプチドが生成されるのが好ましい。

【0108】

n が奇数である場合、値 $[(n - 20) / 2]$ および $[(n + 20) / 2]$ は整数ではない。その場合、結果として生じる値は丸められる。その値よりも小さいか大きい初めの整数値がとられる。たとえば、 $n = 35$ の場合、 $[(n - 20) / 2]$ の値は 7.5 である。その場合、値 7 または 8 のどちらかが選択される。

【0109】

注目するたんぱく性分子が 2 つ以上の内部ジスルフィド結合を含み、各ジスルフィド結合が 2 つのシステイン残基間にある場合、少なくとも 1 つのシステイン残基が選択される本発明の方法が提供されるのが好ましい。したがって、本発明は、少なくとも 1 つのたんぱく性分子の一次配列内の選択されるアミノ酸残基の少なくとも 1 つが、システイン残基である本発明に従う方法を提供する。選択されるアミノ酸残基は、それぞれそのたんぱく性分子のシステイン残基であるのがより好ましい。結果として、このより好ましい実施形態においては、選択されるランキング配列はそれぞれシステイン残基のランキング配列である。少なくとも 1 つのシステイン残基の少なくとも 1 つのランキング配列を含むペプチドが生産される。異なるランキング配列が、1 つのペプチド内で組み合わせられるのが好ましい。さらに好ましい実施形態において、異なる長さのランキング配列を含む複数のペプチドが生産される。この実施形態は、結合化合物および／または免疫原性化合物をスクリーニングするのに特に有用である。なぜなら、通常、ジスルフィド結合を介して互いに結合するシステイン残基のランキング配列は、しばしば相互作用事象と関連があるからである。

10

20

【0110】

シスチンノットファミリーの一員は、2 つ以上のジスルフィド結合を含む。少なくとも 3 つのジスルフィド結合が、システイン残基の 3 対間に存在する。ゆえに、シスチンノットスーパーファミリーの一員は、少なくとも 6 つのシステイン残基を含む（配列順に C y s I ~ C y s VI）。シスチンノットファミリーの一員が注目するたんぱく性分子として考慮される場合、システイン残基の少なくとも 2 つは本発明に従う方法において選択されるのが好ましい。C y s IV および C y s V が選択されるのが最も好ましい。なぜなら、それらの間のシステイン残基およびアミノ酸残基が、必然的にたんぱく性分子内にベータ-3 ヘアピン（B3）ループを形成するからである。このループを模倣するペプチドは、システイン-ノットファミリーの一員のペプチド模倣体として、特に適していることが分かった。

30

【0111】

本発明に従う方法で設計され合成される化合物は、注目する免疫原性化合物および／または結合化合物をスクリーニングするのに特に適している。1 つの実施形態において、本発明に従う複数のペプチドが合成され、たとえば抗体かその機能部分、誘導体および／もしくは類似体、ならびに／または、T 細胞かその機能部分、誘導体および／もしくは類似体などの、注目する結合化合物とインキュベートされる。結合したペプチドは選択され、および／または同定される。したがって、1 つの実施形態は、注目する免疫原性化合物および／または結合化合物の存在および／または同定に関するスクリーニング方法であって

40

、本発明に従う方法によって異なるペプチドを含む複数の化合物を生産する工程と、

それらの化合物の少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つのたんぱく性分子に特異的な抗体かその機能部分、誘導体もしくは類似体、または、少なくとも 1 つのたんぱく性分子に特異的な T 細胞かその機能部分、誘導体もしくは類似体、に特異的に結合することができるかを試験する工程とを、含む方法を提供する。複数の化合物は、所望の特性を備える化合物が存在する機会を増大させるために、少なくとも 10、より好ましくは少なくとも 100、最も好ましくは少なくとも 1000 の化合物を含むのが好ましい。

【0112】

抗体または T 細胞の機能部分は、種類において同じ免疫原性を有する一部として定義さ

50

れ、量において同じ免疫原性を有することは必須ではない。免疫原性とは、抗原を特異的に結合する能力を意味する。抗体またはT細胞の誘導体は、結果として生じる誘導体の免疫原性が、種類において本質的に同じであるように変更された抗体またはT細胞として定義され、量において本質的に同じ免疫原性を有することは必須ではない。誘導体は、たとえば保存的なアミノ酸置換といった、多くの方法で提供することができる。当業者は、抗体またはT細胞の類似化合物を十分に生成することができる。これは、たとえば、ペプチドライブラリのスクリーニングを介してなされる。そのような類似物は、種類において本質的に同じ抗体またはT細胞の免疫原性を有し、量において本質的に同じ特性を有することは必須ではない。

【0113】

1つの実施形態において、本発明のペプチドの免疫原性は、ヒトでない動物に化合物を投与して、免疫応答が誘導されるかを決定することによって試験される。したがって、免疫原性化合物の存在および/または同定に関するスクリーニング方法であって、

本発明に従う方法によって異なるペプチドを含む複数の化合物を生産する工程と、

化合物の少なくとも1つが免疫応答を誘導することができるかどうかを試験する工程とを含む方法が提供される。

【0114】

本発明のペプチドが注目するたんぱく性分子に対して免疫応答を誘導することができるかを試験するのが好ましい。これは、たとえば、ヒトでない動物に本発明のペプチドを与え、ヒトでないその動物から抗体および/またはT細胞を得て、注目するたんぱく性分子（のエピトープ）とその抗体および/またはT細胞をインキュベートし、その抗体および/またはT細胞が注目するたんぱく性分子（のエピトープ）と特異的に結合することができる抗体および/またはT細胞を含むかどうかを決定することによって、実行される。

【0115】

本発明の化合物が注目する免疫原性化合物および/または結合化合物であると思われる場合、その化合物が選択されるのが好ましい。したがって、注目の免疫原性部位または結合部位を含む化合物を選択する工程をさらに含む、本発明に従う方法も、またここで提供される。選択された化合物は同定されるのが好ましい。

【0116】

1つの実施形態においては、選択された化合物は免疫原性化合物および/または結合化合物として直接使用される。別の実施形態においては、選択された化合物は有望な候補化合物として扱われる。これは、さらなる調査が実行されることを意味する。1つの実施形態において、この候補化合物は、スクリーニングの第1ラウンドの後、さらに試験される。たとえば、有望な候補化合物が生体外スクリーニング方法中に選択された場合、たとえばヒトでない動物の生体内にてさらに試験される。1つの実施形態において、この有望な候補化合物は修飾されて、少なくとも1つの改良された特性の存在に関して再び試験される。これは、たとえば置換ネットマッピング（replacement net mapping）で実行され、置換ネットマッピングにおいては複数のペプチドが合成される。各ペプチドにおいて、元々の有望なペプチドの少なくとも1つのアミノ酸残基が、別のアミノ酸残基によって置換される。結果として生じるペプチドは、修飾されたペプチドの少なくとも1つが少なくとも1つの改良された特性を含むかどうかを決定するために、再び試験される。

【0117】

1つの実施形態において、第1のスクリーニングにおいて同定された有望な候補ペプチドは、改良された免疫原性および/または結合特性を有する化合物を検索するために、別のペプチド配列と組合わされる。

【0118】

本発明の方法は、注目する免疫原性および/または結合特性を有する本発明に従う化合物の、生産および/または同定に適している。したがって、本発明に従う方法によって取得可能な、所望の免疫原性および/または結合特性を有する単離、合成または組換え化合物もまた、ここで提供される。その化合物は、足場とカップリングされた、本発明に従う

10

20

30

40

50

ペプチドを含むのが好ましい。この足場は、(ヘテロ)芳香族分子、より好ましくはハロメチルアレーン、ビス(プロモメチル)ベンゼン、トリス(プロモメチル)ベンゼンまたはテトラ(プロモメチル)ベンゼンを含むのが好ましい。この足場は、少なくとも1つのメタ-ジプロモキシレン(m-T2)足場、少なくとも1つの2,4,6-トリス(プロモメチル)メシチレン(T3)足場、および/または少なくとも1つの1,2,4,5-テトラプロモジュレン(T4)足場を含むのが最も好ましい。本発明に従う化合物は、広範な種々の用途に適している。たとえば、本発明に従う化合物は治療の用途に用いられる。本発明に従う化合物は、たとえば、受容体-リガンド結合対に対するアゴニストまたはアンタゴニストとしての使用に適している。1つの実施形態において、所望の免疫原性を有する化合物が合成され選択される。したがって、本発明は、本発明に従う方法によって取得可能な免疫原性化合物を提供する。この免疫原性化合物は、たとえば、本発明の方法によって取得可能な免疫原性ペプチドから成る。しかし、本発明に従う免疫原性化合物は、免疫原性ペプチドの安定性および生物活性を改良するために、足場に結合された免疫原性ペプチドを含むのが好ましい。1つの実施形態において、本発明に従う免疫原性ペプチドは、少なくとも2つのSH-官能基を介して(ヘテロ)芳香族分子、好ましくはハロメチルアレーンに結合される。なぜなら、このようなカップリング反応は、(あらゆる付加的システイン残基を除いて)その免疫原性ペプチドのアミノ酸残基を保護する必要なく、水溶液内でさえ、容易にかつ迅速に実行されるからである。さらに、結果として生じる免疫原性化合物は安定しており、ペプチドは生物学的に重要な構造を含む。特に好ましい実施形態において、本発明に従う免疫原性ペプチドは、ビス(プロモメチル)ベンゼン、トリス(プロモメチル)ベンゼンまたはテトラ(プロモメチル)ベンゼンにカップリングされる。少なくとも1つのメタ-1,3-ビス(プロモメチル)ベンゼン(m-T2)、オルト-1,2-ビス(プロモメチル)ベンゼン(o-T2)、パラ-1,4-ビス(プロモメチル)ベンゼン(p-T2)、メタ-1,3-ビス(プロモメチル)ピリジン(m-P2)、2,4,6-トリス(プロモメチル)メシチレン(T3)、メタ-1,3-ビス(プロモメチル)-5-アジドベンゼン(m-T3-N3)および/または1,2,4,5-テトラプロモジュレン(T4)足場にカップリングされる免疫原性ペプチドを含む、免疫原性化合物が提供されるのが最も好ましい。

【0119】

さらに、本発明は、本発明に従う方法によって取得可能な免疫原性化合物を含む免疫原性組成物を提供する。1つの実施形態において、この免疫原性化合物は、たとえば食塩溶液といった適した担体、および/もしくはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミン(たとえばBSAまたはRSA)、オボアルブミン、ジフテリア毒素(DT)、ウイルス様粒子などのたんぱく担体、または当該技術でよく知られているあらゆる他の適した担体に結合される。しかし、足場にカップリングされた本発明に従う免疫原性化合物の使用は、しばしば担体を使用する必要性を除去する。これは、そのような付加的担体に対して特異的に向けられる免疫応答が避けられるという利点を提供する。したがって、1つの実施形態は、足場に結合された免疫原性ペプチドを含む免疫原性化合物を含む免疫原性組成物を提供し、この免疫原性組成物は(本質的に)付加的担体を欠いている。1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、たとえば完全フロインドアジュバント(FCA)、不完全フロインドアジュバント(IFA)、水中油滴(O/W型)エマルジョンもしくは二重水中油滴(O/W/O型)エマルジョン、アルミニウム塩アジュバント、Montanide ISA、MF59、水酸化アルミニウム、Titermax、RIBI、サポニン、および/またはCoVaccineなどの適したアジュバントを含む。本発明に従う免疫原性組成物は、経口で、もしくはエアロゾルによって投与されるのが好ましく、または、筋肉内に、皮下に、もしくは高圧無針経皮的注射を介して、注射されるのが好ましい。治療的および/または予防的用途において使用される、本発明に従う(免疫原性)ペプチドおよび/または(免疫原性)化合物の投与量範囲は、厳密なプロトコール要件が存在し、ここでさらなる説明を必要としない、臨床試験における病院での上昇投与量試験に基づいて設計される。通常、体重1キログラムあたり1 μ g~1mgの投与量が使用される。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 0 】

好ましい実施形態は、本発明に従う少なくとも2つの異なる免疫原性ペプチドを含む、本発明に従う免疫原性組成物を提供する。これらの少なくとも2つの異なる免疫原性ペプチドは、注目するたんぱく性分子に対して特異的に向けられる免疫応答を誘導することができるのが好ましい。これらの少なくとも2つの異なる免疫原性ペプチドは、宿主の少なくとも50%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも95%において、注目するたんぱく性分子に対して特異的に向けられる防御免疫応答を誘導することができるのが最も好ましい。ここで、たんぱく性分子に対する防御免疫応答は、そのたんぱく性分子の少なくとも1つの特性を弱めることが可能な免疫応答として定義される。

10

【 0 1 2 1 】

1つの実施形態において、本発明のこれらの異なるペプチドはそれぞれ、宿主の少なくとも50%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも95%において、たんぱく性分子に対する防御免疫応答を誘導することができる。しかし、1つの実施形態において、本発明の単一のペプチドはそれぞれ、単独では注目するたんぱく性分子に対して防御免疫応答を本質的に誘導することができないが、本発明に従う少なくとも2つのペプチドの組合せは、宿主の少なくとも50%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも95%において、たんぱく性分子に対する防御免疫応答を誘導することができる。この場合、本発明に従う少なくとも2つの免疫原性ペプチドを含む免疫原性組成物が特に好ましい。

20

【 0 1 2 2 】

本発明に従う少なくとも2つの免疫原性化合物を含む本発明の免疫原性組成物は、自己抗原に対する免疫付与に特に適している。自己抗原に対する免疫応答が所望される場合、免疫応答を誘導することができるのに十分なほど修飾された自己抗原でありながら、同時に、誘導された免疫応答が自己抗原を認識することができるように、元々の自己抗原に十分に類似する自己抗原が使用されるのが好ましい。このような修飾された自己抗原での免疫付与は通常、修飾自己抗原の非修飾自己抗原との類似性の観点から、効果的な免疫応答をもたらさない。しかし、本発明に従う少なくとも2つの免疫原性ペプチドの組合せは、この問題を少なくとも部分的に解決する。なぜなら、このような組合せは、よりよく防御免疫応答を誘導することができるからである。

30

【 0 1 2 3 】

1つの実施形態において、本発明に従う少なくとも2つの異なる免疫原性ペプチドが同じ足場に結合される。たとえば、ペプチドが別の立体配座に固定されるため、異なる三次元定位が得られるため、および/または、多価数の結果として、免疫付与は増大される。

【 0 1 2 4 】

本発明に従う方法によって取得可能な免疫原性ペプチドおよび/または免疫原性化合物は、たとえばヒトでない動物において免疫応答を誘導するのに適している。その後、免疫原性ペプチドおよび/または免疫原性化合物を特異的に結合することができる抗体および/またはT細胞を単離することが可能である。代わりに、またはさらに、本発明の免疫原性ペプチドおよび/または免疫原性化合物を特異的に結合することができる、抗体、T細胞、またはその機能部分、誘導体および/もしくは類似体が、たとえば未感作T細胞を、本発明に従う免疫原性ペプチドによって刺激された抗原提示細胞とインキュベートすることによって、生体外で生成される。したがって、1つの実施形態は、注目する免疫原性化合物および/または結合化合物を選択する工程と、免疫原性化合物を特異的に結合することができる抗体、T細胞、またはその機能部分、誘導体および/もしくは類似体を生産する工程とをさらに含む、本発明に従う方法を提供する。したがって、本発明に従う方法によって取得可能な免疫原性ペプチドおよび/または免疫原性化合物を特異的に結合することができる、単離された、または合成された抗体、T細胞、またはその機能部分、誘導体

40

50

および／もしくは類似体も、ここで提供される。

【0125】

本発明は、さらに、本発明に従う結合化合物を含むアレイを提供する。このようなアレイは、リガンドまたは受容体などの特定の分子の存在に関して、サンプルをスクリーニングするのに特に適している。

【0126】

本発明は、さらに、本発明に従う方法によって取得可能な免疫原性ペプチドおよび／または免疫原性化合物を含むアレイを提供する。このようなアレイは、本発明に従う免疫原性ペプチドおよび／または免疫原性化合物を特異的に結合することができる抗体および／またはT細胞の存在に関して、サンプルをスクリーニングするのに特に適している。たとえば、個体から得られるサンプルは、その個体が注目するたんぱく性分子を特異的に結合することができる抗体および／またはT細胞を含むかどうかを決定するために、本発明に従うアレイでスクリーニングされる。このような抗体および／またはT細胞がサンプルに存在すると思われる場合、その個体は注目するたんぱく性分子の存在を含む病気を患っているか、患う危険があるということが示唆される。その病気（の危険）は、たとえば病原体の感染、悪性細胞の存在、自己免疫疾患などによって引き起こされる。

10

【0127】

さらなる実施形態は、本発明に従う、抗体、T細胞、またはその機能部分、誘導体および／もしくは類似体を含むアレイを提供する。本発明のこのような抗体、T細胞、機能部分、誘導体および／または類似体は、本発明の免疫原性化合物を特異的に結合することができ、たとえば、そのアレイはサンプル中の免疫原性化合物の存在を決定するのに適している。さらに、その免疫原性化合物が注目する免疫原性たんぱく性分子のペプチド模倣体である場合、本発明の抗体、T細胞、機能部分、誘導体および／または類似体はまた、その注目するたんぱく性分子を特異的に結合することができる。その場合、そのアレイは、注目するたんぱく性分子のサンプル中における存在を決定するのにも適している。

20

【0128】

発明の詳細な説明

シスチン-ノット成長因子ファミリーの種々の構成員の調査は、シスチン-ノット成長ファミリー構成員のベータ-3ヘアピン(B3)ループのアミノ酸配列に由来し、独特な特徴を有するペプチドが、ペプチド模倣体としての使用に特に適していることを明らかにした。したがって、シスチン-ノット成長因子ファミリーの一員のペプチド模倣体が提供され、そのペプチド模倣体は、シスチン-ノット成長因子ファミリー構成員のベータ-3ヘアピン(B3)ループのアミノ酸配列に由来するポリペプチドを含む。このポリペプチドにおいては、2つのアミノ酸残基が、足場を介して互いに共有結合された第1および第2システイン残基によって置換され、a)第1足場付着システイン残基は、野生型B3-ループにおけるアミノ酸CysIVに対応する位置からp残基C-末端方向に位置して、位置CysIV+pとして示され、ここで5-p-12である。b)第2足場付着システイン残基は、野生型B3-ループにおけるアミノ酸CysVに対応する位置からq残基N-末端方向に位置して、位置CysV-qとして示され、ここで4-q-12であり、(p-q)は-3, -2, -1, 0, 1, 2または3である。また、c)ポリペプチドの長さは位置CysIV+xのアミノ酸から位置CysV+yのアミノ酸までであり、x+y=-1, 0, 1または2の条件下で、-5x1および1y6である。これらの基準を満たすループしたペプチド構造は、動物において特異的な抗体応答を誘導する能力によってとりわけ明らかのように、Cys-ノットファミリー構成員の模倣体として好適に使用されることがわかった。

30

40

【0129】

ゆえに、B3-ループの天然の立体配座に十分に類似するループしたペプチド構造を達成するために、ポリペプチドの長さ、および、ポリペプチドを足場に付着(環化)されるポリペプチド内のシステイン残基の位置に関して、満たされるべきいくつかの一般的基準がある。ペプチド長は足場の性質にも依存するだろう。これらの一般的基準は、Cys-ノット成長因子ファミリー構成員のすべての構成員においてB3ループの「底」に位置する

50

保存残基 C y s IVおよび C y s Vに関する（図 1 B 参照）。天然のたんぱくにおいて、B 3-ループは複雑なノット-構造の結果として形成され、C y s IVと C y s Vとの間のジスルフィド結合によって形成されるのではないことに注目すべきである。本発明のペプチド模倣体においては、足場分子がポリペプチドを束縛して、B 3-ループを模倣する二次構造を誘導する。足場は、ポリペプチドの末端よりもむしろ、ポリペプチド内のシステインに付着され、ペプチド模倣体は A-形分子として図式的にみなすことができる（図 1 C 参照）。本発明のペプチド模倣体はまた、化学的に結合したペプチド足場（chemically linked peptide scaffold）とも呼ばれ、C L I P S として短縮表記される。

【 0 1 3 0 】

任意の C y s - ノットたんぱくファミリー構成員の B 3-ループならびに残基 C y s IVおよび C y s V の同定を、一次アミノ酸配列の配列アラインメントに基づいてすることができる。表 1 3 は、異なる哺乳類の C y s - ノット成長因子ファミリーの種々の構成員の、そのようなアラインメントを示したものである。B 3 ループは、保存残基 C y s IVにて開始し、残基 C y s V に対する N-末端側の残基にて終了する。この残基を残基 C y s V - 1 ともいう。一度保存 C y s IVおよび C y s V 残基が同定されれば、ポリペプチドの適した長さおよびポリペプチドの足場への付着のためのシステインの位置は、容易に決定することができる。

【 0 1 3 1 】

表 1 4 A ~ 1 4 E は、C y s - ノット成長因子ファミリーの 5 つの異なるサブファミリーに関して、6 つの保存 C y s 残基（C y s I ~ C y s VI）の位置を記載している。たとえば、h C G - アルファは、位置 7 , 1 2 , 2 8 , 3 1 , 3 2 , 5 9 , 6 0 , 8 2 , 8 4 および 8 7 にそれぞれ位置する、1 0 のシステイン残基（C - 1 ~ C - 1 0）を含む。この配列アラインメントに基づくと、h C G の C - 2 は C y s I に、C - 3 は C y s II に対応し、C - 4 は「追加の」システインであり、C - 5 は C y s III に対応する。ゆえに、h C G の場合、残基 C y s 6 0 が C y s IV に、残基 C y s 8 2 が C y s V に対応する。別の例として、G L H B サブファミリー構成員 F S H - ベータにおいては、C y s 5 1 が C y s IV に、C y s 8 2 が C y s V に対応する。同様の様式で、他の C y s - ノットファミリー構成員についても、C y s IV および C y s V 残基は容易に同定することができる。

【 0 1 3 2 】

満たされるべき第 1 および第 2 の基準は、システインが導入され、そのシステインを介してポリペプチドが足場に付着される位置を定義する。第 1（つまり、B 3-ループの配列に基づく N-末端システイン）および第 2（つまり C-末端）システインの位置は、天然のたんぱくに最適に類似する二次構造を誘導する足場の能力に関連すると考えられる。そのポリペプチド内の第 1 システイン残基は、野生型たんぱくの B 3-ループにおけるアミノ酸 C y s IV に対応するアミノ酸位置から、C-末端方向（つまり「下流」）に位置する。この位置は位置 C y s IV + p として示すことができる。位置 C y s IV への距離は、少なくとも 5 残基、最高で 1 2 残基でなければならない。言い換えれば、第 1 の足場付着システインの位置は位置 C y s IV + p に対応し、5 ≤ p ≤ 1 2 である。第 2 の足場付着システイン残基は、野生型たんぱくの B 3-ループにおけるアミノ酸 C y s V に対応するアミノ酸位置から、N-末端方向（つまり「上流」）に位置する。この位置は位置 C y s V - q として示すことができる。位置 C y s V への距離は、少なくとも 4 残基、最高で 1 2 残基でなければならない。言い換えれば、第 2 の足場付着システインの位置は位置 C y s V - q に対応し、4 ≤ q ≤ 1 2 である。さらに、ヘアピン形成を乱すことなく両システインを 1 つの足場に結合させることができるように、両システインはおおよそ互いに反対に位置するのが重要である。その理由のため、(p - q) は - 3 , - 2 , - 1 , 0 , 1 , 2 または 3 であることが必要である。たとえば、ポリペプチドが足場に付着されるシステインの位置は、アミノ酸位置 C y s IV + 1 2 および C y s V - 1 0、C y s IV + 1 1 および C y s V - 1 0、C y s IV + 1 0 および C y s V - 8、C y s IV + 9 および C y s V - 8、C y s IV + 8 および C y s V - 6、C y s IV + 7 および C y s V - 5、C y s IV + 7 および C y s V - 6、C y s IV + 7 および C y s V - 4、C y s IV + 5 および C y s V - 4、ま

10

20

30

40

50

たは $Cys IV + 6$ および $Cys V - 4$ に対応する。システインに関して好ましい位置は、 $Cys IV + 10$ および $Cys V - 8$ 、 $Cys IV + 7$ および $Cys V - 6$ 、または $Cys IV + 8$ および $Cys V - 6$ である。第 1 および第 2 のシステインの位置が位置 $Cys IV + 10$ および $Cys V - 8$ に対応する、本発明に従うペプチド模倣体が提供されるのが最も好ましい。

【0133】

第 1 および第 2 のシステインは、結晶構造において、互いに 6 までの距離内であり、側鎖が同方向を向くアミノ酸の位置に導入されるのが好ましい。側鎖は、表面に露出せず、それでも、B 1-および B 3-ループをとともに維持する、いわゆる疎水性コアに加わるのが好ましい。

10

【0134】

満たされるべき第 3 の基準は、ペプチド長に対する制限を提示する。この基準によれば、ポリペプチドの長さは、位置 $Cys IV + x$ のアミノ酸から位置 $Cys V + y$ のアミノ酸である。ここで、 $x + y = -1, 0, 1$ または 2 の条件下で $-5 \leq x \leq 1$ 、 $1 \leq y \leq 6$ である。言い換えれば、ポリペプチドの第 1 の残基は残基 $Cys IV + x$ に、最後の残基は $Cys V + y$ に対応する。 $x + y = -1, 0, 1$ または 2 であるという条件は、ポリペプチドの足場への付着後に、A-形分子の「足」(図 1C 参照)が、ポリペプチドの第 1 および最後の残基がヘアピン構造において「隣接」する残基となることを、確実にするための長さにおおよそ匹敵することを確実にする。たとえば、ペプチドの長さは、 $Cys IV + 1$ から $Cys V + 1$ まで、 $Cys IV - 5$ から $Cys V + 6$ まで、 $Cys IV - 3$ から $Cys V + 4$ まで、 $Cys IV - 5$ から $Cys V + 4$ まで、または $Cys IV - 2$ から $Cys V + 4$ までである。ポリペプチドの長さは、 $Cys IV + 1$ から $Cys V + 1$ まで、 $Cys IV - 2$ から $Cys V + 4$ まで、または $Cys IV - 5$ から $Cys V + 4$ までであるのが好ましい。FSH ベータの場合、これは、ポリペプチドが、たとえば、アミノ酸 52 ($Cys 51 + 1$) からアミノ酸 83 ($Cys 82 + 1$)、またはアミノ酸 46 ($Cys 51 - 5$) からアミノ酸 86 ($Cys 82 + 4$) までの一連のアミノ酸残基に対応することを意味する。

20

【0135】

用語「に由来する」は、ポリペプチド配列が、天然の Cys -ノットたんぱくの B 3-ループに見られるアミノ酸配列と、同一でなくてもよいことを示すのに使用される。むしろ、ほとんどの場合、ポリペプチドは、導入された 2 つのシステイン残基に加えて、 Cys -ノットファミリーの野生型たんぱくにおける B 3-ループの配列とは、少なくとも 1 つのアミノ酸が異なる。以下に記載するように、前述の 2 つの位置の 2 つのシステイン以外の天然の配列におけるあらゆるシステイン残基は、第 1 および第 2 のシステイン以外の残基を介したポリペプチドの足場への付着を防止するために、足場と反応しない残基に変更されるのが好ましい。

30

【0136】

以上の基準に基づいて、本発明は、 Cys -ノット成長因子ファミリーのあらゆる公知の、または今後同定される構成員であって、たとえば糖たんぱくホルモン-ベータ (GLHB) ファミリー、血小板由来増殖成長因子 (PDGF) ファミリー、形質転換成長因子 (TGF) ファミリー、神経成長因子 (NGF) ファミリーまたは糖たんぱくホルモン-アルファ (GLHA) ファミリーの一員である構成員の、ペプチド模倣体を提供する。

40

【0137】

前述のように、ここで提供されるペプチド模倣体において、足場分子は、ポリペプチドを物理的に束縛して、B 3-ループを模倣する二次構造を誘導する。以下の実施例は、ここで提供されるようなペプチド模倣体における足場の存在の妥当性を実証する。第 1 および第 2 のシステインが適した足場を介して結合されると、結果として生じるペプチドは非常に効果的な免疫原になると思われる。反対に、1 つのペプチド分子内の第 1 および第 2 のシステインが互いに反応してジスルフィド架橋を形成すると、結果として生じるループしたペプチド構造は、試験動物において特有の免疫応答を誘導するのに使用することができない。足場によって付与される物理的束縛は、天然の Cys -ノットファミリー構成員の

50

B 3 -ループの二次構造を模倣するヘアピン構造の形成に重要であると考えられる。

【0138】

種々のタイプの足場を、本発明に従うループしたペプチド構造において使用することができる。適した足場は、ループしたペプチド構造を形成するために、ポリペプチド内の第1および第2のシステインと反応することができるものである。特に興味深い足場分子は（ヘテロ）芳香族化合物であり、特に、ハロメチルアレーンなどの少なくとも2つのベンジルハロゲン置換基を有するものである。これらの化合物はチオール基に対する反応性が非常に高く、システイン残基を含むペプチドと共有結合を迅速に形成する。1つの実施形態において、足場はビス(ハロメチル)ベンゼンもしくはテトラ(ハロメチル)ベンゼン、またはそれらの誘導体である。好ましい実施形態において、足場はオルト-、メタ-およびパラ-ジハロメチルベンゼン（ジハロキシレンとしても知られる）ならびに1,2,4,5-テトラハロメチルベンゼン（1,2,4,5-テトラハロジュレンとしても知られる）から成る群から選択される。足場は、メタ-ジプロモキシレン（m-T2）または1,2,4,5-テトラプロモジュレン（T4）であるのがより好ましい。ここで使用される用語「足場」は、本発明のペプチド模倣体を作製するために使用することができる未反応分子（たとえばメタ-ジプロモベンゼン）を、および、システインと既に反応して、ジプロモベンゼンの場合、もはやハロゲン原子を含まない、結果として生じるペプチド模倣体内の足場部分を、指すことに注意すべきである。これらの足場でペプチド模倣体を構成する方法は、国際公開第2004077062号パンフレットで説明されている。

10

20

【0139】

非常に有用なペプチド模倣体を生成した足場およびペプチドの組合せが、いくつか観察された。1つの実施形態において、ループしたペプチド構造は、メタ-ジハロキシレン足場、好ましくはメタ-ジプロモキシレンに付着される、Cys IV+1からCys V+1までの長さを有するポリペプチドを含む。たとえば1,2,4,5-テトラプロモジュレンといったテトラハロジュレン足場への付着のための好ましいペプチド長は、Cys IV-2からCys V+4までである。

【0140】

ループしたペプチド構造が足場上に形成されるシステインの位置に関して、特に有用な位置が、成長因子のCys-ノットスーパーファミリの異なるサブファミリについて、同定された。

30

【0141】

GLBH、PDGFまたはTGFサブファミリの一員の模倣体を得るためのシステインの好ましい位置は、Cys IV+10とCys V-8との組合せである。FSHの場合、これは残基61および74に、VEGFの場合、残基78および94に、GDNFの場合、残基112および124に対応する。しかし、GLBHファミリ構成員に関しては、位置Cys IV+12およびCys V-10、Cys IV+8およびCys V-6、またはCys IV+7およびCys V-5もまた、良好な結果をもたらす。同様に、PDGF-ファミリ構成員については、位置Cys IV+8およびCys V-6またはCys IV+12およびCys V-10が、TGFファミリ構成員については、位置Cys IV+10およびCys V-10またはCys IV+7およびCys V-4が、適切に使用される。

40

【0142】

1つの好ましい実施形態は、本発明に従うVEGFペプチド模倣体を提供する。この模倣体においては、第1のシステインの位置はアミノ酸位置Cys IV+8に対応し、第2のシステインの位置は位置Cys V-6に対応する。また、ポリペプチドはVEGFたんぱく質のB3-ループに由来する。

【0143】

NGF-ファミリに属する構成員の模倣体を得るためのシステインの好ましい位置は、Cys IV+7およびCys V-6である（NGFの場合、残基87および102）。NGFファミリ構成員のためのシステイン位置の他の有用な組合せは、Cys IV+5およびCys V-4、Cys IV+9およびCys V-8、ならびにCys IV+11およびCys V

50

- 10を含む。

【0144】

GLHA-ファミリーに属する構成員の模倣体を得るためのシステインの好ましい位置は、CysIV+8およびCysV-6である(CGの場合、残基68および76)。GLHA-ファミリー構成員のためのシステイン位置の他の有用な組合せは、CysIV+6およびCysV-4を含む。

【0145】

1つの実施形態において、本発明はGLBH-、PDGF-またはTGF-ファミリーの一員の模倣体を提供する。ここで、模倣体は、2つのシステインを介して足場に付着されたループしたペプチド構造であって、構成員のベータ3-ヘアピンループのアミノ酸配列に由来するポリペプチドから成り、ポリペプチドの長さはアミノ酸位置CysIV-5からCysV+4までであり、ポリペプチドは位置CysIV+10の第1のシステインおよび位置CysV-8の第2のシステインを介して、テトラハロメチルベンゼン足場、好ましくはテトラプロモジュレンに付着される。別の実施形態において、ポリペプチドはシステインを介して、たとえばジプロモベンゼンといった二官能化された足場に付着され、ペプチドの長さは、たとえばアミノ酸CysIV+1からCysV+1までと、幾分短い。

10

【0146】

別の実施形態において、本発明はGLBH-、PDGF-またはTGF-ファミリーの一員の模倣体を提供する。ここで、模倣体は2つのシステインを介して足場に付着されたループしたペプチド構造であって、構成員のベータ3-ヘアピンループのアミノ酸配列に由来するポリペプチドから成り、ポリペプチドの長さはアミノ酸位置CysIV-5からCysV+4までであり、ポリペプチドは位置CysIV+10の第1のシステインおよび位置CysV-8の第2のシステインを介して、テトラハロメチルベンゼン足場、好ましくはテトラプロモジュレンに付着される。別の実施形態において、このポリペプチドはシステインを介して、たとえばジプロモベンゼンといった二官能化された足場に付着され、ペプチドの長さは、たとえばアミノ酸CysIV+1からCysV+1までと、幾分短い。

20

【0147】

さらに別の実施形態において、本発明はGLBH-、PDGF-またはTGF-ファミリーの一員の模倣体を提供する。ここで、模倣体は2つのシステインを介して足場に付着されたループしたペプチド構造であって、構成員のベータ3-ヘアピンループのアミノ酸配列に由来するポリペプチドから成り、ポリペプチドの長さはアミノ酸位置CysIV-5からCysV+4までであり、ポリペプチドは位置CysIV+10の第1のシステインおよび位置CysV-8の第2のシステインを介して、テトラハロメチルベンゼン足場、好ましくはテトラプロモジュレンに付着される。別の実施形態において、このポリペプチドはシステインを介して、たとえばジプロモベンゼンといった二官能化された足場に付着され、ペプチドの長さは、たとえばアミノ酸CysIV+1からCysV+1までと、幾分短い。

30

【0148】

さらなる側面において、本発明はNGF-ファミリーの一員の模倣体を提供する。ここで、模倣体は2つのシステインを介して足場に付着されたループしたペプチド構造であって、構成員のベータ3-ヘアピンループのアミノ酸配列に由来するポリペプチドから成り、ポリペプチドの長さはアミノ酸位置CysIV-5からCysV+4までであり、ポリペプチドは位置CysIV+10の第1のシステインおよび位置CysV-8の第2のシステインを介して、テトラハロメチルベンゼン足場、好ましくはテトラプロモジュレンに付着される。別の実施形態において、このポリペプチドはシステインを介して、たとえばジプロモベンゼンといった二官能化された足場に付着され、ペプチドの長さは、たとえばアミノ酸CysIV+1からCysV+1までと、幾分短い。

40

【0149】

ポリペプチド長がCysIVおよび/またはCysV残基を含む場合、これは、少なくともこ(れら)のシステインは、足場との化学反応を避けるためにポリペプチド中に存在すべきではないことを意味する。たとえば、これらのシステインは、上述の2つのシステイ

50

ン以外のシステインを介して足場にポリペプチドが付着するのを避けるために、たとえばアラニン残基といった足場と反応しない残基に変更することが可能である。同様に、天然の配列におけるあらゆる他のシステイン残基は、非システイン残基に変更されるべきである。たとえば、本発明は特定の側面において、メタ-ジプロモベンゼンに付着される配列 T F K E L V Y E T C R V P G A A H H A D S L C T Y P V A T Q A H を有する F S H の B 3 - ループに由来するポリペプチドから成る、F S H のペプチド模倣体を提供する（実施例 3 も参照）。ポリペプチド長は C y s I V + 1 (T h r 5 2) から C y s V + 1 (H i s 5 2) までの一連のアミノ酸残基に対応する。下線で示される第 1 の C は位置 C y s I V + 1 0 (F S H における V a l 6 1) に、第 2 の C は位置 C y s V - 8 (F S H における T y r 7 4) に対応する。F S H における残基 C y s 6 6 は、足場との不所望の相互作用を妨げるために、このポリペプチド中には存在しない。F S H に由来するこのポリペプチド中において、それは（3つのアラニン残基の第 1 の）アラニンである。天然の F S H の配列に関して、同様のアミノ酸変更を、足場 1, 2, 4, 5 - テトラプロモジュレンに付着されるポリペプチド K I Q K T A T F K E L V Y E T C R V P G A A H H A D S L C T Y P V A T Q A H A G K (C y s I V - 5 から C y s V + 4 に対応) から成る本発明の別の F S H ペプチド模倣体において、見出すことができる。しかし、この場合、F S H における C y s 8 4 (C y s V I に対応) もまた、F S H においてみられるように、アラニンに変更されて、最後の 5 つの残基が C H C G K の代わりに A H A G K となっている。

10

【 0 1 5 0 】

保護されたアミノ酸を含むポリペプチドを使用して、そのアミノ酸の不所望の反応性を避けることも可能である。1つの実施形態において、ポリペプチドは、足場への付着が意図される 2 つのシステインに加えて、除去可能な保護基 C y s (S t B u) で保護されたシステイン残基（たとえば C y s I V に対応する残基）を含む。本発明のペプチド模倣体を生成するための足場への付着に続いて、この保護基は、たとえば 1, 4 - D D T またはエタンジチオールを用いた還元的処理によって容易に除去することが可能である。

20

【 0 1 5 1 】

さらなる側面において、ペプチド模倣体が、ポリペプチドを 2 つのシステインを介して足場に付着させることによって生成される。ここで、ポリペプチドは B 3 - ループに由来するが、1つ以上のアミノ酸残基がバイオイソステリックユニットによって置換される。バイオイソステリック置換は、生物活性分子における官能基の、類似の大きさおよび物理化学的特性を有する別の官能基による置換として定義することができる。バイオイソステリック置換は、薬剤候補の特性（活性、選択性、輸送）を最適化するために、不所望の副作用を除去するために、または、より合成しやすい分子を設計するために、医薬品産業において使用されている。バイオイソステリック置換は物理化学的または位相的な根拠による。

30

【 0 1 5 2 】

さらなる側面において、本発明は h C G のペプチド模倣体を提供する。この模倣体は、h C G の B 3 - ループに類似するループした構造を形成するために、足場としての 1, 2, 4, 5 - テトラプロモジュレンに付着されるポリペプチド V V A N Y E D V K F E S C R L P G A P R G V N P V C S Y A V A L S A Q A A L から成るペプチド模倣体を提供する。位置 6 1 (C y s I V + 1 0) および 7 4 (C y s V - 8) の 2 つのシステイン（下線で示す）が、配列に組み込まれた。野生型たんぱくにおける位置 5 1 (C y s I V)、6 6、8 2 (C y s V) および 8 4 (C y s V I) のシステイン（表 1 3 参照）は、アラニン残基に変更された。ポリペプチドの長さは h C G における C y s I V - 2 (V a l 4 9) から C y s V + 4 (L e u 8 6) までの一連のアミノ酸残基に対応する。配列 N Y R D V R F E S C R L P G A P R G V N P V C S Y A V A L S A Q のポリペプチドを含むペプチド模倣体もまた提供され、このペプチドは下線で示されるシステインを介して足場 m - T 2 に付着される。

40

【 0 1 5 3 】

足場 m - T 2 に付着される配列 T F K C L V Y E T V R V P G A A H H A D S L Y T Y

50

P V A C Q A H のポリペプチドを含む F S H ペプチド模倣体、足場 m - T 2 に付着される配列 T F K E L V Y E T C R V P G D A H H A D S L C T Y P V A T Q A H のポリペプチドを含む F S H ペプチド模倣体、足場 T 3 に付着される配列 T F K E L V Y E T C R V P G A A H H A D S L C T Y P V A T Q A H のポリペプチドを含む F S H ペプチド模倣体、足場 m - T 2 に付着される配列 T F K E L V Y E T C R V P G D A H H A D K L C T Y P V A T Q A H のポリペプチドを含む F S H ペプチド模倣体、足場 m - T 2 に付着される配列 T F K E L V Y E T C R V P G D A H K A D S L C T Y P V A T Q A H のポリペプチドを含む F S H ペプチド模倣体、足場 m - T 2 に付着される配列 E S N C T M Q I M R I K P H Q G Q H I G E M S C L Q H のポリペプチドを含む V E G F ペプチド模倣体、足場 m - T 2 に付着される配列 E E S N C T M Q I M R I K P H Q G Q H I G E M S C L Q H N のポリペプチドを含む V E G F ペプチド模倣体、および 2 つの足場 m - T 2 に付着される配列

N Y E D V K F E S C R L P G C P R G V N P V C S Y A V A L S A Q
S
S

N Y R D V R F E S C R L P G C P R G V N P V C S Y A V A L S A Q

のポリペプチドを含む h C G ペプチド模倣体もまた提供される。例において示されるように、これらのペプチド模倣体は F S H、h C G および V E G F - 特異的血清を誘導するのに特に適している。

【 0 1 5 4 】

さらに、本発明は、本発明のペプチド模倣体の調製方法に関する。本発明に従うループしたペプチド化合物を作製する方法であって、修飾されたポリペプチドおよび足場を用意する工程と、ポリペプチドの足場への共有結合を許容する条件下でポリペプチドと足場とを接触させる工程とを含む方法が提供される。接触は溶液中、より好ましくは水溶液中で実行されるのが好ましい。修飾ポリペプチドは注目するたんぱくの B 3 - ループに由来する配列を有し、ポリペプチドの長さは前述の基準を満たし、ポリペプチドは先に詳細に記載した位置に第 1 および第 2 のシステイン残基を含む。ポリペプチドは合成ペプチドであり得る。合成は、標準の固相ペプチド合成またはポリペプチドを生産する他のあらゆる方法を用いて実行することができる。足場は、ポリペプチドの第 1 および第 2 システインと共有結合を形成することができる 2 つの反応基を含むことが好ましく、これによってループしたペプチド構造の形成を誘導する。カップリング反応は、非保護アミノ酸側鎖を有するポリペプチドを用いて実行されるのが好ましい。カップリング反応は溶液中、より好ましくは水溶液中で実行されるのが好ましい。ハロゲン-官能化足場を用いる、ループしたペプチド構造の合成に関する詳細な情報は、国際公開第 2 0 0 4 0 7 7 0 6 2 号パンフレットにおいて見出すことができる。

【 0 1 5 5 】

別の実施形態において、本発明に従うペプチド模倣体を含むワクチン組成物が提供される。動物試験は、ここで開示される基準を満足するペプチド模倣体を含む組成物が、特異的免疫応答の形成を誘導することができることを明らかにした。実施例 3 は、m - T 2 足場に環化された F S H (残基 5 2 ~ 8 3) 由来の T F K E L V Y E T C R V P G A A H H A D S L C T Y P V A T Q A H ポリペプチドのラットへの注射が、天然の F S H に反応する抗体の生産をもたらすことを示している。良好な結果は、T 4 足場に環化された F S H - 由来ペプチド K I Q K T A T F K E L V Y E T C R V P G A A H H A D S L C T Y P V A T Q A H A G K (残基 4 9 ~ 8 6) によっても得られた。ここで記載されるポリペプチド長の妥当性は、第 1 システイン (位置 C y s I V + 1 0) から第 2 システイン (位置 C y s V - 8) までの配列を有するペプチドが使用されたときの、抗体誘導の大幅な減少によって実証される。足場に付着されると、このペプチドはループした構造を有するが、本発明の特徴的な A - 形ペプチド模倣体の「足」を表す遊離端を欠く。

【 0 1 5 6 】

足場 m - T 2 に環化された F S H - 由来ペプチド T F K E L V Y E T C R V P G A A H H

A D S L C T Y P V A T Q A H が非常に高い抗体力価をもたらす一方で、直鎖ペプチドまたは2つのシステイン間のジスルフィド架橋を介して環化されているペプチドのみを受けたラットの血清が、F S H の顕著な認識を示さなかったことを実証している実施例3および図2から、適当な足場へのペプチドの環化の重要性は明らかである。さらに、この特定のペプチドに関して、メタ-T2足場はオルト-またはパラ-T2足場よりも好ましい。

【0157】

実施例6は、ペプチド系ワクチンとして種々のペプチド組成物を用いて、ラットで実行されたワクチン接種実験の結果を記載している。ペプチド投与の6週後、ラットの血清がhCG認識能力に関して試験された。比較のために、2つの市販のhCGに対する抗体が含まれた。本発明に従うペプチド模倣体を注射されたラットは、良好なhCG-特異的免疫応答を示したが、同じポリペプチドの直鎖型またはSS-環化型を注射されたラットは、顕著な応答を示さなかった(図3)。

10

【0158】

ゆえに、本発明はまた、本発明に従うループしたペプチド化合物を含むワクチンを提供する。免疫原性ペプチド化合物は、細胞性免疫を誘導するために単独で使うことができる。それらはまた、抗体生産または体液性応答を誘導するために、たとえば、他の分子と併せて、ワクチン組成物において使用することもできる。ペプチド模倣体は、たとえばキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミン(たとえばBSAまたはRSA)、オボアルブミンなどのたんぱく担体といった担体に、カップリングすることが可能である。さらに、本発明に従うループしたペプチド化合物と特異的に反応する抗体が提供される。

20

【0159】

本発明のCys-ノットペプチド模倣体を含むワクチンの使用もまた提供される。

1つの実施形態において、ここで提供されるワクチンは哺乳類、好ましくはヒトにおける避妊ワクチンとして使用される。現在、ホルモンの男性避妊には、2つの主要なアプローチがある。1つは、単独の、またはゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)(類似体または免疫付与)と組合せたテストステロン(類似体)に、もう1つは、卵胞刺激ホルモン(FSH)に対する免疫付与に、頼っている。理論的には、後者の方法は精子形成を抑制するが、性欲を妨げないだろう。好ましい実施形態において、本発明は男性の避妊における使用のための抗-FSHワクチンを提供する。この抗-FSHワクチンは抗-黄体形成ホルモン(LH)抗体を含まないのが好ましい(LHは性欲を維持するのに必須であるテストステロンの誘導に参与する)。

30

【0160】

別の実施形態において、本発明は、抗癌治療における治療用ペプチドとしてのループしたペプチド化合物の使用を提供する。たとえば、能動免疫療法において使用することができるワクチンが提供される。たとえば、そのワクチンはhCGを模倣するループしたペプチド化合物を含む。hCGホルモンは妊娠中自然に生産され、成長を促進し、発生中の胚を免疫攻撃(つまり拒否反応)から保護すると考えられている。hCGは、癌の主要な型すべてと関連する悪性腫瘍の生化学的マーカーである。hCGの発現は腫瘍の攻撃性に相関することが示されており、つまり、hCGの発現が多くなるほど、腫瘍がより攻撃的になる。双方の場合において、hCGは成長因子として働き、迅速な細胞分裂を促進する。hCGは転移および組織浸潤を促進し、血管新生、つまり血管の形成を助長し、免疫抑制を促進して、胎児または腫瘍が拒絶反応を避けるのを可能とする。したがって、hCGに対して向けられる免疫応答は、腫瘍に対する免疫攻撃を促進し、hCGによって付与されるホルモンの利点を中和させる。結果として、抗-hCGワクチンは受胎能力を阻害するのに効果的で、従って癌を治療するのに効果的である。確かに、癌においてhCGワクチンを使用する臨床研究は、hCGへの免疫応答が患者の生存に重要な役割を果たすことを示している。

40

【0161】

好ましい実施形態において、腫瘍形成生物におけるプロ-血管新生因子に対する様々な

50

宿主免疫応答（体液性、細胞性）を誘導することができる、本発明のペプチド模倣体を含むワクチンが提供される。VEGF-A / VEGFR-2 システムのペプチド模倣体が特に興味深い。なぜなら、腫瘍血管新生（腫瘍への新しい血管の形成）におけるこのシステムの役割が重大だからである。

【0162】

本発明は以下の実施例によって例示される。実施例は決して本発明の範囲を限定しない。

【0163】

実施例

実施例 1：CCR5 に基づく免疫原性化合物の設計および調製

10

材料および方法

マイクロアレイ上でのペプチドの合成および m-P2 または T3 - 足場との反応

ポリプロピレン支持体のポリアクリル酸とのグラフト化を、12 kGy 線量のガンマ放射線を用いて、CuSO₄ を含む 6 % アクリル酸溶液中で支持体を照射することによって実行した。その後、カルボン酸基を含むグラフト化された固体支持体を、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) とともにジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) を用いて、t-ブチルオキシカルボニル-ヘキサメチレンジアミン (Boc-HMDA) と反応させ、その後、トリフルオロ酢酸 (TFA) を用いて Boc 基を開裂させた。標準 Fmoc 試薬を用いてペプチドを合成し、アシル化後、室温にて 2 ~ 4 時間、13.3 重量 % フェノール、5 体積 % チオアニソール、2.5 体積 % 1,2-エタンジチオールおよび 5 体積 % ミリQ 水を含む TFA (15 ml / g 樹脂) と反応させて脱保護した。H₂O による 3 回の洗浄後、ペプチドマイクロアレイを、20 mM 重炭酸アンモニウム (pH 7.8) / アセトニトリル (1 : 1 v / v) 中の mP2 または T3 の 1.0 mM 過剰溶液で 30 ~ 60 分間室温にて処理し、その後 50 % ACN / H₂O で 3 回洗浄した。その後、マイクロアレイを過剰ミリポア H₂O で洗浄し、ディスラプト (disrupt) バッファ (リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中、1 % SDS / 0.1 % β-メルカプトエタノール (BME)、pH 7.2) 中で 70 ~ 30 分間超音波分解し、その後、さらに 45 分間ミリポア H₂O 中で超音波分解した。

20

【0164】

足場の合成

30

足場はAldrich社によって市販されている。

【0165】

抗体によるマイクロアレイのスクリーニング

マイクロアレイを PBS で 30 分間前処理し、その後インキュベーションバッファ (5 % オボアルブミン、5 % ウマ血清および 1 % Tween-80 を含む PBS) で 1 時間プレコートした。その後、マイクロアレイを mAb (通常、インキュベーションバッファに 1 / 1000 希釈) で一夜、4 °C にてインキュベートした。PBS / Tween-80 (0.05 %) で洗浄 (3 × 10 分) 後、ペプチドをペルオキシダーゼ標識ウサギ抗-マウス抗体と 1 時間 25 °C にてインキュベートし (rampo、1 / 1000 ; Dako社、Glostrup、デンマーク)、その後、PBS / Tween-80 (0.05 %) で再度洗浄 (3 × 10 分) 後、ペルオキシダーゼ基質 2,2'-アジノ-ジ-3-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸塩 (ABTS ; 30 % H₂O₂ を 20 μl 含む 100 ml の 0.1 M クエン酸-リン酸ナトリウム (McIlvaine) バッファ (pH 4.0) 中の 50 mg) とインキュベートした。1 時間後、(450 nm の) 吸光度を、CCD カメラ (XC-77RR、Sony 社、日本) を使用して測定した。結合した mAb を、前述のように、ディスラプト-バッファ中で超音波分解によって除去した。マイクロアレイをおよそ 10 ~ 15 回、スクリーニングのために再使用した。

40

【0166】

CCR5

CCR5 は、細胞侵入のために HIV によって使用されるサイトカイン共受容体である

50

。したがって、CCR5に対して特異的に向けられた抗体は、HIVによる細胞侵入を妨げるのに適しているだろう。しかし、完全なCCR5による免疫付与は、CCR5が膜貫通たんぱくであることから問題がある。したがって、CCR5-特異的抗体を誘導することができるように、CCR5に基づく免疫原性化合物が所望される。

【0167】

適した試験化合物を設計するために、4つのCCR5配列を検討した。1つはN-末端ドメイン(Nt)で、3つは(N-末端方向およびC-末端方向に)膜貫通ドメインの約1~6の隣接アミノ酸残基で拡張される細胞外ループドメインである。これらの細胞外ループドメインをe1、e2およびe3と称する。考慮したドメインの一次配列は以下のとおりである(N-末端から開始)。

10

【0168】

Nt: MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKQIA
 e1: PFWAHYAAAAQWDFGNTMCQLLTGL
 e2: IFTRSQKEGLHYTCSHFPHYSQYQFWKNFQ
 e3: NTFQEFFGLNNCSSSNRLDQAM

【0169】

システイン残基は天然のCCR5において天然のC-架橋を形成する。

e2におけるCys残基のN-末端側の細胞外ドメインをECL2Aと称し、e2におけるCys残基のC-末端側の細胞外ドメインをECL2Bと称する。同様に、e3におけるCys残基のN-末端側の細胞外ドメインをECL3Aと称し、e3におけるCys残基のC-末端側の細胞外ドメインをECL3Bと称する。

20

【0170】

ECL2A: TRSQKEGLHYT
 ECL2B: SSHFPHYSQYQFWK
 ECL3A: QEFFGLNN
 ECL3B: SSSNRLDQ

【0171】

その後、種々のアミノ酸残基をNt、e1、e2およびe3の一次配列内で選択する。これら選択したアミノ酸のフランキング配列を選択し、これらフランキング配列を含むペプチドを生産する。システイン残基を、足場と反応することができる基として使用する。

30

【0172】

以下のペプチドを合成した。

合成およびスクリーニングされたペプチド

1 MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKQIAを覆う直鎖21-マーに重なる全18

2 MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKを覆う直鎖18-マーに重なる全9

3 Nt MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKを覆う直鎖19-マーに重なる全8

4 Nt MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKを覆う直鎖20-マーに重なる全7

40

5 Nt MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKを覆う直鎖21-マーに重なる全6

6 e1 PFWAHYAAAAQWDFGNTMCQLLTGLを覆う直鎖18-マーに重なる全7

7 e1 PFWAHYAAAAQWDFGNTMCQLLTGLを覆う直鎖19-マーに重なる全6

8 e1 PFWAHYAAAAQWDFGNTMCQLLTGLを覆う直鎖20-マーに重なる全5

9 e1 PFWAHYAAAAQWDFGNTMCQLLTGLを覆う直鎖21-マー

50

に重なる全 4

1 0 e 2 I F T R S Q K E G L H Y T C S S H F P Y S Q Y Q F W K N F Q を覆う

直鎖 1 8 - マーに重なる全 1 3

1 1 e 2 I F T R S Q K E G L H Y T C S S H F P Y S Q Y Q F W K N F Q を覆う

直鎖 1 9 - マーに重なる全 1 2

1 2 e 2 I F T R S Q K E G L H Y T C S S H F P Y S Q Y Q F W K N F Q を覆う

直鎖 2 0 - マーに重なる全 1 1

1 3 e 2 I F T R S Q K E G L H Y T C S S H F P Y S Q Y Q F W K N F Q を覆う

直鎖 2 1 - マーに重なる全 1 0

1 4 e 3 N T F Q E F F G L N N C S S S N R L D Q A M を覆う直鎖 1 8 - マーに

重なる全 5

1 5 e 3 N T F Q E F F G L N N C S S S N R L D Q A M を覆う直鎖 1 9 - マーに

重なる全 4

1 6 e 3 N T F Q E F F G L N N C S S S N R L D Q A M を覆う直鎖 2 0 - マーに

重なる全 3

1 7 e 3 N T F Q E F F G L N N C S S S N R L D Q A M を覆う直鎖 2 1 - マーに

重なる全 2

1 8 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 6 -

マーに重なる全 2 3

1 9 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 7 -

マーに重なる全 2 3

2 0 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 8 -

マーに重なる全 2 1

2 1 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 9 -

マーに重なる全 2 0

2 2 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 1

0 - マーに重なる全 1 9

2 3 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 1

1 - マーに重なる全 1 8

2 4 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 1

2 - マーに重なる全 1 7

2 5 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 1

3 - マーに重なる全 1 6

2 6 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 1

4 - マーに重なる全 1 5

2 7 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 1

5 - マーに重なる全 1 4

2 8 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 1

6 - マーに重なる全 1 3

2 9 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 1

7 - マーに重なる全 1 2

3 0 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 1

8 - マーに重なる全 1 1

3 1 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 1

9 - マーに重なる全 1 0

3 2 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 2

0 - マーに重なる全 9

3 3 M D Y Q V S S P I Y D T N Y Y T S E P C Q K I N V K を覆う T 2 ループ 2

1 - マーに重なる全 8

3 4 e 1 A A A Q W D F G N T M を覆う T 2 ループ 6 - マーに重なる全 8

10

20

30

40

50

3 5	e 1	A A A Q W D F G N T M	を覆う T 2 ループ 7 - マーに重なる全 7	
3 6	e 1	A A A Q W D F G N T M	を覆う T 2 ループ 8 - マーに重なる全 6	
3 7	e 1	A A A Q W D F G N T M	を覆う T 2 ループ 9 - マーに重なる全 5	
3 8	e 1	A A A Q W D F G N T M	を覆う T 2 ループ 1 0 - マーに重なる全 4	
3 9	e 1	A A A Q W D F G N T M	を覆う T 2 ループ 1 1 - マーに重なる全 3	
4 0	e 1	A A A Q W D F G N T M	を覆う T 2 ループ 1 2 - マーに重なる全 2	
4 1	e 1	A A A Q W D F G N T M	を覆う T 2 ループ 1 3 - マーに重なる全 1	
4 2	e 2 a	R S Q K E G L H Y T	を覆う T 2 ループ 6 - マーに重なる全 7	
4 3	e 2 a	R S Q K E G L H Y T	を覆う T 2 ループ 7 - マーに重なる全 6	
4 4	e 2 a	R S Q K E G L H Y T	を覆う T 2 ループ 8 - マーに重なる全 5	10
4 5	e 2 a	R S Q K E G L H Y T	を覆う T 2 ループ 9 - マーに重なる全 4	
4 6	e 2 a	R S Q K E G L H Y T	を覆う T 2 ループ 1 0 - マーに重なる全 3	
4 7	e 2 a	R S Q K E G L H Y T	を覆う T 2 ループ 1 1 - マーに重なる全 2	
4 8	e 2 a	R S Q K E G L H Y T	を覆う T 2 ループ 1 2 - マーに重なる全 1	
4 9	e 2 b	S S H F P Y S Q Y Q F W K	を覆う T 2 ループ 6 - マーに重なる全 1 0	
5 0	e 2 b	S S H F P Y S Q Y Q F W K	を覆う T 2 ループ 7 - マーに重なる全 9	
5 1	e 2 b	S S H F P Y S Q Y Q F W K	を覆う T 2 ループ 8 - マーに重なる全 8	
5 2	e 2 b	S S H F P Y S Q Y Q F W K	を覆う T 2 ループ 9 - マーに重なる全 7	
5 3	e 2 b	S S H F P Y S Q Y Q F W K	を覆う T 2 ループ 1 0 - マーに重なる全 6	
5 4	e 2 b	S S H F P Y S Q Y Q F W K	を覆う T 2 ループ 1 1 - マーに重なる全 5	20
5 5	e 2 b	S S H F P Y S Q Y Q F W K	を覆う T 2 ループ 1 2 - マーに重なる全 4	
5 6	e 2 b	S S H F P Y S Q Y Q F W K	を覆う T 2 ループ 1 3 - マーに重なる全 3	
5 7	e 2 b	S S H F P Y S Q Y Q F W K	を覆う T 2 ループ 1 4 - マーに重なる全 2	
5 8	e 2 b	S S H F P Y S Q Y Q F W K	を覆う T 2 ループ 1 5 - マーに重なる全 1	
5 9	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 6 - マーに重なる全	
1 3				
6 0	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 7 - マーに重なる全	
1 2				
6 1	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 8 - マーに重なる全	
1 1				30
6 2	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 9 - マーに重なる全	
1 0				
6 3	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 1 0 - マーに重なる	
全 9				
6 4	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 1 1 - マーに重なる	
全 8				
6 5	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 1 2 - マーに重なる	
全 7				
6 6	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 1 3 - マーに重なる	
全 6				40
6 7	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 1 4 - マーに重なる	
全 5				
6 8	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 1 5 - マーに重なる	
全 4				
6 9	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 1 6 - マーに重なる	
全 3				
7 0	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 1 7 - マーに重なる	
全 2				
7 1	e 3	Q E F F G L N N C S S S N R L D	を覆う T 2 ループ 1 8 - マーに重なる	
全 1				50

7 2 N t M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P A Q K I N V K を覆う T 2 ルー
ブ 1 8 - マーに重なる全 1 1

7 3 N t M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P A Q K I N V K を覆う T 2 ルー
ブ 1 9 - マーに重なる全 1 0

7 4 N t M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P A Q K I N V K を覆う T 2 ルー
ブ 2 0 - マーに重なる全 9

7 5 N t M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P A Q K I N V K を覆う T 2 ルー
ブ 2 1 - マーに重なる全 8

7 6 N t + e 3 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P A - G - S S S N R L D を
覆う T 2 ルーブ 1 8 - マーに重なる全 1 3

7 7 N t + e 3 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P A - G - S S S N R L D を
覆う T 2 ルーブ 1 9 - マーに重なる全 1 2

7 8 N t + e 3 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P A - G - S S S N R L D を
覆う T 2 ルーブ 2 0 - マーに重なる全 1 1

7 9 N t + e 3 M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P A - G - S S S N R L D を
覆う T 2 ルーブ 2 1 - マーに重なる全 1 0

8 0 N t + e 1 Q K I N V K - G G - A A A Q W D F G N T M を覆う T 2 ルーブ 1 8
- マーに重なる全 4

8 1 N t + e 1 Q K I N V K - G G - A A A Q W D F G N T M を覆う T 2 ルーブ 1 9
- マーに重なる全 3

8 2 N t + e 1 Q K I N V K - G G - A A A Q W D F G N T M を覆う T 2 ルーブ 2 0
- マーに重なる全 2

8 3 N t + e 1 Q K I N V K - G G - A A A Q W D F G N T M を覆う T 2 ルーブ 2 1
- マーに重なる全 1

8 4 N t + E C L 3 A Q K I N V K - G G - Q E F F G L N N C を覆う T 2 ルーブ 1
8 - マーに重なる全 2

8 5 N t + E C L 3 A Q K I N V K - G G - Q E F F G L N N C を覆う T 2 ルーブ 1
9 - マーに重なる全 1

8 6 e 1 + e 2 a A A A Q W D F G N T M - G G G - R S Q K E G L H Y T C を覆う
T 2 ルーブ 1 8 - マーに重なる全 1 0

8 7 e 1 + e 2 a A A A Q W D F G N T M - G G G - R S Q K E G L H Y T C を覆う
T 2 ルーブ 1 9 - マーに重なる全 9

8 8 e 1 + e 2 a A A A Q W D F G N T M - G G G - R S Q K E G L H Y T C を覆う
T 2 ルーブ 2 0 - マーに重なる全 8

8 9 e 1 + e 2 a A A A Q W D F G N T M - G G G - R S Q K E G L H Y T C を覆う
T 2 ルーブ 2 1 - マーに重なる全 7

9 0 e 1 + e 2 b A A A Q W D F G N T M - G G G - S S H F P Y S Q Y Q F W K を
覆う T 2 ルーブ 1 8 - マーに重なる全 1 2

9 1 e 1 + e 2 b A A A Q W D F G N T M - G G G - S S H F P Y S Q Y Q F W K を
覆う T 2 ルーブ 1 9 - マーに重なる全 1 1

9 2 e 1 + e 2 b A A A Q W D F G N T M - G G G - S S H F P Y S Q Y Q F W K を
覆う T 2 ルーブ 2 0 - マーに重なる全 1 0

9 3 e 1 + e 2 b A A A Q W D F G N T M - G G G - S S H F P Y S Q Y Q F W K を
覆う T 2 ルーブ 2 1 - マーに重なる全 9

9 4 e 1 + e 3 A A A Q W D F G N T M - G G G G - Q E F F G L N N C を覆う T 2
ルーブ 1 8 - マーに重なる全 9

9 5 e 1 + e 3 A A A Q W D F G N T M - G G G G - Q E F F G L N N C を覆う T 2
ルーブ 1 9 - マーに重なる全 8

9 6 e 1 + e 3 A A A Q W D F G N T M - G G G G - Q E F F G L N N C を覆う T 2
ルーブ 2 0 - マーに重なる全 7

10

20

30

40

50

97 e1 + e3 AAAQWDFGNTM-GGGG-QEFFGLNNCを覆うT2
 ループ21-マーに重なる全6

98 e2a + e2b RSQKEGLHYT-A-SSHFPYSQYQFWKを覆う
 T2ループ18-マーに重なる全9

99 e2a + e2b RSQKEGLHYT-A-SSHFPYSQYQFWKを覆う
 T2ループ19-マーに重なる全8

100 e2a + e2b RSQKEGLHYT-A-SSHFPYSQYQFWKを覆
 うT2ループ20-マーに重なる全7

101 e2a + e2b RSQKEGLHYT-A-SSHFPYSQYQFWKを覆
 うT2ループ21-マーに重なる全6

102 e2b + e1 CSSHFPYSQYQFWK-GGG-AAAQWDFGNT
 MCを覆うT2ループ18-マーに重なる全14

103 e2b + e1 CSSHFPYSQYQFWK-GGG-AAAQWDFGNT
 MCを覆うT2ループ19-マーに重なる全13

104 e2b + e1 CSSHFPYSQYQFWK-GGG-AAAQWDFGNT
 MCを覆うT2ループ20-マーに重なる全12

105 e2b + e1 CSSHFPYSQYQFWK-GGG-AAAQWDFGNT
 MCを覆うT2ループ21-マーに重なる全11

106 e2b + e3 CSSHFPYSQYQFWK-GG-QEFFGLNNASS
 SNRLDを覆うT2ループ18-マーに重なる全17

107 e2b + e3 CSSHFPYSQYQFWK-GG-QEFFGLNNASS
 SNRLDを覆うT2ループ19-マーに重なる全16

108 e2b + e3 CSSHFPYSQYQFWK-GG-QEFFGLNNASS
 SNRLDを覆うT2ループ20-マーに重なる全15

109 e2b + e3 CSSHFPYSQYQFWK-GG-QEFFGLNNASS
 SNRLDを覆うT2ループ21-マーに重なる全14

110 e3 + e1 QEFFGLNNASSSNRLD-GGG-AAAQWDFGN
 TMを覆うT2ループ18-マーに重なる全15

111 e3 + e1 QEFFGLNNASSSNRLD-GGG-AAAQWDFGN
 TMを覆うT2ループ19-マーに重なる全14

112 e3 + e1 QEFFGLNNASSSNRLD-GGG-AAAQWDFGN
 TMを覆うT2ループ20-マーに重なる全13

113 e3 + e1 QEFFGLNNASSSNRLD-GGG-AAAQWDFGN
 TMを覆うT2ループ21-マーに重なる全12

114 Nt + e3b MDYQVSSPIYDINY YTSEC-G-CSSSNRL
 Dを覆うT2ループ21-マーに重なる全9

115 Nt + e3b DYQVSSPIYDINY YTSEPC-G-CSSSNRL
 DQAMQを覆うT2ループ21-マーに重なる全36

116 Nt + e1 QKINVK-GG-CAAAQWDFGNTMCを覆うT2ルー
 プ19~21-マー

117 e1 AAAQWDFGNTM(左)およびe2a SQKEGLHYT(右)
)C-----1-G-1-----Cを覆うP2P2ループ18~21-マー

118 e1 AQWDFGN(左)およびe2a SSHFPYSQYQFWKN(
 右)C-----1-G-1-----Cを覆うP2P2ループ21-マー

119 e1 HYAAAQWDFGNTM(左)およびe2a SSHFPYSQY
 QFWKN(右)C-----1-G-1-----Cを覆うP2P2ループ21-マー

120 Nt SEPCQKINVK(左)およびe3 QEFFGLNNC SSSN
 (右)C-----1-G-1-----Cを覆うP2P2ループ21-マー

121 e1 AAAQWDFGNTM(左)およびe2a RSQKEGLHYT(
 右)を覆うT3ループ16~20-マーペプチド

10

20

30

40

50

1 2 2 e 1 A Q W D F G N T M (左) および e 2 b S S H F P Y S Q Y Q F W K N F (右) を覆う T 3 ループ 2 0 - マーペプチド

1 2 3 e 2 b S S H F P Y S Q Y Q F W K N F (左) および e 1 A A A Q W D F G N T M (右) を覆う T 3 ループ 2 0 - マーペプチド

1 2 4 e 2 b S S H F P Y S Q Y Q F W K N F (左) および e 3 Q E F F G L N N A S S S N R L D Q (右) を覆う T 3 ループ 2 0 - マーペプチド

1 2 5 e 1 Y A A A Q W D F G N T M (左) および e 3 Q E F F G L N N A S S S N R L D Q (右)、G C G (真中) を覆う T 3 ループ 2 0 - マーペプチド

1 2 6 e 3 Q E F F G L N N A S S S N R L D Q (左) および e 1 Y A A A Q W D F G N T M (右)、G C G (真中) を覆う T 3 ループ 2 0 - マーペプチド

1 2 7 e 2 S L P G I I F T R S Q K E G L H Y T C S S H F P Y S Q Y Q F W K N F Q T L を覆う T 3 ループ 2 1 - マーペプチド

1 2 8 N t D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I N V K Q I A A R L L P P L Y S を覆う T 3 ループ 2 1 - マーペプチド

【0173】

ペプチドの第 1 シリーズ (前述の表の第 1 行) において、N t 配列の C - 末端アミノ酸 K、I、N、V、K、Q、I、および A を選択した。次に、21 アミノ酸残基の長さを有する N - 末端フランキング配列を選択した。ゆえに、M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q が K のフランキング配列であったり、D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K が I のフランキング配列であったり、Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C Q K I が N のフランキング配列であったりする。その後、これらフランキング配列の 1 つを含むペプチドを生産した。

【0174】

同様に、ペプチドの第 2 シリーズ (前述の表の第 2 行) において、N t 配列の C - 末端アミノ酸 P、C、Q、K、I、N、V および K を選択した。次に、18 アミノ酸残基の長さを有する N - 末端フランキング配列を選択した。ゆえに、M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E が P のフランキング配列であったり、D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P が C のフランキング配列であったり、Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C が Q のフランキング配列であったりする。その後、これらフランキング配列の 1 つを含むペプチドを生産した。

【0175】

第 1 ~ 17 シリーズ (前述の表の第 1 ~ 17 行) のペプチドは足場に結合せず、足場 - 結合ペプチドと比較してあまり適していないように思われた。

【0176】

ペプチドの第 18 シリーズにおいて、最初から 6 番目までの N - 末端アミノ酸を除く全アミノ酸を選択し、6 アミノ酸長を有する N - 末端フランキング配列を選択した。その後、これらフランキング配列の 1 つおよび 2 つのシステイン残基を含むペプチドを生産した。ペプチドを、2 つのシステイン残基を介して P 2 足場にカップリングさせた。注目すべきは、フランキング配列が、カップリングを意図されないシステイン残基を含む場合、そのシステインをアラニンで置換したことである。シリーズ 19 ~ 75 のペプチドを同様に生産した。

【0177】

シリーズ 76 ~ 116 において、C C R 5 の 2 つの異なるドメインに由来するフランキング配列を組合せた。たとえば、シリーズ 76 ~ 79 において、N t に由来するフランキング配列を、e 3 に由来するフランキング配列に組合せた。同様に、シリーズ 80 ~ 83 において、N t に由来するフランキング配列を、e 1 に由来するフランキング配列に組合せたりなどした。結果として生じるペプチドは、2 つのシステイン残基を介して P 2 にカップリングされた。

【0178】

シリーズ 117 ~ 120 において、2 つの P 2 足場を使用した。2 つのフランキング配

10

20

30

40

50

列を含むペプチドを生産し、e 1 に由来するフランキング配列を E 2 A に由来するフランキング配列に組合せ（前述の表の第 1 1 7 ~ 1 1 9 行）、N t に由来するフランキング配列を e 3 に由来するフランキング配列に組合せた（前述の表の第 1 2 0 行）。システイン残基が各フランキング配列の最初と最後とに存在した（ゆえに、総計で 4 つのシステインが存在した）。フランキング配列がカップリングを意図されないシステイン残基を含む場合、そのシステインをアラニンで置換した。その後、前述の 4 つのシステイン残基を用いて、ペプチドを 2 つの P 2 足場にカップリングさせた（システイン残基を C および 1 として表に表す）。C として表した 2 つのシステインを双方とも 1 つの T 2 足場にカップリングさせ、1 として表した 2 つのシステイン残基を双方とも別の足場にカップリングさせた。

10

【 0 1 7 9 】

シリーズ 1 2 1 ~ 1 2 8 において、T 3 足場を使用した。異なる C C R 5 ドメインに由来する 2 つのフランキング配列を含むペプチドを生産した。T 3 足場にカップリングさせるために 3 つのシステイン残基をペプチドに組み込んだ。

【 0 1 8 0 】

スクリーニング検定

生産したペプチドを市販の抗-C C R 5 抗体 2 D 7 とともにインキュベートした。

【 0 1 8 1 】

結果

高い親和性で抗体 2 D 7 を結合させることのできる有望な化合物を以下に表わす。

20

【 0 1 8 2 】

【 表 1 】

		2D7 (1 μg/ml).	2D7 (10 μg/ml)	2D7 (0.1 μg/ml)
447	CQKEGLHYTC	2706	2943	261
443	CQKEGLHYC	2636	3090	148
449	CSQKEGLHYTC	2606	2889	99
1160	CWDFGNTMCQKEGLHYTC	2469	2765	315
450	CRSQKEGLHYTC	2364	2852	107
702	CNTMGGGRSQKEGLHYTC	1580	2787	68
1159	CQWDFGNTCQKEGLHYTC	1153	2636	213
719	CFGNTMGGGRSQKEGLHYT C	678	2819	113
1158	CAQWDFGNCQKEGLHYTC	416	2377	132

30

【 0 1 8 3 】

上記表の化合物は、すべて P 2 または T 3 に結合するペプチドを含む。すべての化合物は抗体 2 D 7 を結合させることができる。

【 0 1 8 4 】

結論：この例によって、本発明者らは、直鎖ペプチドが 2 D 7 を結合させることができない一方で、本発明に従う方法は、2 D 7 を結合させることができる C C R 5 の模倣体を同定するのに適していることを示している。このようなペプチドは、さらに、H I V 感染を無力化することができる C C R 5 -特異的抗体を誘導するために、免疫付与実験において使用される。

40

【 0 1 8 5 】

実施例 2：インターロイキン 5 に基づく免疫原性化合物の設計および調製

適当な試験化合物を設計するために、5 シリーズの化合物を生成した。その後、化合物を、I L 5 を特異的に結合させることのできる市販の抗体（抗体 3 9 D 1 0）とともにインキュベートした。

【 0 1 8 6 】

50

シリーズ 1

全 I L 5 配列の重複 1 8 -マー配列を生成した。これらのペプチドは足場にカップリングしなかった。これらのペプチドは、容認可能な親和性で、3 9 D 1 0 を結合させることができなかった。

【 0 1 8 7 】

シリーズ 2

全 I L 5 配列の重複 1 3 -マー配列を生成した。1 つの 1 3 -マー配列ならびに N -末端および C -末端システイン残基を含むペプチドを生産した。1 3 -マー配列がカップリングを意図されないシステイン残基を含む場合、そのシステインをアラニンで置換した。その後、N -末端および C -末端システイン残基を介して、ペプチドを P 2 足場にカップリングさせた。その後、結果として生じる化合物を、抗体 3 9 D 1 0 とともにインキュベートした。いくつかの化合物は結合することができたが、見込みのある化合物は見出されなかった。

10

【 0 1 8 8 】

シリーズ 3 ~ 5 において、以下の 2 つのインターロイキン 5 配列を考慮した。

パート 1、K K K S G E E R R R V N Q F L D Y

パート 2、L I A N E T L R I P V P V H K N H

注目すべきは、パート 1 の 4 番目のアミノ酸残基であるセリンは、天然のヒト I L 5 においてはシステイン残基であることである。足場がこのシステインとカップリングするのを避けるために、このシステインをセリンで置換した。

20

【 0 1 8 9 】

シリーズ 3

このシリーズにおいて、パート 1 およびパート 2 の初めの 3 つのアミノ酸配列および最後の 3 つのアミノ酸残基を選択した。その後、1 4 ~ 1 6 アミノ酸残基の長さを有する C -末端および N -末端フランキング配列を選択した。1 つのフランキング配列ならびに N -末端および C -末端システイン残基を含むペプチドを生産した。その後、N -末端および C -末端システイン残基を介して、ペプチドを P 2 足場にカップリングさせた。結果として生じる化合物を、その後、抗体 3 9 D 1 0 とともにインキュベートした。パート 1 のフランキング配列を含むいくつかの化合物は、抗体 3 9 D 1 0 を結合することができた。

30

【 0 1 9 0 】

シリーズ 4

このシリーズにおいて、パート 1 に由来するフランキング配列をパート 2 に由来するフランキング配列と組合せた。以下の概略配列に従って 2 1 -マーを生産した。

【 0 1 9 1 】

```

C X X X X X X X X C X X X X X X X X C
C X X X X X X X X C X X X X X X X X C
C X X X X X X C X X X X X X X X X X C
C X X X X X C X X X X X X X X X X X C
C X X X X C X X X X X X X X X X X X C
C X X X C X X X X X X X X X X X X X C
C X X X X X X X X X C X X X X X X X C
C X X X X X X X X X X C X X X X X X C
C X X X X X X X X X X X C X X X X X C
C X X X X X X X X X X X X C X X X X C
C X X X X X X X X X X X X X C X X X C

```

40

【 0 1 9 2 】

ここで、X 残基の第 1 の配列はパート 1 に由来するフランキング配列を表し、X 残基の第 2 の配列はパート 2 に由来するフランキング配列を表す。ゆえに、フランキング配列長は異なるが、結果として生じるペプチドの全長は同じである (2 1 アミノ酸残基)。ペプチドを T 3 足場にカップリングさせた。結果として生じる化合物を、その後、抗体 3 9 D

50

10 とともにインキュベートした。抗体 39D10 に対して高い結合親和性を有する種々の化合物が見出された。これら化合物を以下に詳細に述べる。

【0193】

シリーズ5

このシリーズにおいても、パート1に由来するフランキング配列をパート2に由来するフランキング配列と組合せた。このシリーズにおいて、結果として生じるペプチドは異なる長さである（パート1に由来するフランキング配列およびパート2に由来するフランキング配列を含む）。ペプチドを3つのシステイン残基を介してT3にカップリングさせ、その後、抗体39D10とともにインキュベートした。結果を以下に詳細に述べる。

【0194】

結果

T3にカップリングさせた以下の4つのペプチドは、抗体39D10に対して高い親和性を有すると思われる。

1. Ac-CEERRRVCANETLRIPVPCGSC (T3) 1:1500
2. Ac-CSGEERRRVCANETLRIPC GSC (T3) 1:1500
3. Ac-CEERRRVNQCANETLRIPC GSC (T3) 1:2000
4. Ac-CGEERRRCIANETLRIPC GSC (T3) 1:4000

【0195】

4つのペプチドすべてが、パート1の部分配列およびパート2の部分配列を含む。

これら4つのペプチドを、全ヒトIL5に対する抗体を誘導することができるかを試験するために、免疫付与実験に使用した。すべてヒトIL5に由来するこれらのペプチドは、(OD最大値の50%であるOD値に従って計算した)抗体力価が1:1500、1:2000および1:4000である全ヒトIL5と、強い交差反応を示す抗体を誘導することができるように思われた。

【0196】

結論

異なる領域由来のフランキング配列の組合せを含むペプチドは、天然IL5エピトープに最もよく類似するように思われる。これらペプチドは、本発明に従うスクリーニング方法によって見出された。

【0197】

実施例3: FSHのペプチド模倣体の設計および調製、ならびにペプチドワクチンとしての使用

この実験において、FSHのB3-ループに対応するポリペプチドを設計し、2つのアミノ酸残基を、足場を介して互いに付着するポリペプチド中の第1および第2のシステイン残基で置換した。第1の足場付着システイン残基を、野生型B3-ループ内のアミノ酸CysIVに対応する位置からp残基C-末端方向に位置する位置CysIV+pに導入した。pは5p12である。第2の足場付着システイン残基を、野生型B3-ループ内のアミノ酸CysVに対応する位置からq残基N-末端方向に位置する位置CysV-qに導入した。qは4 q 12であって、(p-q)は-3, -2, -1, 0, 1, 2または3である。ポリペプチド長はCysIV+xの位置のアミノ酸からCysV+yの位置のアミノ酸までである。xは-5 x 1、yは1 y 6であって、x+y=-1, 0, 1または2の条件である。

【0198】

ペプチドを、Syro-シンセサイザ(MultiSynTech社、ドイツ)上で、4-(2'-4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)-フェノキシ(リンクアミド(RinkAmide))樹脂(BACHEM社、ドイツ)を使用して、固相ペプチド合成によって合成した。全アミノ酸を、側鎖官能基がN-t-Boc(KW)、O-t-Bu(DESTY)、N-Trt(HNQ)、S-Trt(C)、またはN-Pbf(R)基のように保護され、N-アルファ-(Fmoc)のように保護された形態で購入し、使用した。NMP中の6.5倍過剰のHBTU/HOBt/アミノ酸/DIPEA(1:1:1:2)を使用し、二重カップリングを使用

10

20

30

40

50

する 30 分の活性化時間のカップリングプロトコルを用いた。アセチル化ペプチドを、13.3 重量% フェノール、5 体積% チオアニソール、2.5 体積% 1,2-エタンジオール、および 5 体積% ミリQ-H₂O を含む TFA (15 ml / g 樹脂) で、2 ~ 4 時間室温にて反応させることで樹脂から開裂させ、その後 (少なくとも TFA 体積の 3 倍の) ジエチルエーテルで沈殿させた。粗ペプチドを、「DeltaPack」(25 または 40 × 100 mm の内径、15 マイクロメートルの粒径、100 Å の細孔径; Waters 社、米国) または「XTERRA」(50 × 4.6 mm の内径、2.5 マイクロメートルの粒径; Waters 社、米国) RP-18 分取 C18 カラムで、毎分 1 ~ 2 % B の直線的 AB-勾配で、逆相高速液体クロマトグラフィ (RPC) によって精製した。溶媒 A は水中の 0.05 % TFA であり、溶媒 B は 0.05 % ACN であった。ペプチドの正確な一次イオン分子量を、Micromass ZQ (Micromass 社、オランダ) または VG Quattro II (VG Organic 社、英国) の質量分析計で、エレクトロスプレーイオン化質量分析によって確認した。ポリペプチドを、T2 (20 % アセトニトリル (ACN) / 80 % 重炭酸アンモニウム (20 mM)、pH 7.8 中、室温での、ペプチドと 1.05 等量の T2 との 1 時間の反応) または T4 足場 (60 % ACN / 40 % 重炭酸アンモニウム (20 mM)、pH 7.8 中、室温での、ペプチドと 0.5 等量の T4 との 1 時間の反応) 上に環化するか、システインの S-S-酸化を介して直接環化した。足場は Sigma-Aldrich 社から得た。さらに、システインを欠いている直鎖バージョンのポリペプチドを調製した (表 4 参照)。その後、メスのウィスター系ラットに、0 日目に、PBS / CFA 1 : 1 (v / v) (PBS = リン酸緩衝生理食塩水、CFA = 完全フロイントアジュバント) 中の約 2.5 mg / ml のペプチドまたはペプチド-T-構成 400 µl で免疫性を与え、4 週後に追加免疫 (等量および等濃度) を行った。その後、免疫応答を確認するために抗-ペプチド力価を 6 週後に測定し、最終的にラットを 8 週後に出血させて抗血清を収集した。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ-抗-ラット血清と組合せて、2,2'-アジン-ジ(エチルベンゾチアゾリンスルホン酸塩) (ABTS) を使用する、FSH-結合 ELISA (Greiner 社、パレスチナ; 1 µg / ml FSH (Biotrend 社) による GDA-コーティング) にて、抗血清を分析した。抗体 pAb 5215 (Biogenesis 社) および mAb 6602 (Medix Biochemicals 社) を、ポジティブコントロールとして分析に含めた。

【0199】

10

20

【表 4 A】

サンプル n o.	ポリペプチド ^a	足場 ^b
1	*CRVPGDAHHADSLC#	m-T2
2	*CRVPGDAHHADSLC#	T4
3	*CVRVPGAAHHADSLYC#	m-T2
4	*CVRVPGAAHHADSLYC#	T4
5	*YETCRVPGDAHHADSLCTYP#	m-T2
6	*YETCRVPGDAHHADSLCTYP#	T4
7	*TFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQAH#	m-T2
8	*KIQKTATFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQA HAGK#	T4
9	*CYTRDLVYKDPARPKIQKTC#	T4
10	*KIQKTATFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQA HAGK#	m-T2
11	*TQAHCGKADSDSTDC#	T4
12	*TFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQAH#	None; SS cyclized
13	*TFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQAH#	T4
14	*TFKELVYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQAH#	None; linear

^aポリペプチド配列を1字略号で示す。*はN-末端を示し、#はC-末端を示す。

^bm-T2はメタ-ビス(プロモメチル)ベンゼンを示し、T4は1, 2, 4, 5テトラプロモジュレンを示す。

【0200】

図2に示す結果は、B3-由来ポリペプチドを足場に付着させることの妥当性を実証している。SS-酸化を介して環化された対応するペプチドおよび直鎖ポリペプチドは、それらだけでは免疫原性がないからである。

【0201】

以下、表4Bおよび4Cに同じ結果を詳細に表す。CLIPS位置pおよびqなどの種々の値を示す。

【0202】

10

20

30

【表 4 B】

異なる長さおよび表面領域のFSH-由来ペプチドによるワクチン接種実験からの抗体応答、および、FSH-活性化検定における対応する中和活性

No.	ペプチド配列+CLIPS	CLIPS 位置 (p, q)	FSH における AA (x, y)	抗体力価 (10週) 2ラット ^b	中和 FSH- 活性化検定 ^c
1	* <u>C</u> RVPGDAHHD <u>S</u> L <u>C</u> # + m-T2	10, 8	10, -8	<1 (2x)	- (2x)
2	* <u>C</u> VRVPGAAHHAD <u>S</u> L <u>C</u> # + m-T2	9, 7	9, -7	<1 (2x)	- (2x)
3	*YET <u>C</u> RVPGDAHHD <u>S</u> L <u>C</u> TYP# + m-T2	10, 8	7, -5	<1 (2x)	- (2x)
4	*TFKELVYET <u>C</u> RVPGAAHHAD <u>S</u> L <u>C</u> TYPVATQ AH# + m-T2	10, 8	1, 1	<1; 4.0	-; 1/64
5	*KI <u>Q</u> KTATFKELVYET <u>C</u> RVPGAAHHAD <u>S</u> L <u>C</u> TY PVATQA <u>H</u> AGK# m-T2	10, 8	-5, 4	<1 (2x)	- (2x)
6	* <u>C</u> RVPGDAHHD <u>S</u> L <u>C</u> # + T4	10, 8	10, -8	<1 (2x)	- (2x)
7	* <u>C</u> VRVPGAAHHAD <u>S</u> L <u>C</u> # + T4	9, 7	9, -7	<1 (2x)	- (2x)
8	*YET <u>C</u> RVPGDAHHD <u>S</u> L <u>C</u> TYP# + T4	10, 8	7, -5	<1 (2x)	- (2x)
9	*KI <u>Q</u> KTATFKELVYET <u>C</u> RVPGAAHHAD <u>S</u> L <u>C</u> TY PVATQA <u>H</u> AGK# T4	10, 8	-5, 4	3.0; 2.5	1/16; -
10	* <u>C</u> YTRDLVYKDPARPKI <u>Q</u> KT <u>C</u> # + T4	-19, 31	-19, - 31	<1 (2x)	- (2x)
11	*TQA <u>H</u> CGKADSDST <u>D</u> C# + T4	33, -12	29, - 12	<1 (2x)	- (2x)

^a太字で印刷したアミノ酸はこの位置の天然のCys残基に対するの置換基であり、下線を付したアミノ酸はCLIPSが付着されるCys残基を示す。

^b抗体力価は、結合ELISAのODがバックグラウンド-ODの3倍を依然として超えている血清希釈の $10 \log_{10}$ 値として示される (1/10希釈=1、1/100=2、1/1000=3、1/10000=4など)。

^cは、FSH-誘導生物活性の完全なブロッキングが (6 ng/ml FSH細胞-活性化にて) 依然として観察される、精製血清 (protG-column) の最も高い希釈を示す。

【0203】

【表 4 C】

FSH- β 3ループ由来ペプチド i c w. の (位置 C y s IV + p、C y s V - q、長さ C y s IV + x、C y s V + y) 異なる CLIPS によるワクチン接種実験からの抗体応答、および、Y1-細胞生物学的検定における対応する中和活性

No.	ペプチド配列+CLIPS	CLIPS 位置 (p, q)	FSH における AA (x, y)	抗体力価 (10週) 2ラット ^b	中和 FSH- 活性化検定 ^c
1	*TFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQ AH# + m-T2	10, 8	10, -8	3.0; <1	1/16; -
2	*TFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQ AH# + SS	10, 8	10, -8	<1 (2x)	- (2x)
3	*TFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQ AH# + T4	10, 8	10, -8	<1 (2x)	- (2x)
4	*TFKELVYETTYRVPGCAHHADSLYTPVATQ AH#	n.a.	10, -8	<1 (2x)	- (2x)

^a太字で印刷したアミノ酸はこの位置の天然の C y s 残基に対する置換基であり、下線を付したアミノ酸は CLIPS が付着される C y s 残基を示す。

^b抗体力価は、結合 ELISA の OD がバックグラウンド-OD の 3 倍を依然として超えている血清希釈の $-1 \log_{10}$ 値として示される (1/10 希釈 = 1、1/100 = 2、1/1000 = 3、1/10000 = 4 など)。

^cは、FSH-誘導生物活性の完全なブロッキングが (6 ng/ml FSH 細胞-活性化にて) 依然として観察される、精製血清 (protG-column) の最も高い希釈を示す。

【0204】

この結果は、FSH のベータ 3 ループに由来する免疫原性化合物を生成できることを、明らかに実証している (表 4 B の化合物 4 および 9 ならびに表 4 C の化合物 1 を参照)。免疫原性化合物は FSH-特異的抗体の生産を引き起こす。

【0205】

実施例 4 : FSH のペプチド模倣体の設計および調製、ならびにペプチドワクチンとしての使用

この実験において、長さおよび CLIPS-付着に関するシステイン残基のキラル配置の点で異なる、FSH の β 3-ループに対応するポリペプチドのセットを前述のように設計し、合成した。ポリペプチドを m-T2 上に環化した (20% アセトニトリル / 80% 重炭酸アンモニウム (20 mM)、pH 7.8 中、室温でのペプチドと 1.05 等量の m-T2 との 1 時間の反応)。その後、メスのウィスター系ラットに、0 日目に、PBS / CFA 1 : 1 (v/v) (PBS = リン酸緩衝生理食塩水、CFA = 完全フロイントアジュバント) 中の約 2.5 mg/ml のペプチドまたはペプチド-T-構成 400 μ l で免疫性を与え、4 週後に追加免疫 (等量および等濃度) を行った。その後、免疫応答を確認するために抗-ペプチド力価を 6 週後に測定し、最終的にラットを 10 週後に出血させて抗血清を収集した。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ-抗-ラット血清と組合せて、2,2'-アジン-ジ(エチルベンゾチアゾリンスルホン酸塩) (ABTS) を使用する、FSH-結合 ELISA (Greiner 社、パレスチナ; 1 μ g/ml FSH (Biotrend 社) による GDA-コーティング) にて、抗血清を分析した。抗体 pAb 5215 (Biogenesis 社) および mAb 6602 (Medix Biochemicals 社) を、ポジティブコントロール

として分析に含めた。

【0206】

【表7】

種々の可変の長さ (Cys IV+x、Cys V+y) のFSH-β3ループのm-T2 CLIPS-ペプチド (Cys IV+p、Cys V-qにて固定されるCLIPS位置) によるワクチン接種実験からの抗体応答、および、Y1-細胞生物学的検定における対応する中和活性

No.	ペプチド配列+CLIPS	CLIPS 位置 (p, q)	FSH における AA (x, y)	抗体力価 (10週) 2ラット ^b	中和 FSH- 活性化検定 ^c
1	*TFKELVYET <u>C</u> RVPGDAHHAD <u>S</u> LCTYPVAT QAH# + m-T2	10, 8	1, 1	3.0; 4.0	1/250; 1/500
6	*TFKELVYET <u>C</u> RVPGAAHHAD <u>S</u> LCTYPVAT QAH# + T3/DTT	10, 8	1, 1	3.5; <1	1/125; -

^a太字で印刷したアミノ酸はこの位置の天然のCys残基に対する置換基であり、下線を付したアミノ酸はCLIPSが付着されるCys残基を示す。

^b抗体力価は、結合ELISAのODがバックグラウンド-ODの3倍を依然として超えている血清希釈の $-1 \log_{10}$ 値として示される (1/10希釈=1、1/100=2、1/1000=3、1/10000=4など)。

^cは、FSH-誘導生物活性の完全なブロッキングが (6 ng/ml FSH細胞-活性化にて) 依然として観察される、精製血清 (protG-column) の最も高い希釈を示す。

【0207】

表7から、足場T2に結合するペプチドTFKELVYETCRVPGDAHHADSLCTYPVATQAHを含む化合物が好ましいと結論される。さらに、足場T3に結合するペプチドTFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQAHを含む化合物が好ましい。

【0208】

実施例5：構造的に最適化されたFSHのペプチド模倣体の設計および調製、ならびにペプチドワクチンとしての使用

本実験において、FSHのβ3-ループに対応するポリペプチドのセットを、m抗体5828および6602でスクリーニングされた置換分析研究由来の抗体結合データを用いて、構造的に最適化した。ポリペプチドをm-T2上に環化した (20% アセトニトリル / 80% 重炭酸アンモニウム (20 mM)、pH 7.8中、室温での、ペプチドと1.05等量のm-T2との1時間の反応)。その後、メスのウィスター系ラットに、0日目に、PBS / CFA 1 : 1 (v / v) (PBS = リン酸緩衝生理食塩水、CFA = 完全フロイントアジュバント) 中の約2.5 mg / mlのCLIPS-ペプチド構成400 μlで免疫性を与え、4週後に追加免疫 (等量および等濃度) を行った。その後、免疫応答を確認するために抗-ペプチド力価を6週後に測定し、最終的にラットを10週後に出血させて抗血清を収集した。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ-抗-ラット血清と組合せて、2,2'-アジン-ジ(エチルベンゾチアゾリンスルホン酸塩) (ABTS) を使用する、FSH-結合ELISA (Greiner社、パレスチナ; 1 μg / ml FSH (Biotrend社) によるGDA-コーティング) にて、抗血清を分析した。抗体pAb 5215 (Biogenesis社) およびmAb 6602 (Medix Biochemicals社) を、ポジティブコントロールとして分析に含めた。

【0209】

【表 8】

F SH-β 3ループm-T2 CLIPS-ペプチドによるワクチン接種実験からの抗体応答、および、Y1-細胞生物学的検定における対応する中和活性

No.	ペプチド配列+CLIPS	CLIPS 位置 (p, q)	FSH における AA (x, y)	抗体力価 (10週) 2ラット ^b	中和 FSH- 活性化検定 ^c
1	*TFKELVYET <u>C</u> RVPGDAHHADSL <u>C</u> TYPVAT QAH# + m-T2	10, 8	1, 1	1.5; 3.0	1/2; 1/4
2	*TFKELVYET <u>C</u> RVPGDAHHADKL <u>C</u> TYPVAT QAH# + m-T2	10, 8	1, 1	3.5; 2.0	1/64; 1/2
3	*TFKELVYET <u>C</u> RVPGDAHKADSL <u>C</u> TYPVAT QAH# + m-T2	10, 8	1, 1	>4.5; <1	1/1000; -

^a太字で印刷したアミノ酸はこの位置の天然のCys残基に対するの置換基であり、下線を付したアミノ酸はCLIPSが付着されるCys残基を示す。

^b抗体力価は、結合ELISAのODがバックグラウンド-ODの3倍を依然として超えている血清希釈の $-\log_{10}$ 値として示される (1/10希釈=1、1/100=2、1/1000=3、1/10000=4など)。

^cは、FSH-誘導生物活性の完全なブロッキングが (6 ng/ml FSH細胞-活性化にて) 依然として観察される、精製血清 (protG-column) の最も高い希釈を示す。

【0210】

表 8 から、足場 T2 に結合するペプチド T F K E L V Y E T C R V P G D A H H A D K L C T Y P V A T Q A H を含む化合物が好ましいと結論される。さらに、足場 T2 に結合するペプチド T F K E L V Y E T C R V P G D A H K A D S L C T Y P V A T Q A H を含む化合物が好ましい。

【0211】

実施例 6 : h - C G のペプチド模倣体の設計および調製、ならびにペプチドワクチンとしての使用

本実験においては、hCGのβ3-ループに対応するポリペプチドを前述のように設計し、合成した。ポリペプチドをT2上 (20% ACN / 80% 重炭酸アンモニウム (20 mM)、pH 7.8 中、室温での、ペプチドと1.05等量のT2との1時間の反応)、またはT4足場上 (60% ACN / 40% 重炭酸アンモニウム (20 mM)、pH 7.8 中、室温での、ペプチドと0.5等量のT4との1時間の反応) に環化するか、システインのSS-酸化を介して直接環化した。さらに、システインを欠いている直鎖バージョンのポリペプチドを調製した (表 5 参照)。ラットに、実施例 1 においてFSH-ペプチドの模倣体に関して述べた種々のペプチドまたはペプチド構成で、免疫性を与えた。ELISA表面上のhCG (Biotrend社から購入) のコーティングを確認するために、hCGに対する市販の抗体CG-B2 (Imgen社から購入) を、ポジティブコントロールとして分析に含めた。

【0212】

【表 9 A】

サンプルno.	ポリペプチド ^a	足場 ^b
1	*NYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVCSYAVALSAQ#	m-T2
2	*NYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVCSYAVALSAQ#	None; SS-cyclized
3	*NYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVCSYAVALSAQ#	T4
4	*NYRDVRFESIRLPGAPRGVNPVVSYAVALSAQ#	None; linear
5	*VVANYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVCSYAVALSAQAAL#	m-T2
6	*VVANYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVCSYAVALSAQAAL#	T4

10

^aポリペプチド配列を1字略号で示す。*はN-末端を示し、#はC-末端を示す。

^bm-T2はメタ-ジブロモベンゼンを示し、T4は1, 2, 4, 5テトラブロモジュレンを示す。

【0213】

図3に示す結果は、B3-由来ポリペプチドを足場に付着させることの妥当性を実証している。SS-酸化を介して環化された対応するペプチドおよび直鎖ポリペプチドは、それらだけでは免疫原性がないからである。

【0214】

以下、表9Bに同じ結果を詳細に表す。CLIPS位置pおよびqなどの種々の値を示す。

20

【0215】

【表 9 B】

hCG-β3ループ由来ペプチドi c w. の異なるCLIPSによるワクチン接種実験からの抗体応答、および、hCG-生物学的検定における対応する中和活性

No.	ペプチド配列+CLIPS	CLIPS 位置 (p, q)	hCG における AA (x, y)	抗体力価 (10週) 2ラット ^b	中和 hCG- 活性化検定 ^c
2	*NYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVC SYAVALSAQ# + m-T2	10, 8	1, 1	4.0; <1	- (2x)
4	*NYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVC SYAVALSAQ# + SS	10, 8	1, 1	<1; 1.0	- (2x)
5	*NYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVC SYAVALSAQ# + T4	10, 8	1, 1	<1 (2x)	- (2x)
6	*NYRDVRFESIRLPGAPRGVNPVVS YAVALSAQ#	n.a.	1, 1	<1 (2x)	- (2x)
7	*VVANYRDVRFESCRLPGAPRGVN PVC SYAVALSAQAAL# + m-T2	10, 8	1, 1	<1 (2x)	- (2x)
8	*VVANYRDVRFESCRLPGAPRGVN PVC SYAVALSAQAAL# + T4	10, 8	1, 1	3.0; <1	- (2x)

^a太字で印刷したアミノ酸はこの位置の天然のCys残基に対するの置換基であり、下線を付したアミノ酸はCLIPSが付着されるCys残基を示す。

^b抗体力価は、結合ELISAのODがバックグラウンド-ODの3倍を依然として超えている血清希釈の $\log_{10}$ 値として示される (1/10希釈=1、1/100=2、1/1000=3、1/10000=4など)。

^c「+」は、10倍希釈された血清がhCG-誘導細胞活性化 (1および5 ng/ml hCG) を阻害できることを、「-」は、hCG-阻害効果が観察されなかったことを意味する。

【0216】

実施例7：hCGのペプチド模倣体の設計および調製、ならびにペプチドワクチンとしての使用

この実験においては、長さおよびCLIPS-付着に関するシステイン残基の位置の点で異なるhCGのβ3-ループに対応するポリペプチドのセットを、前述のように設計し、合成した。ポリペプチドをm-T2上に環化した (20% アセトニトリル / 80% 重炭酸アンモニウム (20 mM)、pH 7.8中、室温での、ペプチドと1.05等量のT2との1時間の反応)。その後、メスのウイスター系ラットに、0日目に、PBS / CFA 1:1 (v/v) (PBS = リン酸緩衝生理食塩水、CFA = 完全フロイントアジュバント) 中の約2.5 mg/mlのペプチドまたはペプチド-T-構成400 μlで免疫性を与え、4週後に追加免疫 (等量および等濃度) を行った。その後、免疫応答を確認するために、抗-ペプチド力価を6週後に測定し、最終的にラットを10週後に出血させて抗血清を収集した。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ-抗-ラット血清と組合せて、2,2'-アジン-ジ (エチルベンゾチアゾリンスルホン酸塩) (ABTS) を使用する、FISH-結合ELISA (Greiner社、パレスチナ; 1 μg/ml hCG (Biotrend社) によるGDA-コーティング) にて、抗血清を分析した。抗体B2をポジティブコントロールとして、分析に含めた。

【0217】

【表 10】

異なるペプチド長 (Cys IV+x、Cys V+y) のhCG-β 3ループのm-T2 CLIPS-ペプチド (Cys IV+p、Cys V-qのCLIPS位置) によるワクチン接種実験からの抗体応答、および、hCG-生物学的検定における対応する中和活性

No.	ペプチド配列+CLIPS	CLI-PS位置 (p, q)	hCGにおけるAA (x, y)	抗体価 (9週) 2ラット ^b	中和 hCG- 活性化検定 ^c
5	*NYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVCSYAVALSAQ# + m-T2	8, 6	1, 1	1.9 (2x)	- (2x)
6	*ANYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVCSYAVALSAQA# + m-T2	8, 6	0, 2	<1 (2x)	- (2x)
7	*VANYRDVRFESCRLPGAPRGVNPVCSYAVALSAQAA# + m-T2	8, 6	-1, 3	<1; 1.9	- (2x)
8	*NYRDVRFESCRLPGDPRGVNPVCSYAVALSAQ# + m-T2	8, 6	1, 1	<1 (2x)	- (2x)
8	*NYRDVRFESCRLPGCPRGVNPVCSYAVALSAQ# + m-T2 S S *NYRDVRFESCRLPGCPRGVNPVCSYAVALSAQ# + m-T2	8, 6 8, 6	1, 1 1, 1	2.9; 1.8	+, -

^a太字で印刷したアミノ酸はこの位置の天然のCys残基に対する置換基であり、下線を付したアミノ酸はCLIPSが付着されるCys残基を示す。

^b抗体価は、結合ELISAのODがバックグラウンド-ODの3倍を依然として超えている血清希釈の $-\log_{10}$ 値として示される (1/10希釈=1、1/100=2、1/1000=3、1/10000=4など)。

^c「+」は、10倍希釈された血清がhCG-誘導細胞活性化 (1および5 ng/ml hCG) を阻害できることを、「-」は、hCG-阻害効果が観察されなかったことを意味する。

【0218】

表 10 から、足場 T2 に結合するペプチド

*NYEDVRFESCRLPGCPRGVNPVCSYAVALSAQ# + m-T2
S
S

*NYRDVRFESCRLPGCPRGVNPVCSYAVALSAQ# + m-T2
を含む化合物が好ましいと結論される。

【0219】

実施例 8：VEGF-A のペプチド模倣体の設計および調製、ならびにペプチドワクチンとしての使用

この実験においては、長さおよびCLIPS-付着に関するシステイン残基の位置の点で異なる (FSHおよびhCGのB3-ループに対応する) VEGF-A のβ 5 ターン-β 6-ループに対応するポリペプチドのセットを、前述のように設計し、合成した。ポリペプチドをm-T2上に環化した (20% アセトニトリル / 80% 重炭酸アンモニウム (20 mM)、pH 7.8 中、室温での、ペプチドと1.05等量のT2との1時間の反応)。その後、メスのウィスター系ラットに、0日目に、PBS / CFA 1 : 1 (v / v

(P B S = リン酸緩衝生理食塩水、 C F A = 完全フロイントアジュバント) 中の約 2 . 5 m g / m l のペプチドまたは C L I P S - ペプチド-構成の 4 0 0 μ l で免疫性を与え、4 週後に追加免疫 (等量および等濃度) を行った。その後、免疫応答を確認するために、抗-ペプチド力価を 6 週後に測定し、最終的にラットを 9 週後に出血させて抗血清を収集した。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ-抗-ラット血清と組合せて、2, 2'-アジン-ジ(エチルベンゾチアゾリンスルホン酸塩) (A B T S) を使用する、 V E G F - 結合 E L I S A (Greiner 社、パレスチナ ; 0 . 1 μ g / m l V E G F - A による G D A - コーティング) にて、抗血清を分析した。m A b 2 9 3 をポジティブコントロールとして分析に含めた。

【 0 2 2 0 】

【 表 1 1 】

異なる C L I P S 位置 (C y s I V + p , C y s V - q) および異なるペプチド長 (C y s I V + x , C y s V + y) の V E G F - A β 5-ターン- β 6-ループの m-T2 C L I P S-ペプチドによるワクチン接種実験からの抗体応答、および、V E G F 増殖検定における対応する中和活性。

No.	ペプチド配列 + C L I P S ^a	C L I P S 位置 (p, q)	VEGF における AA (x, y)	抗体力価 (9週) 2ラット ^b	中和 VEGF- 増殖検定 ^c
1	*ESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQH# + m-T2	n.a.	5, -3	>1.8 (2x)	- (2x)
2	*ESNCTMQIMRIKPHQGQHIGEMSCLQH# + m-T2	8, 6	5, -3	>2.8 (2x)	+ (2x)
3	*ESNITCQIMRIKPHQGQHIGECFLQH# + m-T2	10, 8	5, -3	>2.8 (2x)	+, -
4	*ESNITMQCMRIKPHQGQHICEMSFLQH# + m-T2	12, 10	5, -3	>2.8; <1.8	+, -
5	*ESNITMQICRIKPHQGQHICGEMSFLQH# + m-T2	13, 11	5, -3	>1.8; <1.8	nd
6	*EESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHN#	n.a.	4, -2	>2.8; <1.8	- (2x)
7	*EESNCTMQIMRIKPHQGQHIGEMSCLQHN# + m-T2	8, 6	4, -2	>2.8 (2x)	+, -
8	*EESNITCQIMRIKPHQGQHIGECFLQHN# + m-T2	10, 8	4, -2	>2.8; <1.8	+, -
9	*EESNITMQCMRIKPHQGQHICEMSFLQHN# + m-T2	12, 10	4, -2	>1.8; <1.8	nd
10	*EESNITMQICRIKPHQGQHICGEMSFLQHN# + m-T2	13, 11	4, -2	<1.8 (2x)	nd

^b 抗体力価は、OD (m A b-結合 E L I S A) が OD-バックグラウンドの 3 倍を超えている 1 0 倍希釈の数として示される。

^c 「+」は、1 0 倍希釈された血清が 2 0 n g / m l V E G F の添加によって誘導された細胞増殖を阻害できることを、「-」は、細胞増殖阻害が 2 0 n g / m l V E G F にて観察されなかったことを意味する。

【 0 2 2 1 】

結論 : C L I P S 位置 8 , 6 (p = 8 および q = 6) および 1 0 , 8 (p = 1 0 および q = 8) が好ましい。

【 0 2 2 2 】

(表 1 2)

: C y s - ノットたんぱくサブファミリの要約

糖たんぱくホルモン- α ファミリー糖たんぱくホルモン(またはゴナドトロピン)- α 1, 2 (G L H A - 1, 2)糖たんぱくホルモン- β ファミリー胎盤性性腺刺激ホルモン- β (β - C G)ゴナドトロピン- β 1, 2 (G T H - I, II)卵胞刺激ホルモン(またはフォロトロピン (follotropin)) - β (F S H - β)黄体形成ホルモン- β (またはルトロピン)- β (β - L H)甲状腺刺激ホルモン(またはチロトロピン)- β (T S H)

コンタクチン関連たんぱく様 2 前駆体 (C T A - 2)

糖たんぱくホルモンベータ- 5 前駆体 (G P B - 5)

10

神経成長因子ファミリー

神経成長因子 (N G F)

神経栄養因子- 3, 4, 5, 7 (N T - 3, 4, 5, 7 ; H D N F)

脳由来神経栄養因子 (B D N F)

P D G F - ファミリー

血小板由来増殖成長因子 A, B - 1, 2 (P D G F - A, B - 1, 2)

P D G F 関連形質転換たんぱくシス (sis) (T S I S, _ S M S A V, P 2 8 S

20

I S)

胎盤成長因子 (P L G F)

血管内皮増殖因子 A, B, C, D, H (V G E F - A, B, C, D, H)

血管内皮増殖因子毒素 (T X V E, S W E G F, I C P P)

形質転換成長因子スーパーファミリー

形質転換成長因子-ベータ 1 ~ 5 (T G F β 1 ~ 5)アクチビン- β (インヒビン- β)

A T P - 依存性 C L P - たんぱく分解酵素 A T P - 結合サブユニット C L P X (C L

30

P X)

骨形成たんぱく 2 ~ 8, 1 0, 1 5 (B M P 2 ~ 8, 1 0, 1 5)

6 0 A たんぱく前駆体 (グラス ボトム ボート (Glass Bottom Boat) たんぱく、

6 0 A)

C E T - 1 シノラブディス エレガンス (Caenorhabditis Elegans)

デカペンタプレジックたんぱく前駆体 (D E C A)

D V R 1 - たんぱく前駆体 (ベジタル ヘミスフィア (Vegital Hemisphere) V G 1

たんぱく)

ドルサリン- 1 前駆体 (D S L 1)

X N R - 1, 2, 4 (アフリカツメガエル)

Z N R - 1 ゼブラダニオ (ゼブラフィッシュ)

V G 1 - セキショクヤケイ (ニワトリ)

胎盤骨形成たんぱく

節前駆体 (N O D A)

ノリー病たんぱく (N D P)

前立腺分化因子 (P D F)

(胚) 成長分化因子 1 ~ 9 (G D F - 1 ~ 9)

グリア細胞系由来神経栄養因子前駆体 (G D N F)

左右決定因子- b 前駆体 (レフティ- b たんぱく、 L F T B)

40

50

巨核球促進因子 (M S F)

ムチン-2 前駆体 (腸ムチン-2)

ミューラー管抑制因子 (M I S)

ニューロツリン前駆体 (N R T N)

ペルセフィン (Persephin) 前駆体 (P S P N)

スクレロスティン (Sclerostin) (S O S T)

スクリュー (Screw) たんぱく前駆体 (S C W)

ユニビン (Univin) 前駆体 (U N I V)

【 0 2 2 3 】

【 0 2 2 4 】

0
20
40
60

	N-端末	CysI (B 1-1-ル-)	CysII (B 1-1-ル-)	CysIII (B 2-1-ル-)	CysIV (B 3-1-ル-)	CysV (B 3-1-ル-)	CysVI + C-端末
hGLHA	PDVQDCE	CTLQENPFPSQPGAPILQ	CMGC	CFSSRAYPTPLRSKKTMLVQNVTSSTC	CVAKSVNRVTVMGGFVENHTA	CH	CSITCYTHKS
hSFH-β	S	CELTNITIAKEECRCFCISINTTW	CAGY	CYTROLVYKDPARRKIOKT	CITKELVETVRVFGCAHIADSLTYTPVATQ	CH	CGKQDSSTDTQVRLGFSYCSFGEIMKE
hCG-β	SKEPLRP	CRFMATLAVKEGCPVCTVNTTI	CAGY	CPTMTIRVLQGVLPALPQW	CNYVDVRESRLPGCPRGANPVSVAVALS	CQ	CALCRSSTDCGSPKQHPITCDIPRQDSSSKAPPSLPSPSRPLPSPSUTPLLPQ
hTSH-β	F	CPIPTETMIIERECAYCLTINTI	CAGY	CMTRIDNGKLFK/ALSDQV	CITRDVIRVTVEIFGCFLWHPFYSFVALS	CK	CGKONTDYDCHCEAKNTKNTCTPQKSYLVGSV
hLH-β	SREPLRPW	CHPINALIAVEKEGCPVCTVNTTI	CAGY	CPTMTIRVLQAVLPPLPQW	CITYRDVRESRLPGCPRGVDPVSPFVALS	CR	CGPQRRTSDCGSPKQHPITCDHPQLSGLLFL
hMGF	SSSHPIPIRGEFSV	CDSSVSWWGDKTTADIKGKEMALGEVWNNVSFKQYFFETK	CysII	CRDNPVDSG	CRGDSKHWNSY	CysIV (B 3-1-ル-)	CysVI
hBDNF	HSDPARRGELS	CDSSSEWTAADKKTADVMSGGVTVLEKVPVSKGQKQJFYETK	CysII	CNPMSGTKEG	CRGIDKRHWNSQ	CV	CYLSPKAVRAA
						CV	CITLTKRGR
N-端末		CysI (B 1-1-ル-)	CysII	CysIII (B 2-1-ル-)	CysIV (B 3-1-ル-)	CysV	CysVI
hVEGF-a	APMAEGGQGNHEHGVKFWMDVYGRSY	CHIETLVDFIOEYDPEIEYIKFSPCVLVR	CSGC	CNDEGLE	CYPTESNTIMQIRKIPHQGHIGEMSFLQHNK	CE	CRPKKDR
hPLGF	SEVENWPFQEWGRSY	CHALERLVDMVSEYSPSEVHEHMFSPQSVLLR	CTGC	CCDENLH	CYPIETANVTMLLKRSGDPSYVELTFSQVHR	CE	CRPLREK
hPDGF-a	SIEEAPAV	CKRTIYVEIPRSQVDPSTANFLWPPQVEVQR	CTGC	CNTSSVK	CQSPRVHRSKVAVVEYVRKPKLKEVQVRLSEHLE	CA	CATTSLN
hPDGF-b	SLGSLTAEPAMIAE	CKRTIETVEISRRLDRITNANFLWPPQVEVQR	CSGC	CNNRNQ	CRPTQVQLRPVQVQREINVRKPKFKKATVTLDEHLA	CK	CETVAAA
N-端末		CysI (B 1-1-ル-)	CysII	CysIII (B 2-1-ル-)	CysIV (B 3-1-ル-)	CysV	CysVI
hTGF-β1	ALDNTYCFSSTEKN	CCVRLQYDFDKRLQGWKKHEPKGYTHAF	CLGP	CPTWMSLDTSQSKVALYNQIHFGASAAPC	CPTWMSLDTSQSKVALYNQIHFGASAAPC	CK	CYFOALEFLPIWTVGVRKPKVEQLSNMVRPS
hBMP-2	QAKGKQRKLKSS	CKKRPLVYDFSDVQWMDWVAPPGYHAFY	CHGE	CPEPLADHLNSTHNAVQTLVHNSKPKAC	CPEPLADHLNSTHNAVQTLVHNSKPKAC	CG	CYFTFLSAISMLYDENIKVMLKNYQDMVVEG
hBMP-7	STGSKQRQNSKPTKQNEALRMANVAENSSSDQROA	CKKHLYVDFRDLGWQDNIWAPGTAANY	CEGE	CAPFLSNMATHNAVQTLVHFNFTVPKPC	CAPFLSNMATHNAVQTLVHFNFTVPKPC	CG	CAPTQLMAISLYFEDSSNMLKRYKNMAVRA
hBMP-10	NAGNY	CKRTFLYDFRGEIGWDSMIAPGTAANY	CRGV	CNPLAEHLTPTHKADQLVHLKSKQSKAC	CNPLAEHLTPTHKADQLVHLKSKQSKAC	CG	CYFTLEPSILYLDNGVTVYKRYESMAVSE
hGDNF	SPDKQMAVLPRERNQMAAANPENSRCGRGGRGQRKRG	CVALTALHNAVTDLGLGYETKEELFRY	CSGS	CDAAEYTKDLKHLNRNRLVSDKVGQAC	CDAAEYTKDLKHLNRNRLVSDKVGQAC	CG	CRPMADDDLSFDLNNVYHLKRFHSANR
hGDF-5	APLATRQGRPSKMLKAR	CSKVALHNVKMGWDWNIAPLEYAFH	CEGL	CEPLBSLEPTNHQVRLVNSDKVDESPPTTC	CEPLBSLEPTNHQVRLVNSDKVDESPPTTC	CG	CYFTFLSPSILFIDSNVWVYQYEDMAVSES
hGDF-15	ARARNGDHCPLPGR	CCRLHTVFRASLIDGWADWVLSRFEVQVTM	CIGA	CPSQFAANMAHQDKTSLHRLKPDVTPAC	CPSQFAANMAHQDKTSLHRLKPDVTPAC	CH	CYPASVNPMLUKDTGTGSLQTYDDLLAKD
N-端末		CysI (B 1-1-ル-)	CysII	CysIII (B 2-1-ル-)	CysIV (B 3-1-ル-)	CysV	CysVI
hTGF-β1	ALDNTYCFSSTEKN	CCVRLQYDFDKRLQGWKKHEPKGYTHAF	CLGP	CPTWMSLDTSQSKVALYNQIHFGASAAPC	CPTWMSLDTSQSKVALYNQIHFGASAAPC	CK	CYFOALEFLPIWTVGVRKPKVEQLSNMVRPS
hBMP-2	QAKGKQRKLKSS	CKKRPLVYDFSDVQWMDWVAPPGYHAFY	CHGE	CPEPLADHLNSTHNAVQTLVHNSKPKAC	CPEPLADHLNSTHNAVQTLVHNSKPKAC	CG	CYFTFLSAISMLYDENIKVMLKNYQDMVVEG
hBMP-7	STGSKQRQNSKPTKQNEALRMANVAENSSSDQROA	CKKHLYVDFRDLGWQDNIWAPGTAANY	CEGE	CAPFLSNMATHNAVQTLVHFNFTVPKPC	CAPFLSNMATHNAVQTLVHFNFTVPKPC	CG	CAPTQLMAISLYFEDSSNMLKRYKNMAVRA
hBMP-10	NAGNY	CKRTFLYDFRGEIGWDSMIAPGTAANY	CRGV	CNPLAEHLTPTHKADQLVHLKSKQSKAC	CNPLAEHLTPTHKADQLVHLKSKQSKAC	CG	CYFTLEPSILYLDNGVTVYKRYESMAVSE
hGDNF	SPDKQMAVLPRERNQMAAANPENSRCGRGGRGQRKRG	CVALTALHNAVTDLGLGYETKEELFRY	CSGS	CDAAEYTKDLKHLNRNRLVSDKVGQAC	CDAAEYTKDLKHLNRNRLVSDKVGQAC	CG	CRPMADDDLSFDLNNVYHLKRFHSANR
hGDF-5	APLATRQGRPSKMLKAR	CSKVALHNVKMGWDWNIAPLEYAFH	CEGL	CEPLBSLEPTNHQVRLVNSDKVDESPPTTC	CEPLBSLEPTNHQVRLVNSDKVDESPPTTC	CG	CYFTFLSPSILFIDSNVWVYQYEDMAVSES
hGDF-15	ARARNGDHCPLPGR	CCRLHTVFRASLIDGWADWVLSRFEVQVTM	CIGA	CPSQFAANMAHQDKTSLHRLKPDVTPAC	CPSQFAANMAHQDKTSLHRLKPDVTPAC	CH	CYPASVNPMLUKDTGTGSLQTYDDLLAKD

表14は、Cys-ノットたんぱくファミリーの種々の構成員における保存システインの位置を示し、角括弧内の数字は、たんぱくドメインまたは保存たんぱく領域の多重アラインメントの、Pfamデータベースを示している。第1欄は、たんぱく内部で見つかったシステイン残基すべてを記載している。第2欄は、6つの保存システイン残基(CysI~CysVI)の称号を表している。他の欄は、個々のサブファミリー構成員に対応するアミノ酸位置(N-末端から開始)を示している。

【0225】

【表14A】

糖たんぱくホルモン-アルファサブファミリー (PF00236)

			hCG-a
C-1			7
C-2	CysI		10
C-3	CysII		28
C-4			31
C-5	CysIII		32
C-6			59
C-7	CysIV		60
C-8	CysV		82
C-9	CysVI		84
C-10			87

10

20

【0226】

【表14B】

糖たんぱくホルモン-ベータサブファミリー (PS00689/PS00261)

		hCG-beta	FSH-beta
C-1	CysI	9	3
C-2		23	17
C-3		26	20
C-4	CysII	34	28
C-5	CysIII	38	32
C-6	CysIV	57	51
C-7		72	66
C-8	CysV	88	82
C-9	CysVI	90	84
C-10		93	87
C-11		100	94
C-12		110	104

30

【0227】

【表14C】

NGF-サブファミリー (PF00243)

		NGF	BDNF
C-1	CysI	15	13
C-2	CysII	58	58
C-3	CysIII	68	68
C-4	CysIV	80	80
C-5	CysV	108	109
C-6	CysVI	110	111

40

【0228】

50

【表 1 4 D】

PDGF-サブファミリー (PF00341)

		PDGF	PLGF	VEGF-A
C-1	CysI	16	35	26
C-2		43	60	51
C-3	CysII	49	66	57
C-4		52	69	60
C-5	CysIII	53	70	61
C-6	CysIV	60	77	68
C-7	CysV	97	111	102
C-8	CysVI	99	113	104

10

【0229】

【表 1 4 E】

TGF-サブファミリー

		TGF-B2	BMP2	BMP7	GDNF	GDF-15
C-1		7	-	-	-	9
C-2	CysI	15	14	38	42	16
C-3		16	-	-	-	17
C-4	CysII	44	43	67	69	46
C-5	CysIII	48	47	71	73	50
C-6		77	78	103	102	79
C-7	CysIV	78	79	104	103	80
C-8	CysV	109	111	136	132	111
C-9	CysVI	111	113	138	134	113

20

【図面の簡単な説明】

【0230】

【図 1 A】Cys-ノット成長因子ファミリー構成員の B3-ループおよびそのペプチド模倣体の略図であり、Cys-ノットたんぱくファミリーの種々の構成員の一般的なループ-構造を示している。

30

【図 1 B】Cys-ノット成長因子ファミリー構成員の B3-ループおよびそのペプチド模倣体の略図であり、残基 CysIV および CysV を含む B3-ループを示している。

【図 1 C】Cys-ノット成長因子ファミリー構成員の B3-ループおよびそのペプチド模倣体の略図であり、本発明のペプチド模倣体の構造設計を示している。2つのシステインが、これらのシステインを介したポリペプチドの足場 (Tとして示す) への共有結合が、天然たんぱくの B3-ループの二次構造に類似する立体配座をとるようにペプチドを誘導するために、ポリペプチド内に導入される。

【図 2】F S H のペプチド模倣体を使用するワクチン接種実験の結果を示す図である。X-軸に示されるペプチド化合物で免疫付与されたラットの血清が、それらのペプチドが天然 F S H に対する免疫応答を誘導することができるかを決定するために、E L I S A を使用して分析された。血清の 4 段階の希釈が試験された (1 / 10 , 1 / 30 , 1 / 100 および 1 / 300)。F S H に対するポリクローナル抗体 5215 (no. 15) およびモノクローナル抗体 6602 (no. 16) が、ポジティブコントロールとして使用された。詳細は実施例 3 に記載されている。

40

【図 3】h C G のペプチド模倣体を使用するワクチン接種実験の結果を示す図である。X-軸に示されるペプチド化合物で免疫付与されたラットの血清が (使用された異なるペプチドおよび足場については、表 5 参照)、それらのペプチドが天然 h C G に対する免疫応答を誘導することができるかを決定するために、E L I S A を使用して分析された。血清の種々の段階の希釈が試験された。抗体 h C G - B 2 (no. 7) が、ポジティブコント

50

ルールとして使用された。詳細は実施例 6 に記載されている。

【図 4】オルト-、メタ-またはパラ-位の 2 つハロメチル基を有する芳香族足場を示す図である。H a l は塩素、臭素またはヨウ素原子を示す。

【0 2 3 1】

- 1, 2 - ビス(ハロメチル)ベンゼンおよび他の位置異性体
- 3, 4 - ビス(ハロメチル)ピリジン (X = N) および他の位置異性体
- 3, 4 - ビス(ハロメチル)ピリダジン (X = N) および他の位置異性体
- 4, 5 - ビス(ハロメチル)ピリミジン (X = N) および他の位置異性体
- 4, 5 - ビス(ハロメチル)ピラジン (X = N) および他の位置異性体
- 4, 5 - ビス(ハロメチル)- 1, 2, 3 - トリアジン (X = N) および他の位置異性体 10
- 5, 6 - ビス(ハロメチル)- 1, 2, 4 - トリアジン (X = N) および他の位置異性体
- 3, 4 - ビス(ハロメチル)ピロール (X = N)、- フラン (X = O)、- チオフェン (X = S) および他の位置異性体
- 4, 5 - ビス(ハロメチル)イミダゾール (X = N, N)、- オキサゾール (X = N, O)、- チアゾール (X = S) および他の位置異性体
- 4, 5 - ビス(ハロメチル)- 3 H - ピラゾール (X = N, N)、- イソオキサゾール (X = N, O)、- イソチアゾール (X = S) および他の位置異性体
- 1, 2 - ビス(- プロモメチルカルボニルアミノ)ベンゼン (X₁ = N H、X₂ = O)
- 2, 2' - ビス(ハロメチル)ビフェニレン
- 2, 2'' - ビス(ハロメチル)テルフェニレン 20
- 1, 8 - ビス(ハロメチル)ナフタレン
- 1, 10 - ビス(ハロメチル)アントラセン
- ビス(2 - ハロメチルフェニル)メタン

【図 5】オルト-、メタ-またはパラ-位の 3 つのハロメチル基を有する芳香族足場を示す図である。 1, 2, 3 - トリス(ハロメチル)ベンゼンおよび他の位置異性体 2, 3, 4 - トリス(ハロメチル)ピリジン (X = N) および他の位置異性体 2, 3, 4 - トリス(ハロメチル)ピリダジン (X = N) および他の位置異性体 3, 4, 5 - トリス(ハロメチル)ピリミジン (X = N) および他の位置異性体 4, 5, 6 - トリス(ハロメチル)- 1, 2, 3 - トリアジン (X = N) および他の位置異性体 2, 3, 4 - トリス(ハロメチル)ピロール (X = N)、- フラン (X = O)、- チオフェン (X = S) および他の位置異性体 2, 4, 5 - ビス(ハロメチル)イミダゾール (X = N, N)、- オキサゾール (X = N, O)、- チアゾール (X = S) および他の位置異性体 3, 4, 5 - ビス(ハロメチル)- 1 H - ピラゾール (X = N, N)、- イソオキサゾール (X = N, O)、- イソチアゾール (X = S) および他の位置異性体 2, 4, 2' - トリス(ハロメチル)ビフェニレン 2, 3', 2'' - トリス(ハロメチル)テルフェニレン 1, 3, 8 - トリス(ハロメチル)ナフタレン 1, 3, 10 - トリス(ハロメチル)アントラセン 30

ビス(2 - ハロメチルフェニル)メタン

【図 6】オルト-、メタ-またはパラ-位の 4 つのプロモメチル基を有する芳香族足場を示す図である。 1, 2, 4, 5 - テトラ(ハロメチル)ベンゼンおよび他の位置異性体 1, 2, 4, 5 - テトラ(ハロメチル)ピリジン (X = N) および他の位置異性体 2, 4, 5, 6 - テトラ(ハロメチル)ピリミジン (X₁ = X₂ = N) および他の位置異性体 2, 3, 4, 5 - テトラ(ハロメチル)ピロール (X = N H)、- フラン (X = O)、- チオフェン (X = S) および他の位置異性体 2, 2', 6, 6' - テトラ(ハロメチル)ビフェニレン 2, 2'', 6, 6'' - テトラ(ハロメチル)テルフェニレン 2, 3, 5, 6 - テトラ(ハロメチル)ナフタレン 2, 3, 7, 8 - テトラ(ハロメチル)アントラセン 40

ビス(2, 4 - ビス(ハロメチル)フェニル)メタン (X = C H₂)

【図 7】単-、二重-および三重-ループペプチド構造の一段階合成の略図である。

【図 8】二重-ループペプチドの段階的合成の略図である。部分的 C y s (T r t) - 保護ペプチドの m P 2 との最初の反応に、残存する T r t - 保護基の除去、および m P 2 の第 2 の当量との反応が続く。

【 図 1 A 】

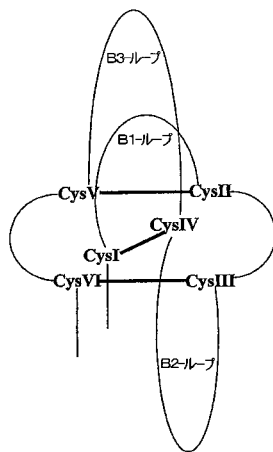


Fig. 1A

【 図 1 B 】

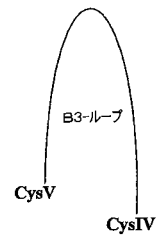


Fig. 1B

【 図 1 C 】

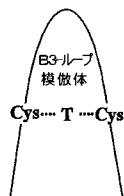


Fig. 1C

【 図 2 】

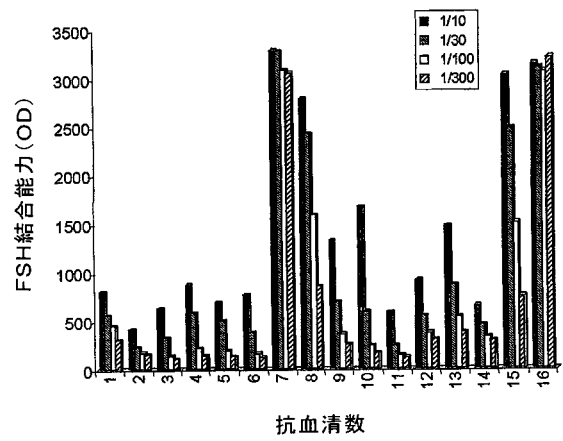


Fig. 2

【図 3】

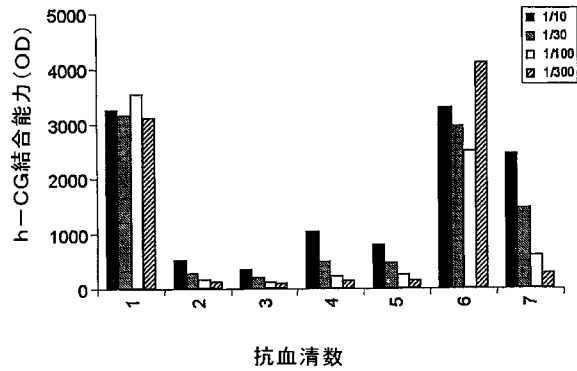
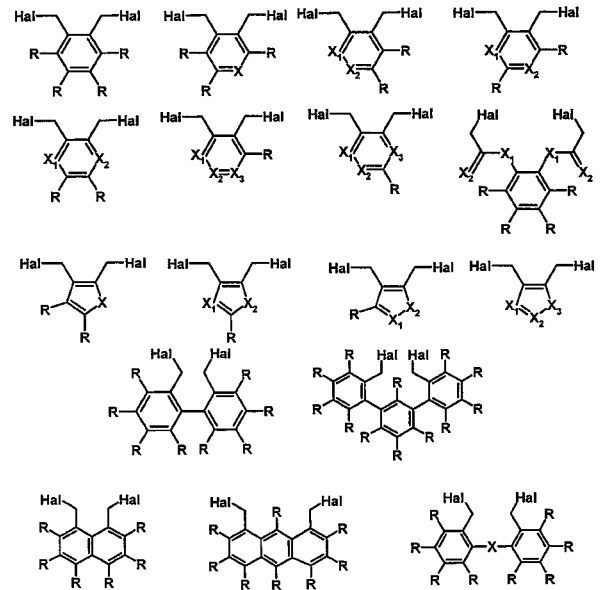


Fig. 3

【図 4】

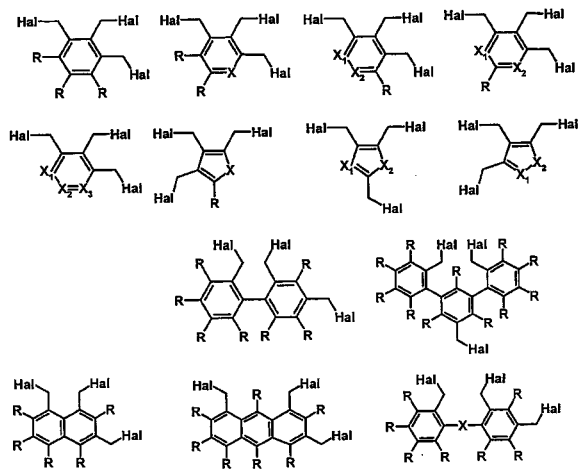


X_{1,2,3} = N(H), O, S

示される化合物の他のオルト、メタおよびパラ誘導体もすべて含む

Fig. 4

【図 5】

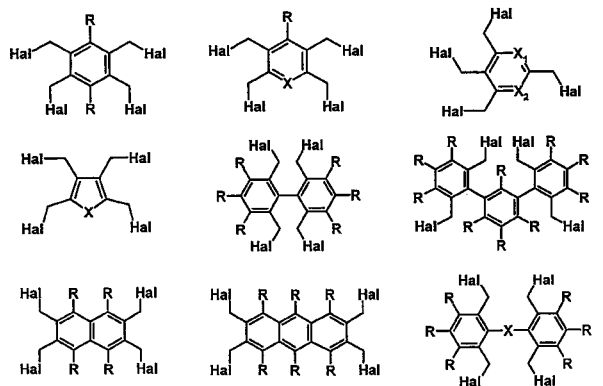


X_{1,2,3} = N(H), O, S

示される化合物の他のオルト、メタおよびパラ誘導体もすべて含む

Fig. 5

【図 6】



X_{1,2} = N(H), O, S

示される化合物の他の可能なオルト、メタおよびパラ誘導体もすべて含む

Fig. 6

【図 7】

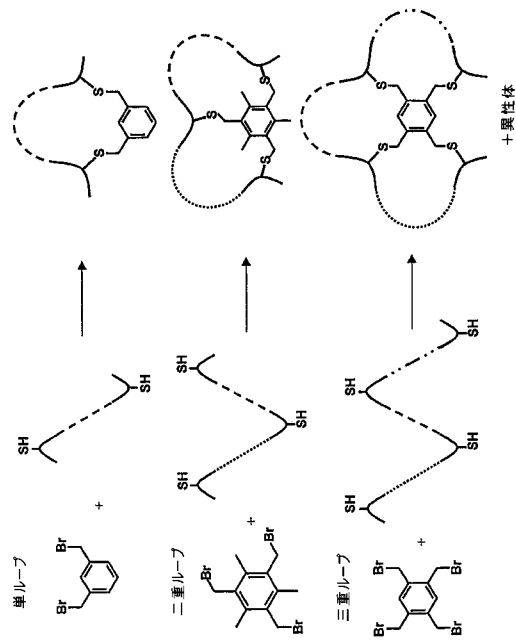


Fig. 7

【図 8】

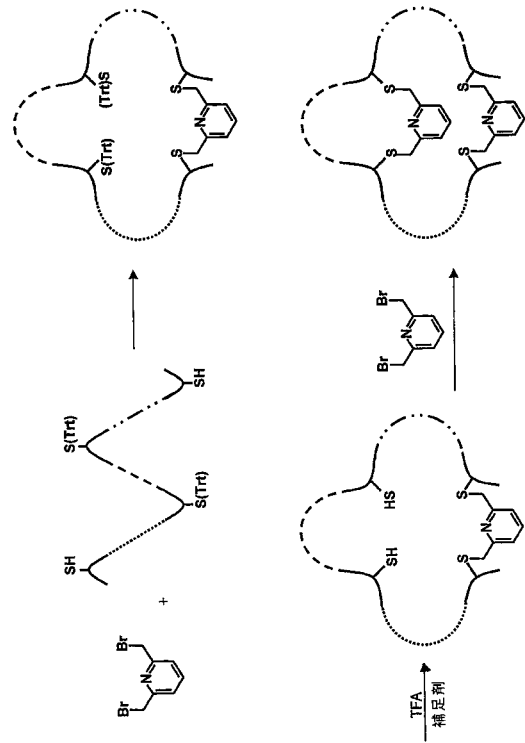


Fig. 8

【配列表】

2008529482000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2006/000036

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
INV. G01N33/68	C07K14/48	C07K14/49	C07K14/495	C07K14/61
A61K47/42	A61K39/00	C07K14/52	C07K14/59	C07K14/04
C07K7/54				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C07K A61K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
X	EP 1 452 868 A (PEPSCAN SYSTEMS B.V) 1 September 2004 (2004-09-01) cited in the application paragraph [0041]; examples 3-5; tables 2,3,56,8,9			1-57
P,X	----- TIMMERMAN PETER ET AL: "Rapid and quantitative cyclization of multiple peptide loops onto synthetic scaffolds for structural mimicry of protein surfaces." CHEMBIOCHEM : A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY. MAY 2005, vol. 6, no. 5, May 2005 (2005-05), pages 821-824, XP002378236 ISSN: 1439-4227			39-57
X	Scheme 1 and 2; the whole document ----- -/-			1-38
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.				
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family				
Date of the actual completion of the international search 2 May 2006			Date of mailing of the international search report 18/05/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016			Authorized officer Vogt, T	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/NL2006/000036

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MELOEN R H ET AL: "Design of synthetic peptides for diagnostics." CURRENT PROTEIN & PEPTIDE SCIENCE. AUG 2003, vol. 4, no. 4, August 2003 (2003-08), pages 253-260, XP001247016 ISSN: 1389-2037 the whole document	1-57
X	MURALI R ET AL: "STRUCTURE-BASED DESIGN OF IMMUNOLOGICALLY ACTIVE THERAPEUTIC PEPTIDES" IMMUNOLOGIC RESEARCH, KARGER, BASEL, CH, vol. 17, no. 1/2, January 1998 (1998-01), pages 163-169, XP000960672 ISSN: 0257-277X the whole document	39
X	EP 0 467 699 A (MERCK & CO. INC) 22 January 1992 (1992-01-22) claims	35,36
Y	TIMMERMAN PETER ET AL: "Mapping of a discontinuous and highly conformational binding site on follicle stimulating hormone subunit-beta (FSH-beta) using domain Scan(TM) and Matrix Scan(TM) technology" MOLECULAR DIVERSITY, vol. 8, no. 2, 2004, pages 61-77, XP002378237 ISSN: 1381-1991 the whole document	1-57
Y	SLOOTSTRA J W ET AL: "STRUCTURAL ASPECTS OF ANTIBODY-ANTIGEN INTERACTION REVEALED THROUGHSMALL RANDOM PEPTIDE LIBRARIES" MOLECULAR DIVERSITY, ESCOM SCIENCE PUBLISHERS, LEIDEN, NL, vol. 1, 1996, pages 87-96, XP002051008 ISSN: 1381-1991 figure 1	1-38
A	SUN ET AL: "the cysteine-knot growth factor superfamily" ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS AND BIOMOLECULAR STRUCTURE, ANNUAL REVIEWS INC., PALO ALTO, CA, US, vol. 24, 1995, pages 269-292, XP002104603 ISSN: 1056-8700	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2006/000036

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VITT U A ET AL: "Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 15, no. 5, May 2001 (2001-05), pages 681-694, XP002238094 ISSN: 0888-8809 -----	
A	DARLING R J ET AL: "Intracellular folding pathway of the cystine knot-containing glycoprotein hormone alpha-subunit" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 40, no. 2, 16 January 2001 (2001-01-16), pages 577-585, XP002343681 ISSN: 0006-2960 -----	
A	WO 03/106487 A (PROTHERICS PLC; GLOVER, JAMES; DOWNHAM, MATTHEW; ROSUL, AJAZ; SPENCER,) 24 December 2003 (2003-12-24) sequence 2 -----	
A	WO 03/095486 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT; GOETSCH, LILIANE; AUBRY, JEAN-PIERRE; KLINGUE) 20 November 2003 (2003-11-20) sequence 50 -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

International Application No. PCT/NL2006/000036

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claim 57 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 35-38

The present claims 35-38 encompass compounds defined only by their desired function, contrary to the requirements of clarity of Article 6 PCT, because the result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, except for the compounds disclosed in the description. Undue experimentation would be required to screen compounds randomly. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was consequently restricted to the compounds disclosed in claim 52.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NL2006/000036**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☒ Claims Nos.: 35-38, 57
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 57 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 35-38
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2006/000036

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1452868	A	01-09-2004	AU 2004215030 A1	10-09-2004
			CA 2517834 A1	10-09-2004
			WO 2004077062 A2	10-09-2004
			US 2006073518 A1	06-04-2006
EP 0467699	A	22-01-1992	CA 2047042 A1	20-01-1992
			JP 4243895 A	31-08-1992
WO 03106487	A	24-12-2003	AU 2003277090 A1	31-12-2003
			CA 2489724 A1	24-12-2003
			CN 1675241 A	28-09-2005
			EP 1515989 A1	23-03-2005
WO 03095486	A	20-11-2003	AU 2003255563 A1	11-11-2003
			FR 2839452 A1	14-11-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 15/16 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 15/18 (2006.01)	A 6 1 P 15/16	
C 0 7 K 14/475 (2006.01)	A 6 1 P 15/18	
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/475	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	C 1 2 M 1/00	A

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

(72) 発明者 ティマルマン, ペーテル
オランダ国 レーリスタット ローゼンガート 1 9 - 4 4
(72) 発明者 ビュエイク, ヴァウテル コルネリス
オランダ国 レーリスタット スフーネル 4 3 - 4 0
(72) 発明者 スロートストラ, イエレ ヴァウテル
オランダ国 レーリスタット スハウ 3 9 - 2 3
(72) 発明者 ファン デイク, エフェルト
オランダ国 ヒートホールン コルネリスフラヒト 4
(72) 発明者 メルーン, ロベルト ハンス
オランダ国 レーリスタット カルフェール 1 0 - 0 4

F ターム(参考) 2G045 DA36 FB03

4B029 AA07 BB11 CC03 FA15
4B064 AG03 AG13 AG15 AG31 DA13
4C085 AA03 AA13 AA14 BB11 CC21 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA16 BA17 BA18 CA40 DA02 DA45
DA86 EA50 FA33 FA44 FA61

专利名称(译)	结合化合物，免疫原性化合物和肽模拟物		
公开(公告)号	JP2008529482A	公开(公告)日	2008-08-07
申请号	JP2007552076	申请日	2006-01-24
[标]申请(专利权)人(译)	佩普斯甘系统公司		
申请(专利权)人(译)	PEPSCAN系统为主.磷酸盐.		
[标]发明人	ティマルマンペーテル ピュエイクヴァウテルコルネリス スロートストライエレヴァウテル ファンデイクエフェルト メルーンロベルトハンス		
发明人	ティマルマン,ペーテル ピュエイク,ヴァウテル コルネリス スロートストラ,イエレ ヴァウテル ファン デイク,エフェルト メルーン,ロベルト ハンス		
IPC分类号	C12P21/00 C07K16/22 A61K39/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P15/16 A61P15/18 C07K14/475 C07K14/00 C07K16/00 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12M1/00		
CPC分类号	A61P15/16 A61P15/18 A61P35/00 C07K7/06 C07K14/52 C07K14/5409 C07K14/59 C07K14/7158 G01N33/6812		
FI分类号	C12P21/00.A C07K16/22.ZNA A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P15/16 A61P15/18 C07K14/475 C07K14/00 C07K16/00 G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12M1/00. A		
F-TERM分类号	2G045/DA36 2G045/FB03 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/CC03 4B029/FA15 4B064/AG03 4B064 /AG13 4B064/AG15 4B064/AG31 4B064/DA13 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045 /BA17 4H045/BA18 4H045/CA40 4H045/DA02 4H045/DA45 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA33 4H045/FA44 4H045/FA61		
优先权	2005075174 2005-01-24 EP 2005077896 2005-12-16 EP		
其他公开文献	JP5372380B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于产生适于测试免疫原性化合物和/或目标结合化合物的存在和/或鉴定的化合物的方法和方法。本文还提供了免疫原性化合物和组合物，以及胱氨酸结家族成员的肽模拟物。

サンプル no.	ポリペプチド ^a	足場 ^b
1	*CRVPGDAHHADSLC#	m-T2
2	*CRVPGDAHHADSLC#	T4
3	*CVRVPGAAHHADSLYC#	m-T2
4	*CVRVPGAAHHADSLYC#	T4
5	*YETCRVPGDAHHADSLCTYP#	m-T2
6	*YETCRVPGDAHHADSLCTYP#	T4
7	*TFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQAH#	m-T2
8	*KIQKTATF ^h ELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQA HAGK#	T4
9	*CYTRDLVYKDPARPKIQKTC#	T4
10	*KIQKTATFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQA HAGK#	m-T2
11	*TQAHC GKADSDSTDC#	T4
12	*TFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQAH#	None; SS cyclized
13	*TFKELVYETCRVPGAAHHADSLCTYPVATQAH#	T4
14	*TFKELVYETVRVPGCAHHADSLYTPVATQAH#	None; linear