

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/117242

発行日 令和1年10月31日(2019.10.31)

(43) 国際公開日 平成30年6月28日(2018.6.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06 Z N A	4 H O 4 5
C 4 O B 40/10 (2006.01)	C 4 O B 40/10	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	
C 4 O B 30/04 (2006.01)	C 4 O B 30/04	
C O 7 K 17/02 (2006.01)	C O 7 K 17/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)		

出願番号	特願2018-558081 (P2018-558081)	(71) 出願人	000229117
(21) 国際出願番号	PCT/JP2017/046019		日本ゼオン株式会社
(22) 国際出願日	平成29年12月21日(2017.12.21)		東京都千代田区丸の内一丁目6番2号
(31) 優先権主張番号	特願2016-248711 (P2016-248711)	(74) 代理人	100147485
(32) 優先日	平成28年12月22日(2016.12.22)		弁理士 杉村 憲司
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(74) 代理人	230118913
			弁護士 杉村 光嗣
		(74) 代理人	100175477
			弁理士 高橋 林太郎
		(74) 代理人	100181847
			弁理士 大島 かおり
		(72) 発明者	市村 直也
			東京都千代田区丸の内一丁目6番2号 日
			本ゼオン株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 オリゴペプチドの探索方法、オリゴペプチド、修飾ペプチド、及び免疫測定方法

(57) 【要約】

目的のタンパク質やペプチドの末端に結合させることができるオリゴペプチドを、ペプチドライブラリーから効率よく探索する方法を提供する。さらに、効率的で安全性の高い免疫測定方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ランダムなアミノ酸配列を内在するペプチドライブラリーを、少なくとも表面がノルボルネン系重合体で構成される成形体の前記表面に曝露するステップ（Ⅰ）と、
暴露された前記表面を水系溶媒で洗浄するステップ（ⅠⅠ）と、
前記表面に残留する化合物を、該表面を有機溶媒で洗浄することにより回収するステップ（ⅠⅠⅠ）と、
回収した前記化合物のペプチド配列情報を解析するステップ（ⅠⅤ）とを含む、オリゴペプチドの探索方法。

【請求項 2】

前記ノルボルネン系重合体が、ノルボルネン系単量体の開環重合体水素化物である、請求項 1 に記載の探索方法。

【請求項 3】

前記水系溶媒が緩衝液である、請求項 1 又は 2 に記載の探索方法。

【請求項 4】

前記有機溶媒が極性有機溶媒である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の探索方法。

【請求項 5】

Thr - Val - Asp - Ser - Cys - Leu - Thr（配列番号 1）のアミノ酸配列を含む、オリゴペプチド。

【請求項 6】

ノルボルネン系重合体に対して接着性を有する、請求項 5 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 7】

前記ノルボルネン系重合体が、ノルボルネン系単量体の開環重合体水素化物である、請求項 6 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 8】

Thr - Val - Asp - Ser - Cys - Leu - Thr（配列番号 1）のアミノ酸配列を含み、ノルボルネン系重合体に接着性を有する、修飾ペプチド又は修飾ポリペプチド。

【請求項 9】

ノルボルネン系重合体で構成される容器の内表面に、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の探索方法により探索されたオリゴペプチドを固相化し、
内表面にオリゴペプチドを固相化した前記容器を用いて測定を行う、免疫測定方法。

【請求項 10】

前記ノルボルネン系重合体が、ノルボルネン系単量体の開環重合体水素化物である、請求項 9 に記載の免疫測定方法。

【請求項 11】

前記オリゴペプチドが Thr - Val - Asp - Ser - Cys - Leu - Thr（配列番号 1）のアミノ酸配列を含む、請求項 9 または 10 に記載の免疫測定方法。

【請求項 12】

前記測定の前にブロッキング処理をさらにを行い、
ブロッキング処理剤として、Tween 20 を用いる、請求項 9 ～ 11 のいずれかに記載の免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オリゴペプチドの探索方法、並びに特定のアミノ酸配列を含むオリゴペプチド、修飾ペプチド、及び免疫測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ノルボルネン系重合体からなる成形体を培養容器として用いることで、組み換え細胞の

10

20

30

40

50

増殖性や組み換え遺伝子の発現量が向上することが知られている（特許文献1）。

また、ノルボルネン系重合体からなる成形体は、タンパク質の凝集、変性、分解を生じさせにくいため、タンパク質溶液製剤の長期保存に好適であることが知られている（特許文献2等）。

【0003】

また、微量含有の物質を検出し、定量する方法として、ELISA法（Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay）と総称される抗原抗体反応法が汎用されている。一般に、ELISA法では、プラスチック製のマイクロウェルプレートなどの容器内表面に固相化された抗体や抗原などのタンパク質と、検体中の被験物との反応を、直接的に又は間接的に検出する。

10

【0004】

ところで、近年、基材にペプチド等の生理活性物質等を固定化し、生体試料中の対象物質の並列検出及び分析等を行う技術が開発されてきている。

このような検出及び分析等に用いる生理活性物質固定化用基板として、例えば、ノルボルネン系重合体からなる基板表面に、検出対象物質の非特異的な吸着・結合を抑制し、生理活性物質を固定化するために、ホスホリルコリン基を有するユニット、疎水性基を有するユニット及びアルデヒド基又はマレイミド基を有するユニットから構成される高分子化合物を被覆することが提案されている（特許文献3）。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0005】

【特許文献1】国際公開第2015/199119号

【特許文献2】特開2011-168610号公報

【特許文献3】特開2010-117189号公報

【特許文献4】特開2009-080119号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、特許文献3の方法では、成形体のタンパク質と接する面がノルボルネン系重合体以外的高分子化合物で被覆されるため、ノルボルネン系重合体が有するタンパク質の安定化効果が減ってしまうという問題があった。

30

また、ノルボルネン系重合体で構成される成形体は、低蛍光であることが知られている（特許文献4）ため、蛍光検出を汎用するELISAに好適であると考えられる。しかしながら、タンパク質などの物質の素材表面への物理的吸着性がポリスチレンに比較して弱いため、抗体や抗原を表面に固相化することが難しいという問題があった。

【0007】

また、ELISA法では、測定試料をウェル内に添加したあと、ウェル内から測定試料を除く操作と、ウェルを洗浄する操作が必要であるが、測定試料中には感染症を引き起こすウイルスや微生物が混入している可能性があり、測定操作中に液の飛沫を受けるといったことに起因する感染リスクの問題もある。

40

【0008】

本発明は、かかる従来技術の実情に鑑みてなされたものであり、目的のタンパク質やペプチドの末端に結合させることができるオリゴペプチドを、ペプチドライブラリーから効率よく探索する方法を提供することを目的とする。さらに、本発明は、効率的で安全性の高い免疫測定方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、目的のタンパク質やペプチドの末端に結合させることができ、かつ、ノルボルネン系重合体に接着性を有するオリゴペプチドを用いることにより、ノルボルネン系重合体が有するタンパク質の安定化効果を減じることなく、ノルボルネン系重合体に、直

50

接、目的のタンパク質やペプチドを効率よく固定化できることを着想し、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。

その結果、ノルボルネン系重合体からなる成形体にペプチドライブラリーを曝露した後に、水系溶媒で洗浄したところ、当該成形体の表面に、ノルボルネン系重合体への接着性が高いペプチドが得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

かくして本発明によれば、下記の(1)～(4)のオリゴペプチドの探索方法、(5)～(7)のオリゴペプチド、(8)の修飾ペプチド又は修飾ポリペプチド、(9)～(12)の免疫測定方法が提供される。

【0010】

(1) ランダムなアミノ酸配列を内在するペプチドライブラリーを、少なくとも表面がノルボルネン系重合体で構成される成形体の前記表面に曝露するステップ(I)と、

暴露された前記表面を水系溶媒で洗浄するステップ(II)と、

前記表面に残留する化合物を、該表面を有機溶媒で洗浄することにより回収するステップ(III)と、

回収した前記化合物のペプチド配列情報を解析するステップ(IV)とを含む、オリゴペプチドの探索方法。

(2) 前記ノルボルネン系重合体が、ノルボルネン系単量体の開環重合体水素化物である(1)に記載のオリゴペプチドの探索方法。

(3) 前記水系溶媒が、緩衝液である(1)又は(2)に記載のオリゴペプチドの探索方法。

(4) 前記有機溶媒が極性有機溶媒である(1)～(3)のいずれかに記載のオリゴペプチドの探索方法。

(5) Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr(配列番号1)のアミノ酸配列を含む、オリゴペプチド。

(6) ノルボルネン系重合体に対して接着性を有する、(5)に記載のオリゴペプチド。

(7) 前記ノルボルネン系重合体が、ノルボルネン系単量体の開環重合体水素化物である、(6)に記載のオリゴペプチド。

(8) Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr(配列番号1)のアミノ酸配列を含み、ノルボルネン系重合体に接着性を有する、修飾ペプチド又は修飾ポリペプチド。

(9) ノルボルネン系重合体で構成される容器の内表面に、請求項1～4のいずれかに記載の探索方法により探索されたオリゴペプチドを固相化し、

内表面にオリゴペプチドを固相化した前記容器を用いて測定を行う、免疫測定方法。

(10) 前記ノルボルネン系重合体が、ノルボルネン系単量体の開環重合体水素化物である、(9)に記載の免疫測定方法。

(11) 前記オリゴペプチドがThr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr(配列番号1)のアミノ酸配列を含む、(9)または(10)に記載の免疫測定方法。

(12) 前記測定の前にブロッキング処理をさらにに行い、

ブロッキング処理剤として、Tween 20を用いる、(9)～(11)のいずれかに記載の免疫測定方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、目的のタンパク質やペプチドの末端に結合させることができるオリゴペプチドを、ペプチドライブラリーから効率よく探索することができる。さらに、本発明によれば、効率的で安全性の高い免疫測定方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、本発明の一実施形態に係る、ノルボルネン系重合体に接着性のあるオリゴペプチドの探索方法手順を示す図である。

【図2】図2は、実施例2において得られたオリゴペプチドの、各種ポリマー成形体への

10

20

30

40

50

接着性評価結果を示すグラフである。

【図 3】図 3 は、実施例 3 における、ポリペプチド 3 が接着した 1060R ディッシュ上の CHO 細胞の顕微鏡写真である。

【図 4】図 4 は、実施例 3 における、ポリペプチド 2 が接着した 1060R ディッシュ上の CHO 細胞の顕微鏡写真である。

【図 5】図 5 は、実施例 3 における、ポリペプチド 2 も 3 も接着していない 1060R ディッシュ上の CHO 細胞の顕微鏡写真である。

【図 6】図 6 は、抗原濃度と吸光度との関係を示すグラフである。

【図 7】図 7 は、抗原濃度と吸光度との関係を示すグラフである。

【図 8】図 8 は、ブロッキング剤が吸光度に与える影響を示すグラフである。

【図 9】図 9 は、BNP 濃度と吸光度との関係を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明の実施形態について、1) オリゴペプチドの探索方法、2) オリゴペプチド、及び、3) ノルボルネン系重合体に接着性を有する修飾ペプチド又は修飾ポリペプチド、4) 免疫測定方法に項分けして、詳細に説明する。

【0014】

1) オリゴペプチドの探索方法

本発明の第 1 の態様は、ランダムなアミノ酸配列を内在するペプチドライブラリーを、少なくとも表面がノルボルネン系重合体で構成される成形体の前記表面に曝露するステップ (I) と、暴露された前記表面を水系溶媒で洗浄するステップ (II) と、前記表面に残留する化合物を、該表面を有機溶媒で洗浄することにより回収するステップ (III) と、回収した前記化合物のペプチド配列情報を解析するステップ (IV) とを含む、オリゴペプチドの探索方法である。

【0015】

<ステップ (I)>

ステップ (I) は、ランダムなアミノ酸配列を内在するペプチドライブラリーを、少なくとも表面がノルボルネン系重合体で構成される成形体の前記表面に曝露するステップである。

上記探索方法に用いるペプチドライブラリーは、ランダムなアミノ酸配列を内在するものであり、一般にペプチドライブラリーとして広く用いられるものが挙げられる。例えば、アミノ酸配列をランダムにして有機合成して得られるペプチドや、タンパク質をランダムに切断して得られるペプチド等のペプチド混合物；ファージ等のウイルス粒子の表面に、末端領域のアミノ酸配列がランダムなタンパク質が呈示されている、ディスプレイライブラリー；等であってもよい。

【0016】

本発明の一態様に係る探索方法では、少なくとも表面がノルボルネン系重合体で構成される成形体を用いる。すなわち、上記成形体は、ペプチドライブラリーが曝露される成形体表面が、少なくともノルボルネン系重合体で構成されていればよい。また、成形体表面がノルボルネン系重合体のみからなることとしてもよく、あるいは、成形体全体がノルボルネン系重合体のみからなることとしてもよい。

ノルボルネン系重合体は、ノルボルネン骨格を有する単量体単位を、ノルボルネン系重合体を構成する全単量体単位に対して 50 質量%以上、好ましくは 60 質量%以上含む重合体である。より具体的には、ノルボルネン系重合体は、ノルボルネン骨格を有する単量体であるノルボルネン系単量体を重合してなるものであり、開環重合によって得られるものと、付加重合によって得られるものに大別される。

【0017】

開環重合によって得られるものとしては、ノルボルネン系単量体の開環重合体、ノルボルネン系単量体とこれと開環共重合可能なその他の単量体との開環重合体、及び、これらの水素化物等が挙げられる。

10

20

30

40

50

付加重合によって得られるものとしては、ノルボルネン系単量体の付加重合体及びノルボルネン系単量体とこれと共重合可能なその他の単量体との付加重合体等が挙げられる。

ノルボルネン系重合体は、それぞれ単独で、あるいは２種以上を組み合わせて用いることができる。

これらの中でも、本願発明の効果がより得られ易いことから、ノルボルネン系単量体の開環重合体水素化物が好ましい。

【００１８】

ノルボルネン系重合体の合成に使用可能なノルボルネン系単量体としては、ビスクロ〔２．２．１〕ヘプター２－エン（慣用名：ノルボルネン）、５－メチル－ビスクロ〔２．２．１〕ヘプター２－エン、５，５－ジメチル－ビスクロ〔２．２．１〕ヘプター２－エン、５－エチル－ビスクロ〔２．２．１〕ヘプター２－エン、５－エチリデン－ビスクロ〔２．２．１〕ヘプター２－エン、５－ビニル－ビスクロ〔２．２．１〕ヘプター２－エン、５－プロペニルビスクロ〔２．２．１〕ヘプター２－エン、５－メトキシカルボニル－ビスクロ〔２．２．１〕ヘプター２－エン、５－シアノビスクロ〔２．２．１〕ヘプター２－エン、５－メチル－５－メトキシカルボニル－ビスクロ〔２．２．１〕ヘプター２－エン等の２環式単量体；

トリシクロ〔４．３．０^１，^６．１^２，^５〕デカー３，７－ジエン（慣用名：ジシクロペンタジエン）、２－メチルジシクロペンタジエン、２，３－ジメチルジシクロペンタジエン、２，３－ジヒドロキシジシクロペンタジエン等の３環式単量体；

テトラシクロ〔４．４．０．１^２，^５．１^７，^{１０}〕－３－ドデセン（テトラシクロドデセン）、テトラシクロ〔４．４．０．１^２，^５．１^７，^{１０}〕－３－ドデセン、８－メチルテトラシクロ〔４．４．０．１^２，^５．１^７，^{１０}〕－３－ドデセン、８－エチルテトラシクロ〔４．４．０．１^２，^５．１^７，^{１０}〕－３－ドデセン、８－エチリデンテトラシクロ〔４．４．０．１^２，^５．１^７，^{１０}〕－３－ドデセン、８，９－ジメチルテトラシクロ〔４．４．０．１^２，^５．１^７，^{１０}〕－３－ドデセン、８－エチル－９－メチルテトラシクロ〔４．４．０．１^２，^５．１^７，^{１０}〕－３－ドデセン、８－エチリデン－９－メチルテトラシクロ〔４．４．０．１^２，^５．１^７，^{１０}〕－３－ドデセン、８－メチル－８－カルボキシメチルテトラシクロ〔４．４．０．１^２，^５．１^７，^{１０}〕－３－ドデセン、７，８－ベンゾトリシクロ〔４．３．０．１^２，^５〕デカー３－エン（慣用名：メタノテトラヒドロフルオレン：１，４－メタノ－１，４，４a，9a－テトラヒドロフルオレンともいう）、１，４－メタノ－８－メチル－１，４，４a，9a－テトラヒドロフルオレン、１，４－メタノ－８－クロロ－１，４，４a，9a－テトラヒドロフルオレン、１，４－メタノ－８－プロモ－１，４，４a，9a－テトラヒドロフルオレン等の４環式単量体；等が挙げられる。

これらのノルボルネン系単量体は、置換基を１種又は２種以上有していてもよい。置換基としては、アルキル基、アルキレン基、アリール基、シリル基、アルコキシカルボニル基、アルキリデン基等が挙げられる。

【００１９】

ノルボルネン系単量体と開環共重合可能なその他の単量体としては、シクロヘキセン、シクロヘプテン、シクロオクテン、１，４－シクロヘキサジエン、１，５－シクロオクタジエン、１，５－シクロデカジエン、１，５，９－シクロドデカトリエン、１，５，９，１３－シクロヘキサデカテトラエン等の単環のシクロオレフィン系単量体が挙げられる。

【００２０】

ノルボルネン系単量体と付加共重合可能なその他の単量体としては、エチレン、プロピレン、１－ブテン、１－ペンテン、１－ヘキセン等の炭素数２～２０のα－オレフィン系単量体；シクロブテン、シクロペンテン、シクロヘキセン、シクロオクテン、テトラシクロ〔９．２．１．０^２，^{１０}．０^３，^８〕テトラデカー３，５，７，１２－テトラエン（３a，５，６，7a－テトラヒドロ－４，7－メタノ－１H－インデンとも言う）等のシクロオレフィン系単量体；１，４－ヘキサジエン、４－メチル－１，４－ヘキサジエン、５－メチル－１，４－ヘキサジエン、１，７－オクタジエン等の非共役ジエン系単量体；

等が挙げられる。

これらの中でも、ノルボルネン系単量体と付加共重合可能なその他の単量体としては、 α -オレフィン系単量体が好ましく、エチレンがより好ましい。

これらのその他の単量体は、置換基を1種又は2種以上有していてもよい。置換基としては、アルキル基、アルキレン基、アリール基、シリル基、アルコキシカルボニル基、アルキリデン基等が挙げられる。

【0021】

ノルボルネン系単量体の開環重合体、又はノルボルネン系単量体とこれと開環共重合可能なその他の単量体との開環重合体は、単量体成分を、公知の開環重合触媒の存在下で重合して得ることができる。

開環重合触媒としては、例えば、ルテニウム、オスミウム等の金属のハロゲン化物と、硝酸塩又はアセチルアセトン化合物、及び還元剤とからなる触媒、あるいは、チタン、ジルコニウム、タングステン、モリブデン等の金属のハロゲン化物又はアセチルアセトン化合物と、有機アルミニウム化合物とからなる触媒を用いることができる。

ノルボルネン系単量体の開環重合体水素化物は、通常、上記開環重合体の重合溶液に、ニッケル、パラジウム等の遷移金属を含む公知の水素化触媒を添加し、炭素-炭素不飽和結合を水素化することにより得ることができる。

【0022】

ノルボルネン系単量体の付加重合体、又はノルボルネン系単量体とこれと共重合可能なその他の単量体との付加重合体は、単量体成分を、公知の付加重合触媒の存在下で重合して得ることができる。

付加重合触媒としては、例えば、チタン、ジルコニウム又はバナジウム化合物と有機アルミニウム化合物とからなる触媒を用いることができる。

【0023】

ノルボルネン系重合体の分子量に格別な制限はないが、シクロヘキサン溶液（重合体が溶解しない場合はトルエン溶液）のゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー（GPC）で測定したポリスチレン換算の重量平均分子量で、通常5,000以上であり、好ましくは5,000～500,000、より好ましくは8,000～200,000、特に好ましくは10,000～100,000である。重量平均分子量がこの範囲内であるときに、機械的強度と成形加工性が高度にバランスし、好適である。

【0024】

ノルボルネン系重合体のガラス転移温度は、使用目的に応じて適宜選択されればよいが、通常50～300℃、好ましくは100～280℃、特に好ましくは115～250℃、さらに好ましくは130～200℃である。ガラス転移温度がこの範囲内であるときに、耐熱性と成形加工性が高度にバランスし、好適である。

上記ノルボルネン系重合体のガラス転移温度は、JIS K 7121に基づいて測定されたものである。

【0025】

ノルボルネン系重合体は、それぞれ単独で、あるいは2種以上を組み合わせて用いることができる。

また、成形体表面を構成する樹脂成分として、ノルボルネン系重合体に加えて、任意で、熱可塑性樹脂材料で通常用いられている配合剤、例えば、軟質重合体、酸化防止剤、紫外線吸収剤、光安定剤、近赤外線吸収剤、離型剤、染料や顔料等の着色剤、可塑剤、帯電防止剤、蛍光増白剤等の配合剤を、通常採用される量、添加することができる。ここで、ノルボルネン系重合体に対して軟質重合体を混合して用いる場合には、ノルボルネン系重合体である脂環構造含有重合体100質量部に対して、通常0.01～20質量部、好ましくは0.05～10質量部、より好ましくは0.05～5質量部である。

【0026】

また、成形体表面を構成する樹脂成分として、ノルボルネン系重合体、及び上述した配合剤の一つである軟質重合体以外に、その他の重合体（以下、単に「その他の重合体」と

10

20

30

40

50

いう)を混合しても良い。ノルボルネン系重合体に混合されるその他の重合体の量は、ノルボルネン系重合体100質量部に対して、通常200質量部以下、好ましくは150質量部以下、より好ましくは100質量部以下である。

ノルボルネン系重合体に対して配合する各種配合剤やその他の重合体の割合が多すぎると細胞が浮遊し難くなるため、いずれも脂環構造含有重合体の性質を損なわない範囲で配合することが好ましい。

【0027】

ノルボルネン系重合体と、配合剤やその他の重合体との混合方法は、ポリマー中に配合剤が十分に分散する方法であれば、特に限定されない。また、配合の順番に格別な制限はない。配合方法としては、例えば、ミキサー、一軸混練機、二軸混練機、ロール、グラベ 10
ンダー、押出機等を用いて樹脂を溶融状態で混練する方法；適当な溶剤に溶解して分散させた後、凝固法、キャスト法、又は直接乾燥法により溶剤を除去する方法；等が挙げられる。

二軸混練機を用いる場合、混練後は、通常は溶融状態で棒状に押出し、ストランドカッターで適当な長さに切り、ペレット化して用いられることが多い。

【0028】

このようなノルボルネン系重合体を用いて、通常、任意の成形方法、例えば、射出成形法、押出成形法、ブロー成形法、真空成形法、プレス成形法、圧縮成形法、回転成形法、キャスト成形法等により、任意の形状を有する成形体に成形することができる。

ノルボルネン系重合体で構成される成形体（ノルボルネン系重合体成形体）としては、 20
例えば、ノルボルネン系重合体成形体を細胞培養に用いる場合においては、ノルボルネン系重合体製培養容器が挙げられる。

例えば、ディッシュ状の培養容器であれば、射出成形法等により成形することができる。

なお、上記培養容器は、ペプチドライブラリーが曝露される部分の表面が、少なくともノルボルネン系重合体で構成されていればよい。

また、当該ペプチドライブラリーが曝露される表面は、ノルボルネン系重合体のみからなることとしてもよく、あるいは、培養容器全体がノルボルネン系重合体のみからなることとしてもよい。

【0029】

成形して得られた成形体は、プラズマ照射等による親水化処理を施すことなく、本発明の一態様に係るペプチドの探索方法に用いることが好ましい。親水化処理を施すことで表面が酸化され、これにより、酸化した表面にペプチドが非特異的に接着するため、当該表面に残留するペプチドの種類が多くなり、特定のペプチドを探索することが困難となるお 30
それがあるからである。

【0030】

上記ノルボルネン系重合体成形体は、通常、滅菌処理して用いられる。

滅菌処理の方法に格別な制限はなく、高圧蒸気法や乾熱法等の加熱法； γ 線や電子線等の放射線を照射する放射線法や高周波を照射する照射法；酸化エチレンガス（EOG）等のガスを接触させるガス法；滅菌フィルタを用いる濾過法；など、医療分野で一般的に採用される方法から、成形体の形状や用いる細胞に応じて、適宜選択することができる。 40

【0031】

成形されたノルボルネン系重合体成形体の表面（ノルボルネン系重合体製培養容器の内面）に、本発明の一態様であるオリゴペプチドやノルボルネン系重合体接着性修飾（ポリ）ペプチドを接触させることで、成形体表面（培養容器内面）に当該オリゴペプチドやノルボルネン系重合体接着性修飾（ポリ）ペプチドを付着させることができる。

【0032】

ランダムなアミノ酸配列を内在するペプチドライブラリーを、少なくとも表面がノルボルネン系重合体で構成される成形体の前記表面に曝露するステップでは、例えば、リン酸緩衝液や細胞培養液などペプチドライブラリーの変性をもたらさない、ほぼ中性の液状媒 50

体で、ペプチドライブラリーを溶解又は懸濁させたペプチドライブラリー液を、上記表面に接触させる方法が採用される。接触時間は、通常1分～10時間、好ましくは5分から2時間である。接触時間が短過ぎると、接着性のあるペプチドが成形体に十分に接着できないおそれがあり、逆に接触時間を長過ぎるとペプチドの変性などにより本来成形体に接着性を有しないものが接着するおそれがあり、いずれも好ましくない。接触時の温度は、通常15～35℃、好ましくは20～30℃である。温度が高すぎると、ペプチドライブラリー液の蒸発が進行し、温度が低すぎるとペプチドライブラリーの本来の接着性が得られない可能性があり、いずれも好ましくない。

【0033】

<ステップ(II)>

ステップ(II)は、ステップ(I)の曝露の後に、暴露された当該表面を、水系溶媒で洗浄するステップである。

【0034】

用いる水系溶媒は、ノルボルネン系重合体への特異的な接着性を持つものを選択しやすいことから、緩衝液、酸性水溶液、及び塩基性水溶液の3種の組み合わせが好ましい。水系溶媒での洗浄の順番は任意に設定することができる。これらの中でも、本発明の効果がより得られ易いことから、緩衝液が好ましい。

【0035】

緩衝液は少量の酸や塩基を加えたり、多少濃度が変化したりしてもpHが大きく変化しないようにした溶液である。

緩衝液としては、通常pH5～9、好ましくはpH6.8～8.3のものを用いる。具体的には、リン酸を緩衝成分とするリン酸緩衝液、リン酸緩衝液に塩化ナトリウムを加えたリン酸緩衝食塩水、酢酸を緩衝成分とする酢酸緩衝液、クエン酸を緩衝成分とするクエン酸緩衝液、ホウ酸を緩衝成分とするホウ酸緩衝液、トリスヒドロキシメチルアミノメタンを緩衝成分とするトリス緩衝液、及び、トリス緩衝液にEDTA等の金属キレート剤又はホウ酸又は酢酸を加えた緩衝液等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

これらは単独で、又は複数種類を組み合わせ用いることができる。

【0036】

酸性水溶液としては、通常pH1～4、好ましくはpH2.5～3のものを用いる。酸性水溶液の調製に用いる酸としては、塩酸、硫酸、リン酸、トリフルオロ酢酸、酸でpH調製したグリシン水溶液、酸でpH調製したクエン酸水溶液等が挙げられる。

これらの中でも、酸性水溶液のpHに暴露したペプチドライブラリーを回収後に、速やかにpHを中性条件とするための操作上の観点から、数mM程度の濃度の希薄な酸溶液や、1M程度のトリスヒドロキシメチルアミノメタン水溶液を混ぜ合わせることで中性pHに容易に調製できるpH2.5程度に調製されたグリシン溶液等が好ましい。

これらは単独で、又は複数種類を組み合わせ用いることができる。

【0037】

塩基性水溶液としては、通常pH8～11.5、好ましくはpH10～11.5のものを用いる。塩基性水溶液の調製に用いる塩基としては、トリエチルアミン又はトリエタノールアミンのような水溶性アミン、アンモニア、水酸化アンモニウムのようなアンモニウム塩、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化ナトリウムでpH調製されたグリシン水溶液等が挙げられる。

これらの中でも、塩基性水溶液のpHに暴露したペプチドライブラリーを回収後に、速やかにpHを中性条件とするための操作上の観点から、上述の塩基性水溶液で、200mM以下の希薄濃度としたアンモニア塩水溶液又はグリシン水溶液等が好ましい。これらは単独で、又は複数種類を組み合わせ用いることができる。

【0038】

水系溶媒での洗浄回数や洗浄に用いる水系溶媒の量は、洗浄したい部分の形状や洗浄したい面積に応じて任意に選択することができる。通常の培養ディッシュのような平面であ

10

20

30

40

50

れば、緩衝液酸性水溶液、及び塩基性水溶液の洗浄回数は、いずれも通常1～5回、好ましくは2～4回である。1回の洗浄に用いる水系溶媒の量は、洗浄対象面積当たり、通常 $10 \sim 0.01 \text{ ml/cm}^2$ 、好ましくは $2 \sim 0.1 \text{ ml/cm}^2$ である。水系溶媒の量が少なすぎると洗浄が不十分となり、一方、多く用いても、洗浄効果に限界があるため無駄になる。

【0039】

<ステップ（III）>

ステップ（III）は、ステップ（II）の洗浄後に、成形体表面に残留する化合物を、当該成形体表面を有機溶媒で洗浄することにより回収するステップである。

ステップ（II）における水系溶媒での洗浄後に、ノルボルネン系重合体成形体の表面に残留する化合物を回収するために有機溶媒で洗浄する。

水系溶媒による洗浄にも耐えて、ノルボルネン系重合体成形体の表面に残留するペプチドは、ノルボルネン系重合体への接着性が高いものであると考えられる。

【0040】

洗浄に用いる有機溶媒は、水系媒体で希釈せずに用いることもできるが、水系媒体で希釈した希釈液として用いることが、ディスプレイライブラリー等のウイルス増殖特性を利用したスクリーニング系である場合には、その増殖特性に与える影響を少なくすることができるため好ましい。従って、本発明に用いる有機溶媒は、水と混和性を有する極性有機溶媒であること好ましい。

【0041】

極性有機溶媒としては、ジメチルスルホキシド等の含硫黄系有機溶媒；ジメチルホルムアミド等のアミド系有機溶媒；メタノール、イソプロパノール等のアルコール系有機溶媒；アセトニトリル等のニトリル系有機溶媒；等が挙げられる。

水系媒体で希釈して用いる場合の極性溶媒の濃度は、希釈液全体に対し、通常5重量%～90重量%、好ましくは5重量%～50重量%である。

【0042】

有機溶媒での洗浄回数や洗浄に用いる有機溶媒の量は、洗浄したい部分の形状や洗浄したい面積に応じて任意に選択することができる。成形体表面が通常の培養ディッシュのような平面であれば、洗浄回数は通常1～5回、好ましくは1～2回である。

1回の洗浄に用いる有機溶媒（水系媒体で希釈した場合は、その希釈液）の量は、通常 $0.01 \sim 10 \text{ ml/cm}^2$ 、好ましくは $0.1 \sim 2 \text{ ml/cm}^2$ である。

洗浄に用いる有機溶媒の量が少なすぎると洗浄が不十分となり、一方多く用いても洗浄効果に限界があるため無駄になる。

【0043】

<ステップ（IV）>

ステップ（IV）は、ステップ（III）で回収した前記化合物のペプチド配列情報を解析するステップである。

すなわち、有機溶媒で洗浄して回収された洗浄処理後の液中のペプチド配列情報を解析して、ノルボルネン系重合体に接着性のあるポリオリゴペプチドのアミノ酸配列を確認する。

【0044】

ペプチドライブラリーとして、ペプチド混合物、及び一部（通常は末端領域）のアミノ酸配列がランダムなタンパク質が呈示されているポリマー粒子を含むディスプレイライブラリーを用いた場合は、既存のアミノ酸配列解析法（マス分析等）により直接アミノ酸配列を確認することができる。

また、ジディスプレイライブラリーを用いた場合は、ファージの遺伝子を解析し、対応するアミノ酸配列を求めることができる。

【0045】

2) オリゴペプチド

本発明の第2の態様は、特定のアミノ酸配列からなるオリゴペプチドである。オリゴペ

10

20

30

40

50

プチドとは、2～10個程度という比較的少数のアミノ酸からなるペプチドである。オリゴペプチドは、例えば、タンパク質（ポリペプチド）を、酵素的、化学的に分解して得られるポリペプチド鎖が挙げられる。

本発明の一態様に係るオリゴペプチドは、Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thrで表されるアミノ酸配列（以下、「特定のアミノ酸配列」ということがある）を含む。こうしたアミノ酸配列を含むオリゴペプチドは、ノルボルネン系重合体に接着性のあるオリゴペプチドである。なお、オリゴペプチドは、Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr（配列番号1）で表されるアミノ酸配列のみからなることとしてもよい。

本発明の第2の態様に係るオリゴペプチドは、上述した本発明の第1の態様に係るノルボルネン系重合体に接着性のあるペプチドの探索方法により探索することができるオリゴペプチドの一種である。

【0046】

3) ノルボルネン系重合体に接着性を有する修飾ペプチド又は修飾ポリペプチド

本発明の第3の態様に係るノルボルネン系重合体に接着性のある修飾ペプチド又は修飾ポリペプチド（以下、「ノルボルネン系重合体接着性修飾（ポリ）ペプチド」という）は、その末端に又はその内部に、前記特定のアミノ酸配列を含有するものである。ノルボルネン系重合体接着性修飾（ポリ）ペプチドは、直鎖状であっても分岐状であっても良い。

【0047】

本発明の第3の態様に係るノルボルネン系重合体接着性修飾（ポリ）ペプチドは、本発明の第2の態様に係るオリゴペプチドに、任意の（ポリ）ペプチドを付加、挿入、又は一部のアミノ酸と置換させて得ることができる。

任意の（ポリ）ペプチドとしては、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン、ビトロネクチン等の細胞外マトリックス；インターロイキン、血小板由来成長因子、肝細胞成長因子、神経成長因子、腫瘍壊死因子、上皮成長因子、線維芽細胞成長因子、トランスフォーミング成長因子、アディポネクチン等のサイトカイン類；インテグリンやPD-1等の細胞膜受容体、CD2やCD60等の細胞表面抗原等の生理活性を有する（ポリ）ペプチドや、ハプテン抗原・タンパク質抗原を認識できる抗体；ヒスチジントグ、チオレドキシンタグ、グルタチオン S-トランスフェラーゼタグ、マルトース結合タンパク質タグや、GFPやルシフェラーゼ等の蛍光標識タンパク質等の遺伝子工学的において有用な機能を有する（ポリ）ペプチド；機能不明なアミノ酸配列からなる（ポリ）ペプチド；が挙げられる。

また、本発明の第2の態様に係るオリゴペプチドと、任意の（ポリ）ペプチドとの連結やペプチド長調節等のために、リンカー配列を挿入することもできる。

【0048】

本発明の第3の態様に係るノルボルネン系重合体接着性修飾（ポリ）ペプチドは、前記特定のアミノ酸配列を、1つ又は複数個含有するものである。

本発明の第3の態様に係るノルボルネン系重合体接着性修飾（ポリ）ペプチドの、「本発明の第3の態様に係るノルボルネン系重合体接着性修飾（ポリ）ペプチドを構成する総アミノ酸数／本発明の第3の態様に係るノルボルネン系重合体接着性修飾（ポリ）ペプチドに含まれる本発明の第2の態様に係るオリゴペプチド数」（ α ）は、好ましくは7以上80以下、より好ましくは10以上50以下である。

前記 α が80を超える場合、本発明の第2の態様に係るオリゴペプチドは、本発明の第3の態様に係るノルボルネン系重合体接着性修飾（ポリ）ペプチドの末端から好ましくは20、より好ましくは10個のアミノ酸以内に少なくとも1の前記特定のアミノ酸配列が存在することが、ノルボルネン系重合体との接着性の観点から好ましい。

【0049】

4) 免疫測定方法

本発明の第4の態様に係る免疫測定方法は、ノルボルネン系重合体で構成される容器の内表面に、本発明の第2の態様に係るオリゴペプチドを固相化した容器を用いて行う。

使用する容器としては、例えば、96ウェルプレートや384ウェルプレートやキュベットが挙げられる。これらの容器は、射出成形法等により成形することができるほか、ノルボルネン系重合体のフィルムを底面にインサート形成したウェルプレートでもよく、板状のノルボルネン系重合体を切削加工などにより作製した流路チップでもよい。

【0050】

なお、上記容器は、上記オリゴペプチドが固相化される部分の表面が、少なくとも先に詳述したノルボルネン系重合体で構成されていればよい。

また、上記オリゴペプチドを固相化する表面は、先に詳述したノルボルネン系重合体のみからなることとしてもよく、あるいは、容器全体が先に詳述したノルボルネン系重合体のみからなることとしてもよい。

10

【0051】

ノルボルネン系重合体で構成される容器の内表面に上記オリゴペプチドを固定する方法は、固相化するオリゴペプチドを含む水溶液を容器内表面へ一定時間暴露すればよい。水溶液には、リン酸緩衝生理食塩水のように緩衝液成分が含まれていてもよく、ジメチルスルホキシドなどの水に溶解する有機溶媒が含まれていても良い。

【0052】

容器表面への暴露操作としては、容器内に固相化するオリゴペプチドを含む水溶液を添加する方法でもよく、インクジェットやジェットディスペンサーのようなディスペンサー、噴霧などの方法でもよく、スタンプ操作による方法でもよい。

【0053】

固相化操作の温度は、室温でよく、加温する場合には、上記オリゴペプチドが熱変性を受けない温度範囲で、水が蒸散して溶液濃度が変化しないようにできればよい。また、保冷状態でもよく、固相化する抗原を含む水溶液が凍結しない温度であればよい。

20

【0054】

こうして、上記オリゴペプチドを接触させた後、当該溶液を除去し、リン酸緩衝生理食塩水等で洗浄する。

固相化操作後には、特段の乾燥操作を行う必要はないが、固相化操作で容器内に残留した微小な液滴を除去するために、送風や減圧などの処理を行うこととしてもよい。

【0055】

固相化したオリゴペプチドが抗原又はその一部の抗体認識部位（以下、まとめて「抗原等」という）である場合、免疫測定方法では、抗原等と結合する標識抗体を結合させることができる。

30

抗体の標識物質は、公知の免疫測定で使用されている標識物質と同様のものを用いることができ、特に限定されない。具体例としては、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、Hisタグなどのタグ、金などのナノ粒子、ハプテン抗原、染色物質、同位体、ユーロピウム、放射性物質などが挙げられる。酵素としては、アルカリホスファターゼ（ALP）、ペルキシダーゼ、βガラクトシダーゼ等、公知のものを用いることができるが、これに限定されるものではない。

【0056】

また、免疫測定方法においては、上記オリゴペプチドを固相化した後、容器内表面に非特異的な（ポリ）ペプチド等の吸着を防止する目的で、ブロッキング処理を行うことができる。

40

ブロッキング処理は、Tween 20などの界面活性剤を用いることが好ましい。あるいは、アルブミンやミルクカゼインなどのタンパク質を用いてもよい。

【0057】

このようにして得られた、ノルボルネン系重合体で構成される容器内表面にオリゴペプチドが固相化された容器を用いて、免疫測定を行う。当該免疫測定は、ノルボルネン系重合体で構成される容器内表面に固相化されたオリゴペプチドと溶液内の抗体との抗原抗体反応を利用するものであるが、当該容器との組み合わせによる免疫測定において、測定方法に格別な制限はなく、一般的に知られているELISA法の直接法、間接法、サンドイ

50

ッチ法、競合法などに基づく測定原理を適用することができる。

【0058】

上記ノルボルネン系重合体で構成される容器内表面に固相化されたオリゴペプチドと溶液内の抗体との抗原抗体反応を利用する代表的な測定方法として、(i) あらかじめ抗体を、容器内に固相化されたオリゴペプチドに結合させた後、被験物を含む試料を添加する方法と、(ii) オリゴペプチドを固相化した後、被験物を含む試料を抗体と同時に添加する方法とが挙げられる。

【0059】

(i) の方法においては、酵素や蛍光色素やビオチンなど標識を修飾した抗体であって、オリゴペプチドに特異的に認識する抗体を、オリゴペプチドをノルボルネン系重合体で構成される容器内表面に固相化した容器に添加して、固相化抗原に反応させて、未反応の余剰の抗体を洗浄除去する。次いで、測定対象の試料を容器内に添加して、試料中の抗原と容器内の抗体を反応させて、容器内にある標識抗体を回収する。その後、回収した標識抗体に起因する標識信号を測定することにより、試料中の抗原濃度を計測する。

10

【0060】

(ii) の方法においては、オリゴペプチドをノルボルネン系重合体で構成される容器内表面に固相化した容器に、酵素や蛍光色素やビオチンなど標識を修飾した抗体であって、抗原を特異的に認識する抗体と、被験物を含む試料を混合し、又は混合せず独立して同時に、添加して、抗体を固相化抗原に反応させて、固相化抗原に反応しなかった標識抗体を回収する。その後、回収した標識抗体に起因する標識信号を測定することにより、試料中の抗原濃度を計測する。

20

【0061】

上記の(i)の方法と(ii)の方法においては、測定対象の試料を上記の容器に入れて測定を行うが、一般的なELISA法の直接法、間接法、サンドイッチ法、競合法などのように、測定試料を添加した後の容器内の洗浄操作を必要としない。

(i)の方法では、測定試料中の測定対象抗原を、測定容器内に予め固相化オリゴペプチドに吸着した標識抗体と反応させ、その後、標識抗体を試料溶液中に溶出させて、その溶出抗体を取り出し、標識による信号を得ることで、測定試料中の測定抗原の濃度を測定できる。そのため、測定試料を添加した後の容器内の洗浄操作は不要となる。

(ii)の方法では、測定試料中の測定対象抗原と標識抗体とを同時に測定容器内に添加する。測定試料中の測定対象抗原と反応しなかった標識抗体が、容器内の固相化オリゴペプチドと反応するが、測定試料を取り出し、試料中に含まれる標識抗体の標識による信号を検出することで、測定試料中の測定対象抗原と反応した標識抗体を反映した信号を測定できる。そのため、測定試料を添加した後の容器内の洗浄操作は不要となる。

30

このように、測定試料を容器内に添加して、免疫反応させた後、その試料液を取り出す操作のみが必要となる。

【0062】

測定対象の試料が、ヒト等の生体由来の試料、あるいは、培養細胞由来の試料である場合には、試料への感染性微生物の混入に起因する感染症のリスクがあり、試料の取扱時における感染防止のための注意が必要となる。

40

ELISA法では、試料を通常の測定容器に入れて抗原抗体反応を行った場合、容器を洗浄することが一般的な操作となっている。その洗浄操作では、洗浄水が多く発生し、また、洗浄溶液を容器から除去する操作においても、洗浄溶液のミスト・飛沫が発生して、操作者への暴露や、自動装置内への暴露などが起きる可能性が懸念される。このため、試料に感染性微生物が混入している可能性が否定できない場合には、感染症のリスクが高まる。

【0063】

これに対し、上記(i)および(ii)の方法では、測定対象試料を測定の容器に添加した後は、洗浄操作を行わずに測定できるので、感染性微生物の混入が否定できない測定対象試料を測定する場合に、感染性リスクを顕著に低減できる。そのため、安全に効率よ

50

く免疫測定を行うことができる。

なお、上記（i）および（ii）の操作は、ヒトの手作業での操作で実施することでもできるが、マルチチャンネルの自動分注装置、ロボットや、アーム型のロボット装置などで操作することとしてもよい。

また、洗浄操作を必要とする測定方法では、洗浄操作を複数回繰り返して行うため、時間を要するが、上記（i）および（ii）の方法であれば、洗浄操作を行う必要がないため、より短時間で効率的に計測が可能となる。

【実施例】

【0064】

以下、本発明を、実施例によりさらに詳細に説明する。但し、本発明は以下の実施例により何ら限定されるものではない。

【0065】

〔実施例1〕

＜第一次ファージ溶液の取得＞

ファージディスプレイペプチドライブラリーとして、Ph. D. -C7C Phage Display Peptide Library Kit（New England Biolabs社製）を用いた。

ファージ溶液をリン酸緩衝液（PBS；137mmol／リットルNaCl、8.1mmol／リットルNa₂HPO₄、2.68mmol／リットルKCl、1.47mmol／リットルKH₂PO₄の混合液、pH7.4）に溶解して、ペプチドライブラリー溶液を調製した。

ノルボルネン系開環重合体水素化物〔ゼオノア（登録商標）1060R、日本ゼオン社製〕からなる直径10cmの培養ディッシュ底面に、調製したペプチドライブラリー溶液を滴下して、室温（25℃）で30分間静置した。

その後、前記培養ディッシュ底面をPBSで3回洗浄した。

続いて、pH2に調製した40mM Glycine・HCl Buffer（pH2.2）で1回洗浄し、さらに、pH10に調製した40mM Glycine・NaOH（pH10）を滴下した。

滴下した液を回収し、直ちに希薄塩酸でpHを中和（pH=7.0）して、「アルカリで洗浄して回収したファージ溶液」とした。

続いて、前記培養ディッシュ底面に10％DMSOを含むPBSを滴下して、滴下した溶液を回収して、「DMSOで洗浄して回収したファージ溶液」とした。

これまでの工程図を図1に示す。

【0066】

＜第二次ファージ溶液の取得＞

回収したファージの増殖を促すため、以下の方法でファージ感染大腸菌を調製した。

アルカリで洗浄して回収したファージ溶液及び、DMSOで洗浄して回収したファージ溶液を、それぞれ、ファージのホストとなる大腸菌培養液に滴下して、37℃で16時間、振とう培養し、ファージ感染大腸菌培養液を得た。

調製したペプチドライブラリー溶液の代わりに、ファージ感染大腸菌培養液を、ノルボルネン系開環重合体水素化物〔ゼオノア1060R、日本ゼオン社製〕からなる直径10cmの培養ディッシュ底面に滴下すること以外は、上述（第一次ファージ溶液の取得）と同様にして、アルカリで洗浄して回収したファージ溶液と、DMSOで洗浄して回収したファージ溶液を得た。

【0067】

＜第三次ファージ溶液の取得＞

こうして得られた上記2つのファージ溶液を用いて、再度ファージの増殖を促すために、大腸菌に感染させ、第二次ファージ溶液の取得と同様にして、アルカリで洗浄して回収したファージ溶液とDMSOで洗浄して回収したファージ溶液を得た。

【0068】

<ファージの遺伝子解析>

第三次ファージ溶液の取得により得られた2つのファージ溶液に含まれるファージの遺伝子配列を読み取り、対応するアミノ酸配列を得た。

アルカリで洗浄して回収したファージ溶液から得られた、即ち、高いpHで溶出する特性を有するアミノ酸配列は、TVDNSLA (Thr-Val-Asp-Asn-Ser-Leu-Ala) (配列番号2)であった。

DMSOで洗浄して回収したファージ溶液から得られた、即ち、アルカリ洗浄しても接着し続け、有機溶媒で溶出するアミノ酸配列は、TVDSCLT (Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr) (配列番号1)であった。

【0069】

10

[実施例2]

<ポリペプチドの合成>

実施例1で得られたアミノ酸配列を基に、末端にポリペプチド検出のために、ヒスチジンを6残基ならべたヒスチジントグ配列を持つポリペプチドで、実施例1で得られたアミノ酸配列とヒスチジントグ配列との間に、グリシンを連結したポリペプチドを有機合成した。

高いpHで溶出する特性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチド1として、AYTVDNSLACGGGGHHHHHH (Ala-Tyr-Thr-Val-Asp-Asn-Ser-Leu-Ala-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-His-His-His-His-His-His) (配列番号3)を合成した。

20

また、DMSOで溶出する特性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチド2として、ACTVDSCLTCTCGGGGGHHHHHH (Ala-Cys-Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-His-His-His-His-His-His) (配列番号4)を合成した。

【0070】

<ポリペプチド溶液の調製>

ポリペプチド1、ポリペプチド2、及び、ヒト正常IgG抗体(和光純薬工業社製)を、それぞれPBS溶液、及び、10%DMSOを含むPBS(10%DMSO PBS)に、それぞれ10µg/mlの濃度で溶解し各種の溶液を調製した。

【0071】

30

<容器への接着性評価>

上記で調製された各ポリペプチド溶液を、ノルボルネン系開環重合体水素化物〔ゼオノア(登録商標)1060R、日本ゼオン社製〕を射出成型して得られた96ウェルプレート(以下、「1060Rプレート」という)、及びポリスチレン製の96ウェルプレート(製品名「ファルコン(登録商標)」、コーニング社製;以下、「TCPSプレート」という)に、それぞれ1ウェルあたり50µLを添加(N=3)して、室温(25℃)で1時間、静置した。

静置後に、1060RプレートとTCPSプレートのウェル内を、T-TBS(0.05mTris塩酸、0.15m塩化ナトリウム、0.05%Tween20;pH7.6)を用いて、3回洗浄した後に、ナカライテスク社製のブロッキングワン試薬の5倍希釈溶液をブロッキング溶液として、1ウェルあたり200µLずつ分注して、室温1時間、静置することにより、ブロッキング操作を行った。

40

静置後の各プレートを、T-TBSで5回洗浄し、洗浄後に、ポリペプチドの検出用に、(マウス抗6Hisモノクローナル抗体、ナカライテスク社製)のPBS溶液を1ウェルあたり50µL添加して、室温1時間、静置した。

さらに、静置後の各プレートを、T-TBS(同上)で5回洗浄し、洗浄後に、ペルオキシダーゼ発色試薬を1ウェルあたり50µL添加して、室温10分間反応発色させて、100mMの塩酸水溶液を100µL添加して、ペルオキシダーゼ反応を停止した。

各プレートのウェルについて、ウェルプレートリーダー装置(コロナ社製)を用いて、450nmの吸光度を測定した。

50

測定結果を図2に示す。図2では、ポリペプチド別に、ポリペプチドを溶解した溶媒とプレートの組み合わせ別の結果を表示している。

【0072】

ポリペプチド2は、TCPSプレートに比較して、1060Rプレートで、より高い450nmの吸光度を示す結果であり、ポリペプチド2に含まれるアミノ酸配列を有するオリゴペプチドに、ノルボルネン系重合体に対する高い接着性があることが示された。

【0073】

〔実施例3〕

実施例2において、ノルボルネン系重合体に対する接着性の高いアミノ酸配列を含むポリペプチド2に、細胞表面のファイブロネクチン等の受容体であるインテグリンの認識アミノ酸配列RGD(Ar g-G l y-A s p)を持たせるため、実施例2のヒスチジンタグの前に、RGDモチーフRGDSP(Ar g-G l y-A s p-S e r-P r o)を挿入した、ノルボルネン系重合体接着性修飾(ポリ)ペプチド「ACTVDSCLTCCGGGGRRGDS PHHHHHH(A l a-C y s-T h r-V a l-A s p-S e r-C y s-L e u-T h r-C y s-G l y-G l y-G l y-G l y-G l y-A r g-G l y-A s p-S e r-P r o-H i s-H i s-H i s-H i s-H i s-H i s)」(ポリペプチド3)(配列番号5)を合成した。

このポリペプチド3と実施例2で得たポリペプチド2を、それぞれPBSに10μg/mlの濃度で溶解した溶液をろ過滅菌して、EOG滅菌済みの1060Rプレートに、1ウェルあたり、50μL添加して、室温(25℃)で1時間、静置した。

静置後、ポリペプチド3と、実施例2で得たポリペプチド2をインキュベーションした1060Rプレートを、それぞれ滅菌済みのPBSで3回洗浄して、ポリペプチド3コート1060Rプレートと、ポリペプチド2コート1060Rプレートを得た。

こうして得られた2つのプレート及びポリペプチドでコーティングしていない1060Rプレートに、無血清培地(無血清培地ESF SFM Serum・Free Medium for Hybridoma, CHO&293Cells, Expression Systems社製)に懸濁したCHO(Chinese Hamster Ovary)細胞をウェルに添加して、37℃のCO₂インキュベータの中で、培養維持した。

【0074】

培養開始後、5時間で細胞を顕微鏡で観察すると、ポリペプチド3コート1060Rプレートのウェル内のCHO細胞は、RGD配列の効果があり、細胞が伸展した形状を示した。

ポリペプチド3が接着した1060Rプレート上のCHO細胞の顕微鏡写真を図3に示す。

しかしながら、RGD配列を持たないポリペプチド2コート1060Rプレートのウェル内では、1060Rプレート表面に、RGD配列を配置していないので、図4に示すように、細胞は丸い形状となった。

また、ポリペプチドをコーティングしていない1060Rプレートにおいても、CHO細胞は丸い形状であり、図5に示すように、細胞が伸展形状を示すことはなかった。

【0075】

これらの結果から、本発明の一態様に係るオリゴペプチドは、細胞の接着を制御するRGD配列等の他のペプチドと組み合わせることで、ノルボルネン系重合体表面に当該オリゴペプチドを含むポリペプチドのコーティングを可能にし、COP表面上での細胞の接着性等の状態を制御することができることが示された。

【0076】

以下の実施例では、例示的に、測定対象の物質としてBNP(脳性ナトリウム利尿ペプチド)を使用するが、測定対象の物質はこれに限定されない。

〔実施例4〕

抗原のマルチウェルプレートへの吸着条件を検討した。ノルボルネン系開環重合体水素化物〔ゼオノア(登録商標)1060R、日本ゼオン社製〕を射出成型して得られた96

10

20

30

40

50

ウェルプレート（以下、「1060Rプレート」という）、及びポリスチレン製の96ウェルプレート（製品名「スミロンELISA用プレートH（登録商標）」、住友ベークライト社製；以下、「PSプレート」という）を用い抗原の吸着比較を行った。

【0077】

ヒトBNP（brain natriuretic peptide）の抗体認識部位のアミノ酸配列Cys-Lys-Val-Leu-Arg-Arg-His（配列番号6）のN末端側に、ノルボルネン系重合体に特異的に吸着する特性を有するアミノ酸配列である、Ala-Cys-Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Ser-Ser-Gly-Leu-Gly（配列番号7）が結合したポリペプチド（以下、「合成BNP抗原」という）を合成した。リン酸緩衝生理食塩水（NaCl 8.0 g/L、KCl 0.20 g/L、Na₂HPO₄ 1.44 g/L、KH₂PO₄ 0.24 g/L；pH 7.4；以下、同じ）に、合成BNP抗原を、濃度1×10⁷ pg/μL、53 pg/μL、及び27 pg/μLとなるように溶解した希釈試料を作り、各種希釈資料100 μLを3ウェルずつ入れて、室温で30分静置し、0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄したあと、リン酸緩衝生理食塩水で10倍希釈したブロッキング剤（ナカライテスク社製、製品名「ブロッキングワン」）を用いて、各ウェルに200 μL分注し、室温30分静置し、0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、プレートに合成BNP抗原を固相化した。

【0078】

続いて、0.25 ng/μLのホースラディッシュペルオキシダーゼ標識の抗体を含むリン酸緩衝生理食塩水を、各ウェルに100 μL添加し、室温30分静置し、0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄した。

次いで、発色試薬（ナカライテスク社製、製品名「ELISA POD基質TMB溶液」）を用いて、プレート中に固定された合成BNP抗原を発色させ、希硫酸水溶液で反応停止させた後に、吸光プレートリーダーで波長450 nmの吸光を測定した。

その結果、図6に示されるように、PSプレートには、合成BNP抗原は吸着しないが、1060Rプレートには、合成BNP抗原が吸着することが確認できた。

【0079】

〔実施例5〕

<BNP測定用プレートの調製>

実施例1で合成した合成BNP抗原を濃度98 pg/μLとなるようにリン酸緩衝生理食塩水に溶解して抗原溶液を調製し、1060Rプレートの各ウェル（7ウェル）に100 μL分注したこと以外は、実施例4と同様にしてプレートに合成BNP抗原を固相化した。

続いて、0.25 ng/μLのホースラディッシュペルオキシダーゼ標識の抗体を含むリン酸緩衝生理食塩水リン酸緩衝生理食塩水で希釈して、各ウェル50 μL添加し、室温30分静置し、0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、BNP測定用プレートを作製した。

【0080】

<BNP測定>

ヒトBNP（ペプチド研究所製）を、リン酸緩衝生理食塩水に濃度2.0 pg/ml、3.9 pg/ml、7.8 pg/ml、15.6 pg/ml、31.3 pg/ml、62.5 pg/ml、及び125 pg/mlとなるように溶解した希釈試料（7点）を調製し、得られたBNP測定用プレートに各ウェル100 μL入れて、室温30分間静置し、ウェル内の溶液を50 μL回収して、別のマルチウェルプレートに移した。

移した溶液に対して、発色試薬（ナカライテスク社製、製品名「ELISA POD基質TMB溶液」）を添加して発色させ、希硫酸水溶液で反応停止させた後に、吸光プレートリーダーで波長450 nmの吸光度を測定した。

その結果、図7に示されるように、用いたBNP濃度に依存して発色がみられ、吸光度を測定することによりBNP濃度を算出可能であることが示された。

【0081】

〔実施例6〕

ノルボルネン系重合体の表面のブロッキング操作として、ELISA法で汎用されているタンパク質を用いる方法と、Tween 20を用いる方法での効果比較を行った。

ブロッキング剤として、汎用されているカゼインを含有する10%ブロッキング剤（ナカライテスク社製、製品名「ブロッキングワン」）を含むリン酸緩衝生理食塩水（「終濃度10%ブロッキングワンPBS」）、0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水（「終濃度0.05% Tween 20 PBS」）、および0.2% Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水（「終濃度0.2% Tween 20 PBS」）を用いて、実施例5と同様にして合成BNP抗原が固相化された容器をブロッキングし、ブロッキング処理しない条件との比較を行った。

10

【0082】

マイクロウェルプレートとして、1060Rプレート（実験例）とPSプレート（比較例）を用いた。

ブロッキング処理は、ブロッキング剤をウェル内（ウェル数3）に各200 μ L添加して、室温20分静置し、0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄した後、0.25 ng/ μ Lのホースラディッシュペルオキシダーゼ標識の抗体を含むリン酸緩衝生理食塩水に溶解した抗体溶液を調製して、96ウェルプレートのウェルに50 μ L添加し、室温で60分間静置した。

【0083】

20

静置後、ウェル内の溶液を除去して、0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水で、3回洗浄し、続いて、発色試薬（ナカライテスク社製、製品名「ELISA POD基質TMB溶液」）を、96ウェルプレートのウェルに50 μ L添加し、室温で5分間静置した。停止液として、0.1Mの硫酸液を添加したあと、吸光度450 nmを吸光プレートリーダーで計測した。

実験条件の組み合わせを表1に示す。

【0084】

【表 1】

実験条件	プレート	ブロッキング処理
実験3-1	1060Rプレート	終濃度10% ブロッキングワン PBS
実験3-2	1060Rプレート	終濃度0.05% Tween20 PBS
実験3-3	1060Rプレート	終濃度0.2% Tween20 PBS
実験3-4	1060Rプレート	なし
比較実験3-1	PSプレート	終濃度10% ブロッキングワン PBS
比較実験3-2	PSプレート	終濃度0.05% Tween20 PBS
比較実験3-3	PSプレート	終濃度0.2% Tween20 PBS
比較実験3-4	PSプレート	なし

【0085】

1060Rプレートでのブロッキング未実施のウェルの測定した吸光値に対する相対値を用いて、各条件の値を求めた。

その結果、図8に示されるように、1060Rプレートでは、タンパク質を含有せず、Tween20が含まれる溶液でのブロッキング効果が見られ、非特異的な抗体の吸着が抑えられていることが示された。PSプレートでは、タンパク質を含有しなくても、未処理に比較して、吸着が少ない結果であったが、タンパク質を含有するブロッキング剤に比較して、ブロッキング効果が低かった。

【0086】

〔実施例7〕

容器内には、固相化抗原を固相化し、試料と同時に抗体を添加する方法について実施例を示す。

<BNP測定用プレートの調製>

実施例 4 で得た合成 BNP 抗原をリン酸緩衝生理食塩水で濃度 $122 \text{ pg}/\mu\text{L}$ として抗原溶液を調製し、1060R プレートの各ウェルに $75 \mu\text{L}$ 分注し、室温 1 時間静置し、 0.05% Tween 20 を含むリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄したあと、 0.05% Tween 20 を含むリン酸緩衝生理食塩水で室温 10 分静置してブロッキング処理を行った。

【0087】

<BNP 測定>

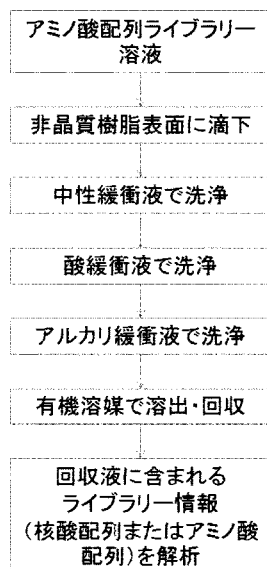
ヒト BNP (ペプチド研究所製) の希釈試料を濃度 $18 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 、 $4 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 、および $1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ で調製し、これらの希釈試料 $50 \mu\text{L}$ と、ヒト BNP を認識できるホースラディッシュペルオキシダーゼ標識の抗体をリン酸緩衝生理食塩水で希釈した溶液 $50 \mu\text{L}$ を混合し、上記の BNP 測定用プレートに各ウェル $100 \mu\text{L}$ 添加 (各 3 ウェル) して、室温 30 分間静置した。

続いて、ウェル内溶液を $50 \mu\text{L}$ 取り出し、発色試薬 (ナカライテスク社製、製品名「ELISA POD 基質 TMB 溶液」) を添加して吸光度を測定した。

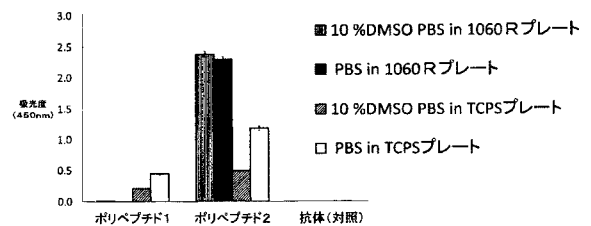
その結果、図 9 に示されるように、BNP 濃度依存的に吸光が観察され、ノルボルネン系重合体からなる容器内に抗原を固相化したプレートを準備して、試料と同時に抗体を添加する方法によっても、免疫測定できることが示された。

10

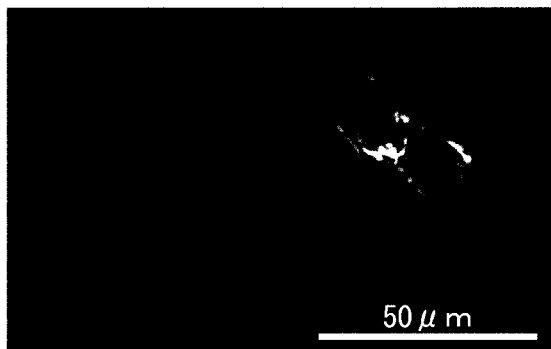
【図 1】



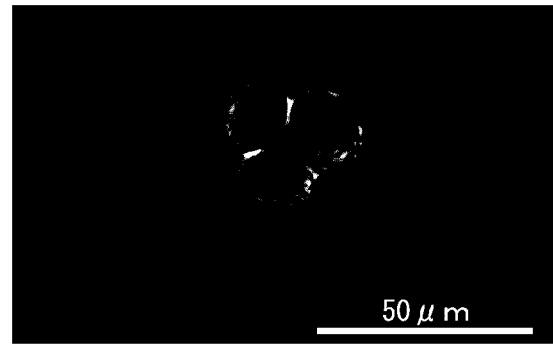
【図 2】



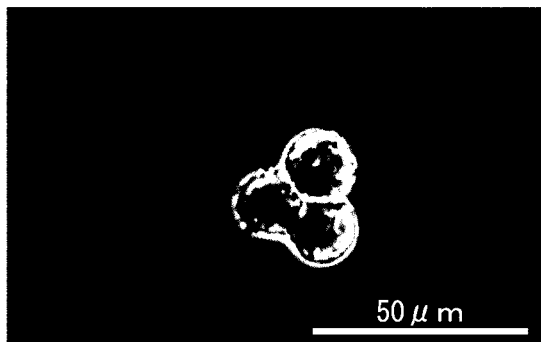
【図 3】



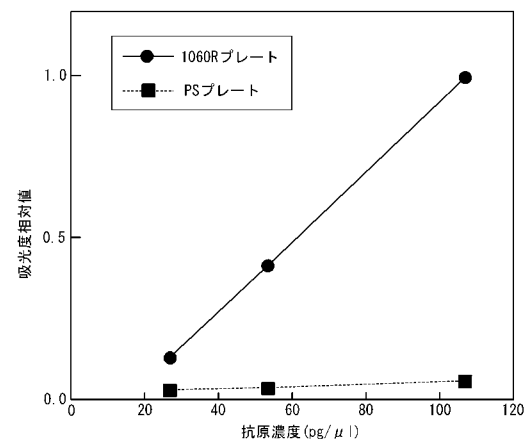
【図 4】



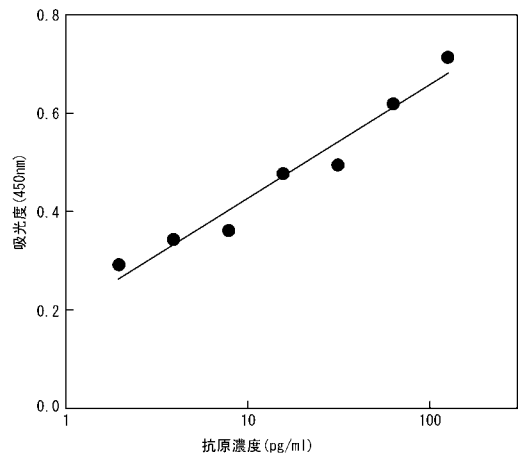
【図 5】



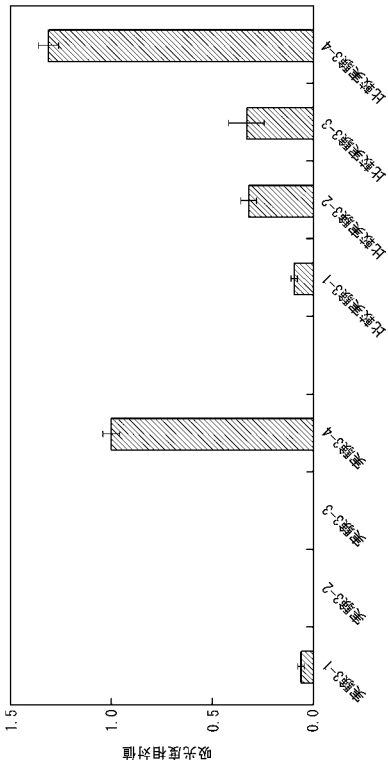
【図 6】



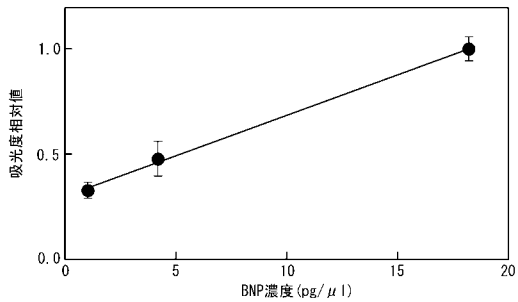
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

2018117242000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/046019

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C07K7/06 (2006.01) i, G01N33/53 (2006.01) i

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)

Int.Cl. C07K7/06, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	WO 2011/111832 A1 (RIKEN, JAPAN) 15 September 2011, claims 1, 8, 25-26, paragraph [0046], fig. 4-5, 7 & US 2013/0045917 A1, claims 1, 8, 25-26, paragraph [0119] & EP 2546342 A1	<u>1-4, 9-10, 12</u> 5-8, 11
<u>Y</u> A	JP 2006-275769 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 12 October 2006, paragraph [0019] (Family: none)	<u>1-4, 9-10, 12</u> 5-8, 11
<u>Y</u> A	JP 2016-038265 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 22 March 2016, examples 1, 2 (Family: none)	<u>1-4, 9-10, 12</u> 5-8, 11
<u>Y</u> A	JP 2007-240461 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 20 September 2007, paragraphs [0002], [0015] (Family: none)	<u>1-4, 9-10, 12</u> 5-8, 11
<u>Y</u> A	WO 2012/070564 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) 31 May 2012, paragraph [0004], example 2 & US 2013/0316932 A1, paragraph [0004], example 2 & EP 2645103 A1	<u>1-4, 9-10, 12</u> 5-8, 11
<u>Y</u> A	JP 2009-136280 A (RIKEN, JAPAN) 25 June 2009, claim 22, paragraph [0004], fig. 6-7 (Family: none)	<u>1-4, 9-10, 12</u> 5-8, 11



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 application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 March 2018 (07.03.2018)Date of mailing of the international search report
20 March 2018 (20.03.2018)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/046019

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-502897 A (PRAECIS PHARMACEUTICALS, INC.) 14 March 2000 & US 2001/0006778 A1 & EP 868427 A1	1-12
A	WO 2000/053740 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 14 September 2000 & US 2005/0266498 A1 & EP 1167522 A1 & CA 2367313 A	1-12
A	SMITH GP, SCOTT J K, "Libraries of Peptides and Proteins Displayed on Filamentous Phage", METHODS IN ENZYMOLOGY, 1993, Vol. 217, pp. 228-257	1-12
A	JP 2002-286724 A (CANON INC.) 03 October 2002 (Family: none)	1-12
A	Database Uniprot [online], Accession No. AOAON0YFT5, [retrieved on 7 March 2018], URL, https://www.uniprot.org/uniprot/AOAON0YFT5.txt?version=5 , 05 October 2016	1-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 4 6 0 1 9										
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K7/06 (2006.01)i, G01N33/53 (2006.01)i												
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K7/06, G01N33/53												
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2018年											
日本国実用新案登録公報	1996-2018年											
日本国登録実用新案公報	1994-2018年											
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)												
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y A</td> <td>WO 2011/111832 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2011.09.15, 請求項 1, 8, 25-26, [0046], 図 4-5, 7 & US 2013/0045917 A1, Claims 1, 8, 25-26, [0119] & EP 2546342 A1</td> <td>1-4, 9-10, 12 5-8, 11</td> </tr> <tr> <td>Y A</td> <td>JP 2006-275769 A (住友ベークライト株式会社) 2006.10.12, [0019] (ファミリーなし)</td> <td>1-4, 9-10, 12 5-8, 11</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y A	WO 2011/111832 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2011.09.15, 請求項 1, 8, 25-26, [0046], 図 4-5, 7 & US 2013/0045917 A1, Claims 1, 8, 25-26, [0119] & EP 2546342 A1	1-4, 9-10, 12 5-8, 11	Y A	JP 2006-275769 A (住友ベークライト株式会社) 2006.10.12, [0019] (ファミリーなし)	1-4, 9-10, 12 5-8, 11
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
Y A	WO 2011/111832 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2011.09.15, 請求項 1, 8, 25-26, [0046], 図 4-5, 7 & US 2013/0045917 A1, Claims 1, 8, 25-26, [0119] & EP 2546342 A1	1-4, 9-10, 12 5-8, 11										
Y A	JP 2006-275769 A (住友ベークライト株式会社) 2006.10.12, [0019] (ファミリーなし)	1-4, 9-10, 12 5-8, 11										
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。												
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献												
国際調査を完了した日 07.03.2018		国際調査報告の発送日 20.03.2018										
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 伊藤 良子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448										

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2017/046019
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>Y</u> A	JP 2016-038265 A (住友ベークライト株式会社) 2016. 03. 22, 実施例 1, 2 (ファミリーなし)	<u>1-4, 9-10, 12</u> 5-8, 11
<u>Y</u> A	JP 2007-240461 A (住友ベークライト株式会社) 2007. 09. 20, [0002], [0015] (ファミリーなし)	<u>1-4, 9-10, 12</u> 5-8, 11
<u>Y</u> A	WO 2012/070564 A1 (国立大学法人北海道大学) 2012. 05. 31, [0004], 実施例 2 & US 2013/0316932 A1, [0004], Example 2 & EP 2645103 A1	<u>1-4, 9-10, 12</u> 5-8, 11
<u>Y</u> A	JP 2009-136280 A (独立行政法人理化学研究所) 2009. 06. 25, 請求項 22, [0004], 図 6-7 (ファミリーなし)	<u>1-4, 9-10, 12</u> 5-8, 11
A	JP 2000-502897 A (プレシス ファーマスーティカルズ インコ ーポレイテッド) 2000. 03. 14, & US 2001/0006778 A1 & EP 868427 A1	1-12
A	WO 2000/053740 A1 (味の素株式会社) 2000. 09. 14, & US 2005/0266498 A1 & EP 1167522 A1 & CA 2367313 A	1-12
A	SMITH G P, SCOTT J K, Libraries of Peptides and Proteins Displayed on Filamentous Phage, METHODS IN ENZYMOLOGY, 1993, Vol. 217, p. 228-257	1-12
A	JP 2002-286724 A (キヤノン株式会社) 2002. 10. 03, (ファミリーなし)	1-12
A	Database Uniprot [online], Accession No. A0A0NOYFT5, [平成 30 年 3 月 7 日 検索], URL, https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0NOYFT5.txt?version=5 , 2016. 10. 05	1-12

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA14 BA17 BA60 EA50 FA20 GA20 HA32

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

专利名称(译)	寡肽搜索方法，寡肽，修饰的肽和免疫测定方法		
公开(公告)号	JPWO2018117242A1	公开(公告)日	2019-10-31
申请号	JP2018558081	申请日	2017-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	日本瑞翁株式会社		
申请(专利权)人(译)	日本Zeon有限公司		
[标]发明人	市村直也		
发明人	市村 直也		
IPC分类号	C07K7/06 C40B40/10 G01N33/53 C40B30/04 C07K17/02		
CPC分类号	C07K7/06 C40B30/10 G01N33/548 G01N33/6818 G01N33/545		
FI分类号	C07K7/06.ZNA C40B40/10 G01N33/53.D C40B30/04 C07K17/02		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/BA17 4H045/BA60 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/GA20 4H045/HA32		
代理人(译)	杉村健二 高桥林太郎		
优先权	2016248711 2016-12-22 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种从肽文库中有效搜索能够结合至目的蛋白或肽末端的寡肽的方法。此外，提供了一种有效且高度安全的免疫测定方法。

(19) 日本国特許庁(JP)		再 公 表 特 許(A1)		(11) 国際公開番号 WO2018/117242	
発行日 令和1年10月31日(2019.10.31)		(43) 国際公開日 平成30年6月28日(2018.6.28)			
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C O 7 K 7/06 (2006.01)		C O 7 K 7/06		Z N A	
C 4 0 B 40/10 (2006.01)		C 4 0 B 40/10		4 H O 4 5	
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N 33/53		D	
C 4 0 B 30/04 (2006.01)		C 4 0 B 30/04			
C O 7 K 17/02 (2006.01)		C O 7 K 17/02			
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)			
出願番号 特願2018-558081 (P2018-558081)		(71) 出願人 000229117			
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/046019		日本ゼオン株式会社			
(22) 国際出願日 平成29年12月21日(2017.12.21)		東京都千代田区丸の内一丁目6番2号			
(31) 優先権主張番号 特願2016-248711 (P2016-248711)		(74) 代理人 100147485			
(32) 優先日 平成28年12月22日(2016.12.22)		弁理士 杉村 意司			
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)		(74) 代理人 230118913			
		弁理士 杉村 光嗣			
		(74) 代理人 100175477			
		弁理士 高橋 林太郎			
		(74) 代理人 100181847			
		弁理士 大島 かおり			
		(72) 発明者 市村 直也			
		東京都千代田区丸の内一丁目6番2号 日本ゼオン株式会社内			
		最終頁に続く			
(54) 【発明の名称】 オリゴペプチドの探索方法、オリゴペプチド、修飾ペプチド、及び免疫測定方法					