

(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2004-505638

(P2004-505638A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
C O 7 K 5/00	C O 7 K 5/00	4 H O 4 5
C O 7 K 7/00	C O 7 K 7/00	
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	A
G O 1 N 33/531	G O 1 N 33/531	A
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-518243 (P2002-518243)	(71) 出願人	302044591
(86) (22) 出願日	平成13年7月26日 (2001.7.26)		インバーネス・メデイカル・スウィツァーランド・ゲゼルシャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハフツング
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月31日 (2003.1.31)		スイス国、ツーク、ツエー・ハー-6300、ブンデスプラッツ・10、エルンスト・アンド・ヤング気付
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/008705	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開番号	W02002/012270		弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成14年2月14日 (2002.2.14)	(74) 代理人	100105131
(31) 優先権主張番号	00306613.1		弁理士 井上 満
(32) 優先日	平成12年8月3日 (2000.8.3)	(74) 代理人	100113332
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エストラジオール分析物についてのミモトープとして機能することができるペプチド

(57) 【要約】

エストラジオール特異的抗体に特異的に結合することができる精製ペプチドミモトープである。また、試料中のエストラジオールの検出のための免疫検定試験装置であって、エストラジオールのペプチドミモトープ、及び該ペプチドミモトープに特異的に結合して検出可能なシグナルを生じることができる抗体を含む免疫検定試験装置も開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エストラジオール特異的抗体に特異的に結合することができる精製ペプチドミモトープ。

【請求項 2】

ミモトープが 12 アミノ酸残基以下のコア結合領域を持つ、請求項 1 に記載の精製ペプチドミモトープ。

【請求項 3】

配列番号 3、4、6 及び 18 から 70 から成る群より選択されるアミノ酸配列によって表わされるコア結合領域を持つ、請求項 1 に記載の精製ペプチドミモトープ。

【請求項 4】

エストロン - 3 - グルクロニド特異的抗体に特異的に結合することができる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の精製ペプチドミモトープ。

【請求項 5】

配列番号 7 から 17 から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の精製ペプチドミモトープ。

【請求項 6】

そのコア結合領域内に、Xaa - Glu - Asp、Phe - Xaa - Asp 及び Phe - Glu - Xaa の少なくとも 1 つに従ったトリペプチドを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の精製ペプチド。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の精製ペプチドがその上に固定されている（解除可能にまたは解除不能に）支持体。

【請求項 8】

免疫検定試験スティックまたはディップスティック形態の、請求項 7 に記載の支持体。

【請求項 9】

試料中のエストラジオールの検出のための免疫検定試験装置であって、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドミモトープ、及び該ペプチドミモトープに特異的に結合して検出可能なシグナルを生じることができる抗体を含む免疫検定試験装置。

【請求項 10】

試験装置が競合免疫検定試験装置である、請求項 9 に記載の免疫検定試験装置。

【請求項 11】

ペプチドミモトープが配列番号 3、4、6 及び 18 から 70 から成る群より選択されるコア結合領域を持つアミノ酸配列を含む、請求項 9 または 10 に記載の免疫検定試験装置。

【請求項 12】

ペプチドミモトープが配列番号 7 から 17 から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 9、10 または 11 のいずれか一項に記載の免疫検定試験装置。

【請求項 13】

ペプチドミモトープがエストロン - 3 - グルクロニド特異的抗体に特異的に結合することができる、請求項 9 から 12 のいずれか一項に記載の免疫検定試験装置。

【請求項 14】

試験する試料中のエストラジオールの存在及び/または量を検定するための、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドミモトープの使用。

【請求項 15】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドミモトープをコードする単離核酸。

【請求項 16】

実施例を参照して、実質的に本文中で説明されるようなペプチドミモトープ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

（発明の分野）

本発明は、ある種のペプチド分子が、そのような化合物間の有意の構造上の相違にもかか

10

20

30

40

50

ならず、ある種のステロイド化合物と同様の反応特性を持ち、それ故例えば、ステロイド類の検出のために設計された置換免疫検定法においてステロイド化合物のミモトープとして機能することができるという発見に関する。

【0002】

(発明の背景)

一般的定義として、エピトープは、免疫に関連する抗体結合応答の引き金を引くために必要な抗原の重要な結合領域を含む、特定抗原の領域である。エピトープはまた、しばしば代替的に抗原決定基とも称される。

【0003】

エピトープの構造ならびに特定抗体へのそれらの特異的結合反応を理解することは、多くの人々にとって大きな関心であり、理解そのものが製薬、診断及び医薬産業における進歩の基礎を築くことができるであろう。この理解を容易にするために、近年、学術機関と産業界はエピトープライブラリーと称されるものを構築した。

【0004】

エピトープライブラリーは、例えばバクテリオファージの表面にディスプレイされる、変化するアミノ酸配列の膨大なコレクションである。各々の配列は特定抗原の特定エピトープに対応する。しばしば、エピトープライブラリーは何百万ものこれらの短いアミノ酸配列から成り、さらに時としては1億個またはそれ以上の配列から成る。代表的なエピトープライブラリーは、Luzzago A.ら、「Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. (ファージディスプレイされたペプチドによる不連続エピトープの模倣、I. 制約された (constrained) ペプチドのファージライブラリーを用いたヒトHフェリチンのエピトープマッピング)」Gene 128, 51-57 (1993)の中で詳細に述べられている。

【0005】

ひとたびエピトープライブラリーが構築されれば、特定抗体または他の結合タンパク質を利用して特定エピトープを特異的に選択することができる。その後エピトープを、直接にまたは最初に対応するDNA配列を同定し、次にそのDNA配列を転写して対応するアミノ酸配列に翻訳することによって配列決定することができる。そのような手法により、抗原化合物及び分子の結合領域を決定することができ、ひとたび特定抗原の結合領域がわかれば、特定エピトープを使用したワクチンの設計のような、強力なバイオテクノロジー応用を実現しうることは容易に想定できる。

【0006】

エピトープライブラリースクリーニング手法の明白な能力にもかかわらず、それらはこれまで、主として特定抗原の特異的結合領域を同定し、配列決定するためにしか使用されてこなかった。これはおのずから本質的に、このテクノロジーに基礎を置くバイオテクノロジー応用の種類と範囲を限定することになる。

【0007】

Scott, 「Discovering Peptide Ligands Using Epitope Libraries (エピトープライブラリーを用いたペプチドリガンドの発見)」、Trends in Biochemical Science 17, pp. 241-245 (1992年7月)の中で、従来のエピトープライブラリー手法の伸展が開示されている。特に、Scottは、エピトープライブラリーを使用して既知の抗原についてのペプチドミモトープを同定し、マッピングすることができることを主張している。ミモトープは、特定抗原のエピトープ領域を「模倣する」が、該エピトープを含む特定アミノ酸配列を含まない分子配列である。従って、ミモトープは、特定エピトープを含む抗原に対する抗体の結合クレフト(くぼみ)に同様に結合することができるので機能的には非常に類似するが、エピトープとは構造的に異なる。

10

20

30

40

50

【0008】

ミモトープは、学術的にはエピトープを模倣するいかなる分子または分子の配列でもありうるが、ほとんどの場合、アミノ酸の短い配列を含む小さな低分子量ペプチドである。それらは最も典型的には小さなペプチドであるので、それらが模倣できるものは限定されると考えられてきた。特に、数多くのタンパク質ベースの抗原（すなわちペプチドエピトープを持つ抗原）についてペプチドミモトープを同定することができるが、抗体結合クレフトの複雑な構造と、それに対応する抗体結合反応の複雑な性質 それらの反応のすべてが、ミモトープ-抗体結合を生じるためにはミモトープとエピトープ間の密接な構造類似性を必要すると考えられてきた。ゆえに、非タンパク質ベースの抗原についてのペプチドミモトープの同定は実現が難しいであろう。一般に、いくつかの孤立した例外はあるが、この考え方は正しいことが証明されている。

10

【0009】

例えば、「Random peptide libraries: A source of specific binding molecules (ランダムペプチドライブラリー: 特異結合分子のソース)」: Devlin JJ: Science 249, 404-406 (1990)において、生体細胞におけるある種の酵素的カルボキシル化反応のために必要な、必須ビタミンであるピオチンのペプチドミモトープが同定された。ピオチンは構造上はペプチドではないが、それにもかかわらず大きさと構造においていくつかのアミノ酸（例えばヒスチジン）と類似している。それ故、そのような分子についてのペプチドミモトープが同定されうることは予想外ではなかった。

20

【0010】

同様に、「Peptide ligands for a sugar binding protein isolated from a random peptide library (ランダムペプチドライブラリーから単離された糖結合タンパク質についてのペプチドリガンド)」: Odernburg, KRら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 5393-5397 (1992)の中で、コンカナバリンAのマンノピラノシドリガンドについてのペプチドミモトープが同定された。しかし、これに関して、そのようなミモトープはそれらが模倣するエピトープと同様の大きさと構造立体配置を持ち、それ故それらの同定は意外ではなかった。Sibilleら、「Mimotopes of polyreactive anti-DNA antibodies identified using phage displayed peptide libraries (ファージディスプレイされたペプチドライブラリーを用いて同定される多反応性抗DNA抗体のミモトープ)」: Eur J Immunol., 27, 1221-1228 (1997)に述べられているように、ある種の形態のDNAのミモトープも同定されている。

30

【0011】

これらのいくつかの限られた発見にもかかわらず、ステロイド化合物のような複雑な非タンパク質分子についてのエピトープライブラリー（または他の手段）からのペプチドミモトープの同定は行われていない。さらに、そのようなペプチドミモトープとステロイド類のような複雑な非タンパク質分子の間での明らかな構造上の相違により、これらのミモトープの存在についてはこれまでほとんど検討されていなかった。

40

【0012】

WO96/16322号は、標的リガンドの第一及び第二類似体の使用を含む、特定標的リガンドに高い親和性を持つ特異的結合物質を回収するための、アフィニティーベースの工程を開示している。かかる資料の4ページは、工程で使用される類似体の1つが、エピトープミミック、「すなわち、標的リガンドの結合部位（エピトープ）と同様に挙動する、短いペプチドのような、一般に合成由来の小分子」でありうることを言及している。

【0013】

資料は、標的リガンドがステロイド（特に、エストロン-3-グルクロニド、「E3G」）である工程の実施例を含むが、これらの実施例のいずれもが、ステロイドのペプチドミ

50

モトープの使用を含まず、またステロイドのペプチドミモトープの特定例あるいはそれに関するいかなる実験証拠も開示されていない。実際に4ページで、上記で引用した一節のすぐ後に、W096/16322号は、「特に標的リガンドがE3Gであるとき、該第一類似体はエストロンでありうる。好ましくは該第二類似体はエストリオールグルクロニドである。あるいは、エストラジオール-3-グルクロニドが第二類似体として使用できる、この場合、場合によってはエストリオール-3-グルクロニドを第一類似体として使用しうる」と述べている。

【0014】

それ故、W096/16322号は標的リガンドのペプチドエピトープミミックの使用に言及し、またステロイド標的リガンドにも言及しているが、ステロイド標的リガンドについてのペプチドミミックの明白な開示または示唆は為されていない。実際に、ステロイド標的リガンドについての特定類似体の唯一の言及は、他の密接に関連するステロイドである。従って、当業者はW096/16322号の内容から、ステロイド類似体についてのペプチドミミックが実際に存在するかまたは作製しうることを推論しないであろうし、またそれが存在することを示唆するいかなる証拠もないので、これに関する成功にいかなる合理的な期待も抱かないであろう。

10

【0015】

上述したものと同様の短い言及がW099/27356号(10ページ)の中に認められるが、やはり具体例または実験証拠は含まれていない。

【0016】

Savirantaら(1998 Bioconjugate Chem. 9, 725-735)は、エストラジオールに特異的なFabフラグメントを使用した、エストラジオールについてのアッセイを開示している。Fabフラグメントに結合する、エストラジオールのペプチドミモトープに関する言及または示唆は存在しない。

20

【0017】

Slootstraら(1997 Journal of Molecular Recognition 10, 217-224)は、エピトープを模倣する合成ペプチドを同定するためのスクリーニング法を述べているが、著者達はタンパク質またはペプチド抗原の模倣に言及しているだけであり、ペプチドミモトープがステロイド化合物に関して利用可能であることの認識または示唆はない。

30

【0018】

最後に、米国特許第5,635,182号(McCoy & Lu)は、本発明とは大きく異なる主題に関するものであり、一般にチオレドキシン様ポリペプチドをコードするDNA配列に関連する。トリペプチド配列Phe-Glu-Aspを含む20量体ペプチドに関する、簡単な開示(その中での配列番号2)がある。

【0019】**(発明の概要)**

本発明は、構造上の有意な相違にもかかわらず、ある種のステロイド化合物についてのペプチドミモトープが実際に存在し、例えば試料中のステロイド類の検出のために設計された競合または置換型免疫検定法において、有利に使用することができるという予想外の発見に基づく。これに関して、本発明は、エストラジオールに特異的な抗体に特異的に結合することができる精製ペプチドミモトープ、及び該精製ペプチドミモトープをコードする単離核酸配列を対象とする。本発明はまた、試料中のエストラジオールの検出のための免疫検定試験装置であって、この免疫検定がペプチドミモトープならびにペプチドミモトープに特異的に結合して検出可能なシグナルを生じることができる抗体を含む、免疫検定試験装置を対象とする。

40

【0020】

本発明は数多くの利点を提供する。免疫原として使用することができるペプチドに加えて、ペプチドミモトープは、新しい免疫検定試験方式及び装置を構築し、また古い免疫検定試験方式及び装置を改善するために使用できる。それらは、例えば、エストラジオールの

50

検出のための従来の置換アッセイにおいてシグナルを基本的に「調整する (t u n e) 」ために利用できる。さらにそれらは、さもなければエストラジオールと非適合性であって、そのような表面のエストラジオールはもう1つ別の分子(しばしばタンパク質様)と複合することによって表面に結合することを必要とするような、ある種のアッセイ表面に直接結合することができる。他の利点は下記の本発明の説明において容易に明らかになるであろう。

【0021】

(発明の詳細な説明)

本発明のペプチドミモトープは、エストラジオールに特異的である、どのような抗体にも特異結合することができる。ここで使用するときエストラジオールは、エストラジオールまたはその代謝産物(例えば、好ましくはエストロン-3-グルクロニド)、ならびに基本的エストロン構造を持つ何らかの関連ステロイド化合物を意味すると解釈される。そのような関連化合物は、エストリオール、16-エピエストリオール、17-エピエストリオール、17-エストラジオール3-(D-グルクロニド)、エストリオール3-(D-グルクロニド)、エストロン、17-エチニルエストラジオール、及び16-ヒドロキシエストロンに例示されるが、必ずしもこれらに限定されない。

10

【0022】

特異結合とは、ミモトープが、過剰量の目的ではない他の物質の存在下で選択的に抗体の抗原結合部位に結合することができ、免疫検定法において使用したとき、十分にしっかりと結合する、すなわち十分に高い親和性を持つので、有用な検定結果を提供することを意味する。同様に、「エストラジオールに特異的な」抗体は、過剰量の目的ではない他の物質の存在下で選択的にエストラジオール(または関連化合物)に結合することができ、免疫検定法において使用したとき十分にしっかりと結合するので、有用な検定結果を提供する。

20

【0023】

ペプチドミモトープが特異的に結合することができる抗体は、エストラジオールまたはその代謝産物について結合特異性を持つあらゆる抗体、そのフラグメントまたはその構築物でありうる。モノクローナルまたはポリクローナル抗体、Fv、Fab、ScFv等を含みうる、そのような抗体の様々な形態が考えられる。また、次のようなものも考えられる。文献において記述されており、2またはそれ以上のポリペプチド鎖を含む、(例えば、Harrisらの特許願WO94/09131号及びDavisらの特許願WO97/14719号参照)多価及び/又は多選択性構築物または「二重ScFv」アプローチに基づく、多価性が、例えばWhitlowら、WO93/11161号及びMezesら、WO94/13806号に述べられているように、2またはそれ以上の一価ScFv分子が共に連結して、少なくとも4つの可変ドメインを含む一本鎖分子を提供するときに生じる。

30

【0024】

抗体は、免疫検定試験装置においてペプチドミモトープと共に使用するとき、当該技術において既知の方法によって構築することができる。VerhoeyenとWindust、「Advances in Antibody Engineering in Molecular Immunology: Frontiers in Molecular Biology (分子免疫学における抗体エンジニアリングの進歩: 分子生物学のフロンティア)」、第2版、Oxford University Press発行、p. 283-325 (Oxford, 1995)及びPriceら、Principles and Practice of Immunoassays (免疫検定法の原理と実際)、第2版、Macmillan Publishers Ltd発行(London, 1997)に例示されているもののような手法が適当である。多くの抗体はまた、市販のものが入手できる。エストラジオール代謝産物、エストロン-3-グルクロニドについては、モノクローナル抗体がLinscott's Directory of Immunological and Biological Reagents (第10版、1

40

50

998-9)の中に述べられており、OEM Concepts Inc, Toms River, NJ, USAより入手しうる。

【0025】

付随する実施例において述べるように、本発明のペプチドミモトープは様々なスクリーニング手法によってエピトープライブラリーから同定された。それらはまた、既知の天然に生じるアミノ酸より構築されたペプチドライブラリーからも同定された。

【0026】

ペプチドミモトープは最小限のコア結合領域を含む。すなわち、それらは、標的抗体に特異結合する能力をミモトープに与えるために必要な最小限の連続アミノ酸配列を含む。好ましくは、該領域は、溶液中での単一抗体結合部位への結合反応についてのミモトープの親和性が 10^5 L/molまたはそれ以上である。結合親和性を測定するための方法は当業者には常套的であり、特定抗体についての特定ミモトープの結合親和性は、ここで述べる手法を活用し、当業者の一般知識を用いて容易に測定することができる。

10

【0027】

ペプチドミモトープはいかなる大きさでもありうるが、三次構造または球状構造形成が起こりうる大きさよりも小さいことが好ましい。従って、それらは典型的には30、好ましくは20アミノ酸以下の長さである。各々のミモトープのコア結合領域は、典型的には12個アミノ酸未満、好ましくは7アミノ酸未満、至適には3から6アミノ酸の長さである。好ましいミモトープを下記の実施例において同定する。

【0028】

特に、発明者は、本発明に従った多くのミモトープのコア結合領域が次のように同定される3つのトリペプチド配列の1つを含むことを発見した：Xaa-Glu-Asp; Phe-Xaa-Asp; 及びPhe-Glu-Xaa。それ故、一般に、好ましいミモトープはこれら3つのトリペプチド配列の1つ(典型的にはPhe-Glu-Asp)を含むが、単にそのようなトリペプチドを有するだけでは、ペプチドが適当な特異結合活性を持つためには必ずしも十分でないことに留意すべきである。発明者は、上述したトリペプチド配列の1つを含むが適当な特異結合活性を示さないペプチドのいくつかの例を認めた。本発明の開示を利用して、当業者は容易に候補ペプチドをスクリーニングし、最も望ましい結合特性を持つものを選択することができるであろう。

20

【0029】

本発明の開示から、アミノ酸のD-異性体を使用した場合、逆配列(すなわちXaa-Glu-Phe; Asp-Xaa-Phe; 及びAsp-Glu-Xaa)が使用しうることは明白であろう。

30

【0030】

米国特許第5,635,182号は、配列QPFE DFRISQ EHLADHF DGRを持つ、ウシホスホリパーゼC-IIから誘導される20量体ペプチドを開示している。

【0031】

本発明者は、トリペプチドFEDを含むいくつかのペプチドが本発明に従ったペプチドミモトープとして有用であることを発見した。発明者は、米国特許第5,635,182号に開示されている20量体もまた有用であるかどうか(すなわちエストラジオール特異的抗体に特異的に結合することができるかどうか)を検討する実験を実施しなかったが、先行技術のペプチドがそのような特異結合活性を示す場合、発明者はここで条件付きで、アミノ酸配列QPFE DFRISQ EHLADHF DGRから成るペプチドを放棄する。

40

【0032】

ペプチドミモトープの精製は、Tendlerら、The role of the arginine residue in the stabilization of mucin core type I turns (ムチンコアI型ターンの安定化におけるアルギニン残基の役割)、Protein and Peptide Letters, 1, 39-43 (1994)に述べられているもののような、従来手法によって実施することができる。好ましくは、ペプチドミモトープを95%まで、至適には9

50

9%まで精製する。ミモトープは典型的には単一ペプチドとして提供されるが、場合によっては共有ペプチド結合しているかあるいは他の何らかの手段によって標識または固形支持体のような他の成分に連結されていてもよい。

【0033】

本発明の1つの実施形態では、ペプチドミモトープは免疫検定試験装置において利用される。そのような装置は様々な形態をとることができ、また実施する検定の的確な性質に応じて変化させうる。

【0034】

ペプチドミモトープは、しばしば試験の対象となる物質（すなわちエストラジオール）を「模倣する」ので、それらは性質及び機能に関して、基本的に抗原性である。それ故、競合または置換型検定（本文中以下、総合的に競合検定と称する）において利用することが最も好ましい。しかし、従来サンドイッチ型検定における使用も排除されるわけではなく、個々の方式を容易に設計することができる。

10

【0035】

特に、本発明のペプチドミモトープを組み込んだ競合検定では、ミモトープを固体支持体上、典型的にはニトロセルロースまたは他の疎水性多孔物質上に被覆することが想定される。それらはまた、合成プラスチック材料、マイクロタイターアッセイプレート、ラテックスビーズ、セルロースまたは合成ポリマー材料を含むフィルター、ガラスまたはプラスチックスライド、ディップスティック、毛細管充填装置等に被覆することもできる。

【0036】

これらの表面へのペプチドミモトープの被覆は、当該技術において既知であり、例えばEP-B-0291194号に述べられている手法によって実施できる。本発明の特別の利点は、それらが模倣する化合物と異なって、本発明のミモトープはペプチドであり、それ故ニトロセルロースのような一部のアッセイ表面に直接被覆することができるということである。エストラジオールは、これに対して、そのようなセルロース材料と非適合性であり、それ故しばしばもう1つ別の分子と複合体を形成することによって表面に結合する必要がある。典型的にはタンパク質がそのような複合体形成に使用され、しばしばBSAが最も好ましい。

20

【0037】

好ましい競合検定では、ひとたび支持体の表面に被覆されたペプチドミモトープは、抗体またはそのフラグメントまたは構築物に特異的に結合する。抗体は上述したとおりであり、エストラジオールに特異結合しうるはずである。ミモトープに結合した抗体を含む領域を超えて移動するエストラジオールを含む液体試料は、支持体の表面から一定量の抗体を置換するであろうと想定される。置換される抗体の量は、試料中のエストラジオールの濃度、及び抗体に対するミモトープとエストラジオールの相対的結合親和性を含めたいくつかの因子に依存するであろう。その後、試料中のエストラジオールの相対濃度を調べる手段として、置換された抗体の量を測定することができる。

30

【0038】

また、もう1つの好ましい実施形態では、抗体は表面に結合することができ、ペプチドミモトープは抗体に特異的に結合し、支持体と接触して（例えば支持体を通して）試料中を移動するエストラジオールによって置換されうると想定される。置換は、置換されたペプチドミモトープ量、従って試料中のエストラジオール量の測定可能なシグナルを生じる。

40

【0039】

本発明によって考慮される他の免疫検定試験装置は、例えば、液体試料が毛細管作用により適切な比率の毛細管注入口に沿って装置内へと引き込まれる、毛細管充填手段を使用するものを含む。本発明における使用に適應させうる毛細管充填装置は、例えばShanksら、米国特許第5,141,868号、Shanksら、EP-A-0422708号、及びBirchら、EP-B-0274215号に開示されている。

【0040】

Mayら、米国特許第5,622,871号及びMayら、米国特許第5,656,50

50

3号に開示されているもののような装置も、本発明の免疫検定法の実施に適する。使用する場合には、これらの装置は、好ましくは固形支持体が入った中空の細長いケースを含む。支持体は、ケースから突出しているかまたは突出していない、吸収性の液体試料受け入れ部分を通して間接的にケースの外側と連絡しており、支持体と試料受け入れ部分は、液体試料が毛細管作用によってこれら2つの間を移動することができるように連結されている。

【0041】

試料受け入れ部分から支持体に沿って空間的に離れた部分が試験区域、及び場合によっては、対照区域である。試験区域内で、ペプチドミモトープは支持体に固定された抗体に結合することができる。そのような固定は、例えばCNBr、カルボニルジイミダゾール、または塩化トレスルを用いた化学的カップリングを含めて、多くの既知の手段によって実施することができる。あるいは、様々な「プリンティング」手法が使用できる。これらは、マイクロシリンジ、直接プリンティング、インク・ジェットプリンティング等による液体抗体の適用を含む。抗体を適用する前の支持体の化学的または物理的処理も、固定を容易にしようので特に考慮される。

10

【0042】

そのような装置におけるケースは、典型的には、裸眼または電子手段のいずれかによって分析結果を観察することができる少なくとも1つの開口部を組み込んで、不透明または半透明材料で構築される。

【0043】

そのような装置は、臨床検査室または家庭での使用に適したキットとして提供することができ、そのようなキットは、湿気不透過性包装で個別に包装され、使用者への適切な指示書と共に梱包された1またはそれ以上の装置を含む。

20

【0044】

試料受け入れ部分は、速やかに液体を吸収することができる吸収性、多孔性または繊維性の材料で作製することができる。材料の多孔性は一方向性（すなわち孔または繊維が全面的にまたは主として該部分の軸に平行に走っている）または多方向性（全方向性、それ故該部分は無定形海綿様構造を持つ）でありうる。ポリプロピレン、ポリエチレン（好ましくは非常に高分子量の）、フッ化ポリビニリデン、エチレン酢酸ビニル、アクリロニトリル及びポリテトラフルオロ-エチレンのような多孔性プラスチック材料が使用できる。製造の際に界面活性剤で該部分を前処理すると、該部分の固有疎水性を低下させ、それ故湿潤試料を速やかに且つ効率的に取り込み、送達する能力を高めることができるので、これは有益であると考えられる。多孔性試料受け入れ部分はまた、紙またはニトロセルロースのような他のセルロース材料から作製することもできる。好ましくは試料受け入れ部分を構成する材料は、多孔性部分を約数秒以内に液体試料で飽和できるように選択すべきである。液体は、多孔性試料受け入れ部分から支持体内に自由に透過することができなければならない。

30

【0045】

そのような装置中の支持体は、好ましくは乾燥多孔性担体である。別個の細長い切れまたはシートで作製することができ、試料受け入れ部分と同様に、好ましくは毛細管作用によって、液体試料をその縦の長さ部分を通して移動させることができるいかなる材料からも構築できる。支持体は、その表面上に抗体及び/またはペプチドミモトープを固定することができなければならない、アッセイを適切に機能させるために必要な結合反応に干渉してはならない。

40

【0046】

支持体は、支持体の長さに沿って液体の上方への毛細管作用を促進し、過剰な試料の適用によって試験装置からあふれるのを回避する手段を提供する、吸収剤「シンク」が連結されていてよい。シンクのための特定材料及び適用は当該技術において慣用的なものであり、本発明の装置に容易に応用することができる。

【0047】

50

本発明の免疫検定試験装置では、試料中の検体の量の測定可能なシグナルを提供するために、ペプチドミモトープまたはそれが結合する抗体のいずれかが標識されていることが好ましい。本発明の好ましい実施形態では、標識は、その存在が容易に検出できる何らかの実体である。好ましくは標識は、Mayら、米国特許第5,656,503号に詳述されているもののような直接標識である。直接標識は、それらの自然の状態、裸眼でまたは光学フィルターを用いて及び/または刺激の適用、例えば蛍光を促進するUV光を用いて、容易に目に見える実体である。例としては、放射性、化学発光、レドックス標識のような電気活性、及び蛍光化合物が含まれる。染料ゾル、金属ゾル（例えば金）及び着色ラテックス粒子のような直接粒子標識も非常に適しており、蛍光化合物と共に好ましい。これらの選択肢のうちで、着色ラテックス粒子と蛍光化合物が最も好ましい。標識を小さな区域または容量に濃縮することにより、容易に検出可能なシグナル、例えば強く着色した領域を生じるはずである。

10

【0048】

例えばアルカリホスファターゼ及びホースラディッシュペルオキシダーゼなどの、酸素のような間接標識も使用できるが、これらは通常、可視シグナルが検出できる前に、基質のような1またはそれ以上の展開剤を加える必要がある。それ故、それらはあまり好ましくない。そのような添加剤は、液体試料を適用したときにそれらが溶解するかまたは分散するようにアッセイ装置の支持体に組み込むことができる。あるいは、試料を支持体に適用する前に展開剤を試料に加えることができる。

【0049】

ペプチドミモトープまたは抗体への標識の結合は、共有結合または非共有結合（疎水結合を含む）によって、あるいは吸着によって実施しうる。そのような結合のための手法は、当該技術において一般的であり、使用する個々の試薬に容易に適応させうる。標識が着色ラテックス粒子である、好ましい実施形態では、好ましくは標識を抗体に結合させ、これは吸着により実施される。標識が蛍光化合物である場合には、標識を抗体に結合するかまたは抗体の一部として構築することが好ましい。

20

【0050】

試験装置を使用するとき、標識は、既知で従来手段によって試験及び対照表面から検出できる試験及び/または対照シグナルを提供することができる。これは裸眼による評価、またはより典型的には、厳密な測定を所望するときには適切な計測器による評価を含む。計測器は、対照または試験シグナルを対照または試験表面における複合体の量によって測定するとき特に適する。

30

【0051】

本発明の免疫検定試験装置は実質的にいかなる種類の生物学的または非生物学的試料にも適用しうるが、尿または血清から誘導される液体の生物学的試料が好ましい。検定に先立って試料を精製または希釈してもよい。ここで使用するとき「免疫検定試験装置」の語はまた、別個の製品として販売または供給されうる、実用的試験装置を構成するために、他の部品の存在を必要とする免疫検定試験装置の部品を包含することが意図されている。特に、本発明の免疫検定試験装置は、一般に使い捨て製品として提供され、別個の部品として供給されうる、ディップスティック、試験スティック等でありうる。

40

【0052】

第二の態様では、本発明は、本発明の第一の態様に従ったペプチドミモトープをコードする単離核酸を提供する。核酸は、配列のライブラリーからまたは生物（例えばファージまたは細菌）からのクローニングによって、あるいは標準的な手法（例えば、多くの販売元から市販されている自動固相オリゴヌクレオチドシンセサイザー）を用いたインビトロ合成によって、あるいは簡便さでは劣るが、異なるソースからの成分核酸配列を一緒にライゲートするライゲーション反応の実施によって調製しうる。典型的には、単離核酸配列はDNA配列であり（しかし、想定上は、センスRNA配列でありうる）、最小限9個の塩基を含む。より典型的には、核酸（あるいはむしろ、ペプチドミモトープをコードするその部分）は、12から90個の塩基、望ましくは15から90個、好ましくは15から6

50

0個の塩基を含む。核酸は、好都合にはプロモーター、エンハンサー及びターミネーター配列、1またはそれ以上の複製起点等のような他の成分を含みうる。さらに、単離核酸は、ペプチドミモトープが(5'または3'末端のいずれかで)ポリペプチド標識のような他のポリペプチド部分に融合している融合タンパク質をコードしうる。前述したように実施形態では、ミモトープをコードする核酸の部分は一般に上記で規定した範囲内の塩基数を含むが、全体としての核酸はそれよりかなり大きくてもよい。核酸部分は、一部の実施形態では、外来アミノ酸残基を伴わずにペプチドミモトープだけから成るペプチドをコードしうる(例えばミモトープは、それが由来する天然に生じる分子内で隣接配列から孤立している)。

【0053】

単離核酸分子は、好都合なことにプラスミドまたは他の複製可能な成分の形態をとりうる。

10

【0054】

第三の態様では、本発明は、試験する試料においてエストラジオールの存在及び/または量を検定するための、上記で定義した本発明の第一の態様に従ったペプチドミモトープの使用を提供する。

【0055】

特定の例示的实施例を参照しながら本発明の実施を下記で詳細に述べるが、本発明がそれらに限定されると解釈されるべきではない。

【0056】

実施例

エストラジオールについてのペプチドミモトープの同定

エストラジオール代謝産物、エストロン-3-グルクロニドのペプチドミモトープの例を同定する方法を下記に述べる。

20

【0057】

モノクローナル抗体MAb 4155を4155モノクローナル細胞系から発現させた。Ganiら(J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 48、277-282(1994))で述べた方法に従って、4155モノクローナル細胞系を調製し、スクリーニングした。Ganiらの公表文献は、抗プロゲステロン抗体の開発に関するものであるが、同様の手法をエストロン及びその類似体と反応する抗体を作製する際に

30

【0058】

下記の実施例において使用する比較アミノ酸配列は次の通りである：

Glu-Asp (配列番号5)

Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu (配列番号71)

Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe (配列番号72)

Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu (配列番号73)

Ala-Ala-Glu-Arg-Gly (配列番号74)

Ala-Ala-Glu-Arg (配列番号75)

Ala-Ala-Glu (配列番号76)

Ala-Ala (配列番号77)

Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Ala-Glu-Asp (配列番号78)

Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Ala-Asp (配列番号79)

Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Ala (配列番号80)

40

【0059】

実施例1

50

ファージディスプレイによるペプチドミモトープ配列の同定

pVIIII9aa-cysノナペプチドファージライブラリー

Felici Fら、Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, *II. Selection of clones recognised by a protective monoclonal antibody against the Bordetella pertussis toxin from phage peptide libraries* (ファージディスプレイされたペプチドによる不連続エピトープの模倣、II. ファージペプチドライブラリーからの百日咳菌毒素に対する防護モノクローナル抗体によって認識されるクローンの選択). *Gene* 128, 21-27 (1993) 及び Luzzagoら、Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, *I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides* (ファージディスプレイされたペプチドによる不連続エピトープの模倣、I. 制約された (constrained) ペプチドのファージライブラリーを用いたヒトHフェリチンのエピトープマッピング). *Gene* 128, 51-57 (1993) が述べた、pVIIII9aa-cysライブラリーファージライブラリーを使用した。ライブラリーは、数百のペプチドが各々のファージ粒子上にディスプレイされるように、主要コートタンパク質 pVIIII に融合したランダムなノナペプチドから成った。

【0060】

ファージライブラリーのスクリーニング

Folgori A.ら、A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera (ランダムペプチドライブラリーとヒト血清だけを使用して病理学的抗原のミモトープを同定するための一般的戦略). *EMBO J* 13, 2236-2243 (1994) 及び Parmley S.F.ら、Antibody-selectable fd phage vectors: affinity purification of target genes (抗体選択性 fd ファージベクター: 標的遺伝子のアフィニティー精製). *Gene* 73, 305-318 (1988) の方法を組合せてファージのアフィニティー選択を実施した。

【0061】

パニングのために使用するポリスチレンチューブ (Nunc からの Immuno tube (商標) を、被覆緩衝液 (0.1 M NaHCO₃、pH 9.0) 2 ml 中のアフィニティー精製した抗エストロン-3-グルクロニド抗体 (20 µg) または被覆緩衝液単独のいずれかにより 4 晩で一晩被覆した。トリス緩衝食塩水 (TBS; 50 mM トリス-HCl、140 mM NaCl、pH 7.4) で 3 回洗ったあと、両方のチューブをブロック緩衝液 (10 mg/ml のオボアルブミンを含む TBS) 4 ml と共に室温で 4 時間インキュベートした。VIIII9aa-cys ライブラリーは、対数的 XL1-B1 ue 細菌 (Stratagene, Amsterdam, Holland) の感染により 1×10^{13} 形質導入単位/ml (TU/ml) の力価を持つことを示した。供与ファージ懸濁液からのアリコート (1 µl; 1×10^{11} TU) を、各々 1 ml の TBS と 1 mg/ml のオボアルブミンを含む抗体被覆及び非被覆ポリスチレンチューブに加えて、4 晩で一晩インキュベートした。室温で、0.5% (v/v) Tween 20 (商標) (TTBS) を含む TBS で 15 回洗い (各々 4 ml)、次に TBS で 5 回洗って非結合ファージを除去した。洗浄したパニングチューブを室温で 12 分間、溶出緩衝液 (1 mg/ml のオボアルブミンを含む 0.1 M HCl、pH 2.2、グリシンで調整) 1 ml と共にインキュベートすることにより、結合ファージを溶出した。溶出したファージを 1 ml ポリスチレンチューブに移し、2 M トリス (pH 調整していない) 60 µl で中和した

。1 M トリス - HCl、pH 7.4 のアリコート (200 μ l) を、中和のためにパニングチューブに加えた。溶出した中和ファージ粒子 (1 ml) を対数的 XL1 - Blue 細菌 9 ml (1% (w/v) を含む 2 TY 中) の感染のために使用した。対数的 XL1 - Blue 細菌 (4 ml) も中和パニングチューブに直接加えた。感染は、振とうせずに 37 で 30 分間実施した。感染細菌をプールし (総容量 13 ml)、アンピシリンを加えて (100 μ g/ml)、培養物を振とうしながら 37 で一晩インキュベートした。感染細菌細胞の少量のアリコート (10 μ l) を取り出した後、1% (w/v) グルコースとアンピシリン (100 μ g/ml) を含む 2 TY 寒天上で、力価測定 (2 TY / アンピシリン / グルコース中 10^{-2} から 10^{-6} に希釈) のために一晩インキュベートした。MAb 4155 抗体で被覆したパニングチューブから溶出したファージで感染させた、一晩培養した XL1 - Blue のアリコート (150 μ l) を、1% (w/v) グルコースと 100 μ g/ml アンピシリンを含む 2 TY 15 ml に加えて対数期まで増殖させた。次に細胞を M13K07 ヘルパーファージ (Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Scotland) (1×10^{11} ファージ/ml) で重感染させ、振とうせずに 37 で 30 分間インキュベートした。この後 1800 rpm で 20 分間遠心分離し、100 μ g/ml アンピシリンと 25 μ g/ml カナマイシンを含む 2 TY 200 ml 中に細胞ペレットを再懸濁した。次に細菌培養物を振とうしながら 37 で一晩インキュベートした。その後細菌細胞を遠心分離 (5000 rpm; 15 分間) によってペレット化し、PEG/NaCl (20% (w/v) ポリエチレングリコール 8000 を含む 2.5 M NaCl) 40 ml を加えて氷上で 1 時間インキュベートして、上清中のファージ粒子を沈殿させた。次にファージ懸濁液を 4、10、000 rpm で 20 分間遠心して、生じたペレットを TBS 20 ml に再懸濁した。PEG/NaCl 4 ml を加え、氷上でさらに 20 分間インキュベートして、さらなる PEG 沈殿を実施した。最終的なファージペレットを TBS 2 ml に溶解して、約 1×10^{13} TU/ml のファージ力価を得た。これらのファージ粒子を新鮮パニングチューブに直接加え、パニング手順全体をさらに 2 回繰り返した。1 回目のスクリーニング後、スクリーニングプロトコル全体 (3 ラウンドのパニング) を繰り返した。

【0062】

ファージ ELISA

3 ラウンドのパニングからの産物を 2 TY 寒天、アンピシリン (100 μ g/ml) 及び 1% (w/v) グルコースに塗布し、37 で一晩インキュベートした。ランダムな個々の細菌コロニー (~200) を採取し、各々 2 TY 200 μ l、1% (w/v) グルコース及びアンピシリン (100 μ g/ml) を含む 96 穴マイクロタイタープレート (Sterilin (商標)) のウエルに加えた。マイクロタイタープレートを振とうしながら 37 で一晩インキュベートした。翌日各々のウエルからのアリコート (20 μ l) を、各々 2 TY 200 μ l、1% グルコース及び 100 μ g/ml アンピシリンを含む新しいマイクロタイタープレートのウエルに加え、振とうしながら 37 で 1 時間インキュベートした。次の段階では、アンピシリン (100 μ g/ml)、1% (w/v) グルコース及び 10^9 M13K07 ヘルパーファージを含む 2 TY 25 μ l を各ウエルに加えた。プレートを振とうせずに 37 で 30 分間インキュベートし、次に振とうしながら 37 で 1 時間さらにインキュベートした。その後プレートを室温で 20 分間、1800 rpm で遠心し、上清を吸引して除去し、アンピシリン (100 μ g/ml) 及びカナマイシン (20 μ g/ml) を含む 2 TY 200 μ l に細胞ペレットを再懸濁した。振とうしながら 37 で一晩インキュベーションを実施した。マイクロタイタープレートのウエルにおいて一晩培養したものの遠心分離を行い (1500 rpm; 20 分間)、ファージ含有上清 (100 μ l) をヒツジ抗 M13 バクテリオファージ (C.P. Laboratories, Bishops Stortford, UK) 被覆したマイクロタイタープレート (Greiner (商標)、high bind) に加えた。結合緩衝液 (0.1 M NaHCO₃、pH 9.0) 中 4 で一晩インキュベートして、精製ヒツジ抗 M13 抗体被覆プレートを調製した (100 μ l / ウエル; 10 μ g/ml)。10 mg/ml オ

ボアルブミン (200 µl / ウエル) を含む P B S T により室温で1時間ブロッキングした。P B S T で5回洗ってヒツジ抗 M 1 3 抗体被覆プレートから非結合ファージを除去した後、10 mg / ml オボアルブミン (100 µl / ウエル) を含む P B S T 2 ml 中にアフィニティー精製した抗エストロン - 3 - グルクロニド抗体 (20 µg) を加えた。室温で2時間インキュベーションを実施した。次にアルカリホスファターゼ複合ウサギ抗マウス免疫グロブリン (100 µl / ウエル) を 1 / 1000 の希釈 (P B S T、10 mg / ml オボアルブミン中) で加え、室温でさらに2時間インキュベートした。1 M ジエタノールアミン、1 mM MgCl₂、pH 9.6 中 100 µl / ウエルの p - ニトロフェニルホスフェート (1 mg / ml) でアッセイを展開し、プレートを 410 nm で読み取った。

10

【0063】

DNA 塩基配列決定

製造者の指示に従って Q i a g e n (商標) プラスミド精製キットを使用して、陽性ファージクローンで感染させた細菌培養 (50 ml) から二本鎖ファージミド DNA を精製した。オリゴヌクレオチドプライマー、配列番号 1 :

5' - T T T C C C A G T C A C G A C G T T G - 3'

(配列番号 1)

を用いて A p p l i e d B i o s y s t e m s 自動シーケンサー (373 A 型、バージョン 1.2.0) で配列決定を行った。

【0064】

ファージ E L I S A と DNA 塩基配列決定の結果から、次の3つのペプチドミモトープ配列を同定した :

A l a - A l a - G l u - A r g - G l y - L e u - P h e - G l u - A s p

(配列番号 2)

T h r - A l a - T r p - T h r - T y r - V a l - L e u - G l y - P h e

(配列番号 3)

T h r - S e r - T r p - A l a - T y r - V a l - L e u - G l y - P r o

(配列番号 4)

20

【0065】

リプレースメント ネット (R e p l a c e m e n t N e t) 分析によるミモトープコ

30

ア結合領域の同定

ピン上での固相ペプチド合成

M u l t i p i n P e p t i d e S y n t h e s i s K i t (C h i r o n M i m o t o p e s , V i c t o r i a , A u s t r a l i a) を用いて、ポリエチレンピン頭部での固相ペプチド合成によって C 末端からペプチドを二組または三組合成した (G e y s e n ら、S t r a t e g i e s f o r e p i t o p e a n a l y s i s u s i n g p e p t i d e s y n t h e s i s (ペプチド合成を用いたエピトープ分析のための戦略)、J . I m m u n o l . M e t h o d s 102、259 - 274 (1987))。96穴マイクロタイタープレートの方式でピンをプラスチックホルダーに配置した。

40

【0066】

ピン上でのペプチドに関する E L I S A 試験

96穴マイクロタイタープレート (B e c t o n D i c k i n s o n , C A , U S A) に、分配したピン試薬を低下させることにより、すべてのインキュベーション段階を室温 (18 から 25) で実施した。ピンのセットを T w e e n 20 (商標) (0.01% v / v) を含むリン酸緩衝食塩水 (P B S) の槽に入れ、攪拌しながら5分間ずつ4回のサイクルで洗浄を行った。カゼイン (1% w / v、175 µl / ウエル) を含む P B S 中で1時間インキュベートすることによってピンの表面の非特異的結合部位をブロックした。M A b 4155 をブロッキング緩衝液中で希釈し、ピンを抗体溶液 (150 µl / ウエル) 中、4 で18時間インキュベートした。洗浄後、ホースラディッシュペルオキシダ

50

ーゼ (HRP) 複合ウサギ抗マウス免疫グロブリン (Dako, High Wycombe, UK、ブロッキング緩衝液中 1/1000、150 μ l/ウエルで1時間) においてインキュベートした。ピンをさらにもう1回洗い、その後 ABTS [2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)] 作用基質中で15分間インキュベートした (150 μ l/ウエル)。ABTSは、33%過酸化水素 (1 μ l/ml) を含む 0.1 Mクエン酸リン酸緩衝液 (pH 4.5) 中で、0.033% (w/v) 溶液として調製した。ウエルからピンを取り出して呈色反応を停止させ、Milenia Kinetic Analyser (商標) (DPC, Llanberis, Wales) を用いて 405 nm で分光光度的に測定した。

【0067】

10

コア結合領域の同定

コア結合領域を同定するために、配列番号2に基づいてピンの頭部でペプチドの1セットを合成した。これらは長さが連続的に1アミノ酸ずつ減少するペプチドを含み、最初はN末端から始まり、もう1つのシリーズではC末端から始まる。さらに、結合事象への各々の残基の寄与を評価するため、リード配列の各々の残基がAla (Alaが既にその位置に存在する場合はGly) によって置換されたペプチドのセットを合成した。MAb 4155をこれらのペプチドとの反応性に関して試験し、その結果を下記の表1に示す。

【0068】

【表1】

表 1

ミモトープ	配列番号	タイプ	相対結合*
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	2	発明	2.0
Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	11	発明	1.5
Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	10	発明	1.8
Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	9	発明	1.6
Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	8	発明	2.2
Leu-Phe-Glu-Asp	7	発明	1.9
Phe-Glu-Asp	6	発明	2.0
Glu-Asp	5	比較	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu	71	比較	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe	72	比較	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu	73	比較	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly	74	比較	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg	75	比較	0.8
Ala-Ala-Glu	76	比較	0.9
Ala-Ala	77	比較	1.0
Gly-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	12	発明	1.9
Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	13	発明	2.0
Ala-Ala-Ala-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	14	発明	1.5
Ala-Ala-Glu-Ala-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	15	発明	2.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Ala-Leu-Phe-Glu-Asp	16	発明	1.5
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Ala-Phe-Glu-Asp	17	発明	1.6
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Ala-Glu-Asp	78	比較	0.8
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Ala-Asp	79	比較	1.8
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Ala	80	比較	1.1

* 上述したようなELISAによって測定したときのペプチドへの
MAb 4155の相対結合

【 0 0 6 9 】

データが示すように、試験されたペプチドのうち配列番号6によって示されるコア結合領域を含むアミノ酸配列だけが適切な結合を提供した。配列番号7から17で表わされるアミノ酸配列は配列番号6のコア結合領域を含み、エストラジオールミモトープとして役立つ適切な結合を提供した。

P h e - G l u - A s p

(配列番号 6)

L e u - P h e - G l u - A s p

(配列番号 7)

G l y - L e u - P h e - G l u - A s p

(配列番号 8)

A r g - G l y - L e u - P h e - G l u - A s p

(配列番号 9)

G l u - A r g - G l y - L e u - P h e - G l u - A s p

(配列番号 1 0)

10

20

30

40

Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp
(配列番号11)
Gly-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp
(配列番号12)
Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp
(配列番号13)
Ala-Ala-Ala-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp
(配列番号14)
Ala-Ala-Glu-Ala-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp
(配列番号15)
Ala-Ala-Glu-Arg-Ala-Leu-Phe-Glu-Asp
(配列番号16)
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Ala-Phe-Glu-Asp
(配列番号17)

10

【0070】

アミノ酸配列、配列番号8を使用し、さらなるコア結合配列を同定した。また、Verhoyenら、Construction of reshaped HMFG1 antibody and comparison of its fine specificity with that of the parent mouse antibody (再成形HMFG1抗体の構築及び親マウス抗体とのその高い特異性の比較). Immunology, 78, 364-370 (1993) に例示されるような既知の手法を用いて、他の19個の天然に生じるアミノ酸による各残基の体系的置換の影響を検討した。

20

【0071】

配列番号8と比較して卓越した結合反応性と特異性を持つ配列を次のように同定した。配列番号8を相対結合100と設定して、ELISAによって決定したこれらの配列へのMAb 4155の結合を下記の表2に示す。

Gly - Phe - Phe - Glu - Asp	(配列番号18)
Gly - Trp - Phe - Glu - Asp	(配列番号19)
Gly - Tyr - Phe - Glu - Asp	(配列番号20)
Gly - Leu - Trp - Glu - Asp	(配列番号21)
Gly - Leu - Phe - Cys - Asp	(配列番号22)
Gly - Leu - Phe - Asp - Asp	(配列番号23)
Gly - Leu - Phe - Phe - Asp	(配列番号24)
Gly - Leu - Phe - Ile - Asp	(配列番号25)
Gly - Leu - Phe - Leu - Asp	(配列番号26)
Gly - Leu - Phe - Trp - Asp	(配列番号27)
Gly - Leu - Phe - Tyr - Asp	(配列番号28)
Gly - Leu - Phe - Glu - Cys	(配列番号29)
Gly - Leu - Phe - Glu - Phe	(配列番号30)
Gly - Leu - Phe - Glu - Ile	(配列番号31)
Gly - Leu - Phe - Glu - Leu	(配列番号32)
Gly - Leu - Phe - Glu - Val	(配列番号33)
Gly - Leu - Phe - Glu - Trp	(配列番号34)
Gly - Leu - Phe - Glu - Tyr	(配列番号35)

30

40

【0072】

【表2】

表 2

ミモトープ	配列番号	相対結合 *
Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	8	100
Gly-Phe-Phe-Glu-Asp	18	200
Gly-Trp-Phe-Glu-Asp	19	343
Gly-Tyr-Phe-Glu-Asp	20	220
Gly-Leu-Trp-Glu-Asp	21	207
Gly-Leu-Phe-Cys-Asp	22	335
Gly-Leu-Phe-Asp-Asp	23	121
Gly-Leu-Phe-Phe-Asp	24	184
Gly-Leu-Phe-Ile-Asp	25	169
Gly-Leu-Phe-Leu-Asp	26	138
Gly-Leu-Phe-Trp-Asp	27	578
Gly-Leu-Phe-Tyr-Asp	28	252
Gly-Leu-Phe-Glu-Cys	29	296
Gly-Leu-Phe-Glu-Phe	30	204
Gly-Leu-Phe-Glu-Ile	31	174
Gly-Leu-Phe-Glu-Leu	32	168
Gly-Leu-Phe-Glu-Val	33	177
Gly-Leu-Phe-Glu-Trp	34	594
Gly-Leu-Phe-Glu-Tyr	35	386

* 上述したような E L I S A によって測定したときのペプチドへの
M A b 4 1 5 5 の相対結合

10

20

30

40

50

【 0 0 7 3 】

コア結合領域の逆配列の D - 異性体

上記の配列番号 1 から 3 5 は L - 異性体である。上記で同定したコア結合領域の、逆配列の D - 異性体が有効なミモトープとして同様に機能することも明らかにされた。例えば、配列番号 3 7 で表わされるようなアミノ酸配列を上述したペプチド合成法によって調製した。上述した試験法により、親配列（配列番号 2 8 ）と比較した結合親和性を測定した。結果は、逆配列が親配列と比較して同等の相対結合親和性を持つことを示す。

【 0 0 7 4 】

したがって下記は、エストラジオールについてのミモトープとして機能することができるペプチドのコア結合配列を同定している。各々の配列は、上述したもののうち、1つの逆配列アミノ酸である D - 異性体を含む。

【 0 0 7 5 】

注：配列番号 3 6 から 5 6 は D - 異性体である

A s p - G l u - P h e	(配列番号 3 6)
A s p - T y r - P h e - L e u - G l y	(配列番号 3 7)
A s p - G l u - P h e - P h e - G l y	(配列番号 3 8)
A s p - G l u - P h e - T r p - G l y	(配列番号 3 9)
A s p - G l u - P h e - T y r - G l y	(配列番号 4 0)
A s p - G l u - T r p - L e u - G l y	(配列番号 4 1)
A s p - C y s - P h e - L e u - G l y	(配列番号 4 2)
A s p - A s p - P h e - L e u - G l y	(配列番号 4 3)

Asp - Phe - Phe - Leu - Gly (配列番号 44)
 Asp - Ile - Phe - Leu - Gly (配列番号 45)
 Asp - Leu - Phe - Leu - Gly (配列番号 46)
 Asp - Trp - Phe - Leu - Gly (配列番号 47)
 Cys - Glu - Phe - Leu - Gly (配列番号 48)
 Phe - Glu - Phe - Leu - Gly (配列番号 49)
 Ile - Glu - Phe - Leu - Gly (配列番号 50)
 Leu - Glu - Phe - Leu - Gly (配列番号 51)
 Val - Glu - Phe - Leu - Gly (配列番号 52)
 Trp - Glu - Phe - Leu - Gly (配列番号 53)
 Tyr - Glu - Phe - Leu - Gly (配列番号 54)

10

Phe-Gly-Leu-Val-Tyr-Thr-Trp-Ala-Thr
 (配列番号 55)

Pro-Gly-Leu-Val-Tyr-Ala-Trp-Ser-Thr
 (配列番号 56)

【0076】

実施例 2

ペプスキャン (PepsScan) ライブラリーからのペプチドミモトープ配列の同定
 実施例 1 で述べたような Multipin Peptide Synthesis Kit からのピンを使用して、20 個の天然に生じるアミノ酸のすべての可能なトリマーの組
 合せを含み、ドデカペプチドのさらなるランダムなセットを追加したペプチド配列のライ
 ブラリーを構築した (Slootstra JWら、Screening of a small set of random peptides: a new strategy to identify synthetic peptides that mimic epitopes (ランダムなペプチドの小セットのスクリーニング: エピト
 ープを模倣する合成ペプチドを同定するための新しい戦略)、J Molec. Recog. 10、217-224 (1997))。Mab4155 の結合を、実施例 1 で述べた
 ように結合親和性に関してライブラリーを試験した。これは、エストラジオールミモト
 ープに関するコア結合領域として次のアミノ酸配列 (L-異性体) を同定した。

20

Asp - Phe - Tyr (配列番号 57)

30

Phe - Tyr - Glu (配列番号 58)

Tyr - Glu - Glu (配列番号 59)

Tyr - Gln - Glu (配列番号 60)

Asn - Glu - Glu - Asp - Phe - Tyr - Gln - Ile - Gln - Leu - Tyr - Glu (配列番号 61)

Arg - Gln - Ile - Asp - Phe - Tyr - Gln - Glu - Ile - Gln - Phe - Lys (配列番号 62)

Asp - Asp - Phe - Tyr - Gly - Gln - Pro - Arg - Glu - Gln - Val - Arg (配列番号 63)

実施例 1 と同様に、D-アミノ酸の下記の逆配列はエストラジオールに関するペプチドミ
 モトープのコア結合領域として機能することができると同定される。

40

【0077】

注: 配列番号 64 から 70 は D-異性体である

Tyr - Phe - Asp (配列番号 64)

Glu - Tyr - Phe (配列番号 65)

Glu - Glu - Tyr (配列番号 66)

Glu - Gln - Tyr (配列番号 67)

Glu - Tyr - Leu - Gln - Ile - Gln - Tyr - Phe - Asp - Glu - Glu - Asn (配列番号 68)

Lys - Phe - Gln - Ile - Glu - Gln - Tyr - Phe - Asp - Ile -

50

Gln - Arg (配列番号69)

Arg - Val - Gln - Glu - Arg - Pro - Gln - Gly - Tyr - Phe -
Asp - Asp (配列番号70)

【0078】

実施例3

固相上でのエストロン - 3 - グルクロニド (E3G) または E3G のペプチドミモトープ
を使用した E3G に関する競合アッセイの比較

ペプチドリガンド合成

Applied Biosystems 431A Peptide Synthesiser Biopolymer Synthesis and Analysis Unit, TM QMC (Nottingham, UK) で合成ペプチドリガンドを調製した。質量分析法と HPLC によって純度を評価し、純度は 95% 以上であった。 10

【0079】

オボアルブミン - E3G 複合体の調製

EDC (1 - エチル (ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド、0.1 M) と NHS (N - ヒドロキシスクシンアミド、0.02 M) の新鮮調製溶液 2 ml 中に E3G 2.6 mg を再懸濁し、室温で 15 分間インキュベートして、エストロン - 3 - グルクロニド (E3G) オボアルブミン複合体を調製した。E3G 溶液にオボアルブミン (10 mg/ml) 2 ml を加え、これを絶えず混合しながら室温で 2 時間半インキュベートした。次に複合体を、0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝食塩水 1 L に対して 16 時間透析した。 20

【0080】

BSA - ミモトープ複合体の調製

ウシ血清アルブミン (BSA、10 mg、Sigma) を清潔なガラスバイアルにおいてピペットチップからの吸引と排出によって混合しながら複合緩衝液 (炭酸水素ナトリウム緩衝液、0.1 M、pH 8.4) 3 ml に溶解した。混合物を 1 時間ローラーにかけた。配列番号 36 によって表わされるようなペプチドミモトープを複合緩衝液に溶解した。ペプチド溶液 (1.0 ml、@ 10 mg/ml) 及びグルタルアルデヒド 10 µl (高市販グレード、Sigma) を BSA 溶液に加えた。次に密封したバイアルを室温で 4 時間、ローラーで攪拌した。その後コンジュゲート溶液を 4 で 48 時間、塩化ナトリウム (0.9% w/v) に対して透析した。 30

【0081】

アッセイ:

ペプチド - ミモトープ - BSA 複合体 (10 µg/ml) と E3G - オボアルブミン複合体 (3 µg/ml) を、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中の溶液 50 µl から室温で一晩別々にマイクロタイタープレート (Becton Dickinson, CA, USA) のウエルで乾燥した。ウエルを洗い (4 x PBS + 0.01% Tween 20 (商標))、PBS 100 µl 中 0.1% カゼインで 1 時間ブロックして、使用前に 4 回洗った。PBS (0 - 3 µM) 中の E3G 25 µl アリコートを加え、15 分間インキュベートした後、PBS 中 0.6 µg/ml で MA b 4155 抗 E3G 抗体 25 µl を加えた。ウエルを攪拌しながら室温で 1 時間インキュベートした。4 回洗った後、PBS 中 1:1000 希釈のウサギ抗マウス IgG - HRP 複合体 50 µl (Dako, High Wycombe, UK) を各ウエルに加え、室温で 1 時間インキュベートした。4 回洗った後、ABTS [2, 2' - アジノ - ビス (3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸)] 作用基質中で 15 分間インキュベートした (150 µl / ウエル)。ABTS は、33% 過酸化水素 (1 µl/ml) を含む 0.1 M クエン酸リン酸緩衝液 (pH 4.5) 中 0.033% (w/v) 溶液として調製した。0.5 M 硫酸を加えて (10 µl / ウエル) 呈色を停止させ、Milenia Kinetic Analyser (商標) (DPC, Llanberies, Wales) を用いて 405 nm で分光光度的に測定した。 40

【0082】

図 1 は生じた検定曲線を示す。どちらも、マイクロモルからナノモルの範囲内に中間点を持つ競合免疫検定法に典型的なものである。さらに、ミモトープ含有 B S A - 配列番号 3 7 を用いたアッセイの感受性は、エピトープ含有 E 3 G - オボアルブミンを使用するときを得られるものよりも有意に高い。

【 0 0 8 3 】

本発明を、その好ましい実施形態を個々に参照しながら詳述したが、本発明の精神と範囲により変法及び改良を実施しうることが明白であろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】

図 1 は生じた検定曲線を示す。ミモトープ含有 B S A - 配列番号 3 7 を用いたアッセイの感受性は、エピトープ含有 E 3 G - オボアルブミンを使用するときを得られるものよりも有意に高い。

10

【 図 1 】

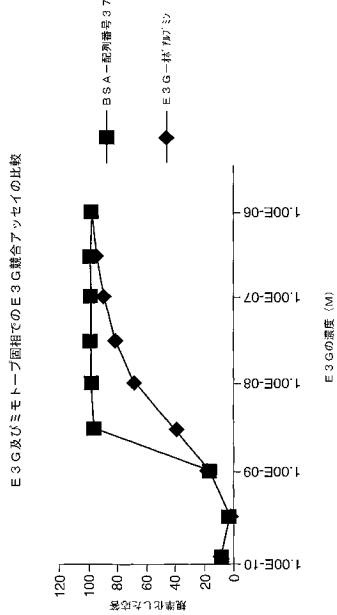


Fig. 1.

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/12270 A1(51) International Patent Classification: C07K 5/08, 5/10,
7/06, 1/04, C12N 15/12, A61K 31/365, G01N 33/53John, Unilever Research Colworth, Colworth House,
Sharnbrook, Bedford, Bedfordshire MK44 1LQ (GB).
WILLIAMS, Samantha, Catherine, 13 Hampton Green,
Balbriggan, County Dublin (IE).

(21) International Application Number: PCT/EP01/08705

(22) International Filing Date: 26 July 2001 (26.07.2001)

(74) Agent: BOERMA, Caroline, Unilever Plc. Patent Depart-
ment, Colworth House, Sharnbrook, Bedford, Bedford-
shire MK44 1LQ (GB).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00506613.1 3 August 2000 (03.08.2000) EP(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(71) Applicant (for AE, AG, AU, BB, BZ, CA, CY, GB, GD, GH,
GM, IE, IL, KE, LC, LK, LS, MN, MW, NZ, SD, SG, SL, SZ,
TT, TZ, UG, ZA, ZW only): UNILEVER PLC (GB/GB);
Unilever House, Blackfriars, London EC4P 4BQ (GB).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).(71) Applicant (for all designated States except AE, AG, AU,
BZ, CA, CY, GB, GD, GH, GM, IE, IL, IN, KE, LC, LK,
LS, MN, MW, NZ, SD, SG, SL, SZ, TT, TZ, UG, ZA, ZW):
UNILEVER NV [NL/NL], Weena 455, NL-3013 AL Rot-
terdam (NL).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(71) Applicant (for IN only): HINDUSTAN LEVER LIM-
ITED [IN/IN], Hindustan Lever House, 165/166 Backbay
Reclamation, Maharashtra, 400 020 Mumbai (IN).(72) Inventors: BADLEY, Robert, Andrew, Unilever
Research Colworth, Colworth House, Sharnbrook, Bed-
ford, Bedfordshire MK44 1LQ (GB). BERRY, Mark,For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/12270 A1

(54) Title: PEPTIDES CAPABLE OF FUNCTIONING AS MIMOTOPES FOR ESTRADIOL ANALYTES

(57) Abstract: A purified peptide mimotope which is capable of binding specifically to an antibody specific to estradiol. Also disclosed is an immunoassay test device for the detection in a sample of estradiol, the immunoassay test device comprising a peptide mimotope of estradiol, and an antibody capable of binding specifically to the peptide mimotope to generate a detectable signal.

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

PEPTIDES CAPABLE OF FUNCTIONING AS MIMOTOPES FOR ESTRADIOL ANALYTES

Field of the Invention

This invention relates to the discovery that certain peptide molecules have similar reactive properties as certain steroidal compounds, notwithstanding the significant structural dissimilarities between such compounds, and are thus capable of functioning as mimotopes of the steroidal compounds in, for example, displacement immunoassays designed for the detection of steroids.

Background of the Invention

As a matter of general definition, an epitope is that region of a particular antigen which contains the critical binding region of the antigen necessary for triggering an immunity-related antibody binding response. Epitopes are also often referred to in the alternative as antigenic determinants.

Understanding the structures of epitopes as well as their specific binding reactions to particular antibodies is of significant interest to many, as such an understanding could lay the foundation for advancements in the pharmaceutical, diagnostic and health industries. To facilitate this understanding, in recent years academic institutions and industry have constructed what are termed epitope libraries.

Epitope libraries are large collections of variable amino acid sequences that are displayed, for example, on the surfaces of bacteriophage. Each sequence corresponds to a particular epitope of a particular antigen. Often, the epitope libraries will consist of many millions of these short amino acid sequences, sometimes even as many as one hundred million sequences or more. Representative epitope libraries are described in detail in Luzzago A., et al. *Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides*. Gene 128, 51-57 (1993).

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

2

Once an epitope library is constructed, antibodies or other binding proteins can be utilised to select specifically for a particular epitope. The epitope can then be sequenced, either directly or by first identifying the corresponding DNA sequence and then by transcribing and translating that DNA sequence into the corresponding amino acid sequence. By such techniques, the binding regions of antigenic compounds and molecules can be determined; and it can be readily envisioned that once the binding regions of particular antigens are known, powerful biotechnology applications -- such as the design of vaccines using particular epitopes -- can be achieved.

Despite the apparent power of epitope library screening techniques, they have heretofore been used primarily only to identify and sequence the specific binding regions of particular antigens. This in and of itself serves to limit the type and scope of biotechnology applications that can be based on this technology.

In Scott, *Discovering Peptide Ligands Using Epitope Libraries*, Trends in Biochemical Science 17, pp. 241-245 (July 1992), an extension of conventional epitope library techniques is disclosed. Specifically, Scott asserts that epitope libraries can be used to identify and map peptide mimotopes for known antigens. A mimotope is a molecular sequence which "mimics" the epitopic region of a particular antigen, but which does not contain the specific amino acid sequence which comprises the epitope. Thus, a mimotope is structurally distinct from an epitope, though functionally it is very similar as it is capable of binding in a similar fashion to the binding cleft of the antibody directed to the antigen containing the particular epitope.

Though mimotopes technically can be any molecules or sequence of molecules which mimic an epitope, they are most often small, low molecular weight peptides which comprise short sequences of amino acids. Because they are most typically small peptides, they have been thought to be constrained in what they can mimic. Specifically, it has been a generally held belief that peptide mimotopes could be identified for numerous protein based antigens (i.e. those antigens with peptide epitopes), but that because of the complex structure of antibody binding clefts, and the correspondingly complex nature of the

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

3

antibody binding response, all of which it was believed would require a close similarity in structure between the mimotope and epitope in order for mimotope-antibody binding to occur, the identification of peptide mimotopes for non-protein based antigens would be difficult to achieve. In general this belief has been proved correct, although there are a few isolated exceptions.

For example, in *Random peptide libraries: A source of specific binding molecules*: Devlin JJ: Science 249, 404-406 (1990), peptide mimotopes have been identified for biotin, an essential vitamin necessary for certain enzymatic carboxylation reactions in living cells. Though biotin is not peptidal in structure, it is nevertheless similar in size and structure to several amino acids (for example, histidine). Thus, it was not unexpected that a peptide mimotope for such a molecule could be identified.

Similarly, in *Peptide ligands for a sugar binding protein isolated from a random peptide library*: Oldenburg, KR et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 5393-5397 (1992), peptide mimotopes for the mannopyranoside ligand of concanavalin A have been identified. Again though, such mimotopes are of similar size and have a similar structural configuration to the epitopes which they mimic and thus their identification was less than surprising. Mimotopes of certain forms of DNA have also been identified, as described in Sibille et al., *Mimotopes of polyreactive anti-DNA antibodies identified using phage displayed peptide libraries*: Eur J Immunol., 27, 1221-1228 (1997)

Notwithstanding these few limited discoveries, the identification of peptide mimotopes from epitope libraries (or other means) for complex non-protein molecules such as steroidal compounds has not occurred. Furthermore, due to the clear structural differences between such peptide mimotopes and complex non-protein molecules such as steroids, the mere existence of these mimotopes has heretofore been questioned.

WO 96/16322 discloses an affinity-based process for recovering specific binding agents with high affinity for a particular target ligand, which involves the use of first and second analogues of the target ligand. Page 4 of the document mentions that one of the analogues

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

4

used in the process may be an epitope mimic, "i.e. a small molecule, generally of synthetic origin, such as a short peptide, which behaves in a manner comparable to the binding site (epitope) of the target ligand".

Although the document includes examples of the process in which the target ligand is a steroid (specifically, estrone-3-glucuronide, "E3G") none of these examples involve the use of a peptide mimotope of a steroid, and there is no disclosure of a specific example of, nor any experimental evidence relating to, a peptide mimotope of a steroid. Indeed at page 4, immediately following the passage quoted above, WO 96/16322 states "Especially when the target ligand is E3G, said first analogue can be estrone. Preferably said second analogue is estriol glucuronide. Alternatively, estradiol-3-glucuronide can be used as the second analogue; in this case, estriol-3-glucuronide may optionally be used as the first analogue".

Thus, whilst WO 96/16322 refers to the use of peptide epitope mimics of target ligands, and also refers to steroid target ligands, there is no explicit disclosure or suggestion of a peptide mimic for a steroid target ligand. Indeed the only mention of particular analogues for steroid target ligands are other, closely-related, steroids. Accordingly, the person skilled in the art would not deduce from the content of WO 96/16322 that peptide mimics for steroid analogues actually existed or could be made, and would not have any reasonable expectation of success in this regard as there is no evidence to suggest that such existed.

A brief reference, along similar lines to that discussed above, appears in WO 99/27356 (page 10) but again without specific examples or any experimental evidence.

Saviranta *et al.*, (1998 *Bioconjugate Chem.* 9, 725-735) disclose an assay for estradiol using Fab fragments specific for estradiol. There is no mention or suggestion of a peptide mimotope of estradiol which binds to the Fab fragments.

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

5

Slootstra *et al.*, (1997 *Journal of Molecular Recognition* **10**, 217-224) describe a screening method to identify synthetic peptides that mimic epitopes, but those authors only ever refer to mimics of protein or peptide antigens, and there is no recognition or suggestion that peptide mimotopes might be available in respect of steroid compounds.

Lastly, US 5,635,182 (McCoy & Lu) relates to subject matter very different to the present invention and is generally concerned with DNA sequences encoding thioredoxin-like polypeptides. There is a brief disclosure (Seq. ID No. 2 therein) of a 20mer peptide which includes the tripeptide sequence Phe-Glu-Asp.

Summary of the Invention

This invention is based on the unexpected discovery that despite significant structural differences, peptide mimotopes for certain steroidal compounds do in fact exist and can be advantageously used, for example, in competitive or displacement-type immunoassays designed for the detection of steroids in a sample. In this regard, the present invention is directed to a purified peptide mimotope which is capable of binding specifically to an antibody specific to estradiol, and to isolated nucleic acid sequences encoding the purified peptide mimotope. It is also directed to an immunoassay test device for the detection in a sample of estradiol, the immunoassay comprising the peptide mimotope, as well as an antibody capable of binding specifically to the peptide mimotope to generate a detectable signal.

The present invention provides numerous advantages. In addition to the peptides being capable of being utilised as immunogens, the peptide mimotopes can be used to construct new, or improve the performance of old, immunoassay test formats and devices. They can, for example, be utilised essentially to "tune" the signal in conventional displacement assays for the detection of estradiol. Further, they can be bound directly to certain assay surfaces which are otherwise non-compatible with estradiol, the estradiol on such surfaces needing to be bound to the surface by complexing with another -- often proteinaceous -- molecule. Other advantages will become readily apparent in the description of the invention below.

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

6

Detailed Description of the Invention

The peptide mimotopes of the invention are capable of specific binding to any antibody which is specific to estradiol. Estradiol as used herein shall be taken to mean estradiol or metabolites thereof (e.g. the preferred estrone-3-glucuronide), as well as any related steroidal compounds having a basic estrone structure. Such related compounds are exemplified by, but not necessarily limited to, estriol, 16-epiestriol, 17-epiestriol, 17- β -estradiol 3-(β -D-glucuronide), estriol 3-(β -D-glucuronide), estrone, 17 α -ethynylestradiol, and 16 α -hydroxyestrone.

By specific binding it is meant that the mimotope is capable of being bound to the antigen-binding site of an antibody in a selective fashion in the presence of excess quantities of other materials not of interest, and tightly enough (i.e. with high enough affinity) that when used in an immunoassay, it provides a useful assay result. Similarly, an antibody "specific to estradiol" is one which is capable of binding to estradiol (or related compounds) in a selective fashion in the presence of excess quantities of other materials not of interest, and tightly enough that when used in an immunoassay it provides a useful assay result.

The antibody to which the peptide mimotopes are capable of being specifically bound can be any antibody, fragment or construct thereof, having a binding specificity for estradiol or metabolites thereof. Various forms of such antibodies are contemplated which may include monoclonal or polyclonal antibodies, Fv, Fab, ScFv and the like. Also contemplated are multivalent and/or multispecific constructions which have been described in the literature and comprise two or more polypeptide chains -- see for example, patent application Harris et al., WO 94/09131 and Davis et al., WO 97/14719 -- or are based on a 'double ScFv' approach, wherein the multivalency arises when two or more monovalent ScFv molecules are linked together, providing a single chain molecule comprising at least four variable domains, as described, for example, in Whitlow et al., WO 93/11161 and Mezes et al., WO 94/13806.

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

7

The antibodies, when utilized with the peptide mimotopes in an immunoassay test device, can be constructed by methods known in the art. Techniques such as those exemplified in Verhoeyen and Windust, *Advances in Antibody Engineering in Molecular Immunology: Frontiers in Molecular Biology*, 2nd Ed., published by Oxford University Press, pp. 283-325 (Oxford, 1995) and Price et al. *Principles and Practice of Immunoassays*, 2nd Ed., published by Macmillan Publishers Ltd (London, 1997) are suitable. Many antibodies may also be obtained commercially. For the estradiol metabolite, estrone-3-glucuronide, a monoclonal antibody is described in Linscott's *Directory of Immunological and Biological Reagents* (10th edition 1998-9) and may be obtained from OEM Concepts Inc, Toms River, NJ, USA.

As described in the accompanying examples, the peptide mimotopes of the invention have been identified from epitope libraries by various screening techniques. They have also been identified from peptide libraries constructed from the known naturally occurring amino acids.

The peptide mimotopes will contain a minimum core binding region. That is, they will include a minimum continuous amino acid sequence which is necessary for imparting to the mimotope the capability of specific binding to the target antibody. Preferably, the region is such that the affinity of the mimotope for the binding reaction to a single antibody binding site in solution is greater than or equal to 10^5 L/mole. Methods of determining binding affinity are routine for those skilled in the art, and the binding affinity of a particular mimotope for a particular antibody can be readily measured with the benefit of the techniques described herein and using the common general knowledge of those skilled in the art.

The peptide mimotopes can be any size, though it is preferable that they be smaller than that which would allow for tertiary or globular structuring to occur. Thus, they are typically no larger than 30, and preferably no greater than 20, amino acids in length. The core binding region of each mimotope will typically be less than 12 amino acids, preferably less than 7 amino acids, and optimally between 3 to 6 amino acids in length. Preferred mimotopes are identified in the examples below.

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

8

In particular, the inventors have found that the core binding region of many mimotopes in accordance with the invention comprises one of the three tripeptide sequences identified as follows: Xaa-Glu-Asp; Phe-Xaa-Asp; and Phe-Glu-Xaa. Thus, in general, preferred mimotopes will comprise one of these three tripeptide sequences (typically, Phe-Glu-Asp), but it should be noted that mere possession of such a tripeptide is not necessarily sufficient for the peptide to possess suitable specific binding activity: the inventors have found some examples of peptides which comprise one of the aforementioned tripeptide sequences but which do not exhibit suitable specific binding activity. With the benefit of the present disclosure, those skilled in the art will readily be able to screen candidate peptides and select those having the most desirable binding characteristics.

It will be apparent from the present disclosure that, if using D-isomers of amino acids, the reverse sequences may be employed (i.e. Xaa-Glu-Phe; Asp-Xaa-Phe; and Asp-Glu-Xaa).

US 5,635,182 discloses a 20mer peptide derived from bovine phospholipase C-II, having the sequence QPFEDFRISQEHLADHFDGR.

The present inventors have found that several peptides comprising the tripeptide FED are useful as peptide mimotopes in accordance with the invention. The inventors have not performed any experiments to investigate whether the 20mer disclosed in US 5,635,182 might also be useful (i.e. be capable of binding specifically to an antibody specific to estradiol) but, in the event that the prior art peptide does exhibit such specific binding activity, the inventors hereby provisionally disclaim the peptide consisting of the amino acid sequence QPFEDFRISQEHLADHFDGR.

Purification of the peptide mimotopes can be accomplished by conventional means, such as those described in Tendler et al., *The role of the arginine residue in the stabilization of mucin core type 1 β turns*. Protein and Peptide Letters, 1, 39-43 (1994). Preferably, the peptide mimotopes will be purified to 95%, optimally to 99%. The mimotope is typically provided as a simple peptide, but may optionally be covalently peptide bonded or linked in some other way to other moieties, such as a label or a solid support.

In one embodiment of the invention, the peptide mimotopes are utilized in an immunoassay test device. Such a device can take different forms, and it can be varied depending on the precise nature of the assay being performed.

Because the peptide mimotopes "mimic" a substance (i.e. Estradiol) which will often be the subject of testing, they are essentially antigenic by nature and function. Thus, it is most preferable that they be utilized in competitive or displacement-type assays (hereinafter collectively referred to as competitive assays). Nothing, however, would preclude their usage in conventional sandwich-type assays as well and specific formats can be readily designed.

Specifically, it is contemplated that in a competitive assay incorporating the peptide mimotopes of the invention, the mimotopes would be coated onto a solid support, typically nitrocellulose or other hydrophobic porous material. They may also be coated on synthetic plastics materials, microtitre assay plates, latex beads, filters comprising cellulosic or synthetic polymeric materials, glass or plastic slides, dipsticks, capillary fill devices and the like.

Coating of the peptide mimotopes to these surfaces can be accomplished by methods known in the art and described in, for example, EP-B-0291194. A particular advantage of the present invention is that unlike the compounds which they mimic, the mimotopes of invention are peptides, and thus can be coated directly onto certain assay surfaces such as nitrocellulose. Estradiol, by contrast, is non-compatible with such cellulosic materials and thus often needs to be bound to the surface by forming a complex with another molecule. Proteins are typically used for such complexing, with BSA often being the most preferred.

In a preferred competitive assay the peptide mimotopes, once coated on the surface of a support, are specifically bound to antibodies or fragments or constructs thereof. The antibodies can be as described above and should be capable of specific binding to estradiol. It is envisioned that a liquid sample containing estradiol migrating over the region

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

10

containing the antibodies bound to the mimotopes would displace a certain amount of antibodies from the surface of the support. The amount of antibodies displaced would be dependent on several factors including the concentration of the estradiol in the sample, and the relative binding affinities of the mimotopes and estradiol for the antibodies. The amount of antibody displaced could then be measured as a means to determine the relative concentration of estradiol in the sample.

Alternatively and in another preferred embodiment, it is contemplated that the antibodies could be bound to the surface, with the peptide mimotopes being specifically bound to the antibodies and capable of being displaced by estradiol migrating in a sample in contact with (e.g. through) the support. The displacement would generate a measurable signal of the amount of peptide mimotopes displaced and hence the amount of estradiol in the sample.

Other immunoassay test devices contemplated by the invention include those employing, for example, capillary-fill means in which a liquid sample is drawn into a device by capillary action along a suitably-proportioned capillary inlet. Capillary-fill devices which may be adapted for use in the present invention are disclosed, for example, in Shanks et al., U.S. Patent 5,141,868, Shanks et al., EP-A-0422708, and Birch et al., EP-B-0274215.

Devices such as those described in May et al., U.S. Patent 5,622,871 and May et al., U.S. Patent 5,656,503 are also suitable for practice of the immunoassays of the invention. If used, these devices preferably comprise a hollow elongated casing containing the solid support. The solid support communicates indirectly with the exterior of the casing via a bulbous fluid sample receiving member which may or may not protrude from the casing, the solid support and the sample receiving member being linked so as to allow for the fluid sample to migrate between the two by capillary action.

Spatially distant along the solid support from the sample receiving member are the test and, optionally, control zones. Within the test zone, the peptide mimotopes can be bound to an antibody immobilized on the support. Such immobilisation can be accomplished by

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

11

any number of known means including chemically coupling using, for example, CNBr, carbonyldiimidazole, or tressyl chloride. Alternatively, various "printing" techniques may be used. These include application of liquid antibodies by micro-syringes, direct printing, ink-jet printing, and the like. Chemical or physical treatment of the support prior to application of the antibody is also specifically contemplated, as such may facilitate immobilisation.

The casing in such devices is typically constructed of opaque or translucent material incorporating at least one aperture through which the analytical result may be observed, either by the naked eye or electronic means.

Such devices can be provided to clinical laboratories or as kits suitable for home use, such kits comprising one or more devices individually wrapped in moisture impervious wrapping and packaged together with appropriate instructions to the user.

The sample receiving member can be made from any bibulous, porous or fibrous material capable of absorbing liquid rapidly. The porosity of the material can be unidirectional (i.e. with pores or fibres running wholly or predominantly parallel to an axis of the member) or multidirectional (omnidirectional, so that the member has an amorphous sponge-like structure). Porous plastics material, such as polypropylene, polyethylene (preferably of very high molecular weight), polyvinylidene fluoride, ethylene vinylacetate, acrylonitrile and polytetrafluoro-ethylene can be used. It can be advantageous to pre-treat the member with a surface-active agent during manufacture, as this can reduce any inherent hydrophobicity in the member and therefore enhance its ability to take up and deliver a moist sample rapidly and efficiently. Porous sample receiving members can also be made from paper or other cellulosic materials, such as nitrocellulose. Preferably the material comprising the sample receiving member should be chosen such that the porous member can be saturated with liquid sample within a matter of seconds. The liquid must be capable of permeating freely from the porous sample receiving member into the solid support.

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

12

The solid support in such devices is preferably a dry porous carrier. It may be made of separate strips or sheets and, like the sample receiving member, can be constructed from any material capable of allowing the liquid sample to migrate through a portion of its length by, preferably, capillary action. The support should allow for the immobilisation of the antibody and/or peptide mimotope on its surface, and should not interfere with the binding reactions which are necessary for the proper functioning of the assay.

The solid support may have associated with it an absorbent "sink" which will facilitate capillary action of fluid up the length of the support, and will provide a means by which to avoid flooding of the test device by application of excess sample. Specific materials for and applications of sinks are conventional in the art and may be readily applied to the devices of the present invention.

In the immunoassay test devices of the invention, in order to provide a measurable signal of the amount of analyte in the sample it is preferred that either the peptide mimotope, or the antibody to which it is bound, be labelled. In the preferred embodiment of the invention, the label is any entity the presence of which can be readily detected. Preferably the label is a direct label, such as the those described in detail in May et al., U.S. Patent 5,656,503. Direct labels are entities which, in their natural state, are readily visible either to the naked eye, or with the aid of an optical filter and/or applied stimulation, e.g. UV light to promote fluorescence. Examples include radioactive, chemiluminescent, electroactive (such as redox labels), and fluorescent compounds. Direct particulate labels, such as dye sols, metallic sols (e.g. gold) and coloured latex particles, are also very suitable and are, along with fluorescent compounds, preferred. Of these options, coloured latex particles and fluorescent compounds are most preferred. Concentration of the label into a small zone or volume should give rise to a readily detectable signal, e.g. a strongly coloured area.

Indirect labels, such as enzymes, e.g. alkaline phosphatase and horseradish peroxidase, can also be used, but these usually require the addition of one or more developing reagents such as substrates before a visible signal can be detected. Hence, they are less preferred.

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

13

Such additional reagents can be incorporated in the solid support of the assay device such that they dissolve or disperse when a liquid sample is applied. Alternatively, the developing reagents can be added to the sample before application of the sample to the solid support.

Conjugation of the label to the peptide mimotope or the antibody can be by covalent or non-covalent (including hydrophobic) bonding, or by adsorption. Techniques for such conjugation are commonplace in the art and may be readily adapted for the particular reagents employed. In the preferred embodiment wherein the label is a coloured latex particle, the label is preferably conjugated to the antibody and it is accomplished through adsorption. Where the label is a fluorescent compound, it is preferred that the label be conjugated to or constructed as part of the antibody.

Upon usage of the test device, the label can provide a test and/or control signal which can be detected from the test and control surfaces by known conventional means. This includes evaluation by the naked eye, or more typically when precise measurements are desired, by appropriate instrumentation. Instrumentation is particularly suitable when the control or test signal is measured by the amount of mass of complex at the control or test surface.

The immunoassay test devices of the invention may be applied to virtually any type of biological or non-biological sample, though liquid biological samples derived from urine or serum are preferred. The samples may be purified or diluted prior to assaying. The term "immunoassay test device" as used herein is also intended to encompass components of immunoassay test devices which may be sold or supplied as separate articles and which require the presence of other components in order to form a working test device. In particular, it is contemplated that the immunoassay test device of the invention may be a dipstick, test stick or the like, which are generally provided as disposable items and may be supplied as separate components.

In a second aspect the invention provides an isolated nucleic acid encoding a peptide mimotope in accordance with the first aspect of the invention. The nucleic acid may be

prepared by cloning from a library of sequences or from an organism (e.g. a phage or a bacterium), or prepared by *in vitro* synthesis using standard techniques (e.g. automated solid phase oligonucleotide synthesizers, which are commercially available from many sources) or, less conveniently, by performance of ligation reactions, ligating together component nucleic acid sequences from different sources. Typically the isolated nucleic acid sequence will be a DNA sequence (but could, conceivably, be a sense RNA sequence) and will comprise a minimum of 9 bases. More typically, the nucleic acid (or rather, that portion thereof which encodes the peptide mimotopes) will comprise between 12 and 90 bases, desirably between 15 and 90, and preferably between 15 and 60 bases. The nucleic acid may advantageously comprise other components, such as promoter, enhancer and terminator sequences, one or more origins of replication, and the like. In addition, the isolated nucleic acid may encode a fusion protein, in which the peptide mimotope is fused (at either the 5' or 3' terminus) to another polypeptide moiety such as a polypeptide label. In such embodiments as aforesaid, whilst that portion of the nucleic acid which encodes the mimotope will generally comprise a number of bases within the ranges identified above, the nucleic acid as a whole may be considerably larger. It will be understood that the nucleic acid molecule may, in some embodiments, encode a peptide which consists solely of the peptide mimotope without any extraneous amino acid residues (e.g. the mimotope will be in isolation from the sequences adjacent thereto in any naturally-occurring molecule from which the mimotope may be derived).

The isolated nucleic acid molecule may conveniently take the form of a plasmid or other replicable moiety.

In a third aspect, the invention provides for the use of a peptide mimotope in accordance with the first aspect of the invention defined above, to assay for the presence and/or amount of estradiol in a sample to be tested.

The practice of the invention is described in detail below with reference to specific illustrative examples, but the invention is not to be construed as being limited thereto.

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

15

EXAMPLES**Identification of Peptide Mimotopes for Estradiol**

Means by which to identify examples of peptide mimotopes of the estradiol metabolite, estrone-3-glucuronide, are described below.

Monoclonal antibodies MAb 4155 were expressed from the 4155 monoclonal cell line. The 4155 monoclonal cell line was prepared and screened according to the methods described by Gani et al., (J Steroid Biochem. Molec. Biol. 48, 277-282 (1994)). The Gani et al. publication relates to development of anti-progesterone antibodies, but similar techniques were employed in producing antibodies reacting with estrone and analogues thereof.

Comparative amino acid sequences utilized in the following examples are as follows:

Glu-Asp	(SEQ ID NO:5)
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu	(SEQ ID NO:71)
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe	(SEQ ID NO:72)
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu	(SEQ ID NO:73)
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly	(SEQ ID NO:74)
Ala-Ala-Glu-Arg	(SEQ ID NO:75)
Ala-Ala-Glu	(SEQ ID NO:76)
Ala-Ala	(SEQ ID NO:77)
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Ala-Glu-Asp	(SEQ ID NO:78)
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Ala-Asp	(SEQ ID NO:79)
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Ala	(SEQ ID NO:80)

EXAMPLE 1**Identification of Peptide Mimotope Sequences by Phage Display**

pVIII9aa-cys nonapeptide phage library

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

16

The VIII9aa-cys library phage library described by Felici F et al., *Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, II. Selection of clones recognised by a protective monoclonal antibody against the Bordetella pertussis toxin from phage peptide libraries*. Gene 128, 21-27 (1993) and Luzzago et al. *Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides*. Gene 128, 51-57 (1993) was used. The library consisted of random nonapeptides fused to the major coat protein pVIII so that several hundred peptides were displayed on each phage particle.

Screening of phage library

Affinity selection of phage was performed by a combination of the methods of Folgori A. et al. *A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera*. EMBO J 13, 2236-2243 (1994) and Parmley S.F. et al. *Antibody-selectable fd phage vectors:affinity purification of target genes*. Gene 73, 305-318 (1988).

Polystyrene tubes used for panning (Immunotubes™ from Nunc) were coated either with affinity-purified anti-estrone-3-glucuronide antibodies (20 µg) in 2 mls of coating buffer (0.1 M NaHCO₃, pH 9.0) or with coating buffer only overnight at 4° C. After three washes with tris buffered saline (TBS; 50 mM tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7.4) both tubes were incubated with 4 mls of blocking buffer (TBS containing 10 mg/ml ovalbumin) for 4 h at room temperature. The VIII9aa-cys library was shown to have a titre of 1×10^{13} transducing units/ml (TU/ml) by infection of logarithmic XL1-Blue bacteria (Stratagene, Amsterdam, Holland). Aliquots (1 µl; 1×10^{11} TU) from the donated phage suspension were added to the antibody-coated and un-coated polystyrene tubes each containing 1 ml of TBS and 1mg/ml ovalbumin and incubated overnight at 4°C. Unbound phage were removed by 15 washes (each of 4 ml) with TBS containing 0.5% (v/v) Tween 20™ (TTBS) followed by 5 washes with TBS at room temperature. Bound phage were eluted by incubation of washed panning tubes with 1ml of elution buffer (0.1 M HCl, pH 2.2,

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

17

adjusted with glycine, containing 1 mg/ml ovalbumin) for 12 min at room temperature. The eluted phage were transferred to 1 ml polypropylene tubes and neutralised with 60 μ l of 2 M tris (pH not adjusted). Aliquots (200 μ l) of 1 M tris-HCl, pH 7.4 were also added to the panning tubes for neutralisation. The eluted neutralised phage particles (1 ml) were used for infection of 9 ml of logarithmic XL1-Blue bacteria (in 2TY containing 1% (w/v) glucose). Logarithmic XL1-Blue bacteria (4 ml) were also added directly to the neutralised panning tubes. Infection was carried out for 30 min at 37°C with no shaking. The infected bacteria were then pooled (total volume 13 ml) ampicillin was added (to 100 μ g/ml) and the cultures incubated overnight with shaking at 37°C. A small aliquot (10 μ l) of infected bacterial cells was removed prior to overnight incubation for titration (diluted 10³ to 10⁶ in 2TY/Amp/Glucose) on 2TY agar containing 1% (w/v) glucose and ampicillin (100 μ g/ml). An aliquot (150 μ l) of the overnight XL1-Blue culture infected with phage eluted from the panning tube coated with MAb 4155 antibodies was then added to 15 ml of 2TY containing 1% (w/v) glucose and 100 μ g/ml ampicillin and grown to logarithmic phase. The cells were then superinfected with M13K07 helper phage (Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Scotland) (1 x 10¹¹ phage/ml) and incubated for 30 min without shaking at 37°C. This was followed by centrifugation for 20 min at 1800 rpm and resuspension of the cell pellet in 200 ml of 2TY containing 100 μ g/ml ampicillin and 25 μ g/ml kanamycin. The bacterial culture was then incubated overnight at 37°C with shaking. Bacterial cells were then pelleted by centrifugation (5000 rpm; 15 min) and the phage particles in the supernatant precipitated by addition of 40 mls of PEG/NaCl (2.5M NaCl containing 20% (w/v) polyethylene glycol 8000) and incubation on ice for 1 hour. The phage suspension was then spun at 10,000rpm for 20 min at 4°C and the resulting pellet resuspended in 20 ml of TBS. A further PEG precipitation was carried out by addition of 4 ml of PEG/NaCl and incubation on ice for a further 20 min. The final phage pellet was dissolved in 2 ml of TBS which resulted in phage titres of the order of 1 x 10¹³ TU/ml. These phage particles were added directly to fresh panning tubes and the entire panning procedure repeated a further two times. The entire screening protocol (three rounds of panning) was repeated after the first screen.

Phage ELISAs

The output from the third round of panning was plated out on 2TY agar, ampicillin (100 µg/ml) and 1% (w/v) glucose and incubated overnight at 37°C. Random individual bacterial colonies (~200) were picked and added to the wells of 96-well microtitre plates (Sterilin™) each containing 200 µl of 2TY, 1% (w/v) glucose and ampicillin (100 µg/ml). The microtitre plates were incubated overnight with shaking at 37°C. The following day aliquots from each well (20 µl) were added to the wells of fresh microtitre plates each containing 200 µl of 2TY, 1% glucose, 100 µg/ml ampicillin and incubated with shaking for 1 h at 37°C. At the next stage, 25 µl of 2TY containing ampicillin (100 µg/ml), 1% (w/v) glucose and 10⁹ M13KO7 helper phage were added to each well. The plates were incubated for 30 min at 37°C without shaking followed by a further incubation for 1 h at 37°C with shaking. The plates were then spun at 1800 rpm for 20 min at room temperature, the supernatant aspirated off and the cell pellet resuspended in 200 µl of 2TY containing ampicillin (100 µg/ml) and kanamycin (20 µg/ml). Incubation with shaking at 37°C was then carried out overnight. Centrifugation of overnight cultures in the wells of microtitre plates was carried out (1500 rpm; 20 mins) and phage-containing supernatants (100 µl) were added to sheep anti-M13 bacteriophage (C.P. Laboratories, Bishops Stortford, UK) coated microtitre plates (Greiner™, high bind). Purified sheep anti-M13 antibody-coated plates were prepared by overnight incubation (100 µl/well; 10 µg/ml) at 4°C in binding buffer (0.1 M NaHCO₃, pH 9.0). Blocking was carried out with PBST containing 10 mg/ml ovalbumin (200 µl/well) for 1 h at room temperature. After removal of unbound phage from sheep anti-M13-coated plates by five washes with PBST affinity-purified anti-estrone-3-glucuronide antibodies were added (20 µg) in 2 mls of PBST containing 10 mg/ml ovalbumin; 100 µl per well). Incubation was carried out for 2 h at room temperature. Alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (100 µl/well) was then added at a dilution of 1/1000 (in PBST, 10 mg/ml ovalbumin) and incubated for a further 2 h at room temperature. The assay was developed with 100 µl/well of *p*-nitrophenyl phosphate (1 mg/ml) in 1M diethanolamine, 1 mM MgCl₂, pH 9.6 and the plates read at 410 nm.

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

19

DNA Sequencing

Double-stranded phagemid DNA was purified from bacterial cultures (50 ml) infected with positive phage clones using the Qiagen™ plasmid purification kit according to the manufacturer's instructions. Sequencing was carried out on an Applied Biosystems automated sequencer (Model 373A, version 1.2.0) using the oligonucleotide primer SEQ ID NO 1:

5'- TTT CCC AGT CAC GAC GTT G -3' (SEQ ID NO:1).

From the Phage ELISA and DNA sequencing results the following three peptide mimotope sequences were identified:

Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp (SEQ ID NO:2).

Thr-Ala-Trp-Thr-Tyr-Val-Leu-Gly-Phe (SEQ ID NO:3).

Thr-Ser-Trp-Ala-Tyr-Val-Leu-Gly-Pro (SEQ ID NO:4).

Identification of Mimotope Core Binding Regions by Replacement Net Analysis

Solid Phase Peptide Synthesis on Pins

Peptides were synthesised in duplicate or triplicate from the C-terminus by solid phase peptide synthesis on the heads of polyethylene pins (Geysen et al., *Strategies for epitope analysis using peptide synthesis*. J. Immunol. Methods 102, 259-274 (1987)) using a Multipin Peptide Synthesis Kit (Chiron Mimotopes, Victoria, Australia). Pins were arranged in a plastic holder in the format of a 96-well microtitre plate.

ELISA Testing of Peptides on Pins

All incubation steps were performed at room temperature (18-25°C) by lowering the pins reagents dispensed into 96-well microtitre plates (Becton Dickinson, CA, USA). Washing

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

20

was accomplished by placing the block of pins in a bath of phosphate buffered saline (PBS) containing Tween 20™ (0.01% v/v) with agitation for four cycles of 5 min. Non-specific binding sites on the surface of the pins were blocked by incubating in PBS containing casein (1% w/v, 175 µl/well) for 1 h. MAb4155 was diluted in blocking buffer and the pins were incubated in the antibody solution (150 µl/well) for 18 h at 4°C. After washing, the pins were incubated in horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (Dako, High Wycombe, UK, 1/1000 in blocking buffer for 1 h at 150 µl/well). The pins were washed once more and then incubated in ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] working substrate for 15 min (150 µl/well). ABTS was prepared as a 0.033% (w/v) solution in 0.1M citrate phosphate buffer (pH 4.5) with 33% hydrogen peroxide (1 µl/ml). Colour development was terminated by removal of the pins from the wells and was measured spectrophotometrically at 405 nm using a Milenia Kinetic Analyser™ (DPC, Llanberis, Wales).

Identification of the Core Binding Regions

In order to identify core binding regions, a set of peptides was synthesised on the heads of pins based on SEQ ID NO:2. These included peptides sequentially reduced in length by one amino acid, first from the N-terminus and then, in another series, from the C-terminus. In addition, a set of peptides was synthesised in which each residue of the lead sequence was replaced by Ala (or Gly if Ala already existed at that position) in order to assess the contribution of each residue to the binding event. MAb4155 was tested for reactivity with these peptides, the results being shown below in Table 1.

Table 1

Mimotope	SEQ ID NO:	Type	Relative Binding*
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	2	invention	2.0
Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	11	invention	1.5
Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	10	invention	1.8
Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	9	invention	1.6

Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	8	invention	2.2
Leu-Phe-Glu-Asp	7	invention	1.9
Phe-Glu-Asp	6	invention	2.0
Glu-Asp	5	comparison	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu	71	comparison	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe	72	comparison	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu	73	comparison	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly	74	comparison	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg	75	comparison	0.8
Ala-Ala-Glu	76	comparison	0.9
Ala-Ala	77	comparison	1.0
Gly-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	12	invention	1.9
Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	13	invention	2.0
Ala-Ala-Ala-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	14	invention	1.5
Ala-Ala-Glu-Ala-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	15	invention	2.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Ala-Leu-Phe-Glu-Asp	16	invention	1.5
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Ala-Phe-Glu-Asp	17	invention	1.6
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Ala-Glu-Asp	78	comparison	0.8
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Ala-Asp	79	comparison	1.8
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Ala	80	comparison	1.1

* Relative Binding of MAb4155 to peptides as measured by ELISA as described above

As is demonstrated from the data, of the peptides tested, only those amino acid sequences comprising the core binding region as indicated by SEQ ID NO:6 provided adequate binding. Amino acid sequences represented by SEQ ID NO:7 - 17 contain the core binding region of SEQ ID NO:6 and provided adequate binding to serve as an estradiol mimotope.

Phe-Glu-Asp (SEQ ID NO:6)
 Leu-Phe-Glu-Asp (SEQ ID NO:7)

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

22

Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:8)
Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:9)
Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:10)
Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:11)
Gly-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:12)
Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:13)
Ala-Ala-Ala-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:14)
Ala-Ala-Glu-Ala-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:15)
Ala-Ala-Glu-Arg-Ala-Leu-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:16)
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Ala-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:17)

Additional core binding sequences were identified utilizing the amino acid sequence SEQ ID NO:8 and investigating the effect of systematic replacement of each residue by the other 19 naturally occurring amino acids using known techniques as exemplified in Verhoeyen et al., *Construction of a reshaped HMFG1 antibody and comparison of its fine specificity with that of the parent mouse antibody*. Immunology, 78, 364-370 (1993).

The sequences which had superior binding reactivity and specificity compared to SEQ ID NO:8 are identified as follows. The binding of MAb4155 to these sequences as determined by ELISA is shown below in Table 2, setting SEQ ID NO:8 to a Relative Binding of 100.

Gly-Phe-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:18)
Gly-Trp-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:19)
Gly-Tyr-Phe-Glu-Asp	(SEQ ID NO:20)
Gly-Leu-Trp-Glu-Asp	(SEQ ID NO:21)
Gly-Leu-Phe-Cys-Asp	(SEQ ID NO:22)
Gly-Leu-Phe-Asp-Asp	(SEQ ID NO:23)
Gly-Leu-Phe-Phe-Asp	(SEQ ID NO:24)
Gly-Leu-Phe-Ile-Asp	(SEQ ID NO:25)
Gly-Leu-Phe-Leu-Asp	(SEQ ID NO:26)
Gly-Leu-Phe-Trp-Asp	(SEQ ID NO:27)

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

23

Gly-Leu-Phe-Tyr-Asp	(SEQ ID NO:28)
Gly-Leu-Phe-Glu-Cys	(SEQ ID NO:29)
Gly-Leu-Phe-Glu-Phe	(SEQ ID NO:30)
Gly-Leu-Phe-Glu-Ile	(SEQ ID NO:31)
Gly-Leu-Phe-Glu-Leu	(SEQ ID NO:32)
Gly-Leu-Phe-Glu-Val	(SEQ ID NO:33)
Gly-Leu-Phe-Glu-Trp	(SEQ ID NO:34)
Gly-Leu-Phe-Glu-Tyr	(SEQ ID NO:35)

Table 2

Mimotope	SEQ ID NO:	Relative Binding*
Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	8	100
Gly-Phe-Phe-Glu-Asp	18	200
Gly-Trp-Phe-Glu-Asp	19	343
Gly-Tyr-Phe-Glu-Asp	20	220
Gly-Leu-Trp-Glu-Asp	21	207
Gly-Leu-Phe-Cys-Asp	22	335
Gly-Leu-Phe-Asp-Asp	23	121
Gly-Leu-Phe-Phe-Asp	24	184
Gly-Leu-Phe-Ile-Asp	25	169
Gly-Leu-Phe-Leu-Asp	26	138
Gly-Leu-Phe-Trp-Asp	27	578
Gly-Leu-Phe-Tyr-Asp	28	252
Gly-Leu-Phe-Glu-Cys	29	296
Gly-Leu-Phe-Glu-Phe	30	204
Gly-Leu-Phe-Glu-Ile	31	174
Gly-Leu-Phe-Glu-Leu	32	168
Gly-Leu-Phe-Glu-Val	33	177
Gly-Leu-Phe-Glu-Trp	34	594
Gly-Leu-Phe-Glu-Tyr	35	386

* Relative Binding of MAb4155 to peptides as measured by ELISA as described above

D-isomers of the Reverse Sequence of the Core Binding Regions.

The foregoing SEQ ID NO.'s 1-35 are L-isomers. It was also demonstrated that the D-isomers of the reverse sequences of those core binding regions identified above similarly function as effective mimotopes. For example, an amino acid sequence as described by SEQ ID NO:37 was prepared by the peptide synthesis methods described above. Binding affinity relative to the parent sequence (SEQ ID NO:28) was measured by the described testing methods. The results show the reverse sequence to have an equivalent relative binding affinity compared to the parent sequence.

The following therefore identify core binding sequences of peptides capable of functioning as mimotopes for estradiol. Each sequence contains D-isomers of the amino acids in the reverse sequence of one of those described above.

NOTE: SEQ ID NO:s 36-56 are D-isomers

Asp-Glu-Phe	(SEQ ID NO:36)
Asp-Tyr-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:37)
Asp-Glu-Phe-Phe-Gly	(SEQ ID NO:38)
Asp-Glu-Phe-Trp-Gly	(SEQ ID NO:39)
Asp-Glu-Phe-Tyr-Gly	(SEQ ID NO:40)
Asp-Glu-Trp-Leu-Gly	(SEQ ID NO:41)
Asp-Cys-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:42)
Asp-Asp-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:43)
Asp-Phe-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:44)
Asp-Ile-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:45)
Asp-Leu-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:46)
Asp-Trp-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:47)
Cys-Glu-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:48)
Phe-Glu-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:49)
Ile-Glu-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:50)
Leu-Glu-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:51)
Val-Glu-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:52)
Trp-Glu-Phe-Leu-Gly	(SEQ ID NO:53)

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

26

Tyr-Glu-Phe-Leu-Gly

(SEQ ID NO:54)

Phe-Gly-Leu-Val-Tyr-Thr-Trp-Ala-Thr

(SEQ ID NO:55)

Pro-Gly-Leu-Val-Tyr-Ala-Trp-Ser-Thr

(SEQ ID NO:56)

EXAMPLE 2**Identification of Peptide Mimotope Sequences from Pepscan Libraries**

The pins from the Multipin Peptide Synthesis Kit as described in Example 1 were used to construct libraries of peptide sequences encompassing all possible trimer combinations of the 20 naturally occurring amino acids, supplemented by a further random set of dodecapeptides (Stootstra JW et al., *Screening of a small set of random peptides: a new strategy to identify synthetic peptides that mimic epitopes* J Molec. Recog. 10, 217-224 (1997)). The binding of MAb4155 was tested on the library for binding affinity in a manner as described in Example 1. This identified the following amino acid sequences (L-isomers) as core binding regions for estradiol mimotopes.

Asp-Phe-Tyr	(SEQ ID NO:57)
Phe-Tyr-Glu	(SEQ ID NO:58)
Tyr-Glu-Glu	(SEQ ID NO:59)
Tyr-Gln-Glu	(SEQ ID NO:60)
Asn-Glu-Glu-Asp-Phe-Tyr-Gln-Ile-Gln-Leu-Tyr-Glu	(SEQ ID NO:61)
Arg-Gln-Ile-Asp-Phe-Tyr-Gln-Glu-Ile-Gln-Phe-Lys	(SEQ ID NO:62)
Asp-Asp-Phe-Tyr-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Gln-Val-Arg	(SEQ ID NO:63)

Similarly to Example 1 the following reverse sequences of D-amino acids are identified as capable of functioning as the core binding region for peptide mimotopes for estradiol.

NOTE: SEQ ID NO:s 64-70 are D-isomers

Tyr-Phe-Asp	(SEQ ID NO:64)
Glu-Tyr-Phe	(SEQ ID NO:65)
Glu-Glu-Tyr	(SEQ ID NO:66)
Glu-Gln-Tyr	(SEQ ID NO:67)
Glu-Tyr-Leu-Gln-Ile-Gln-Tyr-Phe-Asp-Glu-Glu-Asn	(SEQ ID NO:68)
Lys-Phe-Gln-Ile-Glu-Gln-Tyr-Phe-Asp-Ile-Gln-Arg	(SEQ ID NO:69)
Arg-Val-Gln-Glu-Arg-Pro-Gln-Gly-Tyr-Phe-Asp-Asp	(SEQ ID NO:70)

WO 02/12270

PCT/EP01/08705

28

EXAMPLE 3**Comparison of Competitive Assays for Estrone-3-Glucuronide (E3G) Using E3G or a Peptide Mimotope of E3G on a Solid Phase****Peptide Ligand Synthesis**

Synthetic peptide ligands were prepared on an Applied Biosystems 431A Peptide Synthesiser Biopolymer Synthesis and Analysis Unit, TM QMC, (Nottingham, UK). Purity was assessed by mass spectroscopy and HPLC and was in excess of 95%.

Preparation of Ovalbumin-E3G conjugate

An estrone-3-glucuronide (E3G) ovalbumin conjugate was prepared by resuspending 2.6mg of E3G in 2ml of freshly prepared solution of EDC (1-ethyl (dimethylaminopropyl) carbodiimide, 0.1M) and NHS (N-hydroxysuccinamide, 0.02M) and incubating for 15minutes at room temperature. To the E3G solution, 2ml of ovalbumin (10mg/ml) was added and this was incubated for 2.5hrs at room temperature with constant mixing. The conjugate was then dialysed for 16hrs against 1L of phosphate buffered saline containing 0.1% sodium azide.

Preparation of BSA- mimotope conjugate

Bovine serum albumin (BSA, 10mg, Sigma) was dissolved in 3 ml of conjugation buffer (sodium hydrogen carbonate buffer, 0.1M, pH 8.4) in a clean glass vial, mixing by suction and expulsion from a pipette tip. The mixture was left on a roller for one hour. The peptide mimotope as represented by SEQ ID NO:36 was dissolved in conjugation buffer. Peptide solution (1.0 ml @ 10mg/ml) and 10 μ l glutaraldehyde (high commercial grade, Sigma) were added to the BSA solution. The sealed vial was then agitated on a roller for

WO 02/12270

29

PCT/EP01/08705

four hours at room temperature. The conjugate solution was then dialysed against sodium chloride (0.9%w/v) for 48h at 4°C.

Assays:

Peptide-mimotope-BSA conjugate (10µg/ml) and E3G-ovalbumin conjugate (3µg/ml) were dried separately into the wells of a microtitre plate (Becton Dickinson, CA, USA) from 50µl of solution in Phosphate Buffered Saline (PBS) overnight at room temperature. Wells were washed (4x PBS+0.01%Tween20™), blocked for 1 hour with 0.1% casein in 100µl of PBS and washed 4x before use. 25µl aliquots of E3G in PBS (0-3uM) were added and incubated for 15mins before adding in 25µl of the MAb4155 anti-E3G antibody at 0.6µg/ml in PBS. The wells were incubated, with agitation, for 1 hour at room temperature. After washing 4x, 50µl of rabbit anti-mouse IgG-HRP conjugate (Dako, High Wycombe, UK) at 1:1000 dilution in PBS was added to each well and incubated for 1 hour at room temperature. After washing 4x, the wells were incubated in ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] working substrate for 15 min (150 µl/well). ABTS was prepared as a 0.033% (w/v) solution in 0.1M citrate phosphate buffer (pH 4.5) with 33% hydrogen peroxide (1 µl/ml). Colour development was terminated by addition of 0.5M sulphuric acid (10µl/well) and was measured spectrophotometrically at 405 nm using a Milenia Kinetic Analyser™ (DPC, Llanberis, Wales).

Figure 1 shows the resulting assay curves. Both are typical for competitive immunoassays having midpoints in the micromolar to nanomolar range. Furthermore, the assay sensitivity using the mimotope-containing BSA-SEQ ID NO:37 is significantly greater than that obtained when using the epitope-containing E3G-ovalbumin.

The invention has been described in detail with particular reference to preferred embodiments thereof, but it will be understood that variations and modifications can be effected with the spirit and scope of the invention.

Claims

1. A purified peptide mimotope which is capable of binding specifically to an antibody specific to estradiol.
2. A purified peptide mimotope according to claim 1, wherein the mimotope has a core binding region of no greater than 12 amino acid residues.
3. A purified peptide mimotope according to claim 1 having a core binding region represented by an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO's: 3, 4, 6 and 18-70.
4. A purified peptide mimotope according to any of the preceding claims which is capable of binding specifically to an antibody specific to estrone-3-glucuronide.
5. A purified peptide mimotope according to any of the preceding claims comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO's: 7-17.
6. A purified peptide according to any one of the preceding claims comprising, in its core binding region, a tripeptide in accordance with at least one of the following: Xaa-Glu-Asp; Phe-Xaa-Asp; and Phe-Glu-Xaa.
7. A solid support having immobilised (releasably or non-releasably) thereon a purified peptide in accordance with any one of claims 1-6.
8. A solid support according to claim 7, in the form of an immunoassay test stick or dipstick.
9. An immunoassay test device for the detection in a sample of estradiol, the immunoassay comprising a peptide mimotope according to any one of claims 1-6, and

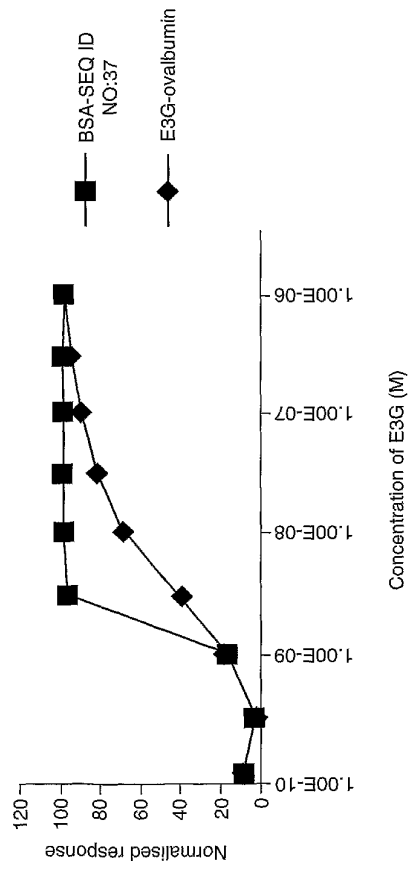
WO 02/12270

PCT/EP01/08705

31

- an antibody capable of binding specifically to the peptide mimotope to generate a detectable signal.
10. An immunoassay test device according to claim 9 wherein the test device is a competitive immunoassay test device.
 11. An immunoassay test device according to claims 9 or 10 wherein the peptide mimotope comprises an amino acid sequence having a core binding region selected from the group consisting of SEQ ID NO's: 3, 4 and 6 and 18-70.
 12. An immunoassay test device according to any one of claims 9, 10 or 11, wherein the peptide mimotope comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO's: 7-17.
 13. An immunoassay test device according to any one of claims 9-12, wherein the peptide mimotope is capable of binding specifically to an antibody specific to estrone-3-glucuronide.
 14. Use of a peptide mimotope according to any one of claims 1 to 6, to assay for the presence and/or amount of estradiol in a sample to be tested.
 15. An isolated nucleic acid encoding a peptide mimotope in accordance with any one of claims 1-6.
 16. A peptide mimotope substantially as hereinbefore described and with reference to the examples.

Fig.1.
Comparison of E3G Competitive Assays on E3G
and Mimotope Solid Phases



WO 02/12270

1

PCT/EP01/08705

SEQUENCE LISTING

<110> Unilever PLC
Unilever NV

<120> Peptides Capable of Functioning as Mimotopes for
Hormonal Analytes

<130> Peptide Mimotopes

<140>
<141>

<150> EP00306613.1
<151> 2000-08-03

<160> 80

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 1
tttccagtc acgacgttg

19

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 2
Ala Ala Glu Arg Gly Leu Phe Glu Asp
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

WO 02/12270

2

PCT/EP01/08705

<400> 3
Thr Ala Trp Thr Tyr Val Leu Gly Phe
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 4
Thr Ser Trp Ala Tyr Val Leu Gly Pro
1 5

<210> 5
<211> 2
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 5
Glu Asp
1

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 6
Phe Glu Asp
1

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

3

PCT/EP01/08705

<400> 7
Leu Phe Glu Asp
1

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 8
Gly Leu Phe Glu Asp
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 9
Arg Gly Leu Phe Glu Asp
1 5

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 10
Glu Arg Gly Leu Phe Glu Asp
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

4

PCT/EP01/08705

<400> 11
Ala Glu Arg Gly Leu Phe Glu Asp
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 12
Gly Ala Glu Arg Gly Leu Phe Glu Asp
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 13
Ala Gly Glu Arg Gly Leu Phe Glu Asp
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 14
Ala Ala Ala Arg Gly Leu Phe Glu Asp
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

WO 02/12270

5

PCT/EP01/08705

<400> 15
Ala Ala Glu Ala Gly Leu Phe Glu Asp
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 16
Ala Ala Glu Arg Ala Leu Phe Glu Asp
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 17
Ala Ala Glu Arg Gly Ala Phe Glu Asp
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 18
Gly Phe Phe Glu Asp
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

6

PCT/EP01/08705

<400> 19
Gly Trp Phe Glu Asp
1 5

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 20
Gly Tyr Phe Glu Asp
1 5

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 21
Gly Leu Trp Glu Asp
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 22
Gly Leu Phe Cys Asp
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

WO 02/12270

7

PCT/EP01/08705

<400> 23
Gly Leu Phe Asp Asp
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 24
Gly Leu Phe Phe Asp
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 25
Gly Leu Phe Ile Asp
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 26
Gly Leu Phe Leu Asp
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

8

PCT/EP01/08705

<400> 27
Gly Leu Phe Trp Asp
1 5

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 28
Gly Leu Phe Tyr Asp
1 5

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 29
Gly Leu Phe Glu Cys
1 5

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 30
Gly Leu Phe Glu Phe
1 5

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

9

PCT/EP01/08705

<400> 31
Gly Leu Phe Glu Ile
1 5

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 32
Gly Leu Phe Glu Leu
1 5

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 33
Gly Leu Phe Glu Val
1 5

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 34
Gly Leu Phe Glu Trp
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

WO 02/12270

10

PCT/EP01/08705

<400> 35

Gly Leu Phe Glu Tyr
1 5

<210> 36

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 36

Asp Glu Phe
1

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 37

Asp Tyr Phe Leu Gly
1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 38

Asp Glu Phe Phe Gly
1 5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

WO 02/12270

11

PCT/EP01/08705

<400> 39
Asp Glu Phe Trp Gly
1 5

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 40
Asp Glu Phe Tyr Gly
1 5

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 41
Asp Glu Trp Leu Gly
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 42
Asp Cys Phe Leu Gly
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

WO 02/12270

12

PCT/EP01/08705

<400> 43
Asp Asp Phe Leu Gly
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 44
Asp Phe Phe Leu Gly
1 5

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 45
Asp Ile Phe Leu Gly
1 5

<210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 46
Asp Leu Phe Leu Gly
1 5

<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

WO 02/12270

13

PCT/EP01/08705

<400> 47
Asp Trp Phe Leu Gly
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 48
Cys Glu Phe Leu Gly
1 5

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 49
Phe Glu Phe Leu Gly
1 5

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 50
Ile Glu Phe Leu Gly
1 5

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

WO 02/12270

14

PCT/EP01/08705

<400> 51
Leu Glu Phe Leu Gly
1 5

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 52
Val Glu Phe Leu Gly
1 5

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 53
Trp Glu Phe Leu Gly
1 5

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 54
Tyr Glu Phe Leu Gly
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

15

PCT/EP01/08705

<400> 55
Phe Gly Leu Val Tyr Thr Trp Ala Thr
1 3 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 56
Pro Gly Leu Val Tyr Ala Trp Ser Thr
1 5

<210> 57
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 57
Asp Phe Tyr
1

<210> 58
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 58
Phe Tyr Glu
1

<210> 59
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

16

PCT/EP01/08705

<400> 59
Tyr Glu Glu
1

<210> 60
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 60
Tyr Gln Glu
1

<210> 61
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 61
Asn Glu Glu Asp Phe Tyr Gln Ile Gln Leu Tyr Glu
1 5 10

<210> 62
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 62
Arg Gln Ile Asp Phe Tyr Gln Glu Ile Gln Phe Lys
1 5 10

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

17

PCT/EP01/08705

<400> 63
Asp Asp Phe Tyr Gly Gln Pro Arg Glu Gln Val Arg
1 5 10

<210> 64
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 64
Tyr Phe Asp
1

<210> 65
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 65
Glu Tyr Phe
1

<210> 66
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 66
Glu Glu Tyr
1

<210> 67
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

18

PCT/EP01/08705

<400> 67

Glu Gln Tyr
1

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 68

Glu Tyr Leu Gln Ile Gln Tyr Phe Asp Glu Glu Asn
1 5 10

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 69

Lys Phe Gln Ile Glu Gln Tyr Phe Asp Ile Gln Arg
1 5 10

<210> 70

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 70

Arg Val Gln Glu Arg Pro Gln Gly Tyr Phe Asp Asp
1 5 10

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

19

PCT/EP01/08705

<400> 71 -
Ala Ala Glu Arg Gly Leu Phe Glu
1 5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 72
Ala Ala Glu Arg Gly Leu Phe
1 5

<210> 73
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 73
Ala Ala Glu Arg Gly Leu
1 5

<210> 74
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 74
Ala Ala Glu Arg Gly
1 5

<210> 75
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

20

PCT/EP01/08705

<400> 75
Ala Ala Glu Arg
1

<210> 76
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 76
Ala Ala Glu
1

<210> 77
<211> 2
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 77
Ala Ala
1

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 78
Ala Ala Glu Arg Gly Leu Ala Glu Asp
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

WO 02/12270

21

PCT/EP01/08705

<400> 79
Ala Ala Glu Arg Gly Leu Phe Ala Asp
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 80
Ala Ala Glu Arg Gly Leu Phe Glu Ala
1 5

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC1/EP 01/08705
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K5/08 C07K5/10 C07K7/06 C07K1/04 C12N15/12 A61K31/365 G01N33/53		
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) IPC 7 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, MPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 16332 A (UNIPATH LTD) 30 May 1996 (1996-05-30) cited in the application	1,4
Y	whole document, claims, 5-10	1-16
X	WO 99 27356 A (UNILEVER PLC ;BADLEY ROBERT ANDREW (GB); PORTER ROBERT ANDREW (GB)) 3 June 1999 (1999-06-03) cited in the application	1,4
Y	Examples 6 and 7, claims	1-16
	--- --	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 December 2001		Date of mailing of the international search report 28/12/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3018		Authorized officer Kronester-Frei, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/JP 01/08705
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SAVIRANTA PETRI ET AL: "In vitro enzymatic biotinylation of recombinant Fab fragments through a peptide acceptor tail." BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 9, no. 6, November 1998 (1998-11), pages 725-735, XP002159053 ISSN: 1043-1802 cited in the application whole text, see esp. competitive Immunoassay for estradiol	1-16
Y	SLOOTSTRA J W ET AL: "Screening of a small set of random peptides: A new strategy to identify synthetic peptides that mimic epitopes." JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, vol. 10, no. 5, 1997, pages 217-224, XP000973182 ISSN: 0952-3499 cited in the application Figures	1-16
A	US 5 635 182 A (LU ZHIJIAN ET AL) 3 June 1997 (1997-06-03) cited in the application SEQ ID 2, whole document	1-11
A	WO 98 56806 A (GLASS CHRISTOPHER K ; ROSE DAVID W (US); TORCHIA JOSEPH (US); UNIV) 17 December 1998 (1998-12-17) whole document, esp. page 46, lines 1-3	1-16
A	EP D 383 313 A (NOCHIDA PHARM CO LTD) 22 August 1990 (1990-08-22) claims	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inter-
 national Application No
 PCT/JP 01/08705

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9616332 A	30-05-1996	AU 4117696 A	17-06-1996
		WO 9616332 A1	30-05-1996
		EP 0793806 A1	10-09-1997
		US 5989926 A	23-11-1999
WO 9927356 A	03-06-1999	AU 1248999 A	15-06-1999
		EP 1032825 A1	06-09-2000
		WO 9927356 A1	03-06-1999
US 5635182 A	03-06-1997	AU 2372895 A	05-01-1996
		WO 9534664 A1	21-12-1995
WO 9856806 A	17-12-1998	AU 8142198 A	30-12-1998
		WO 9856806 A1	17-12-1998
EP 0383313 A	22-08-1990	JP 2213766 A	24-08-1990
		AU 627548 B2	27-08-1992
		AU 4979290 A	22-11-1990
		CA 2009985 A1	15-08-1990
		EP 0383313 A2	22-08-1990
		US 5459045 A	17-10-1995
		US 5283176 A	01-02-1994

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 33/543 G 0 1 N 33/543 5 1 1 D

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(72) 発明者 バドリー, ロバート・アンドリュウ

イギリス国、ベッドフォードシャー・エム・ケー・44・1・エル・キュー、ベッドフォード、シヤンプルツク、コルワース・ハウス、ユニリーバー・リサーチ・コルワース

(72) 発明者 ベリー, マーク・ジヨン

イギリス国、ベッドフォードシャー・エム・ケー・44・1・エル・キュー、ベッドフォード、シヤンプルツク、コルワース・ハウス、ユニリーバー・リサーチ・コルワース

(72) 発明者 ウィリアムズ, サマンサ・キヤサリン

アイルランド国、カントリー・ダブリン、バルブリガン、ハンプトン・グリーン・13

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA04 DA05 EA03 EA04 GA11 HA03 HA11

4H045 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	肽能够作为雌二醇分析物的模拟表位		
公开(公告)号	JP2004505638A	公开(公告)日	2004-02-26
申请号	JP2002518243	申请日	2001-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	因弗因斯医药瑞士股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	因弗内斯Medeikaru Sul的德国之旅土地Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	バドリー・ロバート・アンドリユー ベリー・マーク・ジヨン ウイリアムズ・サマン・サキヤサリン		
发明人	バドリー,ロバート・アンドリユー ベリー,マーク・ジヨン ウイリアムズ,サマン・サキヤサリン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/365 C07K1/04 C07K5/00 C07K5/08 C07K5/083 C07K5/093 C07K5/10 C07K5/103 C07K7/00 C07K7/06 C07K7/08 C12N15/09 C12N15/10 C12N15/12 C40B40/02 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/74		
CPC分类号	C40B40/02 C07K5/0806 C07K5/0819 C07K5/101 C07K7/06 C07K7/08 C12N15/1037 G01N33/743		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K5/00 C07K7/00 G01N33/53.A G01N33/531.A G01N33/543.511.D		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA05 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4H045/BA12 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	井上充 小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	2000306613 2000-08-03 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

是纯化的肽模拟表位能够特异性结合雌二醇特异性抗体。此外，免疫包含用于检测雌二醇的免疫测定试验装置的样品中，能够产生可检测信号的和具体雌二醇肽模拟表位与抗体结合肽模拟表位还公开了测试测试仪。

ミノトープ	配列番号	タイプ	相対結合*
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	2	発明	2.0
Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	11	発明	1.5
Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	10	発明	1.8
Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	9	発明	1.6
Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	8	発明	2.2
Leu-Phe-Glu-Asp	7	発明	1.9
Phe-Glu-Asp	6	発明	2.0
Glu-Asp	5	比較	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu	71	比較	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe	72	比較	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu	73	比較	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly	74	比較	1.0
Ala-Ala-Glu-Arg	75	比較	0.8
Ala-Ala-Glu	76	比較	0.9
Ala-Ala	77	比較	1.0
Gly-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	12	発明	1.9
Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	13	発明	2.0
Ala-Ala-Ala-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	14	発明	1.5
Ala-Ala-Glu-Ala-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp	15	発明	2.0
Ala-Ala-Glu-Arg-Ala-Leu-Phe-Glu-Asp	16	発明	1.5
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Ala-Phe-Glu-Asp	17	発明	1.6
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Ala-Glu-Asp	78	比較	0.8
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Ala-Asp	79	比較	1.8
Ala-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Phe-Glu-Ala	80	比較	1.1

* 上述したようなELISAによって測定したときのペプチドへのMAb 4155の相対結合