

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 360278

(P2002 - 360278A)

(43)公開日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 1/12	4 B 0 2 4
C 0 7 K 1/12		C 1 2 M 1/34	E 4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/34		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 3
C 1 2 P 21/08		C 1 2 Q 1/37	4 B 0 6 4
C 1 2 Q 1/37		G 0 1 N 33/53	D 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 63 O L (全250数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 4906(P2002 - 4906)

(22)出願日 平成14年1月11日(2002.1.11)

(31)優先権主張番号 140881

(32)優先日 平成13年1月14日(2001.1.14)

(33)優先権主張国 イスラエル(IL)

(71)出願人 502014271

エミル イスラエル カッツ

イスラエル、52521 サヴィオン、ハシャル  
ヴァ ストリート 22

(72)発明者 エミル イスラエル カッツ

イスラエル、52521 サヴィオン、ハシャル  
ヴァ ストリート 22

(74)代理人 110000040

特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 目的ポリペプチドのペプチド標本および抗原に対する抗体、その生成および利用のための方法、システムおよびキット

(57)【要約】 (修正有)

【課題】目的ポリペプチドの少なくとも一つのアミノ酸シーケンス標本の一組を生成する方法を提供する。また、疾病の有無若しくは辛さを検出するための、前記ペプチドおよびその抗体を用いたキットおよび方法を提供する。

【解決手段】目的タンパク質のペプチド標本、及びそれに対する高い親和性の抗体、および生物学的サンプル中のタンパク質の検出、測定および/または特徴付けのための前記ペプチド標本及び抗体の生成方法および利用方法が求められている。目的ポリペプチドの少なくとも一つから複数のタンパク質分解物をコンピュータ上で生成、解析し、アミノ酸シーケンスの一組を生成する方法、及びデータベースを含むコンピュータ読み取り可能記録媒体を提供することにより、目的アミノ酸シーケンス標本の一組を生成する方法を提供する。また、疾病の有無若しくは辛さを検出するための、前記ペプチドおよびその抗体を用いたキットおよび方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 目的ポリペプチドの少なくとも一つのアミノ酸シーケンスの一群を生成する方法であって、下記の(a)、(b)および(c)を含む方法。

(a) 目的ポリペプチドの少なくとも一つから複数のタンパク質分解物をコンピュータ上で生成させること。

(b) アミノ酸シーケンスの特性を定義するパラメータの少なくとも一つにより、前記複数のタンパク質分解物をコンピュータで解析すること。

(c) 各前記パラメータのための予め決められた基準により、前記複数のタンパク質分解物から一群のタンパク質分解物を選択し、それによって、目的のポリペプチドの少なくとも一つのアミノ酸シーケンスのセット(組)を生成させる。

【請求項2】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬のタンパク質分解パターンにより前記複数のタンパク質分解物が生成される請求項1記載の方法。

【請求項3】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬が、タンパク質分解酵素およびタンパク質分解化学物質からなる群から選択されたものである請求項2記載の方法。

【請求項4】 前記タンパク質分解酵素が、トリプシン、キモトリプシン、スブチルシン(subtilisin)、ペプシン、V8プロテアーゼ、トロンピンおよびエラスターゼからなる群から選択されたものである請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記タンパク質分解化学物質が、プロモシアンおよび2-nitro-5-thiocyanobenzoateからなる群から選択されたものである請求項3記載の方法。

【請求項6】 前記アミノ酸シーケンスの特徴を定義する前記パラメータの少なくとも一つが、分子量、アミノ酸組成、疎水性、親水性、荷電状態、二次構造、非均一性、長さ、翻訳後修飾、極性、溶解性、両親媒性特性、シーケンスおよび免疫原性からなる群から選択されたものである請求項1記載の方法。

【請求項7】 目的ポリペプチドの少なくとも一つに対応するアミノ酸シーケンスのデータベースを含むコンピュータ読み取り可能記録媒体であって、前記アミノ酸シーケンスが、以下の(a)、(b)および(c)から生成されるコンピュータ読み取り可能記録媒体。

(a) 目的ポリペプチドの少なくとも一つから複数のタンパク質分解物をコンピュータ上で生成させること。

(b) アミノ酸シーケンスの特性を定義するパラメータの少なくとも一つにより、前記複数のタンパク質分解物をコンピュータで解析すること。

(c) 各前記タンパク質分解物のシーケンスを記録することにより、アミノ酸シーケンスのデータベースを生成すること。

【請求項8】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬のタンパク質分解パターンにより前記複数のタンパク質分

解物が生成される請求項7記載のコンピュータ読み取り可能記録媒体。

【請求項9】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬が、タンパク質分解酵素およびタンパク質分解化学物質からなる群から選択されたものである請求項8記載のコンピュータ読み取り可能記録媒体。

【請求項10】 前記タンパク質分解酵素が、トリプシン、キモトリプシン、スブチルシン(subtilisin)、ペプシン、V8プロテアーゼ、トロンピンおよびエラスターゼからなる群から選択されたものである請求項9記載のコンピュータ読み取り可能記録媒体。

【請求項11】 前記タンパク質分解化学物質が、プロモシアンおよび2-nitro-5-thiocyanobenzoateからなる群から選択されたものである請求項9記載のコンピュータ読み取り可能記録媒体。

【請求項12】 前記アミノ酸シーケンスの特徴を定義する前記パラメータの少なくとも一つが、分子量、アミノ酸組成、疎水性、親水性、荷電状態、二次構造、非均一性、長さ、翻訳後修飾、極性、溶解性、両親媒性特性、シーケンスおよび免疫原性からなる群から選択されたものである請求項7記載のコンピュータ読み取り可能記録媒体。

【請求項13】 目的ポリペプチドの少なくとも一つのアミノ酸シーケンスのデータベースを生成するシステムであって、前記システムは、演算処理装置(PU)を含み、前記演算処理装置は、下記の(a)および(b)から構成されるソフトウェアアプリケーションを実行するシステム。

(a) 目的ポリペプチドの少なくとも一つから複数のタンパク質分解物を生成させること。

(b) アミノ酸シーケンスの特性を定義するパラメータの少なくとも一つにより、前記複数のタンパク質分解物を解析すること。

【請求項14】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬のタンパク質分解パターンにより前記複数のタンパク質分解物が生成される請求項13記載のシステム。

【請求項15】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬が、タンパク質分解酵素およびタンパク質分解化学物質からなる群から選択されたものである請求項14記載のシステム。

【請求項16】 前記タンパク質分解酵素が、トリプシン、キモトリプシン、スブチルシン(subtilisin)、ペプシン、V8プロテアーゼ、トロンピンおよびエラスターゼからなる群から選択されたものである請求項15記載のシステム。

【請求項17】 前記タンパク質分解化学物質が、プロモシアンおよび2-nitro-5-thiocyanobenzoateからなる群から選択されたものである請求項15記載のシステム。

【請求項18】 前記アミノ酸シーケンスの特徴を定義

する前記パラメータの少なくとも一つが、分子量、アミノ酸組成、疎水性、親水性、荷電状態、二次構造、非均一性、長さ、翻訳後修飾、極性、溶解性、両親媒性特性、シーケンスおよび免疫原性からなる群から選択されたものである請求項13記載のシステム。

【請求項19】 目的ポリペプチドの少なくとも一つを測るためのキットであって、前記キットは、目的ペプチドの少なくとも一つのコンピュータ解析から得られた情報により生成された複数のペプチドを含み、前記コンピュータ解析は、目的ポリペプチドの少なくとも一つから10の複数のタンパク質分解物の生成を含むキット。

【請求項20】 前記コンピュータ解析が、さらに、アミノ酸シーケンスの特性を定義するパラメータの少なくとも一つによる前記複数のタンパク質分解物の解析および前記少なくとも一つのパラメータのために予め決めていた基準による前記複数のタンパク質分解物からの一組のタンパク質分解物の選択を含む請求項19記載のキット。

【請求項21】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬のタンパク質分解パターンにより前記複数のタンパク質20分解物が生成される請求項19記載のキット。

【請求項22】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬が、タンパク質分解酵素およびタンパク質分解化学物質からなる群から選択されたものである請求項21記載のキット。

【請求項23】 前記タンパク質分解酵素が、トリプシン、キモトリプシン、スブチルシン(subtilisin)、ペプシン、V8プロテアーゼ、トロンピンおよびエラスターゼからなる群から選択されたものである請求項22記載のキット。

【請求項24】 前記タンパク質分解化学物質が、プロモシアンおよび2-nitro-5-thiocyanobenzoateからなる群から選択されたものである請求項22記載のキット。

【請求項25】 前記アミノ酸シーケンスの特徴を定義する前記パラメータの少なくとも一つが、分子量、アミノ酸組成、疎水性、親水性、荷電状態、二次構造、非均一性、長さ、翻訳後修飾、極性、溶解性、両親媒性特性、シーケンスおよび免疫原性からなる群から選択されたものである請求項20記載のキット。

【請求項26】 前記複数のペプチドがラベルされている請求項19記載のキット。

【請求項27】 前記複数のペプチドが、固体基体に付着されている請求項19記載のキット。

【請求項28】 前記複数のペプチドが、個々の容器に含まれている請求項19記載のキット。

【請求項29】 前記複数のペプチドが、一つの容器中で混合されている請求項19記載のキット。

【請求項30】 前記複数のペプチドが、ペプチド合成により、または前記目的ポリペプチドの少なくとも一つのタンパク質分解により生成したものである請求項1950

記載のキット。

【請求項31】 目的ポリペプチドの少なくとも一つを測るためのキットであって、前記キットは、複数のペプチドの少なくとも一つのペプチドを特異的に認識可能な抗体を含み、前記複数のペプチドは、目的ペプチドの少なくとも一つのコンピュータ解析から得られた情報により生成され、前記コンピュータ解析は、目的ポリペプチドの少なくとも一つからの複数のタンパク質分解物の生成を含むキット。

【請求項32】 前記コンピュータ解析が、さらに、アミノ酸シーケンスの特性を定義するパラメータの少なくとも一つによる前記複数のタンパク質分解物の解析および前記少なくとも一つのパラメータのために予め決めていた基準による前記複数のタンパク質分解物からの一組のタンパク質分解物の選択を含む請求項31記載のキット。

【請求項33】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬のタンパク質分解パターンにより前記複数のタンパク質分解物が生成される請求項31記載のキット。

【請求項34】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬が、タンパク質分解酵素およびタンパク質分解化学物質からなる群から選択されたものである請求項33記載のキット。

【請求項35】 前記タンパク質分解酵素が、トリプシン、キモトリプシン、スブチルシン(subtilisin)、ペプシン、V8プロテアーゼ、トロンピンおよびエラスターゼからなる群から選択されたものである請求項34記載のキット。

【請求項36】 前記タンパク質分解化学物質が、プロモシアンおよび2-nitro-5-thiocyanobenzoateからなる群から選択されたものである請求項34記載のキット。

【請求項37】 前記アミノ酸シーケンスの特徴を定義する前記パラメータの少なくとも一つが、分子量、アミノ酸組成、疎水性、親水性、荷電状態、二次構造、非均一性、長さ、翻訳後修飾、極性、溶解性、両親媒性特性、シーケンスおよび免疫原性からなる群から選択されたものである請求項32記載のキット。

【請求項38】 前記複数のペプチドがラベルされている請求項31記載のキット。

【請求項39】 前記複数のペプチドが、固体基体に付着されている請求項31記載のキット。

【請求項40】 前記複数のペプチドが、個々の容器に含まれている請求項31記載のキット。

【請求項41】 前記複数のペプチドが、一つの容器中で混合されている請求項31記載のキット。

【請求項42】 前記複数のペプチドが、ペプチド合成により、または前記目的ポリペプチドの少なくとも一つのタンパク質分解により生成したものである請求項31記載のキット。

【請求項43】 生物学的サンプル中の目的ポリペプチ

ドの少なくとも一つを測定する方法であって、以下の

( a ) , ( b ) および ( c ) を含む方法。

( a ) タンパク質分解された生物学的サンプルを得るために、前記生物学的サンプルをタンパク質分解試薬の少なくとも一つの接触させること。

( b ) 前記生物学的サンプルを、少なくとも一つの抗体および複数のペプチドの少なくとも一つに接触させること。ここで、前記抗体は、前記複数のペプチドの少なくとも一つのペプチドに特異的に結合可能であり、前記複数のペプチドは、前記目的ポリペプチドの少なくとも一つのコンピュータ解析から得られた情報により生成され、前記コンピュータ解析は、前記目的ポリペプチドの少なくとも一つからの複数のタンパク質分解物の生成を含む。

( c ) 結合している抗体の存在、非存在および/またはラベルを検出することにより、前記生物学的サンプル中の目的ポリペプチドの少なくとも一つを測定すること。

【請求項44】 前記抗体の少なくとも一つが、固体基体に付着している請求項43の方法。

【請求項45】 前記固体基体は、マイクロアレイとして構成され、前記抗体の少なくとも一つは、部位特異的手法により前記マイクロアレイに各々付着している複数の抗体を含む請求項44記載の方法。

【請求項46】 前記少なくとも一つの抗体および/または前記少なくとも一つのペプチドがラベルされており、このラベルの測定により、前記(c)のステップが実行される請求項43記載の方法。

【請求項47】 前記複数のペプチドが、ペプチド合成により、または前記少なくとも一つの前記目的ポリペプチドのタンパク質分解により生成されたものである請求項43記載の方法。

【請求項48】 前記コンピュータ解析が、さらに、アミノ酸シーケンスの特性を定義するパラメータの少なくとも一つによる前記複数のタンパク質分解物の解析および前記少なくとも一つのパラメータのために予め決めていた基準による前記複数のタンパク質分解物からの一組のタンパク質分解物の選択を含む請求項43記載の方法。

【請求項49】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬のタンパク質分解パターンにより前記複数のタンパク質分解物が生成される請求項43記載の方法。

【請求項50】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬が、タンパク質分解酵素およびタンパク質分解化学物質からなる群から選択されたものである請求項49記載の方法。

【請求項51】 前記タンパク質分解酵素が、トリプシン、キモトリプシン、スブチルシン(subtilisin)、ペプシン、V8プロテアーゼ、トロンピンおよびエラスターゼからなる群から選択されたものである請求項40記

載の方法。

【請求項52】 前記タンパク質分解化学物質が、プロモシアンおよび2-nitro-5-thiocyanobenzoateからなる群から選択されたものである請求項50記載の方法。

【請求項53】 前記アミノ酸シーケンスの特徴を定義する前記パラメータの少なくとも一つが、分子量、アミノ酸組成、疎水性、親水性、荷電状態、二次構造、非均一性、長さ、翻訳後修飾、極性、溶解性、両親媒性特性、シーケンスおよび免疫原性からなる群から選択されたものである請求項48記載の方法。

【請求項54】 前記少なくとも一つのペプチドが、固体基体に付着している請求項43記載の方法。

【請求項55】 前記固体基体は、マイクロアレイとして構成され、前記抗体の少なくとも一つは、部位特異的手法により前記マイクロアレイに各々付着している複数の抗体を含む請求項54記載の方法。

【請求項56】 目的ポリペプチドに特異的な抗体の生成方法であって、前記方法は、前記目的ポリペプチドに特異的な抗体の少なくとも一つを生成させるための少なくとも一つのペプチドの使用を含み、前記少なくとも一つのペプチドは、前記目的ポリペプチドの少なくとも一つのコンピュータ解析から得られた情報により生成され、前記コンピュータ解析は、前記目的ポリペプチドの少なくとも一つからの複数のタンパク質分解物の生成を含む方法。

【請求項57】 前記コンピュータ解析が、さらに、アミノ酸シーケンスの特性を定義するパラメータの少なくとも一つによる前記複数のタンパク質分解物の解析および前記少なくとも一つのパラメータのために予め決めていた基準による前記複数のタンパク質分解物からの一組のタンパク質分解物の選択を含む請求項56記載の方法。

【請求項58】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬のタンパク質分解パターンにより前記複数のタンパク質分解物が生成される請求項56記載の方法。

【請求項59】 少なくとも一つのタンパク質分解試薬が、タンパク質分解酵素およびタンパク質分解化学物質からなる群から選択されたものである請求項58記載の方法。

【請求項60】 前記タンパク質分解酵素が、トリプシン、キモトリプシン、スブチルシン(subtilisin)、ペプシン、V8プロテアーゼ、トロンピンおよびエラスターゼからなる群から選択されたものである請求項59記載の方法。

【請求項61】 前記タンパク質分解化学物質が、プロモシアンおよび2-nitro-5-thiocyanobenzoateからなる群から選択されたものである請求項59記載の方法。

【請求項62】 前記アミノ酸シーケンスの特徴を定義する前記パラメータの少なくとも一つが、分子量、アミノ酸組成、疎水性、親水性、荷電状態、二次構造、非均

一性、長さ、翻訳後修飾、極性、溶解性、両親媒性特性、シーケンスおよび免疫原性からなる群から選択されたものである請求項57記載の方法。

【請求項63】 前記ペプチドの少なくとも一つが、ペプチド合成により、または前記少なくとも一つの前記目的ポリペプチドのタンパク質分解により生成されたものである請求項56記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、目的ポリペプチドのペプチド標本および抗原に対する抗体に関するものである。特に、本発明は、前記ペプチドおよび抗体の生成および利用のための方法、システムおよびキットに関する。

【0002】

【従来の技術】イムノアッセイ（免疫分析法）は、臨床検査のもっとも一般的なアッセイであり、生物分子の検出、測定および特徴づけのために使用される技術として、もっとも成長スピードが速いものの一つである。表現型スクリーニング、受容体結合および酵素活性を基にしたバイオアッセイもまた、一般的な手法であるが、多くの例が示すように、このようなバイオアッセイは、イムノアッセイの特異性および無限の適用性と同じものを提供することができない。

【0003】抗体の特異性、交差相対活性（cross-reactivity）およびラベル等のイムノアッセイのパラメータは、イムノアッセイの改良のために、多大な努力の下、研究が続けられている[Marks et al. (1992) Biotechnology 10:779-783, Soderlind et al. (1999) Immunotechnology 4:279-285, Ohlin et al. (1996) Mol. Immunol. 33:47-56 and Hemminiki et al. (1998) Immunotechnology 4:59-69]。

【0004】抗体工学

チェーンシャッフリング（chain shuffling）；抗体の相補的決定領域（超可変領域、CDRs）および可変（V）領域をそれぞれ若しくは組み合わせることでコードする遺伝子断片の混合（シャッフリング）の原理は、パリエーションを創造することが可能であり、それは、抗体の親和性の改良に用いることができる [Marks et al. (1992) Biotechnology 10:779-783, Soderlind et al. (1999) Immunotechnology 4:279-285 and Soderlind et al. (2000) 18:852-6]。最初の例の一つは、ハプテン（2-phenyloxalozone）に対するヒトファージ抗体の遺伝子混合である。これは、非免疫ドナーから得たV領域遺伝子のレパートリーによるV領域遺伝子の重鎖および軽鎖の配列の取り替えにより達成でき、その結果、親和性が300倍も増加した。

【0005】ファージディスプレイ；コートタンパク質と抗体断片とからなる融合タンパク質を発現する設計されたファージ粒子を、抗体選択のために使用することが

できる。そのようなファージ粒子は、固定化抗原によりアフィニティー精製され、微生物宿主で増幅され、大きなレパートリーからの抗体の選択に使用される（例えば、ライブラリー）[Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982]。 “免疫レパートリー” と “無処理（naive）レパートリー” の二つのタイプのレパートリーが使用される。[Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4:1-20]。免疫レパートリーの使用の主な利点は、選択された抗体に高い親和性が期待できることであり、一方、不利な点は、新たなレパートリーにおいて、それぞれ新たな抗原が必要となることである。この点において、一度構築してしまえば、それらは殆ど無限に抗原の多様な範囲に対し使用できるから、無処理のライブラリーは実際的である。しかし、無処理のライブラリーは、適切な親和性で抗体を産生するために、大きくする必要がある。

【0006】人工的な抗体：最近、“プラスチックボディ（plastibodies）” のような、非生物学的代替抗体が開発されている[Haupt et al. (1998) Trends Biotech. 16:468-475]。前記プラスチックボディの原理は、分子的刷り込みに基づいている。すなわち、ポリマーで認識部位を直接型どり、それによって、自然の抗体の結合部位を真似るのである。このようなプラスチック（ポリマー）的な構築は、テオフィリンおよびジアゼパム等に対する分子刷り込み吸着アッセイ（MIA）において使用される[Vlatakiset al. (1993) Nature 361:645-647]。プラスチックボディは、交差相対活性を示し、薬剤に関する構造的なもに向いており、自然な抗体に似ている。抗体に変わる分子の設計における主要な問題は、低い親和性のものが得られることであり、これはプラスチックボディの認識部分の固さによるものと思われる。

【0007】 “抗体類似体” の特性による分子構成物の他の例は、ヘリカル微生物受容体の “knottin scaffolds” またはZドメインである。前記Zドメインは、分子外のジスルフィド架橋に依存せず、極端なpHおよび温度条件において安定性が高く、したがって、診断的および親和的な精製のような適用においてknottin scaffoldsを価値あるものにする。見込みがあるにも関わらず、Zアプローチは、高い分離定数の傾向があり、そのため、一般的な適用が限られる。

【0008】免疫原

全体タンパク質の免疫原：全体タンパク質の注射は、自然な形の抗原を認識し得る親和性の高い抗体を得るための好ましい方法である。自然な抗原を認識可能な抗体は、しばしば、診断、ワクチン医療および抗体に基づいた新規の治療法の分野で用いられる。しかし、正しく折りたたまれたタンパク質の十分な量の抽出等のような、様々な困難が、全体タンパク質免疫原にはある。さらに、全体タンパク質若しくはその巨大タンパク質を免疫原として利用するモノクローナル抗体技術は、そのよう

な免疫原に対する免疫応答を狭くする(特異的にする)のに有用であるが、免疫原として巨大タンパクを使用すると、前記巨大タンパクの多数のエピトープに対するポリクローナル抗体を含む抗血清が産生される。しかし、モノクローナル抗体技術は、長期間を要し、また特異的に免疫原を認識し得る抗体の産生量が相対的に少ない。また、上手くいった場合でも、この技術は、抗原のエピトープの生化学的な予測ができない。

【0009】合成ペプチド免疫原;合成ペプチドワクチンの研究は、過去20年間にわたって活発に行われた (Arnon, 1991; Steward and Howard, 1987)。しかし、モノクローナル抗体の大変小さい部分が、完全に自然のタンパク質と同様に合成ペプチド免疫原を認識する自然のタンパク質から得られた適度な長さのペプチドの不足をおこした [Arnheiter et al. (1981) Nature 294:278-280]。さらに、免疫複合体により示される乖離定数は、むしろ高い。

【0010】キャリアのための合成ペプチドの結合は、自然なタンパク質に対する合成ペプチドに対する抗体の親和性の改良を中心に、試みられた[Mariani M., et al. (1987) Mol. Immunol. 24:297-303]。例えば、Marianiと共同研究者等は、ヒト絨毛性ソマトマンモトロピン(hCS)の自然な分子に対するモノクローナル抗体反応を引き出すために、hCSのアミノ酸シーケンスの166-174アミノ酸残基に対応する合成ペプチドにコンジュゲートさせた。選択された抗体クローンは、アイソタイプおよび親和性で特徴づけた。予想したように、hCSペプチドにコンジュゲートしたキャリアで得られた抗体は、コンジュゲートしなかったペプチドで得られたものより、平均で100倍も高い親和性を示した。有望であるにもかかわらず、このアプローチは、生物学的サンプルから得られた、若しくはその中にある抗原に対し結合することができなかった。

【0011】この分野において、合成ペプチド免疫原の開発のための、いくつかの付加的なアプローチが知られている。例えば、米国特許第6,261,569号には、部分的若しくは完全なレトロ-インベルソ(retro-inverso)修飾の抗原類似体が開示されている。前記抗原類似体は、自然なペプチド抗原の免疫的な活性を真似できる。前記米国特許に開示されているが、これらの類似体は、免疫動物に免疫原として投与されれば、抗原産生を誘発し、前記抗原は自然のペプチド抗原を認識できるが、ペプチド抗原には、ワクチンの分野では、成功に限界がある。抗原抗体結合に関する知識における制限は、インベルソ、レトロ若しくはレトロ-インベルソのペプチドに対して引き出される高原の結合効率および特性のための正確な予測を妨害する。レトロインベルソ抗原類似体の概念は、Lernerおよびその共同研究者により挑戦された(Lerner, 1984)。彼等は、インフルエンザ・ウイルスヘム・アグルチン・ペプチドのnative, retro-, invers

o-およびretro-Inversoの形態に対し生成した抗体が、自然なペプチド抗原と交差反応しないことを報告した。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】したがって、目的タンパク質のペプチド標本、およびそれに対する高い親和性の抗体、および、例えば、生物学的サンプル中のタンパク質等のポリペプチドの検出、測定および/または特徴付けのための前記ペプチド標本および抗体の生成方法および利用方法が強く求められている。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明の一つの側面は、目的ポリペプチドの少なくとも一つのアミノ酸シーケンスの組を生成する方法であって、下記の(a)、(b)および(c)を含む方法の提供である。

(a) 目的ポリペプチドの少なくとも一つから複数のタンパク質分解物をコンピュータ上で生成させること。

(b) アミノ酸シーケンスの特性を定義するパラメータの少なくとも一つにより、前記複数のタンパク質分解物をコンピュータで解析すること。

(c) 各前記パラメータのための予め決められた基準により、前記複数のタンパク質分解物から一組のタンパク質分解物を選択し、それによって、目的のポリペプチドの少なくとも一つのアミノ酸シーケンスのセット(組)を生成させる。

【0014】本発明のその他の側面は、目的ポリペプチドの少なくとも一つに対応するアミノ酸シーケンスのデータベースを含むコンピュータ読み取り可能記録媒体であって、前記アミノ酸シーケンスが、以下の(a)、(b)および(c)から生成されるコンピュータ読み取り可能記録媒体を提供することである。

(a) 目的ポリペプチドの少なくとも一つから複数のタンパク質分解物をコンピュータ上で生成させること。

(b) アミノ酸シーケンスの特性を定義するパラメータの少なくとも一つにより、前記複数のタンパク質分解物をコンピュータで解析すること。

(c) 各前記タンパク質分解物のシーケンスを記録することにより、アミノ酸シーケンスのデータベースを生成すること。

【0015】本発明のさらに他の側面は、目的ポリペプチドの少なくとも一つのアミノ酸シーケンスのデータベースを生成するシステムであって、前記システムは、演算処理装置(PU)を含み、前記演算処理装置は、下記の(a)および(b)から構成されるソフトウェアアプリケーションを実行するシステムを提供することである。

(a) 目的ポリペプチドの少なくとも一つから複数のタンパク質分解物を生成させること。

(b) アミノ酸シーケンスの特性を定義するパラメータの少なくとも一つにより、前記複数のタンパク質分解物を解析すること。

【0016】本発明のさらのその他の側面は、目的ポリペプチドの少なくとも一つを測るためのキットであって、前記キットは、目的ペプチドの少なくとも一つのコンピュータ解析から得られた情報により生成された複数のペプチドを含み、前記コンピュータ解析は、目的ポリペプチドの少なくとも一つからの複数のタンパク質分解物の生成を含むキットを提供することである。

【0017】前記本発明の好ましい実施形態において、前記複数のペプチドはラベルされていることが好ましい。

【0018】前記本発明の好ましい実施形態において、複数のペプチドは固体基体に付着されていることが好ましい。

【0019】前記本発明の好ましい実施形態において、前記複数のペプチドは、個々の容器に入っていることが好ましい。

【0020】前記本発明の好ましい実施形態において、前記ペプチドは、一つの容器中で混合されていることが好ましい。

【0021】前記本発明の好ましい実施形態において、前記複数のペプチドが、ペプチド合成により、または前記目的ポリペプチドの少なくとも一つのタンパク質分解により生成したものであることが好ましい。

【0022】本発明の追加的な側面は、目的ポリペプチドの少なくとも一つを測るためのキットであって、前記キットは、複数のペプチドの少なくとも一つのペプチドを特異的に認識可能な抗体を含み、前記複数のペプチドは、目的ペプチドの少なくとも一つのコンピュータ解析から得られた情報により生成され、前記コンピュータ解析は、目的ポリペプチドの少なくとも一つからの複数のタンパク質分解物の生成を含むキットを提供することである。

【0023】前記本発明の好ましい実施形態において、前記本発明の好ましい実施形態において、前記複数のペプチドはラベルされていることが好ましい。

【0024】前記本発明の好ましい実施形態において、複数のペプチドは固体基体に付着されていることが好ましい。

【0025】前記本発明の好ましい実施形態において、前記複数のペプチドは、個々の容器に入っていることが好ましい。

【0026】前記本発明の好ましい実施形態において、前記ペプチドは、一つの容器中で混合されていることが好ましい。

【0027】本発明のさらに追加的な側面は、生物学的サンプル中の目的ポリペプチドの少なくとも一つを測定する方法であって、以下の(a)、(b)および(c)を含む方法を提供することである。

(a) タンパク質分解された生物学的サンプルを得るために、前記生物学的サンプルをタンパク質分解試薬の

少なくとも一つの接触させること。

(b) 前記生物学的サンプルを、少なくとも一つの抗体および複数のペプチドの少なくとも一つに接触させること。ここで、前記抗体は、前記複数のペプチドの少なくとも一つのペプチドに特異的に結合可能であり、前記複数のペプチドは、前記目的ポリペプチドの少なくとも一つのコンピュータ解析から得られた情報により生成され、前記コンピュータ解析は、前記目的ポリペプチドの少なくとも一つからの複数のタンパク質分解物の生成を含む。

(c) 結合している抗体の存在、非存在および/またはラベルを検出することにより、前記生物学的サンプル中の目的ポリペプチドの少なくとも一つを測定すること。

【0028】前記本発明の好ましい実施形態において、複数のペプチドは固体基体に付着されていることが好ましい。

【0029】前記本発明の好ましい実施形態において、前記固体基体は、マイクロアレイとして構成され、前記抗体の少なくとも一つは、部位特異的手法により前記マイクロアレイに各々付着している複数の抗体を含むことが好ましい。

【0030】前記本発明の好ましい実施形態において、前記少なくとも一つの抗体および/または前記少なくとも一つのペプチドがラベルされており、このラベルの測定により、前記(c)のステップが実行されることが好ましい。

【0031】前記本発明の好ましい実施形態において、前記固体基体は、マイクロアレイとして構成され、前記抗体のそれぞれは、部位特異的手法により前記マイクロアレイに各々付着していることが好ましい。

【0032】本発明のさらに追加的な側面は、目的ポリペプチドに特異的な抗体の生成方法であって、前記方法は、前記目的ポリペプチドに特異的な抗体の少なくとも一つを生成させるための少なくとも一つのペプチドの使用を含み、前記少なくとも一つのペプチドは、前記目的ポリペプチドの少なくとも一つのコンピュータ解析から得られた情報により生成され、前記コンピュータ解析は、前記目的ポリペプチドの少なくとも一つからの複数のタンパク質分解物の生成を含む方法を提供することである。

【0033】前記本発明の好ましい実施形態において、前記コンピュータ解析が、さらに、アミノ酸シーケンスの特性を定義するパラメータの少なくとも一つによる前記複数のタンパク質分解物の解析および前記少なくとも一つのパラメータのために予め決めていた基準による前記複数のタンパク質分解物からの一組のタンパク質分解物の選択を含むことが好ましい。

【0034】前記本発明の好ましい実施形態において、少なくとも一つのタンパク質分解試薬のタンパク質分解

パターンにより前記複数のタンパク質分解物が生成されることが好ましい。

【0035】前記本発明の好ましい実施形態において、少なくとも一つのタンパク質分解試薬が、タンパク質分解酵素およびタンパク質分解化学物質からなる群から選択されたものであることが好ましい。

【0036】前記本発明の好ましい実施形態において、前記タンパク質分解酵素が、トリプシン、キモトリプシン、スブチルシン(subtilisin)、ペプシン、V8プロテアーゼ、トロンピンおよびエラスターゼからなる群から選択されたものであることが好ましい。

【0037】前記本発明の好ましい実施形態において、前記タンパク質分解化学物質が、プロモシアンおよび2-nitro-5-thiocyanobenzoateからなる群から選択されたものであることが好ましい。

【0038】前記本発明の好ましい実施形態において、前記アミノ酸シーケンスの特徴を定義する前記パラメータの少なくとも一つが、分子量、アミノ酸組成、疎水性、親水性、荷電状態、二次構造、非均一性、長さ、翻訳後修飾、極性、溶解性、両親媒性特性、シーケンスおよび免疫原性からなる群から選択されたものであることが好ましい。

【0039】本発明は、免疫原およびそれに対する抗体の生成のための新規アプローチおよびそれをを用いた新規イムノアッセイの提供により、従来の問題点を解決するものである。

#### 【0040】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照しながら例をあげて、本発明を説明する。図面に関する詳細な説明において、本発明の好ましい実施形態を説明する目的のために、例により説明するだけであり、本発明の原理とコンセプトを確実に理解するのに有用であると信じる。これに関し、本発明の基本的理解のために必要である以上の本発明の細かな説明はしていない。また、図面を参照した説明により、本発明は、当業者に実施可能である。

#### 【0041】好ましい実施形態の詳細な説明

本発明は、目的ポリペプチドの標本ペプチドおよびその抗体に関する。特に、本発明により生成されたペプチドは、生物学的サンプルから得られた、若しくはそれに含まれるタンパク質の検出、測定、特徴付けに有用な抗体の生成に使用できる。

【0042】本発明の原理と操作は、図面とその説明により、一層理解できるだろう。本発明の好ましい実施敬愛の少なくとも一つの詳細な説明の前に、実施例の箇所の図面および説明において示された構成要素のアレンジや構築の適用において、本発明は限定されないことを理解すべきである。本発明は、様々な手法により、他の実施形態になり得るし、他の実施若しくは実行も可能である。また、ここで用いられている語法や用語は、説明の目的で使用されており、限定的な解釈に用いられるもの

ではないことを理解すべきである。

【0043】抗体は、診断、予防医学および治療の分野で広く使用される。今日において、抗体の生成には、精製された無処理タンパク質若しくは合成ペプチドが、好ましい免疫原として使用される。前者において、正確に折りたたまれたタンパク質の有効量の抽出が必要とされることから、これは熟練した経験が必要となる方法であり、この意味で前者には制限がある。後者は、低い免疫原性と高い解離定数という欠点がある。

【0044】、本発明は、目的ポリペプチドの標本ペプチドおよびその抗体を生成するための新規な方法を提供するものであり、前記抗体は、最小の交差活性において、抗原を認識できる。以下の実施例で述べるように、本発明は、免疫対象生物に投与された場合、サンプル中のタンパク質を認識し得る抗体を生成し得る新規のペプチド抗原を提供する。前記サンプルは、低い濃度のタンパク質および/または抗原的領域が少ないタンパク質を含む。

【0045】“アミノ酸シーケンス”という用語は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質およびその断片のシーケンスを意味する。これらの分子は、自然のものであっても合成のものであってもよい。

【0046】“目的ポリペプチド(polypeptide-of-interest)”という用語は、ここでは、自然のポリペプチド若しくはその抗原的断片という意味で、使用される。本発明による目的ポリペプチドは、特に制限されず、病原等のポリペプチドを含む。例えば、小児麻痺(poliomyelitis)、B型肝炎(hepatitis B)、口蹄疫(foot and mouth disease of livestock)、破傷風(tetanus)、百日咳(pertussis)、HIV、コレラ、マラリア、インフルエンザ、狂犬病(rabies)若しくはジフテリアを起こすようなもの、ロバストキシン(robotoxin)、病原性大腸菌の熱変性毒素、Shigella dysenteriaeのシガトキシン、ブドウ球菌(staphylococcus aureus)からのマルチドラッグ耐性株のポリペプチド等の毒素、アルツハイマーのアミロイドタンパク質のような変性疾病に関する抗原、ヒト絨毛ゴナドトロピンゴナドトロピン放出ホルモン等の妊娠や出産に関する抗原がある。

【0047】目的ポリペプチドは、特に制限されず、成長因子、成長因子に関する受容体、腫瘍腫瘍に関する抗原細胞において増加若しくは減少するタンパク質をコードするガン遺伝子等の腫瘍に関する抗原も含む。例えば、トランスフェリン成長因子(Tf)、上皮成長因子受容体(HER1-3)、繊維芽細胞成長因子受容体(FGFR-1)、上皮成長因子(FGF)、p21-Ras、p53、ERa、bcl-2、a-fetoprotein(AFP)のような癌胎性抗原および癌胚抗原(CEA)、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1,2等がある。前期目的ポリペプチドは、腫瘍の特異的抗原になり得る。前記抗原は、生体において、腫瘍細胞

に特異的に発現し、正常細胞では存在しない。また、前記目的ポリペプチドは、DNA修復、アポトーシスの抑制若しくは亢進または細胞の寿命に関する。したがって、本発明は、一つ以上の目的ポリペプチドのアミノ酸シーケンスの一組を生成する方法を提供することである。この点において、本発明は、いくつかのステップによって効果付けられる。

【0048】最初に、目的ポリペプチドの少なくとも一つの複数のタンパク質分解物が、一つ以上のタンパク質分解試薬の公知のタンパク質分解パターンによりコンピュータ上で生成される。コンピュータの生成に続き、目的ポリペプチドのタンパク質分解物のシーケンスが、アミノ酸シーケンスを特徴づける一つ以上のパラメータで解析される。これらのパラメータは、目的ポリペプチドから得られた一組のアミノ酸シーケンスの選択のために予め決められた基準により、個々に若しくは組み合わせて使用される。目的ポリペプチドの一つ以上を示すシーケンスは、最適なコンピューティングプラットフォームにより生成可能なデータベースに保存される。本発明のアミノ酸シーケンスは、さらに、ペプチドおよびその抗体の生成のために使用することができる。前記ペプチドおよび抗体は、診断キットに含めることができ、種々の治療や診断法において使用することができる。前述のタンパク質分解物は、一つ以上のタンパク質分解試薬の公知のタンパク質分解パターンによりコンピュータ上に生成できる。これは、アミノ酸シーケンス内のタンパク質分解部位の認識およびそのようなタンパク質分解のアミノ酸シーケンスを生成可能なソフトウェアを用いることにより、実施可能である。

【0049】Sciprot( [HYPERLINK "http://www.asiaonline.net.hk/~twcbio/DOCS/1/scPrtein.htm"](http://www.asiaonline.net.hk/~twcbio/DOCS/1/scPrtein.htm) [www.asiaonline.net.hk/~twcbio/DOCS/1/scPrtein.htm](http://www.asiaonline.net.hk/~twcbio/DOCS/1/scPrtein.htm)から入手可能)、GCG package (Genetics Computer Group, Wisconsin) 若しくはMacvector (available from [HYPERLINK "http://www.accelrys.com/products/macvector/"](http://www.accelrys.com/products/macvector/))のような [www.accelrys.com/products/macvector/](http://www.accelrys.com/products/macvector/))のような、専用のソフトウェアを使用することが好ましいが、文書編集アプリケーションソフト(例えば、マイクロソフト社のWord)等のようなソフトウェアを用いてアミノ酸シーケンスのタンパク質分解を行うことができる。専用でないソフトウェアは、文字と数字を組み合わせた(アルファベット)特徴シーケンス(例えば、分解部位)の認識およびユーザーの指令による分解物に対応するアミノ酸シーケンスの生成に使用可能である(例えば、Word Macro)。

【0050】特別なアミノ酸残基間のポリペプチドを分解可能(例えば、タンパク質分解パターン)であれば、前記タンパク質分解試薬は、いずれの試薬であってもよい。本発明の実施形態の一つによれば、タンパク質分解試薬は、タンパク質分解酵素である。タンパク質分解酵

素は、特に制限されず、例えば、トリプシン、来もトリプシン、V8プロテアーゼ、ペプシン、スブチルシン(subtilisin)、トロンピン、エラスターゼ、caspase-1, caspase-2, caspase-3, caspase-4, caspase-5, caspase-6, caspase-7, caspase-8, MetAP-2、アデノウイルスプロテアーゼ、HIVプロテアーゼ等がある。本発明の他の実施形態によれば、タンパク質分解試薬は、シアン化臭素および2-nitro-5-thiocyanobenzoate等のタンパク質分解化学試薬である。本発明では、公知のタンパク質分解試薬が使用できるが、基質を完全に分解するタンパク質分解試薬もしくはその組み合わせが好ましい。

【0051】コンピュータ上での生成に続き、目的ポリペプチドから得られたタンパク質分解アミノ酸シーケンスが、アミノ酸シーケンスの特徴を定義する一つ以上のパラメータによりコンピュータ上で解析される。前記パラメータは、特に制限されず、例えば、分子量、アミノ酸組成、疎水性、親水性、荷電状態、二次構造、非均一性、長さ、翻訳後修飾、極性、溶解性、両親媒性特性、シーケンスおよび免疫原性などがある。コンピュータ上で生成された個々のペプチド産物は、一つ、好ましくはいくつかのパラメータにより分類される。この詳細を以下に説明する。

【0052】パラメータの各々は、予め決定された基準若しくは他のパラメータとの組み合わせにより、別々に考慮することができ、その場合、各パラメータは、その重要性により重み付けされる。いずれの場合でも、各ペプチド産物は点数付け(スコア)される。それぞれのペプチドのスコアは、絶対的スコアであってもよく、この場合、予め決めた境界より上のスコアが選ばれ、若しくは、その代わりに、最も高いスコアのペプチドを選んだ場合に、そのスコアを比例させることができる。

【0053】シーケンス解析は、種々のタンパク質解析ソフトを用いて行ってもよいが、全部もしくは部分的に、その様な用途ではないソフトウェアを用いて行ってもよい。そのような専用ではないソフトウェアは、例えば、Microsoft Excel(登録商標、マイクロソフト社から入手可能)のようなスプレッドシートソフトウェア(spread-sheet software、表計算ソフト)がある。

【0054】以下に詳細に説明するパラメータは、本発明において、ペプチドシーケンスの解析に使用することができる。

【0055】ホモロジーレベル：コンピュータで作成したペプチドのシーケンスは、実質的な非類似性、(たんに質特有性)シーケンスの同定のために、タンパク質データベースと比較される。好ましくは、BLAST(Basic Local Alignment Search Tool、[HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)から入手可能)若しくはスミス([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)から入手可能)若しくはスミス-ウォーターマンアルゴリズム(Smith-Waterman

an algorithm) の使用により、全ての公知のタンパク質データベースと比較する。データベースシーケンスに対し、低いホモロジーを示すシーケンス、例えば、40%未満、好ましくは30%未満、より好ましくは20%未満、さらに好ましくは10%未満、若しくは最適には0~5%の低いホモロジーのシーケンスを選択するか、若しくは定性のために使用するパラメータの数およびタイプに応じ高いスコアを与える。

【0056】免疫原性：コンピュータで作成したペプチドは、特異的免疫応答、特に抗体応答を誘発できる能力について解析できる。この分野において種々のシーケンス解析ソフトが知られており、例えば、ジェイムソン-ウォルフアルゴリズム (Jameson-Wolf algorithm) 等による免疫原性指標 (インデックス) が提供される。前記アルゴリズムは、特に制限されないが、例えば、Scipro (www.asiaonline.net.hk/~twcbio/DOCS/1/scPrtein.htmから入手可能) and Macvector (www.accelrys.com/products/macvector/から入手可能) およびGCG package (Genetics Computer Group, Wisconsin) 等がある。免疫原性は、全体として若しくは部分的に、以下の免疫原の特性により、決定される。

【0057】異質性 (Foreignness) ; 免疫応答を引き出すために、アミノ酸シーケンスは、免疫対象生物の免疫システムにより非自己として認識されなければならない。一般的に、二つの種 (抗原を提供する種と免疫される種) の間の系統発生的な距離が大きくなればなるほど、それらの間の遺伝子的格差および抗原的格差も大きくなる。

【0058】分子サイズ：アミノ酸シーケンスの大きさと、その免疫原性との間には、相関がある。本発明において、少なくとも1000ダルトン (Da)、好ましくは5000Da、より好ましくは10000Da、最適には10000Daの分子サイズを持つアミノ酸シーケンスが望ましく、そのようなものは、選択され、かつ高いスコアが与えられる。

【0059】化学組成および異質性  
一般に、ホモポリマー (例えば、一種類のアミノ酸残基からなるポリマー) は、そのサイズにかかわらず、免疫原性に欠ける傾向がある。2つ以上のアミノ酸残基を持ち、かつ十分なサイズのコポリマーは、免疫性である。また、タンパク質の4つのレベルの構造である、一次構造、二次構造、三次構造および四次構造の全てが、その免疫原性に影響を与える。基本的には、抗原のプロセスと表示の感受性において、退化できず、かつMHC分子と共に存在するポリペプチドは、免疫原性に乏しい。さらに、小さな溶解性分子は、食細胞に食べられやすいから、大きな溶解性分子は、小さな溶解性分子より、免疫原性が高い。

【0060】翻訳後修飾：コンピュータで作成したペプチドは、存在、非存在および/または翻訳後修飾のレベ

ルにより、解析される。アミノ酸残基における100以上の翻訳後修飾が知られており、これらは特に制限されず、例えば、リン酸化、アセチル化、メチル化、水酸化、カルボキシ化、糖化等がある。与えられたアミノ酸シーケンスにおいて予想される翻訳後修飾を決定できるシーケンス解析ソフトウェアとしては、例えば、真核生物タンパク質におけるセリン、スレオニンおよびチロシンのリン酸化部位のためのニューラルネットワーク予測をプロデュースするNetPhosサーバ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)、GPI修飾部位予測 (<http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi>) および全タンパク質解析のためのExpASYプロテオミクスサーバ (HYPERLINK "<http://www.expasy.ch/tools/>") 等がある。

【0061】一般に、翻訳後修飾アミノ酸シーケンスあ、しばしば、精製が難しく、また免疫原性に乏しいことが多いため、翻訳後修飾部位を欠如したペプチドが好ましい。しかし、翻訳後修飾を含むポリペプチドは、目的ポリペプチドの生物学的活性を示し、本発明において使用することもできる。最も一般的な例は、ペプチドにおけるセリン、スレオニンおよびチロシンのアミノ酸残基側鎖のOH基のリン酸化であり、この修飾により、その機能的活性を増大もしくは減少させる。

【0062】サイズ；アミノ酸シーケンスにおいて、分子量が600から1800Daで、シーケンスの長さが5から12のものが好ましい。サイズの限定は、他のポリペプチドとのホモロジー - の最小化および大きなポリペプチドの合成、精製および折りたたみに関する技術的困難性の要求による (免疫原性とサイズの限定は、前で述べた。) 前述のパラメータは、コンピュータで作成したペプチドの解析および本発明において最も適した一組のペプチドの選択のために、個々に若しくは組み合わせ使用される。いくつかのパラメータが試験された場合、スコアリングシステム、例えば、スコアリングマトリックス (scoring matrix) を使用することが好ましい。翻訳後修飾およびサイズより免疫原性がより重要となる場合があり、他方、シーケンスホモロジー - は、最も重要なパラメータであるかもしれないので、パラメータの重みづけをするスコアリングマトリックスの使用は、最も適したペプチドの選択を可能にする。スコアリングマトリックスは、マトリックスのY軸上にパラメータを示し、X軸と交差して種々の (ペプチドの) アミノ酸シーケンスをリストできる。パラメータは、それぞれのペプチドから選択された一つの値からの予め決められた値の領域および重みを含む。最後に、特別のペプチドの各パラメータのスコアを合計し、その結果を解析する。スコアの合計が特別の境界を越えたペプチドを、ペプチドセットとして集める。スコアが高いほど、グルーピングの基準をより厳しくする。つぎに、最も高いスコアを示したペプチドの組 (セット) を選ぶ。それから、目的ポリペプチ

ドを示すこれらのシーケンスは、磁気ディスク、光磁気ディスク若しくは光ディスクのようなコンピュータ読み取り可能記録媒体に記録可能なデータベースの作成に使用できる。シーケンス情報に付け加え、前記データベースは、データベースの生成、ペプチドシーケンスの選択に使用したパラメータ、保存したシーケンスの推定使用、およびそこから生成したシーケンス若しくはポリペプチドに関するその他の種々の注釈（アノテーション）およびリファレンス等に関する追加データを含む。

【0063】本発明のその他の側面によれば、図1に示すように、本発明のペプチドシーケンスのデータベースは、そのような機能のために設計および構築されたシステムにより作成される。前記システムは、ここでシステム10として示される。システム10は、処理装置12を含み、これは前述したような一つ以上のポリペプチドからふくすのタンパク質分解物を生成および好ましくは解析するために設計および構築されたソフトウェアアプリケーションを実行する。また、システム10は、データベース若しくはデータベース関連情報を入力するためのユーザー入力インターフェース（例えば、キーボードおよび/またはマウス）、およびユーザーにデータベース情報を提供するためのユーザー出力インターフェース（例えば、モニター）を含む。本発明のシステム10は、記録シーケンスの照会のために、記録シーケンスを回収するために、若しくはユーザが入力したシーケンスからシーケンスを作成するために、ユーザにより使用されてもよい。システム10は、この分野で知られているいずれのコンピューティングプラットフォームでもより、特に限定されず、例えば、パーソナルコンピュータ、ワークステーション、メインフレーム等がある。システム10により作成され保存されたデータベースは、システム10のユーザーにより、若しくはシステム10と接続した遠隔のユーザによりアクセスできる。

【0064】図2は、本発明において、遠隔的に構築されたシステム10を示す。このような構成において、遠隔のユーザ18と処理装置12のコミュニケーションは、コミュニケーションネットワーク20により実行される。コミュニケーションネットワーク20は、特に制限されず、個人的ネットワークでも公のネットワークでもよく、例えば、通常の電話もしくは携帯電話のネットワーク、インターネット、イントラネット、サテライトネットワーク若しくはこれらの組み合わせのコンピュータネットワーク等である。図2に示すように、コンピュータネットワーク20は、一つ以上のコミュニケーションサーバ22（その一つを図2に示す）を含み、前記サーバは、遠隔ユーザ18と処理装置12との間において、目的ポリペプチドに関するデータのコミュニケーションを図る。多数のサイト24と遠隔解析サイト26の間のデータコミュニケーションをサポートするために必要なアプリケーションおよびコミュニケーションを提供可能な

インターネットのようなコンピュータネットワークの存在が好ましい。例えば、ウェブブラウザアプリケーションおよびワールドワイドウェブ（WWW）のコンピュータ操作の使用により、目的ポリペプチドは、データベースサーバ28により管理されているウェブサイトのユーザ18により、“アップロード”できる。アップロードに続き、処理装置12として働くデータベースサーバ28を、前述のように、ポリペプチドを処理するために、ユーザにより指示することができる。前期処理は、リアルタイムで実行でき、この処理に続き、例えば、その結果を、データベースサーバ28により管理されているウェブサイトに表示したり、電子メールによるコミュニケーションによりサイト24に返信したりできる。したがって、インターネットの使用により、遠隔的に構築されているシステム10は、複数のサイト24（一つを図2に示す）にタンパク質解析サービスを提供できる。ポリペプチド解析が、サイト上で実行できない場合、本発明の前記システム10は特に有利である。例えば、解析するのに必要な装置がない、若しくはそれを操作する技術が欠けている研究室において、有用である。

【0065】本発明により選ばれたペプチドの組は、それによりペプチドが生成し選択される酵素的タンパク質分解により、若しくはペプチド合成方法により、ペプチドを生成するのに使用できる。タンパク質分解ペプチドは、周知の従来技術により、クロマトグラフィー若しくは電気泳動により分離でき、また精製しかつ復元できる。合成ペプチドは、例えば、標準固相技術のような、この分野で知られている古典的な手法で調製できる。標準的な技法は、例えば、限定的固相合成、部分的固相合成法、断片濃縮、古典的溶液合成および組換えDNA技術等がある。マリーフィールド（Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963))を参照のこと。固相ペプチド合成手法は、当分野でよく知られており、また、ジョン・マロー・スチュワート（John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984)に記載されている。合成ペプチドは、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）により精製でき[Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.]、組成は、アミノ酸シーケンスで確認できる。

【0066】タンパク質特異性および免疫原性のために、本発明により得られたペプチドは、高い親和性および特異性により特徴付けられた抗体の生成に使用できる。本発明により得られたペプチドおよびその抗体は、診断若しくは治療の双方の目的に使用可能である。例えば、目的タンパク質の選ばれたアミノ酸シーケンスに対応するペプチドは、目的タンパク質の抗体産生のために、免疫生物に免疫原として直接投与できる。そのよう

な抗体は、タンパク質関連疾病において、高い親和性結合および特異性により特徴づけられ、そのようなペプチドは、治療薬として使用可能である。そのようなペプチドは、抗体（モノクローナル若しくはポリクローナル）抗体の生成に使用でき、また、それは、診断の目的にも使用できる。宿主生物は、特に制限されず、様々なものが使用でき、例えば、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒトなどであり、抗体生成の目的でペプチドを注射することにより免疫される。宿主生物の種類（種）により、免疫応答を増強するために、種々のアジュバントが使用される。そのようなアジュバントは、特に制限されず、例えば、水酸化アルミニウムのようなフレウンのミネラルゲル（Freund's mineralgels）、lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin および dinitrophenol 等の界面活性剤があげられる。モノクローナル抗体は、培地中の継続的セルラインにより抗体分子を産出するいずれの技術を用いても調製できる。これらの方法は、特に限定されず、例えば、ハイブリドーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法、およびthe Epstein-Bar-Virus(EBV)-ハイブリドーマ法[Kohler G., et al. (1975) Nature 256:495-497, Kozbor D., et al. (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42, Cote R.J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030, Cole S.P. et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 62:109-120]等がある。さらに、“キメラ抗体”の作成の技術が開発された。これは、特異的で生物学的な活性の適切な抗原により、マウスの抗体遺伝子をヒトの抗体遺伝子とスプライシングさせたものを得るために使用することができる[Morison S.L. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855, Neuberger M.S. et al. (1984) Nature 312:604-608, Takeda S. et al. (1985) Nature 314:452-454]。単鎖の抗体を産出させるための技術は、当分野の公知の方法により、適用できる。また、抗体は、リンパ球集団におけるインビボでの誘発により、または免疫グロブリンのライブラリーのスクリーニング若しくは高特異性結合試薬により、作成できる[Orlandi D.R. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3833-3837, Winter G. et al. (1991) Nature 349:293-299]。

【0067】抗体断片も同様にして生成できる。例えば、F(ab')<sub>2</sub>断片は、抗体分子をペプシンで消化することにより作成でき、Fab断片は、F(ab')<sub>2</sub>のジスルフィド結合の還元により作成できる。Fab発現ライブラリーは、モノクローナルFab断片の素早いかつ簡単な同定で構築可能である [Huse W.D. et al. (1989) Science 254:1275-1281]。

【0068】種々のイムノアッセイは、所定の特異性を持つ抗体のスクリーニングのために使用できる。ポリクローナルおよびモノクローナルの双方の抗体を用いた競合結合的アッセイ若しくはイムノラジオアッセイのため

の確立された多数のプロトコルが、当分野で知られている。抗原ペプチドとその抗体の複合体の測定などが、典型的なイムノアッセイである。したがって、本発明のペプチドは、抗体の同定および精製に使用できる。本発明では、合成ペプチド若しくは分解産物に対する抗体の生成が好ましく、完全タンパク質に対する抗体も使用できる。

【0069】本発明のペプチドおよびその抗体は、種々の病気の診断に使用される。前記病気は、限定されないが、例えば、パーキンソン病、アルツハイマー病、HIV、マラリア、コレラ、インフルエンザ、狂犬病、ジフテリア、乳癌、結腸癌、喉頭癌、白血病、肺癌、子宮癌、すい臓癌、前立腺癌、骨髄腫、メラノーマ等の病気であり、これらは、複数の抗原の異常発現に関係する。

【0070】一方、最も最新の免疫診断法は、生検に供される抗体の数とタンパク質特異的抗原部分のマスキングにより制限される感受性により、制限される。本発明は、これらの制限を回避する免疫検出アッセイを提供する。したがって、本発明のその他の側面は、生物学的サンプル中の目的ポリペプチドの少なくとも一つを分析する方法を提供することである。

【0071】前記方法は、図4に示すように、いくつかのステップを含む。最初のステップでは、生物学的サンプルを手に入れる。ここで、前記生物学的サンプルとは、生体サンプルに関するものであり、例えば、血液（血清若しくは血漿）、痰やつば、腹水、胸水、尿、生検サンプル、細胞および/または細胞膜等から分離されたもの等がある。哺乳動物から生体組織および体液を入手する方法は、当分野では、よく知られている。入手した生物学的サンプルは、さらに可溶化してもよい。可溶化の方法は、界面活性剤を用いる方法若しくは界面活性剤を用いない方法（例えば、超音波法）等があり、生物学的サンプルの種類や試験に供されるポリペプチドの特性（膜タンパク質、細胞外可溶性ペプチド等）により、適宜選択される。生体由来のプロテアーゼ活性を阻害し、かつ前記ポリペプチドの活性形態を保持するため、プロテアーゼインヒビターやフォスファターゼインヒビターを、可溶化バッファーに含ませることが好ましい。

【0072】可溶化した生物学的サンプルを、一つ以上のタンパク質分解試薬に接触させる。消化は、診断に使用するポリペプチドが、完全に消化されるような十分な条件と時間で実施される。温度やバッファーの穏やかな条件で生物学的サンプルを消化し得る試薬が好ましい。測定は、特別のサンプルに限定して行われないので、消化試薬の種類、反応混合物の条件（イオン強度、pH）および消化時間と温度は、慎重に選択する。インキュベーション時間の終わりにおいて、タンパク質分解活性を、消化時間を延期するとさらに消化が進むため、非特異的タンパク質分解活性を避けるために、また、他のペ

プチド分子（例えば、精製ペプチドおよび/または抗体）のタンパク質分解を避けるために、消化を終了させる。前記精製ペプチドや抗体は、前記混合物に、以下のステップにおいて、加えられる。

【0073】つぎのステップにおいて、タンパク質分解された前記生物学的サンプルは、一つ以上の抗体に接触させる。前記抗体は、目的ポリペプチドの一つ以上のタンパク質分解物に結合できる。そのような抗体は、目的ポリペプチドのペプチド標本に特異的に結合できる。前記ペプチド標本は、前述の方法で作製できる。前記抗体は、固体基体に付着させる。前記固体基体は、アガロース、セファロース、セファデックスビーズ、若しくは96ウエルプレートのような抗体マイクロアレイのように構築された固相等の特別な固相からなる（以下の実施例4, 5を参照）。タンパク質分解された生物学的サンプルを一つ以上の抗体に接触させることは、免疫複合体（第1の免疫複合体）を形成するのに最適な条件で行う。非特異的に結合している抗体を除去し、第1免疫複合体で特異的に結合している抗体のみを検出するために、免疫複合体を洗浄する。

【0074】一般的に、免疫複合体のモニタリング（観察）は、当分野で良く知られており、いくつかの手法のいずれかにより行ってよい。前記手法は、放射能ラベル、蛍光ラベル、生物学的若しくは酵素タグのような当分野で標準的な手法をベースにできる。いくつかの米国出願、前記ラベルに関し記載している（U.S. Pat. No. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 および4,366,241）。試験に供されたポリペプチドは、検出可能なラベルが付けてあり、このラベルを簡単に検出するだけで、混合物中の第1免疫複合体の量を測定できる。ポリペプチドのラベリング（標識）は、生物学的サンプルのラベリングで実施でき、サンプルの消化に先立って、若しくはこれと同時に行ってよい（実施例3参照）。

【0075】つぎに、反応混合物へ添加された標識化（ラベル化）合成ペプチドは、競合的結合手法により、タンパク質分解物の測定に使用できる。前述した検出方法におけるシグナル強度は、マニュアル操作で、若しくはコンピュータプログラムの使用により分析してもよい。一般に、ポリペプチドの測定は、タンパク質を正確に測定するために、検量線を用いて行うことが好ましい（詳細は実施例4参照）。また、患者サンプル由来のポリペプチドの測定は、試験に供されるポリペプチドが正常のパターンを発現することが確認された正常サンプルと比較して行うことが好ましい。

【0076】前述の検出方法は、抗体アレイよりもペプチドを用いて行うことが好ましい。この場合、ペプチドは、固体の支持体に付着し、存在、非存在および/又はポリペプチドの特性を検出することを目的とする競合的結合アッセイにおいて、タンパク質分解された生物学的

サンプルおよび抗体の対応と共に使用する。

【0077】ポリペプチドが、抗自己抗体の形成に関連している場合、このような場合は、自己免疫疾患に前記ポリペプチドが関与しているが、前記ペプチドアレイは、前記自己抗体の存在を検出するのに使用でき、これにより前記疾患が検出できる。

【0078】本発明の免疫検出方法は、種々の疾病および条件の診断において、明らかな有用性を持つ。さらに、前記方法は、抗体滴定法等の非医療的分野にも適用できる。

【0079】本発明により作成されたペプチド若しくは抗体は、診断キット若しくは治療キットに適用できる。例えば、タンパク質関連疾病に特異的なペプチドセット若しくはその抗体は、適切なバッファーおよび防腐剤と共に、一つ以上の容器に収容でき、診断若しくは治療のための検査に使用できる。したがって、前記ペプチド若しくは抗体は、一つの容器中で混合しても良いし、複数の容器に個別に収容してもよい。前記容器は、ラベルされていることが好ましい。前記容器としては、例えば、ボトル、バイアル管、シリンジ、試験管等がある。前記容器は、ガラス、プラスチック等の種々の材質から形成されていてよい。さらに、安定剤、バッファー、ブロッカー等のその他の添加剤が含まれていてもよい。前記キットのペプチド若しくは抗体は、固体支持体に付着させてもよく、診断の目的で使用してもよい。前記固体支持体としては、例えば、ビーズ、アレイ基体（例えば、チップ）がある。実施例4および5において、前記の目的のために設計された固定化抗体アレイ基体の使用が説明されている。キット若しくは固定化基体に含まれるペプチドおよび抗体は、酵素のような検出可能なラベルを結合させてもよい。この場合、前記キットは、発色若しくは蛍光反応を起こす酵素のための基質および補因子（コファクタ）（例えば、検出可能な発色物質若しくは蛍光物質を生成する基質）を含んでいて良い。つぎに、検出可能ラベルは、エピトープタグのようなタグであってもよい。タグは、特に制限されず、例えば、Mycタグ、フラッグタグ、Hisタグ、ロイシントグ、IgGタグ、ストレプトアビジン（streptavidin）タグなどがある。また、前記の場合、キットは、前記エピトープに対する抗体および発色物質若しくは蛍光物質が結合しているラベルされた第2抗体を含んでいてもよい。前記エピトープに対する抗体をラベルしてもよい。

【0080】被検物に問題がある場合、目的ポリペプチドの発現に関する疾病、条件、検出に問題がある場合に、前記キットは、検出のための説明書を含むことができる。本発明のペプチドおよび抗体は、分子生物学の研究、治療、診断の分野で価値がある。本発明は、疾病に関連する複数の抗原を同時に同定する能力があるので、治療法の最適化および疾病の初期段階の予測が可能となり、それによって、疾病の予防や治療を著しく改善でき

る。

【0081】本発明における追加的な目的、利点および新規な特性は、以下の実施例により、当業者に対し、明らかである。前記実施例は限定的でない。さらに、以上述べてきた本発明の種々の実施形態および側面のそれぞれは、特許請求の範囲に記載している。

#### 【0082】

【実施例】以下の実施例で使用される引用文献は、以下のとおりであり、前述の説明と合わせて、本発明を説明するが、本発明は、これらに限定されない。一般に、こ  
40  
50  
60  
70  
80  
90  
100  
110  
120  
130  
140  
150  
160  
170  
180  
190  
200  
210  
220  
230  
240  
250  
260  
270  
280  
290  
300  
310  
320  
330  
340  
350  
360  
370  
380  
390  
400  
410  
420  
430  
440  
450  
460  
470  
480  
490  
500  
510  
520  
530  
540  
550  
560  
570  
580  
590  
600  
610  
620  
630  
640  
650  
660  
670  
680  
690  
700  
710  
720  
730  
740  
750  
760  
770  
780  
790  
800  
810  
820  
830  
840  
850  
860  
870  
880  
890  
900  
910  
920  
930  
940  
950  
960  
970  
980  
990  
1000  
1010  
1020  
1030  
1040  
1050  
1060  
1070  
1080  
1090  
1100  
1110  
1120  
1130  
1140  
1150  
1160  
1170  
1180  
1190  
1200  
1210  
1220  
1230  
1240  
1250  
1260  
1270  
1280  
1290  
1300  
1310  
1320  
1330  
1340  
1350  
1360  
1370  
1380  
1390  
1400  
1410  
1420  
1430  
1440  
1450  
1460  
1470  
1480  
1490  
1500  
1510  
1520  
1530  
1540  
1550  
1560  
1570  
1580  
1590  
1600  
1610  
1620  
1630  
1640  
1650  
1660  
1670  
1680  
1690  
1700  
1710  
1720  
1730  
1740  
1750  
1760  
1770  
1780  
1790  
1800  
1810  
1820  
1830  
1840  
1850  
1860  
1870  
1880  
1890  
1900  
1910  
1920  
1930  
1940  
1950  
1960  
1970  
1980  
1990  
2000  
2010  
2020  
2030  
2040  
2050  
2060  
2070  
2080  
2090  
2100  
2110  
2120  
2130  
2140  
2150  
2160  
2170  
2180  
2190  
2200  
2210  
2220  
2230  
2240  
2250  
2260  
2270  
2280  
2290  
2300  
2310  
2320  
2330  
2340  
2350  
2360  
2370  
2380  
2390  
2400  
2410  
2420  
2430  
2440  
2450  
2460  
2470  
2480  
2490  
2500  
2510  
2520  
2530  
2540  
2550  
2560  
2570  
2580  
2590  
2600  
2610  
2620  
2630  
2640  
2650  
2660  
2670  
2680  
2690  
2700  
2710  
2720  
2730  
2740  
2750  
2760  
2770  
2780  
2790  
2800  
2810  
2820  
2830  
2840  
2850  
2860  
2870  
2880  
2890  
2900  
2910  
2920  
2930  
2940  
2950  
2960  
2970  
2980  
2990  
3000  
3010  
3020  
3030  
3040  
3050  
3060  
3070  
3080  
3090  
3100  
3110  
3120  
3130  
3140  
3150  
3160  
3170  
3180  
3190  
3200  
3210  
3220  
3230  
3240  
3250  
3260  
3270  
3280  
3290  
3300  
3310  
3320  
3330  
3340  
3350  
3360  
3370  
3380  
3390  
3400  
3410  
3420  
3430  
3440  
3450  
3460  
3470  
3480  
3490  
3500  
3510  
3520  
3530  
3540  
3550  
3560  
3570  
3580  
3590  
3600  
3610  
3620  
3630  
3640  
3650  
3660  
3670  
3680  
3690  
3700  
3710  
3720  
3730  
3740  
3750  
3760  
3770  
3780  
3790  
3800  
3810  
3820  
3830  
3840  
3850  
3860  
3870  
3880  
3890  
3900  
3910  
3920  
3930  
3940  
3950  
3960  
3970  
3980  
3990  
4000  
4010  
4020  
4030  
4040  
4050  
4060  
4070  
4080  
4090  
4100  
4110  
4120  
4130  
4140  
4150  
4160  
4170  
4180  
4190  
4200  
4210  
4220  
4230  
4240  
4250  
4260  
4270  
4280  
4290  
4300  
4310  
4320  
4330  
4340  
4350  
4360  
4370  
4380  
4390  
4400  
4410  
4420  
4430  
4440  
4450  
4460  
4470  
4480  
4490  
4500  
4510  
4520  
4530  
4540  
4550  
4560  
4570  
4580  
4590  
4600  
4610  
4620  
4630  
4640  
4650  
4660  
4670  
4680  
4690  
4700  
4710  
4720  
4730  
4740  
4750  
4760  
4770  
4780  
4790  
4800  
4810  
4820  
4830  
4840  
4850  
4860  
4870  
4880  
4890  
4900  
4910  
4920  
4930  
4940  
4950  
4960  
4970  
4980  
4990  
5000  
5010  
5020  
5030  
5040  
5050  
5060  
5070  
5080  
5090  
5100  
5110  
5120  
5130  
5140  
5150  
5160  
5170  
5180  
5190  
5200  
5210  
5220  
5230  
5240  
5250  
5260  
5270  
5280  
5290  
5300  
5310  
5320  
5330  
5340  
5350  
5360  
5370  
5380  
5390  
5400  
5410  
5420  
5430  
5440  
5450  
5460  
5470  
5480  
5490  
5500  
5510  
5520  
5530  
5540  
5550  
5560  
5570  
5580  
5590  
5600  
5610  
5620  
5630  
5640  
5650  
5660  
5670  
5680  
5690  
5700  
5710  
5720  
5730  
5740  
5750  
5760  
5770  
5780  
5790  
5800  
5810  
5820  
5830  
5840  
5850  
5860  
5870  
5880  
5890  
5900  
5910  
5920  
5930  
5940  
5950  
5960  
5970  
5980  
5990  
6000  
6010  
6020  
6030  
6040  
6050  
6060  
6070  
6080  
6090  
6100  
6110  
6120  
6130  
6140  
6150  
6160  
6170  
6180  
6190  
6200  
6210  
6220  
6230  
6240  
6250  
6260  
6270  
6280  
6290  
6300  
6310  
6320  
6330  
6340  
6350  
6360  
6370  
6380  
6390  
6400  
6410  
6420  
6430  
6440  
6450  
6460  
6470  
6480  
6490  
6500  
6510  
6520  
6530  
6540  
6550  
6560  
6570  
6580  
6590  
6600  
6610  
6620  
6630  
6640  
6650  
6660  
6670  
6680  
6690  
6700  
6710  
6720  
6730  
6740  
6750  
6760  
6770  
6780  
6790  
6800  
6810  
6820  
6830  
6840  
6850  
6860  
6870  
6880  
6890  
6900  
6910  
6920  
6930  
6940  
6950  
6960  
6970  
6980  
6990  
7000  
7010  
7020  
7030  
7040  
7050  
7060  
7070  
7080  
7090  
7100  
7110  
7120  
7130  
7140  
7150  
7160  
7170  
7180  
7190  
7200  
7210  
7220  
7230  
7240  
7250  
7260  
7270  
7280  
7290  
7300  
7310  
7320  
7330  
7340  
7350  
7360  
7370  
7380  
7390  
7400  
7410  
7420  
7430  
7440  
7450  
7460  
7470  
7480  
7490  
7500  
7510  
7520  
7530  
7540  
7550  
7560  
7570  
7580  
7590  
7600  
7610  
7620  
7630  
7640  
7650  
7660  
7670  
7680  
7690  
7700  
7710  
7720  
7730  
7740  
7750  
7760  
7770  
7780  
7790  
7800  
7810  
7820  
7830  
7840  
7850  
7860  
7870  
7880  
7890  
7900  
7910  
7920  
7930  
7940  
7950  
7960  
7970  
7980  
7990  
8000  
8010  
8020  
8030  
8040  
8050  
8060  
8070  
8080  
8090  
8100  
8110  
8120  
8130  
8140  
8150  
8160  
8170  
8180  
8190  
8200  
8210  
8220  
8230  
8240  
8250  
8260  
8270  
8280  
8290  
8300  
8310  
8320  
8330  
8340  
8350  
8360  
8370  
8380  
8390  
8400  
8410  
8420  
8430  
8440  
8450  
8460  
8470  
8480  
8490  
8500  
8510  
8520  
8530  
8540  
8550  
8560  
8570  
8580  
8590  
8600  
8610  
8620  
8630  
8640  
8650  
8660  
8670  
8680  
8690  
8700  
8710  
8720  
8730  
8740  
8750  
8760  
8770  
8780  
8790  
8800  
8810  
8820  
8830  
8840  
8850  
8860  
8870  
8880  
8890  
8900  
8910  
8920  
8930  
8940  
8950  
8960  
8970  
8980  
8990  
9000  
9010  
9020  
9030  
9040  
9050  
9060  
9070  
9080  
9090  
9100  
9110  
9120  
9130  
9140  
9150  
9160  
9170  
9180  
9190  
9200  
9210  
9220  
9230  
9240  
9250  
9260  
9270  
9280  
9290  
9300  
9310  
9320  
9330  
9340  
9350  
9360  
9370  
9380  
9390  
9400  
9410  
9420  
9430  
9440  
9450  
9460  
9470  
9480  
9490  
9500  
9510  
9520  
9530  
9540  
9550  
9560  
9570  
9580  
9590  
9600  
9610  
9620  
9630  
9640  
9650  
9660  
9670  
9680  
9690  
9700  
9710  
9720  
9730  
9740  
9750  
9760  
9770  
9780  
9790  
9800  
9810  
9820  
9830  
9840  
9850  
9860  
9870  
9880  
9890  
9900  
9910  
9920  
9930  
9940  
9950  
9960  
9970  
9980  
9990  
10000

【0083】米国特許U.S. Pat. Nos. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771  
40  
50  
60  
70  
80  
90  
100  
110  
120  
130  
140  
150  
160  
170  
180  
190  
200  
210  
220  
230  
240  
250  
260  
270  
280  
290  
300  
310  
320  
330  
340  
350  
360  
370  
380  
390  
400  
410  
420  
430  
440  
450  
460  
470  
480  
490  
500  
510  
520  
530  
540  
550  
560  
570  
580  
590  
600  
610  
620  
630  
640  
650  
660  
670  
680  
690  
700  
710  
720  
730  
740  
750  
760  
770  
780  
790  
800  
810  
820  
830  
840  
850  
860  
870  
880  
890  
900  
910  
920  
930  
940  
950  
960  
970  
980  
990  
1000  
1010  
1020  
1030  
1040  
1050  
1060  
1070  
1080  
1090  
1100  
1110  
1120  
1130  
1140  
1150  
1160  
1170  
1180  
1190  
1200  
1210  
1220  
1230  
1240  
1250  
1260  
1270  
1280  
1290  
1300  
1310  
1320  
1330  
1340  
1350  
1360  
1370  
1380  
1390  
1400  
1410  
1420  
1430  
1440  
1450  
1460  
1470  
1480  
1490  
1500  
1510  
1520  
1530  
1540  
1550  
1560  
1570  
1580  
1590  
1600  
1610  
1620  
1630  
1640  
1650  
1660  
1670  
1680  
1690  
1700  
1710  
1720  
1730  
1740  
1750  
1760  
1770  
1780  
1790  
1800  
1810  
1820  
1830  
1840  
1850  
1860  
1870  
1880  
1890  
1900  
1910  
1920  
1930  
1940  
1950  
1960  
1970  
1980  
1990  
2000  
2010  
2020  
2030  
2040  
2050  
2060  
2070  
2080  
2090  
2100  
2110  
2120  
2130  
2140  
2150  
2160  
2170  
2180  
2190  
2200  
2210  
2220  
2230  
2240  
2250  
2260  
2270  
2280  
2290  
2300  
2310  
2320  
2330  
2340  
2350  
2360  
2370  
2380  
2390  
2400  
2410  
2420  
2430  
2440  
2450  
2460  
2470  
2480  
2490  
2500  
2510  
2520  
2530  
2540  
2550  
2560  
2570  
2580  
2590  
2600  
2610  
2620  
2630  
2640  
2650  
2660  
2670  
2680  
2690  
2700  
2710  
2720  
2730  
2740  
2750  
2760  
2770  
2780  
2790  
2800  
2810  
2820  
2830  
2840  
2850  
2860  
2870  
2880  
2890  
2900  
2910  
2920  
2930  
2940  
2950  
2960  
2970  
2980  
2990  
3000  
3010  
3020  
3030  
3040  
3050  
3060  
3070  
3080  
3090  
3100  
3110  
3120  
3130  
3140  
3150  
3160  
3170  
3180  
3190  
3200  
3210  
3220  
3230  
3240  
3250  
3260  
3270  
3280  
3290  
3300  
3310  
3320  
3330  
3340  
3350  
3360  
3370  
3380  
3390  
3400  
3410  
3420  
3430  
3440  
3450  
3460  
3470  
3480  
3490  
3500  
3510  
3520  
3530  
3540  
3550  
3560  
3570  
3580  
3590  
3600  
3610  
3620  
3630  
3640  
3650  
3660  
3670  
3680  
3690  
3700  
3710  
3720  
3730  
3740  
3750  
3760  
3770  
3780  
3790  
3800  
3810  
3820  
3830  
3840  
3850  
3860  
3870  
3880  
3890  
3900  
3910  
3920  
3930  
3940  
3950  
3960  
3970  
3980  
3990  
4000  
4010  
4020  
4030  
4040  
4050  
4060  
4070  
4080  
4090  
4100  
4110  
4120  
4130  
4140  
4150  
4160  
4170  
4180  
4190  
4200  
4210  
4220  
4230  
4240  
4250  
4260  
4270  
4280  
4290  
4300  
4310  
4320  
4330  
4340  
4350  
4360  
4370  
4380  
4390  
4400  
4410  
4420  
4430  
4440  
4450  
4460  
4470  
4480  
4490  
4500  
4510  
4520  
4530  
4540  
4550  
4560  
4570  
4580  
4590  
4600  
4610  
4620  
4630  
4640  
4650  
4660  
4670  
4680  
4690  
4700  
4710  
4720  
4730  
4740  
4750  
4760  
4770  
4780  
4790  
4800  
4810  
4820  
4830  
4840  
4850  
4860  
4870  
4880  
4890  
4900  
4910  
4920  
4930  
4940  
4950  
4960  
4970  
4980  
4990  
5000  
5010  
5020  
5030  
5040  
5050  
5060  
5070  
5080  
5090  
5100  
5110  
5120  
5130  
5140  
5150  
5160  
5170  
5180  
5190  
5200  
5210  
5220  
5230  
5240  
5250  
5260  
5270  
5280  
5290  
5300  
5310  
5320  
5330  
5340  
5350  
5360  
5370  
5380  
5390  
5400  
5410  
5420  
5430  
5440  
5450  
5460  
5470  
5480  
5490  
5500  
5510  
5520  
5530  
5540  
5550  
5560  
5570  
5580  
5590  
5600  
5610  
5620  
5630  
5640  
5650  
5660  
5670  
5680  
5690  
5700  
5710  
5720  
5730  
5740  
5750  
5760  
5770  
5780  
5790  
5800  
5810  
5820  
5830  
5840  
5850  
5860  
5870  
5880  
5890  
5900  
5910  
5920  
5930  
5940  
5950  
5960  
5970  
5980  
5990  
6000  
6010  
6020  
6030  
6040  
6050  
6060  
6070  
6080  
6090  
6100  
6110  
6120  
6130  
6140  
6150  
6160  
6170  
6180  
6190  
6200  
6210  
6220  
6230  
6240  
6250  
6260  
6270  
6280  
6290  
6300  
6310  
6320  
6330  
6340  
6350  
6360  
6370  
6380  
6390  
6400  
6410  
6420  
6430  
6440  
6450  
6460  
6470  
6480  
6490  
6500  
6510  
6520  
6530  
6540  
6550  
6560  
6570  
6580  
6590  
6600  
6610  
6620  
6630  
6640  
6650  
6660  
6670  
6680  
6690  
6700  
6710  
6720  
6730  
6740  
6750  
6760  
6770  
6780  
6790  
6800  
6810  
6820  
6830  
6840  
6850  
6860  
6870  
6880  
6890  
6900  
6910  
6920  
6930  
6940  
6950  
6960  
6970  
6980  
6990  
7000  
7010  
7020  
7030  
7040  
7050  
7060  
7070  
7080  
7090  
7100  
7110  
7120  
7130  
7140  
7150  
7160  
7170  
7180  
7190  
7200  
7210  
7220  
7230  
7240  
7250  
7260  
7270  
7280  
7290  
7300  
7310  
7320  
7330  
7340  
7350  
7360  
7370  
7380  
7390  
7400  
7410  
7420  
7430  
7440  
7450  
7460  
7470  
7480  
7490  
7500  
7510  
7520  
7530  
7540  
7550  
7560  
7570  
7580  
7590  
7600  
7610  
7620  
7630  
7640  
7650  
7660  
7670  
7680  
7690  
7700  
7710  
7720  
7730  
7740  
7750  
7760  
7770  
7780  
7790  
7800  
7810  
7820  
7830  
7840  
7850  
7860  
7870  
7880  
7890  
7900  
7910  
7920  
7930  
7940  
7950  
7960  
7970  
7980  
7990  
8000  
8010  
8020  
8030  
8040  
8050  
8060  
8070  
8080  
8090  
8100  
8110  
8120  
8130  
8140  
8150  
8160  
8170  
8180  
8190  
8200  
8210  
8220  
8230  
8240  
8250  
8260  
8270  
8280  
8290  
8300  
8310  
8320  
8330  
8340  
8350  
8360  
8370  
8380  
8390  
8400  
8410  
8420  
8430  
8440  
8450  
8460  
8470  
8480  
8490  
8500  
8510  
8520  
8530  
8540  
8550  
8560  
8570  
8580  
8590  
8600  
8610  
8620  
8630  
8640  
8650  
8660  
8670  
8680  
8690  
8700  
8710  
8720  
8730  
8740  
8750  
8760  
8770  
8780  
8790  
8800  
8810  
8820  
8830  
8840  
8850  
8860  
8870  
8880  
8890  
8900  
8910  
8920  
8930  
8940  
8950  
8960  
8970  
8980  
8990  
9000  
9010  
9020  
9030  
9040  
9050  
9060  
9070  
9080  
9090  
9100  
9110  
9120  
9130  
9140  
9150  
9160  
9170  
9180  
9190  
9200  
9210  
9220  
9230  
9240  
9250  
9260  
9270  
9280  
9290  
9300  
9310  
9320  
9330  
9340  
9350  
9360  
9370  
9380  
9390  
9400  
9410  
9420  
9430  
9440  
9450  
9460  
9470  
9480  
9490  
9500  
9510  
9520  
9530  
9540  
9550  
9560  
9570  
9580  
9590  
9600  
9610  
9620  
9630  
9640  
9650  
9660  
9670  
9680  
9690  
9700  
9710  
9720  
9730  
9740  
9750  
9760  
9770  
9780  
9790  
9800  
9810  
9820  
9830  
9840  
9850  
9860  
9870  
9880  
9890  
9900  
9910  
9920  
9930  
9940  
9950  
9960  
9970  
9980  
9990  
10000

720)の二つのMDR関連タンパク質を、プロテイン・ジーン・バンクから取り出した。P-glycoproteinおよびMXRのアミノ酸シーケンスは、編集置換機能を持つマイクロソフトワード(商品名、マイクロソフト社)を使用し、トリプシン分解アミノ酸シーケンスを得るための解析をコンピュータで行った。P-glycoproteinのトリプ\*

\*シン分解アミノ酸シーケンス(Tryptic sequences)をテーブル1に示す。なお、テーブル1において、tryptic fragmentとは、トリプシン分解断片のことである。

【0088】

【表1】

P-glycoprotein tryptic fragments	MXR tryptic fragments
MDLEGDR (SEQ ID NO: 1)	MSSSNVEVFIPVSQGNTNGFPATVSNDLK (SEQ ID NO: 150)
NGGAK (SEQ ID NO 2)	AFTEGAVLSFHNICYR (SEQ ID NO: 151)
K (SEQ ID NO: 3)	VK (SEQ ID NO: 152)
K (SEQ ID NO: 4)	LK (SEQ ID NO: 153)
NFFK (SEQ ID NO:5)	SGFLPCR (SEQ ID NO: 154)
LNNK (SEQ ID NO:6)	K (SEQ ID NO: 155)
SEK (SEQ ID NO 7)	PVEK (SEQ ID NO: 156)
DK (SEQ ID NO 8)	EILSNINGIMK (SEQ ID NO: 157)
K (SEQ ID NO: 9)	PGLNAILGPTGGGK (SEQ ID NO: 158)
EK (SEQ ID NO: 10)	SSLLDVLAAR (SEQ ID NO: 159)
K (SEQ ID NO: 11)	K (SEQ ID NO: 160)
PTVSVFSMFR (SEQ ID NO:12)	DPSGLSGDVLINGAPR (SEQ ID NO: 161)
YSNWLDK (SEQ ID NO:13)	PANFK (SEQ ID NO: 162)
LYMVVGTLAIIHGAGLPLMMLVFGEMT DIFANAGNLEDLMSNITNR (SEQ ID NO:14)	CNSGYVVQDDVVMGTLTVR (SEQ ID NO: 163)

【表2】

SDINDTGFFMNLLEEDMTR (SEQ ID NO:15)	ENLQFSAALR (SEQ ID NO: 164)
YAYYYSGIGAGVLVAAIYQVSWCLAAGR (SEQ ID NO: 16)	LATTMTNHEK (SEQ ID NO: 165)
QIHK (SEQ ID NO17)	NER (SEQ ID NO: 166)
IR (SEQ ID NO 18)	INR (SEQ ID NO: 167)
K (SEQ ID NO 19)	VIEELGLDK (SEQ ID NO: 168)
QFFHAIMR (SEQ ID NO 20)	VADSK (SEQ ID NO: 169)
QEIGWFDVHDVVGELNTR (SEQ ID NO 21)	VGTOFIR (SEQ ID NO: 170)
LTDDVSK (SEQ ID NO 22)	GVSGGER (SEQ ID NO: 171)
INEGIGDK (SEQ ID NO 23)	K (SEQ ID NO: 172)
IGMFFQSMATFFTGFIYGFTR (SEQ ID NO: 24)	R (SEQ ID NO: 173)
GWK (SEQ ID NO 25)	TSIGMELITDPSILSLDEPTTGLDSSTANAV LLLLK (SEQ ID NO: 174)
LTLVLAISPVLGLSAAVWAK (SEQ ID NO:26)	R (SEQ ID NO: 175)
ILSSFTDK (SEQ ID NO: 27)	MSK (SEQ ID NO: 176)
ELLAYAK (SEQ ID NO: 28)	QGR (SEQ ID NO: 177)
AGAVAEVLAIR (SEQ ID NO: 29)	TIIFSIHQPR (SEQ ID NO: 178)
TVIAFGGQK (SEQ ID NO: 30)	YSIFK (SEQ ID NO: 179)
K (SEQ ID NO: 31)	LFDSLTLASGR (SEQ ID NO: 180)
ELER (SEQ ID NO: 32)	LMFHGPAQEALGYFESAGYHCEAYNNPA DFFLDIINGDSTAVLNLR (SEQ ID NO: 181)
YNK (SEQ ID NO: 33)	EEDFK (SEQ ID NO: 182)
NLEEAK (SEQ ID NO: 34)	ATEIIEPSK (SEQ ID NO: 183)
R (SEQ ID NO: 35)	QDK (SEQ ID NO: 184)
IGIK (SEQ ID NO: 36)	PLIEK (SEQ ID NO: 185)
K (SEQ ID NO: 37)	LAEIYVNSSFYK (SEQ ID NO: 186)
AITANISIGAAFLLIYASYALAFWYGTTLV LSGEYSIGQVLTVFFSVLIGAFSVGQASPSI EAFANAR (SEQ ID NO: 38)	ETK (SEQ ID NO: 187)
GAAYEIFK (SEQ ID NO: 39)	AELHQLSGGEK (SEQ ID NO: 188)
IIDNK (SEQ ID NO: 40)	K (SEQ ID NO: 189)
PSIDSYSK (SEQ ID NO: 41)	K (SEQ ID NO: 190)
SGHK (SEQ ID NO: 42)	K (SEQ ID NO: 191)
PDNIK (SEQ ID NO: 43)	ITVFK (SEQ ID NO: 192)
GNLEFR (SEQ ID NO: 44)	EISYTTSFCHQLR (SEQ ID NO: 193)
NVHFSYPSR (SEQ ID NO: 45)	WVSK (SEQ ID NO: 194)
K (SEQ ID NO: 46)	R (SEQ ID NO: 195)
EVK (SEQ ID NO: 47)	SFK (SEQ ID NO: 196)
ILK (SEQ ID NO: 48)	NLLGNPQASIAQIIVTVVLGLVIGAIYFGL K (SEQ ID NO: 197)
GLNLK (SEQ ID NO: 49)	NDSTGIQNR (SEQ ID NO: 198)
VQSGQTVALVGNSSGCGK (SEQ ID NO: 50)	AGVLFLLTNNQCFSSVSAVELFVVEK (SEQ ID NO: 199)
STTVQLMQR (SEQ ID NO: 51)	K (SEQ ID NO: 200)
LYDPTEGMVSVDGQDIR (SEQ ID NO: 52)	LFIHEYISGYR (SEQ ID NO: 201)
TINVR (SEQ ID NO: 53)	VSSYFLGK (SEQ ID NO: 202)
FLR (SEQ ID NO: 54)	LLSDLLPMR (SEQ ID NO: 203)
EIIIGVVSQEPVLFATTIAENIR (SEQ ID NO: 55)	MLPSIIFTICIVFMLGLK (SEQ ID NO: 204)
YGR (SEQ ID NO: 56)	PK (SEQ ID NO: 205)
ENVTMDEIEK (SEQ ID NO: 57)	ADAFFVMMFTLMMVAYSASSMALAIAA GQSVSVVATLLMTICVFMMIFSGLLVNL TTIASWLSWLQYFSIPR (SEQ ID NO: 206)
AVK (SEQ ID NO: 58)	YGFTALQHNEFLGQNFPCPLNATGNNPC NYATCTGEEYLVK (SEQ ID NO: 207)

【表3】

EANAYDFIMK (SEQ ID NO: 59)	QGIDLSPWGLWK (SEQ ID NO: 208)
LPHK (SEQ ID NO: 60)	NHVALACMIVIFLTIAYLK (SEQ ID NO: 209)
FDTLVGER (SEQ ID NO: 61)	LLFLK (SEQ ID NO: 210)
GAQLSGGQK (SEQ ID NO: 62)	K (SEQ ID NO: 211)
QR (SEQ ID NO: 63)	YS (SEQ ID NO: 212)
IAIAR (SEQ ID NO: 64)	
ALVR (SEQ ID NO: 65)	
NPK (SEQ ID NO: 66)	
ILLDEATSALDTESEAVVQVALDK (SEQ ID NO: 67)	
AR (SEQ ID NO: 68)	
K (SEQ ID NO: 69)	
GR (SEQ ID NO: 70)	
TTIVIAHR (SEQ ID NO: 71)	
LSTVR (SEQ ID NO: 72)	
NADVIAGFDDGVIVEK (SEQ ID NO: 73)	
GNHDELMK (SEQ ID NO: 74)	
EK (SEQ ID NO: 75)	
GIYFK (SEQ ID NO: 76)	
LVTMQTAGNEVELENAADESK (SEQ ID NO: 77)	
SEIDALEMSSNSDR (SEQ ID NO: 78)	
SSLIR (SEQ ID NO: 79)	
K (SEQ ID NO: 80)	
R (SEQ ID NO: 81)	
STR (SEQ ID NO: 82)	
R (SEQ ID NO: 83)	
SVR (SEQ ID NO: 84)	
GSQAQDR (SEQ ID NO: 85)	
K (SEQ ID NO: 86)	
LSTK (SEQ ID NO: 87)	
EALDESIPPVSFWR (SEQ ID NO: 88)	
IMK (SEQ ID NO: 89)	
LNLTEWPYFVVGVFCAIINGGLQPAFAIIFSK (SEQ ID NO: 90)	
IIGVFTR (SEQ ID NO: 91)	
IDDPETK (SEQ ID NO: 92)	
R (SEQ ID NO: 93)	
QNSNLFSLFLALGIISFITFFLQGFIFGK	
AGEILTK (SEQ ID NO: 94)	
R (SEQ ID NO: 95)	
LR (SEQ ID NO: 96)	
YMVFR (SEQ ID NO: 97)	
SMLR (SEQ ID NO: 98)	
QDVSWFDDPK (SEQ ID NO: 99)	
NTTGALTTR (SEQ ID NO: 100)	
LANDAAQVK (SEQ ID NO: 101)	
GAIGSR (SEQ ID NO: 102)	
LAVITQNIANLGTGHIISFIYGWQLTLLLLAI	
VPIAIAAGVVEMK (SEQ ID NO: 103)	
MLSGQALK (SEQ ID NO: 104)	
DK (SEQ ID NO: 105)	
K (SEQ ID NO: 106)	
ELEGAGK (SEQ ID NO: 107)	
IATEAIENFR (SEQ ID NO: 108)	
TVVSLTQEQK (SEQ ID NO: 109)	

【表4】

FEHMYAQLQVPYR (SEQ ID NO: 110)
NSLR (SEQ ID NO: 111)
K (SEQ ID NO: 112)
AHIFGITFSFTQAMMYFSYAGCFR (SEQ ID NO: 113)
FGAYLVAHK (SEQ ID NO: 114)
LMSFEDVLLVFSAVVFGAMAVGQVSSFA PDYAK (SEQ ID NO: 115)
AK (SEQ ID NO: 116)
ISAAHIIMIIEK (SEQ ID NO: 117)
TPLIDSYSTEGLMPNTLEGNTVFGEVVFN YPTR (SEQ ID NO: 118)
PDIPVLQGLSLEVK (SEQ ID NO: 119)
K (SEQ ID NO: 120)
GQTLALVGSSGCGK (SEQ ID NO: 121)
STVVQLLER (SEQ ID NO: 122)
FYDPLAGK (SEQ ID NO: 123)
VLLDGK (SEQ ID NO: 124)
EIK (SEQ ID NO: 125)
R (SEQ ID NO: 126)
LNVQWLR (SEQ ID NO: 127)
AHLGIVSQEPILFDCSIAENIAYGDNSR (SEQ ID NO: 128)
VVSQEEIVR (SEQ ID NO: 129)
AAK (SEQ ID NO: 130)
EANIHFIESLPNK (SEQ ID NO: 131)
YSTK (SEQ ID NO: 132)
VGDK (SEQ ID NO: 133)
GTQLSGGQK (SEQ ID NO: 134)
QR (SEQ ID NO: 135)
IAIAR (SEQ ID NO: 136)
IAIAR (SEQ ID NO: 137)
ALVR (SEQ ID NO: 138)
QPHILLLDEATSALDTESEK (SEQ ID NO: 139)
VVQEALDK (SEQ ID NO: 140)
AR (SEQ ID NO: 141)
EGR (SEQ ID NO: 142)
TCIVIAHR (SEQ ID NO: 143)
LSTIQNADLIVVFQNGR (SEQ ID NO: 144)
VK (SEQ ID NO: 145)
EHGTHQQLLAQK (SEQ ID NO: 146)
GIYFSMVSQAGTK (SEQ ID NO: 147)
R (SEQ ID NO: 148)
Q (SEQ ID NO: 149)

【0089】ステップ2：非類似アミノ酸シーケンスのコンピュータでの選択

コンピュータ上で作成されたP-glycoproteinおよびMXRタンパク質のトリプシン分解アミノ酸シーケンスは、Unix（登録商標）インターフェースGCGサーバによりBLASTおよびSmith-Waterman アルゴリズムを用いて、公知の全てのタンパク質についてホモロジー検索した。テーブル1に示されたトリプシン分解アミノ酸シーケンスにおいて、P-glycoproteinおよびMXRタンパク質のユニーク（特別な）な配列が見つかった。これらのシーケンスをテーブル2に示す。これらの配列は、ヒトデータベース(Unigene databank)において記録されている全てのヒトタンパク質では、見つかっていないものである。テーブル2において、UniqueTryptic fragmentは、トリプシン分解配列の中で、ユニーク（特別な）配列のことである。

【0090】

【表5】

	P-glycoprotein Unique tryptic fragments	MXR Unique tryptic fragments
1.	LYMVFVGTAAHHGAGLPLMMLVF GEMTDIFANAGNLEDLMSNITNR (SEQ ID NO: 213)	MSSSNVEVFIPVSQGNNGFPATVSNLKD (SEQ ID NO: 234)
2.	SDINDTGFFMNLEEDMTR (SEQ ID NO: 214)	AFTEGAVLSFHNICYR (SEQ ID NO: 235)
3.	YAYYYSGIGAGVLVAAYIQVSWCL AAGR (SEQ ID NO: 215)	EILSNINGIMKPGLNAILGPTGGGK (SEQ ID NO: 236)
4.	IGMFFQSMATFFTGFIVGFTR (SEQ ID NO: 216)	DPSGLSGDVLINGAPRPANFK (SEQ ID NO: 237)
5.	LTLVLAISPVLGLSAAVWAK (SEQ ID NO: 217)	CNSGYVVQDDVVMGTLTVR (SEQ ID NO: 238)
6.	AITANISIGAAFLLIYASYALAFWYG TTLVLSGEYSIGQVLTVF FSVLIGAFSVGQASPSIEAFANAR (SEQ ID NO: 218)	ENLQFSAALR (SEQ ID NO: 239)
7.	LYDPTEGMVSVVDGQDIR (SEQ ID NO: 219)	LATTMTNHEK (SEQ ID NO: 240)
8.	ILLDEATSALDTESEAVVQVALDK (SEQ ID NO: 220)	TSIGMELITDPSILSLDEPTGLDSSTANA VLLLLK (SEQ ID NO: 241)
9.	NADVIAGFDDGVIVEK (SEQ ID NO: 221)	TIIFSIHQPR (SEQ ID NO: 242)
10.	LVTMQTAGNEVELENAADESK (SEQ ID NO: 222)	LFDLTLASGR (SEQ ID NO: 243)
11.	SEIDALEMSSNSDR (SEQ ID NO: 223)	LMFHGPAQEALGYFESAGYHCEAYNPA DFLDIINGDSTAVALNR (SEQ ID NO: 244)
12.	EALDESIPPVSFWR (SEQ ID NO: 224)	LAIEYVNSSFYK (SEQ ID NO: 245)
13.	LNLTEWPYFVVGVCIIINGGLQPA FAIIFSK (SEQ ID NO: 225)	EISYTTSFCHQLR (SEQ ID NO: 246)
14.	QNSNLFSLFLALGHISFITFLQGFTK (SEQ ID NO: 226)	NLLGNPQASIAQIIVTVVLGLVIGAIYFGLK (SEQ ID NO: 247)

【表6】

15.	LAVITQNIANLGTGHIISFIYGWQLTL LLLAIVPIAIAIGVVEMK (SEQ ID NO: 227)	AGVLFLLTNQCFSSVSAVELFVVEK (SEQ ID NO: 248)
16.	FEHMYAQLQVPYR (SEQ ID NO: 228)	LFIHEYISGYR (SEQ ID NO: 249)
17.	AHIFGITFSFTQAMMYFSYAGCFR (SEQ ID NO: 229)	ADAFFVMMFTLMMVAYSASSMALAIAAGQSV SVATLLMTICFVMMIFSGLLVNLTTIASWLSWL QYFSIPR (SEQ ID NO: 250)
18.	LMSFEDVLLVFSVAVFGAMAVGQS SFAPDYAK (SEQ ID NO: 230)	YGFTALQHNEFLGQNFPCPLNATGNNPCN YATCTGEEYLK (SEQ ID NO: 251)
19.	TPLIDSYSTEGLMPNTLEGVTFGEV VFNYPTR (SEQ ID NO: 231)	QGIDLSPWGLWK (SEQ ID NO: 252)
20.	EANIHFIESLPNK (SEQ ID NO: 232)	NHVALACMIVIFLTIAYLK (SEQ ID NO: 253)
21.	GIYFSMVSQAGTK (SEQ ID NO: 233)	

【0091】ステップ3：免疫原アミノ酸シーケンスのコンピュータでの選択

これらのユニークなトリプシン分解アミノ酸シーケンスは、異質性、アミノ酸組成、不均一性、分子量、抗原に対する感受性等のパラメータにより、その免疫原性を分析した。前記分析により、表2のリストから、免疫原シーケンス候補を選んだ。選ばれた候補シーケンスは、P-glycoproteinの2, 7, 8, 11および19のシーケンスと、MXRの5, 8, 10, 13および16のシーケンスである。

【0092】ステップ4：選択したアミノ酸シーケンスの調製

P-glycoproteinのペプチド8, 9およびMXRのペプ

ド8が、さらなる研究のために、前記候補のなかから選ばれた。MXRのペプチド8のアミノ酸残基9-21およびP-glycoproteinのペプチド8, 19のそれぞれアミノ酸残基12-25, 13-22が、高い免疫原性をもち、これらを合成し、かつHPLCで精製した。

【0093】ステップ5：選択されたペプチドに対する抗体の作製

公知の技術により、ウサギを用いて、MXRの選択した前記ペプチドシーケンスに対するポリクローナル抗体を調製した。一方、P-glycoproteinの選択された前記アミノ酸シーケンスに対するモノクローナル抗体を得た。

【0094】ステップ6：マトリックスの作製と検量マトリックスを測定するため、非特異的結合タンパク質

除去のため、公知のヒト組織で実質的に発現する3つのタンパク質(例えば、ハウスキーピングプロテイン)に対するポリクローナル抗体を、ウサギを用いてさらに調製した。コントロール抗体および前記ステップ4で得られた抗体のそれぞれは、マルチウエルプラスティックプレート(Nunc Immunosorb)を含む固体支持体に結合させた。抗体は、結合させるために、リン酸バッファー(PBS)中、4℃、中性pHで一晩放置した。抗体の結合につづき、1%牛血清アルブミン(BSA)を含むリン酸バッファーで前記マルチウエルプレートを洗浄した。最後に、0.01%アジカナトリウムを入れて4℃で保存した。これにより、ペプチド関連MDRに対する特異的抗体結語の基質マトリックスが得られた。

【0095】ステップ7:前記マトリックス抗体に結合可能なトリプシン分解ペプチド(精製、ラベルしたもの)の調製

ステップ5の抗体の精製のために使用するトリプシン分解ペプチドの全てを、アミノ末端で蛍光ラベルした。このラベリングでは、これらのペプチドがそれぞれの抗体に結合した時、マトリックスの全てのウエル若しくは位置において、単一シグナルが得られるようにした。このラベルしたトリプシン分解ポリペプチドの混合物は、目的サンプル中で見出されたMDR関連タンパク質と競合できる。

【0096】(実施例2)

生物学的サンプル中のマルチ薬剤耐性関連タンパク質の分析のための競合アッセイ

この実施例は、生物学的サンプル中のマルチ薬剤耐性関連タンパク質の同定と分析のための前記マトリックスの利用の段階的手順を説明する。

【0097】MDR発現を示す培養細胞を、1-2%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含むバッファーに1時間溶解した。変性タンパク質は、メタノール/酢酸(pH4)の混液を加え、-20℃で一晩インキュベートすることにより沈殿させた。その後、沈殿タンパク質を、0.05~0.1SDSで再分散させ、そして、これにトリプシンを加えた。トリプシン分解は、サンプルタンパク質が完全に断片化するまで、37℃で16時間行った。分解の最終地点で、トリプシン活性を牛トリプシンインヒビターを加えて止めた。

【0098】トリプシン分解サンプルの一部を、前述のようにして調製した抗体マトリックスに加えた。免疫複合体が形成されるように、室温で1時間のインキュベーションをした。その後、非特異的結合のものを除去するために、1%BSAを含むリン酸バッファー(PBS)で2回洗浄した。

【0099】マトリックスに対するサンプルタンパク質の特異的結合のモニタリングは、抗体と結合したポリペプチドの蛍光により行った。すなわち、前記ペプチド混合物は、マトリックスに添加した時、均一の蛍光を生じ

るように、かつマトリックスに供給した時、減少したシグナル提供できるように、設計されている。それは、前もって、マトリックスにより検出可能なように、サンプル中の消化タンパク質で処理されている。マトリックスの特異的部位から得られる蛍光シグナルの強度により、サンプル中のタンパク質量の測定ができる。このタンパク質量の測定は、マトリックスに供するタンパク質サンプルの量とコントロールの結合とを考慮し、実施例1の3つのコントロールタンパク質から得られる蛍光シグナルを用いて実施できる。

【0100】(実施例3)

生物学的サンプル中のマルチ薬剤関連タンパク質の直接アッセイ

このアッセイは、消化サンプルの蛍光ラベルペプチドを利用した、生物学的サンプル中のMDR関連タンパク質分析を目的とする。したがって、このアッセイは、得られた蛍光シグナルレベルと、分析対象のタンパク質レベルとの相関関係をベースにしている。

【0101】ラベルした消化サンプルを、新鮮な抗体マトリックスに添加し、実施例2と同様にして特異的免疫複合体を形成させる。マトリックスの特別部位と相関関係を示す傾向シグナル強度により、前記サンプル中のMDR関連タンパク質量を測定できる。このタンパク質量の測定は、マトリックスに供するタンパク質サンプルの量とコントロールの結合とを考慮し、実施例1の3つのコントロールタンパク質から得られる蛍光シグナルを用いて実施できる。

【0102】(実施例4)

チャイニーズハムスターの卵巣セルラインにおけるP-glycoproteinの発現レベルの評価

以下の実施例は、2つの異なるチャイニーズハムスターセルラインにおけるP-glycoprotein(例えば、MDR1遺伝子産物)の発現レベルの測定のための、MDR1特異的マトリックスの使用を説明するものである。

【0103】方法:P-glycoprotein発現CHO細胞(Pg-p-CHO)およびコントロールの野生型細胞(WT-CHO)から得られた膜タンパク質(合計1700mg)を、1.12%SDS溶液に分散させ、エタノール/酢酸混合液を加えて-20℃で16時間インキュベートして沈殿させ、0.07%SDS溶液に再度分散させ、N-tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone(TPCK)処理のトリプシンで一晩消化した。消化タンパク質サンプルは、14000rpmで25分間遠心分離し、未消化物を除去するため、Vivaspinカラム(英国Vivascience社)を用いてスピンドルした。

【0104】消化物は、ペプチドプローブ“MPNTLEGNVT K”に対するモノクローナル抗体で予めコートしたMDR1特異的マトリックスの各ウエルに供給した。ここで、前記ペプチドプローブは、C末端以外は、コンピュータで得られたP-glycoproteinのトリプシン消化物の中

央部分に対応する (SEQ ID NO: 231の13 - 22アミノ酸残基)。96ウェルマトリックスの3つのコントロールウェルを、P-glycoproteinを認識する市販の抗体 (米国Dako社) のC494を250mg用いて、プレコートした。

【0105】ペプチドプローブを段階的に希釈したものを、各ウェルに加えた。最も低濃度は500ngである。マトリックスには、さらに10ngのビオチン結合プローブペプチド (biotinylated probe peptide) を加え、最終的に、室温で2時間インキュベートした。イン

キュベーションの後、マトリックスは、1% BSAを含む洗浄バッファーで洗浄し、西洋わさびのペルオキシダーゼを結合したストレプトアビジンと反応させた。基質 (TMB 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine) を加えて酵素反応させ、得られた発色反応により、各ウェルのビオチン量を測定した。E l i s a測定器を用いて、光学密度を測定した。

【0106】結果：図3に示すように、野生型CHO細胞の消化膜サンプルは、コントロールサンプルと比べ、光学密度の低下がなかった。コントロールサンプルは、ラベルした消化物を欠如している。この結果は、野生型CHO細胞において、P-glycoproteinの発言がないことを示唆する。これとは逆に、P-glycoprotein含有細胞 (Pgp-CHO) の消化膜サンプルは、顕著な光学密度の減少が見られた。検量線から外れたため、500mgのオリジナル膜タンパク質は、0.025mgのペプチドを示す。プローブペプチドの分子量が1000Daであり、P-glycoproteinの合計分子量が14460Daであることから、各ウェルのP-glycoproteinの含有量、9.33mgに相当し、これは細胞膜タンパク質全体の1.64%である。一方、CHO膜におけるP-glycoproteinの酵素活性および解析からは、P-glycoproteinの含有量は5.6%と示唆された。これは、生体由来の酵素の29%を特性解析が回復させたことになる。消化ステップの前にプローブペプチドを添加し、ついでMDR1マトリックスに供給したコントロール実験では、予想どおりの45%の回復があった。これら二つの値の類似性により、さらに、生物学的サンプル中のタンパク質の同定と解析において、本発明により作製されたマトリックスの正確さおよび有効性が、強調される。

【0107】実施例5  
タンパク質に関係した疾患を同定し、レベルを定量するための、抗体マトリックス(antibody matrix)の段階的使用

図4に、タンパク質に関係した疾患を同定し、レベルを定量するための方法を示す。この方法は、本発明の教示するところにしたがってデザインし構築したタンパク質特異性抗体マトリックスキットを使用する。

ステップ1：患者から採取したバイオプシー(1)を溶解させ、タンパク質分解試薬により、タンパク質開裂が

完全に達成されるまでインキュベーションした(2)。ステップ2：消化されたサンプルを標識したペプチドと混合した(3)(図中に、矢印に接した六角形で示している)。前記標識したペプチドは、目的とする一種類またはそれ以上のタンパク質に対して特異性を有する。それらペプチドは、目的のタンパク質に対し固有のペプチドのためのヒトシーケンスのタンパク質データベースをスキャンすることにより選択された。サークル、シリンダー、矢印のない六角形およびその他の図形(4)は、バイオプシー消化物中のペプチドを表す。

ステップ3：前記混合物を、選択したペプチドに対し(against)調製した抗体セットを含むマトリックス(5)の上に積層した(7)。前記マトリックスは、その上に前記抗体が直接または間接に位置特異的な方法で設置されているマルチウェルプレート(たとえば96ウェル)が可能である。挿入図は、前記抗体がウェルに設置されていることを示す(6)。それぞれに設置された特定の抗体を有する2つのウェルを描写している。加えて、前記マトリックスは、組織サンプル中のいたるところに存在する

プロテインに対し調製された対照(control)抗体のウェルをさらに含んでも良い。さらに、追加のウェルは、それを元に検量線を作成できる標準物質として働く既知の量の標識したペプチドをさらに含んでも良い。

ステップ4：選択したペプチド、標識したペプチドおよび結合した抗体(8)は、免疫複合体(immunocomplex)(9)を形成するために放置した(left)。挿入図(10)は、形成された免疫複合体を描写する。

ステップ5：前記マトリックスを、非特異的に結合したペプチドを除去するために、ブロッキングバッファー(blocking buffer)(11)で数回洗浄した。

ステップ6：前記標識したペプチドに対し特異的な酵素結合試薬を加え(12)、そして、前記ウェルを、非特異的に結合した試薬を除去するために再度洗浄した。

ステップ7：前記マトリックスを基質(substrate)でインキュベートしたところ(13)、ステップ6で記述した酵素結合試薬によって行われる呈色反応が起こった(14)。

ステップ8：前記により起こった呈色反応の強度(15)を、一般的な(conventional)96ウェルプレートリーダー(reader)により測定し、そのデータをコンピュータプログラムにより解析し(16)、各ウェル中に存在するペプチドの量を決定した。

【0108】その特別の実施例と共に、本発明を説明したが、当業者において、さらなる修飾、変更、バリエーションは明確である。したがって、クレームの範囲および思想の範囲内にある、全ての修飾、変更、バリエーションは、本発明に受け入れられる。本明細書中で言及されることにより特定された全ての出版物、特許、特許出願およびシーケンスは、本明細書の一部となる。同様

に、本明細書で引用された個々の出版物、特許、特許出願およびシーケンスも、本明細書の一部となる。さらに、この出願のいずれの引用文献の引用および同定は、本発明の従来技術として前記引用文献が使用されることを認めることを許すものでない。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明による目的タンパク質のアミノ酸シーケンス標本のデータベース生成のために設計およびデザインされたシステムを示す図である。

【図2】図2は、図1のシステムの遠隔構築を説明する図である。

【図3】図3は、ペプチドプローブを認識する固定抗体の量に対し、連続的に希釈したペプチドプローブを加えて得られた、本発明における酵素免疫法(ELISA)の検量線である。データは、双曲線的に降下している。水平線は、P-glycoproteinの三回消化サンプルの光学密度を示し、下の線がCHO細胞を示し、上の線が野生型のCHO細胞を示す。

【図4】図4は、本発明による抗体の使用を説明する図である。

【配列表】

```

SEQUENCE LISTING
<110> Emil Israel Katz
<120> PEPTIDES REPRESENTATIVE
OF POLYPEPTIDES OF INTEREST AND ANTIBODIES
DIRECTED THEREAGAINST, AND METHODS,
SYSTEMS AND KITS FOR GENERATING AND
UTILIZING EACH
<130> 01/22283
<160> 253
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 7

<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Computer generated synthetic peptide
<400> 1
Met Asp Leu Glu Gly Asp Arg
1             5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Computer generated synthetic peptide
<400> 2
Asn Gly Gly Ala Lys
1             5

<210> 3
<211> 1
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Computer generated synthetic peptide
<400> 3
Lys

```

<211> 1  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 4  
Lys  
1  
<210> 5  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 5  
Asn Phe Phe Lys  
1  
<210> 6  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 6  
Leu Asn Asn Lys  
1  
  
<210> 7  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 7  
Ser Glu Lys  
1  
<210> 8  
<211> 2  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 8  
Asp Lys

<211> 1  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 9  
 Lys  
 1  
 <210> 10  
 <211> 2  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 10  
 Glu Lys  
 1  
 <210> 11  
 <211> 1  
 <212> PRT  
  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 11  
 Lys  
 1  
 <210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 12  
  
 Pro Thr Val Ser Val Phe Ser Met Phe Arg  
  
 1                    5                    10  
 <210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 13  
 Tyr Ser Asn Trp Leu Asp Lys  
 1                    5  
 <210> 14

<213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synthetic peptide  
 <400> 14  
 Leu Tyr Met Val Val Gly Thr Leu Ala Ala  
 Ile Ile His Gly Ala Gly  
 1                    5                    10                    15

Leu Pro Leu Met Met Leu Val Phe Gly Glu  
 Met Thr Asp Ile Phe Ala  
 20                    25                    30

Asn Ala Gly Asn Leu Glu Asp Leu Met Ser  
 Asn Ile Thr Asn Arg  
 35                    40                    45

<210> 15  
 <211> 18  
 <212> PRT

<213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synthetic peptide  
 <400> 15  
 Ser Asp Ile Asn Asp Thr Gly Phe Phe Met  
 Asn Leu Glu Glu Asp Met  
 1                    5                    10                    15

Thr Arg

<210> 16  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synthetic peptide  
 <400> 16  
 Tyr Ala Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ile Gly Ala  
 Gly Val Leu Val Ala Ala  
 1                    5                    10                    15

Tyr Ile Gln Val Ser Phe Trp Cys Leu Ala  
 Ala Gly Arg  
 20                    25

<210> 17  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synthetic



<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 23

Ile Asn Glu Gly Ile Gly Asp Lys  
1 5

<210> 24

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 24

Ile Gly Met Phe Phe Gln Ser Met Ala Thr  
Phe Phe Thr Gly Phe Ile

1 5 10 15

Val Gly Phe Thr Arg

20

<210> 25

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 25

Gly Trp Lys

1

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 26

Leu Thr Leu Val Ile Leu Ala Ile Ser Pro  
Val Leu Gly Leu Ser Ala

1 5 10 15

Ala Val Trp Ala Lys

20

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 28

Glu Leu Leu Ala Tyr Ala Lys

1                    5

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 29

Ala Gly Ala Val Ala Glu Glu Val Leu Ala

Ala Ile Arg

1                    5                    10

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 30

Thr Val Ile Ala Phe Gly Gly Gln Lys

1                    5

<210> 31

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 31

Lys

1

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 32

Glu Leu Glu Arg

1

<210> 33

<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 33  
Tyr Asn Lys  
1  
<210> 34  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 34  
Asn Leu Glu Glu Ala Lys  
1                   5  
<210> 35  
<211> 1  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 35  
Arg  
1  
  
<210> 36  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 36  
Ile Gly Ile Lys  
1  
<210> 37  
<211> 1  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 37  
Lys  
1  
<210> 38  
<211> 68  
<212> PRT

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 38

Ala Ile Thr Ala Asn Ile Ser Ile Gly Ala  
Ala Phe Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Glu Tyr Ser Ile Gly Gln Val Leu Thr  
Val Phe Phe Ser Val Leu

35 40 45

Ile Gly Ala Phe Ser Val Gly Gln Ala Ser  
Pro Ser Ile Glu Ala Phe

50 55 60

Ala Asn Ala Arg  
65

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 39

Gly Ala Ala Tyr Glu Ile Phe Lys

1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 40

Ile Ile Asp Asn Lys

1 5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 41

Pro Ser Ile Asp Ser Tyr Ser Lys

<400> 42  
Ser Gly His Lys  
1  
<210> 43  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 43  
Pro Asp Asn Ile Lys  
1                   5

<210> 44  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 44  
Gly Asn Leu Glu Phe Arg  
1                   5

<210> 45  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 45  
Asn Val His Phe Ser Tyr Pro Ser Arg  
1                   5

<210> 46  
<211> 1  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 46

Lys  
1  
<210> 47  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide

1

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 48

Ile Leu Lys

1

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 49

Gly Leu Asn Leu Lys

1

5

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 50

Val Gln Ser Gly Gln Thr Val Ala Leu Val

Gly Asn Ser Gly Cys Gly

1

5

10

15

Lys

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 51

Ser Thr Thr Val Gln Leu Met Gln Arg

1

5

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 52

Leu Tyr Asp Pro Thr Glu Gly Met Val Ser  
Val Asp Gly Gln Asp Ile

1                    5                    10                    15

Arg

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

Met Ile Phe Asn Val Arg

1                    5

<210> 54

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 54

Phe Leu Arg

1

<210> 55

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 55

Glu Ile Ile Gly Val Val Ser Gln Glu Pro  
Val Leu Phe Ala Thr Thr

1                    5                    10                    15

Ile Ala Glu Asn Ile Arg

20

<210> 56

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 56

Tyr Gly Arg

1

<212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 57

Glu Asn Val Thr Met Asp Glu Ile Glu Lys

1                    5                    10

<210> 58  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 58

Ala Val Lys

1

<210> 59  
 <211> 10  
 <212> PRT

<213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 59

Glu Ala Asn Ala Tyr Asp Phe Ile Met Lys

1                    5                    10

<210> 60  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide

<400> 60

Leu Pro His Lys

1

<210> 61  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide

<400> 61

Phe Asp Thr Leu Val Gly Glu Arg

1

5



<223> Computer generated synthetic peptide  
 <400> 67  
 Ile Leu Leu Leu Asp Glu Ala Thr Ser Ala  
 Leu Asp Thr Glu Ser Glu  
 1                    5                    10                    15

Ala Val Val Gln Val Ala Leu Asp Lys  
                   20                    25

<210> 68  
 <211> 2  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synthetic peptide

<400> 68

Ala Arg

1

<210> 69

<211> 1

<212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synthetic peptide

<400> 69

Lys

1

<210> 70

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 70

Gly Arg

1

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 71

Thr Thr Ile Val Ile Ala His Arg

1

5

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 72

Leu Ser Thr Val Arg

1 5

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 73

Asn Ala Asp Val Ile Ala Gly Phe Asp Asp

Gly Val Ile Val Glu Lys

1 5 10 15

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 74

Gly Asn His Asp Glu Leu Met Lys

1 5

<210> 75

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 75

Glu Lys

1

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 76

Gly Ile Tyr Phe Lys

1 5

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 77

Leu Val Thr Met Gln Thr Ala Gly Asn Glu  
Val Glu Leu Glu Asn Ala

1 5 10 15

Ala Asp Glu Ser Lys

20

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 78

Ser Glu Ile Asp Ala Leu Glu Met Ser Ser  
Asn Asp Ser Arg

1 5 10

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 79

Ser Ser Leu Ile Arg

1 5

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 1

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 80

Lys

1

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 1

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 81

Arg

<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 82  
Ser Thr Arg  
1  
<210> 83  
<211> 1  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 83  
Arg  
1  
<210> 84  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 84  
Ser Val Arg  
1

<210> 85  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 85  
Gly Ser Gln Ala Gln Asp Arg  
1                   5  
<210> 86  
<211> 1  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 86  
Lys  
1  
<210> 87

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 87

Leu Ser Thr Lys

1

<210> 88

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 88

Glu Ala Leu Asp Glu Ser Ile Pro Pro Val  
Ser Phe Trp Arg

1

5

10

<210> 89

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 89

Ile Met Lys

1

<210> 90

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 90

Leu Asn Leu Thr Glu Trp Pro Tyr Phe Val  
Val Gly Val Phe Cys Ala

1

5

10

15

Ile Ile Asn Gly Gly Leu Gln Pro Ala Phe  
Ala Ile Ile Phe Ser Lys

20

25

30

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide



1  
 <210> 97  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 97  
 Tyr Met Val Phe Arg  
 1                    5  
 <210> 98  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 98  
 Ser Met Leu Arg  
 1  
 <210> 99  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 99  
 Gln Asp Val Ser Trp Phe Asp Asp Pro Lys  
  
 1                    5                    10  
 <210> 100  
 <211> 9  
 <212> PRT  
  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 100  
 Asn Thr Thr Gly Ala Leu Thr Thr Arg  
 1                    5  
 <210> 101  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 101

<210> 102  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synthetic peptide  
 <400> 102  
 Gly Ala Ile Gly Ser Arg  
 1 5  
 <210> 103  
 <211> 45  
  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synthetic peptide  
 <400> 103  
 Leu Ala Val Ile Thr Gln Asn Ile Ala Asn  
 Leu Gly Thr Gly Ile Ile  
 1 5 10 15  
  
 Ile Ser Phe Ile Tyr Gly Trp Gln Leu Thr  
 Leu Leu Leu Leu Ala Ile  
 20 25 30  
  
 Val Pro Ile Ile Ala Ile Ala Gly Val Val  
 Glu Met Lys  
 35 40 45  
 <210> 104  
 <211> 8  
 <212> PRT  
  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synthetic peptide  
 <400> 104  
 Met Leu Ser Gly Gln Ala Leu Lys  
 1 5  
 <210> 105  
 <211> 2  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synthetic peptide  
  
 <400> 105  
 Asp Lys  
 1  
 <210> 106

Lys

1

&lt;210&gt; 107

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 107

Glu Leu Glu Gly Ala Gly Lys

1

5

&lt;210&gt; 108

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 108

Ile Ala Thr Glu Ala Ile Glu Asn Phe Arg

1

5

10

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 109

Thr Val Val Ser Leu Thr Gln Glu Gln Lys

1

5

10

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 110

Phe Glu His Met Tyr Ala Gln Ser Leu Gln  
Val Pro Tyr Arg

1

5

10

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

1

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 1

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synth

etic peptide

&lt;400&gt; 112

Lys

1

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synth

etic peptide

&lt;400&gt; 113

Ala His Ile Phe Gly Ile Thr Phe Ser Phe

Thr Gln Ala Met Met Tyr

1

5

10

15

Phe Ser Tyr Ala Gly Cys Phe Arg

20

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synth

etic peptide

&lt;400&gt; 114

Phe Gly Ala Tyr Leu Val Ala His Lys

1

5

&lt;210&gt; 115

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synth

etic peptide

&lt;400&gt; 115

Leu Met Ser Phe Glu Asp Val Leu Leu Val

Phe Ser Ala Val Val Phe

1

5

10

15

Gly Ala Met Ala Val Gly Gln Val Ser Ser

Phe Ala Pro Asp Tyr Ala

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 116

Ala Lys

1

<210> 117

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 117

Ile Ser Ala Ala His Ile Ile Met Ile Ile

Glu Lys

1

5

10

<210> 118

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 118

Thr Pro Leu Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Glu

Gly Leu Met Pro Asn Thr

1

5

10

15

Leu Glu Gly Asn Val Thr Phe Gly Glu Val

Val Phe Asn Tyr Pro Thr

20

25

30

Arg

<210> 119

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 119

Pro Asp Ile Pro Val Leu Gln Gly Leu Ser

Leu Glu Val Lys

1

5

10

<210> 120

<211> 1

<212> PRT

<210> 121  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 121  
 Gly Gln Thr Leu Ala Leu Val Gly Ser Ser  
 Gly Cys Gly Lys  
 1                    5                    10  
 <210> 122  
  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 122  
 Ser Thr Val Val Gln Leu Leu Glu Arg  
 1                    5  
 <210> 123  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 123  
 Phe Tyr Asp Pro Leu Ala Gly Lys  
 1                    5  
 <210> 124  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 124  
 Val Leu Leu Asp Gly Lys  
 1                    5  
  
 <210> 125  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 125  
 Glu Ile Lys

<212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synthetic peptide

<400> 126

Arg

1

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 127

Leu Asn Val Gln Trp Leu Arg

1

5

<210> 128

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 128

Ala His Leu Gly Ile Val Ser Gln Glu Pro

Ile Leu Phe Asp Cys Ser

1

5

10

15

Ile Ala Glu Asn Ile Ala Tyr Gly Asp Asn

Ser Arg

20

25

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 129

Val Val Ser Gln Glu Glu Ile Val Arg

1

5

<210> 130

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<210> 131  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 131  
Glu Ala Asn Ile His Ala Phe Ile Glu Ser  
Leu Pro Asn Lys  
1                    5                    10

<210> 132

<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 132  
Tyr Ser Thr Lys  
1

<210> 133  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 133  
Val Gly Asp Lys  
1

<210> 134  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 134  
Gly Thr Gln Leu Ser Gly Gly Gln Lys  
1                    5

<210> 135  
<211> 2  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 135

<211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 136  
 Ile Ala Ile Ala Arg  
 1 5

<210> 137  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 137  
 Ile Ala Ile Ala Arg  
 1 5

<210> 138  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 138  
 Ala Leu Val Arg  
 1

<210> 139  
 <211> 20  
 <212> PRT

<213> Artificial sequence  
 <220>

<223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 139  
 Gln Pro His Ile Leu Leu Leu Asp Glu Ala  
 Thr Ser Ala Leu Asp Thr  
 1 5 10 15

Glu Ser Glu Lys  
 20

<210> 140  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth

<210> 141

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 141

Ala Arg

1

<210> 142

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 142

Glu Gly Arg

1

<210> 143

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 143

Thr Cys Ile Val Ile Ala His Arg

1

5

<210> 144

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 144

Leu Ser Thr Ile Gln Asn Ala Asp Leu Ile

Val Val Phe Gln Asn Gly

1

5

10

15

Arg

<210> 145

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

1  
 <210> 146  
 <211> 12

<212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 146  
 Glu His Gly Thr His Gln Gln Leu Leu Ala  
 Gln Lys  
 1                    5                    10

<210> 147  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>

<223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 147  
 Gly Ile Tyr Phe Ser Met Val Ser Val Gln  
 Ala Gly Thr Lys  
 1                    5                    10

<210> 148  
 <211> 1  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 148  
 Arg  
 1

<210> 149

<211> 1  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 149  
 Gln  
 1

<210> 150  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth

Thr Asn Gly Phe Pro Ala Thr Val Ser Asn  
Asp Leu Lys

20

25

&lt;210&gt; 151

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 151

Ala Phe Thr Glu Gly Ala Val Leu Ser Phe  
His Asn Ile Cys Tyr Arg

1

5

10

15

&lt;210&gt; 152

&lt;211&gt; 2

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 152

Val Lys

1

&lt;210&gt; 153

&lt;211&gt; 2

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 153

Leu Lys

1

&lt;210&gt; 154

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 154

Ser Gly Phe Leu Pro Cys Arg

1

5

&lt;210&gt; 155

&lt;211&gt; 1

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<210> 156

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 156

Pro Val Glu Lys

1

<210> 157

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 157

Glu Ile Leu Ser Asn Ile Asn Gly Ile Met  
Lys

1

5

10

<210> 158

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 158

Pro Gly Leu Asn Ala Ile Leu Gly Pro Thr  
Gly Gly Gly Lys

1

5

10

<210> 159

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 159

Ser Ser Leu Leu Asp Val Leu Ala Ala Arg

1

5

10

<210> 160

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

1  
 <210> 161  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 161  
 Asp Pro Ser Gly Leu Ser Gly Asp Val Leu  
 Ile Asn Gly Ala Pro Arg  
 1                    5                    10                    15

<210> 162  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 162  
 Pro Ala Asn Phe Lys  
 1                    5

<210> 163  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 163  
 Cys Asn Ser Gly Tyr Val Val Gln Asp Asp  
 Val Val Met Gly Thr Leu  
 1                    5                    10                    15

Thr Val Arg

<210> 164  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>

<223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 164  
 Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala Ala Leu Arg

1                    5                    10  
 <210> 165  
 <211> 10

1                    5                    10  
 <210> 166

<211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide

<400> 166  
 Asn Glu Arg

1  
 <210> 167  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide

<400> 167  
 Ile Asn Arg

1  
 <210> 168  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 168  
 Val Ile Glu Glu Leu Gly Leu Asp Lys  
 1                    5

<210> 169  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide

<400> 169  
 Val Ala Asp Ser Lys

1                    5  
 <210> 170  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth

Val Gly Thr Gln Phe Ile Arg

1 5

<210> 171

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 171

Gly Val Ser Gly Gly Glu Arg

1 5

<210> 172

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 172

Lys

1

<210> 173

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 173

Arg

1

<210> 174

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 174

Thr Ser Ile Gly Met Glu Leu Ile Thr Asp

Pro Ser Ile Leu Ser Leu

1 5 10 15

Asp Glu Pro Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ser

Thr Ala Asn Ala Val Leu

20 25 30

Leu Leu Leu Lys

35

<210> 175

<400> 175

Arg

1

<210> 176

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 176

Met Ser Lys

1

<210> 177

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 177

Gln Gly Arg

1

<210> 178

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 178

Thr Ile Ile Phe Ser Ile His Gln Pro Arg

1

5

10

<210> 179

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 179

Tyr Ser Ile Phe Lys

1

5

<210> 180

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

Leu Phe Asp Ser Leu Thr Leu Leu Ala Ser  
Gly Arg

1                    5                    10

<210> 181

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide

<400> 181

Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu Ala  
Leu Gly Tyr Phe Glu Ser

1                    5                    10                    15

Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn Asn  
Pro Ala Asp Phe Phe Leu

                  20                    25                    30

Asp Ile Ile Asn Gly Asp Ser Thr Ala Val  
Ala Leu Asn Arg

                  35                    40                    45

<210> 182

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide

<400> 182

Glu Glu Asp Phe Lys

1                    5

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide

<400> 183

Ala Thr Glu Ile Ile Glu Pro Ser Lys

1                    5

<210> 184

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide

<400> 184

<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 185  
Pro Leu Ile Glu Lys  
1                    5  
<210> 186  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 186  
Leu Ala Glu Ile Tyr Val Asn Ser Ser Phe  
Tyr Lys  
1                    5                    10  
  
<210> 187  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 187  
Glu Thr Lys  
1  
<210> 188  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
  
<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 188  
Ala Glu Leu His Gln Leu Ser Gly Gly Glu  
Lys  
1                    5                    10  
<210> 189  
<211> 1  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 189  
Lys  
1  
  
<210> 190

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 190

Lys

1

<210> 191

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 191

Lys

1

<210> 192

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 192

Ile Thr Val Phe Lys

1 5

<210> 193

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 193

Glu Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Cys His

Gln Leu Arg

1 5 10

<210> 194

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 194

Trp Val Ser Lys

1

<210> 195

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 195  
 Arg  
 1  
 <210> 196  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 196  
 Ser Phe Lys  
 1  
 <210> 197  
 <211> 31  
  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 197  
 Asn Leu Leu Gly Asn Pro Gln Ala Ser Ile  
 Ala Gln Ile Ile Val Thr  
 1                    5                    10                    15  
  
 Val Val Leu Gly Leu Val Ile Gly Ala Ile  
 Tyr Phe Gly Leu Lys  
                   20                    25                    30  
  
 <210> 198  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 198  
 Asn Asp Ser Thr Gly Ile Gln Asn Arg  
 1                    5  
 <210> 199  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 199  
 Ala Gly Val Leu Phe Phe Leu Thr Thr Asn  
 Gln Cys Phe Ser Ser Val  
 1                    5                    10                    15

<220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 200  
 Lys  
 1  
 <210> 201  
  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 201  
 Leu Phe Ile His Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr  
 Tyr Arg  
 1                    5                    10  
 <210> 202  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 202  
 Val Ser Ser Tyr Phe Leu Gly Lys  
 1                    5  
 <210> 203  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 203  
 Leu Leu Ser Asp Leu Leu Pro Met Arg  
 1                    5  
  
 <210> 204  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 204  
 Met Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Cys Ile  
 Val Tyr Phe Met Leu Gly  
 1                    5                    10  
  
 Leu Lys

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 205

Pro Lys

1

<210> 206

<211> 73

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 206

Ala Asp Ala Phe Phe Val Met Met Phe Thr

Leu Met Met Val Ala Tyr

1

5

10

15

Ser Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala

Ala Gly Gln Ser Val Val

20

25

30

Ser Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys

Phe Val Phe Met Met Ile

35

40

45

Phe Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr

Ile Ala Ser Trp Leu Ser

50

55

60

Trp Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg

65

70

<210> 207

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 207

Tyr Gly Phe Thr Ala Leu Gln His Asn Glu

Phe Leu Gly Gln Asn Phe

1

5

10

15

Cys Pro Gly Leu Asn Ala Thr Gly Asn Asn

Pro Cys Asn Tyr Ala Thr

20

25

30

Cys Thr Gly Glu Glu Tyr Leu Val Lys

35

40

<211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 209  
 Asn His Val Ala Leu Ala Cys Met Ile Val  
 Ile Phe Leu Thr Ile Ala  
 1                    5                    10                    15

Tyr Leu Lys

<210> 210  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 210  
 Leu Leu Phe Leu Lys  
 1                    5

<210> 211

<211> 1  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 211  
 Lys  
 1

<210> 212  
 <211> 2  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>

<223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 212  
 Tyr Ser  
 1

<210> 213  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 213

	20	25	30
--	----	----	----

Asn Ala Gly Asn Leu Glu Asp Leu Met Ser  
Asn Ile Thr Asn Arg

	35	40	45
--	----	----	----

<210> 214  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 214  
Ser Asp Ile Asn Asp Thr Gly Phe Phe Met  
Asn Leu Glu Glu Asp Met

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Arg

<210> 215  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 215  
Tyr Ala Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ile Gly Ala  
Gly Val Leu Val Ala Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Tyr Ile Gln Val Ser Phe Trp Cys Leu Ala  
Ala Gly Arg

	20	25
--	----	----

<210> 216

<211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synthetic peptide  
<400> 216  
Ile Gly Met Phe Phe Gln Ser Met Ala Thr  
Phe Phe Thr Gly Phe Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Gly Phe Thr Arg

	20
--	----

<210> 217  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 218  
 Ala Ile Thr Ala Asn Ile Ser Ile Gly Ala  
 Ala Phe Leu Leu Ile Tyr  
 1                    5                    10                    15  
  
 Ala Ser Tyr Ala Leu Ala Phe Trp Tyr Gly  
 Thr Thr Leu Val Leu Ser  
                   20                    25                    30  
  
 Gly Glu Tyr Ser Ile Gly Gln Val Leu Thr  
 Val Phe Phe Ser Val Leu  
                   35                    40                    45  
  
 Ile Gly Ala Phe Ser Val Gly Gln Ala Ser  
 Pro Ser Ile Glu Ala Phe  
                   50                    55                    60  
  
 Ala Asn Ala Arg  
 65  
 <210> 219  
 <211> 17  
 <212> PRT  
  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 219  
 Leu Tyr Asp Pro Thr Glu Gly Met Val Ser  
 Val Asp Gly Gln Asp Ile  
 1                    5                    10                    15  
  
 Arg  
  
 <210> 220  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 220  
 Ile Leu Leu Leu Asp Glu Ala Thr Ser Ala  
 Leu Asp Thr Glu Ser Glu  
 1                    5                    10                    15

1 5 10 15

<210> 222

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 222

Leu Val Thr Met Gln Thr Ala Gly Asn Glu  
Val Glu Leu Glu Asn Ala

1 5 10 15

Ala Asp Glu Ser Lys  
20

<210> 223

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 223

Ser Glu Ile Asp Ala Leu Glu Met Ser Ser  
Asn Asp Ser Arg

1 5 10

<210> 224

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 224

Glu Ala Leu Asp Glu Ser Ile Pro Pro Val  
Ser Phe Trp Arg

1 5 10

<210> 225

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 225

Leu Asn Leu Thr Glu Trp Pro Tyr Phe Val  
Val Gly Val Phe Cys Ala

1 5 10 15

<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 226  
Gln Asn Ser Asn Leu Phe Ser Leu Leu Phe  
Leu Ala Leu Gly Ile Ile  
1 5 10 15

Ser Phe Ile Thr Phe Phe Leu Gln Gly Phe  
Thr Lys  
20 25

<210> 227  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 227  
Leu Ala Val Ile Thr Gln Asn Ile Ala Asn  
Leu Gly Thr Gly Ile Ile  
1 5 10 15

Ile Ser Phe Ile Tyr Gly Trp Gln Leu Thr  
Leu Leu Leu Leu Ala Ile  
20 25 30

Val Pro Ile Ile Ala Ile Ala Gly Val Val  
Glu Met Lys  
35 40 45

<210> 228  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 228  
Phe Glu His Met Tyr Ala Gln Ser Leu Gln  
Val Pro Tyr Arg  
1 5 10  
<210> 229  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Computer generated synth  
etic peptide  
<400> 229

&lt;400&gt; 230

Leu Met Ser Phe Glu Asp Val Leu Leu Val  
Phe Ser Ala Val Val Phe

1 5 10 15

Gly Ala Met Ala Val Gly Gln Ser Ser Phe  
Ala Pro Asp Tyr Ala Lys

20 25 30

&lt;210&gt; 231

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 231

Thr Pro Leu Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Glu  
Gly Leu Met Pro Asn Thr

1 5 10 15

Leu Glu Gly Asn Val Thr Phe Gly Glu Val  
Val Phe Asn Tyr Pro Thr

20 25 30

Arg

&lt;210&gt; 232

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 232

Glu Ala Asn Ile His Ala Phe Ile Glu Ser  
Leu Pro Asn Lys

1 5 10

&lt;210&gt; 233

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 233

Gly Ile Tyr Phe Ser Met Val Ser Val Gln  
Ala Gly Thr Lys

1 5 10

1                    5                    10                    15

Thr Asn Gly Phe Pro Ala Thr Val Ser Asn  
Asp Leu Lys

20                    25

<210> 235

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide

<400> 235

Ala Phe Thr Glu Gly Ala Val Leu Ser Phe  
His Asn Ile Cys Tyr Arg

1                    5                    10                    15

<210> 236

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide

<400> 236

Glu Ile Leu Ser Asn Ile Asn Gly Ile Met  
Lys Pro Gly Leu Asn Ala

1                    5                    10                    15

Ile Leu Gly Pro Thr Gly Gly Gly Lys

20                    25

<210> 237

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide

<400> 237

Asp Pro Ser Gly Leu Ser Gly Asp Val Leu  
Ile Asn Gly Ala Pro Arg

1                    5                    10                    15

Pro Ala Asn Phe Lys

20

<210> 238

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 239  
 Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala Ala Leu Arg

1                    5                    10

<210> 240  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 240  
 Leu Ala Thr Thr Met Thr Asn His Glu Lys

1                    5                    10

<210> 241  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 241  
 Thr Ser Ile Gly Met Glu Leu Ile Thr Asp  
 Pro Ser Ile Leu Ser Leu

1                    5                    10                    15

Asp Glu Pro Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ser  
 Thr Ala Asn Ala Val Leu

20                    25                    30

Leu Leu Leu Lys  
 35

<210> 242  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 242  
 Thr Ile Ile Phe Ser Ile His Gln Pro Arg

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 243

Leu Phe Asp Ser Leu Thr Leu Leu Ala Ser  
Gly Arg

1 5 10

&lt;210&gt; 244

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 244

Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu Ala  
Leu Gly Tyr Phe Glu Ser

1 5 10 15

Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn Asn  
Pro Ala Asp Phe Phe Leu

20 25 30

Asp Ile Ile Asn Gly Asp Ser Thr Ala Val  
Ala Leu Asn Arg

35 40 45

&lt;210&gt; 245

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 245

Leu Ala Glu Ile Tyr Val Asn Ser Ser Phe  
Tyr Lys

1 5 10

&lt;210&gt; 246

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> Computer generated synth  
etic peptide

&lt;400&gt; 246

Glu Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Cys His  
Gln Leu Arg

1 5 10

&lt;210&gt; 247

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

<211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 248  
 Ala Gly Val Leu Phe Phe Leu Thr Thr Asn  
 Gln Cys Phe Ser Ser Val  
 1 5 10 15  
  
 Ser Ala Val Glu Leu Phe Val Val Glu Lys  
  
 20 25  
 <210> 249  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 249  
 Leu Phe Ile His Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr  
 Tyr Arg  
 1 5 10  
 <210> 250  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Computer generated synth  
 etic peptide  
 <400> 250  
 Ala Asp Ala Phe Phe Val Met Met Phe Thr  
 Leu Met Met Val Ala Tyr  
 1 5 10 15  
  
 Ser Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala  
 Ala Gly Gln Ser Val Ser  
 20 25 30  
  
 Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys Phe  
 Val Phe Met Met Ile Phe  
 35 40 45  
  
 Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr Ile  
 Ala Ser Trp Leu Ser Trp  
 50 55 60  
  
 Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg  
 65 70

20

25

30

Cys Thr Gly Glu Glu Tyr Leu Val Lys  
35 40

<210> 252

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide

<400> 252

Gln Gly Ile Asp Leu Ser Pro Trp Gly Leu  
Trp Lys

1

5

10

<210> 253

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synth  
etic peptide

<400> 253

Asn His Val Ala Leu Ala Cys Met Ile Val

【 1】

Ile Phe Leu Thr Ile Ala

【 2】

1

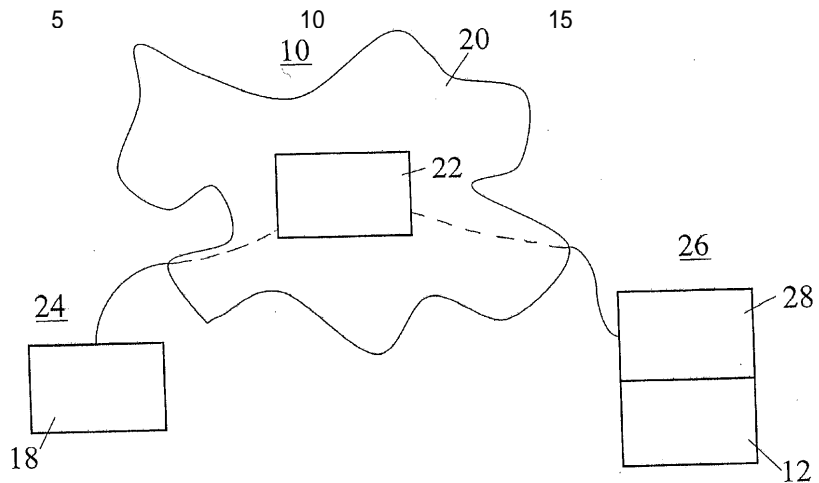
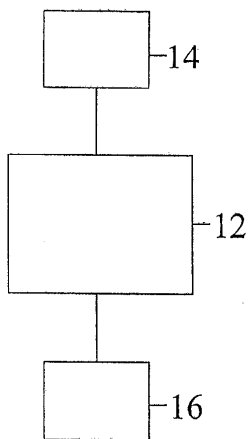
5

10

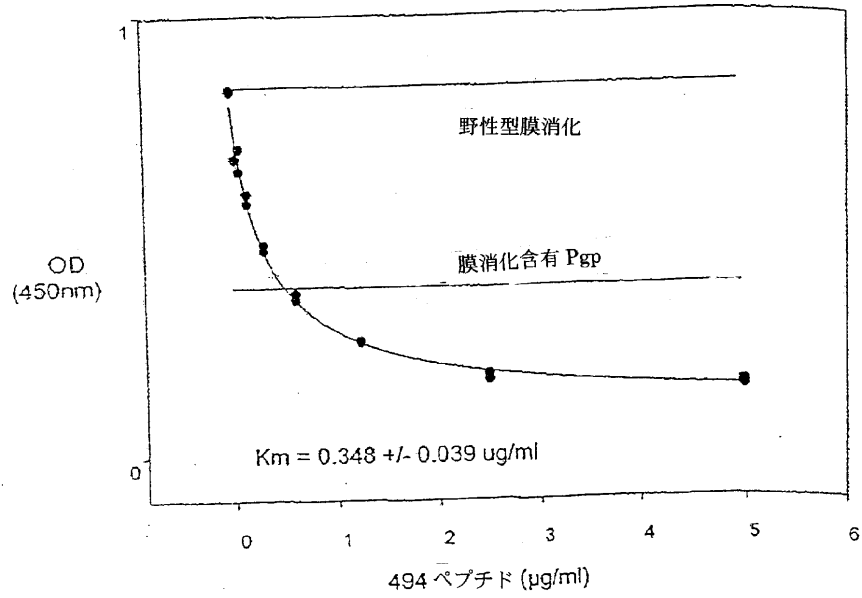
15

10

Leu Lys

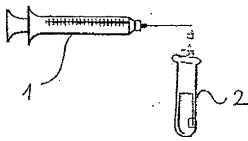


【図3】

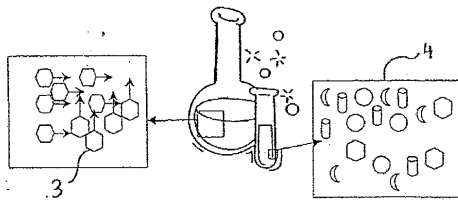


【図4】

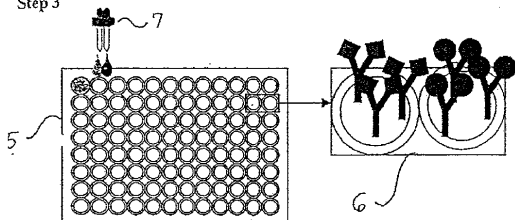
Step 1



Step 2



Step 3



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 37/00	1 0 2
37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	Z N A A
(72)発明者 エミル イスラエル カッツ イスラエル、52521 サヴィヨン、ハシャ ルヴァ ストリート 22		Fターム(参考)	4B024 AA01 AA11 BA31 BA61 HA03 4B029 AA07 BB16 FA15 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ79 QR16 QR48 QR82 QR90 QS02 QS28 QS36 4B064 AG01 AG27 CA21 CB01 DA20 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA50 FA50 FA70

## 【外国語明細書】

5

Inventor: Emil Israel Katz

10

Title: PEPTIDES REPRESENTATIVE OF POLYPEPTIDES OF  
INTEREST AND ANTIBODIES DIRECTED  
THEREAGAINST, AND METHODS, SYSTEMS AND KITS  
15 FOR GENERATING AND UTILIZING EACH

FIELD AND BACKGROUND OF THE INVENTION

The present invention relates to peptides representative of polypeptides  
20 of interest and antibodies directed thereagainst. More specifically, the present  
invention relates to methods, systems and kits for generating and utilizing such  
peptides and antibodies.

Immunoassays are the most commonly used type of diagnostic assay  
and still one of the fastest growing technologies used for detection,  
25 quantification and characterization of biomolecules. Although, bioassays  
based phenotypic screening, receptor binding and enzymatic activity are also  
commonly practiced, such bioassays cannot, in many instances, offer the same  
unlimited applicability and specificity of immunoassays.

Immunoassay parameters, including, antibody specificity, cross-reactivity and labeling are continuously researched in efforts to improve the resolving power of immunoassays [Marks et al. (1992) *Biotechnology* 10:779-783, Soderlind et al. (1999) *Immunotechnology* 4:279-285, Ohlin et al. (1996) *Mol. Immunol.* 33:47-56 and Hemminiki et al. (1998) *Immunotechnology* 4:59-69].

### ***Antibody engineering***

***Chain shuffling:*** The principle of shuffling gene segments encoding individual or combinations of complementarity-determining regions (CDRs) or entire variable (V) regions of an antibody is to create variation, which can be used to improve antibody affinity [Marks et al. (1992) *Biotechnology* 10:779-783, Soderlind et al. (1999) *Immunotechnology* 4:279-285 and Soderlind et al. (2000) 18:852-6]. One of the first examples was the gene shuffling of a human phage antibody specific for the hapten 2-phenyloxalozone. This was achieved by sequentially replacing the heavy and light chain V-region genes with repertoires of V-region genes obtained from non-immunized donors, resulting in a 300-fold increase in affinity.

***Phage display:*** Engineered phage particles, which express a fusion protein consisting of an antibody fragment and a coat-protein can be used for

antibody selection. Such phage particles are affinity-purified on immobilized antigen and following amplification in a bacterial host, used for selecting antibodies from large repertoires (e.g., libraries) [Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982]. Two types of repertoires are used; 5 "immunized repertoires" and "naive repertoires" [Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4:1-20]. The main advantage of using an immunized repertoire is that antibodies selected are expected to have high affinities, while it's major drawback is the need for a new repertoire for each new antigen. In this respect, naive libraries are practical, since once constructed they can then 10 be used almost indefinitely against a diverse range of antigens. However, naive libraries have to be very large in order to yield antibodies with reasonable affinities.

*Artificial antibodies:* Artificial antibodies are a recent development of non-biological alternatives to antibodies, also referred to as "plastibodies" 15 [Haupt et al. (1998) Trends Biotech. 16:468-475]. The plastibody principle is based on molecular imprinting, namely, a recognition site, which is molded directly in a polymer, to thereby mimic the binding site of a natural antibody. Such polymeric constructs are used in molecularly imprinted sorbent assays (MIA) [Vlatakis et al. (1993) Nature 361:645-647], against for example

theophylline and diazepam. Plastibodies exhibit a cross-reactivity profile, towards structurally related drugs, similarly to bona fide antibodies. The major problem in the design of molecular alternatives to antibodies is that only low-affinities variants are obtained, probably due to the rigidity of the  
5 plastibody recognition site.

Other examples of molecular constructs with 'antibody-like' properties are the 'knottin scaffolds' or the Z domain of the  $\alpha$ -helical bacterial receptor. The Z domain does not depend on intramolecular disulfide bridges, and is highly stable at extreme pH and heat conditions, thus making knottin scaffolds  
10 valuable in applications such as diagnostics and affinity purification. Although promising, the Z approach suffers from high dissociation constants and as such it is currently limited in applications.

### *Immunogens*

**Whole protein immunogens:** A whole protein injection is the preferred  
15 method of obtaining high affinity antibodies capable of recognizing the antigen native form. Antibodies which are capable of recognizing the native antigen are frequently used in diagnostics, vaccination and the emerging field of antibody-based therapy. However, various difficulties are associated with whole protein immunogens such as extraction of sufficient amounts of

accurately folded protein. Furthermore the use of large protein molecules as immunogens produces antisera containing polyclonal antibodies to the numerous epitopes of the large protein molecules, although monoclonal antibody techniques utilizing whole proteins or large portions thereof as

5 immunogens have been useful in narrowing the immunological response to such immunogens. However, a standalone monoclonal antibody technology is extremely time consuming and yields only a relatively small number of antibodies, which are capable of recognizing the immunogens specifically. Moreover, even when successful, such techniques cannot predict the

10 biochemical identity of the antigenic epitope.

*Synthetic peptide immunogens:* Synthetic peptide vaccines have been actively researched over the past two decades (Arnon, 1991; Steward and Howard, 1987). However, results show that only a very small portion of monoclonal antibodies raised against short to moderate length peptides derived

15 from the native protein recognize the synthetic peptide immunogens as well as the intact native protein [Arnheiter et al. (1981) Nature 294:278-280]. Furthermore, dissociation constants displayed by the immunocomplexes is oftentimes rather high.

Conjugating synthetic peptides to carriers has been attempted in efforts of improving the affinity of antibodies raised against such synthetic peptides to the native protein [Mariani M., et al. (1987) Mol. Immunol. 24:297-303]. For example Marianni and co-workers conjugated a synthetic peptide  
5 corresponding to amino acid residues 166-174 of human chorionic somatomammotropin (hCS) amino acid sequence to elicit monoclonal antibody response to the native hCS molecule. Selected antibody clones were characterized for isotype and affinity. As expected antibodies produced against carrier conjugated hCS peptides showed, on an average, a 1000-folds  
10 higher affinity towards the native hCS protein as compared to antibodies generated against non-conjugated peptides. Although promising, this approach oftentimes generates antibodies which are incapable of binding an antigen present in, or derived from, a biological sample.

Several additional approaches for developing synthetic peptide  
15 immunogens are known in the art. For example, U.S. Pat. No: 6,261,569 teaches of partially or completely retro-inverso modified antigen analogues, which are capable of mimicking the immunological activity of a native peptide antigen. Although as disclosed in U.S. Pat. No: 6,261,569, these analogues induced the production of antibodies, which recognize a native peptide antigen

when administered as an immunogen to an immunocompetent host, retero  
inversion of peptide antigens has met with limited success in the field of  
vaccination. Limitations in knowledge concerning antigen-antibody binding  
prevent accurate predictions as to the nature and binding efficiencies of  
5 antibodies elicited against an inverso, retro or retro-inverso peptide. The  
notion of retro inverso antigen analogues was further challenged by Lerner and  
co-workers (Lerner, 1984) who reported that antibodies generated against  
native, retro-, inverso- and retro-inverso forms of an influenza virus  
haemagglutinin peptide were not cross-reactive with the native peptide antigen.

10 There is thus a widely recognized need for, and it would be highly  
advantageous to have, peptides representative of a protein of interest, and high  
affinity antibodies directed thereagainst and methods of generating and using  
same for detecting, quantifying and/or characterizing polypeptides, such as for  
example, proteins contained in a biological sample.

15

#### SUMMARY OF THE INVENTION

According to one aspect of the present invention there is provided a  
method of generating a set of amino acid sequences representative of at least  
one polypeptide of interest, the method comprising: (a) computationally

generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest; (b) computationally analyzing the plurality of proteolytic cleavage products according to at least one parameter defining a characteristic of an amino acid sequence; and (c) selecting a set of proteolytic  
5 cleavage products from the plurality of proteolytic cleavage products according to predetermined criteria for each of the at least at least parameter, thereby generating the set of amino acid sequences representative of the at least one polypeptide of interest.

According to another aspect of the present invention there is provided a  
10 computer readable storage media comprising a database of amino acid sequences corresponding to at least one polypeptide of interest, the database of amino acid sequences being generated by: (a) computationally generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest; (b) computationally analyzing the plurality of proteolytic cleavage  
15 products according to at least one parameter defining a characteristic of an amino acid sequence; and (c) storing a sequence of each of the proteolytic cleavage products thereby generating the database of amino acid sequences.

According to yet another aspect of the present invention there is provided a system for generating a database of amino acid sequences of at least

one polypeptide of interest, the system comprising a processing unit, the processing unit executing a software application configured for: (a) generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest; and (b) analyzing the plurality of proteolytic cleavage products according to at least one parameter defining a characteristic of an amino acid sequence.

According to still another aspect of the present invention there is provided a kit for quantifying at least one polypeptide of interest, the kit comprising a plurality of peptides being generated according to information derived from computational analysis of the at least one polypeptide of interest, the computational analysis including generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest.

According to further features in preferred embodiments of the invention described below, the plurality of peptides are labeled.

According to still further features in the described preferred embodiments the plurality of peptides are attached to a solid substrate.

According to still further features in the described preferred embodiments the plurality of peptides is contained in an individual container.

According to still further features in the described preferred embodiments the peptides are mixed in a single container.

According to still further features in the described preferred embodiments the plurality of peptides are generated via peptide synthesis or  
5 proteolytic cleavage of the at least one polypeptide of interest.

According to an additional aspect of the present invention there is provided a kit for quantifying at least one polypeptide of interest, the kit comprising a plurality of antibodies each capable of specifically recognizing at least one peptide of a plurality of peptides, the plurality of peptides being  
10 generated according to information derived from computational analysis of the at least one polypeptide of interest, the computational analysis including generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest.

According to still further features in the described preferred  
15 embodiments the plurality of antibodies are labeled.

According to still further features in the described preferred embodiments the plurality of antibodies are attached to a solid substrate.

According to still further features in the described preferred embodiments the plurality of antibodies is contained in an individual container.

According to still further features in the described preferred embodiments the plurality of antibodies are mixed in a single container.

According to yet additional aspect of the present invention there is provided a method of quantifying at least one polypeptide of interest in a  
5 biological sample, the method comprising: (a) contacting the biological sample with at least one proteolytic agent, so as to obtain a proteolysed biological sample; (b) contacting the proteolysed biological sample with at least one antibody and at least one peptide of a plurality of peptides, wherein the antibody is capable of specifically binding the at least one peptide of the  
10 plurality of peptides, and further wherein the plurality of peptides are generated according to information derived from computational analysis of the at least one polypeptide of interest, the computational analysis including generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest; and (c) detecting presence, absence and/or level of antibody binding to  
15 thereby quantify the at least one polypeptide of interest in the biological sample.

According to still further features in the described preferred embodiments the at least one antibody is attached to a solid substrate.

According to still further features in the described preferred embodiments the solid substrate is configured as a microarray and the at least one antibody includes a plurality of antibodies each attached to the microarray in a regio-specific manner.

5           According to still further features in the described preferred embodiments the at least one antibody and/or the at least one peptide is labeled and whereas step (c) is effected by quantifying the label. According to still further features in the described preferred embodiments the at least one peptide is attached to a solid substrate.

10           According to still further features in the described preferred embodiments the solid substrate is configured as a microarray and each of the plurality of peptides is attached to the microarray in a regio-specific manner.

          According to still additional aspect of the present invention there is provided a method of generating at least one antibody specific to a polypeptide  
15 of interest, the method comprising using at least one peptide to generate the at least one antibody specific to the polypeptide of interest, wherein the at least one peptide is generated according to information derived from computational analysis of the polypeptide of interest, the computational analysis including

generating a plurality of proteolytic cleavage products from the polypeptide of interest.

According to still further features in the described preferred embodiments, computational analysis further includes analysis of the plurality  
5 of proteolytic cleavage products according to at least one parameter defining a characteristic of an amino acid sequence and selection of a set of proteolytic cleavage products from the plurality of proteolytic cleavage products according to predetermined criteria for each of the at least at least parameter.

According to still further features in the described preferred  
10 embodiments the plurality of proteolytic cleavage products are generated according to a proteolytic cleavage pattern of at least one proteolytic agent.

According to still further features in the described preferred embodiments the at least one proteolytic agent is selected from the group consisting of a proteolytic enzyme and a proteolytic chemical.

15 According to still further features in the described preferred embodiments the proteolytic enzyme is selected from the group consisting of trypsin, chymotrypsin, subtilisin, pepsin, V8 protease, thrombin and elastase.

According to still further features in the described preferred embodiments the proteolytic chemical is selected from the group consisting of cyanogen bromide and 2-nitro-5-thiocyanobenzoate.

According to still further features in the described preferred  
5 embodiments the at least one parameter defining the characteristic of the amino acid sequence is selected from the group consisting of molecular weight, amino acid composition, hydrophobicity, hydrophilicity, charge, secondary structure, heterogeneity, length, post-translational modifications, polarity, solubility, amphipathic nature, sequence and immunogenicity.

10 The present invention successfully addresses the shortcomings of the presently known configurations by providing a novel approach for producing immunogens and antibodies directed thereto and novel immunoassays utilizing same.

15 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The invention is herein described, by way of example only, with reference to the accompanying drawings. With specific reference now to the drawings in detail, it is stressed that the particulars shown are by way of example and for purposes of illustrative discussion of the preferred

embodiments of the present invention only, and are presented in the cause of providing what is believed to be the most useful and readily understood description of the principles and conceptual aspects of the invention. In this regard, no attempt is made to show structural details of the invention in more  
5 detail than is necessary for a fundamental understanding of the invention, the description taken with the drawings making apparent to those skilled in the art how the several forms of the invention may be embodied in practice.

In the drawings:

FIG. 1 illustrates a system designed and configured for generating a  
10 database of amino acid sequences representative of a protein of interest according to the teachings of the present invention.

FIG. 2 illustrates a remote configuration of the system described in Figure 1.

FIG. 3 illustrates a calibration curve of the enzyme-linked Elisa assay of  
15 the present invention as obtained by adding serial dilutions of peptide probe to a fixed quantity of antibodies recognizing the peptide probe. Data is fitted by hyperbolic descending. The horizontal lines represent the optical density of triplicate digested samples of P-glycoprotein expressing CHO cells (lower line) and wild type CHO cells (upper line).

FIG. 4 illustrates the use of an antibody matrix designed and constructed according to the teachings of the present invention.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

5           The present invention is of peptides representative of polypeptides of interest and antibodies directed thereagainst. Specifically, the peptides generated according to the teachings of the present invention can be used to generate antibodies useful for detecting quantifying and characterizing proteins contained in, or derived from a biological sample.

10           The principles and operation of the present invention may be better understood with reference to the drawings and accompanying descriptions.

          Before explaining at least one embodiment of the invention in detail, it is to be understood that the invention is not limited in its application to the details of construction and the arrangement of the components set forth in the following description or illustrated in the drawings described in the Examples section. The invention is capable of other embodiments or of being practiced or carried out in various ways. Also, it is to be understood that the phraseology and terminology employed herein is for the purpose of description and should not be regarded as limiting.

Antibodies are widely used in the fields of diagnostics, vaccination and therapy.

To date, most approaches for generating antibodies use purified intact proteins or synthetic peptide antigens as preferred immunogens. While the former is limited by the need to extract sufficient amounts of precisely folded  
5 protein, an essentially laborious and expensive method, the latter suffers from low immunogenicity and high dissociation constants.

The present invention provides a novel approach for producing peptides representative of polypeptides of interest and antibodies directed thereagainst,  
10 which antibodies are capable of specifically recognizing an antigen while being of minimal cross-reactivity potential.

As described hereinunder and in the Examples section which follows, the present invention provides novel peptide antigens which when administered to an immunocompetent host are capable of effectively inducing  
15 the production of protein-specific antibodies which can be used to detect the protein in samples, which contain low protein concentrations and/or low exposure of protein-specific antigenic regions.

The phrase "amino acid sequences" refers herein to an oligopeptide, peptide, polypeptide, or protein sequence and fragments thereof. Such molecules can be naturally occurring or synthetic.

The phrase "polypeptide-of-interest" is used herein in reference of any  
5 naturally occurring polypeptide or antigenic fragment thereof. The polypeptide-of-interest in accordance with the present invention includes, but is not limited to pathogen derived polypeptides such as, poliomyelitis, hepatitis B, foot and mouth disease of livestock, tetanus, pertussis, HIV, cholera, malaria, influenza, rabies or diphtheria causing agents, or toxins such as  
10 robustoxin, heat labile toxin of pathogenic Escherichia coli strains, Shiga toxin from Shigella dysenteriae, polypeptides derived from multi-drug resistant strains of staphylococcus Aureus and the like; degenerative diseases associated antigens such as the Amyloid- $\beta$ -protein of Alzheimer's disease; and pregnancy and fertility associated antigens, which antigens include for example human  
15 chorionic gonadotropin and gonadotropin releasing hormone.

The polypeptide of interest can also be a tumor associated antigen such as growth factors, growth factor receptors, as well as oncogene-encoded proteins, which are expressed at significantly increased or decreased levels on tumor cells, examples include but are not limited to transferrin growth factor

(Tf), Epidermal growth factor receptor (HER1-3), Fibroblast growth factor receptor (FGFR-1), Epidermal growth factor (EGF), p21-Ras, p53, ERa, bcl-2 and the like or oncofetal antigens such as  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA), MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1,2 and  
5 the like. Alternatively the polypeptide of interest can be a tumor specific antigen, which antigens are unique to tumor cells, and do not occur on normal cells in the body. Alternatively, the polypeptide of interest can be one associated with DNA repair, or with the suppression or enhancement of apoptosis or cell senescence.

10           Thus, according to one aspect of the present invention there is provided a method of generating a set of amino acid sequences representative of one or more polypeptides of interest.

The method according to this aspect of the present invention is effected by several steps.

15           First, a plurality of proteolytic cleavage products of the at least one polypeptide of interest are computationally generated according to a known proteolytic cleavage pattern of one or more proteolytic agent.

Following computer generation, the proteolytically cleaved amino acid sequences derived from the polypeptide of interest are computationally

analyzed according to one or more parameters, which define amino acid sequence characteristics.

These parameters are used individually or in combination according to predetermined criteria to select a set of amino acid sequences derived from the  
5 at least one polypeptide of interest.

Sequences that represent the one or more polypeptides of interest can be stored in a database which can be generated by a suitable computing platform. Amino acid sequences of the present invention can be further used to generate peptides and antibodies directed thereagainst, which can be packed in  
10 diagnostic kits and implemented in various therapeutic and diagnostic methods.

The proteolytic cleavage products described above can be computationally generated according to a known proteolytic cleavage pattern of one or more proteolytic agents. This can be effected using any processing software capable of recognizing proteolytic cleavage sites within an amino acid  
15 sequence and generating the amino acid sequences of such proteolysis.

It will be appreciated that although the use of a dedicated software application, such as Sciprot (available from [www.asiaonline.net.hk/~twcbio/DOCS/1/scPrtein.htm](http://www.asiaonline.net.hk/~twcbio/DOCS/1/scPrtein.htm)), the GCG package (Genetics Computer Group, Wisconsin) or Macvector (available from

www.accelrys.com/products/macvector/) is preferred, computational proteolysis of amino acid sequences can also be generated using non-dedicated software applications such as for example, a text edit application (e.g., Word available from Microsoft Inc.). Such a non-dedicated application can be used  
5 to recognize specific alphanumeric character sequences (i.e., cleavage sites) and to generate sequences of amino acids, which correspond to the cleavage products according to commands provided by the user (e.g., a Word Macro).

The proteolytic agent can be any agent, which is capable of cleaving polypeptides between specific amino acid residues (i.e., the proteolytic  
10 cleavage pattern).

According to one embodiment of this aspect of the present invention a proteolytic agent is a proteolytic enzyme. Examples of proteolytic enzymes, include but are not limited to trypsin, chymotrypsin, V8 protease, pepsin, subtilisin, thrombin, elastase, caspase-1, caspase-2, caspase-3, caspase-4,  
15 caspase-5, caspase-6, caspase-7, caspase-8, MetAP-2, adenovirus protease, HIV protease and the like.

According to another embodiment of this aspect of the present invention a proteolytic agent is a proteolytic chemical such as cyanogen bromide and 2-nitro-5-thiocyanobenzoate.

It will be appreciated that although any proteolytic agent known in the art can be used by the present invention, proteolytic reagents or combinations thereof, which enable complete substrate proteolysis are preferred.

Following computer generation, the proteolytically cleaved amino acid  
5 sequences derived from the polypeptide of interest are computationally analyzed according to one or more parameters, which define amino acid sequence characteristics.

Examples of such parameters include but are not limited to molecular weight, amino acid composition, hydrophobicity, hydrophilicity, charge,  
10 secondary structure, heterogeneity, length, post-translational modifications, polarity, solubility, amphipathic nature, sequence and immunogenicity.

Each of the peptide products computationally generated is classified according to one or preferably several parameters, which are described in detail below.

15 Each parameter can be considered separately according to predetermined criteria or in combination with other parameters used, in which case, each parameters is also weighted according to its importance. In any case, each of the peptide products is scored. The score of each peptide may be an absolute score, in which case peptides, which score above a predetermined

threshold are selected, or alternatively, the score can be proportional in which case highest scoring peptides are selected.

Although sequence analyses can be effected using various protein analysis softwares, analysis may also be effected at least in part, using other  
5 software applications not dedicated for such use. Examples of non-dedicated software applications which can be used include spread-sheet software, such as Microsoft Excel (available from Microsoft incorporation).

The following describes in detail parameters, which can be used by the present invention to qualify peptide sequences.

10 **Homology level:** The sequences of the computer generated peptide products are compared with protein databases in order to identify substantially non-homologous, (protein-unique) sequences. Preferably, sequences are compared to all known protein databases, employing a sequence alignment  
15 algorithm such as BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, available through [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) or the Smith-Waterman algorithm. Sequences that display low homology to database sequences, e.g., not exceeding 40%, preferably not exceeding 30%, more preferably not exceeding 20%, most preferably not exceeding 10%, or presently preferred displaying

0-5% homology are selected or given a high score depending on the type and number of parameters used for qualification.

**Immunogenicity:** The computer generated peptide products can also be analyzed for their ability to induce a specific immunogenic response, specifically, an antibody response. Various sequence analysis softwares are known in the art, which provide an immunogenicity index according to, for example, the Jameson-Wolf algorithm. Examples include, but are not limited to, Sciprot (available from [www.asiaonline.net.hk/~twcbio/DOCS/1/scPrtein.htm](http://www.asiaonline.net.hk/~twcbio/DOCS/1/scPrtein.htm)) and Macvector (available from [www.accelrys.com/products/macvector/](http://www.accelrys.com/products/macvector/)) as well as the widely utilized GCG package (Genetics Computer Group, Wisconsin).

Immunogenicity is determined, at least in part, by the following properties of the immunogen:

Foreignness- in order to elicit an immune response, amino acid sequences must be recognized as non-self by the immune system of the immunocompetent host. Generally, the greater the phylogenetic distance, between the two species (the species from which the antigen was extracted, and the immunocompetent host species), the greater the genetic and therefore the antigenic disparity between them.

Molecular size- there is a correlation between the size of an amino acid sequence and its immunogenicity. As such, amino acid sequences having a molecular mass of at least 1000 daltons (Da), more preferably at least 5000 Da, even more preferably at least 10,000 Da and most preferably have a molecular mass approaching 100,000 Da are favored by the present invention and as such are either selected or given a high score.

Chemical composition and heterogeneity- In general, homopolymers (i.e., polymers composed of a single amino acid) tend to lack immunogenicity, regardless of their size. Copolymers of sufficient size, containing two or more different amino acids, are immunogenic. Furthermore, all four levels of protein organization-primary, secondary, tertiary and quaternary-contribute to the structural complexity of a polypeptide and hence affect its immunogenicity.

Susceptibility to antigen processing and presentation- Basically, polypeptides that cannot be degraded and presented with MHC molecules are poor immunogens. Moreover, large insoluble molecules are more immunogenic than small soluble ones, because they are more readily phagocytosed and processed.

***Post-translational modifications:*** The computer generated peptide products can also be analyzed according to the presence, absence and/or level

of post-translational modifications. More than 100 different such modifications of amino acid residues are known, examples include but are not limited to phosphorylation, acetylation, methylation, hydroxylation, carboxylation and glycosylation. Sequence analysis softwares which are

5 capable of determining putative post-translational modification in a given amino acid sequence include the NetPhos server which produces neural network predictions for serine, threonine and tyrosine phosphorylation sites in eukaryotic proteins (available through <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), GPI Modification Site Prediction (available through

10 <http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi>) and the ExPASy proteomics server for total protein analysis (available through [www.expasy.ch/tools/](http://www.expasy.ch/tools/))

Generally, preferred peptide products are those lacking any post-translational modification sites, since post-translationally modified amino acid sequences are often difficult to purify, and are frequently poor

15 immunogens.

Notwithstanding from the above, peptide products which include post-translational modification, which indicate a biological activity of the polypeptide-of-interest can also be used by the present invention. A very common example is the phosphorylation of OH group of the amino acid side

chain of a serine, a threonine, or a tyrosine group in a polypeptide. Depending on the polypeptide, this modification can increase or decrease its functional activity.

*Size* - Preferred amino acid sequences include fragments of a molecular weight between 600 - 1800 Da and amino acid sequence length between 5 - 12. The size limitation is mainly due to the requirement for minimizing homologies to other polypeptides and technical difficulties associated with synthesizing, purifying and folding large polypeptides (besides the immunogenic-associated size limitation, discussed hereinabove).

10 The parameters described above are then used individually or in combination to analyze the computationally generated peptide products and to select a set of peptides most suitable for use with the present invention.

As mentioned hereinabove, selection can be effected on the basis of a single parameter or several parameters considered individually or in  
15 combination.

In cases where several parameters are examined, a scoring system e.g., a scoring matrix, is preferably used.

Since in some cases immunogenicity may be more important than both post-translational modifications and sizes, while in others, sequence homology

might be the most significant parameter, the use of a scoring matrix in which each parameter is weighted enables one to select the most suitable peptides.

Such a scoring matrix can list the various amino acid sequences (of the peptide products) across the X-axis of the matrix while each parameter can be  
5 listed on the Y-axis of the matrix. Parameters include both a predetermined range of values from which a single value is selected from each peptide, and a weight. Each peptide is scored at each parameter according to its value and the weight of the parameter.

Finally, the scores of each parameter of a specific peptide are summed  
10 and the results are analyzed.

Peptides which exhibit a total score greater than a particular stringency threshold are grouped as members of a peptide set; the higher the score the more stringent the criteria of grouping.

Alternatively, a set of peptides exhibiting the highest scores can also be  
15 selected.

The sequences of these peptides, which represent a polypeptide of interest, can then be used to generate a database which can be stored on a computer readable media such as a magnetic, optico-magnetic or optical disk.

In addition to sequence information, such a database can also include additional data relating to database generation, parameters used for selecting peptide sequences, putative uses of the stored sequences, and various other annotations and references which relate to the stored sequences or polypeptide  
5 from which they were generated

According to another aspect of the present invention and as illustrated in Figure 1, the database of peptide sequences of the present invention is generated by a system designed and configured for such function, which system is referred to hereinunder as system **10**.

10 System **10** includes a processing unit **12**, which executes a software application designed and configured for generating and preferably analyzing the plurality of proteolytic cleavage products from one or more polypeptides as described hereinabove. System **10** may also include a user input interface **14** (e.g., a keyboard and/or a mouse) for inputting database or database related  
15 information, and a user output interface **16** (e.g., a monitor) for providing database information to a user.

System **10** of the present invention may be used by a user to query stored sequences, to retrieve peptide sequences stored therein or to generate peptide sequences from user inputted sequences.

System **10** can be any computing platform known in the art including but not limited to, a personal computer, a work station, a mainframe and the like.

The database generated and stored by system **10** can be accessed by an  
5 on-site user of system **10**, or by a remote user communicating with system **10**.

Figure 2 illustrates a remote configuration of system **10** of the present invention.

In such a configuration, the communication between a remote user **18** and processing unit **12** is effected through a communication network **20**.  
10 Communication network **20** can be any private or public communication network including, but not limited to, a standard or cellular telephony network, a computer network such as the Internet or intranet, a satellite network or any combination thereof.

As illustrated in Figure 2, communication network **20** includes one or  
15 more communication servers **22** (one shown in Figure 2) which serves for communicating data pertaining to the polypeptide of interest between remote user **18** and processing unit **12**.

It will be appreciated that existing computer networks such as the Internet can provide the communication and applications necessary for

supporting data communication between any number of sites **24** and remote analysis sites **26**.

For example, using a computer operating a Web browser application and the World Wide Web, any polypeptide of interest can be "uploaded" by user **18**  
5 onto a Web site maintained by a database server **28**. Following uploading, database server **28** which serves as processing unit **12** can be instructed by the user to processes the polypeptides as is described hereinabove.

Following such processing, which can be performed in real time, peptide sequence results can be displayed at the web site maintained by database server  
10 **28** and/or communicated back to site **24**, via for example, e-mail communication.

Thus, using the Internet, a remote configuration of system **10** can provide protein analysis services to a plurality of sites **24** (one shown in Figure 2). It will be appreciated that this configuration of system **10** of the present invention  
15 is especially advantageous in cases where polypeptide analysis can not be effected on-site. For example, laboratories which lack the equipment necessary for executing the analysis or lack the necessary skills to operate it.

The peptide set selected according to the teachings of the present invention can be used to generate peptides either through enzymatic cleavage

of the protein from which they were generated and selection of peptides, or preferably through peptide synthesis methods.

Proteolytically cleaved peptides can be separated by chromatographic or electrophoretic procedures and purified and renatured via well known prior art  
5 methods.

Synthetic peptides can be prepared by classical methods known in the art, for example, by using standard solid phase techniques. The standard methods include exclusive solid phase synthesis, partial solid phase synthesis methods, fragment condensation, classical solution synthesis, and even by  
10 recombinant DNA technology. See, e.g., Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963), incorporated herein by reference. Solid phase peptide synthesis procedures are well known in the art and further described by John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984).

15 Synthetic peptides can be purified by preparative high performance liquid chromatography [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.] and the composition of which can be confirmed via amino acid sequencing.

Due to their protein specificity and immunogenicity, peptides produced according to the teachings of the present invention can be used to generate antibodies characterized by high affinity and specificity.

The peptides generated according to the teachings of the present invention or the antibodies directed thereagainst can be used for both  
5 diagnostic and therapeutic purposes.

For example, peptides corresponding to selected amino acid sequences of a protein of interest can be directly administered to an immunocompetent host as immunogens in order to elicit efficient production of antibodies  
10 directed at such a protein of interest. Such antibodies would be characterized by high affinity binding and specificity and as such, in cases of disease related protein, such peptides can be used as efficient therapeutic agents.

Alternatively, such peptides can be used to generate antibodies (monoclonal or polyclonal), which in turn can be used for diagnostic purposes.

15 Various hosts including goats, rabbits, rats, mice, humans and others, may be immunized by peptide injection for the purposes of generating antibodies. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to Freund's mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface active

substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin and dinitrophenol.

Monoclonal antibodies may be prepared using any technique which produces antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include  
5 but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the Epstein-Bar-Virus (EBV)-hybridoma technique [Kohler G., et al. (1975) *Nature* 256:495-497, Kozbor D., et al. (1985) *J. Immunol. Methods* 81:31-42, Cote R.J. et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030, Cole S.P. et al. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 62:109-120].

10 In addition, techniques developed for the production of “chimeric antibodies”, the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used [Morison S.L. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855, Neuberger M.S. et al. (1984) *Nature* 312:604-608, Takeda S. et al. (1985)  
15 *Nature* 314:452-454]. Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies may be adapted, using methods known in the art.

Antibodies may also be produced by inducing in vivo production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of

highly specific binding reagents as disclosed [Orlandi D.R. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3833-3837, Winter G. et al. (1991) Nature 349:293-299].

Antibody fragments may also be generated. For example, such fragments include F(ab')<sub>2</sub> fragments which may be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')<sub>2</sub> fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity [Huse W.D. et al. (1989) Science 254:1275-1281].

Various immunoassays may be used for screening antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificity are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between the immunogenic peptide and its specific antibody. Thus the peptides of the present invention may be used for identifying and purifying antibodies.

It will be appreciated that although generation of antibodies against synthetic peptides or cleavage products is preferred, antibodies generated

against the whole protein and affinity purified against the synthetic peptides or cleavage products can also be used by the present invention.

Peptides generated according to the teachings of the present invention or antibodies specific thereto can be used to diagnose a variety of diseases including but not limited to diabetes, Parkinson, Alzheimer' disease, HIV, 5 malaria, cholera, influenza, rabies, diphtheria, breast cancer, colon cancer, cervical cancer, melanoma, lung cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, lymphomas, leukemias and the like and any other diseases which are associated with aberrant expression of multiple antigens.

10 While most current immuno-diagnostic methods are rate limited by the number of antibodies which can be applied on a given biopsy and sensitivity-limited by masking of protein-specific antigenic regions, the present invention provides an immuno-detection assay which circumvents these limitations.

15 Thus, according to an additional aspect of the present invention there is provided a method of quantifying at least one polypeptide of interest in a biological sample.

The method includes several method steps, schematically illustrated in Figure 4.

In the first step, a biological sample is obtained. The biological sample as used herein refers to any body sample such as blood (serum or plasma), sputum, ascites fluids, pleural effusions, urine, biopsy specimens, isolated cells and/or cell membrane preparation. Methods of obtaining tissue biopsies and  
5 body fluids from mammals are well known in the art.

Retrieved biological samples can be further solubilized using detergent-based or detergent free (i.e., sonication) methods, depending on the biological specimen and the nature of the examined polypeptide (i.e., secreted, membrane anchored or intracellular soluble polypeptide). Oftentimes, protease  
10 and phosphatase inhibitors are included within the solubilization buffer, to avoid non-regulated endogenous protease activity, and maintenance of the polypeptides active form.

The solubilized biological sample is contacted with one or more proteolytic agents. Digestion is effected under effective conditions and for a  
15 period of time sufficient to ensure complete digestion of the diagnosed polypeptide(s). Agents that are capable of digesting a biological sample under moderate conditions in terms of temperature and buffer stringency are preferred. Measures are taken not to allow non-specific sample digestion, thus the quantity of the digesting agent, reaction mixture conditions (i.e., salinity

and acidity), digestion time and temperature are carefully selected. At the end of incubation time proteolytic activity is terminated to avoid non-specific proteolytic activity, which may evolve from elongated digestion period, and to avoid further proteolysis of other peptide-based molecules (i.e., purified peptides and/or antibodies), which are added to the mixture in following steps.

In the next method step the proteolysed biological sample is contacted with one or more antibodies, which are capable of binding one or more proteolytic cleavage products of the examined polypeptide(s) of interest. Such antibodies are capable of specifically binding peptides representative of the polypeptide(s) of interest, which were generated as described hereinabove.

The antibodies are attached to a solid substrate, which may consist of a particulate solid phase such as agarose, sepharose or sephadex beads or a solid substrate configured as an antibody microarray, such as a 96 well plate (see Examples 4 and 5 of the Examples section which follows).

Contacting the proteolysed biological sample with one or more antibodies is effected under conditions suitable for the formation of immune complexes (primary immune complexes).

Immunocomplexes are washed to remove any non-specifically bound antibody species, allowing only those antibodies specifically bound within the primary immune complexes to be detected.

In general monitoring of immunocomplex formation is well known in the art and may be achieved by any one of several approaches. These approaches are generally based on the detection of a label or marker, such as any radioactive, fluorescent, biological or enzymatic tags or labels of standard use in the art. U.S. Patents concerning the use of such labels include U.S. Pat. No. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 and 4,366,241, each incorporated herein by reference.

The examined polypeptide(s) may be linked to a detectable label, to allow simple detection of this labeled polypeptide, thereby allowing the amount of the primary immune complexes in the composition to be determined. Polypeptide labeling can be effected by labeling the biological sample, prior to, concomitant with or following sample digestion (see Example 3 of the Examples section).

Alternatively, labeled synthetic peptides added to the reaction mixture can be used to quantify binding of the proteolytic products via competitive binding approaches.

The intensity of signal produced in any of the detection methods described hereinabove may be analyzed manually or using a computer program.

In general, polypeptide quantification is preferably effected alongside a  
5 calibration curve so as to enable accurate protein determination (see Example 4 of the Examples section below for further detail). Furthermore, quantifying polypeptide(s) originating from a biological sample of a patient is preferably effected by comparison to a normal sample, which sample is characterized by normal expression pattern of the examined polypeptide(s).

10 It will be appreciated that the detection method described above can also be effected using peptide rather than antibody arrays. In such a case, peptides are attached to a solid support and used along with corresponding antibodies and proteolysed biological samples in competitive binding assays aimed at detecting the presence, absence and/or quantity of specific  
15 polypeptides.

It will further be appreciated that in cases of polypeptides which are associated with the formation of anti-self antibodies, such as the case with autoimmune disease associated polypeptides, such peptide arrays can also be

used to detect the presence of such autoantibodies, thereby enabling the detection of the disease.

Immunodetection methods of the present invention have evident utility in the diagnosis of various diseases and conditions. In addition, such methods  
5 can also be used in non-clinical applications, such as, for example, antigen titering and the like.

The peptides or antibodies generated according to the present invention can be included in a diagnostic or therapeutic kit. For example, peptide sets of specific disease related proteins or antibody populations directed thereagainst  
10 can be packaged in a one or more containers with appropriate buffers and preservatives and used for diagnosis or for directing therapeutic treatment.

Thus, the peptides or antibodies can be each mixed in a single container or placed in individual containers. Preferably, the containers include a label. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, and test tubes.  
15 The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic.

In addition, other additives such as stabilizers, buffers, blockers and the like may also be added.

The peptides or antibodies of such kits can also be attached to a solid support, such as beads, array substrate (e.g., chips) and the like and used for diagnostic purposes. Example 4 and Example 5 of the Examples section describe the use of substrate immobilized antibody arrays designed for such purposes.

5           Peptides and antibodies included in kits or immobilized to substrates may be conjugated to a detectable label such as an enzyme, in which case the kit also includes substrates and cofactors required by the enzyme to produce a colorimetric reaction (e.g. a substrate precursor which provides the detectable chromophore or fluorophore). Alternatively, the detectable label can be a tag  
10 such as an epitope tag , examples of which include but are not limited to a Myc tag, a Flag tag, a His tag, a Leucine tag, an IgG tag, a streptavidin tag and the like, in which case the kit will include an antibody directed at the epitope and a secondary labeled antibody conjugated to a chromophore or a fluorophore, possibly the epitope directed antibody is labeled.

15           The kit can also include instructions for determining if the tested subject is suffering from, or is at risk of developing, a condition, disorder, or disease associated with expression of the polypeptide of interest.

The peptides and antibodies directed thereagainst of the present invention are valuable to the fields of biomolecule research, therapy and

diagnostics. The ability to simultaneously identify multiple antigens associated with a disease or condition can result in an optimized treatment regimen as well as enable identification of an onset or an early stage of diseases, thereby significantly improving prognosis and treatment.

5           Additional objects, advantages, and novel features of the present invention will become apparent to one ordinarily skilled in the art upon examination of the following examples, which are not intended to be limiting. Additionally, each of the various embodiments and aspects of the present invention as delineated hereinabove and as claimed in the claims section below  
10 finds experimental support in the following examples.

#### ***EXAMPLES***

Reference is now made to the following examples, which together with the above descriptions, illustrate the invention in a non limiting fashion.

Generally, the nomenclature used herein and the laboratory procedures utilized  
15 in the present invention include molecular, biochemical, microbiological and recombinant DNA techniques. Such techniques are thoroughly explained in the literature. See, for example, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in

Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989);  
Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New  
York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books,  
New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual  
5 Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998);  
methodologies as set forth in U.S. Pat. Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531;  
5,192,659 and 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes  
I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III  
Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology"  
10 (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi  
(eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co.,  
New York (1980); available immunoassays are extensively described in the  
patent and scientific literature, see, for example, U.S. Pat. Nos. 3,791,932;  
3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654;  
15 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771  
and 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic  
Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985);  
"Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984);  
"Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and

Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning"  
Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press;  
"PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press,  
San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and  
5 Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); all of  
which are incorporated by reference as if fully set forth herein. Other general  
references are provided throughout this document. The procedures therein are  
believed to be well known in the art and are provided for the convenience of  
the reader. All the information contained therein is incorporated herein by  
10 reference.

### ***Background***

Multi-drug resistance (MDR) represents a major obstacle in the  
successful therapy of neoplastic diseases. Studies have demonstrated that this  
form of drug resistance occurs both in cultured tumor cell lines as well as in  
15 human cancers. Recent findings show that numerous molecular mechanisms  
operate in MDR; from decrease in drug cellular accumulation to the abrogation  
of drug-induced apoptosis. The most investigated mechanisms for MDR  
include activation or upregulation of transmembrane proteins, effluxing  
different chemical substances from the cells (P-glycoprotein is the most

characterized efflux pump), activation of the glutathione detoxification system and alterations of genes and proteins involved in the control of apoptosis (especially p53 and Bcl-2).

It has been suggested that expression of MDR associated proteins has a prognostic value to various types of human cancers including leukemias and soft tissue sarcomas. For example, the failure to achieve complete remission in acute myeloid leukemia has been associated with P-glycoprotein expression [Broxterman HJ. et al. (1997) J. int. Med. Suppl. 70:147-51], while P-glycoprotein expression was shown to serve as a molecular marker for response to chemotherapy in bone and soft tissue sarcomas [Stein V et al. (1996) Eur. J. Cancer 32A:86-92].

Further progress towards understanding the clinical importance of MDR associated proteins and P-glycoprotein specifically, is hampered by the lack of validation methods to determine their expression.

15

#### ***EXAMPLE 1***

##### ***Construction of a kit suitable for identifying and quantifying multi-drug resistance associated proteins in a biological sample***

The large variety of proteins, which are found to be associated with a condition or a disease, defines a need for a kit which can rapidly evaluate

protein antigen in a tissue sample, such as in a biopsy taken from a suspected cancer patient. The kit presented hereinunder is suitable for reacting multiple antigens present in a biological sample with a large number of antibodies at once.

- 5            **Step 1 - In-silico extraction of tryptic amino acid sequences:** Entire protein sequences of P-glycoprotein (GenBank accession number Hs.21330) and Mitoxantrone resistance protein (MXR) (GenBank accession number Hs.194720), two of the numerous MDR associated proteins, were retrieved from the protein gene bank. The amino acid sequences of P-glycoprotein and MXR  
10 were computationally analyzed to obtain tryptic amino acid sequences using the edit/replace function of Microsoft Word (Microsoft Incorporation). Tryptic sequences derived from P-glycoprotein are presented in Table 1 below.

**Table 1**

<b>P-glycoprotein tryptic fragments</b>	<b>MXR tryptic fragments</b>
MDLEGDR (SEQ ID NO: 1)	MSSSNVEVFIPVSQGNTNGFPATVSNDLK (SEQ ID NO: 150)
NGGAK (SEQ ID NO 2)	AFTEGAVLSFHNICYR (SEQ ID NO: 151)
K (SEQ ID NO: 3)	VK (SEQ ID NO: 152)
K (SEQ ID NO: 4)	LK (SEQ ID NO: 153)
NFFK (SEQ ID NO:5)	SGFLPCR (SEQ ID NO: 154)
LNNK (SEQ ID NO:6)	K (SEQ ID NO: 155)
SEK (SEQ ID NO 7)	PVEK (SEQ ID NO: 156)
DK (SEQ ID NO 8)	EILSNINGIMK (SEQ ID NO: 157)
K (SEQ ID NO: 9)	PGLNAILGPTGGGK (SEQ ID NO: 158)
EK (SEQ ID NO: 10)	SLLDVLAAR (SEQ ID NO: 159)
K (SEQ ID NO: 11)	K (SEQ ID NO: 160)
PTVSVFSMFR (SEQ ID NO:12)	DPSGLSGDVLINGAPR (SEQ ID NO: 161)
YSNWLDK (SEQ ID NO:13)	PANFK (SEQ ID NO: 162)
LYMVVGTLAIIHGAGLPLMMLVFGEMT DIFANAGNLEDLMSNITNR (SEQ ID NO:14)	CNSGYVVQDDVVMGTLTVR (SEQ ID NO: 163)

SDINDTGFFMNLEEDMTR (SEQ ID NO:15)	ENLQFSAALR (SEQ ID NO: 164)
YAYYYSGIGAGVLVAAAIQVSWCLAAGR (SEQ ID NO: 16)	LATTMTNHEK (SEQ ID NO: 165)
QIHK (SEQ ID NO:17)	NER (SEQ ID NO: 166)
IR (SEQ ID NO 18)	INR (SEQ ID NO: 167)
K (SEQ ID NO 19)	VIEELGLDK (SEQ ID NO: 168)
QFFHAIMR (SEQ ID NO 20)	VADSK (SEQ ID NO: 169)
QEIGWFDVHDVVGELNTR (SEQ ID NO 21)	VGTQFIR (SEQ ID NO: 170)
LTDDVSK (SEQ ID NO 22)	GVSGGER (SEQ ID NO: 171)
INEGIGDK (SEQ ID NO 23)	K (SEQ ID NO: 172)
IGMFFQSMATFFTGFIVGFTR (SEQ ID NO: 24)	R (SEQ ID NO: 173)
GWK (SEQ ID NO 25)	TSIGMELITDPSILSLDEPTTGLDSSTANAV LLLLK (SEQ ID NO: 174)
LTLVILAISPVGLGLSAAVWAK (SEQ ID NO:26)	R (SEQ ID NO: 175)
ILSSFTDK (SEQ ID NO: 27)	MSK (SEQ ID NO: 176)
ELLAYAK (SEQ ID NO: 28)	QGR (SEQ ID NO: 177)
AGAVAEVLAAIR (SEQ ID NO: 29)	TIIFSIHQPR (SEQ ID NO: 178)
TVIAFGGQK (SEQ ID NO: 30)	YSIFK (SEQ ID NO: 179)
K (SEQ ID NO: 31)	LFDSLTLASGR (SEQ ID NO: 180)
ELER (SEQ ID NO: 32)	LMFHGPAQEALGYFESAGYHCEAYNPA DFFLDIINGDSTAVLNLR (SEQ ID NO: 181)
YNK (SEQ ID NO: 33)	EEDFK (SEQ ID NO: 182)
NLEEK (SEQ ID NO: 34)	ATEIIEPSK (SEQ ID NO: 183)
R (SEQ ID NO: 35)	QDK (SEQ ID NO: 184)
IGIK (SEQ ID NO: 36)	PLIEK (SEQ ID NO: 185)
K (SEQ ID NO: 37)	LAEIYVNSSFYK (SEQ ID NO: 186)
AITANISIGAAFLLIYASYALAFWYGTTLV LSGEYSIGQVLTVFFSVLIGAFSVGQASPSI EAFANAR (SEQ ID NO: 38)	ETK (SEQ ID NO: 187)
GAAYEIFK (SEQ ID NO: 39)	AELHQLSGGEK (SEQ ID NO: 188)
IIDNK (SEQ ID NO: 40)	K (SEQ ID NO: 189)
PSIDSYSK (SEQ ID NO: 41)	K (SEQ ID NO: 190)
SGHK (SEQ ID NO: 42)	K (SEQ ID NO: 191)
PDNIK (SEQ ID NO: 43)	ITVFK (SEQ ID NO: 192)
GNLEFR (SEQ ID NO: 44)	EISYTTSFCHQLR (SEQ ID NO: 193)
NVHFSYPSR (SEQ ID NO: 45)	WVSK (SEQ ID NO: 194)
K (SEQ ID NO: 46)	R (SEQ ID NO: 195)
EVK (SEQ ID NO: 47)	SFK (SEQ ID NO: 196)
ILK (SEQ ID NO: 48)	NLLGNPQASIAQIIVTVVLGLVIGAIYFGL K (SEQ ID NO: 197)
GLNLK (SEQ ID NO: 49)	NDSTGIQNR (SEQ ID NO: 198)
VQSGQTVALVGNVSGCGK (SEQ ID NO: 50)	AGVLFLLTNNQCFSSVSAVELFVVEK (SEQ ID NO: 199)
STTVQLMQR (SEQ ID NO: 51)	K (SEQ ID NO: 200)
LYDPTEGMVSDGQDIR (SEQ ID NO: 52)	LFIHEYISGYR (SEQ ID NO: 201)
TINVR (SEQ ID NO: 53)	VSSYFLGK (SEQ ID NO: 202)
FLR (SEQ ID NO: 54)	LLSDLLPMR (SEQ ID NO: 203)
EIIGVVSQEPVLFATTIAENIR (SEQ ID NO: 55)	MLPSIIFTCIVYFMLGLK (SEQ ID NO: 204)
YGR (SEQ ID NO: 56)	PK (SEQ ID NO: 205)
ENVTMDEIEK (SEQ ID NO: 57)	ADAFFVMMFTLMMVAYSASSMALAIAA GQSVVSVATLLMTICFVMMIFSGLLVNL TTIASWLSWLQYFSIPR (SEQ ID NO: 206)
AVK (SEQ ID NO: 58)	YGFTALQHNEFLGQNFPCPLNATGNNPC NYATCTGEEYLVK (SEQ ID NO: 207)

EANAYDFIMK (SEQ ID NO: 59)	QGIDLSPWGLWK (SEQ ID NO: 208)
LPHK (SEQ ID NO: 60)	NHVALACMIVIFLTIAYLK (SEQ ID NO: 209)
FDTLVGER (SEQ ID NO: 61)	LLFLK (SEQ ID NO: 210)
GAQLSGGQK (SEQ ID NO: 62)	K (SEQ ID NO: 211)
QR (SEQ ID NO: 63)	YS (SEQ ID NO: 212)
IAIAR (SEQ ID NO: 64)	
ALVR (SEQ ID NO: 65)	
NPK (SEQ ID NO: 66)	
ILLDEATSALDTESEAVVQVALDK (SEQ ID NO: 67)	
AR (SEQ ID NO: 68)	
K (SEQ ID NO: 69)	
GR (SEQ ID NO: 70)	
TTIVIAHR (SEQ ID NO: 71)	
LSTVR (SEQ ID NO: 72)	
NADVIAGFDDGVIVEK (SEQ ID NO: 73)	
GNHDELMK (SEQ ID NO: 74)	
EK (SEQ ID NO: 75)	
GIYFK (SEQ ID NO: 76)	
LVTMQTAGNEVELENAADESK (SEQ ID NO: 77)	
SEIDALEMSSNDSR (SEQ ID NO: 78)	
SSLIR (SEQ ID NO: 79)	
K (SEQ ID NO: 80)	
R (SEQ ID NO: 81)	
STR (SEQ ID NO: 82)	
R (SEQ ID NO: 83)	
SVR (SEQ ID NO: 84)	
GSQAQDR (SEQ ID NO: 85)	
K (SEQ ID NO: 86)	
LSTK (SEQ ID NO: 87)	
EALDESIPPVSFWR (SEQ ID NO: 88)	
IMK (SEQ ID NO: 89)	
LNLTEWPYFVVGVFCAIINGGLQPAFAIIFSK (SEQ ID NO: 90)	
IIGVFTR (SEQ ID NO: 91)	
IDDPETK (SEQ ID NO: 92)	
R (SEQ ID NO: 93)	
QNSNLFSLFLALGIISFITFFLQGFTEGK	
AGEILTK (SEQ ID NO: 94)	
R (SEQ ID NO: 95)	
LR (SEQ ID NO: 96)	
YMVFR (SEQ ID NO: 97)	
SMLR (SEQ ID NO: 98)	
QDVSWFDDPK (SEQ ID NO: 99)	
NTTGALTTR (SEQ ID NO: 100)	
LANDAAQVK (SEQ ID NO: 101)	
GAIGSR (SEQ ID NO: 102)	
LAVITQNIANLGTGIIISFIYGWQLTLLLLAI	
VPIAIAAGVVEMK (SEQ ID NO: 103)	
MLSGQALK (SEQ ID NO: 104)	
DK (SEQ ID NO: 105)	
K (SEQ ID NO: 106)	
ELEGAGK (SEQ ID NO: 107)	
IATEAIENFR (SEQ ID NO: 108)	
TVVSLTQEQK (SEQ ID NO: 109)	

FEHMYAQSLQVPYR (SEQ ID NO: 110)
NSLR (SEQ ID NO: 111)
K (SEQ ID NO: 112)
AHIFGITFSFTQAMMYFSYAGCFR (SEQ ID NO: 113)
FGAYLVAHK (SEQ ID NO: 114)
LMSFEDVLLVFSVAVVFGAMAVGQVSSFA PDYAK (SEQ ID NO: 115)
AK (SEQ ID NO: 116)
ISAAHIIMIEK (SEQ ID NO: 117)
TPLIDSYSTEGLMPNTLEGNTFGEVVFN YPTR (SEQ ID NO: 118)
PDIPVLQGLSLEVK (SEQ ID NO: 119)
K (SEQ ID NO: 120)
GQTLALVGSSGCGK (SEQ ID NO: 121)
STVVQLLER (SEQ ID NO: 122)
FYDPLAGK (SEQ ID NO: 123)
VLLDGK (SEQ ID NO: 124)
EIK (SEQ ID NO: 125)
R (SEQ ID NO: 126)
LNVQWLR (SEQ ID NO: 127)
AHLGIVSQEPILFDCSIAENIAYGDNSR (SEQ ID NO: 128)
VVSQEEIVR (SEQ ID NO: 129)
AAK (SEQ ID NO: 130)
EANIHFIESLPNK (SEQ ID NO: 131)
YSTK (SEQ ID NO: 132)
VGDK (SEQ ID NO: 133)
GTQLSGGQK (SEQ ID NO: 134)
QR (SEQ ID NO: 135)
IAIAR (SEQ ID NO: 136)
IAIAR (SEQ ID NO: 137)
ALVR (SEQ ID NO: 138)
QPHILLDEATSALDTESEK (SEQ ID NO: 139)
VVQEALDK (SEQ ID NO: 140)
AR (SEQ ID NO: 141)
EGR (SEQ ID NO: 142)
TCIVIAHR (SEQ ID NO: 143)
LSTIQNADLIVVFQNGR (SEQ ID NO: 144)
VK (SEQ ID NO: 145)
EHGTHQQLAQK (SEQ ID NO: 146)
GIYFSMVSQAGTK (SEQ ID NO: 147)
R (SEQ ID NO: 148)
Q (SEQ ID NO: 149)

**Table 1 Cont.*****Step 2 - In silico selection of non-homologous amino acid sequences:***

Computationally extracted tryptic amino acid sequences of P-glycoprotein and

MXR protein were scanned for homology to all known protein sequences using the BLAST and Smith-Waterman algorithms by Unix-interfaced GCG server.

Only a portion of the tryptic amino acid sequences listed in Table 1, were found to be unique to each of P-glycoprotein and MXR protein. These 5 sequences, which were not found in any other human protein recorded in the human database (Unigene databank) are listed in Table 2 below.

**Table 2**

	P-glycoprotein Unique tryptic fragments	MXR Unique tryptic fragments
1.	LYMVVGTLAIIHGAGLPLMMLVF GEMTDIFANAGNLEDLMSNITNR (SEQ ID NO: 213)	MSSSNVEVFIPVSQGNTNGFPATVSNDLK (SEQ ID NO: 234)
2.	SDINDTGFFMNLEEDMTR (SEQ ID NO: 214)	AFTEGAVLSFHNICYR (SEQ ID NO: 235)
3.	YAYYYSGIGAGVLVAAYIQVSFWCL AAGR (SEQ ID NO: 215)	EILSNINGIMKPLNAILGPTGGGK (SEQ ID NO: 236)
4.	IGMFFQSMATFFTGFIVGFTR (SEQ ID NO: 216)	DPSGLSGDVLINGAPRPANFK (SEQ ID NO: 237)
5.	LTLVILAI SPVLGLSAAVWAK (SEQ ID NO: 217)	CNSGYVVQDDVVMGTLTVR (SEQ ID NO: 238)
6.	AITANISIGAAFLLIYASYALAFWYG TTLVLSGEYSIGQVLTVF FSVLIGAFSVGQASPSIEAFANAR (SEQ ID NO: 218)	ENLQFSAALR (SEQ ID NO: 239)
7.	LYDPTEGMVSVDGQDIR (SEQ ID NO: 219)	LATTMTNHEK (SEQ ID NO: 240)
8.	ILLDEATSALDTESEAVVQVALDK (SEQ ID NO: 220)	TSIGMELITDPSILSLDEPTTGLDSSTANA VLLLLK (SEQ ID NO: 241)
9.	NADVIAGFDDGVIVEK (SEQ ID NO: 221)	TIIFSIHQPR (SEQ ID NO: 242)
10.	LVTMQTAGNEVELENAADESK (SEQ ID NO: 222)	LFDSLTLASGR (SEQ ID NO: 243)
11.	SEIDALEMSSNDSR (SEQ ID NO: 223)	LMFHGPAQEALGYFESAGYHCEAYNNPA DFFLDIINGDSTAVALNR (SEQ ID NO: 244)
12.	EALDESIPPVSFWR (SEQ ID NO: 224)	LAEIYVNSSFYK (SEQ ID NO: 245)
13.	LNLTEWPYFVVGVFCAIINGGLQPA FAIIFSK (SEQ ID NO: 225)	EISYTTSFCHQLR (SEQ ID NO: 246)
14.	QNSNLFSLFLALGIHSFITFFLQGFVK (SEQ ID NO: 226)	NLLGNPQASIAQIIVTVVLGLVIGAIYFGLK (SEQ ID NO: 247)

15.	LAVITQNIANLGTGIIISFIYGWQLTL LLLAIVPIIAIAGVVEMK (SEQ ID NO: 227)	AGVLFFLTNNQCFSSVSAVELFVVEK (SEQ ID NO: 248)
16.	FEHMYAQLQVPYR (SEQ ID NO: 228)	LFIHEYISGYR (SEQ ID NO: 249)
17.	AHIFGITFSFTQAMMYFSYAGCFR (SEQ ID NO: 229)	ADAFFVMMFTLMMVAYSASSMALAIAAGQSV SVATLLMTICFVFMIFSGLLVNLTTIASWLSWL QYFSIPR (SEQ ID NO: 250)
18.	LMSFEDVLLVFSVAVVFGAMAVGQS SFAPDYAK (SEQ ID NO: 230)	YGFTALQHNEFLGQNFPCPLNATGNNPCN YATCTGEEYLVK (SEQ ID NO: 251)
19.	TPLIDSYSTEGLMPNTLEGNTVFGEV VFNYPTR (SEQ ID NO: 231)	QGIDLSPWGLWK (SEQ ID NO: 252)
20.	EANIHFIESLPNK (SEQ ID NO: 232)	NHVALACMIVIFLTIAYLK (SEQ ID NO: 253)
21.	GIYFSMVSQAGTK (SEQ ID NO: 233)	

Table 2 Cont.

**Step 3 - In silico selection of immunogenic amino acid sequences:**

These unique tryptic amino acid sequences were further analyzed for immunogenicity, by testing parameters such as foreignness, amino acid  
5 chemical composition and heterogeneity, peptide molecular weight and susceptibility to antigen processing and presentation.

Following such analysis, several immunogenic sequence candidates were selected from the amino acid sequences presented in Table 2. The candidate sequences selected included peptides: 2, 7, 8, 11 and 19 of the  
10 P-glycoprotein list and peptides 5, 8, 10, 13 and 16 of the MXR list.

**Step 4 - Preparation of selected amino acid sequences:** Peptide 8 of the MXR list and peptides 8 and 19 of the P-glycoprotein list were selected from the above described candidates for further studies. Highly immunogenic

portions of these peptides including amino acids 9-21 of MXR peptide 8 and amino acids 12-25 and 13-22 of P-glycoprotein peptides 8 and 19 (respectively) were synthesized and purified by HPLC.

**Step 5 - Generation of antibodies against selected peptides:** Polyclonal antibodies directed against the selected amino acid sequence of MXR were prepared in rabbit using known techniques, while monoclonal antibodies were obtained against the selected amino acid sequences of the P-glycoprotein.

**Step 6 - Matrix construction and calibration:** To calibrate the matrix, as to non-specifically bound proteins, polyclonal antibodies against three proteins known to be constitutively expressed in human tissues (i.e., house keeping proteins) were further prepared in rabbits. Each of the control antibodies and the antibodies generated in step 4 above, were conjugated to a solid support, comprised of a multiwell plastic plate (Nunc Immunosorb). Antibodies were left to bind overnight at 4°C at a neutral pH in phosphate-buffered saline (PBS). Subsequent to antibody conjugation, the multiwell plate was washed in PBS containing 1% bovine serum albumine (BSA), and finally stored at 4°C in the presence of 0.01% sodium azide thus generating a matrix of substrate-bound antibodies each specifically directed against an MDR associated peptide.

***Step 7 - preparation of purified labeled tryptic peptides capable of***

***binding the matrix antibodies:*** All tryptic peptides used for generating the antibodies of step 5 were end labeled at the amino terminus by fluorescent labeling, such that a uniform signal is obtained in all the wells or positions in  
5 the matrix when these peptides are conjugated with their respective antibodies. This mixture of labeled tryptic polypeptides is capable of competing with MDR associated proteins found in a sample of interest.

***EXAMPLE 2***

***A competition assay for quantifying multi-drug resistance associated proteins***

10 ***in a biological sample***

This example illustrates a stepwise procedure, which utilizes the matrix described above to identify and quantify multi-drug resistance associated proteins in a biological sample.

A cell culture, which exhibits an MDR phenotype, is dissolved by  
15 suspending the sample in a 1-2 % sodium dodecyl sulfate (SDS) containing buffer for one hour. Denatured proteins are precipitated by adding methanol/acetic acid (pH-4) followed by an overnight incubation at -20°C. Thereafter, the protein precipitate is resuspended in 0.05-0.1 % SDS, and trypsin is added to the resuspended sample. Tryptic digestion is allowed to

proceed for 16 hours at 37° until complete proteolytic fragmentation of the sample proteins. At the completion of digestion residual tryptic activity is terminated by adding bovine trypsin inhibitor.

Subsequently, a portion of the tryptic-digested sample is added to an  
5 antibody matrix, which is prepared as described hereinabove. Incubation is allowed to proceed for 1 hour at room temperature to allow formation of immunocomplexes, following which, the matrix is washed twice with phosphate buffered saline (PBS) containing 1 % BSA, to reduce non-specific binding.

10 Monitoring specific binding of sample proteins to the matrix is effected using a mixture of fluorescently labeled polypeptides against which the matrix antibodies were raised. In principle, such a peptide mixture is designed to generate a homogeneously fluorescent surface when applied on a fresh matrix, and to provide a reduced signal when applied to a matrix, which has been  
15 previously treated with a digested protein sample detectable by the matrix. The intensity of the fluorescent signal obtained from the matrix as correlated to specific positions in the matrix gives a quantitative measure of the amount of protein present in the sample, after considering the amount of protein sample

applied to the matrix, and control binding, as determined using signals obtained from three control antibodies described in Example 1.

**EXAMPLE 3**

***A direct assay for quantifying multi-drug resistance associated proteins in a biological sample***

5

This assay is aimed at quantifying MDR associated proteins in a biological sample by utilizing fluorescently labeled peptides products of the digested sample. As such, this assay is based on a direct correlation between the level of the fluorescent signal obtained and the level of the protein to be  
10 quantified.

A labeled digested sample is applied onto a fresh antibody matrix, and specific immunocomplexes are allowed to form as described in Example 2 of the Examples section. The intensity of fluorescent signal correlated with specific positions in the matrix, gives a quantitative measure of the amount of  
15 MDR associated proteins present in the sample, after considering the amount of protein sample applied to the matrix, and control binding, as determined using signals obtained from three control antibodies described in Example 1.

**EXAMPLE 4*****Quantifying P-glycoprotein expression level in membrane fractions of  
chinese hamster ovarian cell-lines***

The following Example illustrates use of an MDR1-specific matrix, for  
5 determining the expression level of P-glycoprotein (i.e., MDR1 gene product)  
in two different Chinese hamster ovarian cell-lines.

**Method:** Total membrane protein (1700 µg) obtained from  
P-glycoprotein expressing CHO cells (Pgp-CHO) and control wild type cells  
(WT-CHO) was suspended in 1.12 % SDS, precipitated with methanol/acetic  
10 acid, incubated at -20°C for 16 hours, resuspended in 0.07 % SDS and digested  
overnight with N-tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone (TPCK)-treated  
trypsin. Digested protein samples were centrifuged at 14,000 rpm for 25  
minutes, and then spin-filtered through a Vivaspin column (Vivascience Ltd,  
UK), to remove undigested sample.

15 The digest was then applied onto each well of an MDR1 specific matrix  
which was precoated with a monoclonal antibody generated against the peptide  
probe, MPNTLEGNVTK, where all but the C-terminal lysine corresponded to  
the central section of an informatically derived tryptic digest product of  
P-glycoprotein (amino acid coordinates 13-22 of SEQ ID NO: 231). Three

control wells of the 96 well matrix were pre-coated with 250  $\mu$ g of C494, a commercially available monoclonal antibody recognizing P-glycoprotein (Dako corporation, USA).

Serial dilutions of the peptide probe were added in duplicates along with  
5 the digested samples to each well starting at minimal dilution containing 500 ng of probe peptide. The matrix was further supplemented with 10 ng of biotinylated probe peptide, and the resulting mixture was incubated for 2 hr room temperature.

Following incubation, the matrix was washed with a washing buffer  
10 containing 1 % BSA, and subsequently reacted with streptavidin conjugated to horse-radish peroxidase. The obtained color reaction of the peroxidase enzyme with substrate TMB 3,3',5,5' – Tetramethylbenzidine measured the amount of biotin present in each well. Optical density was determined using an Elisa reader.

15 **Results:** As shown in Figure 3, digested membrane sample of wild-type CHO cells exhibited no reduction in optical density when compared to a control sample, which lacked the labeled digest products, suggesting that wild-type CHO cells are devoid of P-glycoprotein expression. In contrast, digested membrane samples of P-glycoprotein containing cells (Pgp-CHO),

exhibited a significant decrease in optical density. As was extrapolated from the calibration curve, 500  $\mu\text{g}$  of original membrane protein represents 0.025  $\mu\text{g}$  of peptide. Given that the molecular weight of the probe peptide is 1000 Da, and that P-glycoprotein has a total molecular weight of 14,460 Da, the content  
5 of P-glycoprotein in each well corresponded to 9.33  $\mu\text{g}$  which represents 1.64 % of the cell membrane protein mass. Turnover analysis and enzymatic activity of P-glycoprotein in CHO membranes suggests that the P-glycoprotein membrane content was 5.6 %, implying that the quantitative analysis recovered  
29 % of the enzyme originally present.

10 Control experiments in which a probe peptide was added to the membrane sample prior to the digestive step and subsequently applied on the MDR1-matrix showed an expected recovery of 45 %. The similarity of these two values further validates the accuracy and efficiency of the matrix constructed according to the teachings of the present invention in identifying  
15 and quantifying proteins in a biological sample.

**EXAMPLE 5*****A stepwise usage of an antibody matrix to identify and quantify levels of a disease associated protein***

Figure 4 illustrate a method of identifying and quantifying disease associated proteins using a protein-specific antibody matrix kit designed and constructed according to the teachings of the present invention.

**Step 1:** a biopsy (1), which is taken from a patient is solubilized and incubated with a proteolytic agent until complete protein cleavage is achieved (2).

**Step 2:** The digested sample is mixed with a sample of tagged peptides (3) (represented in the figure by arrow-attached hexagons). The labeled peptides are specific for one or more proteins of interest. These peptides have been selected by scanning a protein database of human sequences for peptides that are unique to protein(s) of interest. Circles, cylinders, non-arrowed hexagons and other shapes (4) represent the peptides in the biopsy digest.

**Step 3:** The mixture is layered (7) onto a matrix (5), which includes a set of antibodies prepared against the selected peptides. The matrix can be a multiwell plate (e.g., 96 wells) onto which the antibodies are directly or indirectly attached in a regiospecific manner. The inset illustrates the

antibodies attached to the wells (6); two wells are depicted, each having a particular antibody attached to it. In addition, the matrix may also include wells of control antibodies, which are prepared against proteins that are ubiquitously present in tissue samples. Furthermore, additional wells may also  
5 include labeled peptides at known amounts to serve as standards from which a calibration curve can be derived.

*Step 4:* The mixture of selected peptides, tagged peptides and attached antibodies(8) is left to form immunocomplexes (9). Inset (10) depicts formed immunocomplexes.

10 *Step 5:* The matrix is washed several times with a blocking buffer (11) in order to free non-specifically attached peptides.

*Step 6:* An enzyme-linked agent specific for the tagged peptides is added (12) and the wells are washed again in order to remove non-specifically bound agent.

15 *Step 7:* The matrix is incubated (13) with a substrate, which generates a color reaction (14) when processed by the enzyme-linked agent described in Step 6.

*Step 8:* The intensity of the color reaction (15) produced is measured in a conventional 96-well plate reader and the data analyzed by a computer

program(16) which determines the amount of peptide present in each of the wells.

Although the invention has been described in conjunction with specific  
5 embodiments thereof, it is evident that many alternatives, modifications and  
variations will be apparent to those skilled in the art. Accordingly, it is  
intended to embrace all such alternatives, modifications and variations that fall  
within the spirit and broad scope of the appended claims. All publications,  
patents, patent applications and sequences identified by their accession  
10 numbers mentioned in this specification are herein incorporated in their  
entirety by reference into the specification, to the same extent as if each  
individual publication, patent, patent application or sequence identified by their  
accession number was specifically and individually indicated to be  
incorporated herein by reference. In addition, citation or identification of any  
15 reference in this application shall not be construed as an admission that such  
reference is available as prior art to the present invention.



<400> 2

Asn Gly Gly Ala Lys  
1 5

<210> 3

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 3

Lys  
1

<210> 4

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 4

Lys  
1

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 5

Asn Phe Phe Lys  
1

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 6

Leu Asn Asn Lys  
1

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 7

Ser Glu Lys  
1

<210> 8

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 8

Asp Lys  
1

<210> 9

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 9

Lys  
1

<210> 10

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 10

Glu Lys  
1

<210> 11

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 11

Lys  
1

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 12

Pro Thr Val Ser Val Phe Ser Met Phe Arg  
1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 13

Tyr Ser Asn Trp Leu Asp Lys  
1 5

<210> 14

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 14

Leu Tyr Met Val Val Gly Thr Leu Ala Ala Ile Ile His Gly Ala Gly  
 1                   5                   10                   15

Leu Pro Leu Met Met Leu Val Phe Gly Glu Met Thr Asp Ile Phe Ala  
                  20                   25                   30

Asn Ala Gly Asn Leu Glu Asp Leu Met Ser Asn Ile Thr Asn Arg  
           35                   40                   45

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 15

Ser Asp Ile Asn Asp Thr Gly Phe Phe Met Asn Leu Glu Glu Asp Met  
 1                   5                   10                   15

Thr Arg

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 16

Tyr Ala Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ile Gly Ala Gly Val Leu Val Ala Ala  
 1                   5                   10                   15

Tyr Ile Gln Val Ser Phe Trp Cys Leu Ala Ala Gly Arg  
           20                   25

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 17

Gln Ile His Lys

1

<210> 18

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 18

Ile Arg

1

<210> 19

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 19

Lys

1

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 20

Gln Phe Phe His Ala Ile Met Arg  
1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 21

Gln Glu Ile Gly Trp Phe Asp Val His Asp Val Gly Glu Leu Asn Thr  
1 5 10 15

Arg

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 22

Leu Thr Asp Asp Val Ser Lys  
1 5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 23

Ile Asn Glu Gly Ile Gly Asp Lys  
1 5

<210> 24

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 24

Ile Gly Met Phe Phe Gln Ser Met Ala Thr Phe Phe Thr Gly Phe Ile  
1 5 10 15

Val Gly Phe Thr Arg  
20

<210> 25

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 25

Gly Trp Lys  
1

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 26

Leu Thr Leu Val Ile Leu Ala Ile Ser Pro Val Leu Gly Leu Ser Ala  
1                    5                    10                    15

Ala Val Trp Ala Lys  
                  20

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 27

Ile Leu Ser Ser Phe Thr Asp Lys  
1                    5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 28

Glu Leu Leu Ala Tyr Ala Lys  
1 5

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 29

Ala Gly Ala Val Ala Glu Glu Val Leu Ala Ala Ile Arg  
1 5 10

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 30

Thr Val Ile Ala Phe Gly Gly Gln Lys  
1 5

<210> 31

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 31

Lys

1

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 32

Glu Leu Glu Arg

1

<210> 33

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 33

Tyr Asn Lys

1

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 34

Asn Leu Glu Glu Ala Lys  
1 5

<210> 35

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 35

Arg  
1

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 36

Ile Gly Ile Lys  
1

<210> 37

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 37

Lys  
1

<210> 38

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 38

Ala Ile Thr Ala Asn Ile Ser Ile Gly Ala Ala Phe Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ala Leu Ala Phe Trp Tyr Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser  
20 25 30

Gly Glu Tyr Ser Ile Gly Gln Val Leu Thr Val Phe Phe Ser Val Leu  
35 40 45

Ile Gly Ala Phe Ser Val Gly Gln Ala Ser Pro Ser Ile Glu Ala Phe  
50 55 60

Ala Asn Ala Arg  
65

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 39

Gly Ala Ala Tyr Glu Ile Phe Lys  
1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 40

Ile Ile Asp Asn Lys  
1 5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 41

Pro Ser Ile Asp Ser Tyr Ser Lys  
1 5

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 42

Ser Gly His Lys

1

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 43

Pro Asp Asn Ile Lys

1

5

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 44

Gly Asn Leu Glu Phe Arg

1

5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 45

Asn Val His Phe Ser Tyr Pro Ser Arg  
1 5

<210> 46

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 46

Lys  
1

<210> 47

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 47

Glu Val Lys  
1

<210> 48

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 48

Ile Leu Lys  
1

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 49

Gly Leu Asn Leu Lys  
1 5

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 50

Val Gln Ser Gly Gln Thr Val Ala Leu Val Gly Asn Ser Gly Cys Gly  
1 5 10 15

Lys

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 51

Ser Thr Thr Val Gln Leu Met Gln Arg  
1 5

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 52

Leu Tyr Asp Pro Thr Glu Gly Met Val Ser Val Asp Gly Gln Asp Ile  
1 5 10 15

Arg

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 53

Thr Ile Asn Val Arg  
1 5

<210> 54

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 54

Phe Leu Arg  
1

<210> 55

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 55

Glu Ile Ile Gly Val Val Ser Gln Glu Pro Val Leu Phe Ala Thr Thr  
1                   5                   10                   15

Ile Ala Glu Asn Ile Arg  
20

<210> 56

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 56

Tyr Gly Arg  
1

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 57

Glu Asn Val Thr Met Asp Glu Ile Glu Lys  
1                   5                   10

<210> 58

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 58

Ala Val Lys  
1

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 59

Glu Ala Asn Ala Tyr Asp Phe Ile Met Lys  
1                   5                   10

<210> 60

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 60

Leu Pro His Lys  
1

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 61

Phe Asp Thr Leu Val Gly Glu Arg  
1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 62

Gly Ala Gln Leu Ser Gly Gly Gln Lys  
1 5

<210> 63

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 63

Gln Arg  
1

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 64

Ile Ala Ile Ala Arg  
1 5

<210> 65

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 65

Ala Leu Val Arg  
1



<400> 68

Ala Arg  
1

<210> 69

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 69

Lys  
1

<210> 70

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 70

Gly Arg  
1

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 71

Thr Thr Ile Val Ile Ala His Arg  
1 5

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 72

Leu Ser Thr Val Arg  
1 5

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 73

Asn Ala Asp Val Ile Ala Gly Phe Asp Asp Gly Val Ile Val Glu Lys  
1 5 10 15

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 74

Gly Asn His Asp Glu Leu Met Lys  
1 5

<210> 75

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 75

Glu Lys  
1

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 76

Gly Ile Tyr Phe Lys  
1 5

<210> 77

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 77

Leu Val Thr Met Gln Thr Ala Gly Asn Glu Val Glu Leu Glu Asn Ala  
1 5 10 15

Ala Asp Glu Ser Lys  
20

<210> 78

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 78

Ser Glu Ile Asp Ala Leu Glu Met Ser Ser Asn Asp Ser Arg  
1 5 10

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 79

Ser Ser Leu Ile Arg  
1 5

<210> 80

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 80

Lys

1

<210> 81

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 81

Arg

1

<210> 82

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 82

Ser Thr Arg

1

<210> 83

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 83

Arg

1

<210> 84

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 84

Ser Val Arg

1

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 85

Gly Ser Gln Ala Gln Asp Arg

1

5

<210> 86

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 86

Lys

1

<210> 87

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 87

Leu Ser Thr Lys

1

<210> 88

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 88

Glu Ala Leu Asp Glu Ser Ile Pro Pro Val Ser Phe Trp Arg

1

5

10

<210> 89

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 89

Ile Met Lys

1

<210> 90

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 90

Leu Asn Leu Thr Glu Trp Pro Tyr Phe Val Val Gly Val Phe Cys Ala  
1                   5                   10                   15

Ile Ile Asn Gly Gly Leu Gln Pro Ala Phe Ala Ile Ile Phe Ser Lys  
          20                   25                   30

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 91

Ile Ile Gly Val Phe Thr Arg

1

5

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 92

Ile Asp Asp Pro Glu Thr Lys  
1 5

<210> 93

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 93

Arg  
1

<210> 94

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 94

Gln Asn Ser Asn Leu Phe Ser Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gly Ile Ile  
1 5 10 15

Ser Phe Ile Thr Phe Phe Leu Gln Gly Phe Thr Phe Gly Lys Ala Gly  
20 25 30

Glu Ile Leu Thr Lys  
35

<210> 95

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 95

Arg  
1

<210> 96

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 96

Leu Arg  
1

<210> 97

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 97

Tyr Met Val Phe Arg  
1 5

<210> 98

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 98

Ser Met Leu Arg  
1

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 99

Gln Asp Val Ser Trp Phe Asp Asp Pro Lys  
1                   5                   10

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 100

Asn Thr Thr Gly Ala Leu Thr Thr Arg  
1                   5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 101

Leu Ala Asn Asp Ala Ala Gln Val Lys  
1 5

<210> 102

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 102

Gly Ala Ile Gly Ser Arg  
1 5

<210> 103

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 103

Leu Ala Val Ile Thr Gln Asn Ile Ala Asn Leu Gly Thr Gly Ile Ile  
1 5 10 15

Ile Ser Phe Ile Tyr Gly Trp Gln Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile  
 20 25 30

Val Pro Ile Ile Ala Ile Ala Gly Val Val Glu Met Lys  
 35 40 45

<210> 104

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 104

Met Leu Ser Gly Gln Ala Leu Lys  
 1 5

<210> 105

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 105

Asp Lys  
 1

<210> 106

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 106

Lys

1

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 107

Glu Leu Glu Gly Ala Gly Lys

1

5

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 108

Ile Ala Thr Glu Ala Ile Glu Asn Phe Arg

1

5

10

<210> 109

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 109

Thr Val Val Ser Leu Thr Gln Glu Gln Lys  
1 5 10

<210> 110

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 110

Phe Glu His Met Tyr Ala Gln Ser Leu Gln Val Pro Tyr Arg  
1 5 10

<210> 111

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 111

Asn Ser Leu Arg  
1

<210> 112

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 112

Lys  
1

<210> 113

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 113

Ala His Ile Phe Gly Ile Thr Phe Ser Phe Thr Gln Ala Met Met Tyr  
1                   5                   10                   15

Phe Ser Tyr Ala Gly Cys Phe Arg  
20

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 114

Phe Gly Ala Tyr Leu Val Ala His Lys  
1                   5

<210> 115

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 115

Leu Met Ser Phe Glu Asp Val Leu Leu Val Phe Ser Ala Val Val Phe  
1                   5                   10                   15

Gly Ala Met Ala Val Gly Gln Val Ser Ser Phe Ala Pro Asp Tyr Ala  
                  20                   25                   30

Lys

<210> 116

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 116

Ala Lys  
1

<210> 117

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 117

Ile Ser Ala Ala His Ile Ile Met Ile Ile Glu Lys  
1                   5                   10

<210> 118

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 118

Thr Pro Leu Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Glu Gly Leu Met Pro Asn Thr  
1                   5                   10                   15

Leu Glu Gly Asn Val Thr Phe Gly Glu Val Val Phe Asn Tyr Pro Thr  
                  20                   25                   30

Arg

<210> 119

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 119

Pro Asp Ile Pro Val Leu Gln Gly Leu Ser Leu Glu Val Lys  
1                   5                   10

<210> 120

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 120

Lys  
1

<210> 121

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 121

Gly Gln Thr Leu Ala Leu Val Gly Ser Ser Gly Cys Gly Lys  
1 5 10

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 122

Ser Thr Val Val Gln Leu Leu Glu Arg  
1 5

<210> 123

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 123

Phe Tyr Asp Pro Leu Ala Gly Lys  
1 5

<210> 124

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 124

Val Leu Leu Asp Gly Lys  
1 5

<210> 125

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 125

Glu Ile Lys  
1

<210> 126

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 126

Arg  
1

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 127

Leu Asn Val Gln Trp Leu Arg  
1 5

<210> 128

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 128

Ala His Leu Gly Ile Val Ser Gln Glu Pro Ile Leu Phe Asp Cys Ser  
1 5 10 15

Ile Ala Glu Asn Ile Ala Tyr Gly Asp Asn Ser Arg  
20 25

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 129

Val Val Ser Gln Glu Glu Ile Val Arg  
1 5

<210> 130

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 130

Ala Ala Lys  
1

<210> 131

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 131

Glu Ala Asn Ile His Ala Phe Ile Glu Ser Leu Pro Asn Lys  
1 5 10

<210> 132

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 132

Tyr Ser Thr Lys

1

<210> 133

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 133

Val Gly Asp Lys

1

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 134

Gly Thr Gln Leu Ser Gly Gly Gln Lys

1

5

<210> 135

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 135

Gln Arg  
1

<210> 136

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 136

Ile Ala Ile Ala Arg  
1 5

<210> 137

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 137

Ile Ala Ile Ala Arg  
1 5

<210> 138

<211> 4

<212> PRT



<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 141

Ala Arg

1

<210> 142

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 142

Glu Gly Arg

1

<210> 143

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 143

Thr Cys Ile Val Ile Ala His Arg

1

5

<210> 144

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 144

Leu Ser Thr Ile Gln Asn Ala Asp Leu Ile Val Val Phe Gln Asn Gly  
 1 5 10 15

Arg

<210> 145

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 145

Val Lys  
 1

<210> 146

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 146

Glu His Gly Thr His Gln Gln Leu Leu Ala Gln Lys  
 1 5 10



<210> 150

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 150

Met Ser Ser Ser Asn Val Glu Val Phe Ile Pro Val Ser Gln Gly Asn  
1                   5                   10                   15

Thr Asn Gly Phe Pro Ala Thr Val Ser Asn Asp Leu Lys  
          20                   25

<210> 151

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 151

Ala Phe Thr Glu Gly Ala Val Leu Ser Phe His Asn Ile Cys Tyr Arg  
1                   5                   10                   15

<210> 152

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 152

Val Lys  
1

<210> 153

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 153

Leu Lys  
1

<210> 154

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 154

Ser Gly Phe Leu Pro Cys Arg  
1 5

<210> 155

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 155

Lys  
1

<210> 156

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 156

Pro Val Glu Lys  
1

<210> 157

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 157

Glu Ile Leu Ser Asn Ile Asn Gly Ile Met Lys  
1                    5                    10

<210> 158

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide





<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 164

Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala Ala Leu Arg  
1 5 10

<210> 165

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 165

Leu Ala Thr Thr Met Thr Asn His Glu Lys  
1 5 10

<210> 166

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 166

Asn Glu Arg  
1

<210> 167

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 167

Ile Asn Arg

1

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 168

Val Ile Glu Glu Leu Gly Leu Asp Lys

1

5

<210> 169

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 169

Val Ala Asp Ser Lys

1

5

<210> 170

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 170

Val Gly Thr Gln Phe Ile Arg  
1 5

<210> 171

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 171

Gly Val Ser Gly Gly Glu Arg  
1 5

<210> 172

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 172

Lys  
1

<210> 173

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence



<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 176

Met Ser Lys

1

<210> 177

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 177

Gln Gly Arg

1

<210> 178

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 178

Thr Ile Ile Phe Ser Ile His Gln Pro Arg

1

5

10

<210> 179

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 179

Tyr Ser Ile Phe Lys  
1 5

<210> 180

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 180

Leu Phe Asp Ser Leu Thr Leu Leu Ala Ser Gly Arg  
1 5 10

<210> 181

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 181

Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu Ala Leu Gly Tyr Phe Glu Ser  
1 5 10 15

Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn Asn Pro Ala Asp Phe Phe Leu  
20 25 30

Asp Ile Ile Asn Gly Asp Ser Thr Ala Val Ala Leu Asn Arg  
35 40 45

<210> 182

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 182

Glu Glu Asp Phe Lys  
1 5

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 183

Ala Thr Glu Ile Ile Glu Pro Ser Lys  
1 5

<210> 184

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 184

Gln Asp Lys  
1

<210> 185

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 185

Pro Leu Ile Glu Lys  
1 5

<210> 186

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 186

Leu Ala Glu Ile Tyr Val Asn Ser Ser Phe Tyr Lys  
1 5 10

<210> 187

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 187

Glu Thr Lys  
1

<210> 188

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 188

Ala Glu Leu His Gln Leu Ser Gly Gly Glu Lys  
1 5 10

<210> 189

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 189

Lys  
1

<210> 190

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 190

Lys  
1

<210> 191

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 191

Lys  
1

<210> 192

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 192

Ile Thr Val Phe Lys  
1                      5

<210> 193

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 193

Glu Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Cys His Gln Leu Arg  
1 5 10

<210> 194

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 194

Trp Val Ser Lys  
1

<210> 195

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 195

Arg  
1

<210> 196

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 196

Ser Phe Lys  
1

<210> 197

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 197

Asn Leu Leu Gly Asn Pro Gln Ala Ser Ile Ala Gln Ile Ile Val Thr  
1                   5                   10                   15

Val Val Leu Gly Leu Val Ile Gly Ala Ile Tyr Phe Gly Leu Lys  
          20                   25                   30

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 198

Asn Asp Ser Thr Gly Ile Gln Asn Arg  
1                   5

<210> 199

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 199

Ala	Gly	Val	Leu	Phe	Phe	Leu	Thr	Thr	Asn	Gln	Cys	Phe	Ser	Ser	Val
1				5					10					15	

Ser	Ala	Val	Glu	Leu	Phe	Val	Val	Glu	Lys
			20					25	

<210> 200

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 200

Lys

1

<210> 201

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 201

Leu	Phe	Ile	His	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Arg
1				5					10		

<210> 202

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 202

Val Ser Ser Tyr Phe Leu Gly Lys  
1 5

<210> 203

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 203

Leu Leu Ser Asp Leu Leu Pro Met Arg  
1 5

<210> 204

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 204

Met Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Cys Ile Val Tyr Phe Met Leu Gly  
1 5 10 15

Leu Lys

<210> 205

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 205

Pro Lys

1

<210> 206

<211> 73

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 206

Ala Asp Ala Phe Phe Val Met Met Phe Thr Leu Met Met Val Ala Tyr  
1 5 10 15

Ser Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala Ala Gly Gln Ser Val Val  
20 25 30

Ser Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys Phe Val Phe Met Met Ile  
35 40 45

Phe Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr Ile Ala Ser Trp Leu Ser  
50 55 60

Trp Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg  
65 70

<210> 207

<211> 41

<212> PRT



Tyr Leu Lys

<210> 210  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 210

Leu Leu Phe Leu Lys  
1 5

<210> 211  
<211> 1  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 211

Lys  
1

<210> 212  
<211> 2  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide



<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 215

Tyr Ala Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ile Gly Ala Gly Val Leu Val Ala Ala  
1 5 10 15

Tyr Ile Gln Val Ser Phe Trp Cys Leu Ala Ala Gly Arg  
20 25

<210> 216

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 216

Ile Gly Met Phe Phe Gln Ser Met Ala Thr Phe Phe Thr Gly Phe Ile  
1 5 10 15

Val Gly Phe Thr Arg  
20

<210> 217

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 217

Leu Thr Leu Val Ile Leu Ala Ile Ser Pro Val Leu Gly Leu Ser Ala  
 1 5 10 15

Ala Val Trp Ala Lys  
 20

<210> 218

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 218

Ala Ile Thr Ala Asn Ile Ser Ile Gly Ala Ala Phe Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ala Leu Ala Phe Trp Tyr Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser  
 20 25 30

Gly Glu Tyr Ser Ile Gly Gln Val Leu Thr Val Phe Phe Ser Val Leu  
 35 40 45

Ile Gly Ala Phe Ser Val Gly Gln Ala Ser Pro Ser Ile Glu Ala Phe  
 50 55 60

Ala Asn Ala Arg  
 65

<210> 219

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 219

Leu Tyr Asp Pro Thr Glu Gly Met Val Ser Val Asp Gly Gln Asp Ile  
 1                   5                   10                   15

Arg

<210> 220

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 220

Ile Leu Leu Leu Asp Glu Ala Thr Ser Ala Leu Asp Thr Glu Ser Glu  
 1                   5                   10                   15

Ala Val Val Gln Val Ala Leu Asp Lys  
                  20                   25

<210> 221

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 221

Asn Ala Asp Val Ile Ala Gly Phe Asp Asp Gly Val Ile Val Glu Lys  
 1                   5                   10                   15

<210> 222

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 222

Leu Val Thr Met Gln Thr Ala Gly Asn Glu Val Glu Leu Glu Asn Ala  
1 5 10 15

Ala Asp Glu Ser Lys  
20

<210> 223

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 223

Ser Glu Ile Asp Ala Leu Glu Met Ser Ser Asn Asp Ser Arg  
1 5 10

<210> 224

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 224

Glu Ala Leu Asp Glu Ser Ile Pro Pro Val Ser Phe Trp Arg  
1 5 10

<210> 225

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 225

Leu Asn Leu Thr Glu Trp Pro Tyr Phe Val Val Gly Val Phe Cys Ala  
1 5 10 15

Ile Ile Asn Gly Gly Leu Gln Pro Ala Phe Ala Ile Ile Phe Ser Lys  
20 25 30

<210> 226

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 226

Gln Asn Ser Asn Leu Phe Ser Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gly Ile Ile  
1 5 10 15

Ser Phe Ile Thr Phe Phe Leu Gln Gly Phe Thr Lys  
20 25

<210> 227

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 227

Leu Ala Val Ile Thr Gln Asn Ile Ala Asn Leu Gly Thr Gly Ile Ile  
 1 5 10 15

Ile Ser Phe Ile Tyr Gly Trp Gln Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile  
 20 25 30

Val Pro Ile Ile Ala Ile Ala Gly Val Val Glu Met Lys  
 35 40 45

&lt;210&gt; 228

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 228

Phe Glu His Met Tyr Ala Gln Ser Leu Gln Val Pro Tyr Arg  
 1 5 10

&lt;210&gt; 229

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 229

Ala His Ile Phe Gly Ile Thr Phe Ser Phe Thr Gln Ala Met Met Tyr  
 1 5 10 15

Phe Ser Tyr Ala Gly Cys Phe Arg  
 20

&lt;210&gt; 230

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 230

Leu Met Ser Phe Glu Asp Val Leu Leu Val Phe Ser Ala Val Val Phe  
1                   5                   10                   15

Gly Ala Met Ala Val Gly Gln Ser Ser Phe Ala Pro Asp Tyr Ala Lys  
                  20                   25                   30

<210> 231

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 231

Thr Pro Leu Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Glu Gly Leu Met Pro Asn Thr  
1                   5                   10                   15

Leu Glu Gly Asn Val Thr Phe Gly Glu Val Val Phe Asn Tyr Pro Thr  
                  20                   25                   30

Arg

<210> 232

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence



<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 235

Ala Phe Thr Glu Gly Ala Val Leu Ser Phe His Asn Ile Cys Tyr Arg  
1 5 10 15

<210> 236

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 236

Glu Ile Leu Ser Asn Ile Asn Gly Ile Met Lys Pro Gly Leu Asn Ala  
1 5 10 15

Ile Leu Gly Pro Thr Gly Gly Gly Lys  
20 25

<210> 237

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 237

Asp Pro Ser Gly Leu Ser Gly Asp Val Leu Ile Asn Gly Ala Pro Arg  
1 5 10 15

Pro Ala Asn Phe Lys  
20

<210> 238

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 238

Cys Asn Ser Gly Tyr Val Val Gln Asp Asp Val Val Met Gly Thr Leu  
1                   5                   10                   15

Thr Val Arg

<210> 239

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 239

Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala Ala Leu Arg  
1                   5                   10

<210> 240

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 240

Leu Ala Thr Thr Met Thr Asn His Glu Lys  
1 5 10

<210> 241

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 241

Thr Ser Ile Gly Met Glu Leu Ile Thr Asp Pro Ser Ile Leu Ser Leu  
1 5 10 15

Asp Glu Pro Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ser Thr Ala Asn Ala Val Leu  
20 25 30

Leu Leu Leu Lys  
35

<210> 242

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 242

Thr Ile Ile Phe Ser Ile His Gln Pro Arg  
1 5 10

<210> 243

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 243

Leu Phe Asp Ser Leu Thr Leu Leu Ala Ser Gly Arg  
1 5 10

<210> 244

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 244

Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu Ala Leu Gly Tyr Phe Glu Ser  
1 5 10 15

Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn Asn Pro Ala Asp Phe Phe Leu  
20 25 30

Asp Ile Ile Asn Gly Asp Ser Thr Ala Val Ala Leu Asn Arg  
35 40 45

<210> 245

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 245

Leu Ala Glu Ile Tyr Val Asn Ser Ser Phe Tyr Lys  
1 5 10



&lt;400&gt; 248

Ala Gly Val Leu Phe Phe Leu Thr Thr Asn Gln Cys Phe Ser Ser Val  
 1 5 10 15

Ser Ala Val Glu Leu Phe Val Val Glu Lys  
 20 25

&lt;210&gt; 249

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 249

Leu Phe Ile His Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Tyr Arg  
 1 5 10

&lt;210&gt; 250

&lt;211&gt; 72

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Computer generated synthetic peptide

&lt;400&gt; 250

Ala Asp Ala Phe Phe Val Met Met Phe Thr Leu Met Met Val Ala Tyr  
 1 5 10 15

Ser Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala Ala Gly Gln Ser Val Ser  
 20 25 30

Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys Phe Val Phe Met Met Ile Phe  
 35 40 45

Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr Ile Ala Ser Trp Leu Ser Trp  
 50 55 60

Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg  
65 70

<210> 251

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 251

Tyr Gly Phe Thr Ala Leu Gln His Asn Glu Phe Leu Gly Gln Asn Phe  
1 5 10 15

Cys Pro Gly Leu Asn Ala Thr Gly Asn Asn Pro Cys Asn Tyr Ala Thr  
20 25 30

Cys Thr Gly Glu Glu Tyr Leu Val Lys  
35 40

<210> 252

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 252

Gln Gly Ile Asp Leu Ser Pro Trp Gly Leu Trp Lys  
1 5 10

<210> 253

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Computer generated synthetic peptide

<400> 253

Asn	His	Val	Ala	Leu	Ala	Cys	Met	Ile	Val	Ile	Phe	Leu	Thr	Ile	Ala
1				5					10					15	

Tyr Leu Lys

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of generating a set of amino acid sequences representative of at least one polypeptide of interest, the method comprising:

- (a) computationally generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest;
- (b) computationally analyzing said plurality of proteolytic cleavage products according to at least one parameter defining a characteristic of an amino acid sequence; and
- (c) selecting a set of proteolytic cleavage products from said plurality of proteolytic cleavage products according to predetermined criteria for each of said at least at least parameter, thereby generating the set of amino acid sequences representative of the at least one polypeptide of interest.

2. The method of claim 1, wherein said plurality of proteolytic cleavage products are generated according to a proteolytic cleavage pattern of at least one proteolytic agent.

3. The method of claim 2, wherein said at least one proteolytic agent is selected from the group consisting of a proteolytic enzyme and a proteolytic chemical.

4. The method of claim 3, wherein said proteolytic enzyme is selected from the group consisting of trypsin, chymotrypsin, subtilisin, pepsin, V8 protease, thrombin and elastase.

5. The method of claim 3, wherein said proteolytic chemical is selected from the group consisting of cyanogen bromide and 2-nitro-5-thiocyanobenzoate.

6. The method of claim 1, wherein said at least one parameter defining said characteristic of said amino acid sequence is selected from the group consisting of molecular weight, amino acid composition, hydrophobicity, hydrophilicity, charge, secondary structure, heterogeneity, length, post-translational modifications, polarity, solubility, amphipathic nature, sequence and immunogenicity.

7. A computer readable storage media comprising a database of amino acid sequences corresponding to at least one polypeptide of interest, said database of amino acid sequences being generated by:

- (a) computationally generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest; and
- (b) computationally analyzing said plurality of proteolytic cleavage products according to at least one parameter defining a characteristic of an amino acid sequence; and
- (c) storing a sequence of each of said proteolytic cleavage products thereby generating said database of amino acid sequences.

8. The computer readable storage media of claim 7, wherein said plurality of proteolytic cleavage products are generated according to a proteolytic cleavage pattern of at least one proteolytic agent.

9. The computer readable storage media of claim 8, wherein said at least one proteolytic agent is selected from the group consisting of a proteolytic enzyme and a proteolytic chemical.

10. The computer readable storage media of claim 9, wherein said proteolytic enzyme is selected from the group consisting of trypsin, chymotrypsin, subtilisin, pepsin, V8 protease, thrombin and elastase.

11. The computer readable storage media of claim 9, wherein said proteolytic chemical is selected from the group consisting of cyanogen bromide and 2-nitro-5-thiocyanobenzoate.

12. The computer readable storage media of claim 7, wherein said at least one parameter defining said characteristic of said amino acid sequence is selected from the group consisting of molecular weight, amino acid composition, hydrophobicity, hydrophilicity, charge, secondary structure, heterogeneity, length, post-translational modifications, polarity, solubility, amphipathic nature, sequence and immunogenicity.

13. A system for generating a database of amino acid sequences of at least one polypeptide of interest, the system comprising a processing unit, said processing unit executing a software application configured for:

- (a) generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest; and
- (b) analyzing said plurality of proteolytic cleavage products according to at least one parameter defining a characteristic of an amino acid sequence.

14. The system of claim 13, wherein said plurality of proteolytic cleavage products are generated according to a proteolytic cleavage pattern of at least one proteolytic agent.

15. The system of claim 14, wherein said at least one proteolytic agent is selected from the group consisting of a proteolytic enzyme and a proteolytic chemical.

16. The system of claim 15, wherein said proteolytic enzyme is selected from the group consisting of trypsin, chymotrypsin, subtilisin, pepsin, V8 protease, thrombin and elastase.

17. The system of claim 15, wherein said proteolytic chemical is selected from the group consisting of cyanogen bromide and 2-nitro-5-thiocyanobenzoate.

18. The system of claim 13, wherein said at least one parameter defining said characteristic of said amino acid sequence is selected from the group consisting of molecular weight, amino acid composition, hydrophobicity, hydrophilicity, charge, secondary structure, heterogeneity, length, post-translational modifications, polarity, solubility, amphipathic nature, sequence and immunogenicity.

19. A kit for quantifying at least one polypeptide of interest, the kit comprising a plurality of peptides being generated according to information derived from computational analysis of the at least one polypeptide of interest, said computational analysis including generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest.

20. The kit of claim 19, wherein said computational analysis further includes analysis of said plurality of proteolytic cleavage products according to

at least one parameter defining a characteristic of an amino acid sequence and selection of a set of proteolytic cleavage products from said plurality of proteolytic cleavage products according to predetermined criteria for each of said at least at least parameter.

21. The kit of claim 19, wherein said plurality of proteolytic cleavage products are generated according to information derived from a proteolytic cleavage pattern of at least one proteolytic agent.

22. The kit of claim 21, wherein said at least one proteolytic agent is selected from the group consisting of a proteolytic enzyme and a proteolytic chemical.

23. The kit of claim 22, wherein said proteolytic enzyme is selected from the group consisting of trypsin, chymotrypsin, subtilisin, pepsin, V8 protease, thrombin and elastase.

24. The kit of claim 22, wherein said proteolytic chemical is selected from the group consisting of cyanogen bromide and 2-nitro-5-thiocyanobenzoate.

25. The kit of claim 20, wherein said at least one parameter defining said characteristic of said amino acid sequence is selected from the group consisting of molecular weight, amino acid composition, hydrophobicity, hydrophilicity, charge, secondary structure, heterogeneity, length, post-translational modifications, polarity, solubility, amphipathic nature, sequence and immunogenicity.

26. The kit of claim 19, wherein said plurality of peptides are labeled.

27. The kit of claim 19, wherein said plurality of peptides are attached to a solid substrate.

28. The kit of claim 19, wherein each of said plurality of peptides is contained in an individual container.

29. The kit of claim 19, wherein said plurality of peptides are mixed in a single container.

30. The kit of claim 19, wherein said plurality of peptides are generated via peptide synthesis or proteolytic cleavage of the at least one polypeptide of interest.

31. A kit for quantifying at least one polypeptide of interest, the kit comprising a plurality of antibodies each capable of specifically recognizing at least one peptide of a plurality of peptides, said plurality of peptides being generated according to information derived from computational analysis of the at least one polypeptide of interest, said computational analysis including generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest.

32. The kit of claim 31, wherein said computational analysis further includes analysis of said plurality of proteolytic cleavage products according to at least one parameter defining a characteristic of an amino acid sequence and selection of a set of proteolytic cleavage products from said plurality of

proteolytic cleavage products according to predetermined criteria for each of said at least at least parameter.

33. The kit of claim 31, wherein said plurality of proteolytic cleavage products are generated according to information derived from a proteolytic cleavage pattern of at least one proteolytic agent.

34. The kit of claim 33, wherein said at least one proteolytic agent is selected from the group consisting of a proteolytic enzyme and a proteolytic chemical.

35. The kit of claim 34, wherein said proteolytic enzyme is selected from the group consisting of trypsin, chymotrypsin, subtilisin, pepsin, V8 protease, thrombin and elastase.

36. The kit of claim 34, wherein said proteolytic chemical is selected from the group consisting of cyanogen bromide and 2-nitro-5-thiocyanobenzoate.

37. The kit of claim 32, wherein said at least one parameter defining said characteristic of said amino acid sequence is selected from the group consisting of molecular weight, amino acid composition, hydrophobicity, hydrophilicity, charge, secondary structure, heterogeneity, length, post-translational modifications, polarity, solubility, amphipathic nature, sequence and immunogenicity.

38. The kit of claim 31, wherein said plurality of antibodies are labeled.

39. The kit of claim 31, wherein said plurality of antibodies are attached to a solid substrate.

40. The kit of claim 31, wherein each of said plurality of antibodies is contained in an individual container.

41. The kit of claim 31, wherein said plurality of antibodies are mixed in a single container.

42. The kit of claim 31, wherein said plurality of peptides are generated via peptide synthesis or proteolytic cleavage of the at least one polypeptide of interest.

43. A method of quantifying at least one polypeptide of interest in a biological sample, the method comprising:

- (a) contacting the biological sample with at least one proteolytic agent, so as to obtain a proteolysed biological sample;
- (b) contacting said proteolysed biological sample with at least one antibody and at least one peptide of a plurality of peptides, wherein said antibody is capable of specifically binding said at least one peptide of said plurality of peptides, and further wherein said plurality of peptides are generated according to information derived from computational analysis of the at least one polypeptide of interest, said computational analysis including generating a plurality of proteolytic cleavage products from the at least one polypeptide of interest; and

- (c) detecting presence, absence and/or level of antibody binding to thereby quantify the at least one polypeptide of interest in the biological sample.

44. The method of claim 43, wherein said at least one antibody is attached to a solid substrate.

45. The method of claim 44, wherein said solid substrate is configured as a microarray and said at least one antibody includes a plurality of antibodies each attached to said microarray in a regio-specific manner.

46. The method of claim 43, wherein said at least one antibody and/or said at least one peptide is labeled and whereas step (c) is effected by quantifying said label.

47. The method of claim 43, wherein said plurality of peptides are generated by peptide synthesis or proteolytic cleavage of the at least one polypeptide of interest.

48. The method of claim 43, wherein said computational analysis further includes analysis of said plurality of proteolytic cleavage products according to at least one parameter defining a characteristic of an amino acid sequence and selection of a set of proteolytic cleavage products from said plurality of proteolytic cleavage products according to predetermined criteria for each of said at least at least parameter.

49. The method of claim 43, wherein said plurality of proteolytic cleavage products are generated according to information derived from a proteolytic cleavage pattern of at least one proteolytic agent.

50. The method of claim 49, wherein said at least one proteolytic agent is selected from the group consisting of a proteolytic enzyme and a proteolytic chemical.

51. The method of claim 40, wherein said proteolytic enzyme is selected from the group consisting of trypsin, chymotrypsin, subtilisin, pepsin, V8 protease, thrombin and elastase.

52. The method of claim 50, wherein said proteolytic chemical is selected from the group consisting of cyanogen bromide and 2-nitro-5-thiocyanobenzoate.

53. The method of claim 48, wherein said at least one parameter defining said characteristic of said amino acid sequence is selected from the group consisting of molecular weight, amino acid composition, hydrophobicity, hydrophilicity, charge, secondary structure, heterogeneity, length, post-translational modifications, polarity, solubility, amphipathic nature, sequence and immunogenicity.

54. The method of claim 43, wherein said at least one peptide is attached to a solid substrate.

55. The method of claim 54, wherein said solid substrate is configured as a microarray and each of said plurality of peptides is attached to said microarray in a regio-specific manner.

56. A method of generating at least one antibody specific to a polypeptide of interest, the method comprising using at least one peptide to generate the at least one antibody specific to the polypeptide of interest, wherein said at least one peptide is generated according to information derived from computational analysis of the polypeptide of interest, said computational analysis including generating a plurality of proteolytic cleavage products from the polypeptide of interest.

57. The method of claim 56, wherein said computational analysis further includes analysis of said plurality of proteolytic cleavage products according to at least one parameter defining a characteristic of an amino acid sequence and selection of a set of proteolytic cleavage products from said plurality of proteolytic cleavage products according to predetermined criteria for each of said at least at least parameter.

58. The method of claim 56, wherein said plurality of proteolytic cleavage products are generated according to information derived from a proteolytic cleavage pattern of at least one proteolytic agent.

59. The method of claim 58, wherein said at least one proteolytic agent is selected from the group consisting of a proteolytic enzyme and a proteolytic chemical.

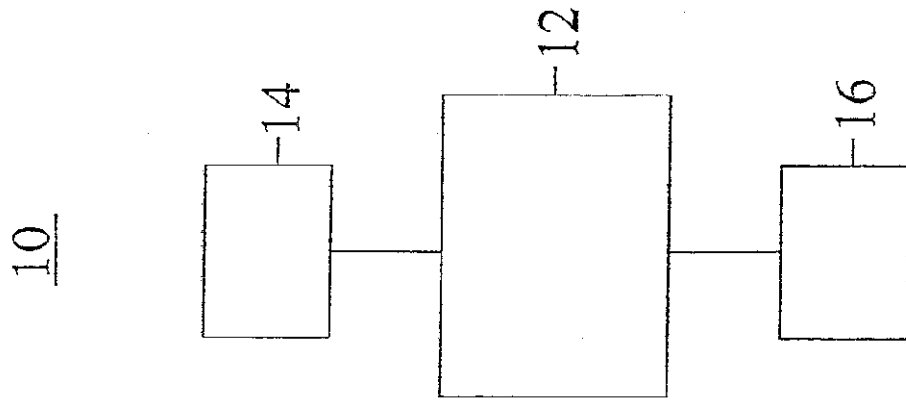
60. The method of claim 59, wherein said proteolytic enzyme is selected from the group consisting of trypsin, chymotrypsin, subtilisin, pepsin, V8 protease, thrombin and elastase.

61. The method of claim 59, wherein said proteolytic chemical is selected from the group consisting of cyanogen bromide and 2-nitro-5-thiocyanobenzoate.

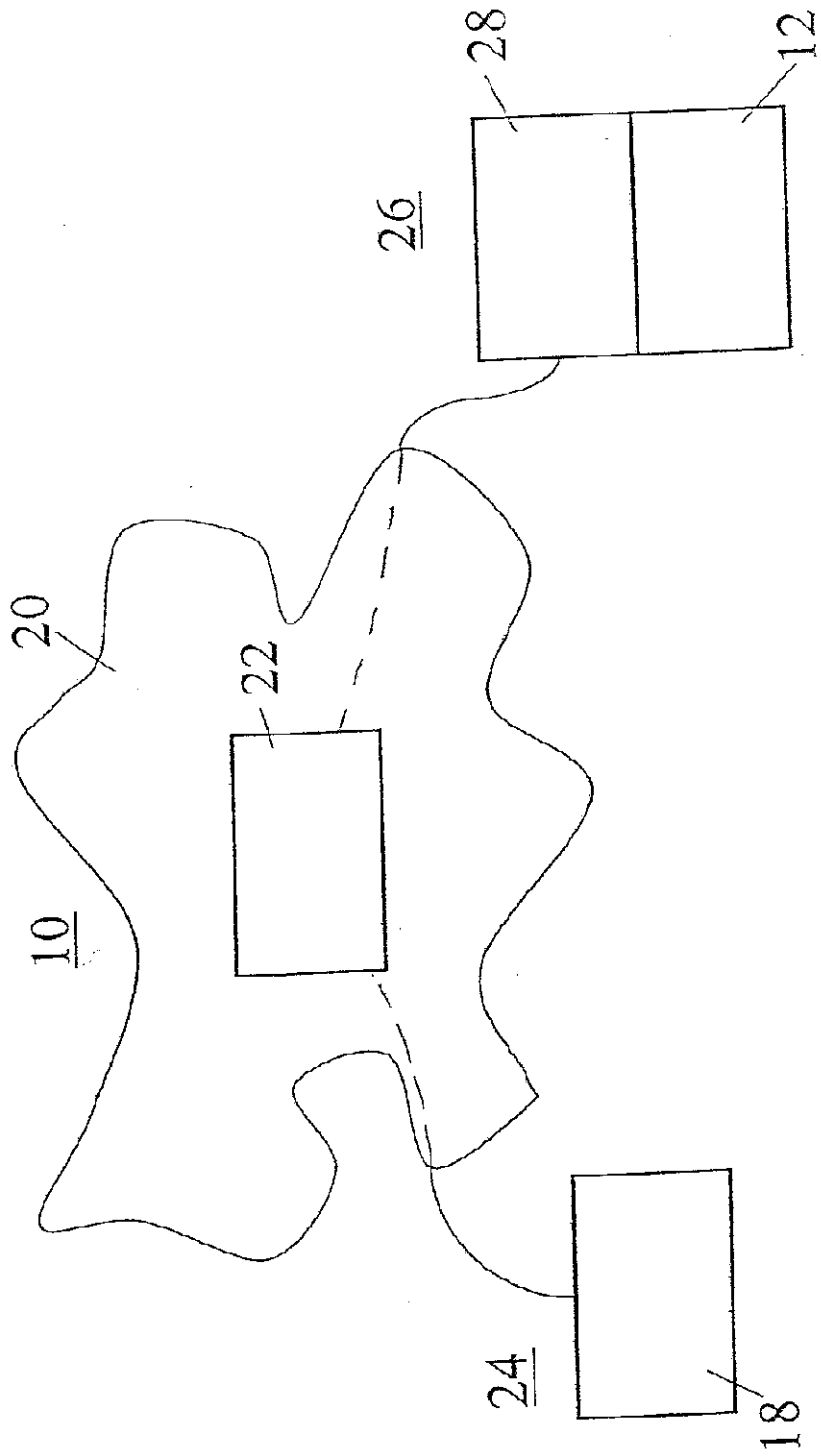
62. The method of claim 57, wherein said at least one parameter defining said characteristic of said amino acid sequence is selected from the group consisting of molecular weight, amino acid composition, hydrophobicity, hydrophilicity, charge, secondary structure, heterogeneity, length, post-translational modifications, polarity, solubility, amphipathic nature, sequence and immunogenicity.

63. The method of claim 56, wherein said at least one peptide is generated by peptide synthesis or proteolytic cleavage of the at least one polypeptide of interest.

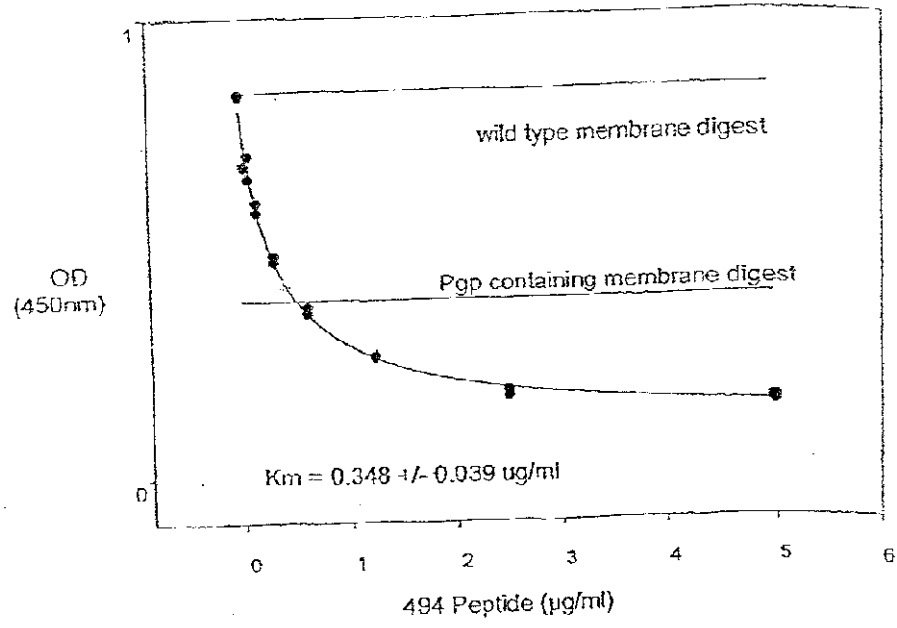
【図1】



【図2】

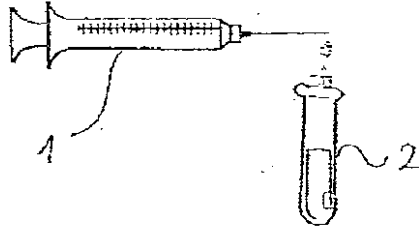


【図3】

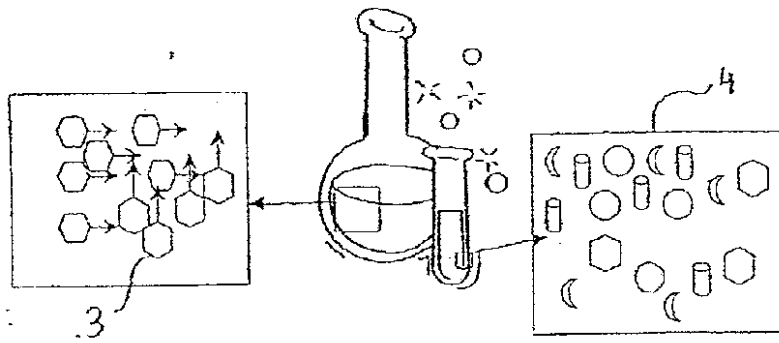


【図4】

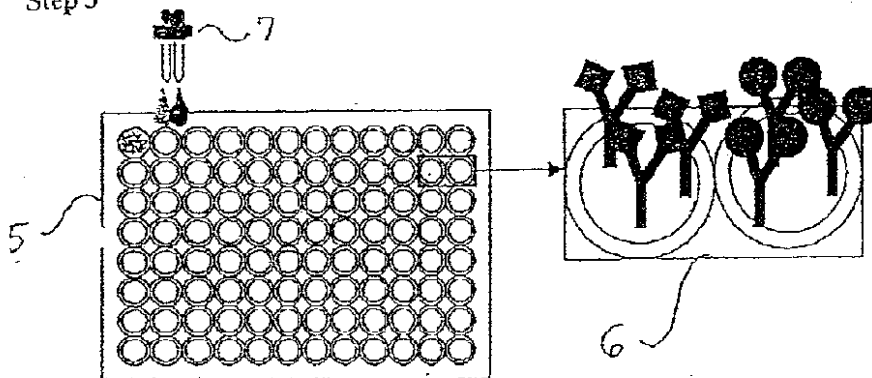
Step 1



Step 2



Step 3



A method of generating a set of amino acid sequences representative of at least one polypeptide of interest is provided. Also provided are kits and methods of using such peptides and antibodies generated thereagainst for detecting the presence absence or severity of a disease.

专利名称(译)	肽样品的抗体和感兴趣的多肽的抗原，其制备和使用的方法，系统和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002360278A</a>	公开(公告)日	2002-12-17
申请号	JP2002004906	申请日	2002-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	埃米尔·卡茨以色列		
申请(专利权)人(译)	埃米尔·卡茨以色列		
[标]发明人	エミルイスラエルカッツ		
发明人	エミル イスラエル カッツ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K1/00 C07K1/12 C07K14/705 C07K16/28 C12M1/34 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/37 G01N37/00		
CPC分类号	C07K16/28 C07K1/00 C07K1/12 C07K14/705 C07K2317/34 G16B30/00		
FI分类号	C07K1/12 C12M1/34.E C12P21/08 C12Q1/37 G01N33/53.D G01N37/00.102 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA61 4B024/HA03 4B029/AA07 4B029/BB16 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QR82 4B063/QR90 4B063/QS02 4B063/QS28 4B063/QS36 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA21 4B064/CB01 4B064/DA20 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA50 4H045/FA70		
优先权	140881 2001-01-14 IL		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供形成至少一种目标多肽的一对氨基酸序列样品的的方法，以及使用该肽及其抗体检测疾病的存在或严重性的试剂盒和方法。  
 解决方案：需要目标蛋白质的肽样品，对蛋白质具有高亲和力的抗体，以及制备和使用肽样品和用于检测，测量和/或表征生物样品中的蛋白质的抗体的方法。通过在计算机上形成和分析来自至少一种目标多肽的蛋白质的多个分解产物形成一对氨基酸序列的方法，以及包括数据库的计算机可读记录介质，形成方法提供了一对目标氨基酸序列样品。此外，提供了使用该肽及其抗体检测疾病的存在或严重程度的试剂盒和方法。

・タで行った。P-erythroproteinのトリプ\*

P-glycoprotein tryptic fragments	MXR tryptic fragments
MDLEGDR (SEQ ID NO: 1)	MSSSNVEVFPVPSQGTNGFPATVSNLKD (SEQ ID NO: 150)
NGGAK (SEQ ID NO: 2)	AFTEGAVLSFHINCYR (SEQ ID NO: 151)
K (SEQ ID NO: 3)	VK (SEQ ID NO: 152)
K (SEQ ID NO: 4)	LK (SEQ ID NO: 153)
NFFK (SEQ ID NO: 5)	SGFLPCR (SEQ ID NO: 154)
LNNK (SEQ ID NO: 6)	K (SEQ ID NO: 155)
SEK (SEQ ID NO: 7)	PVEK (SEQ ID NO: 156)
DK (SEQ ID NO: 8)	EILSNINGIMK (SEQ ID NO: 157)
K (SEQ ID NO: 9)	PGLNAILGPTGGGK (SEQ ID NO: 158)
EK (SEQ ID NO: 10)	SSLLDVLAAR (SEQ ID NO: 159)
K (SEQ ID NO: 11)	K (SEQ ID NO: 160)
PTVSVFSMFR (SEQ ID NO: 12)	DPSGLSGDVLINGAPR (SEQ ID NO: 161)
YSNWLDK (SEQ ID NO: 13)	PANFK (SEQ ID NO: 162)
LYMVGTLAAIIHGAGLPLMMLVFGEMTDIFANAGNLEDLMSNITNR (SEQ ID NO: 14)	CNSGYVVDVVMGTLTVR (SEQ ID NO: 163)