



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110191894 A

(43)申请公布日 2019.08.30

(21)申请号 201780076647.4

(22)申请日 2017.12.21

(30)优先权数据

2016-248711 2016.12.22 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.06.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/046019 2017.12.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/117242 JA 2018.06.28

(71)申请人 日本瑞翁株式会社

地址 日本东京

(72)发明人 市村直也

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11413

代理人 赵曦 刘继富

(51)Int.Cl.

G07K 7/06(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

序列表3页 附图6页

(54)发明名称

寡肽的搜索方法、寡肽、修饰肽及免疫测定  
方法

(57)摘要

本发明实施例提供了一种有效地从肽库中  
搜索能够键合于目的蛋白质、肽的末端的寡肽的  
方法。进而提供高效且安全性高的免疫测定方  
法。

1. 一种寡肽的搜索方法,其包含如下步骤:  
将具有随机氨基酸序列的肽库曝露于至少表面由降冰片烯系聚合物构成的成型体的所述表面的步骤I,  
用水系溶剂将曝露的所述表面进行清洗的步骤II,  
通过用有机溶剂清洗所述表面从而将残留于所述表面的化合物回收的步骤III,  
将回收的所述化合物的肽序列信息进行解析的步骤IV。
2. 根据权利要求1所述的搜索方法,其中,所述降冰片烯系聚合物为降冰片烯系单体的开环聚合物氢化物。
3. 根据权利要求1或2所述的搜索方法,其中,所述水系溶剂为缓冲液。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的搜索方法,其中,所述有机溶剂为极性有机溶剂。
5. 一种寡肽,其包含Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr的氨基酸序列,该氨基酸序列为序列号1。
6. 根据权利要求5所述的寡肽,其对降冰片烯系聚合物具有粘接性。
7. 根据权利要求6所述的寡肽,其中,所述降冰片烯系聚合物为降冰片烯系单体的开环聚合物氢化物。
8. 一种修饰肽或修饰多肽,其包含Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr的氨基酸序列,对降冰片烯系聚合物具有粘接性,该氨基酸序列为序列号1。
9. 一种免疫测定方法,其特征在于,将由权利要求1~4中任一项所述的搜索方法而搜索的寡肽在由降冰片烯系聚合物构成的容器的内表面进行固相化,  
使用在内表面固相化了寡肽的所述容器进行测定。
10. 根据权利要求9所述的免疫测定方法,其中,所述降冰片烯系聚合物为降冰片烯系单体的开环聚合物氢化物。
11. 根据权利要求9或10所述的免疫测定方法,其中,所述寡肽包含Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr的氨基酸序列,该氨基酸序列为序列号1。
12. 根据权利要求9~11中任一项所述的免疫测定方法,其中,  
在所述测定前进一步进行阻断处理,作为阻断处理剂,使用Tween20。

## 寡肽的搜索方法、寡肽、修饰肽及免疫测定方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及寡肽的搜索方法、以及包含特定的氨基酸序列的寡肽、修饰肽及免疫测定方法。

### 背景技术

[0002] 人们已知通过将包含降冰片烯系聚合物的成型体用作培养容器,从而重组细胞的增殖性、重组基因的表达量会上升(专利文献1)。

[0003] 此外,人们已知包含降冰片烯系聚合物的成型体不易产生蛋白质的凝聚、变性、分解,因此在蛋白质溶液制剂的长期保存中是优选的(专利文献2等)。

[0004] 此外,作为将微量含有的物质进行检测、定量的方法,广泛使用被总称为ELISA法(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)的抗原抗体反应法。通常,在ELISA法中,将抗体、抗原等蛋白质与样品中被检物的反应直接地或间接地进行检测,其中,上述抗体、抗原等蛋白质被固相化在塑料制的微孔板等容器内表面。

[0005] 但是近年来,逐渐开发了将肽等生理活性物质等固定化于基材、进行生物体试样中对象物质的并联检测和分析等的技术。

[0006] 作为用于这样的检测和分析等的生理活性物质固定用基板,提出了例如:为了抑制检测对象物质在包含降冰片烯系聚合物的基板表面的非特异性吸附·键合、将生理活性物质固定化,而被覆高分子化合物,该高分子化合物由具有磷酸胆碱基的单元、具有疏水基团的单元和具有醛基或马来酰亚胺基的单元构成(专利文献3)。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2015/199119号;

[0010] 专利文献2:日本特开2011-168610号公报;

[0011] 专利文献3:日本特开2010-117189号公报;

[0012] 专利文献4:日本特开2009-080119号公报。

### 发明内容

[0013] 发明要解决的问题

[0014] 然而,在专利文献3的方法中,存在如下问题:成型体的与蛋白质接触的面被降冰片烯系聚合物以外的高分子化合物被覆,因此,降冰片烯系聚合物具有的蛋白质的稳定化效果减少。

[0015] 此外,已知由降冰片烯系聚合物构成的成型体为低荧光(专利文献4),因此能够认为其对广泛使用荧光检测的ELISA是优选的。然而,会有如下问题:相较于聚苯乙烯,其对蛋白质等物质的材料表面的物理吸附性弱,因此难以将抗体、抗原固相化在表面。

[0016] 此外,在ELISA法中,还有如下问题:在将测定试样添加至孔内后,需要进行从孔内除去测定试样的操作和清洗孔的操作,但是会有在测定试样中混入引起感染的病毒、微生

物的可能性,还有由于在测定操作中受到液体飞沫这一原因而导致的感染风险。

[0017] 本发明是鉴于该现有技术的实情而完成的,其目的在于提供一种有效地从肽库中搜索能够键合于目的蛋白质、肽的末端的寡肽的方法。进而,本发明的目的在于提供有效且安全性高的免疫测定方法。

[0018] 用于解决问题的方案

[0019] 本发明人设想,通过使用能够键合于目的蛋白质、肽的末端、并且与降冰片烯系聚合物具有粘接性的寡肽,从而能够不减少降冰片烯系聚合物具有的蛋白质的稳定化效果,在降冰片烯系聚合物上直接、有效地将目的蛋白质、肽固定化,为解决上述课题进行了深入研究。

[0020] 其结果是,在将肽库曝露于包含降冰片烯系聚合物的成型体之后,用水系溶剂进行清洗,结果发现在该成型体的表面得到了对降冰片烯系聚合物的粘接性高的肽,以至完成了本发明。

[0021] 如此,根据本发明能够提供:下述(1)~(4)的寡肽的搜索方法、(5)~(7)的寡肽、(8)修饰肽或修饰多肽、(9)~(12)的免疫测定方法。

[0022] (1)一种寡肽的搜索方法,其包含如下步骤:

[0023] 将具有随机氨基酸序列的肽库曝露于至少表面由降冰片烯系聚合物构成的成型体的上述表面的步骤(I)、

[0024] 用水系溶剂将曝露的上述表面进行清洗的步骤(II)、

[0025] 通过用有机溶剂清洗上述表面从而将残留于上述表面的化合物回收的步骤(III)、

[0026] 将回收了的上述化合物的肽序列信息进行解析的步骤(IV)。

[0027] (2)根据(1)所述的寡肽的搜索方法,其中,上述降冰片烯系聚合物为降冰片烯系单体的开环聚合物氢化物。

[0028] (3)根据(1)或(2)所述的寡肽的搜索方法,其中,上述水系溶剂为缓冲液。

[0029] (4)根据(1)~(3)中任一项所述的寡肽的搜索方法,其中,上述有机溶剂为极性有机溶剂。

[0030] (5)一种寡肽,其包含Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr(序列号1)的氨基酸序列。

[0031] (6)根据(5)所述的寡肽,其对降冰片烯系聚合物具有粘接性。

[0032] (7)根据(6)所述的寡肽,其中,上述降冰片烯系聚合物为降冰片烯系单体的开环聚合物氢化物。

[0033] (8)一种修饰肽或修饰多肽,其包含Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr(序列号1)的氨基酸序列,对降冰片烯系聚合物具有粘接性。

[0034] (9)一种免疫测定方法,其特征在于,在由降冰片烯系聚合物构成的容器的内表面,将由权利要求1~4中任一项所述的搜索方法而搜索的寡肽进行固相化,

[0035] 使用在内表面固相化了寡肽的上述容器进行测定。

[0036] (10)根据(9)所述的免疫测定方法,其中,上述降冰片烯系聚合物为降冰片烯系单体的开环聚合物氢化物。

[0037] (11)根据(9)或(10)所述的免疫测定方法,其中,所述寡肽包含Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr(序列号1)的氨基酸序列。

- [0038] (12) 根据(9)～(11)中任一项所述的免疫测定方法,其中,
- [0039] 在上述测定前进一步进行阻断处理,作为阻断处理剂,使用Tween20。
- [0040] 发明效果
- [0041] 根据本发明,能够提供一种有效地从肽库中搜索能够键合于目的蛋白质、肽的末端的寡肽的方法。进而,根据本发明,能够提供有效且安全性高的免疫测定方法。

### 附图说明

- [0042] 图1为示出本发明的一个实施方式涉及的、对降冰片烯系聚合物具有粘接性的寡肽的搜索方法步骤的图。
- [0043] 图2为示出在实施例2中得到的寡肽的、对各种聚合物成型体的粘接性评价结果的图表。
- [0044] 图3为实施例3中的、多肽3粘接的1060R皿上的CHO细胞的显微镜照片。
- [0045] 图4为实施例3中的、多肽2粘接的1060R皿上的CHO细胞的显微镜照片。
- [0046] 图5为实施例3中的、多肽2和3均未粘接的1060R皿上的CHO细胞的显微镜照片。
- [0047] 图6为示出抗原浓度与吸光度的关系的图表。
- [0048] 图7为示出抗原浓度与吸光度的关系的图表。
- [0049] 图8为示出阻断剂对吸光度产生的影响的图表。
- [0050] 图9为示出BNP浓度与吸光度的关系的图表。

### 具体实施方式

[0051] 以下,对本发明的实施方式分为1)寡肽的搜索方法、2)寡肽、以及3)对降冰片烯系聚合物具有粘接性的修饰肽或修饰多肽、4)免疫测定方法,进行详细地说明。

#### [0052] 1)寡肽的搜索方法

[0053] 本发明的第1方式为寡肽的搜索方法,其包含将具有随机氨基酸序列的肽库曝露于至少表面由降冰片烯系聚合物构成的成型体的上述表面的步骤(I)、用水系溶剂将曝露的上述表面进行清洗的步骤(II)、通过用有机溶剂清洗上述表面从而将残留于该表面的化合物回收的步骤(III)、以及将回收了的上述化合物的肽序列信息进行解析的步骤(IV)。

#### [0054] <步骤(I)>

[0055] 步骤(I)为下述步骤:将具有随机氨基酸序列的肽库曝露于至少表面由降冰片烯系聚合物构成的成型体的上述表面。

[0056] 用于上述搜索方法的肽库具有随机的氨基酸序列,能够举出通常作为肽库而被广泛使用的肽库。可以是例如将氨基酸序列以随机的方式进行有机合成而得到的肽、将蛋白质随机地切断而得到的肽等肽混合物;在噬菌体等病毒粒子的表面显示末端区域的氨基酸序列为随机的蛋白质的显示库等。

[0057] 在本发明的一个方式的搜索方法中,使用至少表面由降冰片烯系聚合物构成的成型体。即,就上述成型体而言,肽库被曝露的成型体表面至少由降冰片烯系聚合物构成即可。此外,可以制成成型体表面仅包含降冰片烯系聚合物,也可以制成成型体整体仅包含降冰片烯系聚合物。

[0058] 降冰片烯系聚合物为如下化合物:相对于构成降冰片烯系聚合物的全部单体单

元,包含50质量%以上、优选为60质量%以上的、具有降冰片烯骨架的单体单元。更具体而言,降冰片烯系聚合物是将作为具有降冰片烯骨架的单体的降冰片烯系单体聚合而成,大致分为通过开环聚合得到的聚合物和通过加成聚合得到的聚合物。

[0059] 作为通过开环聚合而得到的聚合物,能够举出降冰片烯系单体的开环聚合物、降冰片烯单体与能够与其开环共聚的其它单体的开环聚合物、以及它们的氢化物等。

[0060] 作为通过加成聚合而得到的聚合物,能够举出:降冰片烯系单体的加成聚合物以及降冰片烯单体与能够与其共聚的其它单体的加成聚合物等。

[0061] 降冰片烯系聚合物能够分别单独使用,或者能够组合2种以上来使用。

[0062] 在它们之中,从更容易得到本申请发明的效果的观点出发,优选为降冰片烯单体的开环共聚物氢化物。

[0063] 作为能够用于降冰片烯系聚合物的合成的降冰片烯单体,能够举出双环[2.2.1]庚-2-烯(常用名:降冰片烯)、5-甲基-双环[2.2.1]庚-2-烯、5,5-二甲基-双环[2.2.1]庚-2-烯、5-乙基-双环[2.2.1]庚-2-烯、5-亚乙基-双环[2.2.1]庚-2-烯、5-乙烯基-双环[2.2.1]庚-2-烯、5-丙烯基-双环[2.2.1]庚-2-烯、5-甲酯基-双环[2.2.1]庚-2-烯、5-氰基-双环[2.2.1]庚-2-烯、5-甲基-5-甲酯基-双环[2.2.1]庚-2-烯等2环式单体;

[0064] 三环[4.3.0<sup>1,6</sup>.1<sup>2,5</sup>]癸-3,7-二烯(常用名:二环戊二烯)、2-甲基二环戊二烯、2,3-二甲基二环戊二烯、2,3-二羟基二环戊二烯等3环式单体;

[0065] 四环[4.4.0.1<sup>2,5</sup>.1<sup>7,10</sup>]-3-十二烯(四环十二烯)、四环[4.4.0.1<sup>2,5</sup>.1<sup>7,10</sup>]-3-十二烯、8-甲基四环[4.4.0.1<sup>2,5</sup>.1<sup>7,10</sup>]-3-十二烯、8-乙基四环[4.4.0.1<sup>2,5</sup>.1<sup>7,10</sup>]-3-十二烯、8-亚乙基四环[4.4.0.1<sup>2,5</sup>.1<sup>7,10</sup>]-3-十二烯、8,9-二甲基四环[4.4.0.1<sup>2,5</sup>.1<sup>7,10</sup>]-3-十二烯、8-乙基-9-甲基四环[4.4.0.1<sup>2,5</sup>.1<sup>7,10</sup>]-3-十二烯、8-亚乙基-9-甲基四环[4.4.0.1<sup>2,5</sup>.1<sup>7,10</sup>]-3-十二烯、8-甲基-8-羧甲基四环[4.4.0.1<sup>2,5</sup>.1<sup>7,10</sup>]-3-十二烯、7,8-苯并三环[4.3.0.1<sup>2,5</sup>]癸-3-烯(常用名:亚甲基四氢茱:也被称为1,4-亚甲基-1,4,4a,9a-四氢茱)、1,4-亚甲基-8-甲基-1,4,4a,9a-四氢茱、1,4-亚甲基-8-氯-1,4,4a,9a-四氢茱、1,4-亚甲基-8-溴-1,4,4a,9a-四氢茱等4环式单体等。

[0066] 这些降冰片烯系单体也可以具有1种或2种以上的取代基。作为取代基,能够举出烷基、烯烃基、芳香基、甲硅烷基、烷氧基羰基、亚烷基等。

[0067] 作为能够与降冰片烯系单体开环共聚的其它单体,能够举出环己烯、环庚烯、环辛烯、1,4-环己二烯、1,5-环辛二烯、1,5-环癸二烯、1,5,9-环十二碳三烯、1,5,9,13-环己基癸四烯等单环的环烯烃系单体。

[0068] 作为能够与降冰片烯系单体加成共聚的其它单体,能够举出乙烯、丙烯、1-丁烯、1-戊烯、1-己烯等碳原子数为2~20的 $\alpha$ -烯烃系单体;环丁烯、环戊烯、环己烯、环辛烯、四环[9.2.1.0<sup>2,10</sup>.0<sup>3,8</sup>]十四碳-3,5,7,12-四烯(也称为3a,5,6,7a-四氢-4,7-亚甲基-1H-茱)等环烯烃系单体;1,4-己二烯、4-甲基-1,4-己二烯、5-甲基-1,4-己二烯、1,7-辛二烯等非共轭二烯烃系单体等。

[0069] 在它们之中,作为能够与降冰片烯系单体加成共聚的其它单体,优选 $\alpha$ -烯烃系单体,更优选乙烯。

[0070] 这些其它单体也可以具有1种或2种以上的取代基。作为取代基,能够举出烷基、亚烷基、芳基、甲硅烷基、烷氧基羰基、亚烷基等。

[0071] 降冰片烯系单体的开环聚合物、或降冰片烯系单体与能够与其开环共聚的其它单体的开环聚合物能够在公知的开环聚合催化剂的存在下将单体成分进行聚合而得到。

[0072] 作为开环聚合催化剂,能够使用例如包含钨、钼等金属的卤化物、硝酸盐或乙酰丙酮化合物、以及还原剂的催化剂,或者包含钛、锆、钨、钼等金属的卤化物或乙酰丙酮化合物和有机铝化合物的催化剂。

[0073] 降冰片烯系单体的开环聚合物氢化物通常能够在上述开环聚合物的聚合溶液中,添加包含镍、铂等过渡金属的公知的氢化催化剂,将碳-碳不饱和键进行氢化,从而得到。

[0074] 降冰片烯系单体的加成聚合物、或降冰片烯系单体与能够与其开环共聚的其它单体的加成聚合物能够在公知的加成聚合催化剂的存在下将单体成分进行聚合而得到。

[0075] 作为加成聚合催化剂,能够使用例如包含钛、锆或钨化合物和有机铝化合物的催化剂。

[0076] 降冰片烯系聚合物的分子量没有特别的限制,以环己烷溶液(聚合物不溶解的情况下为甲苯溶液)的凝胶渗透色谱法(GPC)测定的换算为聚苯乙烯的重均分子量计,通常为5000以上,优选为5000~500000,更优选为8000~200000,特别优选为10000~100000。当重均分子量在该范围内时,机械强度与成型加工性高度地平衡,为优选。

[0077] 降冰片烯系聚合物的玻璃化转变温度根据使用目的而适当选择即可,通常为50~300℃,优选为100~280℃,特别优选为115~250℃,进一步优选为130~200℃。当玻璃化转变温度为该范围内时,耐热性和成形加工性高度平衡,为优选。

[0078] 上述降冰片烯系聚合物的玻璃化转变温度基于JIS K 7121而测定。

[0079] 降冰片烯系聚合物能够分别单独使用,或者也可以组合2种以上来使用。

[0080] 此外,作为构成成型体表面的树脂成分,除降冰片烯系聚合物之外,还能够以通常所采用的量任意地添加通常用于热塑性树脂材料的配合剂,例如软质聚合物、抗氧化剂、紫外线吸收剂、光稳定剂、近红外线吸收剂、脱模剂、染料、颜料等着色剂、增塑剂、抗静电剂、荧光增白剂等配合剂。在此,在对降冰片烯系聚合物混合软质聚合物而使用的情况下,相对于100质量份的作为降冰片烯系聚合物的含脂环结构聚合物,通常为0.01~20质量份,优选为0.05~10质量份,更优选为0.05~5质量份。

[0081] 此外,作为构成成型体表面的树脂成分,除降冰片烯系聚合物和作为上述配合剂的一种的软质聚合物以外,也可以混合其它的聚合物(以下,简称为“其它聚合物”)。混合在降冰片烯系聚合物中的其它聚合物的量,相对于100质量份的降冰片烯系聚合物,通常为200质量份以下,优选为150质量份以下,更优选为100质量份以下。

[0082] 当相对于降冰片烯系聚合物而配合的各种配合剂、其它聚合物的比例过多时,细胞会变得难以悬浮,因此,优选在不损害任一种含脂环结构聚合物的性质的范围进行配合。

[0083] 降冰片烯系聚合物与配合剂、其它聚合物的混合方法,只要是配合剂充分地分散在聚合物中的方法,则没有特别限定。此外,配合的顺序也没有特别的限制。作为配合方法,能够举出例如使用混炼机、单轴混炼机、双轴混炼机、辊式混炼机、布拉班德(Brabender)混炼机、挤出机等在熔融状态下混炼树脂的方法;在适当的溶剂中溶解使其分散后,通过凝固法、流延法、或直接干燥法而除去溶剂的方法等。

[0084] 在使用双轴混炼机的情况下,大多是在混炼后,通常以熔融状态挤出为棒状,用股切割机切成适当的长度,进行颗粒化而使用。

[0085] 使用这样的降冰片烯系聚合物,通常能够通过任意的成型方法,例如注射成型法、挤出成型法、吹塑成型法、真空成型法、压制成型法、压缩成型法、旋转成型法、流延成型法等,成型为具有任意形状的成型体。

[0086] 作为由降冰片烯系聚合物构成的成型体(降冰片烯系聚合物成型体),例如在将降冰片烯系聚合物成型体用于细胞培养的情况下,能够举出降冰片烯系聚合物制培养容器。

[0087] 例如,如果是皿状的培养容器,则能够通过注射成型法等进行成型。

[0088] 另外,就上述培养容器而言,肽库被曝露的部分的表面至少由降冰片烯系聚合物构成即可。

[0089] 此外,该肽库被曝露的表面可以制成仅包含降冰片烯系聚合物,或者也可以制成培养容器整体仅包含降冰片烯系聚合物。

[0090] 进行成型而得到的成型体优选不施加利用等离子照射等亲水化处理而用于本发明的一个方式的肽的搜索方法。这是因为有如下风险:通过施加亲水化处理,从而表面被氧化,由此,肽非特异性地粘接在氧化了的表面,残留于该表面的肽的种类变多,变得难以搜索特定的肽。

[0091] 上述降冰片烯系聚合物成型体通常能够进行灭菌处理而使用。

[0092] 灭菌处理的方法没有特别的限定,能够根据成型体的形状、使用的细胞,而从高压蒸汽法、干热法等加热法;照射 $\gamma$ 射线、电子束等放射线的放射线法、照射高频率的照射法;使其接触氧化乙烯气体(EOG)等气体的气体法;使用灭菌过滤器的过滤法等医药领域通常采用的方法中适当选择。

[0093] 通过使作为本发明的一个方式的寡肽、降冰片烯系聚合物粘接性修饰(多)肽接触成型了的降冰片烯系聚合物成型体的表面(降冰片烯系聚合物制培养容器的内面),从而能够使该寡肽、降冰片烯系聚合物粘接性修饰(多)肽附着于成型体表面(培养容器内面)。

[0094] 在将具有随机的氨基酸序列的肽库曝露于至少表面由降冰片烯系聚合物构成的成型体的上述表面的步骤中,能够采用例如使肽库液接触上述表面的方法,其中,该肽库液是在磷酸缓冲液、细胞培养液等不会导致肽库变性、几乎中性的液状介质中,使肽库溶解或悬浊的肽库液。接触时间通常为1分钟~10小时,优选为5分钟至2小时。当接触时间过短时,会有具有粘接性的肽不能充分地粘接于成型体的风险,相反当接触时间过长时,会有由于肽的变性等导致原本对成型体不具有粘接性的肽粘接的风险,任何一种都不优选。接触时的温度通常为15~35℃,优选为20~30℃。当温度过高时,会进行肽库液的蒸发,当温度过低时会有无法得到肽库原本的粘接性的可能性,任何一种都是优选。

[0095] <步骤(II)>

[0096] 步骤(II)是在步骤(I)的曝露之后,将曝露的该表面用水系溶剂进行清洗的步骤。

[0097] 从容易选择具有对降冰片烯系聚合物的特异性的粘接性的观点出发,使用的水系溶剂优选缓冲液、酸性水溶液和碱性水溶液3种的组合。在水系溶剂中的清洗的顺序能够任意地设定。在它们之中,从更容易得到本发明的效果的观点出发,优选缓冲液。

[0098] 缓冲液是即使添加少量的酸、碱,稍微改变浓度,pH也不会大幅度变化的溶液。

[0099] 作为缓冲液,通常使用pH5~9的缓冲液,优选使用pH6.8~8.3的缓冲液。具体而言,能够举出将磷酸作为缓冲成分的磷酸缓冲液、在磷酸缓冲液中加入氯化钠的磷酸缓冲液、将乙酸作为缓冲成分的乙酸缓冲液、将枸橼酸作为缓冲成分的枸橼酸缓冲液、将硼酸

作为缓冲成分的硼酸缓冲液、将三羟甲基氨基甲烷作为缓冲成分的Tris缓冲液、以及在Tris缓冲液中加入EDTA等金属螯合剂、硼酸或乙酸的缓冲液等,但不限定于这些。

[0100] 它们能够单独使用,或将多种组合来使用。

[0101] 作为酸性水溶液,通常使用pH1~4的酸性水溶液,优选使用pH2.5~3的酸性水溶液。作为用于酸性水溶液的制备的酸,能够举出盐酸、硫酸、磷酸、三氟乙酸、用酸调节了pH的甘氨酸水溶液、用酸调节了pH的枸橼酸水溶液等。

[0102] 在它们之中,从为了在酸性水溶液的pH中回收曝露的肽库后,迅速地将pH调至中性条件的操作上的观点出发,优选将若干mM左右浓度的稀的酸溶液、1M左右的三羟甲基氨基甲烷水溶液进行混合从而能够易于制备的、可制备为pH2.5左右的甘氨酸溶液等。

[0103] 它们能够单独使用,或将多种组合来使用。

[0104] 作为碱性水溶液,通常使用pH8~11.5的碱性水溶液,优选使用pH10~11.5的碱性水溶液。作为用于碱性水溶液的制备的碱,能够举出三乙胺或三乙醇胺这样的水溶性胺、氨、氢氧化铵这样的铵盐、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、用氢氧化钠调节了pH的甘氨酸水溶液等。

[0105] 在它们之中,从回收在碱性水溶液的pH中曝露了的肽库后,迅速地将pH调至中性条件的操作上的观点出发,在上述的碱性水溶液中,优选制成200mM以下的稀浓度的铵盐水溶液或甘氨酸水溶液等。它们能够单独使用,或将多种组合来使用。

[0106] 在水系溶剂中的清洗次数、用于清洗的水系溶剂的量能够根据要清洗的部分的形状、要清洗的面积而任意选择。如果是通常的培养皿那样的平面,缓冲液酸性水溶液和碱性水溶液的清洗次数通常各为1~5次,优选各为2~4次。用于1次清洗的水系溶剂的量通常为每清洗对象面积10~0.01ml/cm<sup>2</sup>,优选为每清洗对象面积2~0.1ml/cm<sup>2</sup>。当水系溶剂的量过少时,清洗会不充分,另一方面,即使多使用,清洗效果也会有界限,因此没有作用。

[0107] <步骤(III)>

[0108] 步骤(III)是在步骤(II)的清洗后,通过用有机溶剂清洗成型体表面从而将残留于成型体表面的化合物回收的步骤。

[0109] 在步骤(II)中用水系溶剂清洗后,为了回收残留于降冰片烯系聚合物成型体表面的化合物,用有机溶剂进行清洗。

[0110] 能够认为:经受住水系溶剂的清洗而残留于降冰片烯系聚合物成型体的表面的肽是对降冰片烯系聚合物的粘接性高的肽。

[0111] 用于清洗的有机溶剂能够不以水系介质稀释而使用,但在利用显示库等的病毒增殖特性的筛选系的情况下,作为以水系介质稀释了的稀释液而使用能够减少对其增殖特性的影响,因此优选。因此,用于本发明的有机溶剂优选为与水具有混合性的极性有机溶剂。

[0112] 作为极性有机溶剂,能够举出二甲基亚砜等含硫系有机溶剂;二甲基甲酰胺等酰胺系有机溶剂;甲醇、异丙醇等醇系有机溶剂;乙腈等腈系有机溶剂等。

[0113] 相对于稀释液整体,以水系介质稀释而使用情况下的极性溶剂的浓度通常为5重量%~90重量%,优选为5重量%~50重量%。

[0114] 在有机溶剂中的清洗次数、用于清洗的有机溶剂的量能够根据要清洗的部分的形状、要清洗的面积而任意选择。如果成型体表面是通常的培养皿那样的平面,则清洗次数通常为1~5次,优选为1~2次。

[0115] 用于1次清洗的有机溶剂(以水系介质进行稀释的情况下为其稀释液)的量通常为0.01~10ml/cm<sup>2</sup>,优选0.1~2ml/cm<sup>2</sup>。

[0116] 当用于清洗的有机溶剂的量过少时,清洗会不充分,另一方面,即使多使用,清洗效果也会有界限,因此没有作用。

[0117] <步骤(IV)>

[0118] 步骤(IV)是解析在步骤(III)中回收的上述化合物的肽序列信息的步骤。

[0119] 即,解析以有机溶剂清洗而回收的清洗处理后的液体中的肽序列信息,确认对降冰片烯系聚合物有粘接性的聚寡肽的氨基酸序列。

[0120] 作为肽库,在使用包含肽混合物和聚合物粒子的显示库的情况下,能够通过已有的氨基酸序列解析法(质量分析等)直接确认氨基酸序列,其中,该聚合物粒子显示一部分(通常为末端区域)的氨基酸序列为随机的蛋白质。

[0121] 此外,使用双显示库的情况下,能够解析噬菌体的基因,求出对应的氨基酸序列。

[0122] 2) 寡肽

[0123] 本发明的第2方式为包含特定的氨基酸序列的寡肽。寡肽是由2~10个左右、较少数的氨基酸形成的肽。寡肽能够举出例如将蛋白质(多肽)以酶性、化学性进行分解而得到的多肽链。

[0124] 本发明的一个方式涉及的寡肽包含以Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr表示的氨基酸序列(以下称为“特定的氨基酸序列”)。包含这样的氨基酸序列的寡肽是对降冰片烯系聚合物具有粘接性的寡肽。另外,寡肽也可以制成仅包含以Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr(序列号1)表示的氨基酸序列。

[0125] 本发明的第2方式涉及的寡肽是能够通过上述本发明的第1方式涉及的对降冰片烯系聚合物有粘接性的肽的搜索方法而进行搜索的寡肽的一种。

[0126] 3) 对降冰片烯系聚合物具有粘接性的修饰肽或修饰多肽

[0127] 本发明的第3方式涉及的对降冰片烯系聚合物有粘接性的修饰肽或修饰多肽(以下称为“降冰片烯系聚合物粘接性修饰(多)肽”)在其末端或其内部含有上述特定的氨基酸序列。降冰片烯系聚合物粘接性修饰(多)肽可以是直链状,也可以是支链状。

[0128] 本发明的第3方式涉及的降冰片烯系聚合物粘接性修饰(多)肽能够在本发明的第2方式涉及的寡肽上,将任意的(多)肽进行加成、插入、或与一部分氨基酸取代,从而得到。

[0129] 作为任意的(多)肽,能够举出层粘连蛋白、纤连蛋白、胶原蛋白、玻连蛋白等细胞外基质;白细胞介素、血小板衍生生长因子、肝细胞生长因子、神经生长因子、肿瘤坏死因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、转化生长因子、脂联素等细胞因子类;整联蛋白、PD-1等细胞膜受体、CD2、CD60等细胞表面抗原等具有生理活性的(多)肽、能够识别半抗原和蛋白质抗原的抗体;组氨酸标签、硫氧还蛋白标签、谷胱甘肽S-转移酶标签、麦芽糖结合蛋白标签、GFP、荧光素酶等荧光标记蛋白质等在基因工程中具有有用的功能的(多)肽;由功能不明确的氨基酸序列形成的(多)肽。

[0130] 此外,为了本发明的第2方式涉及的寡肽与任意的(多)肽的连接、肽长度调节等,也能够插入链接序列。

[0131] 本发明的第3方式涉及的降冰片烯系聚合物粘接性修饰(多)肽含有1个或多个上述特定的氨基酸序列。

[0132] 本发明的第3方式涉及的降冰片烯系聚合物粘接性修饰(多)肽的、“构成本发明的第3方式涉及的降冰片烯系聚合物粘接性修饰(多)肽的总氨基酸数/本发明的第3方式涉及的降冰片烯系聚合物粘接性修饰(多)肽包含的本发明的第2方式涉及的寡肽数”(α)优选为7以上且80以下,更优选为10以上且50以下。

[0133] 在上述α超过80的情况下,从与降冰片烯系聚合物的粘接性的观点出发,优选:本发明的第2方式涉及的寡肽在从本发明的第3方式涉及的降冰片烯系聚合物粘接性修饰(多)肽的末端起20个、更优选10个氨基酸以内,存在至少1个上述特定的氨基酸序列。

[0134] 4) 免疫测定方法

[0135] 本发明的第4方式涉及的免疫测定方法使用下述容器进行,该容器将本发明的第2方式涉及的寡肽固相化在由降冰片烯系聚合物构成的容器的内表面。

[0136] 作为使用的容器,能够举出例如96孔板、384孔板、比色皿。这些容器除能够通过注射成型法等进行成型之外,也可以是将降冰片烯系聚合物的膜在底面嵌件形成的孔板,也可以是将板状的降冰片烯系聚合物通过切割加工等而制作的流路芯片。

[0137] 另外,就上述容器而言,上述寡肽被固相化的部分的表面至少由之前详述的降冰片烯系聚合物构成即可。

[0138] 此外,将上述寡肽进行固相化的表面可以制成仅包含之前详述的降冰片烯系聚合物,或者也可以制成容器整体仅包含之前详述的降冰片烯系聚合物。

[0139] 就将上述寡肽固定在由降冰片烯系聚合物构成的容器的内表面上的方法而言,将包含固相化的寡肽的水溶液曝露于容器内表面一定时间即可。在水溶液中,可以像磷酸缓冲生理盐水这样包含缓冲液成分,也可以包含二甲基亚砷等溶解于水的有机溶剂。

[0140] 作为在容器表面的曝露操作,可以是添加包含在容器内固相化的寡肽的水溶液的方法,也可以是喷墨、喷射点胶机这样的点胶机、喷雾等方法,也可以是根据印章操作的方法。

[0141] 固相化操作的温度可以是室温,在加热的情况下,能够在上述寡肽不产生热变性的温度范围内,以水蒸发而溶液浓度不会改变的方式进行。此外,也可以是冷藏状态,在包含固相化的抗原的水溶液不会冻结的温度即可。

[0142] 如此使上述寡肽接触后,除去该溶液,用磷酸缓冲生理盐水等进行清洗。

[0143] 在固相化操作后,不需要进行特殊的干燥操作,但为了除去在固相化操作中残留在容器内的微小的液滴,可以进行送风、减压等处理。

[0144] 在固相化了的寡肽是抗原或其一部分的抗体识别位点(以下统称为“抗原等”)的情况下,在免疫测定方法中,能够使与抗原等键合的标记抗体进行键合。

[0145] 抗体的标记物质能够使用与公知的免疫测定中使用的标记物质同样的标记物质,没有特别限定。作为具体例子,能够举出酶、荧光物质、化学发光物质、生物素、His标签等标签、金等纳米粒子、半抗原、染色物质、同位素、铀、放射性物质等。作为酶,能够使用碱性磷酸酶(ALP)、过氧化物酶、β-半乳糖苷酶等公知的酶,但不限定于这些酶。

[0146] 此外,在免疫测定方法中,在将上述寡肽进行固相化之后,基于防止在容器内表面非特异性的(多)肽等的吸附的目的,能够进行阻断处理。

[0147] 阻断处理优选使用Tween20等表面活性剂。或者也可以使用白蛋白、牛奶酪蛋白等蛋白质。

[0148] 使用如此而得到的容器进行免疫测定,其中,该容器为寡肽被固相化在由降冰片烯系聚合物构成的容器内表面的容器。该免疫测定利用寡肽与溶液内的抗体的抗原抗体反应,该寡肽为被固相化在由降冰片烯系聚合物构成的容器内表面的寡肽,但在与该容器的组合的免疫测定中,测定方法没有特别限制,能够应用基于通常所知的ELISA法的直接法、间接法、三明治法、竞争法的测定原理。

[0149] 作为利用上述被固相化在由降冰片烯系聚合物构成的容器内表面的寡肽与溶液内的抗体的抗原抗体反应的代表性的测定方法,能够举出 (i) 预先使抗体键合在被固相化于容器内的寡肽后,添加包含被检物的试样的方法和 (ii) 将寡肽固相化后,将包含被检物的试样与抗体同时添加的方法。

[0150] 在 (i) 的方法中,在将酶、荧光染料、生物素等标记进行修饰了的抗体中,将特异性识别寡肽的抗体添加到容器中,该容器为将寡肽固相化于由降冰片烯系聚合物构成的容器内表面的容器,使之与固相化抗原进行反应,将未反应的剩余抗体清洗除去。接下来,将测定对象的试样添加到容器内,使试样中的抗原与容器内的抗体反应,回收在容器内的标记抗体。之后,通过测定起因于回收了的标记抗体的标记信号,从而计测试样中的抗原浓度。

[0151] 在 (ii) 的方法中,在将酶、荧光染料、生物素等标记进行修饰了的抗体,且将特异性识别抗原的抗体与包含被检物的试样混合,或不混合而同时添加到容器中,使抗体与固相化抗原进行反应,回收不与固相化抗原反应的标记抗体,其中,该容器为将寡肽固相化于由降冰片烯系聚合物构成的容器内表面的容器。之后,通过测定起因于回收了的标记抗体的标记信号,从而计测试样中的抗原浓度。

[0152] 在上述 (i) 的方法和 (ii) 的方法中,将测定对象的试样放入上述的容器进行测定,但不像通常的ELISA法的直接法、间接法、三明治法、竞争法那样在添加测定试样后不需要进行容器内的清洗操作。

[0153] 在 (i) 的方法中,能够使测定试样中的测定对象抗原在测定容器内预先与吸附于固相化寡肽的标记抗体反应,之后,使标记抗体溶出于试样溶液中,取出其溶出抗体,得到标记的信号,从而测定测定试样中的测定抗原的浓度。因此,在添加测定试样后不需要进行容器内的清洗操作。

[0154] 在 (ii) 的方法中,将测定试样中的测定对象抗原与标记抗体同时添加到测定容器内。不与测定试样中的测定对象抗原反应的标记抗体与容器内的固相化寡肽进行反应,取出测定试样,检测出试样中包含的标记抗体的标记的信号,从而能够测定反映与测定试样中的测定对象抗原反应了的标记抗体的信号。因此,在添加测定试样后不需要进行容器内的清洗操作。

[0155] 仅需要如下操作:以这样的方式将测定试样添加到容器内,使之进行免疫反应后,将该试样液取出的操作。

[0156] 在测定对象的试样是来自人类等生物体的试样或来自培养细胞的试样的情况下,会有由于感染性微生物混入样品而导致的感染症的风险,需要注意防止操作试样时的感染。

[0157] 在ELISA法中,在将试样放入通常的测定容器而进行抗原抗体反应的情况下,清洗容器为通常的操作。在该清洗操作中,担心如下可能性:产生大量清洗水,并且在将清洗溶液从容器除去的操作中,产生清洗溶液的雾·飞沫,引起对操作者的曝露、对自动装置内的

曝露等。因此,在不能否定感染性微生物混入试样的可能性的情况下,感染症的风险变高。

[0158] 对此,在上述(i)和(ii)的方法中,在将测定对象试样添加到测定的容器后,能够不进行清洗操作而测定,因此在测定不能否定混入感染性微生物的测定对象试样的情况下,能够显著地降低感染性风险。因此,能够安全有效地进行免疫测定。

[0159] 另外,上述(i)和(ii)的操作也能够以人手作业的操作而实施,但也可以以多通道自动点胶装置、机器人、臂式机器人装置进行操作。

[0160] 此外,在需要清洗操作的测定方法中,由于多次重复进行清洗操作而需要时间,但如果是上述(i)和(ii)的方法,则没有进行清洗操作的必要,因此能够在更短时间有效地进行计测。

[0161] 实施例

[0162] 以下,通过实施例,更加详细地说明本发明。但是,本发明完全不被限定于以下的实施例。

[0163] [实施例1]

[0164] <第一次噬菌体溶液的取得>

[0165] 作为噬菌体展示肽库,使用Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit (NewEnglandBioLabo公司制)。

[0166] 将噬菌体溶液溶解于磷酸缓冲液(PBS;137mmol/升的NaCl、8.1mmol/升的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2.68mmol/升的KCl、1.47mmol/升的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的混合液、pH7.4),制备肽库溶液。

[0167] 在包含降冰片烯系开环聚合物氢化物[ZEONOR(注册商标)1060R、日本瑞翁公司制]的直径10cm的培养皿底面,滴加制备的肽库溶液,在室温(25℃)静置30分钟。

[0168] 之后,用PBS将上述培养皿底面清洗3次。

[0169] 接下来,用制备为pH2的40mM Glycine • HCl Buffer (pH2.2)清洗1次,进而滴加制备为pH10的40mM Glycine • NaOH (pH10)。

[0170] 回收滴加的液体,直接用稀盐酸将pH进行中和(pH=7.0),制成“用碱清洗而回收的噬菌体溶液”。

[0171] 接下来,向上述培养皿底面滴加包含10%DMSO的PBS,回收滴加的溶液,制成“用DMSO清洗而回收的噬菌体溶液”。

[0172] 图1示出至此为止的工序图。

[0173] <第二次噬菌体溶液的取得>

[0174] 为了促进回收的噬菌体的增殖,按以下的方法制备噬菌体感染的大肠杆菌。

[0175] 将用碱清洗而回收的噬菌体溶液和用DMSO清洗而回收的噬菌体溶液分别滴加至作为噬菌体宿主的大肠杆菌培养液中,在37℃振动培养16小时,得到噬菌体感染的大肠杆菌培养液。

[0176] 代替制备的肽库溶液,将噬菌体感染的大肠杆菌培养液滴加至包含降冰片烯系开环聚合物氢化物[ZEONOR 1060R、日本瑞翁公司制]的直径10cm的培养皿底面,除此以外,与上述(第一次噬菌体溶液的取得)同样地进行,得到用碱清洗而回收的噬菌体溶液和用DMSO清洗而回收的噬菌体溶液。

[0177] <第三次噬菌体溶液的取得>

[0178] 使用如此而得到的上述2个噬菌体溶液,为了再次促进噬菌体的增殖,使大肠杆菌

感染,与第二次噬菌体溶液的取得同样地进行,得到用碱清洗而回收的噬菌体溶液和用DMSO清洗而回收的噬菌体溶液。

[0179] <噬菌体的基因解析>

[0180] 读取通过第三次噬菌体溶液的取得而得到的2个噬菌体溶液包含的噬菌体的基因序列,得到对应的氨基酸序列。

[0181] 从用碱清洗而回收的噬菌体溶液得到的、即,具有在高pH溶出的特性的氨基酸序列为TVDNSLA (Thr-Val-Asp-Asn-Ser-Leu-Ala) (序列号2)。

[0182] 从用DMSO清洗而回收的噬菌体溶液得到的、即,即使进行碱清洗也继续粘接、在有机溶剂中溶出的氨基酸序列为TVDSCLT (Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr) (序列号1)。

[0183] [实施例2]

[0184] <多肽的合成>

[0185] 基于在实施例1中得到的氨基酸序列,为了在末端检测出多肽,使用具有组氨酸标签序列的多肽,在实施例1中得到的氨基酸序列与组氨酸标签序列之间,有机合成了与甘氨酸连接的多肽,其中,该组氨酸标签序列排列有6个组氨酸残基。

[0186] 作为包含具有在高pH时溶出的特性的氨基酸序列的多肽1,合成了AYTVDNSLACGGGGGHHHHHH (Ala-Tyr-Thr-Val-Asp-Asn-Ser-Leu-Ala-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-His-His-His-His-His) (序列号3)。

[0187] 此外,作为包含具有在DMSO中溶出的特性的氨基酸序列的多肽2,合成ACTVDSCLTCGGGGGHHHHHH (Ala-Cys-Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-His-His-His-His-His) (序列号4)。

[0188] <多肽溶液的制备>

[0189] 将多肽1、多肽2和人正常IgG抗体(和光纯药工业公司制)分别以10 $\mu$ g/ml的浓度溶解于PBS溶液和包含10%DMSO的PBS(10%DMSO PBS)中,制备各种溶液。

[0190] <对容器的粘接性评价>

[0191] 将在上述中制备的各多肽溶液分别以每1孔50 $\mu$ L添加(N=3)到将降冰片烯系开环聚合物氢化物[ZEONOR(注册商标)1060R、日本瑞翁公司制]注射成型而得到的96孔板(以下称为“1060R板”)和聚苯乙烯制的96孔板(产品名“Falcon(注册商标)”、Corning公司制;以下称为“TCPS板”),在室温(25 $^{\circ}$ C)静置1小时。

[0192] 在静置后,将1060R板和TCPS板的孔内使用T-TBS(0.05mTris盐酸、0.15m氯化钠、0.05%Tween20;pH7.6)清洗3次,之后,将nacalai tesque,inc制的Blocking One试剂的5倍稀释溶液作为阻断溶液,每1孔分注200 $\mu$ L,在室温静置1小时,由此进行阻断操作。

[0193] 将静置后的各板用T-TBS清洗5次,在清洗后,每1孔添加50 $\mu$ L的(小鼠抗6His单克隆抗体、nacalai tesque,inc制)的PBS溶液用于检测多肽,在室温静置1小时。

[0194] 进而,将静置后的各板用T-TBS(同上)清洗5次,在清洗后,每1孔添加50 $\mu$ L的过氧化物酶显色剂,使之在室温反应10分钟而进行显色,添加100 $\mu$ L的100mM的盐酸水溶液,终止过氧化物酶反应。

[0195] 对于各板的孔,使用孔板阅读器装置(CORONA公司制),测定450nm的吸光度。

[0196] 测定结果示于图2。在图2中,对于不同的多肽,显示了溶解多肽的溶剂和板的不同组合的结果。

[0197] 结果是多肽2相比于TCPS板,在1060R板中示出更高的450nm的吸光度,在具有多肽2包含的氨基酸序列的寡肽中,示出对降冰片烯系聚合物有高粘接性。

[0198] [实施例3]

[0199] 在实施例2中,多肽2包含对降冰片烯系聚合物粘接性高的氨基酸序列,为了使多肽2具有作为细胞表面的纤维连接蛋白等受体的、整联的识别氨基酸序列RGD (Arg-Gly-Asp),合成了下述多肽,即,在实施例2的组氨酸标签前插入RGD基序RGDSP (Arg-Gly-Asp-Ser-Pro)的、降冰片烯系聚合物粘接性修饰(多)肽“ACTVDSCLTCGGGGGRGDSPHHHHH (Ala-Cys-Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-His-His-His-His-His-His)”(多肽3)(序列号5)。

[0200] 将该多肽3和在实施例2中得到的多肽2分别以10 $\mu$ g/ml的浓度溶解于PBS的溶液进行过滤灭菌,在EOG灭菌过的1060R板中每1孔添加50 $\mu$ L该溶液,在室温(25 $^{\circ}$ C)静置1小时。

[0201] 在静置后,将孵化了多肽3和在实施例2中得到的多肽2的1060R板分别用灭菌过的PBS清洗3次,得到多肽3涂层1060R板和多肽2涂层1060R板。

[0202] 在如此而得到的2个板和未涂敷多肽的1060R板上,将悬浮于无血清培养基(无血清培养基ESF SFM Serum • Free Medium for Hybridoma, CH0&293Cells, Expression Systems公司制)的CHO (Chinese Hamster Ovary) 细胞添加到孔中,在37 $^{\circ}$ C的CO<sub>2</sub>孵化中维持培养。

[0203] 在培养开始后,当在5小时时用显微镜观察细胞时,多肽3涂层1060R板的孔内的CHO细胞有RGD序列的效果,细胞表现为拉伸的形状。

[0204] 图3示出多肽3粘接的1060R板上的CHO细胞的显微镜照片。

[0205] 但是,在不具有RGD序列的多肽2涂层1060R板的孔内,由于在1060R板表面没有配置RGD序列,因而如图4示出那样,细胞为球形。

[0206] 此外,在没有涂敷多肽的1060R板中,CHO细胞为球形,如图5示出那样,细胞没有表现为拉伸形状。

[0207] 根据这些结果可以示出:本发明的一个方式涉及的寡肽与控制细胞的粘接的RGD序列等其它肽组合,从而使包含该寡肽的多肽能够涂敷在降冰片烯系聚合物表面,能够控制在COP表面上的细胞的粘接性等状态。

[0208] 在以下的实施例中,示例性地使用BNP(脑利钠肽)作为测定对象的物质,但测定对象的物质不限于此。

[0209] [实施例4]

[0210] 研究了抗原对多孔板的吸附条件。使用将降冰片烯系开环聚合物氢化物[ZEONOR(注册商标)1060R、日本瑞翁公司制]注射成型而得到的96孔板(以下称为“1060R板”)和聚苯乙烯制的96孔板(产品名“SUMIRON ELISA用板H(注册商标)”、Sumitomo Bakelite Co., Ltd.制;以下称为“PS板”),进行抗原的吸附比较。

[0211] 在人BNP(brain natriuretic peptide)的抗体识别位点的氨基酸序列Cys-Lys-Val-Leu-Arg-Arg-His(序列号6)的N末端一侧,合成多肽,该多肽键合了作为对降冰片烯系聚合物具有特异吸附特性的氨基酸序列的、Ala-Cys-Thr-Val-Asp-Ser-Cys-Leu-Thr-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Ser-Ser-Gly-Leu-Gly(序列号7)(以下将该多肽称为“合成BNP抗原”)。将合成BNP抗原以成为1 $\times$ 10<sup>7</sup>pg/ $\mu$ L、53pg/ $\mu$ L和27pg/ $\mu$ L浓度的方式溶解于磷酸缓

冲生理盐水 (NaCl 8.0g/L、KCl 0.20g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g/L; pH7.4; 下同), 制作稀释试样, 在3孔内分别放入100 $\mu$ L的各种稀释试样, 在室温静置30分钟, 用包含0.05% Tween20的磷酸缓冲生理盐水清洗3次, 然后使用以磷酸缓冲生理盐水稀释10倍的阻断剂 (nacalai tesque, inc制、产品名“Blocking One”), 在各孔内分注200 $\mu$ L, 在室温静置30分钟, 用包含0.05% Tween20的磷酸缓冲生理盐水清洗3次, 在板上将合成BNP抗原进行固相化。

[0212] 接下来, 在各孔内添加100 $\mu$ L的0.25ng/ $\mu$ L的包含辣根过氧化物酶标记的抗体的磷酸缓冲生理盐水, 在室温静置30分钟, 用包含0.05% Tween20的磷酸缓冲生理盐水清洗3次。

[0213] 接下来, 使用显色试剂 (nacalai tesque, inc制、产品名“ELISA POD底物TMB溶液”) 使固定在板中的合成BNP抗原着色, 用稀硫酸水溶液使反应终止, 之后用吸光板阅读器测定波长450nm的吸光。

[0214] 其结果是, 如图6示出的那样, 能够确认到在PS板中, 合成BNP抗原不吸附, 但在1060R板中, 合成BNP抗原吸附。

[0215] [实施例5]

[0216] <BNP测定用板的制备>

[0217] 将在实施例1中合成的合成BNP抗原以成为98pg/ $\mu$ L浓度的方式溶解于磷酸缓冲生理盐水, 制备抗原溶液, 分注到1060R板的各孔(7孔)中100 $\mu$ L, 除此以外, 与实施例4同样地进行, 在板上将合成BNP抗原进行固相化。

[0218] 接下来, 在各孔内添加用磷酸缓冲生理盐水稀释的、50 $\mu$ L的0.25ng/ $\mu$ L的包含辣根过氧化物酶标记的抗体的磷酸缓冲生理盐水, 在室温静置30分钟, 用包含0.05% Tween20的磷酸缓冲生理盐水清洗3次, 制作BNP测定用板。

[0219] <BNP测定>

[0220] 将人BNP (PEPTIDE INSTITUTE, INC. 制) 以浓度成为2.0pg/ml、3.9pg/ml、7.8pg/ml、15.6pg/ml、31.3pg/ml、62.5pg/ml和125pg/ml的方式溶解于磷酸缓冲生理盐水, 制备稀释试样(7点), 在得到的BNP测定用板中各孔放入100 $\mu$ L, 在室温静置30分钟, 回收50 $\mu$ L孔内的溶液, 转移至其它多孔板。

[0221] 对转移的溶液添加显色试剂 (nacalai tesque, inc制、产品名“ELISA POD底物TMB溶液”) 使之显色, 用稀硫酸水溶液使反应终止, 之后用吸光板阅读器测定波长450nm的吸光度。

[0222] 其结果是, 如图7示出的那样, 示出了根据使用的BNP浓度而可以看到显色, 能够通过测定吸光度而算出BNP浓度。

[0223] [实施例6]

[0224] 作为降冰片烯系聚合物的表面的阻断操作, 进行使用在ELISA法中广泛使用的蛋白质的方法和使用Tween20的方法的效果比较。

[0225] 作为阻断剂, 使用包含10%含有广泛用于干酪素的阻断剂 (nacalai tesque, inc制、产品名“Blocking One”) 的磷酸缓冲生理盐水 (“终浓度10%Blocking One PBS”)、包含0.05% Tween20的磷酸缓冲生理盐水 (“终浓度0.05% Tween20 PBS”) 和包含0.2% Tween20的磷酸缓冲生理盐水 (“终浓度0.2% Tween20 PBS”), 与实施例5同样地进行, 将合成BNP抗原被固相化了的容器进行阻断, 进行与未阻断处理的条件的比较。

[0226] 作为微孔板,使用1060R板(实施例)和PS板(比较例)。

[0227] 就阻断处理而言,在孔内(孔数3)各添加200 $\mu$ L的阻断剂,在室温静置20分钟,用包含0.05%Tween20的磷酸缓冲生理盐水清洗3次,之后溶解于0.25ng/ $\mu$ L的包含辣根过氧化物酶标记的抗体的磷酸缓冲生理盐水,制备抗体溶液,在96孔板的孔中添加50 $\mu$ L,在室温静置60分钟。

[0228] 在静置后,除去孔内的溶液,用包含0.05%Tween20的磷酸缓冲生理盐水清洗3次,接下来将显色试剂(nacalai tesque,inc制、产品名“ELISA POD底物TMB溶液”)添加50 $\mu$ L到96孔板的孔中,在室温静置5分钟。作为终止液,在添加0.1M的硫酸液后,用吸光板阅读器计测450nm的吸光度。

[0229] 表1示出实验条件的组合。

[0230] [表1]

[0231]

实验条件	板	阻断处理
实验3-1	1060R板	终浓度10% Blocking One PBS
实验3-2	1060R板	终浓度0.05% Tween20 PBS
实验3-3	1060R板	终浓度0.2% Tween20 PBS
实验3-4	1060R板	无
比较实验3-1	PS板	终浓度10% Blocking One PBS
比较实验3-2	PS板	终浓度0.05% Tween20 PBS
比较实验3-3	PS板	终浓度0.2% Tween20 PBS
比较实验3-4	PS板	无

[0232] 使用相对于测定在1060R板的未实施阻断的孔的吸光值的相对值,求出各条件的值。

[0233] 其结果是,如图8示出的那样,示出了在1060R板中,可以看到不含有蛋白质而包含Tween20的溶液中的阻断效果,可以抑制非特异性抗体的吸附。在PS板中,即使不含有蛋白质,与未处理相比较也是吸附少的结果,与含有蛋白质的阻断剂相比较,阻断效果低。

[0234] [实施例7]

[0235] 在实施例示出如下方法：在容器内，将固相化抗原进行固相化，与试样同时添加抗体的方法。

[0236] <BNP测定用板的制备>

[0237] 将在实施例4中得到的合成BNP抗原用磷酸缓冲生理盐水制成浓度122pg/ $\mu$ L，制备抗原溶液，分注到1060R板的各孔75 $\mu$ L，在室温静置1小时，用包含0.05%Tween20的磷酸缓冲生理盐水清洗2次，之后用包含0.05%Tween20的磷酸缓冲生理盐水在室温静置10分钟，进行阻断处理。

[0238] <BNP测定>

[0239] 以浓度18pg/ $\mu$ L、4pg/ $\mu$ L和1pg/ $\mu$ L制备人BNP (PEPTIDE INSTITUTE, INC. 制) 的稀释试样，将50 $\mu$ L这些稀释试样与50 $\mu$ L的用磷酸缓冲生理盐水稀释了的、能够识别人BNP的辣根过氧化物酶标记的抗体的溶液混合，在上述的BNP测定用板中各孔添加(各3孔) 100 $\mu$ L，在室温静置30分钟。

[0240] 接下来，取出50 $\mu$ L的孔内溶液，添加显色试剂 (nacalai tesque, inc制、产品名“ELISA POD底物TMB溶液”)，测定吸光度。

[0241] 其结果是，如图9示出的那样，示出了可观察到取决于BNP浓度的吸光，通过准备将抗原固相化在包含降冰片烯系聚合物的容器内的板，将抗体与试样同时添加的方法，从而能够进行免疫测定。

## 序列表

&lt;110&gt; 日本瑞翁株式会社

&lt;120&gt; 寡肽的搜索方法、寡肽、修饰肽及免疫测定方法

&lt;130&gt; G217151WO

&lt;150&gt; JP 2016-248711

&lt;151&gt; 2016-12-22

&lt;160&gt; 7

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 发明人: 市村直也

&lt;400&gt; 1

Thr Val Asp Ser Cys Leu Thr

5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 发明人: 市村直也

&lt;400&gt; 2

Thr Val Asp Asn Ser Leu Ala

5

[0001]

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 发明人: 市村直也

&lt;400&gt; 3

Ala Tyr Thr Val Asp Asn Ser Leu Ala Cys

5

10

Gly Gly Gly Gly Gly His His His His His

15

20

His

&lt;210&gt; 4

<211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 发明人: 市村直也  
 <400> 4  
 Ala Cys Thr Val Asp Ser Cys Leu Thr Cys  
                   5                  10  
 Gly Gly Gly Gly Gly His His His His His  
                   15                  20  
 His

<210> 5  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 发明人: 市村直也  
 <400> 5  
 Ala Cys Thr Val Asp Ser Cys Leu Thr Cys  
                   5                  10  
 [0002] Gly Gly Gly Gly Gly Arg Gly Asp Ser Pro  
                   15                  20  
 His His His His His His  
                   25

<210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223>发明人: 市村直也  
 <400> 6  
 Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
                   5

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>

<223>发明人: 市村直也  
<400> 7  
Ala Cys Thr Val Asp Ser Cys Leu Thr Cys  
[0003]                   5                   10  
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Gly Leu  
                          15                   20  
Gly

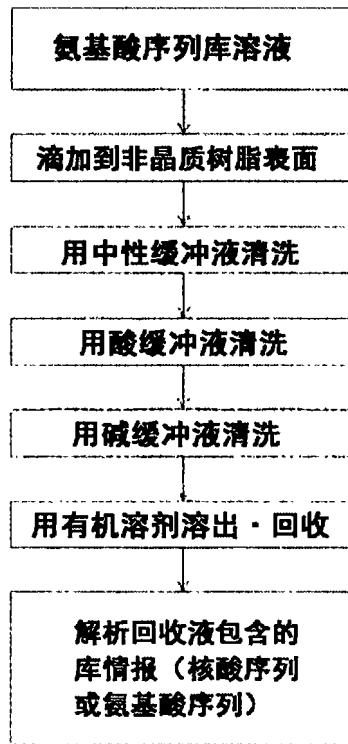


图1

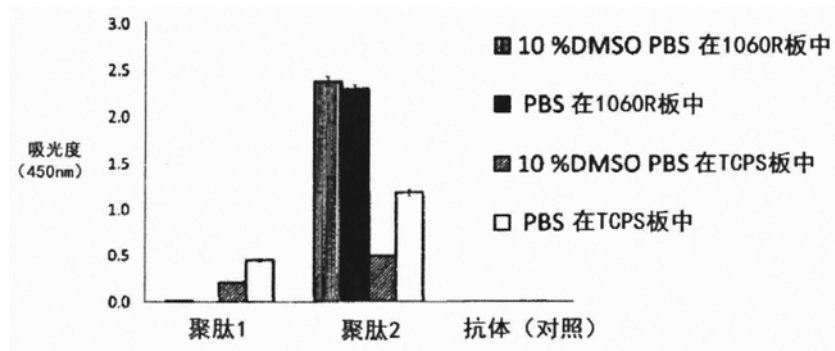


图2

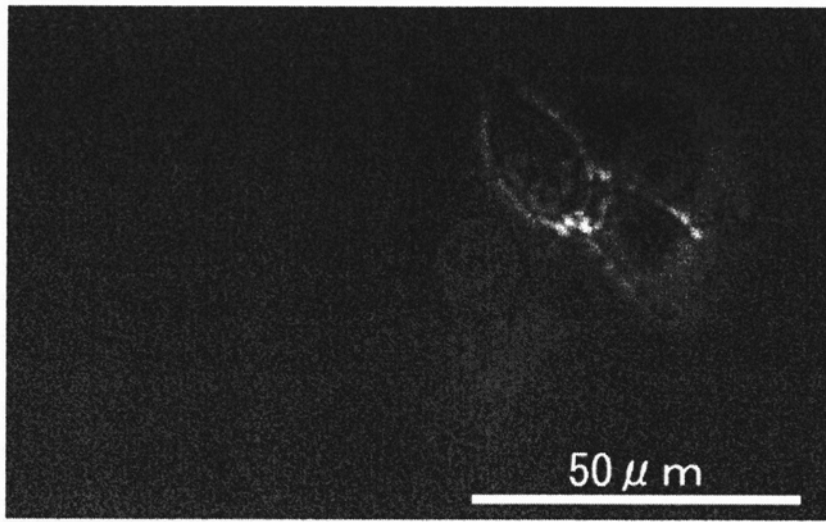


图3

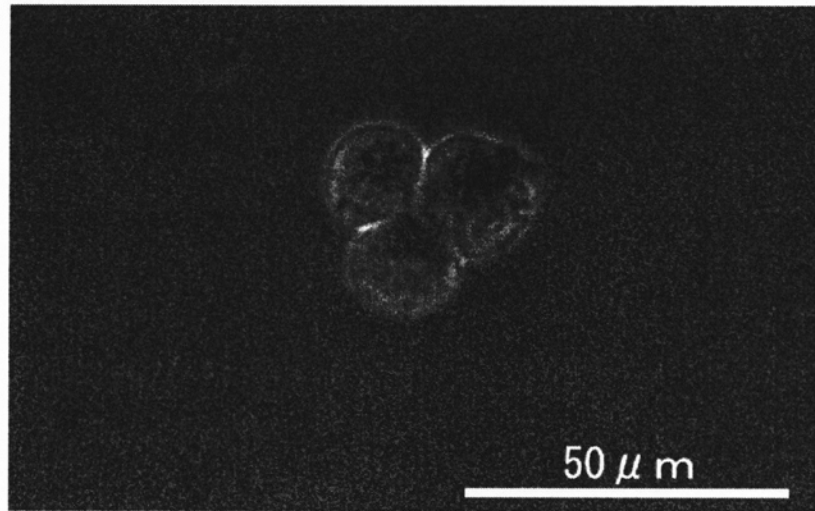


图4

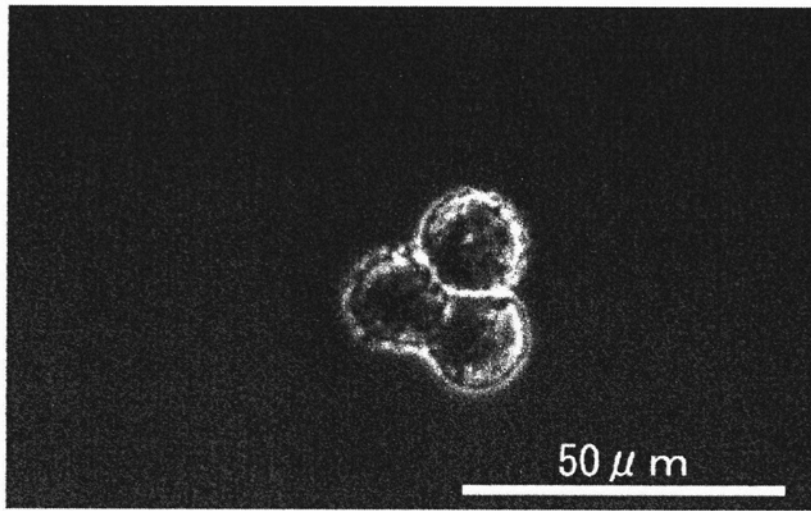


图5

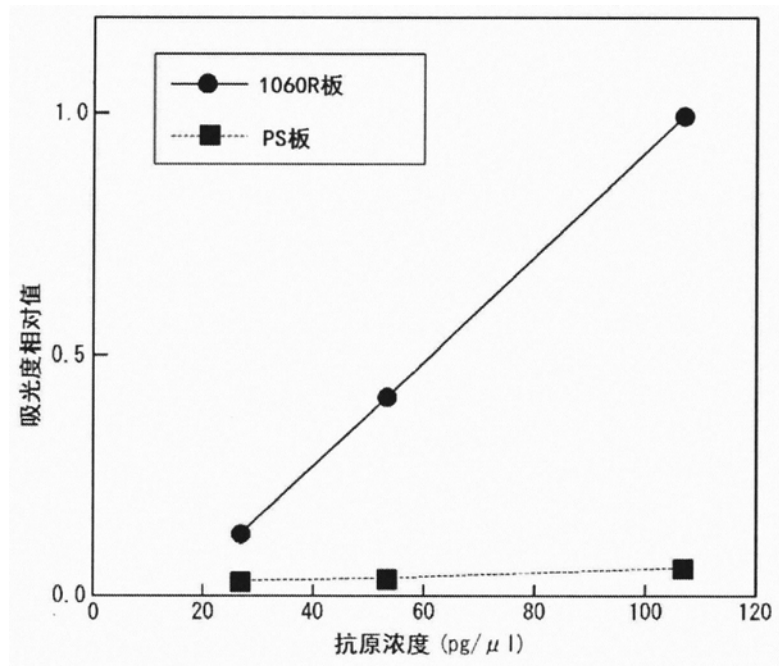


图6

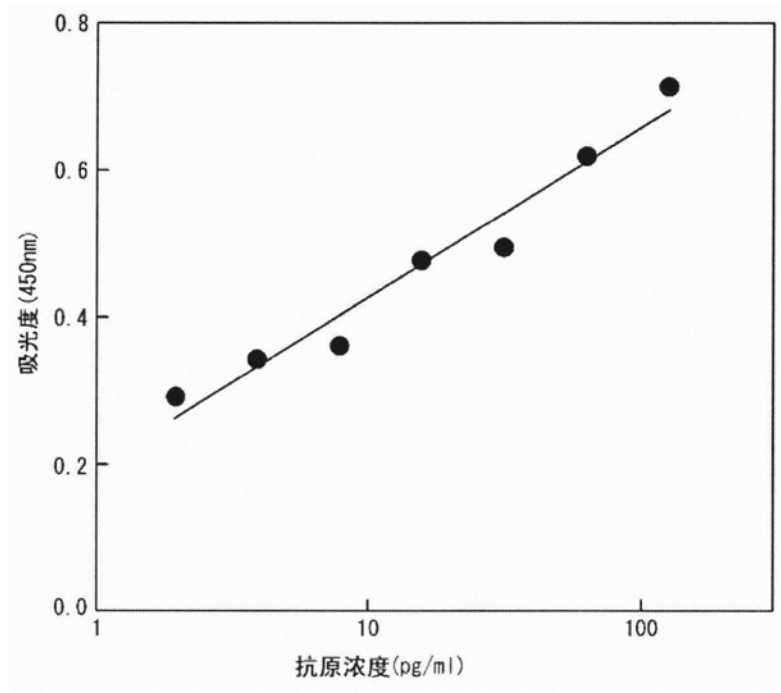


图7

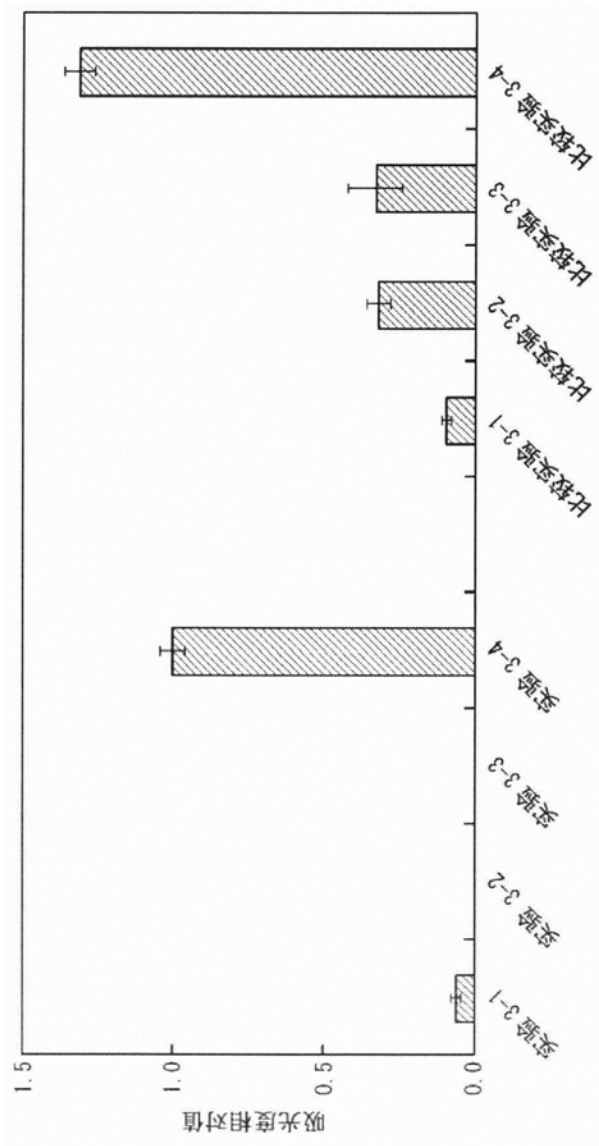


图8

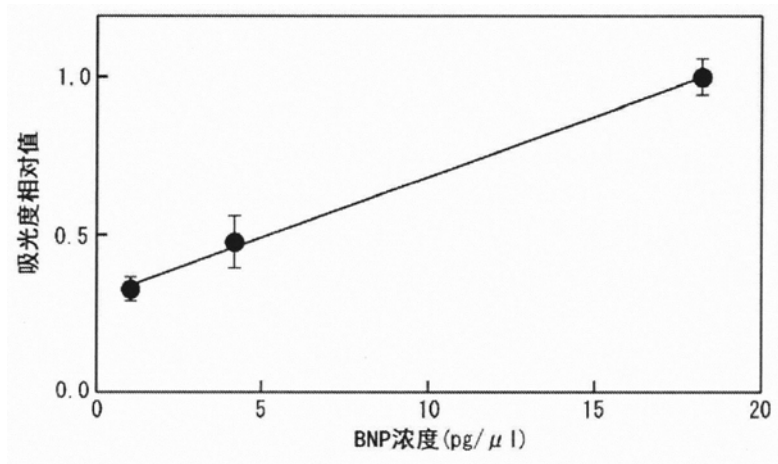


图9

专利名称(译)	寡肽的搜索方法、寡肽、修饰肽及免疫测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110191894A</a>	公开(公告)日	2019-08-30
申请号	CN201780076647.4	申请日	2017-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	日本瑞翁株式会社		
申请(专利权)人(译)	日本瑞翁株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日本瑞翁株式会社		
[标]发明人	市村直也		
发明人	市村直也		
IPC分类号	C07K7/06 G01N33/53		
CPC分类号	C07K7/06 C40B30/10 G01N33/548 G01N33/6818 G01N33/545		
代理人(译)	赵曦		
优先权	2016248711 2016-12-22 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明实施例提供了一种有效地从肽库中搜索能够键合于目的蛋白质、肽的末端的寡肽的方法。进而提供高效且安全性高的免疫测定方法。

序列表  
 <110> 日本瑞翁株式会社  
 <120> 寡肽的搜索方法、寡肽、修饰肽及免疫测定方法  
 <130> G217151WG  
 <150> JP 2016-248711  
 <151> 2016-12-22  
 <160> 7  
 <210> 1  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 发明人: 市村直也  
 <400> 1  
 Thr Val Asp Ser Cys Leu Thr  
 5  
 <210> 2  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 发明人: 市村直也  
 <400> 2  
 Thr Val Asp Asn Ser Leu Ala  
 5  
 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 发明人: 市村直也  
 <400> 3  
 Ala Tyr Thr Val Asp Asn Ser Leu Ala Cys  
 5 10  
 Gly Gly Gly Gly Gly His His His His His  
 15 20  
 His  
 <210> 4