

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5205465号
(P5205465)

(45) 発行日 平成25年6月5日(2013.6.5)

(24) 登録日 平成25年2月22日(2013.2.22)

(51) Int.Cl.	F I
C07K 7/00 (2006.01)	C O 7 K 7/00 Z N A
C07K 17/08 (2006.01)	C O 7 K 17/08
C12M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F
G01N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 2 5 E
G01N 33/533 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 2 5 W
請求項の数 20 (全 19 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2010-527865 (P2010-527865)	(73) 特許権者	508139457
(86) (22) 出願日	平成19年10月18日(2007.10.18)		コリア リサーチ インスティテュート
(65) 公表番号	特表2010-540620 (P2010-540620A)		オブ バイオサイエンス アンド バイオ
(43) 公表日	平成22年12月24日(2010.12.24)		テクノロジー
(86) 国際出願番号	PCT/KR2007/005106		大韓民国 テジョン ユソング クァン
(87) 国際公開番号	W02009/044949		ハンノ 111
(87) 国際公開日	平成21年4月9日(2009.4.9)	(74) 代理人	100065248
審査請求日	平成22年5月7日(2010.5.7)		弁理士 野河 信太郎
(31) 優先権主張番号	10-2007-0098852	(72) 発明者	チョン, サン ジョン
(32) 優先日	平成19年10月1日(2007.10.1)		大韓民国、テジョン-シ 305-768
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		、ユサン-ク、ノエン-ドン、イエオルマ
			エマウル アパートメント #902-801
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドハイブリッドを用いた配向性が調節された抗体単分子膜の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体に対する親和性を有し、配列番号1ないし4からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列からなるオリゴペプチド及び前記オリゴペプチドに共有結合で連結されたPEGからなる、抗体固定用ペプチドハイブリッド。

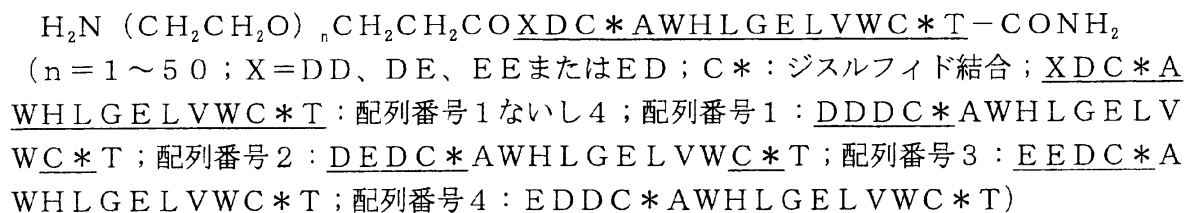
【請求項2】

前記PEG(ポリエチレングリコール)が、分子量60ないし3000であることを特徴とする請求項1に記載の抗体固定用ペプチドハイブリッド。

【請求項3】

前記ハイブリッドが、下記構造式1で表わされることを特徴とする請求項1または2に記載の抗体固定用ペプチドハイブリッド。

< 構造式 1 >



【請求項4】

前記ハイブリッドが、下記構造式 1 a で表わされることを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれか一項に記載の抗体固定用ペプチドハイブリッド。

< 構造式 1 a >



【請求項 5】

1) カルボキシル基がコーティングされた固体基板のカルボキシル基を活性化させる工程と、

2) 請求項 1 ないし請求項 4 のいずれか一項の抗体固定用ペプチドハイブリッドを、工程 1) のカルボキシル基が活性化した固体基板に付着させる表面処理工程と、 10

3) 工程 2) の表面処理された固体基板にタンパク質を結合させる工程とからなるタンパク質単分子膜の製造方法。

【請求項 6】

前記固体基板が、CM-5 Au センサーチップ、磁性微細粒子、ガラス板、金ナノ粒子、および PLGA からなる群から選択される生分解性有機高分子ナノ粒子または各種 (マイクロ) ウェルプレートからなる群から選択されるいずれか一つであることを特徴とする請求項 5 に記載の製造方法。

【請求項 7】

請求項 1 ないし請求項 4 のいずれか一項の抗体固定用ペプチドハイブリッドのいずれか一つで表面処理されたタンパク質固定用基板。 20

【請求項 8】

請求項 3 または請求項 4 の抗体固定用ペプチドハイブリッドで表面処理された固体基板に、前記ハイブリッドを媒介にして抗体が固定された免疫センサー。

【請求項 9】

請求項 8 の免疫センサーに固定された抗体に試料を加えて、前記抗体と前記抗体に特異的に結合する抗原との間の抗原抗体反応を検出する工程を含む、抗原の検出方法。

【請求項 10】

前記抗原抗体反応検出が、SPR、酵素免疫分析、蛍光プローブを用いた蛍光分析法によって行われることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。 30

【請求項 11】

前記抗原に特異的に結合する抗体発色酵素コンジュゲートを結合させて洗浄した後、前記発色酵素によって発色反応する基質を加えて前記発色を測定することによって行われることを特徴とする請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記発色酵素が、HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ)、GUS (- グルクロニダーゼ)、AP (アルカリホスファターゼ)、 - Gal (- ガラクトシダーゼ) 及びビルシフェラーゼからなる群から選択されることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記抗原に特異的に結合する抗体蛍光プローブコンジュゲートを結合させて洗浄した後、前記蛍光を測定することによって行われることを特徴とする請求項 9 または 10 に記載の方法。 40

【請求項 14】

前記蛍光プローブが、6-FAM、フルオレセイン、Cy3、Cy5 及びローダミンからなる群から選択されるいずれか一つであることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

1) 請求項 8 に記載の免疫センサーに固定された抗体に特異的に結合する抗原を加えた後に洗浄する工程と、

2) 工程 1) の洗浄された免疫センサーに試料を加えた後に洗浄する工程と、

3) 前記抗体と抗原との間の抗原抗体反応を検出する工程と 50

を含む、試料中の抗体の検出方法。

【請求項 16】

工程 3) の抗原抗体反応検出が、S P R、酵素免疫分析、および蛍光プローブを用いた蛍光分析法からなる群から選択されるいずれか一つによって行われることを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

工程 3) が、前記抗体に結合する 2 次抗体発色酵素コンジュゲートを結合させて洗浄した後、前記発色酵素によって発色反応する基質を加えて前記発色を測定することによって行われることを特徴とする請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記発色酵素が、H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ)、G U S (- グルクロニダーゼ)、A P (アルカリホスファターゼ)、- G a l (- ガラクトシダーゼ) 及びビルシフェラーゼからなる群から選択されることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

工程 3) が、前記抗体に結合する 2 次抗体蛍光プローブコンジュゲートを結合させて洗浄した後に前記蛍光を測定することによって行われることを特徴とする請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記蛍光プローブが、6 - F A M、フルオレセイン、C y 3、C y 5 及びローダミンからなる群から選択されるいずれか一つであることを特徴とする請求項 19 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質固定用ペプチドハイブリッドを用いたタンパク質単分子膜の製造方法に関するもので、詳細には、特定タンパク質に親和性を有して結合するオリゴペプチドに P E G リンカー及び適切な反応基を導入して溶解度を改善し、固体基板の間に十分な空間を提供することで多様な固体基板に特定タンパク質が効果的に結合するように製造されたタンパク質固定用ペプチドハイブリッドに関するものである。

【背景技術】

【0002】

抗原抗体反応を用いた免疫センサー、タンパク質チップ、診断キットなどの応用分野で、抗体は大部分多様な無機性 (i n o r g a n i c) 固体物質表面に固定化された形態で使用される。抗体固有の結合特性及び活性を損なわずに抗体の抗原結合部位が表面によく露出するように、配向性を調節しながら多様な固体基板に抗体を単分子膜形態で固定化させる技術は、チップやセンサーの検出感度と直接的に関連するので非常に重要である。

【0003】

現在まで固体基質表面に抗体を固定させる方法は、物理的吸着またはタンパク質の共有結合に依存している。しかし、このような方法で抗体を固定すると、たびたびタンパク質の変性、無作為的な配向性 (O r i e n t a t i o n)、抗体の無作為的な化学的修飾等によって抗原との結合力が減少するという問題が発生する。

【0004】

このような問題点を克服するために、抗体と特異的に結合する微生物由来の抗体結合タンパク質 (プロテイン A、プロテイン G、プロテイン A / G またはプロテイン L) を用いた抗体固定化技術が開発されてきた。前記タンパク質は、抗原抗体反応に関与しない抗体の特定部位に強く結合して、該当の抗体を固体基板に固定させることによって抗原のアプローチを容易にする。また、前記タンパク質と抗体との結合には別途の化学的修飾が必要ではないので、抗体の固有機能を害さないという長所がある。しかし、抗体結合タンパク質を固体基板に固定させる過程でタンパク質の配向性の調節が難しく、抗体の固定効率を最適化するのに問題があった。そこで最近では、遺伝子工学的な方法及び化学的方法で抗体結合タンパク質を改変することによって、前記問題を克服する研究に焦点が合わせられ

10

20

30

40

50

ている。

【0005】

このような抗体結合タンパク質を用いた抗体固定化方法は、物理的吸着に比べて色々な長所があることはあるが、これもタンパク質なので各種物理・化学的環境に対して敏感に反応して変性することが憂慮されるので、長期保存が難しいという問題がある。また、場合によって、タンパク質の特定部位に化学的修飾が必要な場合、所望する部位に特異的に反応させることがほとんど不可能であるという問題もある。このような問題点を克服できる方法として、固体基板に対する固定が容易で安定性が高い低分子物質を用いる抗体固定化方法の開発が切望されている。そこで、デンドリマー、鉄イオンまたはカリックスクラウン(calixcrown)誘導体等を用いた抗体固定化方法が開発されたが、前記の方法は、抗体に対する配向性調節及び選択性なしにすべての種類のタンパク質に同程度の結合を示し、結合力も非常に強くすることができないという短所がある。

10

【0006】

そこで、本発明者等は、既存の抗体結合タンパク質や抗体固定用低分子物質の短所を克服できる新しい形態のタンパク質固定用低分子物質を開発するために、広範囲の文献の調査を通じて、抗体分離用吸着材料及び抗体結合を通じて疾病治療目的に既に使用されている低分子物質を検索した。その中から、比較的選択的に免疫グロブリンG(IgG)に結合する3種類のペプチド分子を候補物質として選定した(DeLano WL等, Science, 2000年, 第287巻, p. 1279-1283; Yang H等, J Peptide Res, 2006年, 第66(Suppl.1)巻, p. 120-137; Fassina G等, J Mol Recognit, 1998年, 第11巻, p. 128-133)。前記ペプチドの化学構造改変を通じてタンパク質固定用ペプチドハイブリッドを完成した後、前記タンパク質固定用ペプチドハイブリッドによる免疫センサー、及び抗体チップ製造用固体基板での抗体及び抗原に対する結合能力を確認することで本発明を完成した。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、抗体固定時に発生する固体基板への非特異的な結合を減少させ、抗体の配向性を調節して均一な表面特性を有するバイオチップや免疫センサー開発に利用することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

前記目的を達成するために、本発明は、特定タンパク質に対する親和性を有する長さ7ないし17アミノ酸からなるオリゴペプチド及び前記オリゴペプチドに共有結合で連結されたPEGからなるタンパク質固定用ハイブリッドを提供する。

【0009】

また、本発明は、

- 1) カルボキシル基を含む固体基板のカルボキシル基を活性化させる工程と、
 - 2) 本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドを、工程1)のカルボキシル基が活性化した固体基板に付着させる表面処理工程と、
 - 3) 工程2)の表面処理された固体基板にタンパク質を結合させる工程と
- からなるタンパク質単分子膜の製造方法、及びそれによって製造された本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたタンパク質固定用基板を提供する。

40

【0010】

また、本発明は、本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理された固体基板に、前記ハイブリッドを媒介にして抗体が固定された免疫センサーを提供する。

【0011】

また、本発明は、前記免疫センサーに固定された抗体に試料を加えて、前記抗体と前記抗体に特異的に結合する抗原との間の抗原抗体反応を検出する工程を含む、抗原の検出方

50

法を提供する。

【0012】

同時に、本発明は、

1) 前記免疫センサーに固定された抗体に特異的に結合する抗原を加えた後、洗浄する工程と、

2) 工程1)の洗浄された免疫センサーに試料を加えた後、洗浄する工程と、

3) 前記抗体と抗原との間の抗原抗体反応を検出する工程と

を含む、試料中の抗体の検出方法を提供する。

【発明の効果】

【0013】

本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドは、多くの種類の固体表面上で抗体に配向性を付与して固定することだけではなく、抗体の由来またはサブタイプ別に異なる結合親和力を有して抗体を固定できるので、本発明のハイブリッドを用いた表面処理技術は、多様な免疫センサー及び免疫チップの製作に利用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドが固体基板に抗体を固定する原理を示した図である。

【図2】本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたデキストランCM-5 Auセンサーチップに、ヒト、ウサギ、マウス及びヤギ由来抗体及びBSAを適用させながら、表面プラズモン共鳴法によって結合程度を測定した結果を示した図：

a：構造式1のハイブリッドで表面処理されたチップでの結果、及び b：構造式2のハイブリッドで表面処理されたチップでの結果。

【図3】本発明の1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたデキストランCM-5 Auセンサーチップにヒト及びマウス由来抗体を適用させながら、表面プラズモン共鳴法によって結合程度を測定した結果を示した図： a：ヒト由来抗体HIgG1、HIgG2、HIgG3を適用させながら表面プラズモン共鳴法によって結合程度を測定した結果、及び b：マウス由来抗体MIgGA、MIgG1、MIgG2、MIgG3を適用させながら表面プラズモン共鳴法によって結合程度を測定した結果。

【図4】本発明の1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドとヒト、ウサギ、マウス及びヤギ由来抗体と間の結合親和力を示した図： a：本発明の1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたデキストランCM-5 Auセンサーチップに、ヒトIgG1 (anti CRP) 抗体を100nM、250nM、500nM及び1,000nMの濃度で適用させながら、表面プラズモン共鳴法によって結合程度を測定した結果、及び b：本発明の1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドとHIgG1、ウサギIgG、MIgG3抗体の結合親和力。

【図5】本発明の1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたデキストランCM-5 Auセンサーチップに固定された抗体の抗原結合程度を測定した結果を示した図である。

【図6】1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたチップ上に固定された抗CRP抗体チップ(ペプチドハイブリッド-抗-CRP)と、化学的方法に固定された抗-CRP抗体チップ(化学的抗-CRP)との抗原抗体結合力を比べた図である。

【図7】1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理された磁性微細粒子にヒト、マウス、ヤギ及びウサギ由来抗体を適用させた後、結合程度をPAGEで分析した結果を示した図である。

【図8】1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたガラス板に、ヒト、マウス、ヤギ及びウサギ由来抗体を適用させた後、結合程度をPAGEで分析した結果を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

10

20

30

40

50

以下、本発明を詳しく説明する。

【0016】

本発明は、特定タンパク質に対する親和性を有する長さ7ないし17アミノ酸からなるオリゴペプチド及び前記オリゴペプチドに共有結合で連結されたPEGからなるタンパク質固定用ハイブリッドを提供する。

【0017】

前記タンパク質は、当業者が所望するすべてのタンパク質が許容され、特に、医療、研究用及び産業用タンパク質、例えば、抗原、抗体、細胞受容体、酵素、構造タンパク質、血清、細胞タンパク質からなる群から選択される生物学的活性を有する多様なタンパク質を挙げることができ、抗体であることが好ましい。前記タンパク質が抗体の場合、前記オリゴペプチドは抗体のFcに対する親和性を有するものである。

10

【0018】

本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドは、多くの種類の固体表面上に前記タンパク質を配向性を有して固定するために、長さ7ないし17アミノ酸からなるものであり得、長さ13ないし17アミノ酸からなるものであることが好ましい。また、前記ペプチドは、構造式1ないし3で表わされるペプチドハイブリッドの部分構造として含まれる配列番号1ないし5及び構造式4からなる群から選択されるアミノ酸配列（配列番号1：DDDC*AWHLGELVWC*T；配列番号2：DEDC*AWHLGELVWC*T；配列番号3：EEDC*AWHLGELVWC*T；配列番号4：EDDC*AWHLGELVWC*T；構造式4：(RTY)₄K₂KG；配列番号5：GHWRGWVS，
C*：ジスルフィド結合）を有することができる（表1参照）。前記ペプチドは、ヒト免疫グロブリンGのFc部位と結合することが知られている（DeLano WL等，*Science*，2000年，第287巻，p.1279-1283；Yang H等，*J Peptide Res*，2006年，第66（Suppl.1）巻，p.120-137；Fassina G等，*J Mol Recognit*，1998年，第11巻，p.128-133）。

20

【0019】

構造式1



2

(n = 1 ~ 50；X = DD、DE、EEまたはED；C*：ジスルフィド結合；XDC*AWHLGELVWC*T；配列番号1ないし4；配列番号1：DDDC*AWHLGELVWC*T；配列番号2：DEDC*AWHLGELVWC*T；配列番号3：EEDC*AWHLGELVWC*T；配列番号4：EDDC*AWHLGELVWC*T)

30

【0020】

構造式2

H₂

(n = 1 ~ 50；(RTY)₄K₂KG：構造式4)

【0021】

構造式3



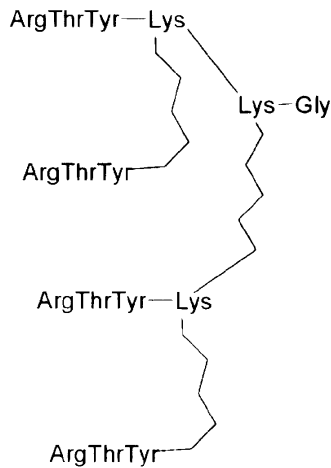
(n = 1 ~ 50；GHWRGWVS：配列番号5)

40

【0022】

構造式4

【化 1】



10

【0023】

前記 PEG (ポリエチレングリコール) は、分子量が 60 ないし 3000 であることが好ましい。PEG を導入するように設計されたペプチドハイブリッドは、水を用いた緩衝溶液でのハイブリッドの溶解度を改善して、配列番号 1 ないし 5 及び構造式 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドと固体基板との間に十分な空間を提供することにより、抗体が効果的に結合できる空間を提供できる (図 1 参照)。

20

【0024】

本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドは、多様な化学的修飾が可能であり、好ましくは表 1 の配列番号 1 ないし 5 及び構造式 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを含む構造式 1 ないし 3 で表わされるタンパク質固定用ペプチドハイブリッドであり得、最も好ましくは配列番号 4 のアミノ酸配列を有するペプチドを含む構造式 1 a で表わされるタンパク質固定用ペプチドハイブリッドである。

【0025】

構造式 1 a



30

(C* : ジスルフィド結合 ; EDDC*AWHLGELVWC*T : 配列番号 4)

【0026】

前記化学的修飾は、光反応性機能グループや、チオール特異性機能グループ (マレイミドなど)、ピオチン、NTA (ニトリロ三酢酸)、IDA (イミノ二酢酸)、マルトースまたは特定反応性機能グループ (ジエン、ジエノフィル) などを含むディールス・アルダー反応基質によって多様に可能である。本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドは、前記化学的修飾を通じてタンパク質の付加結合または特定生理活性物質のコンジュゲーションなどに利用でき、このような修飾は、以後に抗体治療剤開発に適用されて特定化合物、生理活性ペプチド及びタンパク質のような治療物質や放射性アイソトープを癌細胞のような所望する部位に運ぶのに、非常に有用に用いることができる。また、本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドは、前記タンパク質が抗体の場合、本発明の好ましい実施例で抗体の由来またはサブタイプ別に異なる結合程度を有して抗体を固定できる。構造式 1 で表わされたタンパク質固定用ペプチドの場合、ヒト及びウサギ由来抗体と強く結合でき (図 2 a 参照)、特に構造式 1 a で表わされるタンパク質固定用ペプチドの場合、ヒト由来 HIgG1 ($K_d = 85 \text{ nM}$) 及び HIgG2 並びにウサギ由来の IgG ($K_d = 305 \text{ nM}$) と強く結合できる (図 3 及び図 4 参照)。

40

【0027】

また、本発明は、

- 1) カルボキシル基を含む固体基板のカルボキシル基を活性化させる工程と、
- 2) 本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドを工程 1) の固体基板に付着させ

50

る表面処理工程と、

3) 工程2)の表面処理された固体基板にタンパク質を結合させる工程とからなるタンパク質単分子膜の製造方法、及びそれによって製造された本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたタンパク質固定用基板を提供する。

【0028】

前記固体基板は、CM-5 Auセンサーチップ、磁性微細粒子、ガラス板、金ナノ粒子、PLGAなど生分解性有機高分子ナノ粒子または各種(マイクロ)ウェルプレート(micro well plate)からなる群から選択されるいずれか一つであり得る。前記固体基板は、カルボキシル基を有することを特徴とするが、前記カルボキシル基を活性化させると、本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドの末端アミノ基と反応して前記ハイブリッドを固定できる。本発明の表面処理によって固体基板は、配向性が調節されるようにタンパク質を結合させることができ、固体基板表面の均一性を増加させることができる。本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドを用いたタンパク質単分子膜の製造方法は、前記タンパク質が抗体の場合、既存の抗体結合タンパク質(プロテインA、プロテインG、プロテインA/GまたはプロテインL)を用いた方法と比較して、物理的・化学的に安定して、多様な化学的修飾が可能でその用途が非常に広範囲であるだけでなく、既存の低分子化合物を用いた方法と比較しても、抗体に対する非常に高い選択性と結合力を示すことをその特徴とする。

10

【0029】

前記ハイブリッドは、好ましくは表1の配列番号1ないし5及び構造式4からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを含む構造式1ないし3で表わされたタンパク質固定用ペプチドハイブリッドであり得、最も好ましくは配列番号4のアミノ酸配列を有するペプチドを含む構造式1aで表わされたタンパク質固定用ペプチドハイブリッドである。

20

【0030】

前記抗体は、ヒト、ウサギ、マウスまたはヤギ由来免疫グロブリンGであり得、構造式1aで表わされるタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理される場合、抗体は、ヒト由来またはウサギ由来免疫グロブリンGであることが好ましい。

【0031】

本発明の方法で表面処理された多様な固体基板は、多様な抗体を固定化できる。本発明の方法で1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドを用いて表面処理されたCM-5 Auセンサーチップ(図2ないし図6参照)、磁性微細粒子(図7参照)及びガラス板(図8参照)に共通して、ヒト由来及びウサギ由来のIgGが効果的に固定化され、マウス及びヤギ由来のIgGはよく結合しないことを確認した。また、本発明の方法は、微細粒子を基盤とするバイオセンサーの構築にも利用でき、ガラス板表面処理後、室温で数ヶ月保管後にも、よく維持された抗体結合能力を有し得ることが立証された。

30

【0032】

また、本発明は、本発明のタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理された固体基板に、前記ハイブリッドを媒介にして抗体が固定された免疫センサーを提供する。

【0033】

本発明の1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたチップ上に抗CRP抗体を固定した後、抗原であるCRPを流しながら、抗原抗体結合程度を表面プラズモン共鳴法(SPR)によって測定した結果、抗-CRP抗体が抗原であるCRPと結合することを確認した(図5参照)。また、ペプチドで処理したチップ表面が非常に安定しているので、20mM NaOHで表面を洗浄してペプチド部分を再生した後、再び抗体と抗原の結合に用いても、抗体結合能力に大きな影響を与えないことを観察した。

40

【0034】

1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたチップ上に固定された抗-CRP抗体チップと、化学的方法でチップ上に固定された抗-CRP抗体チップの抗原抗体結合力とを比較した結果、1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理さ

50

れたチップ上に固定された抗 - C R P 抗体チップが、化学的方法で固定された抗 - C R P 抗体チップよりも、約 1 . 6 倍さらに効果的に C R P と結合することを確認した (図 6 参照) 。

【 0 0 3 5 】

また、本発明は、前記免疫センサーに固定された抗体に試料を加えて、前記抗体と前記抗体に特異的に結合する抗原との間の抗原抗体反応を検出する工程を含む、抗原の検出方法を提供する。

【 0 0 3 6 】

前記免疫センサーは、カルボキシル基が活性化した固体基板をタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理した後、検出しようとする抗原に特異的な抗体を固定化させることによつて得られる。

【 0 0 3 7 】

前記抗原抗体反応検出は、S P R、酵素免疫分析、蛍光プローブを用いた蛍光分析法によつて行なうことができる。前記抗原に特異的に結合する抗体発色酵素コンジュゲートを結合させて洗浄した後、前記発色酵素によつて発色反応する基質を加えた後、前記発色を測定することで行なうことができる。前記発色酵素は、H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ)、G U S (- グルクロニダーゼ)、A P (アルカリホスファターゼ)、- G a l (- ガラクトシダーゼ) 及びルシフェラーゼからなる群から選択できるが、これらに限定されない。また、前記抗原に特異的に結合する抗体蛍光プローブコンジュゲートを結合させて洗浄した後、前記蛍光を測定することによつて行なうことができる。前記蛍光プローブは、6 - F A M、フルオレセイン (F l u o r e s c e i n)、C y 3、C y 5 及びローダミン (R h o d a m i n e) からなる群から選択されるいずれか一つであり得るが、これらに限定されない。

【 0 0 3 8 】

前記抗原抗体反応の検出は、前記免疫センサーの固体基板の種類によつて変化し得る。すなわち、前記固体基板が C M - 5 A u センサーチップの場合、前記免疫センサーに抗原を一定速度で注入しながら表面プラズモン共鳴法によつて抗原抗体結合の程度を測定できる。また、前記固体基板が磁性微細粒子の場合、前記磁性微細粒子自体を緩衝溶液でボイルした後、P A G E 法で確認した (図 7 参照)。同時に、前記固体基板がガラス板の場合、抗体蛍光プローブコンジュゲートをペプチド表面に処理することにより、抗体からの蛍光を測定して確認した (図 8 参照)。

【 0 0 3 9 】

同時に、本発明は、

1) 前記免疫センサーに固定された抗体に特異的に結合する抗原を加えた後に洗浄する工程と、

2) 工程 1) の洗浄された免疫センサーに試料を加えた後、洗浄する工程と、

3) 前記抗体と抗原との間の抗原抗体反応を検出する工程とを含む、試料中の抗体の検出方法を提供する。

【 0 0 4 0 】

前記工程 3) の抗原抗体反応検出は、S P R、酵素免疫分析、蛍光プローブを用いた蛍光分析法によつて行うことができる。工程 3) は、前記抗体に結合する 2 次抗体発色酵素コンジュゲートを結合させて洗浄した後、前記発色酵素によつて発色反応する基質を加えた後、前記発色を測定することにより行うことができる。前記発色酵素は、H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ)、G U S (- グルクロニダーゼ)、A P (アルカリホスファターゼ)、- G a l (- ガラクトシダーゼ) 及びルシフェラーゼからなる群から選択できるが、これらに限定されない。また工程 3) は、前記抗体に結合する 2 次抗体蛍光プローブコンジュゲートを結合させて洗浄した後、前記蛍光を測定することによつて行うことができる。前記蛍光プローブは、6 - F A M、フルオレセイン、C y 3、C y 5 及びローダミンからなる群から選択されるいずれか一つであり得るが、これらに限定されない。

。

10

20

30

40

50

【0041】

以下、本発明を実施例によって詳しく説明する。

【0042】

但し、下記実施例は、本発明を例示するだけのものであって、本発明の内容が下記実施例に限定されるのではない。

【0043】

<実施例1> ペプチドハイブリッドの製造

本発明者等は、表1の配列番号1ないし5及び構造式4からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを含む構造式1ないし3で表わされるペプチドハイブリッドからタンパク質固定用ペプチドハイブリッドを製造した。

10

【0044】

下記表1の配列番号1ないし5及び構造式4からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを含む構造式1ないし3で表わされるペプチドハイブリッドの部分構造に含まれている配列番号1ないし5及び構造式4からなる群から選択されるアミノ酸配列(配列番号1：DDDC*AWHLGELVWC*T；配列番号2：DEDC*AWHLGELVWC*T；配列番号3：EEDC*AWHLGELVWC*T；配列番号4：EDDC*AWHLGELVWC*T；構造式4：(RTY)₄K₂KG；配列番号5：GHWRGWVS，C*：ジスルフィド結合)を有するペプチドは、ヒト免疫グロブリンGのFc部位と結合することが知られている(DeLano WL等，Science，2000年，第287巻，p.1279-1283；Yang H等，J Peptide Res，2006年，第66(Suppl.1)巻，p.120-137；Fassinag等，J Mol Recognit，1998年，第11巻，p.128-133)。水を用いた緩衝溶液でのハイブリッドの溶解度を改善して、配列番号1ないし5及び構造式4からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドと固体基板との間に十分な空間を提供することによって抗体が効果的に結合するようにするために、前記ハイブリッドにPEG(ポリエチレングリコール)を導入するように設計した。設計されたペプチドハイブリッドは、固相合成法で合成され、HPLC分析の結果、97%の純度に精製された製品をBioFuture(韓国)から購入して、MALDI-TOF質量分析を通じてその構造を確認した。

20

【0045】

<構造式1>



2

(n=1~50；X=DD、DE、EEまたはED；C*：ジスルフィド結合；XDC*AWHLGELVWC*T：配列番号1ないし4；配列番号1：DDDC*AWHLGELVWC*T；配列番号2：DEDC*AWHLGELVWC*T；配列番号3：EEDC*AWHLGELVWC*T；配列番号4：EDDC*AWHLGELVWC*T)

30

【0046】

<構造式1a>

H₂

(C*：ジスルフィド結合；配列番号4：EEDC*AWHLGELVWC*T)

40

【0047】

<構造式2>

H₂

(n=1~50；(RTY)₄K₂KG：構造式4)

【0048】

<構造式3>



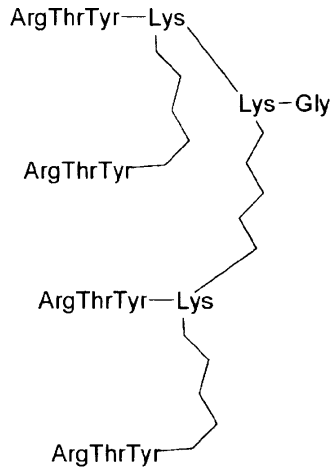
50

(n = 1 ~ 5 0 ; G H W R G W V S : 配列番号 5)

【 0 0 4 9 】

< 構造式 4 >

【 化 2 】



10

【 0 0 5 0 】

【 表 1 】

タンパク質固定用ペプチドハイブリッド

20

番号	構造式	備考	アミノ酸配列
1	$H_2N(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2COXDC*AWHLGELVWC* T-CONH_2$	配列番号 1	<u>DDDC*AW</u> HLGELVW C*T
		配列番号 2	<u>DEDC*AW</u> HLGELVW C*T
		配列番号 3	<u>EEDC*AW</u> HLGELVW C*T
1 a	$H_2N(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2COEDDC*AWHLGELVWC* T-CONH_2$	配列番号 4	<u>EDDC*AW</u> HLGELVW C*T
2	$\frac{(RTY)_{-1}K_2KGNHCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nOCH_2CH_2O-Cys-NH_2}{}$	構造式 4	<u>(RTY)_{-1}K_2</u> <u>KG</u>
3	$H_2NGHWRGWVS-NH(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2CO-Cys-NH_2$	配列番号 5	<u>GHWRGWV</u> <u>S</u>

30

40

C* : ジスルフィド結合

【 0 0 5 1 】

< 実施例 2 > 抗体試料及び試薬の準備

ヒト (H I g G 1、H I g G 2、H I g G 3)、ウサギ、マウス (M I g G A、M I g G 1、M I g G 2、M I g G 3)、ヤギなど多様な由来及び異なるアイソタイプ (i s o t y p e) を有する様々な免疫グロブリン G と、抗体固定に用いた (3 - アミノプロピル) トリエトキシシラン (A P T S)、N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) 及び 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (E D C)、2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸 (M E S)、エタノールアミン、無水コハク酸 - D M F など

50

の溶液は、シグマアルドリッチ (Sigma - Aldrich、米国) から購入した。C - 反応性タンパク質 (CRP) 及びウサギ抗 - CRP 抗体は、Calbiochem (米国) から購入し、抗体標識に用いた Cy3 - モノ NHS エステルは、GEヘルスケア (GE Healthcare、韓国) から購入した。表面プラズモン共鳴の測定のための CM - 5 Au センサーチップは、Biacore AB (スウェーデン) から、磁性微細粒子 (Dynabeads MyOne™ カルボン酸) は、DYNAL (米国) から、ガラス板はコーニング (Corning、韓国) から購入した。

【0052】

<実施例3> デキストランチップ上に配向性固定されたタンパク質固定用ペプチドハイブリッドの抗体結合力

10

<3 - 1> タンパク質固定用ペプチドハイブリッドの配向性固定化

表面にカルボキシル基を有する固体基板に実施例1で得たタンパク質固定用ペプチドハイブリッドを固定化した。

【0053】

デキストラン CM - 5 Au センサーチップ (Biacore AB、スウェーデン) 上に、0.2 M EDC と 0.05 M NHS とを混合した PBS 緩衝溶液を 7 μ l / 分の速度で流して、センサーチップ表面のカルボキシル基を活性化させた。続いて、100 μ M のペプチドハイブリッドを含む PBS 緩衝液を同一速度で 30 分間流した。前記ペプチドハイブリッドは、NHS エステル形態で活性化したセンサーチップ上で末端アミノ基の反応を通じて結合した。最後に、前記ペプチドハイブリッドと反応しない未反応表面を、pH 8.5、1 M エタノールアミノ溶液を用いて不活性化させた。

20

【0054】

<3 - 2> 抗体結合力の測定

実施例3 - 1の方法で得たタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたチップと実施例2の抗体とを結合させた。

【0055】

実施例2の多様な動物細胞由来抗体または対照群のBSAを5 μ g / mlの濃度でPBS緩衝溶液に含むように製作された抗体溶液及び対照群を、10 μ l / 分の速度で実施例3 - 1のチップ表面のペプチドハイブリッドと結合させて、結合程度をBiacore 3000機器を用いて表面プラズモン共鳴法 (SPR) によって測定した。

30

【0056】

その結果、構造式1で表わされるタンパク質固定用ペプチドハイブリッドは、多様な種類の抗体と強く結合することを示したが (図2a)、構造式2ないし3で表わされたタンパク質固定用ペプチドハイブリッドは、200 RU以下の低い反応値を示した (図2b)。

【0057】

特に、構造式1a (構造式1で、n = 2、X = ED) で表わされたハイブリッド (以下、1a) 処理の場合、ヒト由来 IgG (HIgG1ないし3の混合組成物) 及びウサギ由来のIgGは、ほとんど飽和状態 (12000 RU) で結合することが示された。しかし、前記1aは、マウス (MIgG1ないし3の混合組成物) 及びヤギ由来の抗体とは微量のみ結合して、抗体ではない他のタンパク質であるウシ血清アルブミン (BSA) とは結合しないことが確認された (図2a)。

40

【0058】

さらに、ヒト由来のHIgG1及びHIgG2は、1aで表面処理されたチップ上に効果的に結合する一方で、HIgG3の場合は、微量のみが結合することを確認した (図3a)。一方、マウス由来の抗体では、MIgG3はある程度結合するが、MIgGA、MIgG1及びMIgG2は、ほとんど結合しなかった (図3b)。

【0059】

<3 - 3> 1aの結合親和度測定

実施例3 - 1ないし3 - 2で抗体結合力が確認された1aと抗体の間の結合親和力を測

50

定した。

【0060】

実施例3-1の1aが表面処理されたチップ上に実施例3-2の方法でH I g G 1、ウサギI g G、M I g G 3抗体を、100 nM、250 nM、500 nM及び1,000 nMの濃度で含む抗体溶液を、10 μ l / 分の速度で実施例3-1のチップ表面のペプチドハイブリッドと結合させて、結合程度をB i a c o r e 3000機器を用いて表面プラズモン共鳴法(S P R)によって測定した。

【0061】

その結果、点線で表記したS P Rセンサーグラム実験値を得た。前記実験値は、B i a c o r e 3000に内蔵されたB I A e v a l u a t i o n s o f t w a r eを用いて非線形回帰法(n o n l i n e a r r e g r e s s i o n)で分析し、実線で表記した理論的グラフを得た(図4a)。前記理論的グラフから図4bに提示された動力学定数を得ることができ、それぞれの点線と該当の実線がよく一致することから、計算結果が正確であることが分かった。

10

【0062】

また、1aがヒト由来のH I g G 1と強力に結合して($K_d = 85$ nM)、ウサギ由来のI g Gとは多少低い結合親和力を有することを確認した($K_d = 305$ nM)(図4b)。すなわち、1aハイブリッドを利用すると、抗体を由来またはアイソタイプ別に結合程度を異なるように調節してチップ表面に固定できることを確認した。

【0063】

<実施例4> 1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドによって固定された抗体の抗原結合力

20

1aハイブリッドによって固定された抗体の抗原結合力を測定した。

【0064】

<4-1> 抗原抗体結合確認

実施例3-1の方法で得た1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたチップ上に、ウサギ抗-C R P抗体を5 μ g / m lの濃度で含むP B S緩衝溶液を、10 μ l / 分の速度で流しながら固定した後、同一濃度のC R Pを含むP B S緩衝溶液を流しながら、抗原抗体結合程度をB i a c o r e 3000機器を用いて表面プラズモン共鳴法(S P R)によって測定した。20 m M N a O H溶液を用いてチップ表面を再生させて、抗原抗体結合測定実験を繰り返した。

30

【0065】

その結果、抗-C R P抗体が抗原であるC R Pとよく結合することを確認した(図5)。また、ペプチドで処理したチップ表面が非常に安定しているので、20 m M N a O Hで表面を洗浄してペプチド部分を再生した後、再び抗体と抗原の結合に用いても抗体結合能力に大きく影響を与えないことを確認した。

【0066】

<4-2> 配向性調節に対する抗原抗体結合

デキストランC M - 5 A uセンサーチップ(B i a c o r e A B、スウェーデン)上に、0.2 M E D Cと0.05 M N H Sとを混合した緩衝溶液を7 μ l / 分の速度で流して、センサーチップ表面のカルボキシル基を活性化させた。続いて、5 μ g / m lの抗-C R P抗体を含むP B S緩衝液を同一速度で30分間流した。前記抗体は、N H Sエステル形態で活性化したセンサーチップの上で、末端アミノ基の反応を通じて結合した。最後に、前記抗体と反応しない未反応表面を、p H 8.5、1 Mエタノールアミン溶液を用いて不活性化させた。

40

【0067】

前記方法で得た化学的方法で固定された抗-C R P抗体チップと、実施例3-1の方法で得た1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたチップ上に固定された抗-C R P抗体チップに、5 μ g / m lの抗原であるC R Pを含むP B S緩衝溶液を10 μ l / 分の速度で流しながら、抗原抗体結合程度をB i a c o r e 3000機器を用

50

いて表面プラズモン共鳴法 (S P R) によって測定した。

【 0 0 6 8 】

その結果、 1 a タンパク質固定用ペプチドハイブリッドで表面処理されたチップ上に固定された抗 - C R P 抗体チップが、化学的方法で固定された抗 - C R P 抗体チップと比較して、 C R P と約 1 . 6 倍さらに効果的に結合した (図 6) 。

【 0 0 6 9 】

< 実施例 5 > 磁性微細粒子に配向性固定された 1 a タンパク質固定用ペプチドハイブリッドの抗体結合力

< 5 - 1 > 1 a タンパク質固定用ペプチドハイブリッドの配向性固定化

表面にカルボキシル基を有する磁性微細粒子に、実施例 1 で得て実施例 3 によって抗体結合力が確認された 1 a タンパク質固定用ペプチドハイブリッドを固定化した。

【 0 0 7 0 】

カルボキシル基を有する磁性微細粒子に、 N H S (0 . 4 M) 、 E D C (0 . 2 M) を含む p H 6 、 2 5 m M M E S 緩衝溶液を適用して表面を活性化した。磁石を用いて磁性微細粒子のみを回収し、活性化した磁性微細粒子を 0 . 2 m g / m l 濃度の 1 a タンパク質固定用ペプチドハイブリッドと室温で 1 時間反応させた。対照群には、活性化した磁性微細粒子と P B S のみを反応させた。未反応の活性エステル基は、 p H 8 . 5 、 1 M エタノールアミンを用いて不活性化させた。 1 a が付かない磁性微細粒子及び 1 a が導入された磁性微細粒子は、 P B S を用いて反覆洗浄した後、最終濃度が 5 m g / m l になるように P B S 緩衝溶液に希釈した。

【 0 0 7 1 】

< 5 - 2 > 抗体結合力の測定

1 a が導入された磁性微細粒子と抗体との結合を確認するために、磁性微細粒子の最終濃度は 2 m g / m l 、実施例 3 - 2 で用いたもの同一の抗体は 0 . 1 m g / m l になるように混合した後、結合を誘導した。室温で 1 時間反応させた後、磁石を用いて磁性微細粒子を容器の底に引き寄せながら上澄み液を除去した後、再び緩衝液で 5 回反覆希釈して、反応しない抗体をすべて除去した。続いて、抗体を含んだ磁性微細粒子を、還元剤 (2 - メルカプトエタノール) を含む P A G E サンプル緩衝液 (l o a d i n g b u f f e r) に入れて加熱し、抗体鎖を微細粒子で分離させた後、 P A G E で分析した。

【 0 0 7 2 】

磁性微細粒子に結合した抗体の量は、 1 0 % S D S を含む 1 2 % ポリアクリルアミドゲルを用いて分析した。 2 % 微細粒子 P B S 緩衝液、各 2 0 μ l を 5 μ l のサンプル緩衝液 (p H 6 . 8 ; 6 0 m M T r i s - H C l 、 2 5 % グリセロール、 2 % S D S 、 1 4 . 4 m M 2 - メルカプトエタノール、 0 . 1 % プロモフェノールブルー、 H ₂ O) と混合した後、 9 0 で 1 0 分間加熱後、 1 5 μ l のサンプルを取ってポリアクリルアミドゲル上の各ウェル (w e l l) に移した。常温で一時間 2 0 0 V の一定電圧を加えてサンプルを移動させた後、ゲルを染色溶液 (0 . 5 % クーマシーブルー、 4 5 % メタノール、 1 0 % 酢酸水溶性溶液) に浸して、常温で 3 0 分間染色した後、脱色溶液 (1 0 % メタノール、 1 0 % 酢酸水溶性溶液) に移して、常温で 3 時間ゆっくり振盪して過量の染色試薬を洗浄、除去した。

【 0 0 7 3 】

その結果、 P B S で反覆洗浄後にも、 1 a 抗体結合用ペプチドハイブリッドで表面処理された磁性微細粒子に結合した抗体が結合していることを確認した (図 7) 。また、実施例 3 の結果と同様に、前記 1 a が導入された磁性微細粒子は、ヒト由来の H I g G 及びウサギ由来の I g G に効果的に結合するが、マウス及びヤギ由来の I g G とはよく結合しないことを確認した。

【 0 0 7 4 】

< 実施例 6 > ガラス板に配向性固定された 1 a タンパク質固定用ペプチドハイブリッドの抗体結合力

1 a タンパク質固定用ペプチドハイブリッドの抗体結合力を測定した。

【0075】

< 6 - 1 > 1 a タンパク質固定用ペプチドハイブリッドの配向性固定化

ガラス板を95%の硫酸と5%の過酸化水素(容積比3:1)との混合溶液で60で30分間処理した後、蒸留水とエタノールで洗浄した。洗浄したガラス板を1%APTSに浸して、室温で4時間反応させてアミノ基を導入した。アミノ基が導入されたガラス板を1M無水コハク酸-DMF溶液中で37で4時間反応させて、ガラス板上にカルボキシル基を生成させた。ガラス板を蒸留水及びエタノールで洗浄して、窒素ガスを用いて乾燥した後、真空乾燥器に入れて保管した。カルボキシル基が導入されたガラス板を、0.1MEDCと0.025MNHSとの混合溶液で15分間処理して表面を活性化した。活性化したガラス板は、蒸留水で洗浄して窒素ガスで乾燥させた。1aタンパク質固定用ペプチドハイブリッド溶液の濃度が0.5mg/mlになるように、40%グリセロールを含むPBS緩衝溶液に溶解して、1μlずつをガラス板上に点滴して2時間反応させた。ガラス板に残っている未反応活性型のエステルは、pH8.5、1MEタノールアミンを用いて不活性化させ、PBS緩衝溶液で洗浄した。

10

【0076】

< 6 - 2 > 抗体結合力の測定

1aが導入されたガラス板と抗体との結合を、Cy3に標識された抗体を用いてその結合力を確認した。

【0077】

まず、HIgG(HIgG1ないしHIgG3の混合物)、MIgG(MIgG1ないしMIgG3の混合物)、ウサギIgG及びヤギIgGのPBS溶液(0.5mg/ml)各100μlに、3.34mMCy3-モノNHSエステル-DMF溶液5μlを加えて常温で30分間反応させた後、すぐにミニゲルカラム(PD-10 desalting column, Amersham-Bioscience, 米国)に通過させて過量の蛍光染料を除去して、タンパク質部分のみを取って次の実験に用いた。前記Cy3で標識された抗体を、0.01%ツイーン20と0.1μg/mlBSAとを含むPBS緩衝溶液で最終1g/mlの濃度になるように希釈した。

20

【0078】

1aが導入されたガラス板上に、前記Cy3で標識された抗体溶液を50μlずつ点滴して常温で1時間反応させた後、PBST、PBS及び蒸留水を用いて順番に洗浄して、窒素ガスを用いて乾燥した後、GenPix 4200(Axon, 米国)カメラを用いてガラス板に残っている蛍光イメージを観察した。

30

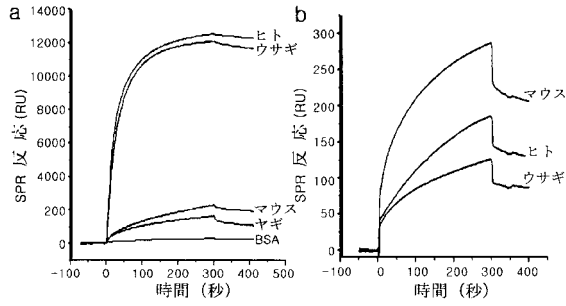
【0079】

その結果、1aが導入されたガラス板上にヒト及びウサギ由来の抗体がよく結合する一方で、マウス及びヤギ由来の抗体はよく結合しないことが分かった(図8)。

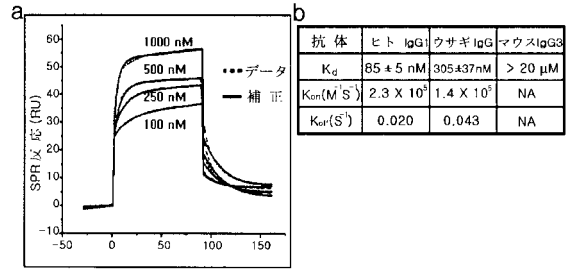
【0080】

また、1aが導入されたガラス板を室温で数ヶ月間保管した後にも、抗体と結合する能力が維持されたことから、前記表面処理が非常に安定した構造からなるものであることが分かった。

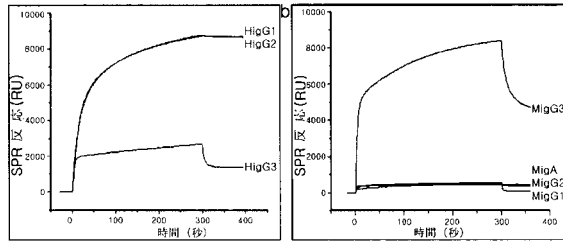
【 図 2 】



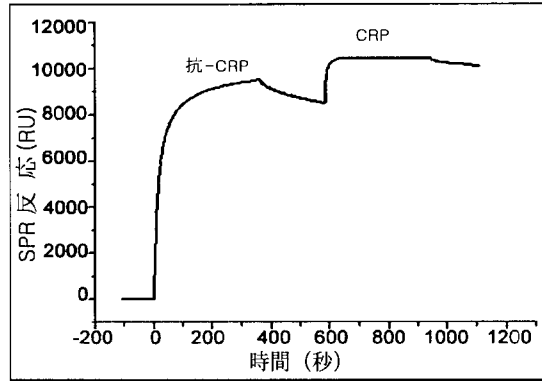
【 図 4 】



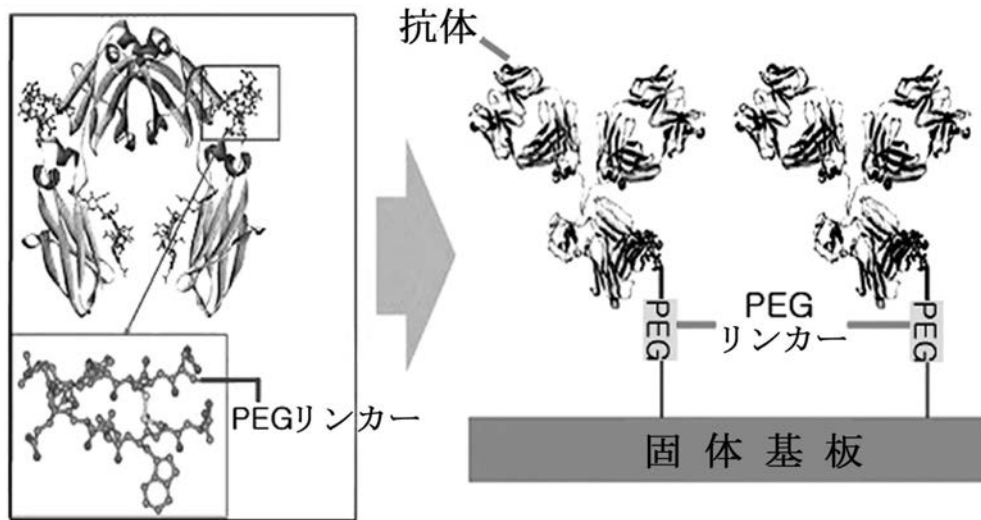
【 図 3 】



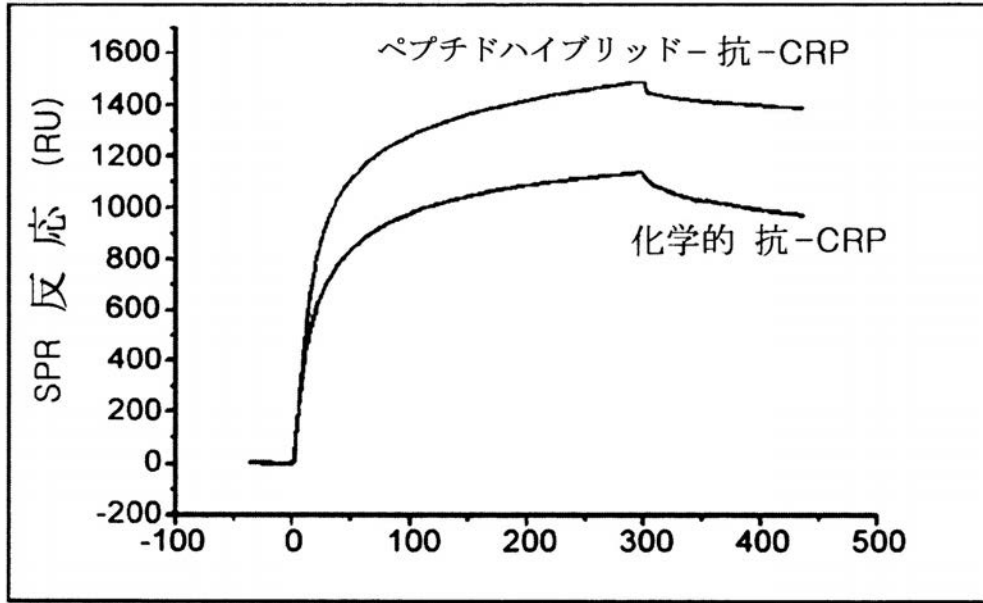
【 図 5 】



【 図 1 】

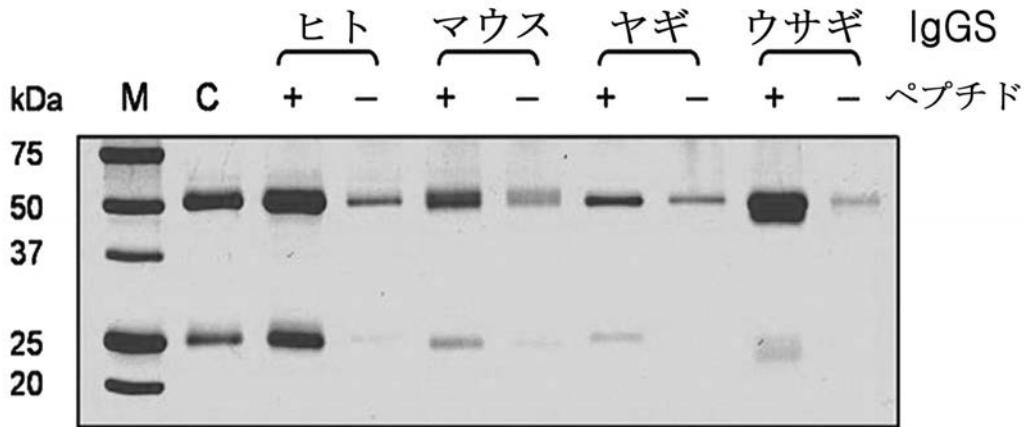


【図6】

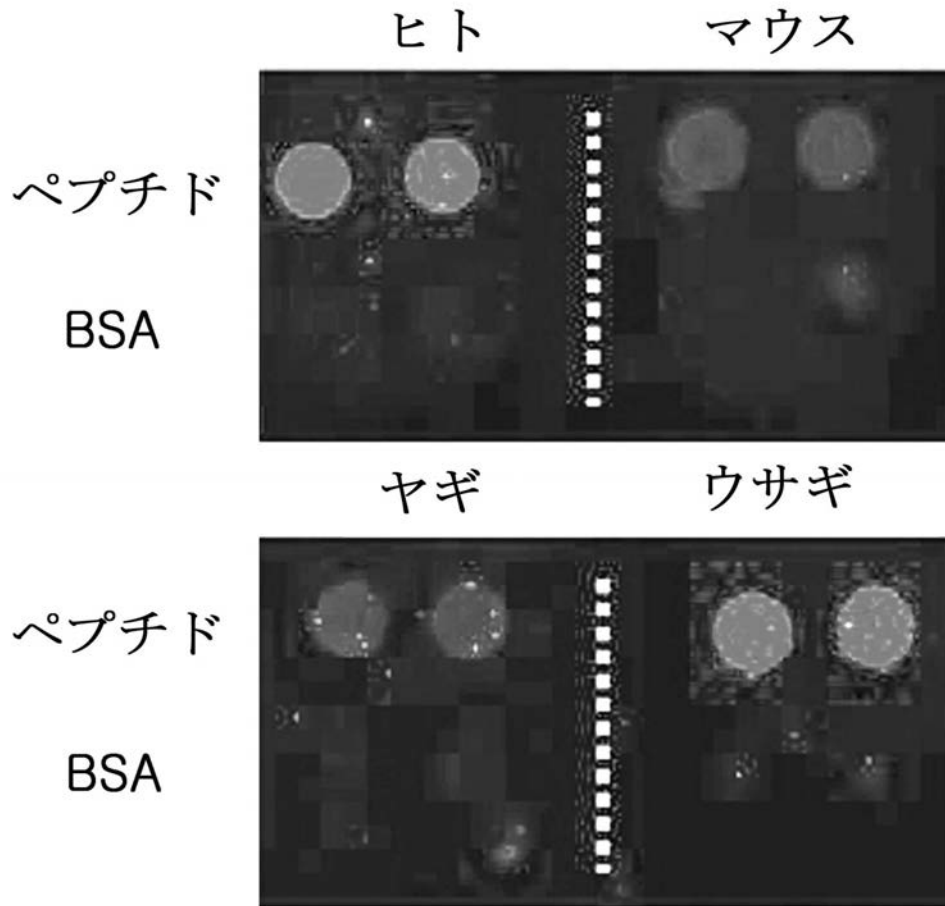


チップ表面	抗-CRP 固定化 (RU)	CRP 結合 (RU)	CRP/ 抗-CRP (相対的 固定化 効率)
ペプチド	7231	1382	0.191(1.57)
化学的	7936	967	0.122(1)

【図7】



【図8】



【配列表】

0005205465000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/533
G 0 1 N 33/543 5 4 5 A
- (72)発明者 チョン, ボン ヒョン
大韓民国、テジョン - シ 3 0 2 - 2 8 0、セオ - ク、ウォルピョン - ドン、ヌリ アパートメン
ト # 1 1 3 - 6 0 7
- (72)発明者 ジョン, ヨンウォン
大韓民国、テジョン - シ 3 0 5 - 8 0 4、ユサン - ク、シンサン - ドン 1 5 0 - 5、# 2 0 1
- (72)発明者 カン, ヒョ ジン
大韓民国、ギョンサンブク - ド 7 9 1 - 9 2 2、ポハン - シ、ブク - ク、チョンハ - ミョン、ド
クソン - リ 1 4 8 - 2
- (72)発明者 リ, ジョン ミン
大韓民国、テジョン - シ 3 0 2 - 2 8 0、セオ - ク、ウォルピョン - ドン、ハナロ アパートメ
ント # 1 0 1 - 6 0 4

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 Biosensors and Bioelectronics, 2 0 0 6 年, Vol.21, p.998-1006
Analytical Chemistry, 2 0 0 7 年 8 月, Vol.79, No.15, p.5878-5887
Journal of Peptide Research, 2 0 0 6 年, Vol.66, Suppl.1, p.120-137
Science, 2 0 0 0 年, Vol.287, p.1279-1283
Analytical Chemistry, 2 0 0 4 年, Vol.76, No.19, p.5713-5720

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C 1 2 M 1 / 0 0 3 / 1 0
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDreamII)
UniProt/GeneSeq
PubMed

专利名称(译)	使用肽杂合体制取向调节的抗体单分子膜的方法		
公开(公告)号	JP5205465B2	公开(公告)日	2013-06-05
申请号	JP2010527865	申请日	2007-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	韩国生命工学研究院		
申请(专利权)人(译)	韩国研究所生物科学和生物技术		
当前申请(专利权)人(译)	韩国研究所生物科学和生物技术		
[标]发明人	チヨンサンジョン チヨンボンヒヨン ジョンヨンウォン カンヒョジン リジョンミン		
发明人	チヨン,サン ジョン チヨン,ボン ヒヨン ジョン,ヨンウォン カン,ヒョ ジン リ,ジョン ミン		
IPC分类号	C07K7/00 C07K17/08 C12M1/34 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	C07K17/00 C07K7/02 C07K7/08 G01N33/54353 G01N33/54393		
FI分类号	C07K7/00.ZNA C07K17/08 C12M1/34.F G01N33/543.525.E G01N33/543.525.W G01N33/533 G01N33/543.545.A		
审查员(译)	福泽弘光		
优先权	1020070098852 2007-10-01 KR		
其他公开文献	JP2010540620A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种方法，用于使用肽杂化蛋白质固定化，特别是产生蛋白质的单层，导入PEG接头和与一个亲和力结合特定蛋白质的合适的反应性基团的寡肽以改善溶解性和固体基材之间提供足够的空间，特别是那些对蛋白质为产生有效结合蛋白固定肽杂合体各种固体基材。用于本发明不仅通过许多类型的固体赋予取向到抗体表面上，以固定抗体固定的蛋白质的固定肽混合有原点或同种型特异性抗体不同的结合亲和力使用本发明的混合物的表面处理技术可用于制造各种免疫传感器和免疫芯片。

