

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-503662

(P2019-503662A)

(43) 公表日 平成31年2月14日(2019.2.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/37 (2006.01)	C12Q 1/37 ZNA	4B063
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	4H045
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 D	
G01N 37/00 (2006.01)	G01N 37/00 I02	
C07K 7/08 (2006.01)	C07K 7/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2018-527724 (P2018-527724)
 (86) (22) 出願日 平成28年11月29日 (2016.11.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年6月26日 (2018.6.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/079123
 (87) 国際公開番号 W02017/093246
 (87) 国際公開日 平成29年6月8日 (2017.6.8)
 (31) 優先権主張番号 62/261,191
 (32) 優先日 平成27年11月30日 (2015.11.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチー4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100106208
 弁理士 宮前 徹
 (74) 代理人 100120112
 弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼ基質を同定するためのシステムおよび方法

(57) 【要約】

本開示は、プロテアーゼを、第1のアレイおよび第2のアレイのうちの1つと接触させるステップであって、各アレイが、複数の同一の特徴を有し、各特徴が、固体支持体に結びついた少なくとも1つの配列を含む、ステップを含む、プロテアーゼに対する基質を同定する方法を提供する。少なくとも1つの配列は、レポーターに結びついたプロテアーゼ基質候補を含む。本方法は、検出可能な要素をアレイのそれぞれと接触させて、検出可能な要素がレポーターに結合し、検出可能な要素が第1および第2のアレイ内のレポーターのそれぞれと結合したことに起因する第1および第2のシグナルを検出するのを可能にするステップをさらに含む。本方法は、第1のシグナルと第2のシグナルを比較して、第1のシグナルと第2のシグナルの差異を識別し、少なくとも1つのプロテアーゼ基質候補をプロテアーゼに対する基質として同定するステップをさらに含む。

【選択図】 図1

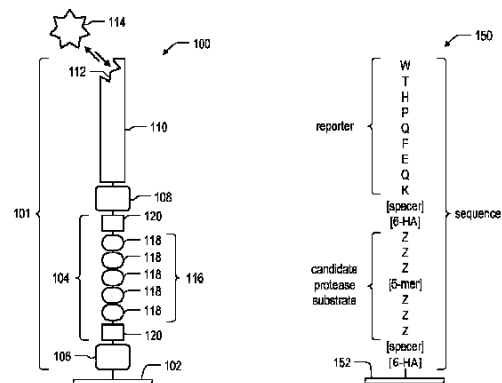


FIG. 1A

FIG. 1B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロテアーゼに対する基質を同定する方法であって、

a. プロテアーゼを、第 1 のアレイおよび第 2 のアレイのうちの 1 つと接触させるステップであって、第 1 のアレイおよび第 2 のアレイのそれぞれが、複数の特徴を有し、第 1 のアレイおよび第 2 のアレイが同一の複数の特徴を有し、各特徴が固体支持体と結びついた少なくとも 1 つの配列を含み、前記少なくとも 1 つの配列がレポーターと結びついたプロテアーゼ基質候補を含む、前記ステップ、

b. 検出可能な要素を第 1 のアレイおよび第 2 のアレイのそれぞれと接触させて、第 1 のアレイおよび第 2 のアレイのそれぞれの特徴において、前記検出可能な要素が前記少なくとも 1 つの配列内のレポーターに結合可能にするステップ、

c. 前記検出可能な要素が、第 1 のアレイのそれぞれの特徴において、前記少なくとも 1 つの配列内のレポーターに結合することに起因する第 1 のシグナル、および前記検出可能な要素が、第 2 のアレイのそれぞれの特徴において、前記少なくとも 1 つの配列内のレポーターに結合することに起因する第 2 のシグナルを検出するステップ、

d. 第 1 のアレイとの結合に起因する第 1 のシグナルと、第 2 のアレイとの結合に起因する第 2 のシグナルとを比較して、第 1 のシグナルと第 2 のシグナルとの差異を識別するステップ、および、

e. ステップ d) でプロテアーゼに対する基質として識別された特徴において、少なくとも 1 つのプロテアーゼ基質候補を同定するステップ、

を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記レポーターが、ペプチドエピトープであり、前記検出可能な要素が、前記ペプチドエピトープに対して特異的な抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記レポーターが、タンパク質に対するペプチドバインダーであり、前記検出可能な要素が、前記ペプチドバインダーが特異的に結合するタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記プロテアーゼ基質候補が、天然および非天然アミノ酸から選択されるコア配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記検出可能な要素が、ストレプトアビジンであり、前記ペプチドバインダーが、W T H P Q F E、D Y L A E Y H G G、Y E R P G W K L S、P A P A W A H G G、N S F D E W L Q K、W T H P Q F E Q K、A D Y L A E Y H G G、Y E R P G W K L G T、D P A P A W A H G G、および N S F D D W L A K G G からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記検出可能な要素が、蛍光基を含有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの配列が、式：

$$[R_1] - [L_1] - [Z_1] - [X_1] - [Z_2] - [L_2]$$

を有し、

式中、 R_1 はレポーターであり、 L_1 および L_2 はそれぞれスペーサーであり、 Z_1 および Z_2 は、0 から約 3 個のアミノ酸を有するペプチド配列からそれぞれ独立に選択され、 X_1 は、約 5 から約 15 個のアミノ酸の定義された配列を有するペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

配列番号 1 から配列番号 9 からなる群から選択される配列を含む、トロンピンプロテアーゼに対するペプチド基質。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

配列番号 10 から配列番号 28 からなる群から選択される配列を含む、マトリブターゼプロテアーゼに対するペプチド基質。

【請求項 10】

複数の特徴を含むプロテアーゼに対する基質を同定するためのペプチドマイクロアレイであって、各特徴が、固体支持体と結びついた少なくとも 1 つの配列を有し、前記配列が、プロテアーゼ基質候補ペプチドおよびレポーターペプチドを含むペプチドマイクロアレイ。

【請求項 11】

前記プロテアーゼ基質候補ペプチドおよび前記レポーターペプチドが、スペーサーを介して連結する、請求項 10 に記載のマイクロアレイ。

10

【請求項 12】

前記プロテアーゼ基質候補ペプチドが、5 から 15 個のアミノ酸を含む、請求項 10 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 13】

前記レポーターペプチドが、ストレプトアビジン結合配列である、請求項 10 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 14】

少なくとも 1 つの配列が、式：

$$[R_1] - [L_1] - [Z_1] - [X_1] - [Z_2] - [L_2]$$

20

を有し、

式中、 R_1 はレポーターペプチドであり、 L_1 および L_2 はそれぞれスペーサーであり、 Z_1 および Z_2 は、0 から約 3 個のアミノ酸を有するペプチド配列からそれぞれ独立に選択され、 X_1 は約または正確に 5 個から約または正確に 15 個のアミノ酸の定義された配列を有するペプチドである、

請求項 10 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 15】

プロテアーゼに対する基質を同定する方法であって、

a. プロテアーゼを、複数の特徴を有する第 1 のアレイと接触させるステップであって、各特徴が固体支持体に結びついた少なくとも 1 つの配列を含み、前記少なくとも 1 つの配列が、プロテアーゼ基質候補がタンパク質分解性の消化を受けた際に検出可能なシグナルを生成する能力を有する検出可能な要素に結びついた前記プロテアーゼ基質候補を含むステップと

30

b. 1 つまたは複数の特徴において、前記プロテアーゼ基質候補のタンパク質分解性の消化に起因するシグナルを検出するステップと、

c. シグナルが、前記プロテアーゼに対する基質としてステップ b) において検出されている特徴において、前記プロテアーゼ基質候補を同定するステップと、を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、プロテアーゼ酵素、より具体的には、ペプチドマイクロアレイを使用したプロテアーゼ基質の発見に関する。

【背景技術】

【0002】

タンパク質の翻訳後修飾 (PTM) は、細胞内および細胞外のシグナル伝達、異化、ならびにその他の酵素機能を含む様々な細胞のプロセスを制御する。PTM の例として、タンパク質分解、リン酸化、およびその他の化学修飾が挙げられる。PTM は、転写および翻訳よりも急速にタンパク質機能を改変することができるので、PTM は生物学的応答において重要な役割を果たしている。例えば、血液凝固、補体活性化、および卵母細胞の表

50

層反応は、タンパク質分解性の切断によるタンパク質活性化に関わる生物学的応答である。これまでに配列決定された複雑なゲノム内のタンパク質コーディング配列のうち、約2%がプロテアーゼをコードするものと見積もられている。このような酵素の基質特異性を理解すれば、生物学的経路の手がかりが得られる。さらに、所与のプロテアーゼに対する基質を同定すれば、クリニックおよびそれ以外において有望な用途を有し得る極めて特異性の高いプロテアーゼ阻害剤の創出が可能になる。

【0003】

また、プロテインキナーゼは、多くの細胞プロセスにおいても役割を果たしている。プロテインキナーゼは、修飾のため様々なアミノ酸を標的とする広くクラス分けされるタンパク質である（例えば、チロシン、ヒスチジン、およびセリン-トレオニンの各キナーゼ）。キナーゼにより標的とされるペプチド配列が同定されれば、臨床的に重要で、競合的であり、おそらくは不可逆的なキナーゼの阻害剤として役に立ち得る基質模倣化合物を設計する道が開ける。

10

【0004】

その他のPTM、例えばリン酸化、およびグリコシル化等とは異なり、タンパク質分解は、修飾されたタンパク質の富化を可能にする固有のケミカルハンドルを生成しない。すなわち、タンパク質分解は、その他のPTMの場合のように建設的であるのとは逆に破壊的である。したがって、プロテアーゼを同定するためのアプローチ、およびその基質レパートリーは、「デグラドミクス」と呼ばれる研究分野に発展した。現在のところ、プロテアーゼ基質を同定するためのいくつかの方法が存在する。このような方法として、一次元および二次元電気泳動、ならびにN末端同定法が挙げられる。これらの方法と関連したいくつかの欠点として、潜在的基質候補のライブラリーが大きいと、そのスクリーニングが不可能であること、検出に必要な化学修飾の収率が低いこと、バックグラウンドが高いこと、および偽陽性結果が生じることが挙げられる。プロテアーゼ基質を同定するための既存の方法は、極めて豊富なタンパク質分解生成物に引きずられて偏りが生ずること、および質量分析のマッチングに頼らざるを得ないことから制約を受ける。

20

【0005】

いくつかの方法は、天然源中に存在するプロテアーゼ基質の発見を目的とする。例えば、全細胞ライセートは、プロテアーゼを認識するための空間的レイアウトを構築するために、2-Dゲル電気泳動で処理され得る。Bredemeyer, A.らの、(2004年) *A proteomic approach to the discovery of protease substrates*, PNAS, 101巻: 11785頁を参照。その他の方法は、人工的基質と関係する。Harris, J.らの、(2000年) *Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries*, PNAS, 97巻: 7754号を参照。この方法は、固体支持体上で合成され、プロテアーゼ基質の複合混合物を作製するために溶液中に放出されるペプチドの開裂可能なライブラリーと関係する。プロテアーゼ基質は、宿主細胞の集団をプロテアーゼ発現プラスミド、および切断時に蛍光を発する能力を有する基質候補をコードするプラスミドのライブラリーと共に、*in vivo*で同時トランスフェクトすることによっても識別可能である。Kostallas G.らの、(2011年) *Substrate Profiling of Tobacco Etch Virus Protease Using a Novel Fluorescence-Assisted Whole-Cell Assay*, PLoS ONE, 6巻(1): e16136頁, doi: 10.1371/journal.pone.0016136. を参照。その他の方法は、プロテアーゼ基質の配列および構造的特徴を識別するためのサポートベクターマシン(SVM)アルゴリズムを利用する *in silico*での基質の探索と関係し、例えば、Barkan, D.らの、(2010年) *Predicting protease substrates using sequence and structure features*, Bioinforma

30

40

50

t i c s、26巻：1714頁)を参照。ただし、これまでに記載した通り、プロテアーゼ基質を同定するための上記方法は、スループットが低く、時間がかかり、一般的に非効率的であるおそれがある。

【0006】

したがって、プロテアーゼ基質の同定および成熟のための改善した方法およびシステムに対する必要性が存在する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、プロテアーゼ基質を同定するためのシステムおよび方法を提供することにより、上記欠点を克服する。

10

本開示の1つの実施形態に基づき、プロテアーゼに対する基質を同定する方法は、以下のステップを含む：a)プロテアーゼを、第1のアレイおよび第2のアレイのうちの1つと接触させるステップであって、第1のアレイおよび第2のアレイのそれぞれが、複数の特徴を有し、第1のアレイおよび第2のアレイが同一の複数の特徴を有し、各特徴が固体支持体に結びついた少なくとも1つの配列を含み、前記少なくとも1つの配列がレポーターに結びついたプロテアーゼ基質候補を含む前記ステップ；b)検出可能な要素を第1のアレイおよび第2のアレイのそれぞれと接触させて、第1のアレイおよび第2のアレイのそれぞれの特徴において、前記検出可能な要素が前記少なくとも1つの配列内のレポーターに結合可能にするステップ；c)前記検出可能な要素が、第1のアレイのそれぞれの特徴において、前記少なくとも1つの配列内のレポーターに結合することに起因する第1のシグナル、および前記検出可能な要素が、第2のアレイのそれぞれの特徴において、前記少なくとも1つの配列内のレポーターに結合することに起因する第2のシグナルを検出するステップ；d)第1のアレイとの結合に起因する第1のシグナルと、第2のアレイとの結合に起因する第2のシグナルとを比較して、第1のシグナルと第2のシグナルとの差異を識別するステップ；ならびにe)ステップd)でプロテアーゼに対する基質として識別された特徴において、少なくとも1つのプロテアーゼ基質候補を同定するステップ。

20

【0008】

一態様では、レポーターは、ペプチドエピトープであり、および検出可能な要素は、ペプチドエピトープに対して特異的な抗体である。

30

別の態様では、レポーターは、タンパク質に対するペプチドバインダーであり、および検出可能な要素は、ペプチドバインダーが特異的に結合するタンパク質である。

【0009】

なおも別の態様では、プロテアーゼ基質候補は、天然および非天然アミノ酸から選択されるコア配列を含む。

また別の態様では、コア配列は、約5～約15個のアミノ酸を有する。

【0010】

さらなる態様では、検出可能な要素は、ストレプトアビジンであり、ならびにペプチドバインダーは、W T H P Q F E、D Y L A E Y H G G、Y E R P G W K L S、P A P A W A H G G、N S F D E W L Q K、W T H P Q F E Q K、A D Y L A E Y H G G、Y E R P G W K L G T、D P A P A W A H G G、およびN S F D D W L A K G Gからなる群から選択される。

40

【0011】

一態様では、検出可能な要素は、蛍光基を含有する。

別の態様では、少なくとも1つの配列は、式：

$$[R_1] - [L_1] - [Z_1] - [X_1] - [Z_2] - [L_2]$$

を有し、

式中、 R_1 はレポーターペプチドであり、 L_1 および L_2 はそれぞれスペーサーであり、 Z_1 および Z_2 は、0～約3個のアミノ酸を有するペプチド配列からそれぞれ独立に選択され、ならびに X_1 は、約5～約15個のアミノ酸の定義された配列を有するペプチドで

50

ある。

【0012】

また別の態様では、 R_1 はストレプトアビジンにより結合したペプチド配列であり、 L_1 および L_2 のうちの少なくとも1つは6-ヘキサン酸スペーサーであり、ならびに Z_1 および Z_2 のペプチド配列は、グリシンおよびセリンのうちの少なくとも1つを含む。

【0013】

一態様では、 L_2 は、固体支持体に結びついている。

本開示の別の実施形態に基づけば、トロンピンプロテアーゼに対するペプチド基質は、配列番号1～配列番号9からなる群から選択される配列を含む。

【0014】

本開示のなおも別の実施形態に基づけば、マトリプターゼプロテアーゼに対するペプチド基質では、該ペプチド基質は、配列番号10～配列番号28からなる群から選択される配列を含む。

【0015】

本開示のなおも別の実施形態に基づけば、プロテアーゼに対する基質を同定するためのペプチドマイクロアレイは、複数の特徴を備え、各特徴は、固体支持体に結びついた少なくとも1つの配列を有し、該配列は、プロテアーゼ基質ペプチド候補およびレポーターペプチドを含む。

【0016】

一態様では、プロテアーゼ基質ペプチド候補およびレポーターペプチドは、スペーサーを介して連結している。

別の態様では、スペーサーは、オレイン酸を含む。

【0017】

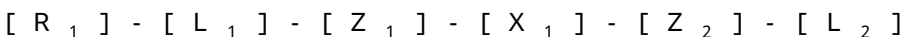
なおも別の態様では、スペーサーは、ヘキサン酸のポリマーである。

さらなる態様では、プロテアーゼ基質ペプチド候補は、5～15個のアミノ酸を含む。

また別の態様では、レポーターペプチドとして、ストレプトアビジン結合配列が挙げられる。

【0018】

一態様では、少なくとも1つの配列は、式：



を有し、

式中、 R_1 はレポーターペプチドであり、 L_1 および L_2 はそれぞれスペーサーであり、 Z_1 および Z_2 はそれぞれ0～約3個のアミノ酸を有するペプチド配列から独立に選択され、ならびに X_1 は約5～約15個のアミノ酸の定義された配列を有するペプチドである。

【0019】

本開示のさらなる実施形態に基づけば、プロテアーゼに対する基質を同定する方法は、以下のステップを含む：a) プロテアーゼを、複数の特徴を有する第1のアレイと接触させるステップであって、各特徴が固体支持体に結びついた少なくとも1つの配列を含み、前記少なくとも1つの配列が、プロテアーゼ基質候補がタンパク質分解性の消化を受けた際に検出可能なシグナルを生成する能力を有する検出可能な要素と結びついた前記プロテアーゼ基質候補を含む前記ステップ；b) 1つまたは複数の特徴において、前記プロテアーゼ基質候補のタンパク質分解性の消化に起因するシグナルを検出するステップ；c) シグナルが、プロテアーゼに対する基質としてステップb)において検出されている特徴において、前記プロテアーゼ基質候補を同定するステップ。

【0020】

本開示は、ペプチドマイクロアレイを使用してプロテアーゼ基質を同定する方法をさらに提供する。1つの実施形態では、本発明は、プロテアーゼを、複数のアドレス可能な特徴を含む第1の固体支持体と接触させるステップであって、各特徴がプロテアーゼ基質候補ペプチドおよびレポーターペプチドを含有する前記ステップ；第1の固体支持体の特徴

10

20

30

40

50

において、検出可能な要素を第1の固体支持体と接触させて、検出可能な要素がレポーターペプチドと結合するのを可能にするステップ；第2の固体支持体の特徴において、検出可能な要素を、第1の固体支持体と同一であるが、プロテアーゼと接触していない第2の固体支持体と接触させて、検出可能な要素がレポーターペプチドと結合するのを可能にするステップ；第1および第2の固体支持体の特徴において、検出可能な要素とレポーターペプチドとの結合に起因するシグナルを検出するステップ；第1および第2の固体支持体との結合に起因するシグナルを比較して、第1の固体支持体ではなく第2の固体支持体中に存在するシグナルを識別するステップ；欠損している特徴において、プロテアーゼに対する基質としてプロテアーゼ基質候補ペプチドを同定するステップを含む、プロテアーゼに対する基質を同定する方法である。レポーターペプチドは、エピトープであり得るが、また検出可能な要素は、当該エピトープに対して特異的な抗体であり得る。レポーターペプチドは、タンパク質に対するペプチドバインダーであり得るが、また検出可能な要素は、ペプチドバインダーが特異的に結合するタンパク質である。ペプチドバインダーは、2014年12月19日出願の米国特許出願番号第14/577,334号に記載の方法により選択され得る。検出可能な要素は、ストレプトアビジンであり得るが、またストレプトアビジンバインダーは、W T H P Q F E、D Y L A E Y H G G、Y E R P G W K L S、P A P A W A H G G、N S F D E W L Q K、W T H P Q F E Q K、A D Y L A E Y H G G、Y E R P G W K L G T、D P A P A W A H G G、およびN S F D D W L A K G Gからなる群から選択され得る。検出可能な要素は、蛍光基を含み得る。

10

20

【0021】

別の実施形態では、本発明は、アドレス可能な特徴を含むプロテアーゼに対する基質を同定するためのマイクロアレイであり、各特徴はプロテアーゼ基質候補ペプチドおよびレポーターペプチドを含有する。プロテアーゼ基質候補ペプチドおよびレポーターペプチドは、スパーサー、例えば、オレイン酸を含むスパーサー、例えば、ヘキサ酸のポリマーを介して連結し得る。プロテアーゼ基質候補ペプチドは、5～15個のアミノ酸を含み得る。レポーターペプチドは、ストレプトアビジン結合配列であり得る。

【0022】

別の実施形態では、本発明は、以下のステップを含む方法により同定されるプロテアーゼに対する基質である：プロテアーゼを複数のアドレス可能な特徴を含む第1の固体支持体と接触させるステップであって、各特徴がプロテアーゼ基質候補ペプチドおよびレポーターペプチドを含有する前記ステップ；第1の固体支持体の特徴において、検出可能な要素を第1の固体支持体と接触させて、検出可能な要素がレポーターペプチドに結合するのを可能にするステップ；第2の固体支持体の特徴において、検出可能な要素を、第1の固体支持体と同一であるが、プロテアーゼと接触していない第2の固体支持体と接触させて、検出可能な要素がレポーターペプチドに結合するのを可能にするステップ；第1および第2の固体支持体の特徴において、検出可能な要素がレポーターペプチドに結合することに起因するシグナルを検出するステップ；第1および第2の固体支持体との結合に起因するシグナルを比較して、第1の固体支持体ではなく第2の固体支持体中に存在するシグナルを識別するステップ；欠損している特徴において、プロテアーゼに対する基質としてプロテアーゼ基質候補ペプチドを同定するステップ。

30

40

【0023】

別の実施形態では、本発明は、以下のステップを含むプロテアーゼに対する基質を同定する方法である：プロテアーゼを、複数のアドレス可能な特徴を含む固体支持体と接触させるステップであって、各特徴がプロテアーゼ基質候補ペプチド、およびプロテアーゼ基質候補ペプチドがタンパク質分解性の消化を受けた際に検出可能なシグナルを生成する能力を有する検出可能な要素を含有する前記ステップ；1つまたは複数の特徴において、プロテアーゼ基質候補ペプチドのタンパク質分解性の消化に起因するシグナルを検出するステップ；シグナルが、プロテアーゼに対する基質として検出された特徴において、プロテアーゼ基質候補ペプチドを同定するステップ。

【0024】

50

別の実施形態では、本発明は、以下のステップを含むプロテアーゼに対して少なくとも2つの異なる親和性を有する基質を同定する方法である：第1セットの条件下で、プロテアーゼを、複数のアドレス可能な特徴を含む固体支持体と接触させるステップであって、各特徴が、プロテアーゼ基質候補ペプチドおよびプロテアーゼ基質候補ペプチドがタンパク質分解性の消化を受けた際に検出可能なシグナルを生成する能力を有する検出可能な要素を含有する前記ステップ；第1セットの条件下、1つまたは複数の特徴において、プロテアーゼ基質候補ペプチドのタンパク質分解性の消化に起因するシグナルを検出するステップ；第1の親和性を有するプロテアーゼに対する基質として、ステップbでシグナルが検出された特徴において、プロテアーゼ基質候補ペプチドを同定するステップ；第2セットの条件下で、プロテアーゼを、第1のステップと同一の固体支持体と接触させるステップ；第2セットの条件下、1つまたは複数の特徴において、プロテアーゼ基質候補ペプチドのタンパク質分解性の消化に起因するシグナルを検出するステップ；第2の親和性を有するプロテアーゼに対する基質としてプロテアーゼ基質候補ペプチドを同定するステップ。

10

20

30

40

50

【0025】

上記およびその他の態様、ならびに本発明の長所は、下記の説明から明らかとなる。説明では、本明細書の一部をなす添付図面を参照しているが、そこでは、本発明の好ましい実施形態が説明目的で提示される。ただし、そのような実施形態は必ずしも本発明の範囲全体を表しているわけではなく、したがって本発明の範囲を解釈するには、特許請求の範囲および本明細書が参照される。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1Aは、本開示に基づき、プロテアーゼ基質を同定するためのマイクロアレイについて、その単一の特徴に関する説明図である。図1Bは、本開示に基づき、プロテアーゼ基質を同定するためのマイクロアレイについて、その単一の特徴に関する特別な実施例の説明図である。特徴として、5-merコア配列を含むプロテアーゼ基質候補、およびストレプトアビジンバインダーペプチドとして例示するレポーター要素が挙げられる。

【図2】プロテアーゼとしてトロンピンを用いた、図1Bに基づくペプチドの特徴の切断結果を示す散布図である。縦軸は、トロンピンによる処理無し(UT)ペプチドマイクロアレイに由来する特徴に結合したCy5標識ストレプトアビジンにより生成された蛍光シグナルに対する、トロンピンによる処理有り(T)ペプチドマイクロアレイに関する特徴に結合したCy5標識ストレプトアビジンにより生成された蛍光シグナルの比を示す一方、横軸は、トロンピンで処理した特徴に関する蛍光シグナルのみを示す。

【図3】トロンピン切断効率と基質候補ペプチドの5-merコア配列内の所定のアミノ酸数について、それらの間の関連性を示す図である。データは、アミノ酸をアラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、およびアスパラギン(N)として表わす。例えば、上段左側の第1のパネルは、5-merコア配列内のアラニン残基(0~3)の数の関数として切断効率の対数を示す。

【図4】トロンピン切断効率と基質候補ペプチドの5-merコア配列内の所定のアミノ酸数について、それらの間の関連性を示す図である。データは、アミノ酸をプロリン(P)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)、およびチロシン(Y)として表わす。例えば、上段左側の第1のパネルは、5-merコア配列内のプロリン残基(0~3)の数の関数として切断効率の対数を示す。

【図5】トロンピンによる5-merペプチドの切断結果をさらに表す図2の散布図であり、ペプチド内のアルギニン(R)含有量(0~3残基)を強調的に表示する。

【図6】トロンピンによる5-merペプチドの切断結果をさらに示す図2の散布図であり、ペプチド内のリジン(K)含有量を強調的に表示する。

【図7】これまでに記載されているトロンビン基質および本開示に基づく新規同定されたトロンビン基質のリストを比較した図である。パネルA～Cは、Gallwitz M.ら、(2012年)、The Extended Cleavage Specificity of Human Thrombin. PLoS ONE、7巻(2): e31756から転載。パネルDは、本開示の方法を通じて同定されたペプチド配列のリストである。

【図8】プロテアーゼのマトリプターゼによる、図1Bに基づくペプチドの特徴の切断結果を示す散布図である。縦軸は、マトリプターゼによる処理有りペプチドマイクロアレイ上の特徴に結合したCy5-標識ストレプトアビジンにより生成された蛍光シグナルに対する、処理無し(UT)ペプチドマイクロアレイ上の特徴に結合したCy5-標識ストレプトアビジンにより生成された蛍光シグナルの比を示す一方、横軸は、処理無しの特徴に関する蛍光シグナルのみを示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0027】

I. 定義

本明細書で用いる場合、用語「ペプチド」および「オリゴペプチド」とは、アミノ酸から構成される有機化合物を意味し、隣接した残基のカルボキシル基とアミノ基の間のペプチド結合により、共に接合したアミノ酸の直線状または環状の鎖で構成され得る。用語「ペプチド」および「オリゴペプチド」とは、より短いポリペプチド、すなわち、50個未満のアミノ酸残基から構成される有機化合物を意味する。

20

【0028】

用語「天然アミノ酸」とは、標準的な遺伝子コードによりコードされ、およびタンパク質に一般的に見出され、およびタンパク質生合成で使用される20種類のアミノ酸のうちの一つ、ならびに翻訳の間にタンパク質に組み込まれ得るその他のアミノ酸(ピロリジンおよびセレノシステインを含む)を意味する。20種類の天然アミノ酸として、ヒスチジン、アラニン、バリン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、グルタミン、アスパラギン、トレオニン、アルギニン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニン、およびリジンが挙げられる。

【0029】

用語「非天然アミノ酸」とは、標準的な遺伝子コードによりコードされる、または翻訳の間にタンパク質に組み込まれるアミノ酸に該当しない有機化合物を意味する。非天然アミノ酸として、アミノ酸またはアミノ酸の類似体、例えば、アミノ酸のD-アイソステレオマー(D-アミノ酸)、アミノ酸の-アミノ類似体、シトルリン、ホモシトルリン、ホモアルギニン、ヒドロキシプロリン、ホモプロリン、オルニチン、4-アミノ-フェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン、-アミノイソ酪酸、N-メチル-アラニン、N-メチル-グリシン、ノルロイシン、N-メチル-グルタミン酸、tert-ブチルグリシン、-アミノ酪酸、tert-ブチルアラニン、2-アミノイソ酪酸、-アミノイソ酪酸、2-アミノインダン-2-カルボン酸、セレノメチオニン、デヒドロアラニン、ランチオニン、-アミノ酪酸、およびアミン窒素がモノまたはジ-アルキル化されたその誘導体が挙げられる。

30

40

【0030】

用語「マイクロアレイ」、または「ペプチドマイクロアレイ」、または単に「アレイ」とは、固体または半固体支持体表面上にある特徴(オリゴペプチド)の二次元配置を意味する。単一のマイクロアレイ、または場合によっては、複数のマイクロアレイ(例えば、3、4、5個、またはそれ超のマイクロアレイ)が、1つの固体支持体に位置し得る。マイクロアレイのサイズは、1つの固体支持体上のマイクロアレイの数に依存する。固体支持体1個当たりのマイクロアレイの数が多くなるほど、固体支持体に収まるにはアレイは小さくならなければならない。アレイは、任意の形状で設計され得るが、好ましくは四角形または長方形として設計される。既製タイプの製品は、「マイクロアレイスライド」と

50

呼ばれる固体または半固体支持体上のオリゴペプチドマイクロアレイである。

【0031】

用語「特徴」とは、マイクロアレイ表面上の定義された領域を意味する。特徴は、生体分子、例えば本発明の文脈においてペプチド等を含む。1つの特徴は、異なる特性、例えばその他の特徴と比較して異なる配列または配向等を有する生体分子を含み得る。特徴のサイズは、2つの因子：i) アレイ上の特徴の数（アレイ上の特徴の数が多いほど、1つの特徴それぞれは小さくなる）；および ii) 1つの特徴の発光に使用される、個別にアドレス可能なアルミニウムミラー要素により決定される。1つの特徴の発光に使用されるミラー要素の数が多いほど、1つの特徴それぞれは大きくなる。アレイ上の特徴の数は、マイクロミラーデバイス中に存在するミラー要素（ピクセル）の数により限定され得る。例えば、Texas Instruments, Inc社製の最新技術分野のマイクロミラーデバイスは、現在のところ、4.2百万ミラー要素（ピクセル）を備え、したがって、そのような代表的なマイクロアレイ内の特徴の数は、この数により限定される。ただし、Texas Instruments, Inc社製のマイクロミラーデバイスは、代表的な目的について提示されるに過ぎず、より高密度のアレイも利用可能である、または利用可能となるものと理解すべきである。

10

【0032】

用語「固体または半固体支持体」とは、有機分子が結合形成を通じて繋ぎ止められ得る、または電子的もしくは静的相互作用、例えば特異的官能基を通じた共有結合もしくは複合体形成等を通じて吸収され得る表面領域を有するあらゆる固体材料を意味する。支持体は、材料の組合せ、例えばガラス上のプラスチック、ガラス上のカーボン等であり得る。機能的表面は、単純な有機分子であり得るが、コポリマー、 dendrimer、分子ブラシ等を含んでもよい。

20

【0033】

本明細書で用いる場合、用語「スパーサー」とは、1つまたは複数の化学物質、ポリマーまたは、その組合せを意味するが、天然アミノ酸を含まない。

II. 説明

本発明は、酵素基質モチーフを同定するために、ペプチドライブラリーをスクリーニングする方法に関する。いくつかの実施形態では、酵素はプロテアーゼであるが、一方、その他の実施形態では、酵素は、プロテインキナーゼである。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、マイクロアレイ等の固体支持体に結合している。ペプチドマイクロアレイを形成する方法は、当技術分野において公知である。ペプチドアレイを生成する特定の方法は、事前に組み立てられたペプチドをスポットするステップ、または膜上で試薬をスポットすることによる *in-situ* 合成を含む（米国特許第6,375,903号を参照）。より高い密度のペプチドアレイを生成するのに使用される公知のその他の方法は、フォトリソグラフィー技術と関係し、その場合、所望のバイオポリマーの合成デザインは、光等の電磁放射に曝露された際に、次の各アミノ酸に対して結合部位を放出する好適な感光性保護基（PLPG）により制御される（Fodorら、（1993年）、Nature、364巻：555～556頁；Fodorら、（1991年）、Science、251巻：767～773頁）。2つの異なるフォトリソグラフィー技術が、当技術分野において公知である。第1は、合成表面の特定の領域に光を誘導してPLPGの局所的な脱保護を有効にするのに使用されるフォトリソグラフィーマスクである。このような「マスク」法は、基質と嵌合し、基質とマウントの間にリアクタースペースを提供するマウント（「マスク」）を利用するポリマー合成を含む。米国特許第5,143,854号および同第5,445,934号を参照。第2のフォトリソグラフィー技術は、いわゆるマスクレスフォトリソグラフィーであり、その場合、マイクロミラーデバイス等のデジタルプロジェクション技術により、光は合成表面の特定領域に誘導されて、PLPGの局所的脱保護が有効となる（Singh-Gassonら、Nature Biotechnol.、17巻（1999年）、974～978頁）。そのような「マスクレス」アレイを合成すれば、時間および費用のかかる露光マスクの製造に対する必要性が取り除かれる。本発明の

30

40

50

方法で利用されるペプチドマイクロアレイは、上記方法のいずれか、または2014年12月19日出願の「Systemic Discovery, Maturation and Extension Of Peptide Binders to Proteins」と題する米国特許出願番号第14/577,334号において、本発明者らによりこれまでに記載された方法を含む、当技術分野において公知の任意のその他の方法により合成され得る。

【0034】

1. アレイの特徴

いくつかの実施形態では、本開示は、固体支持体上に配置されたアレイ状のペプチドの特徴を使用することを含む。アレイ上の各特徴は、定義された位置と配列を有する。さらに、各特徴は、因子、例えば所与の特徴内の開始反応部位の数、全配列に対する反応部位の変換割合(%)、および合成の忠実度等に応じて、1つまたは複数の同一の配列を含み得る。例えば、ペプチドアレイ上の仮想的な特徴は、固体支持体上の定義された座標に $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ の四角形を備え得る。特徴の例は、面積 $10\mu\text{m}^2$ 当たり推定 10^6 個の反応部位をさらに有し、これにより特徴内での最大 10^6 個の同一の配列が合成できるようになる。別の態様では、配列は、任意の数の異なる化学的構成ブロック、例えばアミノ酸(例えば、天然および非天然アミノ酸)、リンカーまたはスペーサー、蛍光物質等、およびその組合せを含み得る。

10

【0035】

図1Aに戻り、特徴の例100は、固体支持体102と結びついた配列101を含む。簡略化のために、ペプチドの特徴100は、固体支持体102と結びついた、または結合した単一の配列101を含むように例示されている；ただし、ペプチドの特徴100は、固体支持体102上のペプチドの特徴100により定義される領域内に複数の同一の配列101を含むように合成され得ると認識される。配列101は、第1のスペーサー106を介して固体支持体102に結びついたプロテアーゼ基質候補104を含む。基質104は、第2のスペーサー108を介してレポーター110とさらに結びついている。図1Aに示す説明図において、レポーター110は、検出可能な要素114と相互作用し、それに結合する能力を有する結合部分112を含む。例えば、レポーター110は、ペプチド配列であり得、結合部分112は、結合モチーフを提示するペプチド配列内のアミノ酸のサブセットであり得、検出可能な要素114は、ペプチド配列の結合モチーフと特異的に結合する蛍光標識された抗体であり得る。

20

30

【0036】

説明的な実施形態では、基質104は、個々のモノマーユニット118から構成されるコア配列116を含む。コア配列116は、1つまたは複数の追加のモノマーユニット120とさらに隣接する。1つの実施形態では、コア配列116は、定義されたアミノ酸配列を有する5-merペプチドであり、またコア配列116は、ランダムな配列または定義された配列を有する3-merアミノ酸配列(すなわち、モノマー120)と各端部において隣接する。まとめとして、固体支持体102と結びついた配列101の端部から始まり、配列101は、第1のスペーサー106、1つまたは複数のモノマーユニット120、モノマーユニット118から構成されるコア配列116、1つまたは複数のモノマーユニット120、第2のスペーサー108、および検出可能な要素114と相互作用する能力を有するレポーター110を含む。

40

【0037】

本開示の1つの実施形態では、特徴100は、プロテアーゼ基質の同定に有用である。例えば、コア配列116が所定のプロテアーゼに対する基質である場合、特徴100がプロテアーゼ切断に適する条件下でプロテアーゼにより処理されると、コア配列116は切断され、これにより固体支持体102からレポーター110が分離する(例えば、プロテアーゼは隣接したモノマー118間のペプチド結合を破壊して、レポーター110が固体支持体102ともはや結びつけない、さもなければ結合できないようにする)。対照的に、コア配列116がプロテアーゼに対する基質でない場合には、特徴100がプロテアー

50

ぜで処理されても、コア配列は切断されず、これによりレポーター 1 1 0 と固体支持体 1 0 2 の間の結びつき（すなわち、コア配列 1 1 6）はそのまま残る。したがって、プロテアーゼ処理後、レポーター 1 1 0 が、特徴 1 0 0（および配列 1 0 1）が配置された固体支持体 1 0 2 上の定義された場所において検出される場合、コア配列 1 1 6 はプロテアーゼにより切断されない可能性が高い。ただし、レポーター 1 1 0 が特徴 1 0 0 の場所において検出されない場合、コア配列 1 1 6 は切断された可能性が高く、したがってコア配列 1 1 6 は、プロテアーゼに対する基質である可能性が高い。本開示のこのようなおよびその他の態様は、少なくとも下記の実施例セクションを含む本明細書においてより詳細に記載されている。

【0038】

ここで図 1 B に戻り、プロテアーゼ基質を同定するための特徴の特別な例が示される。図 1 B に示す通り、各特徴 1 5 0 は、固体支持体 1 5 2 と結びつき、レポーターとさらに結びついた固有のプロテアーゼ基質候補を含む 1 つまたは複数の配列を含む。図 1 B では、レポーターは、アーキタイプカル「HPQ」結合モチーフを含むストレプトアビジン結合ペプチド配列により例示される。ただし、本発明の範囲は、その他のペプチド結合配列を含む。本発明の範囲は、非ペプチドベースレポーターであるその他のレポーターも含む。例えば、図 1 B に示す例示的なストレプトアビジン結合ペプチド配列は、ビオチン分子と置換し得る。本発明の範囲は、レポーターペプチドが省略され、また検出可能な要素がスパーサー、または候補ペプチド配列そのものにコンジュゲートしているような実施形態をさらに含む。なおもその他の検出スキームも、本開示の範囲に含まれる。

【0039】

マイクロアレイの特徴 1 5 0 内では、プロテアーゼ基質候補は、長さが約 5 ~ 1 5 個のアミノ酸のペプチドである。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ基質候補は、5 - m e r ペプチドである。任意選択的に、ペプチドは、より長い、例えば、長さが最大 1 1 個のアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態では、アレイ上のペプチドは、標準遺伝子コードによりコードされる天然アミノ酸のみを使用して合成される。非天然アミノ酸ならびにペプチド結合を形成する能力を有するその他の分子も利用可能である。2 0 種類すべて、または 2 0 種類よりも少なくとも、例えば、1 8 種類の天然アミノ酸のみであっても利用可能である。いくつかの実施形態では、アレイは、システイン（C y s）およびメチオニン（M e t）を含まない、1 8 種類の天然アミノ酸を使用して合成される。なおもその他の実施形態では、アレイ上のペプチド配列は、あらゆる二量体、または同一のアミノ酸からなるより長いリピートをさらに除外する。なおもその他の実施形態では、アレイ上のペプチド配列は、試験プロテアーゼに対して特異性を有することが公知の配列をさらに除外する。そのように除外する目的は、基質であることがすでに公知の配列を回避し、新規基質の発見を促進することにある。このような除外は、試験プロテアーゼが有する既知の基質との解離定数（ K_D ）が非常に低いとき、特に有利である。例として、配列 HPQ および HPM を選択するのを回避するために、本発明の方法に基づくアレイはアミノ酸配列 HR、RH、HK、KH、RK、KR、HP、および PQ を除外する。この例に基づき、当業者は、特定のプロテアーゼ基質に対する候補をアレイから除外するための配列を選択することができる。

【0040】

1 つの例では、ペプチドアレイは、各特徴が完全長ペプチドをもたらすことができる最大 10^7 個の反応部位を有する、最大 2.9×10^7 個の特徴を有し得る。より小型またはより大型のアレイも設計可能である。例えば、システインを除くすべての天然アミノ酸を使用するすべての有望な 5 - m e r ペプチドの網羅的なリストを提示するアレイは、2 , 4 7 6 , 0 9 9（約 2.5×10^6 ）個のペプチドを有する。特定のアミノ酸およびアミノ酸二量体を除外するアレイは、約 1 M（ 10^6 ）個のペプチドを有し得る。マスクレスアレイ合成（MAS）の場合、アレイ上の特徴の数は、使用されるデジタルマイクロミラーデバイス（DMD）の寸法および全特徴数に対応し得る。1 つの例では、 10^8 個のマイクロミラーを有する DMD が、最大 10^8 個の特徴を調製するのに利用可能である。

10

20

30

40

50

【0041】

2. レポーター

本発明の方法では、マイクロアレイ上の特徴は、レポーターペプチドとコンジュゲートした、または結びついたプロテアーゼ基質候補ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、レポーターペプチドは、検出可能な要素が特異的に結合するアミノ酸配列である。検出可能な要素 - レポーター配列の対の例として、抗体 - エピトープ、およびタンパク質 - ペプチドバインダーの対が非限定的に挙げられる。特異的エピトープに対する抗体が、当技術分野において公知の任意の方法に基づき生成され得る。特定のペプチドに対する市販の抗体も利用可能である。したがって任意の適するエピトープ - 抗体の対が、本発明の文脈において、レポーターシステムとして利用可能である。

10

【0042】

その他の実施形態では、レポーターペプチドは、検出可能な要素に直接コンジュゲートしている。そのような実施形態では、レポーターペプチドは、検出可能な要素を含めるのに配列に依存しない構造的な役割を果たす。レポーターペプチドは省略され得るが、その場合、検出可能な要素は候補基質ペプチドに直接またはリンカーを介してコンジュゲートしている。マイクロアレイ上のペプチドの特徴に直接コンジュゲートした検出可能な要素は、蛍光分子または検出可能なシグナルを発する能力を有する任意の分子であり得る。シグナルは、定常的（例えば、放射性標識、蛍光レポーター色素）、または条件的（例えば、レポーター色素として機能する後に添加される蛍光アクセプター色素に、蛍光エネルギーを移す蛍光ドナー色素）であり得る。

20

【0043】

なおもその他の実施形態では、レポーターペプチドは、省略され得るが、その場合、蛍光物質が、プロテアーゼ基質候補ペプチドのN末端に直接付加可能である。プロテアーゼ消化後のシグナルの損失が、試験プロテアーゼに対する基質として候補を識別するのに利用可能である。

【0044】

3. プロテアーゼ耐性レポーター

いくつかの実施形態では、レポーターペプチドは、プロテアーゼ耐性の追加の特性を有する。いくつかの事例では、試験プロテアーゼは、レポーターペプチド配列の少なくとも一部に対して特異性を思いがけず有する可能性があり、したがって実験デザインを阻害する。そのような潜在的な問題に対処するために、レポーターペプチド配列は、タンパク質分解に対して耐性を有するように設計され得る。例えば、レポーターペプチド配列は、タンパク質に通常見出されないアミノ酸（例えばD - アミノ酸等）を含み得る。その他の実施形態では、アミノ酸は、化学修飾を有する場合があります。そのような修飾アミノ酸を含有するペプチドは、タンパク質分解性の消化を排除する。一般的に、レポーターペプチド配列のタンパク質分解を防止するが、検出可能な要素による同定、または検出可能な要素により検出可能なシグナルの放出をなおも妨害しない化学修飾のいずれも、本発明の範囲内にある。この実施形態の変形形態では、レポーター配列は、ペプチド配列ではなく、レポーター配列の必要な構造的な特性を有するオリゴマーまたはポリマーであり、すなわち、検出可能な要素または検出可能な要素による特異的認識を支援するが、プロテアーゼ消化に対して耐性を有する。

30

40

【0045】

標的ペプチドに特異的に結合するペプチドバインダーは、2014年12月19日出願の米国特許出願番号第14/577,334号のSystemic Discovery, Maturation and Extension Of Peptide Binders to Proteinsにおいて本発明者らによりこれまでに記載された方法を含む、当技術分野において公知の任意の方法により識別され得る。

【0046】

いくつかの実施形態では、レポーターペプチド配列は、スパーサー（時にリンカーと呼ばれる）を介してペプチド配列候補と連結することができる。いくつかの実施形態では、

50

スパーサーは、1つまたは複数のカルボン酸分子、例えば、ヘキサ酸から構成される。当業者は、ヘキサ酸が属する、脂肪族側鎖を備えたカルボン酸の属において、化学的特性の類似性および互換性を認識する。さらに、脂肪族側鎖を備えたカルボン酸と類似した化学的特性および立体的特徴を備えたその他の化合物が、カルボン酸の代わりに利用可能である。リンカーは任意選択的である。いくつかの実施形態では、プロテアーゼペプチド候補およびレポーターペプチドは、例えば、ペプチド結合を介して直接連結し得る。

【0047】

いくつかの実施形態では、レポーター配列は、検出可能な要素として使用するのに好適および好都合な、タンパク質に特異的に結合するペプチドバインダー配列である。例えば、レポーター配列は、ストレプトアビジンが検出可能な要素であるストレプトアビジン-結合配列であり得る。いくつかの実施形態では、ストレプトアビジン-結合配列は、WTHPQFEQKである。その他の実施形態では、その他のストレプトアビジン-結合配列、例えば、WTHPQFE、DYLA EYHGG、YERPGWKLS、PAPAWAHGG、NSFDEWLQK、WTHPQFEQK、ADYLA EYHGG、YERPGWKLG T、DPAPAWAHGG、またはNSFDDWLAKGGが使用される。このような配列のより長いまたはより短いバージョンまたは置換されたバージョンも、ストレプトアビジンに対して十分な親和性を有する限り利用可能である。

10

【0048】

その他の実施形態では、レポーター配列は、ヘキサ-ヒスチジン配列(6His)であり、また検出可能な要素は、蛍光物質にコンジュゲートしたニッケル(II)-ニトリロトリ酢酸系(Ni^{2+} -NTA)、例えば、(Ni^{2+} -NTA)₂-Cy3である。Zhao, C.ら、(2010年). Hexahistidine-tag-specific optical probes for analyses of proteins and their interactions, Analytical Biochemistry, 399巻(2): 237~45を参照。なおもその他の実施形態では、レポーター配列は、エピトープタグであり、すなわち、高親和性抗体が検出可能な要素として使用するのに利用可能であるレポーターペプチド配列である。エピトープタグのいくつかの例として、Myc-タグ(c-Mycに由来する)、HA-タグ(インフルエンザ赤血球凝集素に由来する)、および人工的なFLAG-タグ(Hopp, T.ら、(1988年)、A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification, Biotechnology, 6巻(10): 1204頁)が挙げられる。

20

30

【0049】

4. プロテアーゼ基質候補

図1Bに示す通り、各ペプチドの特徴150は、プロテアーゼ基質候補ペプチドを含む。該特徴内のプロテアーゼ基質候補ペプチドは、長さ5個のアミノ酸であっても、またはそれより長くてもよい。いくつかの実施形態では、アレイ合成期間中に、ペプチドは、N末端、C末端、または両方の端部において、1つまたは複数のアミノ酸により延長され得る。そのような延長は、2またはそれ超のアミノ酸の混合物が、組み込みに用いられる「ウォブル合成」であり得る。いくつかの実施形態では、「ウォブル混合物」は、グリシン(G)およびセリン(S)を3:1の比で含有する。その他の例では、ウォブル混合物は、等しい濃度(例えば、等しい比)のG、S、アデニン(A)、バリン(V)、アスパラギン酸(D)、プロリン(P)、グルタミン酸(E)、ロイシン(L)、トレオニン(T)、および/または等しい濃度(例えば、等しい比)のアミノ酸L、A、D、リジン(K)、T、グルタミン(Q)、P、F、V、チロシン(Y)を含有する。本実施形態では、得られたプロテアーゼ基質候補ペプチドは、ランダムおよび指向性合成アミノ酸の組合せを有する。例えば、図1に示す通り、アレイ上の候補ペプチドは、フォーマット: ZZZZZ-5mer-ZZZZZを有する15-merであり得、式中Zは、特定のウォブル混合物に由来するアミノ酸である。

40

50

【 0 0 5 0 】

5 . 切断

本発明は、固体支持体（例えば、マイクロアレイ）上に存在するプロテアーゼ基質候補ペプチドの集団の中からプロテアーゼ基質ペプチドを切断するステップを含む方法である。本方法は、プロテアーゼ基質候補ペプチドを有する固体支持体を、試験プロテアーゼが酵素的に活性な条件の下で、試験プロテアーゼに曝露するステップを含む。そのような条件の下で、候補中の基質ペプチドは切断を受ける一方、非基質ペプチドは、固体支持体上にそのまま留まる。当業者は、同一のプロテアーゼであっても、各基質について異なる活性、すなわち、異なる動力学的特性（ K_D ）を有し得ると認識する。同様に、同一のプロテアーゼであっても、プロテアーゼが最大活性を発揮するような好ましい反応条件を有する可能性がある。条件は、反応バッファの温度、pH、および組成により特徴付けられる。したがって、本発明の範囲には、プロテアーゼ基質候補ペプチドを有する固体支持体を、切断とプロテアーゼに対して好ましい基質とあまり好ましくない基質の識別とを可能にする様々な反応条件の下で試験プロテアーゼに曝露するステップが含まれる。

10

【 0 0 5 1 】

本発明は、固体支持体（例えば、マイクロアレイ）上に存在するプロテアーゼ基質候補ペプチドの集団の中のどのペプチドが切断されたか識別するステップを含む方法である。いくつかの実施形態では、方法は、タンパク質分解性の切断生成物を取り除く、1つまたは複数の洗浄ステップを含む。残存（未切断）ペプチドの識別では、検出可能な要素または検出可能な要素のような別のものを利用する。そのために、方法は、試験プロテアーゼにすでに曝露された固体支持体を、検出可能な要素と接触させるステップを含む。検出可能な要素は、タンパク質分解性の切断が生じなかった特徴中においてのみ検出可能なシグナルを生成する。このような特徴においてのみ、無変化の候補ペプチド、およびつながったレポーター配列が固体支持体上になおも存在する。検出可能な要素（例えば、蛍光分子または検出可能なシグナルを発する能力を有するあらゆる分子）がマイクロアレイ上で候補ペプチドに直接コンジュゲートしているようないくつかの実施形態では、同様に、シグナルはタンパク質分解性の切断が生じなかった特徴中においてのみ検出される。

20

【 0 0 5 2 】

方法は、検出可能な要素との接触前に試験プロテアーゼに曝露されないことを除き、同じように処理される、第1のマイクロアレイと同一の第2のマイクロアレイを分析するステップをさらに含む。例えば、第2のマイクロアレイは、任意選択的に、プロテアーゼを含有しない同一のプロテアーゼバッファ溶液に曝露され、また第1のマイクロアレイと同一の条件下でインキュベートされ得る。第1のアレイではなく、第2のアレイ上で検出された特徴内の候補ペプチド配列が、試験プロテアーゼに対する基質として同定される。

30

【 0 0 5 3 】

6 . 基質の識別

いくつかの実施形態では、本発明は、ペプチドマイクロアレイを使用してプロテアーゼ基質を同定する方法である。方法は、試験プロテアーゼを、アドレス可能な特徴を有する第1の固体支持体（例えばマイクロアレイ等）と接触させるステップを含み、各特徴はプロテアーゼ基質候補ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、各特徴は、候補ペプチド配列とコンジュゲートした、または結びついたレポーターペプチド配列をさらに含む。さらなる実施形態では、各特徴は、検出可能な要素が結合可能なレポーターペプチド配列の代わりに検出可能な要素を含む。

40

【 0 0 5 4 】

方法は、第1の固体支持体上のレポーターペプチド配列の存在を検出することにより、試験プロテアーゼへの曝露後に、第1の固体支持体上の未切断ペプチド配列の存在を検出するステップをさらに含む。該ステップは、レポーターペプチド配列に結合することにより、または特徴内のペプチドが切断を受けなかった場合に限り、シグナルの放出を引き起こす別の機構により、検出可能なシグナルの放出を可能にする条件下で、第1の固体支持体を検出可能な要素と接触させるステップを含む。本方法は、プロテアーゼで処理されな

50

かった、第2の固体支持体上のペプチド配列の存在を検出するステップをさらに含む。本方法は、第1および第2の固体支持体の検出結果を比較して、第1ではなく第2の固体支持体上に存在するプロテアーゼ基質候補ペプチドを同定するステップをさらに含む。そのようなペプチドは、プロテアーゼにより切断を受けて第1の固体支持体から離れ、したがってプロテアーゼ基質ペプチドとして同定される。

【0055】

7. 基質を同定するためのアレイおよびシステム

いくつかの実施形態では、本発明は、プロテアーゼに対する基質を同定するためのマイクロアレイである。マイクロアレイは、アドレス可能な特徴を含み、各特徴は、固体支持体と結びつき、レポーターペプチド配列とさらに結びついた固有のプロテアーゼ基質候補ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本発明は、プロテアーゼに対する基質を同定するシステムである。該システムは、少なくとも2つのマイクロアレイを含み、各マイクロアレイは、アドレス可能な特徴を含み、各特徴は、固体支持体と結びつき、レポーターペプチド配列とさらに結びついた、または検出可能な要素に直接結びついた固有のプロテアーゼ基質候補ペプチドを含有する。該システムは、分離した検出可能な要素も含み得る。いくつかの実施形態では、検出可能な要素は直接検出可能であり、またその他の実施形態では、検出可能な要素は、間接的に検出可能、例えば、検出可能な基質にコンジュゲートした二次抗体を用いて検出可能である。いくつかの実施形態では、システムは、マイクロアレイ上の特定のアドレス可能な特徴の存在を検出するための検出手段をさらに含む得る。例えば、検出可能な要素が、蛍光基または蛍光標識を含む、またはそれにコンジュゲートしている場合、該標識は、蛍光スキャナーにより検出可能である。その他の標識および対応する検出方法として、化学発光、比色定量、またはオートラジオグラフィーが挙げられる。

【0056】

いくつかの実施形態では、システムは、2つのマイクロアレイのうち的一方に存在するが他方において欠損している特徴を識別するために、マイクロアレイのそれぞれにおいて検出された特徴の集団を比較する計算処理手段をさらに含む。マイクロアレイスライドをスキャンした後、スキャナーは、スキャンされたマイクロアレイスライド上の各蛍光スポットの解釈を可能にする20ビット、16ビット、または8ビットの数値画像を記録する。いくつかの実施形態では、結果は定性的である、すなわち、検出可能な要素は、候補ペプチドが消化されたことまたは消化されなかったことに対応して存在するまたは存在しないとして検出される。計算処理手段は、シグナルと第1のマイクロアレイおよび第2のマイクロアレイ上の対応するペプチド配列の関係を関連付け、ならびに第1ではなく第2のマイクロアレイ上に存在するペプチド配列を同定する能力を有する。いくつかの実施形態では、システムは、候補ペプチド配列が処理無しのマイクロアレイ上で検出され、プロテアーゼ処理されたマイクロアレイ上では検出されない場合、プロテアーゼ基質配列として候補ペプチド配列を報告するための報告手段をさらに含む。

【0057】

8. 本開示に基づき同定されたプロテアーゼ基質

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載する新規の方法により同定されるプロテアーゼに対するペプチド基質である。本方法は、1)プロテアーゼを、アドレス可能な特徴を有する第1の固体支持体(例えばマイクロアレイ等)と接触させるステップであって、前記固体支持体上に位置している各特徴は、プロテアーゼ基質候補ペプチドおよび候補ペプチド配列とコンジュゲートした、または結びついたレポーターペプチド配列を含む前記ステップ; 2)第1の固体支持体を、検出可能な要素と接触させて、検出可能なシグナルを生成させるステップ; および3)第1の固体支持体上のレポーター配列の存在を検出するステップ; 4)プロテアーゼと接触しなかった固体支持体を用いてステップ2)および3)を繰り返すステップ; 5)第1ではなく第2の固体支持体上に存在する特徴を同定し、その特徴内のペプチドをプロテアーゼに対する基質として同定するステップを含む。

10

20

30

40

50

【0058】

本明細書に記載するペプチド基質は、追加のプロテアーゼ基質ペプチドを取得するための *in vitro* 進化プロセス（例えば、米国特許出願番号第14/577,334号に記載されるような）を施し得る。

【0059】

9. 基質の確認

いくつかの実施形態では、方法は、試験プロテアーゼに対する基質として同定された候補の確認をさらに含む。該確認は、試験プロテアーゼ、および追加の配列を備える、または備えない候補ペプチドを含めて実施される、ならびに溶液中で、または固体支持体上で実施される、競合的または非競合的なタンパク質分解アッセイを含み得る。

10

【0060】

10. 特異的基質

いくつかの実施形態では、本発明は、ペプチドマイクロアレイを使用してトロンビンに対する基質を同定する方法である。いくつかの天然および合成トロンビン基質が記載されている。Gallwitz M.ら、(2012年)、The Extended Cleavage Specificity of Human Thrombin. PLoS ONE、7巻(2): e31756. doi:10.1371/journal.pone.0031756。本発明の文脈において、該方法は、トロンビンをアドレス可能な特徴を有する第1の固体マイクロアレイと接触させるステップであって、各特徴が、トロンビン基質候補ペプチドを含む前記ステップを含む。いくつかの実施形態では、各特徴は、候補ペプチド配列とコンジュゲートした、または結びついたレポーターペプチド配列をさらに含む。方法は、第1のマイクロアレイ上のレポーター配列の存在を検出することにより、候補ペプチド配列の存在を検出するステップをさらに含む。該ステップは、第1のマイクロアレイを、それがレポーター配列に結合するのを可能にする条件下で検出可能な要素と接触させるステップを含む。未結合の検出可能な要素を任意選択的に除去した後、結合した検出可能な要素の存在が検出され、これによりトロンビンで処理した後に固体支持体上に残った各プロテアーゼ基質候補ペプチドの存在を検出する。いくつかの実施形態では、結合した検出可能な要素は、直接検出可能である。その他の実施形態では、検出可能な要素が、検出可能なシグナルを発する能力を有する別の分子と接触する。該方法は、検出可能な要素と接触させ、およびそれを検出する前にトロンビンに曝露されないことを除き、第1のマイクロアレイと同一であり、同一方式で処理される第2のマイクロアレイをさらに含む。第1のアレイではなく第2のアレイ上に存在するものとして検出された特徴内の候補ペプチド配列が、トロンビンプロテアーゼに対する基質として同定される。

20

30

【0061】

11. 単一アレイ法

いくつかの実施形態では、本発明は、ペプチドマイクロアレイを使用してプロテアーゼ基質を同定する方法である。該方法は、試験プロテアーゼを、アドレス可能な特徴を有する単一の固体支持体（例えばマイクロアレイ等）と接触させるステップであって、前記固体支持体に位置する各特徴が、プロテアーゼにより切断された際に検出可能なシグナルを発する能力を有する検出可能な要素に直接コンジュゲートしたプロテアーゼ基質候補ペプチドを含む前記ステップを含む。検出可能な要素は、例えば、タンパク質分解性の消化の前に蛍光消光物質と対をなす蛍光レポーター色素であり得る。ペプチドが試験プロテアーゼによりタンパク質分解性の消化を受けた後に、消光分子がレポーター蛍光物質から分離し、蛍光が生ずるのを可能にする。切断が生じ、蛍光シグナルが検出される場合、そのような特徴内のプロテアーゼ基質候補がプロテアーゼ基質ペプチドとして同定される。

40

【0062】

本実施形態では、同一の固体支持体（例えば、マイクロアレイ）は、プロテアーゼに対して様々な親和性を有する基質を識別するために、試験プロテアーゼに対して連続的に曝露され得る。固体支持体を、プロテアーゼ消化にとって最適とはいえない条件下でプロテアーゼに曝露することで、最高の親和性を有する基質の同定が可能となる。高親和性基質

50

がタンパク質分解により固体支持体から除去された後、許容性が徐々に増し、より最適となるような異なる一連の条件下で固体支持体をプロテアーゼに曝露すれば、親和性が低くなる基質の分類について、その識別が可能になる。

【0063】

いくつかの実施形態では、方法は、プロテアーゼ基質候補を含有する固体支持体をプロテアーゼと接触させること、および反応終了が検出可能なシグナルの放出により明らかになるタンパク質分解反応速度を経時的に測定することにより、プロテアーゼ基質候補の動力学的特性を決定するステップを含む。

【0064】

実施例

下記の実施例は、説明的であるように意図されており、またいかなる場合においても制限するようには意図されない。

【0065】

実施例1：トロンビン結合配列候補の同定

本開示に基づくマスケレスアレイ合成を使用してペプチドマイクロアレイを合成した。各マイクロアレイは、N末端からC末端の順番で、下記の構造を有する特徴を備えた：
W T H P Q F E Q K - [6 - ヘキサン酸] - [3 Z] - [5 - mer コア配列] - [3 Z] - [6 - ヘキサン酸] - [固体支持体] (図1を参照)

3 Z は、一連の3個の「Z」アミノ酸を表し、Z は、5 - mer コア配列に対して溶解性および可撓性を付与する目的を有する1つまたは複数のアミノ酸の混合物を表す。一態様では、5 - mer コア配列に隣接するZアミノ酸の数は、0 ~ 3個のアミノ酸またはそれ超のアミノ酸まで変化し得る。本実施例では、Z は、G l y : S e r が3 : 1の混合物であった。ただし、その他の実施例では、Z は、単にグリシンのみである(実施例2を参照)。別の態様では、各5 - mer 候補ペプチドの特徴を、事前に定義されたアミノ酸配列を用いて合成したが、固有のペプチドの特徴それぞれが有する定義されたアミノ酸配列は異なった。したがって、マイクロアレイ上の各場所にある5 - mer 候補のアミノ酸配列は既知であった。

【0066】

2つの同一のマイクロアレイを実験で使用した。ペプチドの特徴を合成した後、1つのマイクロアレイを、EMDミリポア製トロンビン切断キット(B i l l e r i c a、M a s s .)を使用して、標準的な市販条件下、トロンビンプロテアーゼ(E C 3 . 4 . 2 1 . 5)で処理した。トロンビン処理後、両方のアレイを、蛍光色素C y 5とコンジュゲートしたストレプトアビジンと結合させた。両方のアレイを蛍光に基づくスキャナープラットフォーム上でスキャンして、アレイ上の特徴毎に蛍光アウトプットを識別した。

【0067】

試験アレイと対照アレイとを比較して、トップヒットを明らかにした(図2)。特に、処理有りアレイおよび処理無しアレイから得たデータを、処理有りの各ペプチドの特徴に関する蛍光シグナルと、それに対応する処理無しのペプチドの特徴に関する蛍光シグナルの比を、処理有りのペプチドの特徴から生じた蛍光シグナルの関数としてプロットすることにより分析した。処理有りの特徴と処理無しの特徴に関する蛍光シグナルの比が大きいが、処理後の蛍光シグナルが低いペプチドの特徴(例えば、図2の上部左隅)を、さらに調査を要するトップヒットとして識別した(表1)。トロンビン基質ペプチド内の各アミノ酸の存在についても分析した(図3および4)。所与の5 - mer コア配列内のアルギニン(R)またはリジン(K)残基の合計数(0 ~ 3)は、トロンビン切断と最も強い相関を示した。さらに、図2に示すデータについてアルギニンまたはリジン残基の数を可視化すると、図5および図6にそれぞれ示すように、アルギニンまたはリジン残基の数が類似した特徴について、独特のクラスタリングパターンが明らかとなった。

【0068】

10

20

30

40

【表 1】

表 1:

トロンビン基質コア配列
PKAKX (配列番号1)
PKSKX (配列番号2)
PKAFK (配列番号3)
QRAKX (配列番号4)
RARDX (配列番号5)
LQRAK (配列番号6)
VPRGS (配列番号7)
KANKX (配列番号8)
QRGKX (配列番号9)

10

【0069】

図 7 では、本発明の方法により同定されたトロンビン基質（パネル D）を、これまでに報告されたトロンビン基質（パネル A ~ C、Gallwitz M.ら、（2012年）The Extended Cleavage Specificity of Human Thrombin. PLoS ONE 7(2): e31756より）と比較した。

20

【0070】

実施例 2：マトリプターゼ結合配列候補の同定

プロテアーゼであるマトリプターゼ（EC 3.4.21.109）に対する基質を同定することを目的として、実施例 1 と同様にペプチドマイクロアレイを合成した。1つの重要な相違点として、Z は、グリシンのみの解決法（glycine only solution）であったことが挙げられる（すなわち、3Z = GGG）。

【0071】

第 1 の（処理有り）マイクロアレイスライドを、アッセイバッファー（50 mM のトリス、50 mM の NaCl、0.01%（v/v）Tween（登録商標）20、pH 9.0）中、0.052 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の rhマトリプターゼと結合させ、第 2 のマイクロアレイスライドを、アッセイバッファーのみと結合させた（すなわち、処理無し）。両方のマイクロアレイを、室温、終夜インキュベートした。

30

【0072】

終夜インキュベーション後、1 x トリス緩衝生理食塩水（TBS）中にマイクロアレイスライドを取り出し、1 x TBS 中で 30 秒間洗浄し、次に水で 30 秒間洗浄した。

切断の検出では、マイクロアレイスライドを、ストレプトアビジン - Cy5 バッファー：640 μl の 1M トリス - Cl, pH 7.4、6.4 ml の 5% アルカリ可溶性カゼイン、16 μl の Tween 20、25.28 の H₂O、150 μl のストレプトアビジン - Cy5（1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）と結合させた。マイクロアレイスライドを、Cy5 標識ストレプトアビジンの存在下で 1 時間インキュベートし、次に 1 x TBS 中で 30 秒間洗浄し、水で 15 秒間洗浄し、最終的にスピン乾燥した。

40

【0073】

1 μm の分解能の蛍光スキャナー（Innopsys 社）を用いて、15% PMT Cy5 で、マイクロアレイスライドのスキャンを実施した。

プローブを繰り返し行い、その平均値および標準誤差（SE）を両方のアレイについて計算した。処理有りの相対蛍光ユニット（RFU）に対する処理無し RFU の比を計算し、SE カットオフを、0.20 に設定した。

【0074】

50

試験アレイと対照アレイとを比較して、トップヒットを明らかにした(図8)。特に、処理有リアレイおよび処理無リアレイから得たデータを、処理無しペプチドの各特徴に関する蛍光シグナルと、それに対応する処理有リペプチドの特徴に関する蛍光シグナルの比を、処理無しペプチドの特徴から生じた蛍光シグナルの関数としてプロットすることにより分析した。処理無しの特徴と処理有リの特徴に関する蛍光シグナルの比が大きいが、蛍光シグナルが高い処理無しペプチドの特徴(例えば、図8の上部右隅)を、さらに調査を要するトップヒットとして識別した。トップヒットには、表2に記載するマトリプターゼ基質モチーフが含まれた。特に、表2の配列は、各表の括弧内に示す全体的なプロテアーゼ基質候補のコア配列を表す。

【0075】

【表2】

10

表2:

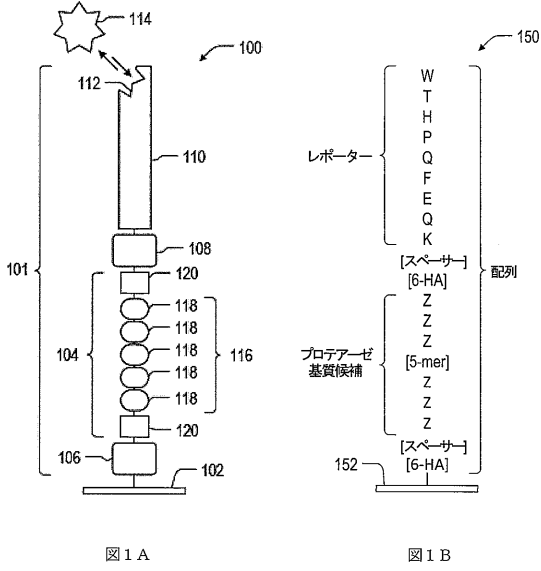
マトリプターゼ基質コア配列

- AKSNS (配列番号10)
 - EGKKN (配列番号11)
 - ERQYK (配列番号12)
 - GQAKN (配列番号13)
 - HQAKG (配列番号14)
 - IQARK (配列番号15)
 - ISPKK (配列番号16)
 - KKINH (配列番号17)
 - KKLQT (配列番号18)
 - LNARK (配列番号19)
 - PSVKS (配列番号20)
 - QESKK (配列番号21)
 - QMAKK (配列番号22)
 - QYKSS (配列番号23)
 - RKANN (配列番号24)
 - RNNQV (配列番号25)
 - VNAKK (配列番号26)
 - VQAKK (配列番号27)
 - VQMFK (配列番号28)
-

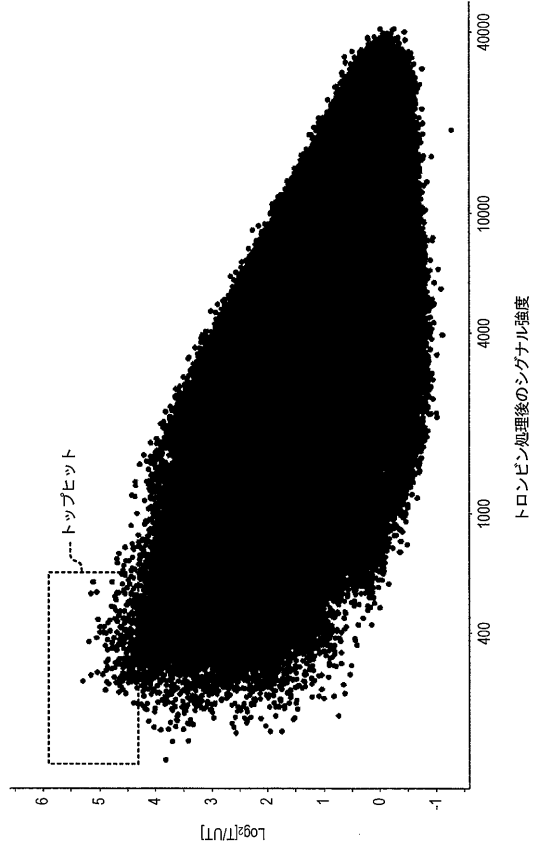
20

30

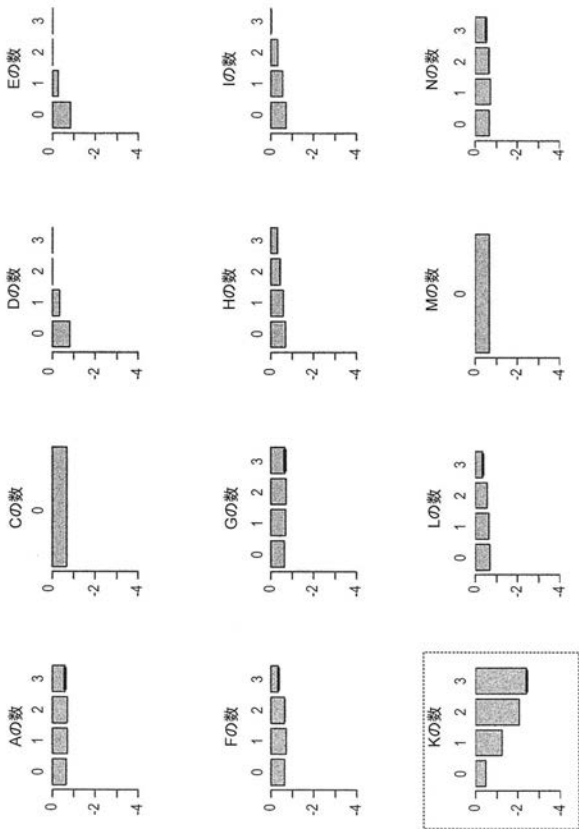
【 図 1 】



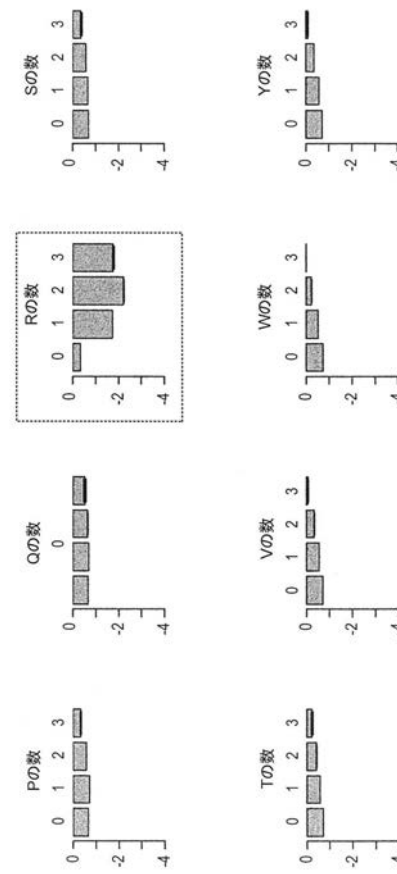
【 図 2 】



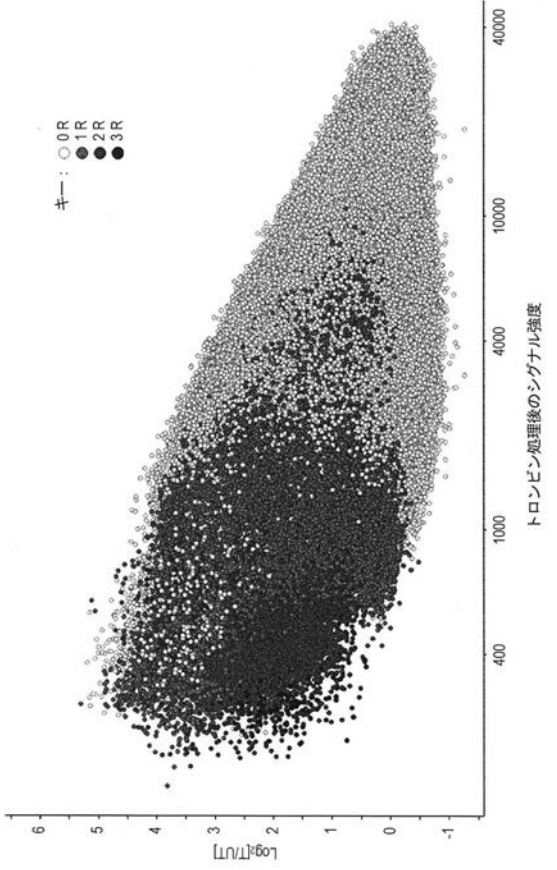
【 図 3 】



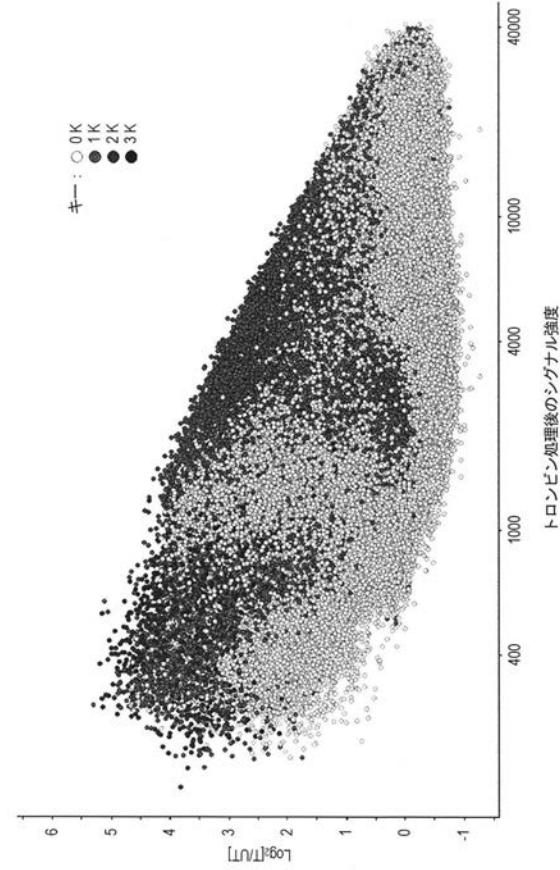
【 図 4 】



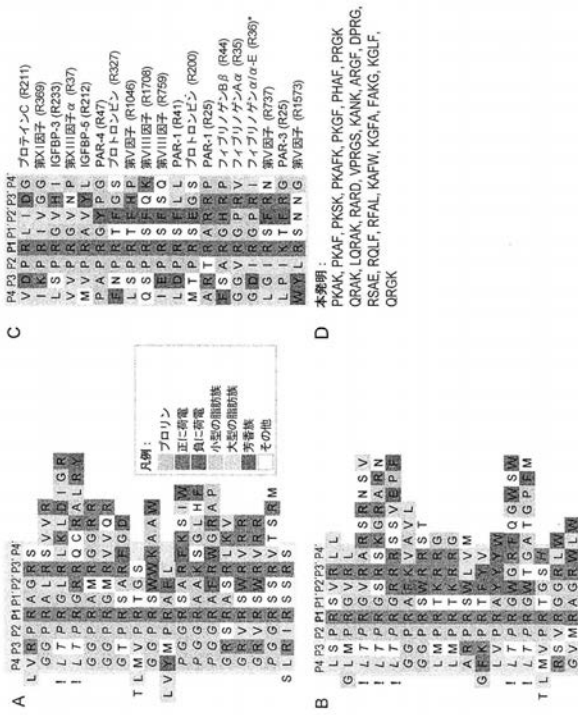
【 図 5 】



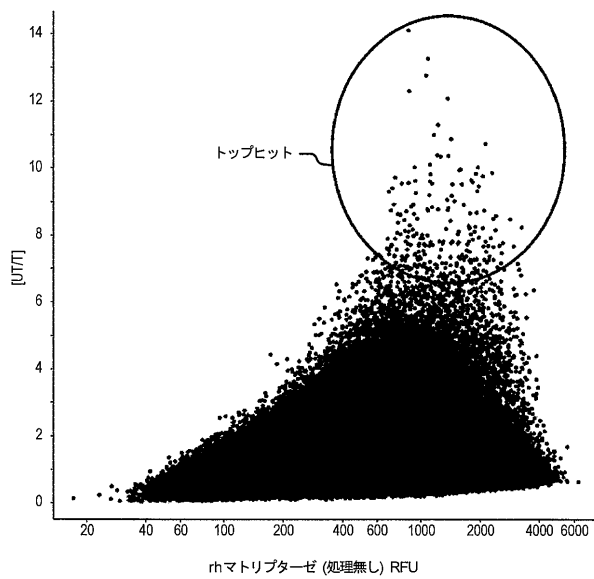
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【配列表】

2019503662000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/079123

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/37 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	US 2010/093554 A1 (CHU KETING [US]) 15 April 2010 (2010-04-15) paragraphs [0068] - [0069], [0156] - [0157], [0162], [0226] - [0227]; figures 24-26; examples 12-13 ----- -/--	15 1-7 8-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 February 2017		18/04/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Eveleigh, Anna

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/079123

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEOK-HOON KONG ET AL: "Characterization of TAMRA- and biotin-conjugated peptide arrays for on-chip matrix metalloproteinase activity assay", BIOCHIP JOURNAL, vol. 6, no. 4, 20 December 2012 (2012-12-20), pages 307-313, XP055342385, SEOUL, SOUTH KOREA ISSN: 1976-0280, DOI: 10.1007/s13206-012-6401-3	10,12, 13,15
Y	abstract	1-7,11, 14
A	page 307, right-hand column, last paragraph - page 308, left-hand column page 311, left-hand column, paragraph 2-3 figure 1	8,9

X	LÓPEZ-OTÍN C ET AL: "Protease degradomics: a new challenge for proteomics", NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY, MACMILLAN MAGAZINES, LONDON, GB, vol. 3, no. 7, July 2002 (2002-07), pages 509-519, XP002455899,	15
A	abstract table 2 page 514, right-hand column, last paragraph figure 2c	1-14

X	SALISBURY C M ET AL: "Peptide microarrays for the determination of protease substrate specificity", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 124, no. 50, 18 December 2002 (2002-12-18), pages 14868-14870, XP002277823, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/JA027477Q	15
A	page 14868, left-hand column, last paragraph page 14869, right-hand column, paragraph 2 figures 1-3	1-14
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/079123

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	D0-HYUN KIM ET AL: "Determination of protease subsite preference on SPOT peptide array by fluorescence quenching-based assay", JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE., vol. 18, no. 6, 30 June 2012 (2012-06-30), pages 394-399, XP055343963, GB ISSN: 1075-2617, DOI: 10.1002/psc.2409	15
A	abstract page 396, right-hand column, paragraph 1-3 figure 2	1-14
X	----- DATABASE Geneseq [Online] 22 April 2004 (2004-04-22), "TANGO 197-related thrombin cleavage peptide.", XP002766910, retrieved from EBI accession no. GSP:ADI00569 Database accession no. ADI00569 sequence -& US 2003/144193 A1 (ROTTMAN JAMES B [US] ET AL) 31 July 2003 (2003-07-31) paragraphs [0092], [0271] - [0272]; figures 14-15	8
X	----- DATABASE Geneseq [Online] 9 December 2010 (2010-12-09), "Helical protein secondary structure fragment, SEQ ID 7709.", XP002766911, retrieved from EBI accession no. GSP:AYK82495 Database accession no. AYK82495 sequence	9
Y	----- US 2015/185216 A1 (ALBERT TOM [US] ET AL) 2 July 2015 (2015-07-02) cited in the application paragraphs [0008], [0051], [0119] - [0120]; example 2; table 1 ----- -/--	5

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/079123

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DUAN Y J ET AL: "Protease Substrate Specificity Mapping Using Membrane-Bound Peptides", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 216, no. 2, February 1994 (1994-02), pages 431-438, XP024763379, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1006/ABIO.1994.1064 [retrieved on 1994-02-01] abstract page 433, left-hand column, paragraph 1 page 437, left-hand column, paragraph 3 -----</p>	7,11,14
A	<p>DIAMOND ET AL: "Methods for mapping protease specificity", CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, LONDON, GB, vol. 11, no. 1, 9 February 2007 (2007-02-09), pages 46-51, XP005881385, ISSN: 1367-5931, DOI: 10.1016/J.CBPA.2006.11.021 the whole document -----</p>	1-15
A	<p>DOEZ R H P: "Profilig primary protease specificity by peptide synthesis on a solid support", ANGEWANDTE CHEMIE, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 116, 14 June 2004 (2004-06-14), pages 3200-3203, XP002307314, ISSN: 0044-8249, DOI: 10.1002/ANGE.200353367 the whole document -----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/079123**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-7, 10-15(completely); 8, 9(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2016/ 079123

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7, 10-15(completely); 8, 9(partially)

A method of identifying a substrate for a protease comprising the use of two substrate arrays in parallel. A peptide substrate for the thrombin protease including SEQ ID NO:7. A peptide substrate for the matriptase protease including SEQ ID NO:23. A peptide microarray for identifying a substrate for a protease. A method of identifying a substrate for a protease comprising the use of one substrate array.

1.1. claims: 1-7, 10-14

A method of identifying a substrate for a protease comprising the use of two substrate arrays in parallel. A peptide microarray for identifying a substrate for a protease.

1.2. claim: 8(partially)

A peptide substrate for the thrombin protease including SEQ ID NO:7.

1.3. claim: 9(partially)

A peptide substrate for the matriptase protease including SEQ ID NO:23.

1.4. claim: 15

A method of identifying a substrate for a protease comprising the use of one substrate array.

2-9. claim: 8(partially)

A peptide substrate for the thrombin protease respectively including a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:1-6 and 8-9.

10-27. claim: 9(partially)

A peptide substrate for the matriptase protease respectively including a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:10-22 and 24-28.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/079123

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010093554 A1	15-04-2010	US 2009176664 A1 US 2010093554 A1 WO 2008151146 A2	09-07-2009 15-04-2010 11-12-2008
US 2003144193 A1	31-07-2003	NONE	
US 2015185216 A1	02-07-2015	EP 3087083 A2 JP 2017504795 A US 2015185216 A1 WO 2015097077 A2	02-11-2016 09-02-2017 02-07-2015 02-07-2015

フロントページの続き

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

(72) 発明者 クライン, クリティアン

スイス国 8906 ボンシュテッテン, カップフシュトラーセ 26 ベー

(72) 発明者 リアミチェフ, ヴィクター

アメリカ合衆国ウィスコンシン州 53711, マディソン, キャリーデール・コート 2523

(72) 発明者 パテル, ジガー

アメリカ合衆国ウィスコンシン州 53593, ヴェローナ, ブラック・チェリー・コート 1741

(72) 発明者 サリヴァン, エリック

アメリカ合衆国ウィスコンシン州 53716, マディソン, ドレクセル・アベニュー 4201

(72) 発明者 グッドリッチ, ローレン

アメリカ合衆国ウィスコンシン州 53715, マディソン, レーク・コート 923

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ36 QR48 QR55 QR56 QR57 QR58 QS32

QS36 QX02

4H045 AA10 AA30 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA40 EA50