

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12) 公表特許公報 ( A )

(11)特許出願公表番号

## 特表2003 - 513283

(P2003 - 513283A)

(43)公表日 平成15年4月8日(2003.4.8)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-コード <sup>*</sup> ( 参考 )
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 2 G 0 4 5 M 2 G 0 5 2
B 0 1 D 15/00 15/08		B 0 1 D 15/00 15/08	Z 4 B 0 2 9 4 D 0 1 7
B 0 1 J 20/26		B 0 1 J 20/26	H 4 G 0 6 6

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 60数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 535064(P2001 - 535064)

(86)(22)出願日 平成12年11月1日(2000.11.1)

(85)翻訳文提出日 平成13年7月2日(2001.7.2)

(86)国際出願番号 PCT/US00/30110

(87)国際公開番号 W001/033230

(87)国際公開日 平成13年5月10日(2001.5.10)

(31)優先権主張番号 60/163,110

(32)優先日 平成11年11月2日(1999.11.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/169,160

(32)優先日 平成11年12月6日(1999.12.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 カイロン コーポレーション  
アメリカ合衆国,カリフォルニア 94608,エ  
ミリービル,ホートン ストリート 4560

(72)発明者 ズッカーマン, ロナルド エヌ.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94530,  
エル セリート, コントラ コスタ  
ドライブ 1116

(72)発明者 ビューソレイル, エリック  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131,  
サン フランシスコ, ガーデンサイド  
ドライブ ナンバー402 110

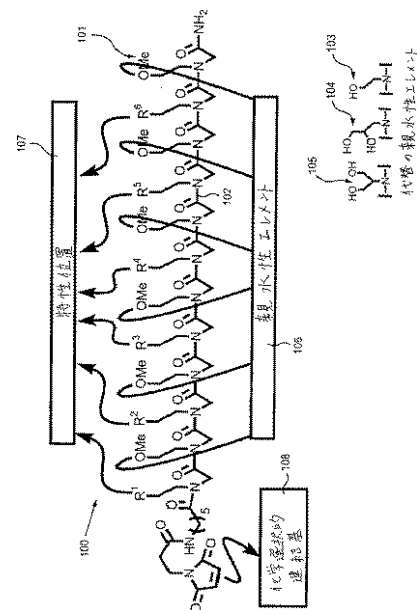
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生物学的サンプル成分の精製およびディファレンシャルディスプレイ

### (57)【要約】

生物学的サンプルの中間体結合親和性を有する親和性支持材料が提供される。本発明によって提供される材料は、親水性マトリクスに結合した親水性リガンドを含む親水性固体支持体であり、これは、生物学的サンプル（例えば、細胞株、生物学的流体（例えば、血液）、または組織細胞溶解物）と適合性である。リガンドは、親和特性基、および骨格から分枝した親水性基を含み得、生物学的サンプルの成分を少なくとも部分的に分離するように構成される。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 生物学的サンプルについて、生物学的サンプル成分の発現パターンを決定する方法であって、該方法は、以下：

生物学的サンプルを、生物学的サンプル適合性親水性マトリクスに結合したりリガンドを含む親和性支持体に適用する工程であって、該リガンドが、複数の親和特性基を有する骨格、および該骨格から分枝した親水性基を含み、そして該リガンドが、該生物学的サンプルの成分を少なくとも部分的に分離するように構成される、工程；

該生物学的サンプルの少なくとも1つの成分を分離することにより、濃縮分画を提供する工程；ならびに

該濃縮分画を使用して、該生物学的サンプルについて、生物学的サンプル成分の発現パターンを決定する工程、を包含する、方法。

【請求項2】 前記生物学的サンプル成分がタンパク質を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記生物学的サンプル成分がヌクレオチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 請求項1に記載の方法であって、前記親水性リガンドが、以下：

ペプチド骨格：ならびに

複数の親和特性基、および該ペプチド骨格から分枝した親水性基、を含む、方法。

【請求項5】 前記親水性基が、前記親和特性基と相互作用する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記親水性基が、前記ペプチド骨格に沿って前記親和特性基を交換する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 請求項6に記載の方法であって、前記親和特性基が、アルキル、(シクロアルキル)アルキル、(シクロヘテロアルキル)アルキル、アラルキル、およびヘテロアラルキルからなる群から選択され、これらの各々が、オキソ、チア、ハロ、アミノ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、チオ、アミノカルボニ

ル、カルボキシ、およびイミノからなる群から必要に応じて置換される、方法。

【請求項8】 請求項7に記載の方法であって、前記親和特性基が、メチル、ヒドロキシメチル、プロブ-2-イル、2-メチルプロピル、ピロリジルメチル、メチルチオエチル、1-ヒドロキシエチル、チオメチル、アミノカルボニルメチル、アミノカルボニルエチル、カルボキシメチル、カルボキシエチル、4-アミノブチル、ならびに3-グアニジノプロピル、グアニジノアリアル、ヒドロキシアリアル、アミドアルキル、ホスホニルアルキル、ホスホニルアリアル、オリゴエーテル、およびポリヒドロキシアルキルからなる群から選択される、方法。

【請求項9】 前記親和特性基が、必要に応じて置換されたアラルキルおよびヘテロアラルキルからなる群から選択される、請求項7に記載の方法。

【請求項10】 前記親和特性基が、フェニルメチル、ヒドロキシフェニルメチル、イミダゾリルメチル、プリニルメチル、ピリミジニルメチル、およびインドリルメチルからなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 前記親和性基が、必要に応じて置換されたアミノアルキル、トリアルキルアミノアルキルからなる群から選択される、請求項7に記載の方法。

【請求項12】 前記親和特性基が、必要に応じて置換されたカルボキシラクトアルキルである、請求項7に記載の方法。

【請求項13】 前記親水性基が、アルキルオキシアルキレニル、アミノアルキル、アルキルアミノアルキル、4級アンモニウムアルキル、ヒドロキシアルキル、チオアルキル、アルキルチオアルキレニル、カルボキシアルキル、アルキルオキシカルボニルアルキル、およびアミノカルボニルアルキルからなる群から選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項14】 前記親水性基が、アルキルオキシアルキルである、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記親水性基が、メトキシエチル、ヒドロキシエチル、1-ヒドロキシエチル-2-ヒドロキシエチル、および2,3-ジヒドロキシプロピルからなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記ペンダント基の約50%が親和特性基である、請求項4に記載の方法。

【請求項17】 前記ペンダント親和特性基の約33%が、共通親和特性を有する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 前記ペンダント親和特性基の約67%が、共通親和特性を有する、請求項16に記載の方法。

【請求項19】 前記ペンダント親和特性基の約100%が、共通親和特性を有する、請求項16に記載の方法。

【請求項20】 前記親和特性基および前記親水性基が、前記骨格の窒素原子から分枝している、請求項4に記載の方法。

【請求項21】 前記生物学的サンプルが、同質供給源由来である、請求項4に記載の方法。

【請求項22】 前記同質供給源が、細胞株である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 前記生物学的サンプルが、異質供給源由来である、請求項4に記載の方法。

【請求項24】 前記異質供給源が、1つ以上の組織サンプルである、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 前記異質供給源が、1つ以上の血液サンプルである、請求項23に記載の方法。

【請求項26】 請求項4に記載の方法であって、ここで、親水性生物学的サンプル適合性マトリクスに結合した前記親水性ペプチドが、以下：

疎水性固相基体上でペプチドを合成する工程であって、該ペプチドが、親和特性を有するペプチド骨格、および該ペプチド骨格から分枝した親水性基を含み、該ペプチドは、生物学的サンプルの生物学的サンプル成分を少なくとも部分的に分離するように構成される、工程；

化学選択的連結基で該ペプチドを終結させる工程；

該ペプチドを、該疎水性固相基体から切断する工程；ならびに

該ペプチドを、該化学選択的連結基を用いて、親水性固相基体に結合する工

程、を包含する手順によって、調製される、方法。

【請求項27】 請求項4に記載の方法であって、ここで、親水性生物学的サンプル適合性マトリクスに結合した前記親水性ペプチドが、以下：

疎水性固相基体上でペプチドを合成する工程であって、該ペプチドは、親和特性を有するペプチド骨格、および該ペプチド骨格から分枝した親水性基を含み、該ペプチドは、生物学的サンプルの生物学的サンプル成分を少なくとも部分的に分離するように構成される、工程；ならびに

該疎水性基体を親水性基体に変換する工程、  
を包含する手順によって、調製される、方法。

【請求項28】 前記疎水性基体が、疎水性保護基を除去する脱保護反応によって、親水性基体に変換させる、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 生物学的サンプルの表現型を比較する方法であって、該方法が、以下：

請求項1に記載の方法に従って、複数の生物学的サンプルの生物学的サンプル成分の発現パターンを決定する工程；ならびに

該生物学的サンプルの間で、該生物学的サンプル成分の発現パターンの差異を分析する工程、を包含する、方法。

【請求項30】 請求項29に記載の方法であって、ここで、前記生物学的サンプル成分がタンパク質を含み、そして前記差異を分析する工程が、1つ以上の該タンパク質の有無を決定する工程を包含する、方法。

【請求項31】 請求項30に記載の方法であって、ここで、前記1つ以上のタンパク質の有無を決定する工程が、1つ以上のタンパク質の存在比を決定する工程をさらに包含する、方法。

【請求項32】 請求項29に記載の方法であって、該方法が、前記生物学的サンプルを第2のペプチドに適用する工程、および各ペプチドを使用して決定された、生物学的サンプル成分の発現パターンの差異を分析する工程、をさらに包含する、方法。

【請求項33】 請求項29に記載の方法であって、ここで、前記生物学的サンプルの一方が、健康な組織サンプル由来であり、そして該生物学的サンプル

の他方が、患部組織サンプル由来である、方法。

【請求項34】 請求項29に記載の方法で合って、ここで、前記生物学的サンプルの一方が、第1型の健康な組織サンプル由来であり、そして該生物学的サンプルの他方が、同一の細胞型の患部組織サンプル由来である、方法。

【請求項35】 請求項29に記載の方法であって、前記生物学的サンプルの一方が、第1型の患部組織サンプル由来であり、そして該生物学的サンプルの他方が、第2型の患部組織サンプル由来である、方法。

【請求項36】 生物学的サンプルの複雑性を減少させる方法であって、該方法は、以下：

該生物学的サンプルを、請求項1に記載されるような親水性親和性支持体に適用する工程；および

該生物学的サンプルの生物学的サンプル成分を、該親水性支持体を使用して分画する工程、を包含する、方法。

【請求項37】 前記生物学的サンプルの複雑性を減少させるために親和性支持体を選択する工程をさらに包含する、請求項36に記載の方法であって、該方法が、以下：

該生物学的サンプルの一部を、複数の親和性支持体の各々に適用する工程であって、該複数の親和性支持体は、生物学的サンプル成分を少なくとも部分的に分離するように構成されたペプチドのアレイを含み、該ペプチドは生物学的サンプル適合性マトリクスに結合される、工程；

様々な該支持体によって達成される複雑性の減少の差異を同定する工程；ならびに

該差異を使用して支持体を選択する工程、を包含する、方法。

【請求項38】 前記複数の親和性支持体が、1つ以上の多区画格納構造体内に設けられる、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 前記複数の親和性支持体が、複数の多区画格納構造体内に設けられる、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 前記生物学的サンプルの成分を同定する工程、および定量する工程の少なくとも1つをさらに包含する、請求項36に記載の方法。

【請求項41】 前記同定および/または定量する工程が、質量スペクトル分析を含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】 請求項39に記載の方法であって、該方法が、以下：

前記生物学的サンプルを第1の多区画格納構造体に適用する工程であって、ここで1つ以上のコンパートメントが複数の親和性支持体を含む、工程；

該第1の多区画格納構造体の異なるコンパートメント内の支持体によって達成される複雑性の減少の差異を同定する工程；

該差異を使用して、該第1の多区画格納構造体から、支持体含有コンパートメントを選択する工程；

該生物学的サンプル成分の混合サンプルを、第2の多区画格納構造体に適用する工程であって、ここで別個のコンパートメントが、該第1の多区画格納構造体から選択された支持体含有コンパートメントからの1つ以上の支持体を含む、工程；

該第1の多区画格納構造体から選択された支持体含有コンパートメントの異なる支持体によって達成される複雑性の減少の差異を同定する工程；ならびに

前記アレイから支持体を選択し、そして該差異を使用して、該第2の多区画格納構造体で表す工程、を包含する、方法。

【請求項43】 生物学的サンプルの複雑性を減少させるためのキットであって、該キットが、以下：

複数の親和性支持体であって、該複数の親和性支持体が、請求項1に記載されるような生物学的サンプル適合性マトリクスに結合した親水性リガンドのアレイを含み、該生物学的サンプル適合性マトリクスに結合した親水性リガンドが、がコンパートメント収容構造体の別個のコンパートメント内に設けられる、親和性支持体、を備える、キット。

【請求項44】 請求項43に記載のキットであって、ここで、前記親水性リガンドの各々が、以下：

ペプチド骨格；ならびに

複数の親和特性基、および該ペプチド骨格から分枝した親水性基、を含む、キット。

【請求項45】 前記多区画格納構造体が、ウェルプレートを含む、請求項44に記載のキット。

【請求項46】 前記ウェルプレートが、フリットウェルプレートである、請求項45に記載のキット。

【請求項47】 前記多区画格納構造体が、パターン化チップを含む、請求項44に記載のキット。

【請求項48】 前記チップが、Si、Au、Alおよびガラスから選択される材料の基体を含む、請求項47に記載のキット。

【請求項49】 親水性ペプチドであって、該ペプチドが、以下：  
ペプチド骨格；ならびに

複数の親和特性基、および該ペプチド骨格から分枝した親水性基、を含み、ここで、該ペンダント親和特性基の約50%が、親和特性基である、親水性ペプチド。

【請求項50】 前記ペンダント親和特性基の約33%が、共通親和特性を有する、請求項49に記載のペプチド。

【請求項51】 前記ペンダント親和特性基の約67%が、共通親和特性を有する、請求項49に記載のペプチド。

【請求項52】 前記ペンダント親和特性基の約100%が、共通親和特性を有する、請求項49に記載のペプチド。

【請求項53】 前記親水性基が、前記親和特性基と相互作用する、請求項49に記載のペプチド。

【請求項54】 前記親水性基が、前記ペプチド骨格に沿って前記親和特性基を交換する、請求項53に記載のペプチド。

【請求項55】 前記ペプチドが、化学選択的連結基を使用して、生物学的サンプル適合性マトリクスに結合される、請求項49に記載のペプチド。

【請求項56】 請求項4に記載の方法であって、前記親水性生物学的サンプル適合性マトリクスに結合した親水性ペプチドが、以下：

疎水性固相基体上でペプチドを合成する工程であって、該ペプチドが、親和特性を有するペプチド骨格、およびペプチド骨格から分枝する親水性基を

含み、ここで、該ペンダント基の約50%が親和特性基であり、該ペプチドが、生物学的サンプルの生物学的サンプル成分を少なくとも部分的に分離するように構成される、工程；

化学選択的連結基で該ペプチドを終結させる工程；

該ペプチドを、該疎水性固相基体から切断する工程；ならびに

該ペプチドを、該化学選択的連結基を用いて、親水性固相基体に結合する工程、を包含する手順によって、調製される、方法。

【請求項57】 前記ペンダント親和特性基の約33%が、共通親和特性を有する、請求項56に記載の方法。

【請求項58】 前記ペンダント親和特性基の約67%が、共通親和特性を有する、請求項56に記載の方法。

【請求項59】 前記ペンダント親和特性基の約100%が、共通親和特性を有する、請求項56に記載の方法。

【請求項60】 請求項4に記載の方法であって、前記親水性生物学的サンプル適合性マトリクスに結合した親水性ペプチドが、以下：

疎水性固相基体上でペプチドを合成する工程であって、該ペプチドが、親和特性を有するペプチド骨格、および該ペプチド骨格から分枝する親水性基を含み、ここで、該ペンダント基の約50%が親和特性基であり、該ペプチドが、生物学的サンプルの生物学的サンプル成分を少なくとも部分的に分離するように構成される、工程；ならびに

前記疎水性基体を親水性基体に変換する工程、を包含する手順によって調製される、方法。

【請求項61】 前記ペンダント親和特性基の約33%が、共通親和特性を有する、請求項60に記載の方法。

【請求項62】 前記ペンダント親和特性基の約67%が、共通親和特性を有する、請求項60に記載の方法。

【請求項63】 前記ペンダント親和特性基の約100%が、共通親和特性を有する、請求項60に記載の方法。

【請求項64】 前記疎水性基体が、疎水性保護基を除去する脱保護反応に

よって、親水性基体に変換される、請求項60に記載の方法。

【請求項65】 生物学的サンプルを処理する方法であって、該方法が、以下：

生物学的サンプルを複数の親和性支持体に適用する工程であって、該支持体の各々は親水性リガンドを含み、該リガンドは、生物学的サンプル適合性親水性マトリクスに結合され、該リガンドは、複数の親和特性基、および骨格から分枝した親水性基を含み、そして生物学的サンプルの生物学的成分を少なくとも部分的に分離するように構成される、工程；ならびに

並行して、該サンプルの成分を、該親和性支持体を使用して分画し、濃縮分画を生成する工程、を包含する、方法。

【請求項66】 前記濃縮分画が、前記親和性支持体に結合しない生物学的サンプルの部分を含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】 前記濃縮分画が、前記親和性支持体に最初に結合する生物学的サンプルの部分を含む、請求項65に記載の方法。

【請求項68】 前記濃縮分画が、前記親和性支持体から単一溶離分画として溶離する生物学的サンプルの部分を含む、請求項67に記載の方法。

【請求項69】 前記濃縮分画が、前記親和性支持体から複数の溶離分画として溶離する生物学的サンプルの部分を含む、請求項67に記載の方法。

【請求項70】 請求項65に記載の方法であって、前記親水性リガンドの各々が、以下：

ペプトイド骨格；ならびに

複数の親和特性基、および該ペプトイド骨格から分枝した親水性基、を含む、方法。

【請求項71】 生物学的サンプルを処理する方法であって、該方法が、以下：

該生物学的サンプルを、親水性リガンドを含む第1の親和性支持体に適用する工程であって、該リガンドが、生物学的サンプル適合性親水性マトリクスに結合され、該リガンドが、複数の親和特性基、および骨格から分枝した親水性基を含み、そして、該生物学的サンプルとの第1の親和性相互作用に従って、生物学的

サンプルの成分を少なくとも部分的に分離するように構成される、工程；

該生物学的サンプルの成分を、該第1の親和性支持体を使用して分画して、濃縮分画を提供する工程；

該濃縮分画を、親和性リガンドを含む第2の親和性支持体に適用する工程であって、該第2のリガンドが、生物学的サンプル適合性親水性マトリクスに結合され、該リガンドが、複数の親和特性基、および骨格から分枝した親水性基を含み、そして、該生物学的サンプルとの第2の親和性相互作用に従って、生物学的サンプルの成分を少なくとも部分的に分離するように構成される、工程；ならびに

該濃縮サンプル分画の生物学的サンプル成分を、該第2の親和性支持体を使用して分画して、2倍に濃縮された分画を提供する工程、を包含する、方法。

【請求項72】 請求項71に記載の方法であって、前記親水性リガンドの各々が、以下：

ペプチド骨格；ならびに

複数の親和特性基、および該ペプチド骨格から分枝した親水性基、を含む、方法。

【請求項73】 請求項71に記載の方法であって、該方法が、1つ以上の追加の親和性支持体を使用する、すでに濃縮された分画の1つ以上の追加の適用および分画をさらに包含し、該1つ以上の追加の支持体の各々は、親水性リガンドを含み、該1つ以上の追加のリガンドは、生物学的サンプル適合性親水性マトリクスに結合され、該1つ以上の追加のリガンドは、複数の親和特性基、および骨格から分枝した親水性基を含み、そして、該すでに濃縮された分画とのさらなる親和性相互作用に従って、生物学的サンプルの成分を少なくとも部分的に分離するように構成される、方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の背景)**

本発明は、生物学的サンプルの精製ならびにこのような生物学的サンプルの成分のディファレンシャルディスプレイおよび分析のための、技術ならびに材料に関する。1つの実施形態において、本発明は、タンパク質精製およびプロテオーム ( proteome ) ディファレンシャルディスプレイに関する。

**【0002】**

生物学的サンプルの成分 ( 例えば、タンパク質、核酸など ) を精製するための現在の方法論は、いくつかの市販の親水性固体支持体に頼っている。従来のクロマトグラフィー支持体としては、陰イオン交換支持体 ( 例えば、ジエチルアミノエチル ( DEAE ) Sepharose など )、陽イオン交換支持体 ( 例えば、カルボキシメチル官能基を有するもの )、逆相支持体および疎水性相互作用支持体が、挙げられる。これらの材料は、生物学的サンプルの成分 ( 例えば、タンパク質 ) を非常に大まかにしか区別し得ず、従って、生物学的サンプルの成分 ( 特に、同様の陰イオン性、陽イオン性などの特徴のタンパク質 ) を分離するその能力が、制限される。

**【0003】**

現在利用可能な他の分離技術は、非常に特異的である。例えば、抗体、タンパク質、糖などをベースとする、親和性クロマトグラフィー支持体が利用可能であり、例えば、Use of antibody fragments in immunoaffinity chromatography : comparison of FV fragments , VH fragments and paralog peptides、Berry , M . J . ; Davies , J . , J . Chromatogr . ( 1992 ) 597 ( 1 ~ 2 ) 239 ~ 45 に記載される。しかし、まさに、従来のクロマトグラフィー支持体が大まか過ぎて、代表的には生物学的サンプルを含む化学物質の複合混合物の限定された分離以上のものは提供できないのと同様に、従来の親和性支持体は、特異的過ぎて、対応する特定の標的または抗原以外は、このような混合物の多くの成分の有用な

分離は提供できない。

【0004】

従って、現在利用可能なこれらの分離の選択肢はいずれも、生物学的細胞サンプルおよび組織サンプルに代表的に見出される生物学的サンプル成分の複合混合物の分離において特に有効というわけではない。現在の新規クロマトグラフィー材料の開発は、ペプチド-樹脂複合体、タンパク質-樹脂複合体、または低分子-樹脂複合体のスクリーニングをベースとしている。しかし、これらのアプローチは、多様性、生物学的安定性/化学的安定性および大スケール産生に関して、制限を有する。

【0005】

生物学的サンプル成分の分離への別の可能なアプローチは、電気泳動（特に、二次元ゲル電気泳動）の使用を介する。二次元ゲルは、生物学的サンプル（例えば、細胞溶解物または組織サンプル）について泳動され得、1つの次元でpHに基づいて分離し、そしてもう1つの次元で分子量に基づいて分離する。しかし、この技術は、混合物中の非常に豊富なタンパク質が、より豊富でないタンパク質をしばしば隠すという事実に起因して、厳しい特異性の制限を有する。さらに、この技術は、低処理量しか有しておらず、そして大スケール産生には適さない。

【0006】

複合生物学的サンプルから生物学的成分を分離および精製することに加え、そのサンプル成分を特徴付けることもまた、有用である。異なる表現型を有する2つの生物学的サンプルの成分の比較によって、そのサンプル間の差異の源の同定が可能であり得る。例えば、健常組織サンプルと同じ型の疾患組織サンプルのこのような示差的分析を実施することによって、その疾患の原因を同定すること、および/またはその疾患の表現型症状を特徴付けることが、可能であり得る。このアプローチは、遺伝子（核酸）レベルで重要な注意を払われており、そして「遺伝学」の分野の発展が見受けられる。

【0007】

この遺伝学的アプローチの1つの特定の適用が、M. R. Martzenら、  
A Biochemical Genomics Approach for

Identifying Genes by the Activity of Their Products、Science、Vol.286、November 5, 1999に記載されており、この論文は、本明細書中で参考として援用される。しかし、このアプローチは、診断適用および薬物開発適用にこのアプローチ自体を加えないかもしれない。

【0008】

このアプローチは、遺伝子産物(タンパク質レベル)では、ほとんど注意を払われていない。しかし、より最近では、「プロテオミクス(proteomics)」の分野が発達し始めている。示差的遺伝子発現を分析するプロテオミクスアプローチは、魅力的である。異なる生物学的サンプルにおける遺伝子の差異と、その関連する細胞、組織、または生物において観察される異なる表現型(例えば、疾患状態に対する健常状態)との間に相関関係が存在し得るが、遺伝子の差異は、必ずしも遺伝子発現の差異としてその差異を表さない。一方、プロテオミクスは、研究中のサンプルのタンパク質の構成に基づく分析に重点を置くことによって、遺伝子発現の差異を直接取り扱う。しかし、プロテオミクスアプローチの有効性は、現在利用可能な物質および技術が研究中の生物学的サンプルを高い分離能でディファレンシャルディスプレイすることを提供する能力によって、制限される。例えば、Kauvarら(例えば、米国特許第5,599,903号、Preparation of glutathione analogs and paralog panels comprising glutathione mimics as affinity ligands and glutathione transferase inhibitors; 国際特許出願番号WO 9106356、Methods and kits to identify analyte-binding ligands using paralog panels; 国際特許出願番号WO 8909088、Paralog substrates for affinity chromatography, their selection, and their use; およびParalog chromatography、Kauvar, Lawrence M.ら、BioTechniques(1990

）8（2）204～9は、タンパク質混合物を分離することにおける使用のための、クロマトグラフィー支持体上に載せられたペプチドの使用を記載している。しかし、これらのペプチドベースの分離材料は、タンパク分解性分解を受け、従って、有用性が制限されている。

【0009】

従って、生物学的サンプル成分混合物の改良された分離を容易にし、ならびにプロテオミクス分析の有効性を高める、技術および材料の開発が望ましい。

【0010】

（発明の要旨）

上記のことを達成するために、本発明は、非常に大まかな結合親和性しか有さないかまたは非常に特異的な結合親和性を有する従来の材料と比較して、生物学的サンプルについて中間の結合親和性を有する、親和性支持体材料を提供する。本発明により提供される材料の中には、生物学的サンプルと適合性である親水性マトリクスに結合した親水性リガンドから構成される、親水性固体支持体がある。本発明に適用可能な適切な生物学的サンプルは、事実上すべての型または供給源であり得る。これらの型または供給源としては、例えば、以下が挙げられる：規定された細胞株（例えば、腫瘍細胞株、細菌、ウイルス感染細胞、レプリコンなど）由来の細胞；生物学的液体（例えば、血液、尿、唾液、または粘液）；生物学的表面から、例えば、洗浄（wash）（例えば、洗浄（lavage））または綿棒（例えば、パパニコラウ染色塗抹標本または咽喉培養物）から収集された細胞；ならびに組織サンプル由来の細胞（例えば、疾患組織および/または非疾患「正常」組織の生検から得た細胞）。これらの生物学的サンプルは、均質（すなわち、単一の供給源由来）であっても、または不均質（すなわち、2つ以上の関連しない供給源由来）であってもよい。本明細書中に記載されるリガンドは、骨格から垂れ下がった親和性特性基および親水性基を含み得、そして上記に規定されるような生物学的サンプルの成分を少なくとも部分的に分離するように形成され得る。このような親和性特性基および親水性基は、本明細書中で以下に記載される方法を使用して選択され得る。

【0011】

本発明による親和性支持体は、種々の技術および装置において用いられて、複雑な生物学的サンプルの改善された分離を達成し得、それにより、生物学的サンプル成分の分離、分画、濃縮、精製、発現産物の決定および比較、ならびに他の生物学的サンプルの処理技術および分析技術の結果を増強し得る。さらに、親和性支持体は、新規なタンパク質精製のような適用のために生物学的サンプルを処理する際に有用なキット中に含まれ得る。

#### 【0012】

本発明のいくつかの実施形態では、この親和性支持体の親水性リガンドは、ペプチド骨格から張り出した ( p e n d e n t ) 親和性特性基および親水性基の両方を有するペプチドであり得る。種々のペプチド構造、ならびに適切な特性を有するペプチドおよび適切な範囲の特性を有するペプチドのアレイを設計および作製するためのパラメーターもまた提供される。

#### 【0013】

1つの局面では、本発明は、生物学的サンプルについての生物学的サンプル成分の発現パターンを提供するための方法を提供し、この方法は、生物学的サンプルを、生物学的サンプルに適合可能なマトリクスに結合された1以上のリガンドに適用する工程を包含する。このリガンドは、骨格から張り出した複数の親和性特性基および親水性基を含み得、そして生物学的サンプルの生物学的サンプル成分を少なくとも部分的に分離するように形成され得る。このサンプルの成分は、1以上の親水性リガンドを用いて分画されて濃縮分画を提供し得、そして生物学的サンプルについての生物学的サンプル成分の発現パターンは、濃縮された分画を用いて決定され得る。

#### 【0014】

他の実施形態では、本発明は、生物学的サンプル表現型を比較する方法、生物学的サンプルの複雑さを低減する方法、多数の親和性支持体で生物学的サンプルを一次元および二次元の両方で大規模に並行処理する方法、ならびにこれらの方法を達成する際に有用な親和性支持体を取り込んだ材料およびキットを提供する。本発明に従って親和性支持体（特に、ペプチド骨格から張り出した親和性特性基および親水性基の両方を有し、親水性マトリクスに結合されたペプチドを

含む支持体)を作製する方法もまた提供される。

【0015】

本発明のこれらおよび他の特徴および利点は、例によって、本発明の原理を例示する、本発明の以下の明細書および添付の図面にさらに詳細に提示される。

【0016】

(発明の実施形態の詳細な説明)

本発明の親和性支持体材料ならびに関連する技術および装置は、ここで、いくつかの実施形態を参照して記載される。記載された実施形態の重要な特性および特徴は、本文および添付の図面において構造において例示される。本発明をこれらの実施形態に関連して記載するが、本発明は、これらの実施形態に限定されるとは意図されないことが理解されるべきである。一方、添付の特許請求の範囲によって規定されるような、本発明の趣旨および範囲内に含まれ得るような、代替物、改変物および等価物を包含することが意図される。以下の説明では、多数の特定の詳細が、本発明の完全な理解を提供するために示される。本発明は、これらの特定の詳細のいくつかまたは全てを伴わずに実施され得る。他の例では、周知のプロセス操作は、本発明を不必要に不明確にしないように、詳細には記載されていない。

【0017】

(1. 序論)

本発明は、従来の材料と比較して、生物学的サンプルについての間中でかつ制御可能な結合親和性を有する親和性支持体材料を提供する。本明細書中で使用される場合、「間中でかつ制御可能な結合親和性支持体材料」とは、タンパク質 - タンパク質相互作用、タンパク質 - オリゴヌクレオシド(オリゴヌクレオチド)相互作用またはオリゴヌクレオシド(オリゴヌクレオチド) - オリゴヌクレオシド(オリゴヌクレオチド)相互作用に類似した、イオン性相互作用、ファンデルワールス相互作用および水素結合相互作用の組み合わせによって、生物学的サンプルの構成成分と、相互作用し得る材料をいう。従って、タンパク質およびヌクレオチド化学の分野の当業者は、本発明の支持体材料が、生物学的サンプルの成分を分離するための先行技術によって教示される材料とは有意に異なることを認

識する。なぜなら、先行技術によって教示される材料は、単に、生物学的サンプル成分との（例えば、電荷に基づく）非常に一般的かつ制御不能な相互作用を、または非常に特異的かつ制御された（例えば、抗体に基づく）結合親和性を用いるが、これらの極端なものの中のものはないからである。一般に、本発明によって提供される支持体は、代表的には1つの官能基に基づく一般的樹脂（例えば、陰イオン交換樹脂または陽イオン交換樹脂）および単一の特異的標的構成成分について選択されたいくつかの官能基の特定の組み合わせに基づく高度に特異的な親和性樹脂の特性を合わせる。本明細書中に記載される支持体は、多くの官能基を有するが、平均して、これらは、先行技術の高度に特異的なアレイよりも特異的が低く規定され得る。それゆえ、この支持体は依然として、多くの場合に高親和性を生じるが、親和性樹脂よりも広い特異性を有し得る。

#### 【0018】

本発明によって提供される材料の中には、生物学的サンプル（例えば、細胞株、血液もしくは組織に由来するサンプルまたは細胞溶解産物）と適合可能な親水性マトリクスに結合された親水性リガンドから構成される親水性固体支持体がある。生物学的サンプルに適合可能な親水性マトリクスは、生物学的サンプルの成分とマトリクスとの間の相互作用を実質的に最小にするに効果的なマトリクスである。従って、本明細書中に記載されるような適合可能なマトリクスは、タンパク質分解性分解に対して耐性であり、そして生物学的サンプルの成分（例えば、タンパク質）による比較的低い非特異的結合（ときどき、タンパク質吸着に耐性とも呼ばれる）を提供することが化学の分野の当業者によって認識される。リガンドは、骨格から張り出した親和性特性基および親水性基を含み得、そして生物学的サンプルの成分を少なくとも部分的に分離するように形成される。

#### 【0019】

本発明に従う親和性支持体は、種々の技術および装置において使用され、複雑な生物学的サンプルの改善された分離を達成し得、そしてそれによって生物学的成分の分離、分画、濃縮、精製、発現産物の決定および比較、ならびに他の生物学的サンプルの処理技術の結果を増強し得る。さらに、この親和性支持体は、生物学的サンプルの処理に有用なキットに含まれ得る。

## 【0020】

生物学的成分（例えば、タンパク質）を固相連結リガンドに曝露するために、この固相は、高い親水性特性を有さなければならない。さもなければ、非特異的な結合が生じ、そして低度の分離が得られる。従って、本発明は、広範な種々の化学官能性または化学特性を提示するように構成され得るリガンド分子を提供し、これは、親水性状況下での生物学的サンプルに対する中間の結合親和性を有する親和性分離支持体内への組み込みに適切である。この親水性状況は、親水性特性および親和性特性の基を分子骨格に挿入することによって提供される。親水性基の機能は、しばしば疎水性である多様な側鎖の存在下で、親和性リガンドの実質的な水溶性を提供することである。この親水性基はまた、大きい疎水性パッチを妨げることによって、この親和性リガンドの凝集を妨げる。水溶性は、生物学的サンプル成分（特に、タンパク質）の分離に使用される、親水性固体支持体の効率的な誘導体化を可能にする。

## 【0021】

適切な親和性支持体は、高い親水性特性を保持しなければならないが、リガンドの合成は、一般的に、有機的な環境を必要とする。従って、以下に詳細に記載されるように、本発明は、有機溶媒中で、かつ疎水性樹脂（例えば、ポリスチレン）上での固相有機合成によって、多様なリガンドを合成する方法を提供する。次いで、これらのリガンドは切断され、そして水性緩衝液中に溶解されて、生物学的サンプルの適用に適切な親水性基体（例えば、セファロース）へのそれらの結合を容易にする。本発明に従って、有機溶媒中で、かつ疎水性樹脂上での固相有機合成によってリガンドを合成し、そしてその後、この樹脂を親水性基体へ変換することもまた可能であり、これは、ある基体から別の基体へのリガンドの転移の必要性を排除する。他の方法は、同時係属中の米国特許出願第08/828,195号（1997年、3月21日出願）に記載され、これは、その全体として、かつ全ての目的のために、本明細書中で参考として援用される。

## 【0022】

## (2. ペプチド)

本発明のいくつかの実施形態において、この親和性支持体の親水性リガンドは

、「ペプチド」であり得、これらは、それらの骨格に結合する親水性特性の基および親水性基の両方を有する。一般的に言えば、「ペプチド」は、ポリ(N置換型グリシン)であり、これは、タンパク質の骨格構造を有するが、従来のアミノ酸基とは全くまたは一部異なる結合基を有する。ペプチドは、当該分野で公知であり、そして種々の刊行物(米国特許第5,877,278号、同第5,977,301号、同第5,831,005号および同第5,811,381号(これらの各々は、全ての目的のために本明細書中で参考として援用される)を含む)に記載される。上記のように、本発明に従うリガンドは、親水性特性および親水性特性の基をリガンドの分子骨格に挿入することによって、親水性特性を与えられ得る。

#### 【0023】

本発明に従う親水性ペプチドは、生物学的サンプルのタンパク質成分の分離、精製および他の処理に特に適用可能である。本開示の他の箇所では、種々のタンパク質処理技術に関連する親水性ペプチドの構造、合成および適用に焦点を当てるが、本発明は、本明細書中に提供される原理に従う、中間の親水性クロマトグラフィー支持体を用いた生物学的サンプル成分の処理に、より一般的に適用可能であることが理解されるべきである。従って、本発明は、生物学的サンプル適合性マトリクスに結合される、ペプチド以外の親水性リガンド分子、およびタンパク質以外の生物学的サンプル成分(核酸、脂質などを含む)の処理のためのそれらの使用を包含することが意図される。

#### 【0024】

ペプチドは、クロマトグラフィー支持体材料の特に良好な候補である。これらは、コンビナトリアル合成に受け入れやすく、そして利用可能な何百もの異なる側鎖を用いて、支持体特性を精巧に調整ことが可能である。ペプチドは、プロテアーゼ安定性であり、例えば、粗細胞溶解物と共に、そのようなサンプルに通常存在するプロテアーゼによる有意な分解の危険性を伴わずして、使用され得る。これらは、化学的および熱的に安定であり、これは、支持体の再生および再利用を可能にする。さらに、ペプチドは、比較的単純な固定化化学を有し、これは、ラージスケールの生産のために容易にスケールアップされる。

## 【0025】

図1は、本発明の1つの実施形態に従う、親水性ペプチド100を示す。この示された実施形態において、メトキシエチル側鎖1010は、親水性エレメント106として使用される。この側鎖は、安価でかつ保護を必要としないので、所望される。あるいは、とりわけ、ヒドロキシルモノマー（例えば、ヒドロキシエチルアミン103、1-ヒドロキシエチル-2-ヒドロキシエチルアミン104および2,3-ジヒドロキシプロピルアミン105）が、使用され得る。図1に示される実施形態において、親水性エレメント106は、各特性（親和性）エレメント107の間に挿入されるが、これは、親水性基および親和性基が、リガンドの水溶性を確実にする機能を達成する任意の構成にある骨格102分散され得る場合には、必要ではない。

## 【0026】

もちろん、特定のペプチド中の親水性基の数は、そのペプチド中に含まれる親和性基の親水性/疎水性特性に依存する。親水性および疎水性の親和性基の配置は、高度に両親媒性のペプチド構造が回避されるようにあるべきである。このような構造は、凝集してミセルを形成し得、従って、その基体との効率的な分離および/または結合を達成する、それらの能力を損なう。合成の間、ペプチドリガンド100は、代表的に、有機合成反応を容易にするために親水性基体に結合される（示さず）。リガンド100はまた、化学選択的な連結基108（例えば、マレイミドプロピオニル）を有する。これは、リガンドの遊離N末端に結合され、親水性支持体へのその後の結合を可能にする。一旦、有機合成が完了されると、ペプチドリガンド100は、疎水性樹脂から切断され得、そして水性緩衝液に溶解され、水性の生物学的サンプルの敵容易適切な親水性支持体（例えば、セファロース）へのその結合を容易にする。

## 【0027】

上記のように、このペプチドリガンドは、適切な化学選択的末端基（例えば、マレイミドプロピオニルのようなマレイミド）を有し得る。これは、親水性支持体の表面上に提示されるチオールと反応して共有結合を形成し得る。リガンド上の他の可能な末端基としては、ヒドラジド（これは、支持体上のアルデヒド部

分またはケトン部分と反応して共有結合を形成し得る) ; アミノオキシ (これは、支持体上のアルデヒド部分またはケトン部分 (あるいは合成的な等価物) と反応して共有結合を形成し得る) ; アルデヒド (これは、ヒドラジド基またはアミノオキシ基と反応して共有結合を形成し得る) ; ジスルフィド (これは、チオール基と反応して共有結合を形成し得る) ; チオール (これは、ジスルフィド基またはマレイミド基と反応して共有結合を形成し得る) 、アジド、ホスフィン、またはアビジン (これは、支持体上のビオチン部分と反応して安定な非共有結合複合体を形成し得る) が挙げられる。もちろん、この特徴の他の適切な結合の組み合わせ (つまり、支持体結合ペプチドリガンドがその正常な操作条件下で供される処理の間で、その結合を維持するのに十分安定であるこれらの組み合わせ) もまた、可能である。さらに、表面化学分野に当業者は、ペプチドリガンド上の上記に列挙した末端基が、その表面上の反応性基として機能し得、そしてこの反応性の表面基がまた、末端ペプチドリガンド基として機能することを理解する。

#### 【0028】

あるいは、上記のように、疎水性基体は、親水性基体へ変換され得、これは、ある基体から別の基体へのペプチドの転移の必要性を排除する。例えば、この基体は、種々の除去可能な疎水性部分であり得る。1つの実施形態において、疎水性基体は、アルキルシリルエーテル (例えば、tert-ブチルジメチルシラン (TBDMs)) で保護されたヒドロキシアルキルアシルアミドを使用して形成される。これは、標準的な条件を使用して除去されて、疎水性基体を提供し得る。

#### 【0029】

図2Aおよび図2Bは、疎水性基体上に親水性リガンドからなる親和性支持体を生成するための2つのプロセスを示す。図2Aのプロセスにおいて、210 (リガンド214) は、上記のようなペプチドまたは別の適切な分子であり得、これは、疎水性基体212 (例えば、ポリスチレン) 上に合成される。化学選択的連結基 ( $R_1$ ) 216 は、疎水性基体結合リガンド214の遊離N末端に結合される。C末端または任意の適切な側鎖もまた、この化学選択的連結基の結合点

として作用し得る。有機合成の完了後、リガンド214は疎水性基体212から切断され、そして親水性基体218（例えば、チオセファロース）に、その化学選択的連結基216を介して再結合される。もちろん、親水性基体および疎水性基体は、当業者に明らかなように、種々の材料から作製され得る。

#### 【0030】

あるいは、化学選択性(chemoselective)連結基が存在しないが、第1のプロセス210におけるように、図2Bのプロセス220に従って、リガンド224が疎水性基体222上で合成される。有機合成の完了に続いて、疎水性基体222が改変され、疎水性基体222を親水性基体222mに変換する。例えば、この基体は、利用可能なヒドロキシル部分上の保護基（例えば、 $-OSiR_3$ ）の存在によって、疎水性にされ得た。この場合、基体は、保護基の除去によって親水性の状態に変換されて、有機合成の完了に続いて自由なヒドロキシル( $-OH$ )基を提供し得る。この代替のプロセスにおいて、切断および再結合は必要ではない。

#### 【0031】

上記のように、ペプチドは、クロマトグラフィー支持体材料のための特に良好な候補である。なぜなら、部分的に、合成プロセス間に利用可能な数百もの多様な側鎖の中から選択することによって、支持体の特性を精功に変更することが可能であるからである。従って、ペプチドは、タンパク質中に見出される主要な化学官能基のいくつかを模倣するために、使用され得る。特定の分離を実施するためのもっとも良好なペプチドを決定するために、複数の親和性を有するペプチドのアレイを有することが所望される。次いで、生物学的サンプル（例えば、細胞溶解物）が、ペプチドのアレイに対して平行に流され得、そして分離結果が比較された。次いで、最も良好な性能を有するペプチド（単数または複数）が、実際の分離においての使用のために選択され得る。

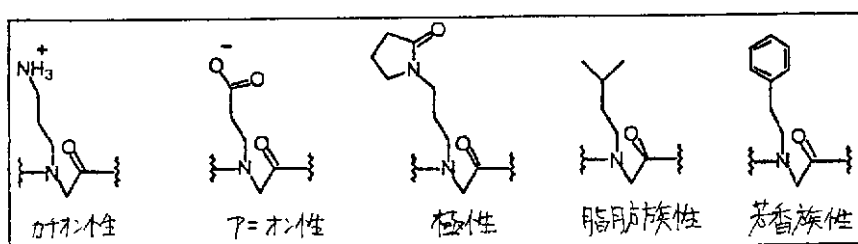
#### 【0032】

複数の親和性を有するペプチドのアレイを組み立てるための1つの技術は、タンパク質中に共通して見出される1つ以上の特性を代表する物理化学(physicochemical)的な特性を有する側鎖を同定し、次いで、親水性側

鎖と組合せて、種々の順列でこれらの側鎖を組合せることである。本発明に従う1つのこのようなアプローチは、5つの異なる物理化学的な特性（カチオン性、アニオン性、極性、脂肪族性および芳香族性）を示す5つの異なる側鎖が、25個の12量体のアレイに組み込まれる。このアプローチのために選択された5つの側鎖を以下に示す：

【0033】

【化1】



他の適切な側鎖は、有機化学および生物化学分野の当業者に明らかである。

【0034】

25個の12量体は、以下の表1AおよびBに示される行列（matrix）に従って構築された：

【0035】

【表1】

単一特性樹脂				互いの2つの特性の組合せの樹脂				
	低	中	高	カチオン性	アニオン性	極性	脂肪族性	芳香族性
カチオン性	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
アニオン性	✓	✓	✓			✓	✓	✓
極性	✓	✓	✓				✓	✓
脂肪族性	✓	✓	✓					✓
芳香族性	✓	✓	✓					

表 1A

表 1B

表1Aは、親和性特性のそれぞれが、低レベル（12量体中の12個の側鎖中の2個）、中レベル（12個の中の4個）、および高レベル（12個中の6個）

でのアレイを表す(15個の12量体)ことを示す。図1Bは、アレイが5つの異なる特性の全ての2つの特性の組合せをどのように含むのかを示す(10個の12量体)。アレイのリガンドは、図3A~Cに模式的に示される。図3Aのリガンドは、顕著なアニオン性の特性を有する。図3Bのリガンドは、顕著な疎水性の特徴を有する(リガンドのうちの5個は、強いアニオン性および疎水性に特性の両方を有する)。図3Cのリガンドは、顕著なカチオン性の特性を有する。

#### 【0036】

上記のアレイは、本発明に従って合成されるペプチドに可能な複数の親和性の代表である。親和性特性のそれぞれを示す親和性基は、使用され得るいくつかの可能な側鎖のただの例である。上記のように、数百の多様な側鎖がペプチド合成において利用可能であり、これには、例えば、多くの天然またはノル-アミノ酸、非天然アミノ酸、ヌクレオチド塩基、酵素補因子、または糖から誘導されるものが挙げられる。さらに、等比体積および/または等電子的特性を有する、公知のアミノ酸側鎖および/またはヌクレオチド塩基の側鎖、あるいはそれらの代用物を使用され得る。非天然アミノ酸側鎖の例は、米国特許第5,656,660号に記載され、本明細書中に参考として援用される。

#### 【0037】

他の可能な側鎖は、以下から誘導されるものであるが、これらに限定されない：  
酢酸ヒドラジド(acetic hydrazide)、N-アセチルエチレンジアミン、1-アダマンタミン(1-adamantamine)、2-アダマンタミン・HCL、1-アダマンタンメチルアミン、アラニン、 $\beta$ -アラニン、アラニンアミド、アリルアミン、O-アリルヒドロキシルアミン、3-アミノ-1,2-プロパンジオール、2-アミノ-1,3-プロパンジオール、4-アミノ-1-ベンジルピペリジン、2-アミノ-1-ブタノール、4-アミノ-1-ブタノール、6-アミノ-1-インダノン、5-アミノ-1-ナフトール、5-アミノ-1-ペンタノール、2-アミノ-1-フェニルエタノール、3-アミノ-1-プロパノール、5-アミノ-2-メトキシピリジン、1-アミノ-2-プロパノール、アミノアセトニトリル、4-アミノベンズアミド、4-メチルベンジルシアニド、4-アミノビフェニル、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸

、 1 - アミノシクロヘキサン - 2 , 3 - ジオール、 1 - アミノシクロヘキサン - 3 , 4 , 5 - トリオール、 トランス - 4 - アミノシクロヘキサノール、 アミノジフェニルメタン、 3 - アミノ - N ' , N ' - ジデシルプロパンアミド、 3 - アミノ - N ' , N ' - ジヘキシルプロパンアミド、 3 - アミノ - N ' , N ' - ジオクチルプロパンアミド、 3 - アミノ - N ' , N ' - ジフェネチルプロパンアミド、 2 - アミノエタノール、 N - (アミノエチル)カルバゾール、 2 - アミノエチルメタクリレート、 4 - (2 - アミノエチル)モルホリン、 (2 - アミノエチル)フェニルアミン、 アミノメチルホスホネート、 2 - (2 - アミノエチル)ピリジン、 アミノエチル - 5 - (2 , 3 - ジクロロチオフェニル)スルホンアミド、 N - アミノエチルチミン、 2 - (2 - アミノエトキシ)エタノール、 6 - アミノガラクトース、 2 - アミノヘプタン、 1 - アミノインダン、 2 - アミノインダン、 5 - アミノインダン、 5 - アミノインドール、 4 - アミノメチルベンゼンスルホン酸、 2 - (アミノメチル)ベンズイミダゾール、 4 - (アミノメチル)安息香酸、 (アミノメチル)シクロヘキサン、 トランス - 4 - (アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸、 (アミノメチル)シクロプロパン、 2 - (アミノメチル)ピリジン、 3 - (アミノメチル)ピリジン、 4 - (アミノメチル)ピリジン、 5 - アミノメチル - 2 - ナフタレンスルホン酸、 2 - アミノ - 5 - メチルオクタン、 2 , 2 - アミノメチルフェニルチオベンジルアルコール、 1 - アミノナフタレン、 2 - アミノナフタレン、 1 - (4 - アミノフェニル) - エチルアミン、 4 - アミノフェニルフェニルエーテル、 2 - (4 - アミノフェニル) - エチルアミン、 2 , 4 - (アミノフェニル)エチルアミン、 2 - アミノプロパン - 1 , 3 - ジオール (2 - aminopropan - 1 , 3 - diol)、 3 - アミノプロパノール、 1 - (3 - アミノプロピル) - 2 - ピロリジノン、 1 - (3 - アミノプロピル)イミダゾール、 4 - (3 - アミノプロピル)モルホリン、 3 - アミノピリジン、 4 - アミノスチレン、 アミルアミン、 アニリン、 アルギニン、 アスパラギン酸、 ベンゼンスルホニルヒドラジド、 1 , 4 - ベンゾジオキサン - 6 - アミン、 安息香酸ヒドラジド (benzoichydrazide)、 ベンジルカルバゼート、 N - ベンジル - 2 - フェネチルアミン、 ベンジルアミン、 O - ベンジルヒドロキシルアミン、 ビフェニルアミン、 1 , 4 - ビス (3 - アミノプロピル)

ピペラジン、3,5-ビス(トリフルオロメチル)ベンジルアミン、3-ブトキシプロピルアミン、t-ブチルカルバゼート、4-t-ブチルシクロヘキシルアミン、O-t-ブチルヒドロキシシルアミン、t-ブチルアミン、ブチルアミン、4-ブチルアニリン、4-sec-ブチルアニリン、3-クロロアニリン、4-クロロアニリン、2-クロロ-6-フルオロベンジルチオエチルアミン、2-(2-クロロフェニル)エチルアミン、2-(3-クロロフェニル)エチルアミン、2-(4-クロロフェニル)エチルアミン、5-クロロチオフエン-2-スルホンヒドラジド、シクロヘブチルアミン、2-(1-シクロヘキセニル)エチルアミン、シクロヘキシルアミン、4-シクロヘキシルアニリン、シクロペンチルアミン、シクロプロピルアミン、システアミン、2-(デシル)-ドデシルアミン、デシルアミン、デヒドロアビエチルアミン、1,4-ジアミノブタン、トランス-1,4-ジアミノシクロヘキサン、N,N-ジ-(2-アミノエチル)アミン、1,5-ジアミノナフタレン、1,3-ジアミノプロパン-2-オール、1,3-ジアミノプロパン、N,N-ジベンジルグリシンアミド、3,4-ジクロロベンジルアミン、N,N-ジヘキシルグリシンアミド、2,3-ジヒドロキシプロピルアミン、6,7-ジメトキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン、4,4'-ジメトキシベンズヒドリルグリシンアミド、2,3-ジメトキシベンジルアミン、3,5-ジメトキシベンジルアミン、2,4-ジメトキシベンジルアミン、3,4-ジメトキシフェネチルアミン、3-ジメチルアミノプロピルアミン、3,4-ジメチルアニリン、N,N-ジメチルエチレンジアミン、2,4-ジメチルブチルアミン、3,7-ジメチルオクチルアミン、3,3-ジフェニル-2-プロペンアミン、1,2-ジフェニルエチルアミン、2,2-ジフェニルエチルアミン、3,3-ジフェニルプロピルアミン、ドデシルアミン、エピネフリン、エタノールアミン、3-エトキシプロピルアミン、2-(4-エトキシ)フェネチルアミン、エチルアミン、4-エチルアニリン、エチレンジアミン、2,2'-(エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン)、2-エチルヘキシルアミン、2-エチルピペコリネート、1-エチルプロピルアミン、エチルトリプタミン、9-フルオレンアミン、4-フルオロベンジルアミン、N-(2-フルオロフェニル)ピペラジン、フルフリルアミン、D-グルコサミン

、グリシンアミド、グリシン、グリシン - ナフチルアミド、グアニジノエチルアミン、グアニジノプロピルアミン、グアニジノブチルアミン、2 - (4 - グアニジノ)フェネチルアミン、2, 2, 3, 3, 4 - ヘプタフルオロブチルアミン(2, 2, 3, 3, 4 - heptafluorobutylamine)、ヘブチルアミン、1, 6 - ヘキサンジアミン、1, 6 - ヘキサンジアミン、3 - ヘキセニルアミン、ヘキシルアミン、2 - (ヘキシル)オクチルアミン、ヒスタミン、3 - ヒドロキシチラミン、インドリン、4 - ヨードアニリン、イソアミルアミン、イソブチルアミン、3 - イソプロポキシプロピルアミン、イソプロピルアミン、4 - イソプロピルアニリン、4 - メトキシベンゼンスルホニルヒドラジド、4 - メトキシベンジルカルバゼート、2 - メトキシベンジルアミン、3 - メトキシベンジルアミン、4 - メトキシベンジルアミン、2 - メトキシエチルアミン、メトキシアミン(methoxylamine)、2 - メトキシフェネチルアミン、3 - メトキシフェネチルアミン、4 - メトキシフェネチルアミン、3 - メトキシプロピルアミン、メチルヒドラジン、メチルヒドラジノカルボキシレート(methylhydrazinecarboxylate)、N - メチル - 2, 2 - ジフェニルエチルアミン、メチルアミン、 - (メチルアミノメチル) - ベンジルアルコール、4 - メチルベンジルアミン、 - メチルベンジルアミン、2 - メチルブチルアミン、3, 4 - (メチレンジオキシ)アニリン、3, 4 - メチレンジオキシフェネチルアミン、 - メチルフェネチルアミン、4 - メチルフェネチルアミン、シス - ミリタニルアミン(cis-myritanylamine)、1 - (ナフチル)エチルアミン、1 - ナフトレンメチルアミン、ニコチン酸ヒドラジド(nicotinichydrazide)、4 - ニトロ安息香酸ヒドラジド(4-nitrobenzoichydrazide)、p - ニトロフェネチルアミン、3 - ノネニルアミン、ノニルアミン、2 - ノルボルニルアミン、ノルエフェドリン、ノルフェニルエフリン(norphenylephrine)、オクトパミン、オクチルアミン、2, 2, 3, 3, 3 - ペンタフルオロプロピルアミン、フェネルジンスルフェート、2 - フェネチルアミン、2 - (フェノキシ)エチルアミン、3 - フェノキシ - 2 - ヒドロキシプロピルアミン、3 - (フェニル)プロパルギルアミン、1 - フェニル - 1, 2, 3, 4 - テト

ラヒドロイソキノリン、4 - フェニル - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロイソキノリン、3 - フェニル - 1 - プロピルアミン、5 - フェニル - 0 - アニシジン、フェニル酢酸ヒドロジド ( phenylacetic hydrazide )、フェニルアラニン、4 - フェニルブチルアミン、L - フェニルエフリン、4 - フェニルセミカルバジド、1 - ピペラジンカルボキシレート、ピペリジン、ピペロニルアミン、プロパルギルアミン、プロピルアミン、4 - プロピルアニリン、セリン、スペルミン、スペルミジン、1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 1 - ナフチルアミン、テトラヒドロフルフリルアミン、1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロイソキノリン、2 - チオフェン - メチルアミン、p - トルエンスルホンヒドラジド、p - トルイジン、4 - (トリフルオロメチル)ベンジルアミン、3 , 4 , 5 - トリメトキシベンジルアミン、2 , 4 , 6 - トリメトキシベンジルアミン、2 , 4 , 6 - トリメチルベンゼンスルホニルヒドラジド、トリプタミン、ホスホ - チラミン、チラミン、ベラトリルアミン、m - キセニルアミン、m - キシリレンジアミン、および p - キシリレンジアミン。

#### 【0038】

本明細書中で参考として援用される以下の文献はまた、使用され得る側鎖のさらなる例を提供する：米国特許第5 , 877 , 278号、同第5 , 811 , 387号、同第5 , 447 , 916号、同第5 , 480 , 871号、同第5 , 919 , 967号、ならびに国際特許出願第WO91 / 19735号、同第WO96 / 40202号、同第WO96 / 40759号、同第WO97 / 19106号、同第WO94 / 03483号、同第WO95 / 04072号、同第WO98 / 09641号、同第WO98 / 52620号、同第WO97 / 10887号および同第WO99 / 31124号。

#### 【0039】

本発明に従う親水性ペプチドを合成するための親和性基として使用され得る側鎖としては、以下が挙げられる：アルキル、(シクロアルキル)アルキル、(シクロヘテロアルキル)アルキル、アラルキル、およびヘテロアラルキルの群から選択される基(それぞれ、必要に応じて以下で置換されている：オキソ、チア、ハロ、アミノ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、チオ、アミノカルボニル、カル

ボキシ、およびイミノ)。アルキル基、(シクロアルキル)アルキル基、(シクロヘテロアルキル)アルキル基は、さらに以下から選択され得る：メチル、ヒドロキシメチル、プロパ-2-イル、2-メチルプロピル、ピロリジルメチル、メチルチオエチル、1-ヒドロキシエチル、チオエチル、アミノカルボニルメチル、アミノカルボニルエチル、カルボキシメチル、カルボキシエチル、4-アミノブチル、ならびに3-グアニジノプロピル、グアニジノアリアル、ヒドロキシアリアル、アミドアルキル、ホスホニルアルキル、ホスホニルアリアル、オリゴエーテル、およびポリヒドロキシアアルキル。アラルキル基およびヘテロアラルキル基は、さらに以下から選択され得る：フェニルアルキル、ヒドロキシフェニルアルキル、イミダゾリルアルキル、プリニルアルキル、ピリミジニルアルキル、およびインドリルアルキル。糖の例としては、以下が挙げられ、任意の適切な原子で結合される：フラノシルアルキル、ピラノシルアルキル、フラノシル、またはピラノシル。本発明に従う親水性ペプチドを合成するための親水性基として使用され得る側鎖としては、以下の群から選択される基が挙げられる：アルキルオキシアルキル、ヒドロキシアアルキル、チオアルキル、アルキルチオアルキル、アルキルスルフィニルアルキル、アルキルオキシカルボニルアルキル、およびアミノカルボニルアルキル。この側鎖は、例えば、以下のうちの1つでさらに置換され得る：メトキシエチル、ヒドロキシエチル、1,3-ジヒドロキシプロパ-2-イル、2-(ヒドロキシメチル)-1,3-ジヒドロキシプロパ(dihydroxoxyp)rop)-2-イル、および2,3-ジヒドロキシプロピル、アルキルスルホキシドアルキル、ならびにChapman, R.G.; Ostun, E.; Takayama, S.; Holmlin, R.E.; Yan, L.; Whitesides, G.M.; J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 8303-8304において報告されるか、または記載される技術を用いて同定された側鎖。

#### 【0040】

##### (3. キット)

本発明はまた、一連の親和性特性を有する、本発明に従う複数の親水性クロマトグラフィー支持体を含むキットを提供する。1つの実施形態においては、親和

性クロマトグラフィーのためのスクリーニングキットが提供される。図4は、本発明のこのような実施形態に従うキットを図示する。このキット400は、上記のような中間の親和性の親水性クロマトグラフィー支持体のアレイ402を含む。アレイ402からの支持体は、親和性クロマトグラフィーを行うために適切な容器404に分配される。この容器404は、多区画格納構造の別々の区画であり得る。このような構造の1つの代表的な形式は、ミニチュア親和性クロマトグラフィーに適合される96ウェルプレートであり、これらのウェルは底部で閉じられていないが、代わりに、ミニチュア親和性クロマトグラフィーに適する、例えばフリッピングされたウェルプレートである。このようなミニチュアクロマトグラフィーのフリッピングされたウェルプレートは、当業者に公知である。

#### 【0041】

操作において、生物学的サンプル（例えば、細胞溶解物）は、容器404中の支持体402に適用され得、そして溶出物は、サンプル中の標的の生物学的サンプル成分408に対して最良の分離を提供する支持体についてスクリーニングするために、電気泳動ゲル上で電気泳動され得る。次いで、支持体が選択され、そしてこの生物学的サンプルの大規模な処理のために使用され得る。本発明は、このようなキットに構成される場合、親和性分離を行うために望ましい親和性特性を有する支持体を効率的に決定するために、生物学的サンプルの並行処理を有利に可能にするということに留意されるべきである。

#### 【0042】

適切なクロマトグラフィー条件は、当業者に周知である。この条件はまた、所望の分離のための親和性クロマトグラフィー支持体と条件との最適な組み合わせを決定するために、容器の異なるセットにわたって変化し得る。タンパク質を分離するために使用される、ペプチドリガンドに基づく親水性支持体のアレイのためのサンプル条件は、以下の通りであり得る：

#### 【0043】

#### 【表2】

クロマトグラムの型	充填緩衝液	溶出緩衝液
アニオン交換	20 mM Tris; pH 7.0 10 mM NaCl	20 mM Tris; pH 7.0 1.0 M NaCl
カチオン交換	20 mM クエン酸Na; pH 6.0 10 mM NaCl	20 mM クエン酸Na; pH 7.0 1.0 M NaCl
疎水性親和性	20 mM Tris 20% AmSO <sub>4</sub> ; pH 8.0 3 mM EDTA	20 mM Tris 0% AmSO <sub>4</sub> ; pH 8.0 3mM EDTA

表 1

もちろん、他の条件（例えば、洗浄、pH、および勾配の使用および選択）が、生化学およびタンパク質精製分野における当業者に明らかであるように使用され得る。ゲル電気泳動のための条件およびパラメータ（すなわち、ゲルの組成、緩衝液、標識など）もまた、当該分野において周知である。

## 【0044】

本発明に従うキットはまた、ナノスケールのチップ（例えば、ケイ素、ガラス上の金、またはガラス上のアルミニウムで構成されるチップ）上に分散された親水性支持体のアレイを有し得るということもまた留意されるべきである。この点において、本発明は、以下に記載されるような技術を実施し得る：米国仮特許出願第60/141,469号、同第60/209,711号、米国特許第5,744,305号および同第5,874,219号（これらのすべては、本明細書中に参考として援用される）。

## 【0045】

## (4. 適用)

本発明に従う親和性支持体は、同業者に周知の方法に従って親和性クロマトグラフィークラムに装填され得、次いで種々の目的のための分離を行うために使用され得る。これらの適用としては、生物学的サンプル成分（例えば、タンパク質）の精製ならびに示差的なタンパク質発現パターン（例えば、プロテオミク（proteomic））の決定および比較が挙げられる。これらの技術は、他の研究および生産の適用の中で、診断および薬物開発において有用な手段を提供する。

## 【0046】

(生物学的サンプル成分の発現パターンの決定および比較)

図5は、本発明のプロテオミク適用の例を図示する。生物学的サンプル502は、上記のような、生物学的サンプルに適合性の親水性マトリックス(基体)に結合した親水性リガンドで構成される、親水性親和性支持体504に適用される。このリガンドは、少なくとも部分的に生物学的サンプルの成分を分離するように構成された骨格からぶら下がる、親和性特性基および親水性基を含む。サンプルの生物学的サンプル成分は、親水性支持体により分画され、濃縮分画506を与える。この濃縮分画506は、親和性支持体に結合しない適用された生物学的サンプルの一部か、またはより頻繁には、初めは結合するが、次に支持体から溶出される、適用された生物学的サンプルの一部であり得る。次いで、この濃縮分画506は、生物学的サンプル成分の発現パターン508、およびおそらくこの生物学的サンプルの他の性質510(例えば、タンパク質発現レベルおよびタンパク質の正体)を決定するために分析される。

## 【0047】

発現パターンは、この親水性親和性支持体を用いるクロマトグラフィーにより得られた濃縮分画を、電気泳動ゲル上で電気泳動することにより決定され得る。標識(例えば、放射性標識または色素)は、生物学的サンプル成分(例えば、タンパク質)の分離バンドが完了したゲルの処理の後に見られ得るように、ゲルにロードする前に濃縮分画に添加され得る。

## 【0048】

本発明の親和性支持体を用いる親和性クロマトグラフィーから得られた濃縮分画から、生物学的サンプルの他の性質を決定するために使用される技術としては、質量分析(MS)、バイオ情報科学(得られたデータの生物学的情報および生化学的情報の関係データベースとの比較)、高分子構造分析技術(例えば、本明細書中に参考として援用される、米国特許出願第09/580,380(2000年5月26日出願)に記載される技術)が挙げられる。

## 【0049】

このプロテオミク(proteomic)アプローチは、種々の異なる方法

で実施され得る。親和性支持体に適用される生物学的サンプルは、単一のサンプルであっても、または異なる生物学的供給源（例えば、細胞株、組織サンプル、血液のような生物学的流体など）から得られる2以上の異なるサンプルであってもよい。同様に、1以上の生物学的サンプルが（別個に）適用される親和性支持体は、単一の支持体であっても、異なる特性を有する2以上の支持体であってもよい。また、使用されるクロマトグラフィーの条件は、変化し得る。

#### 【0050】

従って、表現パターンは、単一の親和性支持体で実施される単一の生物学的サンプルのために得られ得る。または、サンプルは、多数の異なるクロマトグラフィー条件を使用して、複数の支持体上で実施され得、そしてこれらの表現パターンは、所与のサンプルを処理するのに最良の支持体および/または条件を決定するために比較され得る。上記のように、本発明は、このような決定を作製するためのキットを提供する。

#### 【0051】

さらに、複数の生物学的サンプルは、1以上の親和性支持体上で実施され得、そしてサンプルにおける表現型の差異に関連する表現差異を決定するために、これらの表現パターンは、比較され得る。例えば、同じ組織の健康サンプルおよび疾患サンプルは、疾患状態の表現型を解明しようと試みる際に、この様式で処理され得る。または異なる型だが、同じ疾患状態を患った組織は、この様式で処理され得、この疾患状態に関連する病原体が、異なる組織において明とされるかどうかを決定する。

#### 【0052】

（複雑さの減少（生物学的サンプル成分の精製を含む））

本発明に従った親水性親和性支持体もまた使用して、親和性クロマトグラフィーを実施することによる生物学的サンプルの複雑さを減少し得る。生物学的サンプルを、本発明に従った親水性親和性支持体に適用する結果として、生物学的サンプルの成分の分画を生じる。このようなアプローチを使用して、生物学的サンプルからタンパク質のような成分を分離し、そして精製する。このような分離を実施するために適切な特定の支持体は、本発明によって提供されるキットを参照

して、上述のように選択され得る。

【0053】

このアプローチの1つの特定の実施形態は、2段階のプロセスを含む。この実施形態に従って、生物学的サンプルは、多区画格納構造に適用され得、ここで、1以上の成分は、上記のように生物学的サンプル成分のために、中間範囲の親和性を有するペプチドのアレイから複数のペプチドを含む。この方法において、サンプルの良好な分離または複雑さの減少を達成するのに適切な親和性特性を有するペプチドは、主にグループで同定され得る。多区画格納構造の異なる区画において、ペプチドによって達成される複雑さの減少の程度に基づいて、多区画格納構造の区画からのペプチドは、さらなる処理のために選択され得る。

【0054】

次いで、同じ生物学的サンプルの別のサンプルは、分離区画を有する第2多区画格納構造に適用され得、この分離区画は、第1多区画格納構造から選択されたペプチド含有区画のペプチドを含む。上記のように、この処理のための条件およびパラメータは、生化学分野およびタンパク質精製分野の当業者に容易に明らかとなる。

【0055】

次いで、第2多区分含有構造に含まれる異なるペプチドによって達成される複雑さの減少における相違が、決定され得、そして最良の複雑さの減少を提供するペプチドが、特定の生物学的サンプル成分のさらなる処理のために選択され得る。この方法で、タンパク質の分離および精製を実施するための最適な親和性基体が、効果的に決定され得る。

【0056】

生物学的サンプルの複雑さの減少における本発明のさらなる適用は、例えば、市販のICAT™の処理(Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用して、生物学的サンプルのマスペクトルベースの同定および定量のためのサンプルの調製に存在し得る。この方法において、ICAT手順の前に複雑な生物学的サンプルを分画して、ICATの結果として少量のサンプル成分が得られ得る。このICAT手順は、以下の資料にさらに記載さ

れ、これらの各々は、全ての目的のために本明細書中でその全体が参考として援用される：Measuring gene expression by quantitative proteome analysis Gygi SP, Rist B, Aebersold R, Current Opinion in Biotechnology 11:(4)396-401 AUG 2000；および国際特許出願第WO 00/11208号。

【0057】

(連続処理)

本発明はまた、本発明に従った親水性親和性支持体を使用する生物学的サンプルを連続的に処理するための方法を提供し、分離プロセスにおいて複数の支持体を使用することによって向上した分離を提供する。使用され得る支持体は、上記のようなキットの使用によって選択され得る。生物学的サンプルは、上記のような第1親水性親和性支持体に適用され得、そして質の高いフラクションを提供するために分画され得る。次いで、この高い質のフラクションは、第2親和性支持体に適用され得、そしてさらに質の高いフラクションを提供するためにさらに分画され得る。このプロセスは、所望される程度の多回数で繰り返され得、各分画での質の高いフラクションは、次の親和性支持体と適合性の新しい緩衝液で脱塩されそして配置される。

【0058】

(間接的なアッセイ)

目的のタンパク質に対する抗体が公知の場合、ELISAまたは他の抗体ベースのアッセイ(例えば、ラジオイムノアッセイ、「RIA」)を実施して、本発明に従ってペプチド親和性支持体で充填されるクロマトグラフィーカラムが、目的のタンパク質と結合して、そして放出し得るかどうかを決定し得た。

【0059】

(MPLC)

本発明に従ってペプチド親和性支持体を、クロマトグラフィーカラム(例えば、中圧(<150psi.)液体クロマトグラフィー(MPLC)カラム)に充填し、そして標準勾配溶出モードで使用し得る。従って、分離されるべきサン

ブルは、1セットの非溶出（または低溶出）条件下でカラムに充填され得、そして目的の分析物は、溶出溶媒または緩衝液の勾配を実施することによって溶出され得る。これにより、複雑なサンプルが分画されるのを可能にする。

#### 【0060】

##### （実施例）

以下の実施例は、本発明に従った親水性親和性クロマトグラフィーの支持体の合成および特性、それらの成分、ならびに適用に関する詳細を提供する。以下は、単に代表例であり、本発明は、これらの実施例に記載される詳細によって限定されない。

#### 【0061】

##### （実施例1．親水性支持体上のペプトイドの調製）

図6、パートAのペプトイドの合成において例示および記載されるように、ペプトイドを、Rinkアミドポリスチレン樹脂上で調製した。この合成手順はまた、Figliozzi, G.M., Goldsmith, R., Ng, S.C., Banville, S.C., Zuckermann, R.N. Methods Enzymol. 1996, 267, 437-447に報告されており、この開示は、全ての目的のために本明細書中で参考として援用される。

#### 【0062】

切断の前に、Rink樹脂上のペプトイドを、N-FMOC-アミノヘキサン酸(0.4M)、HOBT(0.4M)、DIC(0.44M)を用いて、35で1時間処理した。ニンヒドリン試験により青色呈色ビーズが示される場合、2重カップリングを実施した。FMOC保護基を除去するためのピペラジン処理の後、ビーズを、3-マレイミドプロピオン酸(0.4M)、DIC(0.44M)を用いて35で1時間処理した。95%TFA[v/v](H<sub>2</sub>O中)を使用して樹脂から切断した後、得られた溶液を濾過し、H<sub>2</sub>Oと混合し、凍結し、そして凍結乾燥した。得られた生成物を、100%AcOH中に溶解し、凍結し、凍結乾燥し、そしてさらに95%[v/v]CH<sub>3</sub>CN(H<sub>2</sub>O中)に溶解し、凍結し、そして凍結乾燥した。

#### 【0063】

ペプトイドの純度を、HPLCおよび質量分析を用いて評価して、代表的に90%より高いことを示した。次いで、得られた産物を、pH7で緩衝化された $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.1M)に溶解して、そしてチオセファロース樹脂に添加した。マレイミドペプトイドの添加の前後の遊離チオール量を、エルマン試薬(DTNB)を用いて決定した。残存遊離チオールが、初量の遊離チオールの10%未満であった場合、この残存遊離チオールを、マレイミドでキャッピングした。

#### 【0064】

この操作を各々の樹脂について繰り返して、親水性固体支持体に貼り付けたペプトイドのアレイを得た。

#### 【0065】

(実施例2. 作製された親水性親和性支持体の評価)

ペプトイドを付着した各々の固相をカラムに詰めて、そして細胞溶解物でロードした。特定の期間の後、このカラムをローディング緩衝液で洗浄した。この樹脂結合タンパク質を、種々の溶出緩衝液を用いて溶出した。回収された分画をポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて分析した。

#### 【0066】

多才なこれらの材料を、4つの基準を用いて評価した：再現性、結合能、濃縮および特異性。これらの評価において用いられたこの種々のペプトイドの構造は、図3A~Cに見られる。

#### 【0067】

図7は、HeLa細胞溶解物の3回のローディング、洗浄および溶出後のペプトイド/セファロースカラムの溶出産物再現性を示す。このゲルは、高度の再現性を示す。

#### 【0068】

図8は、HeLa細胞溶解物のタンパク質セットに関して、ペプトイドセファロースカラムのEB8224およびEB8225の結合能を示す。EB8225が、細胞溶解物の11%を結合した一方、EB8224は、細胞溶解物の7%を結合した。これは、これらの支持体が、細胞溶解物の複雑度を有意に減少し得ること、ならびに異なるリガンドの実証されている相違する性質、およびそれらの

それぞれの異なるタンパク質分画を結合する能力を実証する。特異性および濃縮のための能力はまた、溶出分画中の分離されたバンドがロード分画（全細胞溶解物）よりも何倍も濃縮されており、そしてこれらのバンドはまた、これらはロードにおいては分離されないが、溶出において分離され得ることで実証される。

【0069】

図9は、プロテオームの異なる表示の乳癌組織（低転移性対高転移性）において、ペプチドセファロスラムEB8217-8221の濃縮および特異性を示す。支持体のアレイを使用して、高転移性生物学的サンプルおよび低転移性生物学的サンプル（細胞溶解物の場合）のタンパク質を分画化し、そしてタンパク質の存在または非存在および多量の特異的タンパク質についてのタンパク質の発現のパターン（プロテオーム）における違いを見ることによりこれらの表現型間の違いを分析した。このゲルは、本発明に従う支持体のアレイを用いて達成できる結合親和性の程度を、例えば、EB8220とEB8221との間で観察された特異性の違いにより証明されたように、実証する。さらに、樹脂および/またはそれらの設計の性質のために、この結果は、ロードされた細胞溶解物中のタンパク質のサブセットがあり、これは、ある樹脂に結合するが、任意の他の樹脂に結合しないことを実証する。従って、本発明は、実質的に分離可能な様式においてプロテオームの間隔を補う能力を提供する。

【0070】

このゲルはまた、支持体EB8220により提供される発現パターンにおいて高転移性組織サンプルと低転移性組織サンプルとの間の発現の観察可能な違いにより証明されるように本発明に従う親和性物質が、本実施例において、生物学的サンプルの構成要素を濃縮しかつ高転移性組織および低転移性組織の間のタンパク質発現における違いの分析を可能にする能力を実証する。EB8220の場合において、低転移性組織サンプルは、高転移性組織よりも特定のタンパク質の発現がより高いことが見られ得る。このような発見は、研究者が、例えば、転移性の抑制において同定されたタンパク質についての可能な役割を調査することを許容する。

【0071】

(実施例3．選択的に結合する支持体リガンドの同定)

本発明に従って調製された4つのペプチドベースの親和性支持体を用いて、粗細胞溶解物からタンパク質を精製した。図10において、01、02、03および04として識別された本実施例において使用された4つのカラムは、図3Aおよび3Cにおいて、それぞれEB8201、EB8202、EB8203およびEB8204として識別されたカラムであった。このタンパク質FGF（線維芽細胞増殖因子）に対して選択的に結合するペプチドを位置付けた。各々の異なるカラムをFGF含有細胞溶解物と共にロードし、そして表1に上記されたカチオン条件を用いて流した。このカラムからの素通り分画（FT）および最初の結合分画、次いで溶出分画（溶出液）をFGF標準物と共にゲル電気泳動に供した。FGF（図4b、レーン10）に選択的に結合しているペプチドリガンド（図4b、レーン6；bFGF）を、図10に示されたように決定した。

【0072】

(実施例4．平行処理)

bFGFの過剰発現を有する酵母抽出物の細胞溶解物を、本発明に従ういくつかの異なる媒介親和性クロマトグラフィー支持体で、平行して処理した。次いで、ロード、素通り、および溶出液を、上記のように電気泳動ゲルに流した。結果および溶出条件を、図11に示す。図11における説明は、各々のゲルパネルの下にある重要な英数字の参照を提供するカラムおよび条件を示す。種々の条件は、表1に記載され、そして種々のカラムの組成物は、図3A～3C中に例証する。

【0073】

この結果は、研究目的のタンパク質が、本発明に従う1工程親和性精製プロセスを利用して精製され得ることを証明する。このプロセスは、市販の樹脂を用いる標準的なクロマトグラフィーが関与する時間および障害を克服する。本発明の技術は、研究のための新規のタンパク質の迅速な研究精製を達成し得る。

【0074】

(結論)

本発明が、明確な理解の目的のためにある程度詳細に記載されているが、特定

の変化および改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内で行われ得ることは明らかである。例えば、本発明の開示は、ペプチドの使用を強調するが、本発明の範囲は、それほど限定されないで、そして適切な特性を有する他の分子および本明細書中に記載されたような作用がまた用いられることを理解するべきである。本発明のプロセスおよび器具の両方を組み合わせる代替的な方法があることもまた注意するべきである。従って、本発明の実施形態は、例示としてみなされ、そして限定的ではなく、そして本発明は、本明細書中に提供される内容に限定されないが、添付の特許請求の範囲および等価物の範囲内の改変であり得る。

**【図面の簡単な説明】**

**【図1】**

図1は、本発明の1つの実施形態による親水性ペプチドの構造を模式的に示す。

**【図2】**

図2Aおよび図2Bは、本発明によって親水性親和性クロマトグラフィー支持体を合成するための代替的プロセスを模式的に示す。

**【図3A】**

図3A～図3Cは、本発明の1つの実施形態による25個の12マーペプチドのアレイの分子構造を模式的に示す。

**【図3B】**

図3A～図3Cは、本発明の1つの実施形態による25個の12マーペプチドのアレイの分子構造を模式的に示す。

**【図3C】**

図3A～図3Cは、本発明の1つの実施形態による25個の12マーペプチドのアレイの分子構造を模式的に示す。

**【図4】**

図4は、本発明の1つの実施形態によるキットおよびその操作態様を模式的に示す。

**【図5】**

図5は、本発明の1つの実施形態によって示差的タンパク質発現（プロテオミ

ック ( proteomic ) ) 分析を実施するためのプロセスを模式的に示す。

【図6】

図6は、本発明の1つの実施形態によって親水性基体上で親水性ペプチドを合成するためのプロセスを模式的に示す。

【図7】

図7は、本発明による支持体を用いて調製されたクロマトグラフィーカラムの再現性を例示する電気泳動ゲルを示す。

【図8】

図8は、本発明による支持体を用いて調製されたクロマトグラフィーカラムの結合能力を例示する電気泳動ゲルを示す。

【図9】

図9は、本発明による支持体を用いて調製されたクロマトグラフィーカラムによって達成可能な特異性および濃縮を例示する電気泳動ゲルを示す。

【図10】

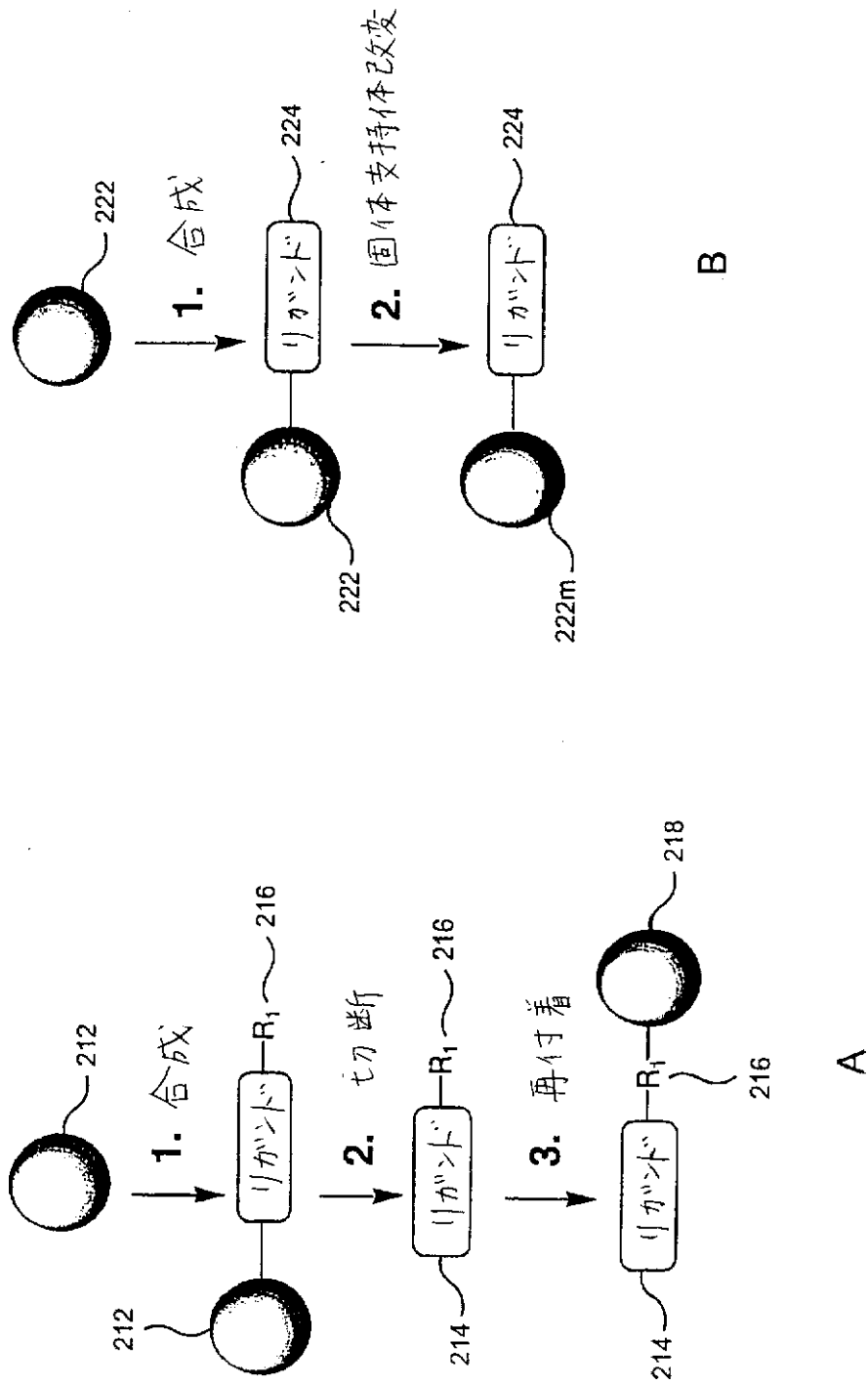
図10は、本発明による、細胞溶解産物中のタンパク質に選択的に結合するペプチドリガンドの同定を例示する電気泳動ゲルを示す。

【図11】

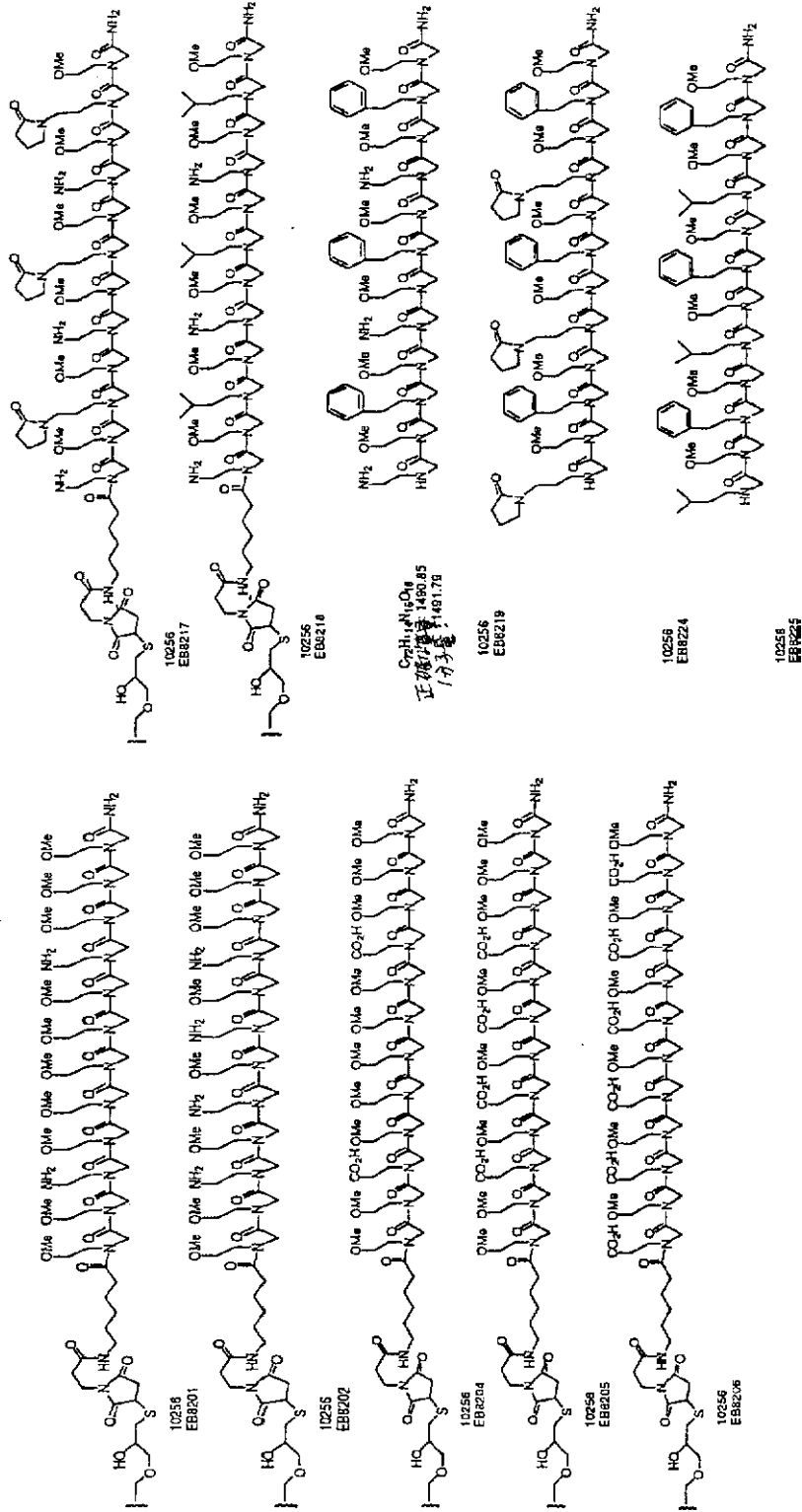
図11は、本発明による細胞溶解産物の並行処理の結果を例示する電気泳動ゲルを示す。



【図2】

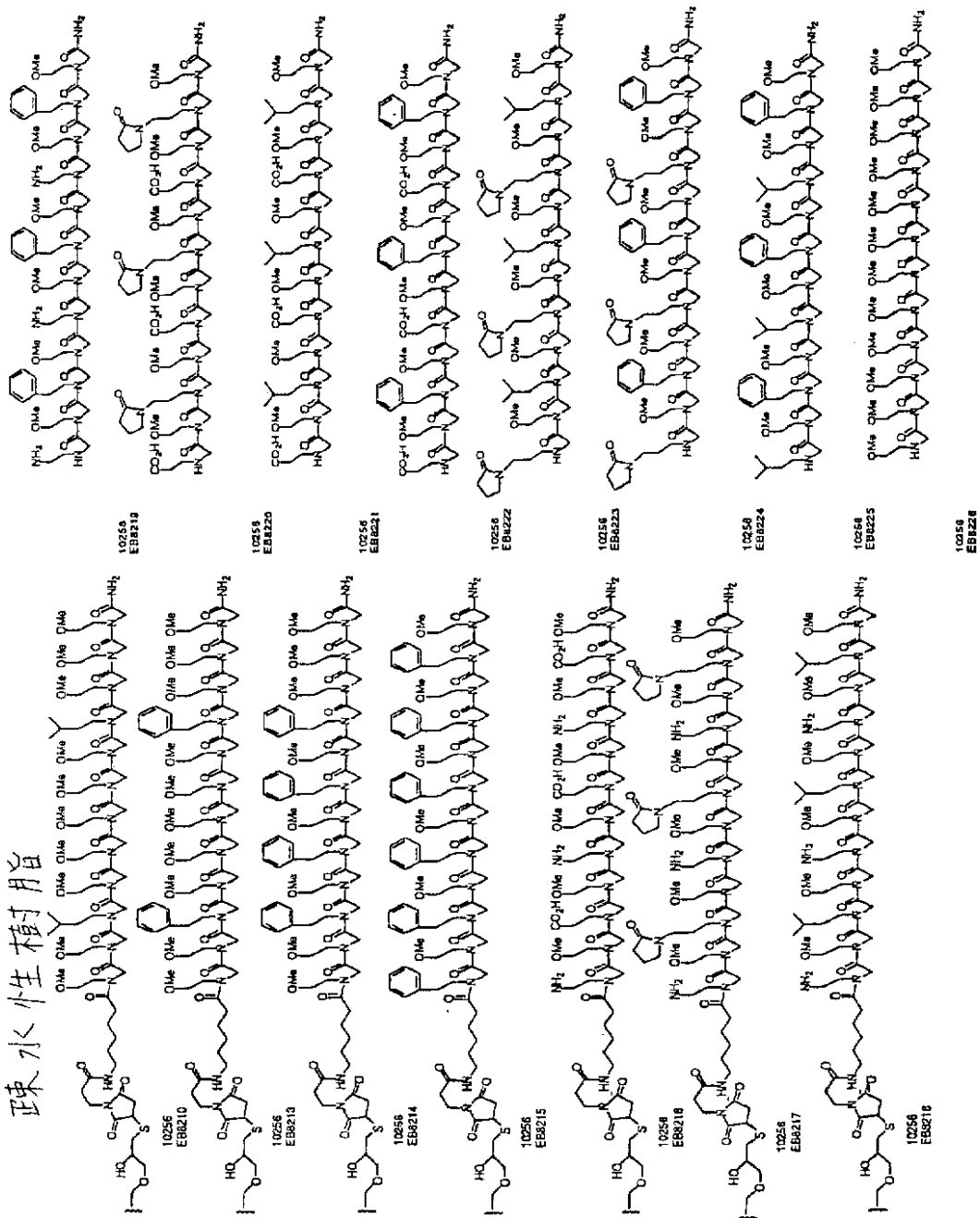


陰イオン樹脂



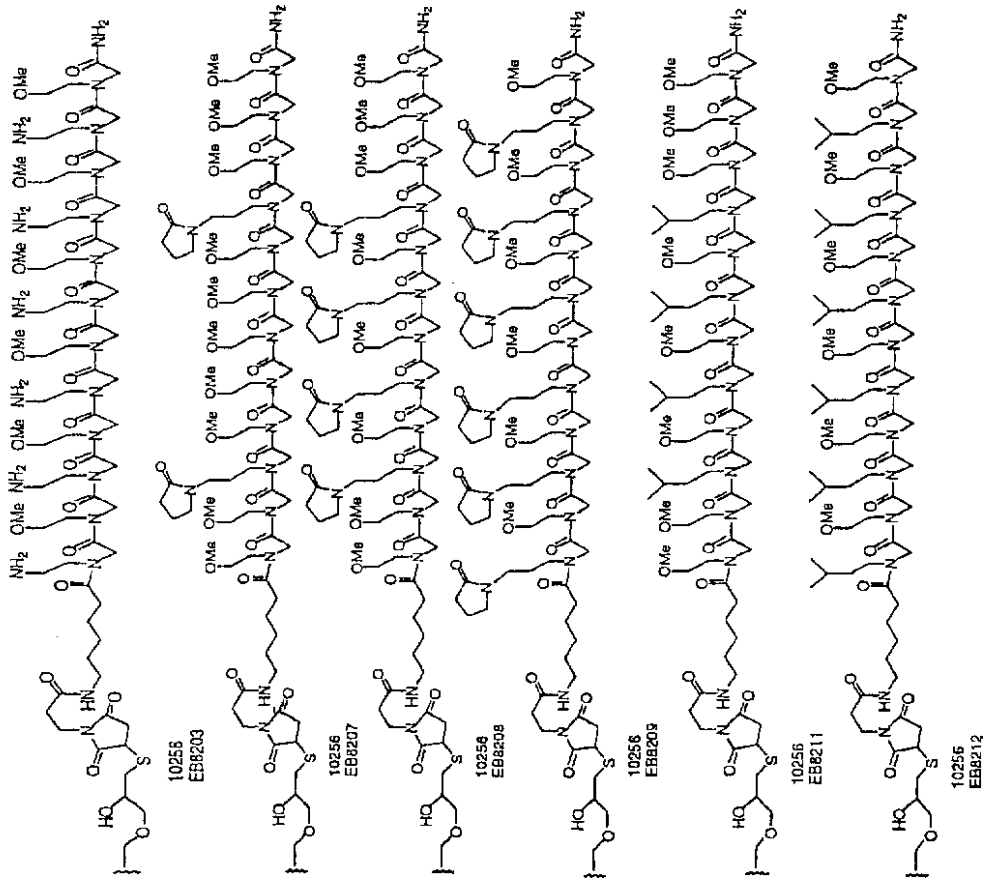
【図3B】

疎水性樹脂

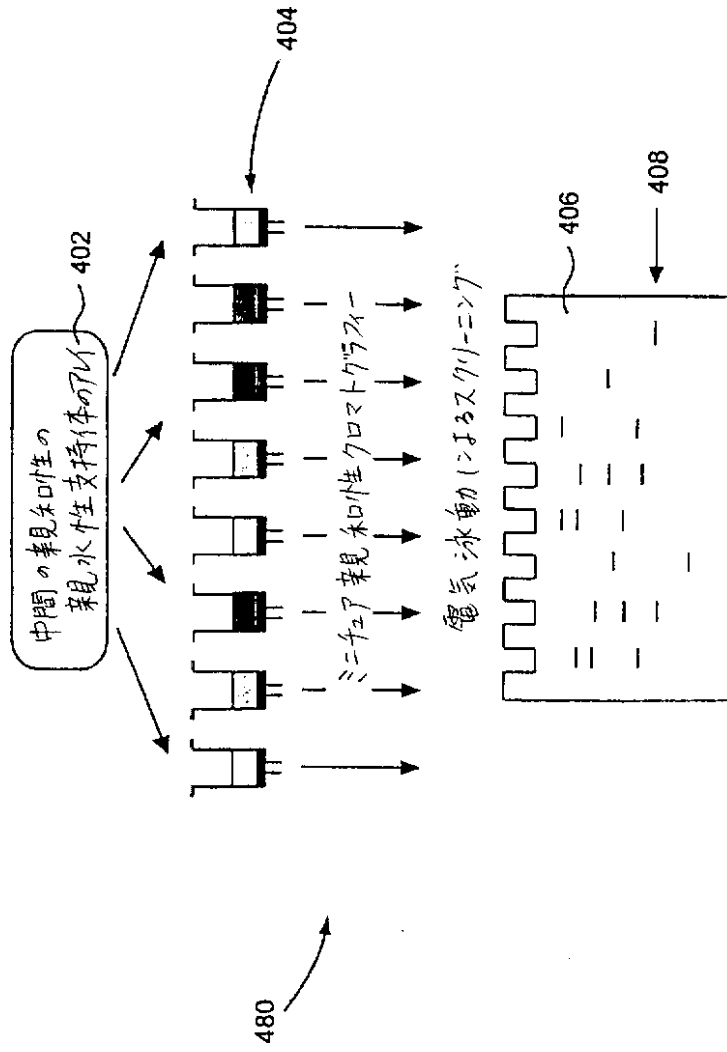


【図3C】

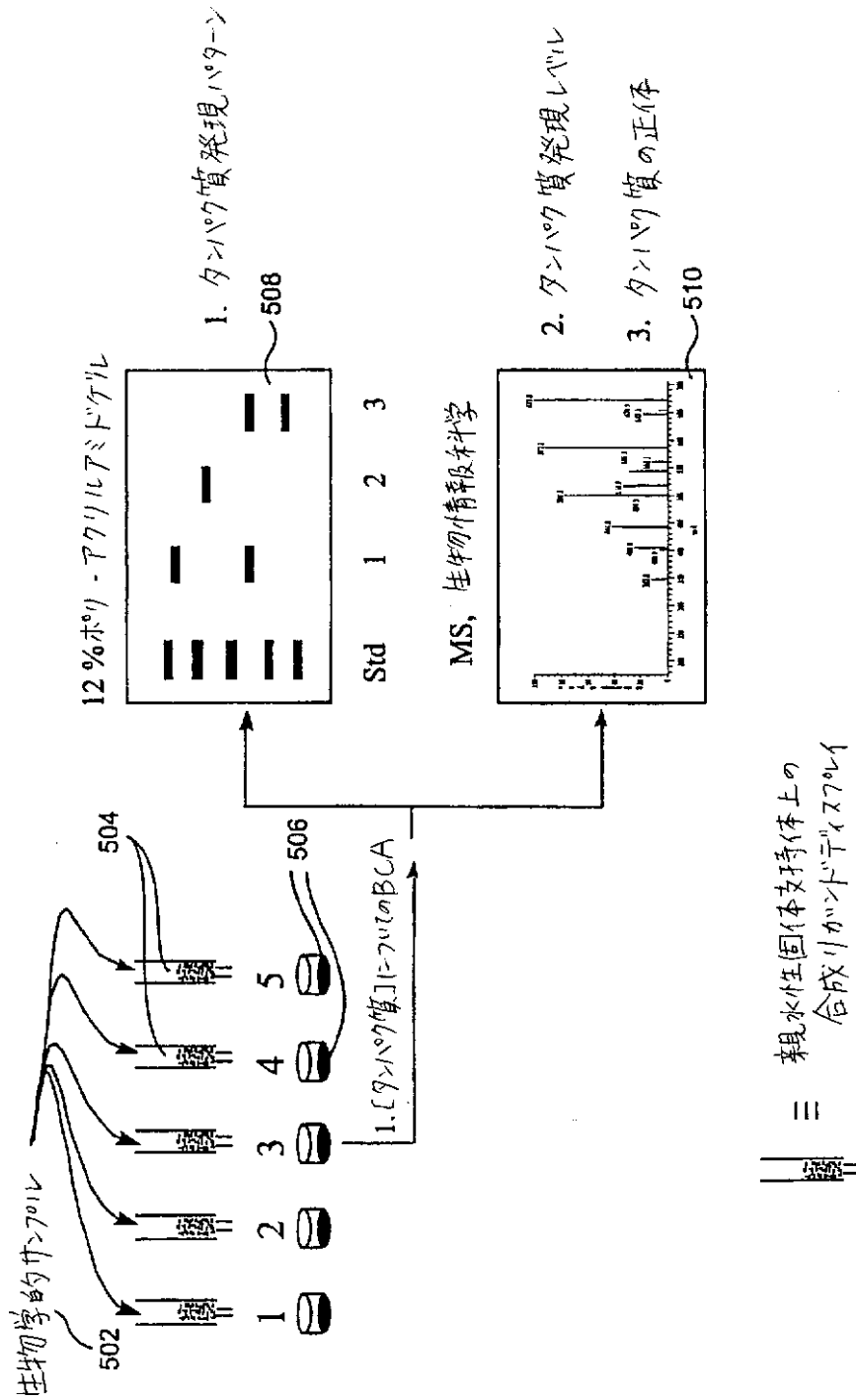
陽イオン樹脂



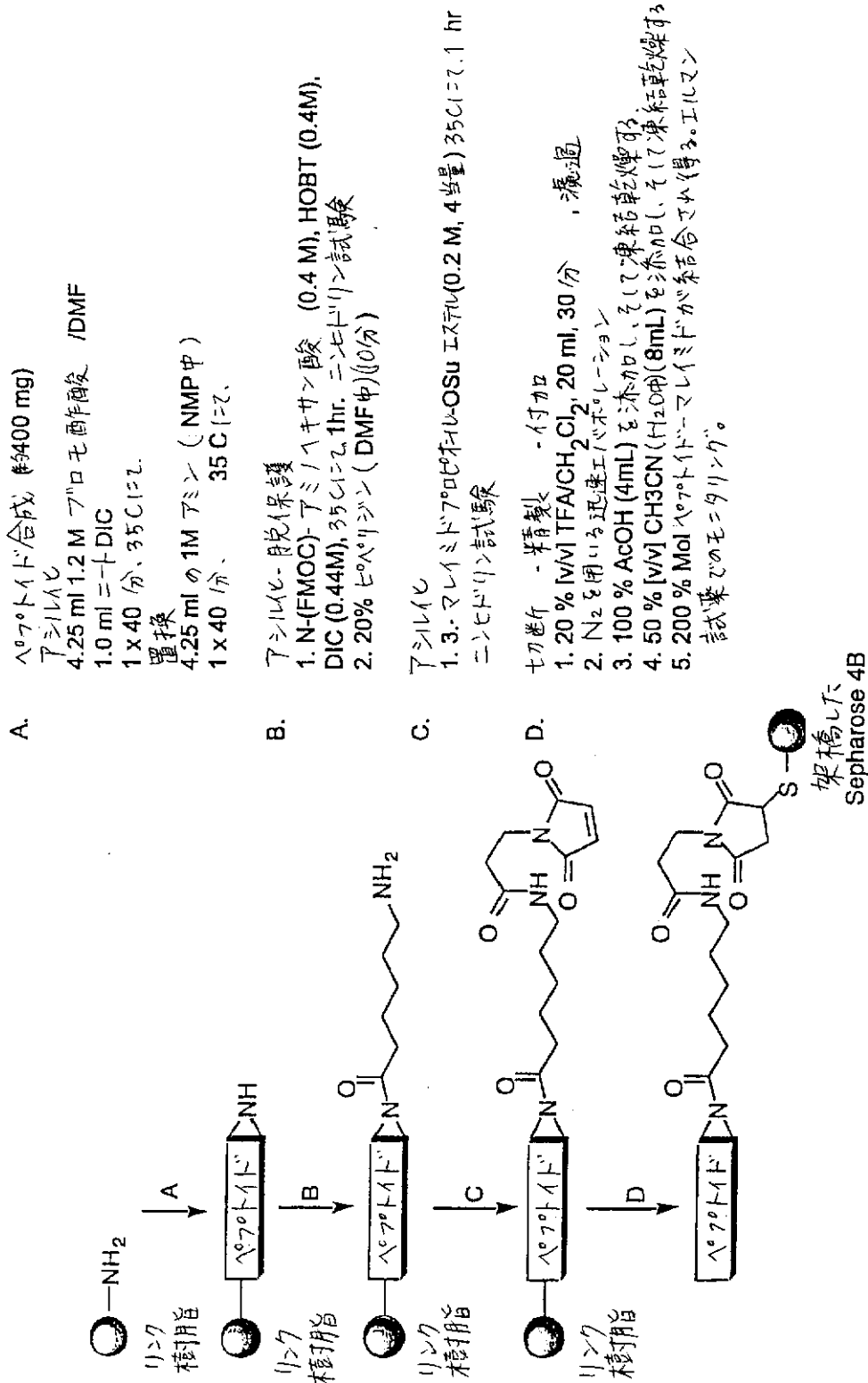
【図4】



【図5】



【図6】



【図7】

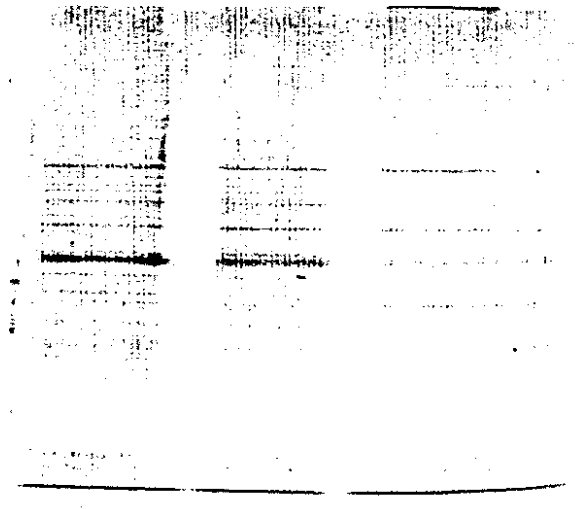
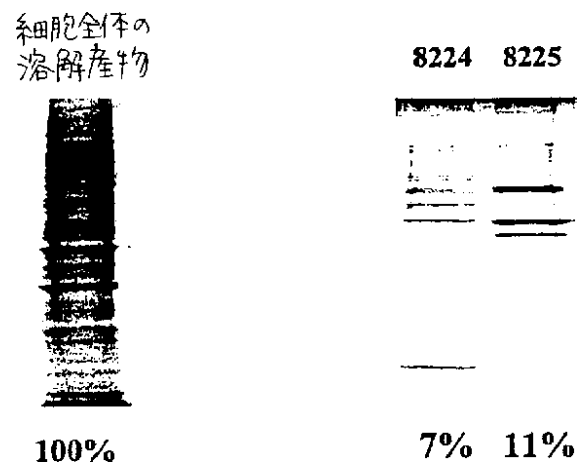
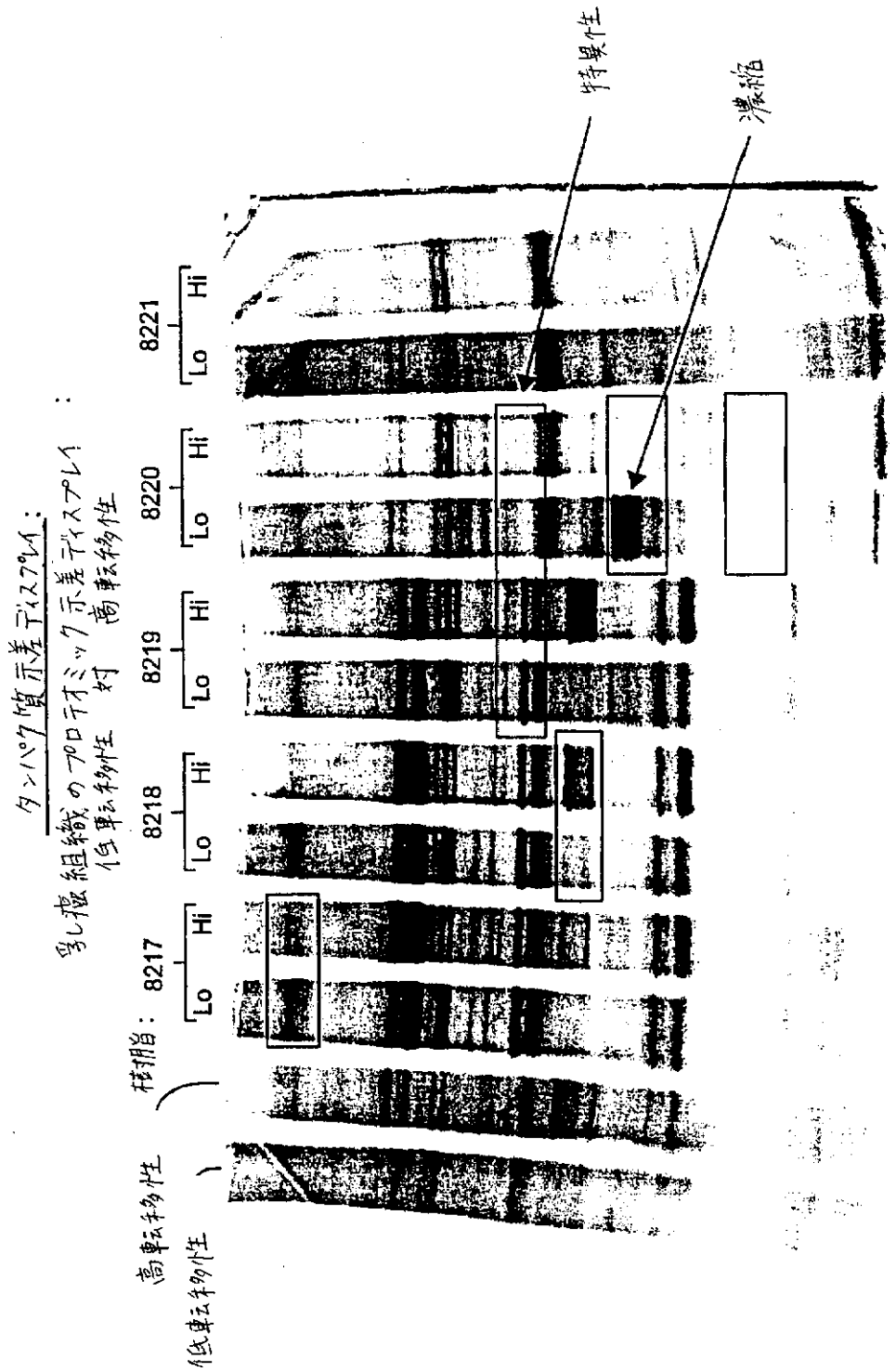


FIG. 7

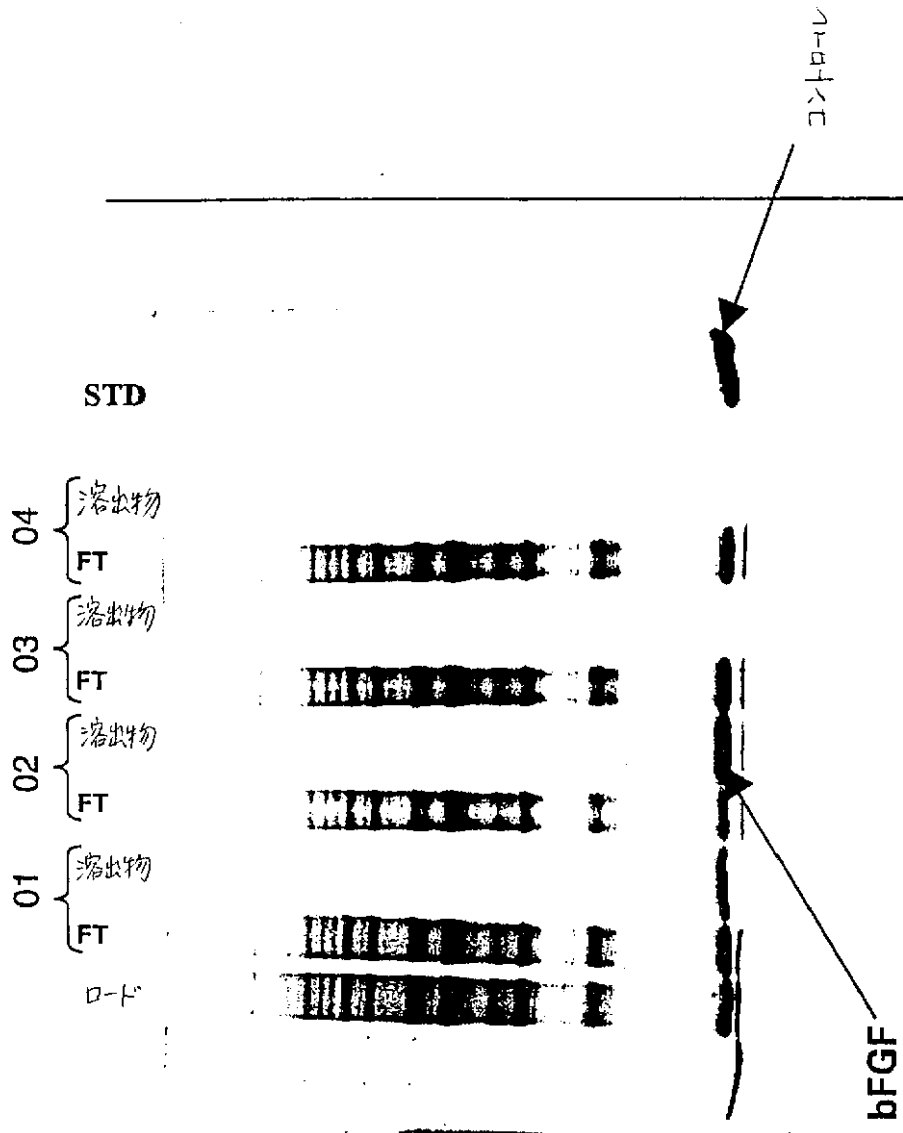
【図8】



【図9】



【図10】



【図11(1)】

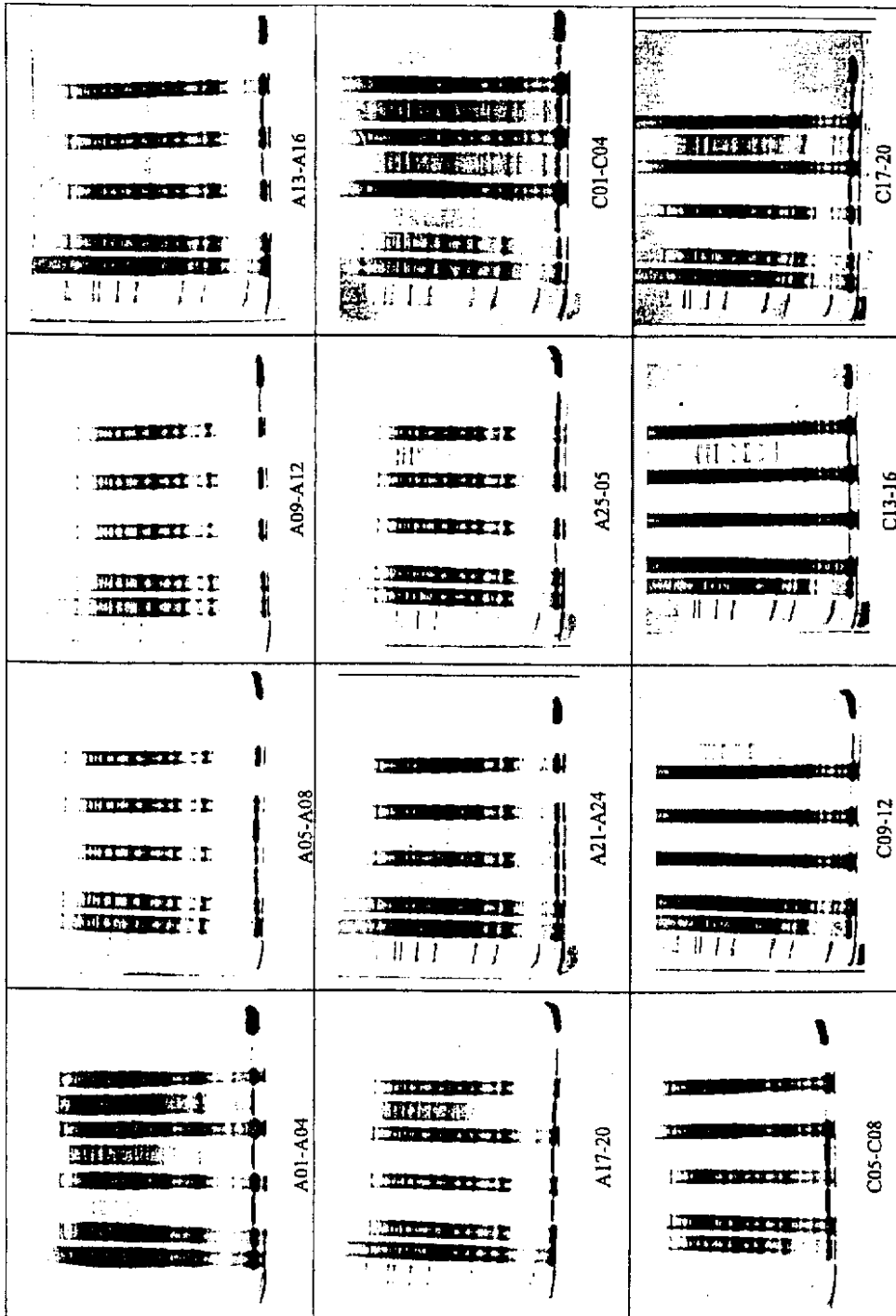


FIG. 11 (1)

【図11(2)】

FIG.11(1)の続き

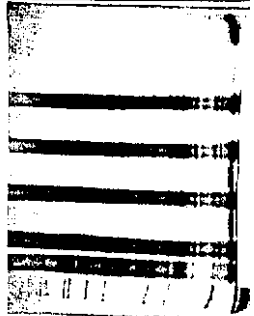
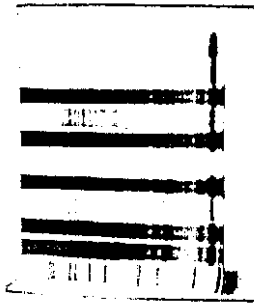
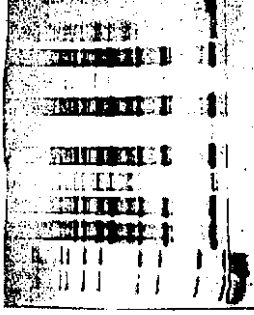
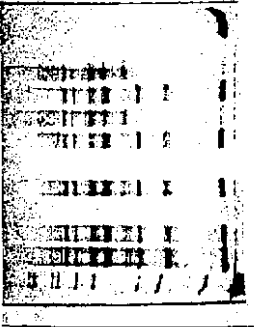
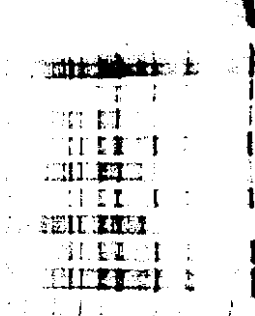
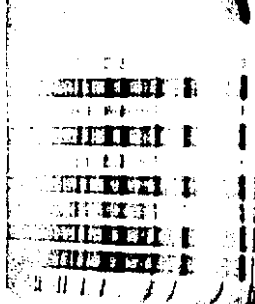
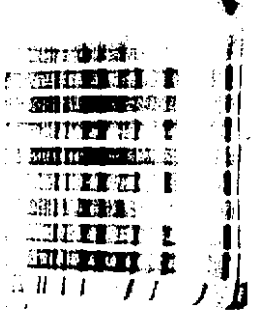
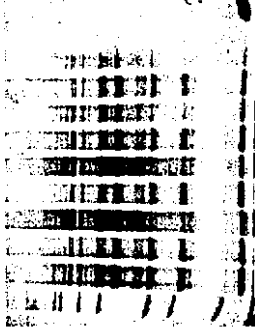
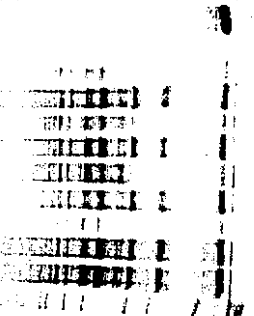
 <p>C20-14</p>	 <p>C25</p>	 <p>H01-04</p>	 <p>H05-08</p>
 <p>H09-12</p>	 <p>H13-16</p>	 <p>H17-20</p>	 <p>H21-24</p>
 <p>H25</p>		<p>説明  Aは、陰イオン交換条件下での溶出を意味する。  Cは、陽イオン交換条件下での溶出を意味する。  Hは、疎水性親和性条件下での溶出を意味する。  番号は、カラム番号をいう。</p> <p>例  A01～A04は、カラム01、02、03、04が陰イオン交換条件下で溶出されたことを意味する。</p>	

FIG. 11 (2)

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PC/US 00/30110
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 GOIN33/545 B01J19/00 G01N30/48 C12Q1/68 C07K14/00 GOIN33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 GOIN B01J B01D		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 06356 A (TERRAPIN TECH INC) 16 May 1991 (1991-05-16) cited in the application	1-3, 30, 31, 33-36, 40-43, 65-69, 71, 73
Y	page 40, line 22 -page 42, line 26; figures 5-7	1, 4-29, 32, 36-39, 43-48, 56-65, 70-72
	---	-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 14 May 2001		Date of mailing of the international search report 25/05/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hart-Davis, J

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PC1/US 00/30110
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 89 09088 A (TERRAPIN DIAGNOSTICS INC) 5 October 1989 (1989-10-05) cited in the application	1-3, 30, 31, 33-36, 40-43, 65-69, 71, 73
Y	claims 1-9	1, 4-29, 32, 36-39, 43-48, 56-65, 70-72
P, X	--- EP 1 006 362 A (CAHILL MICHAEL DR ;NORDHEIM ALFRED PROF DR (DE); DRUKIER ANDRZEJ D) 7 June 2000 (2000-06-07)	1-3, 30, 31, 33-36, 40-43, 65-69, 71, 73
P, Y	page 9, column 9, paragraph 28 -page 10, column 11, paragraph 37	1, 4-29, 32, 36-39, 43-48, 56-65, 70-72
X	--- WO 98 42730 A (CHIRON CORP) 1 October 1998 (1998-10-01) cited in the application	49-55
Y	figure 3; examples 1-3	1, 4-29, 32, 36-39, 43-48, 56-65, 70-72
X	--- US 5 831 005 A (GOFF DANE A ET AL) 3 November 1998 (1998-11-03) cited in the application the whole document -----	49-55

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/30310

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9106356 A	16-05-1991	US 5133866 A	28-07-1992
		AU 654940 B	01-12-1994
		AU 6724990 A	31-05-1991
		CA 2072637 A	01-05-1991
		EP 0500685 A	02-09-1992
		JP 2690193 B	10-12-1997
		NO 921680 A	17-06-1992
		US 5340474 A	23-08-1994
		US 5409611 A	25-04-1995
		US 5679643 A	21-10-1997
		US 5567317 A	22-10-1996
		US 5763570 A	09-06-1998
		WO 8909088 A	05-10-1989
AU 628812 B	24-09-1992		
AU 3353789 A	16-10-1989		
CA 1339768 A	24-03-1998		
DE 68928704 D	16-07-1998		
DE 68928704 T	10-12-1998		
EP 0438402 A	31-07-1991		
HU 63587 A	28-09-1993		
JP 2690164 B	10-12-1997		
JP 3505120 T	07-11-1991		
NZ 228482 A	26-03-1991		
US 5340474 A	23-08-1994		
US 5409611 A	25-04-1995		
US 4963263 A	16-10-1990		
US 5567317 A	22-10-1996		
US 5133866 A	28-07-1992		
EP 1006362 A	07-06-2000	AU 1861100 A	19-06-2000
		WO 0033075 A	08-06-2000
WO 9842730 A	01-10-1998	AU 6871298 A	20-10-1998
US 5831005 A	03-11-1998	US 5977301 A	02-11-1999
		US 5877278 A	02-03-1999
		AU 679945 B	17-07-1997
		AU 5292093 A	12-04-1994
		BG 99521 A	31-01-1996
		BR 9307092 A	30-03-1999
		CA 2144067 A	31-03-1994
		EP 0671928 A	20-09-1995
		FI 951356 A	26-04-1995
		HU 72614 A	28-05-1996
		JP 8501565 T	20-02-1996
		JP 2000239242 A	05-09-2000
		KR 168709 B	15-01-1999
		NO 950682 A	18-04-1995
		NZ 256952 A	27-07-1997
		PL 308204 A	24-07-1995
		WO 9406451 A	31-03-1994

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
B 0 1 J	20/26	B 0 1 J	20/26	L
C 1 2 M	1/00	C 1 2 M	1/00	A
G 0 1 N	1/10	G 0 1 N	1/10	C
	30/48		30/48	R
	30/88		30/88	E
	33/48		33/48	A
	33/566		33/566	
	37/00		37/00	1 0 2

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ワチョウィクス, マシュー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608  
 -2916, エミリービル, ホートン ス  
 トリート 4560, カイロン コーポレイ  
 ション 気付

(72)発明者 コサコタ, スリニバス  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608  
 -2916, エミリービル, ホートン ス  
 トリート 4560, カイロン コーポレイ  
 ション 気付

Fターム(参考) 2G045 BA13 BB03 CA25 CA26 CB01  
CB03 CB07 DA12 DA13 DA14  
DA36 FB03 FB06 FB15 HA09  
HA16  
2G052 AA28 AB18 AB20 AD26 AD46  
DA08 ED07 ED11 GA22 GA24  
GA30  
4B029 AA07 AA23 AA27 BB16 BB20  
FA15  
4D017 AA11 BA07 CA13 CA14 CB01  
DA03 EA05  
4G066 AB27B AC14C AE05B AE05C  
CA54 DA11 DA12 EA02

专利名称(译)	生物样品组分的纯化和差异显示		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003513283A</a>	公开(公告)日	2003-04-08
申请号	JP2001535064	申请日	2000-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	Chiron公司		
[标]发明人	ズッカーマンロナルドエヌ ビューソレイルエリック ワチョウイクスマシユー コサコタスリニバス		
发明人	ズッカーマン, ロナルド エヌ. ビューソレイル, エリック ワチョウイクス, マシユー コサコタ, スリニバス		
IPC分类号	G01N33/53 B01D15/00 B01D15/08 B01J20/26 B01J20/281 B01J20/32 C12M1/00 C40B60/14 G01N1/10 G01N30/88 G01N33/48 G01N33/545 G01N33/566 G01N33/68 G01N37/00 G01N30/48		
CPC分类号	G01N33/6803 B01J20/3204 B01J20/321 B01J20/3212 B01J20/3219 B01J20/3246 B01J20/3248 B01J20/3251 B01J20/3253 B01J20/3255 B01J20/3274 B01J2219/00317 C40B60/14 G01N33/545 G01N2550/00		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M B01D15/00.Z B01D15/08 B01J20/26.H B01J20/26.L C12M1/00.A G01N1/10.C G01N30/48.R G01N30/88.E G01N33/48.A G01N33/566 G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB15 2G045/HA09 2G045/HA16 2G052/AA28 2G052/AB18 2G052/AB20 2G052/AD26 2G052/AD46 2G052/DA08 2G052/ED07 2G052/ED11 2G052/GA22 2G052/GA24 2G052/GA30 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/AA27 4B029/BB16 4B029/BB20 4B029/FA15 4D017/AA11 4D017/BA07 4D017/CA13 4D017/CA14 4D017/CB01 4D017/DA03 4D017/EA05 4G066/AB27B 4G066/AC14C 4G066/AE05B 4G066/AE05C 4G066/CA54 4G066/DA11 4G066/DA12 4G066/EA02		
优先权	60/163110 1999-11-02 US 60/169160 1999-12-06 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了对生物样品具有中等结合亲和力的亲和支持材料。本发明提供的材料是亲水性固体载体，其包含结合至亲水性基质的亲水性配体，该亲水性基质是生物样品（例如细胞系，生物流体（例如血液）），或组织细胞裂解液）。配体可以包括从支架分支的亲亲和特征基团和亲水基团，并且被配置为至少部分地分离生物样品的组分。

