

(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2007-511837

(P2007-511837A)

(43) 公表日 平成19年5月10日(2007.5.10)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 6 F 19/00	(2006.01)	G 0 6 F 19/00	6 0 0	4 B 0 6 4
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D	
G 0 1 N 37/00	(2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 146 頁)

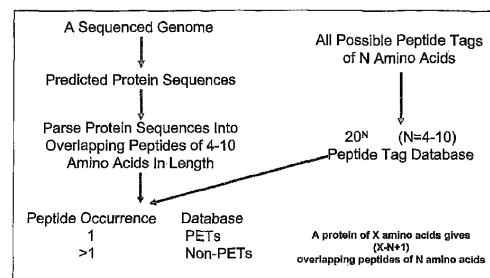
(21) 出願番号	特願2006-539990 (P2006-539990)	(71) 出願人	504416585
(86) (22) 出願日	平成16年11月15日 (2004.11.15)		イビトミ バイオシステムズ インコーポ レイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成18年7月12日 (2006.7.12)		アメリカ合衆国 02453 マサチュー セッツ、ウォルサム、ビーバー ストリー ト 100
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/038283	(74) 代理人	100067817
(87) 国際公開番号	W02005/050223		弁理士 倉内 基弘
(87) 国際公開日	平成17年6月2日 (2005.6.2)	(74) 代理人	100126527
(31) 優先権主張番号	10/712,425		弁理士 遠藤 朱砂
(32) 優先日	平成15年11月13日 (2003.11.13)	(74) 代理人	100130465
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 吉田 匠
		(74) 代理人	100129333
			弁理士 中島 拓

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテオームエピトームタグ及びそれらのタンパク質修飾分析における利用方法

(57) 【要約】

試料中のタンパク質特に様々な翻訳後修飾(リン酸化、グリコシル化、メチル化、アセチル化など)を有するタンパク質の存在を、該試料中の一組のタンパク質のユニークに特徴的な認識配列(プロテオームエピトームタグ即ちPET)を認識して該配列と相互作用する一種以上の捕捉剤の利用によって、信頼性をもって検出する方法を開示する。これらの捕捉剤又はPETを含むアレイも又、提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の標的タンパク質上の翻訳後修飾の存在を検出する方法であって、下記を含む当該方法：

- (1) 該標的タンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該翻訳後修飾のための少なくとも 1 つの候補の部位を同定し；
- (2) 該標的タンパク質の少なくとも 1 つの断片のアミノ酸配列をコンピューターにより同定し、該断片は、該試料中の該標的タンパク質の処理から予想通りに生じて、該断片は、該試料中の該断片にユニークな該潜在的翻訳後修飾部位及び P E T (プロテオームエピトームタグ)を含み；
- (3) 該 P E T に特異的に結合する捕捉剤を生成させて、該捕捉剤を支持体に固定化し；
- (4) 該試料を該処理にかけて、該断片を溶液に可溶性にして、該試料を、該処理後、該捕捉剤に接触させて；
- (5) 該捕捉剤に結合された該断片において、該翻訳後修飾の存否を検出する。

10

【請求項 2】

前記の翻訳後修飾が、アセチル化、アミド化、脱アミド化、プレニル化、ホルミル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、メチル化、ミリストイル化、リン酸化、ユビキチン化、リボシル化又は硫酸化である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記の翻訳後修飾が、チロシン、セリン又はスレオニンに対するリン酸化である、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記のアミノ酸配列のコンピューター分析のステップが、該 P E T を、p I、電荷、立体構造、溶解度、疎水性、極性及び溶媒露出領域の少なくとも 1 つをも含む基準に基づいてを同定するニアレスト - ネイバー分析を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

(3) で生成した捕捉剤の、少なくとも一種の P E T のニアレスト - ネイバーに対する特異性を測定することを更に含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

ペプチド競合アッセイを、(3) で生成した捕捉剤の、P E T のニアレスト - ネイバーに対する特異性の測定に利用する、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記のアミノ酸配列をコンピューター分析するステップが、示された溶解条件下で少なくとも閾値の溶解度を有すると予想された該 P E T を同定する溶解度分析を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記の P E T の長さを、5 ~ 10 アミノ酸、10 ~ 15 アミノ酸、15 ~ 20 アミノ酸、20 ~ 25 アミノ酸、25 ~ 30 アミノ酸、又は 30 ~ 40 アミノ酸から選択する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記の捕捉剤が、完全長の抗体、又は F a b 断片、F (a b')₂ 断片、F d 断片、F v 断片、d A b 断片、単離された相補性決定領域 (C D R)、一本鎖抗体 (s c F v)、又はこれらの誘導体から選択する機能的な抗体断片である、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記の捕捉剤が、ヌクレオチド；核酸；P N A (ペプチド核酸)；タンパク質；ペプチド；炭水化物；人工ポリマー；又は小型有機分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記の捕捉剤が、アプタマー、足場ペプチド、又は小型有機分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

50

前記の処理が、前記の試料の、プロテアーゼ、化学薬剤、物理的剪断、又は超音波処理による変性及び／又は断片化である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記の変性が、熱変性又は化学的変性である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記の熱変性で、熱安定性プロテアーゼを利用するタンパク質分解をその後行なうか又は同時に行なう、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記の熱変性が、2 サイクル以上の熱変性とその後のプロテアーゼ消化を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

前記の断片化を、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、パパイン、カルボキシペプチダーゼ、カルパイン、ズブチリシン、g l u c - C、エンド l y s - C、又はプロテイナーゼ K から選択するプロテアーゼによって行なう、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記の試料が、唾液、粘液、汗、全血液、血清、尿、羊水、生殖器液、糞便、骨髓、血漿、脊髄液、囲心腔液、胃液、腹液、腹膜腔液、胸膜液、滑液、囊胞液、脳脊髄液、肺洗浄液、リンパ液、涙、前立腺液、他の身体部分からの抽出液、又は他の腺からの分泌物から選択する体液であり；又は上清、全細胞溶解物、又は細胞画分(細胞性物質の溶解及び分画により得られる)、生物学的実在物又は人工的環境で成長した細胞から直接得られる細胞の抽出物又は画分に由来する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

前記の試料が、ヒト、マウス、ラット、カエル(アフリカツメガエル)、魚類(ゼブラフィッシュ)、ハエ(キイロショウジョウバエ)、線虫(C. elegans)、分裂又は出芽酵母、又は植物(シロイスナズナ)から得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記の試料が、膜結合タンパク質の処理により生成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記の処理が、前期の翻訳後修飾を保存する条件下で行なわれる、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 2 1】

前記の P E T 及び翻訳後修飾のための候補の部位が、重複しない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記の捕捉剤が、変性条件下で前記の P E T についての選択性について最適化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

ステップ(5)が、前記の翻訳後修飾に特異的な第二捕捉剤を利用することにより実施され、前記の第二捕捉剤が、酵素、蛍光標識、着色染料、化学発光性化合物、コロイド粒子、放射性同位体、近赤外線染料、DNA デンドリマー、水溶性量子ドット、ラテックスビーズ、セレン粒子、又はユーロピウムナノ粒子から選択する検出可能な部分により標識される、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 2 4】

前記の翻訳後修飾が、リン酸化であり、前記の第二の捕捉剤が、リン酸化チロシン、リン酸化セリン、又はリン酸化スレオニンに特異的な標識された第二抗体である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記の第二抗体は、酵素又は蛍光基により標識される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記の酵素が、H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ)である、請求項 2 5 に記載の方法

50

。

【請求項 27】

前記の翻訳後修飾が、リン酸化であり、第二の捕捉剤が、リンアミノ酸を特異的に染める蛍光染料である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

前記の蛍光染料が、Pro-Q Diamond染料である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記の翻訳後修飾は、グリコシル化であり、前記の標識した第二捕捉剤が、グリコシル化部位に結合した少なくとも一つの糖部分に特異的である標識されたレクチンである、請求項 23 に記載の方法。

10

【請求項 30】

前記の翻訳後修飾が、ユビキチン化であり、前記の標識した第二捕捉剤が、ユビキチンに特異的な標識した第二抗体である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 31】

前記の試料が、前記の断片に対して 10 億モル過剰の無関係のタンパク質又はその断片を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

前記の捕捉剤に結合した前記の断片を定量することを更に含む、請求項 1 に記載の方法

。

【請求項 33】

20

ステップ(3)が、動物を前記のPET配列を含む抗原で免疫化することにより実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 34】

前記のPET配列のN又はC末端、又は両方が、遊離のN又はC末端、又は両方を排除するためにブロックされる、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記のPET配列のN又はC末端が、PET配列を異質のキャリアーポリペプチドに融合することによってブロックされ、又は小さい化学基によってブロックされる、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

30

前記のキャリアーが、KLH又はBSAである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

プロテオーム中のキナーゼのすべての潜在的基質を同定するための捕捉剤のアレイであって、各々固体支持体上の別々のアドレス可能な位置に固定された複数の捕捉剤を含み、各捕捉剤は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想された通りに生じるペプチド断片とユニークに結びついたPETに特異的に結合し、該ペプチド断片は、該キナーゼの少なくとも一つの潜在的なリン酸化部位を含んでいる、当該アレイ。

【請求項 38】

前記の固体支持体は、ビーズ又はアレイデバイス(表面に配列された前記の捕捉剤の正体をコード化する様式の)である、請求項 37 に記載のアレイ。

40

【請求項 39】

前記のアレイが、100以上の異なる捕捉剤を含む、請求項 38 に記載のアレイ。

【請求項 40】

前記のアレイデバイスが、回折格子表面を含む、請求項 38 に記載のアレイ。

【請求項 41】

前記の捕捉剤が、抗体又はその抗原結合部位であり、前記のアレイが、整列されたELISAである、請求項 38 に記載のアレイ。

【請求項 42】

前記のアレイデバイスが、表面プラズモン共鳴アレイである、請求項 38 に記載のアレイ。

50

【請求項 4 3】

前記のピーズが、仮想アレイとしてコード化されている、請求項 3 8 に記載のアレイ。

【請求項 4 4】

試料中でキナーゼの潜在的基質を同定する方法であって、下記：

(1) プロテオーム中のすべてのタンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、前記のキナーゼのすべての候補のリン酸化部位を同定し；

(2) 少なくとも 1 つの前記の候補のリン酸化部位を含むすべてのペプチド断片をコンピューターにより同定し、該断片は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想されたとおりに生成し；

(3) (2) で同定された前記の各断片について、前記の試料中の前記の断片にユニークな 1 つの P E T を同定し； 10

(4) (3) で同定された各 P E T に特異的な捕捉剤をそれぞれ獲得して、該捕捉剤を固定化して請求項 3 7 に記載のアレイを生成し；

(5) 該捕捉剤のアレイを前記の処理にかけた前記のプロテオームの試料と接触させ、そして

(6) 前記の捕捉剤に結合した任意の断片中のリン酸化残基の存在を検出することを含み、特定の捕捉剤に結合した特定の断片中のリン酸化残基の存在が、該特定の断片が由来したタンパク質が該キナーゼの基質であることを示す、当該方法。

【請求項 4 5】

前記のプロテオームが、ヒトのプロテオームである、請求項 4 4 に記載の方法。 20

【請求項 4 6】

前記の候補のリン酸化部位が、前記のキナーゼによるリン酸化の共通配列に基づいて予想される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記の共通配列が、リン酸化部位のデータベースから得られる、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記の試料が、前記のキナーゼの公知のアゴニスト、又は前記のキナーゼが属するシグナリング経路の公知のアゴニストである薬剤によって予備処理される、請求項 4 4 に記載の方法。 30

【請求項 4 9】

前記の処理が、リン酸化を保存する条件下で行なわれる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記の同定された基質の前記のキナーゼによるインビトロ又はイン・ビボでのリン酸化を確認することを更に含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記のプロテオーム及び前記のキナーゼが、同じ起源に由来する、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 5 2】

ステップ (6) が、リン酸化された残基に特異的な標識された第二の捕捉剤を利用することにより実施される、請求項 4 4 に記載の方法。 40

【請求項 5 3】

プロテオーム中の翻訳後修飾を触媒する酵素のすべての潜在的基質を同定するための捕捉剤のアレイであって、各々固体支持体上の別々のアドレス可能な位置に固定された複数の捕捉剤を含み、各捕捉剤は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想された通りに生じるペプチド断片とユニークに結びついた P E T に特異的に結合し、該ペプチド断片は、該酵素の少なくとも一つの潜在的な翻訳後修飾部位を含んでいる、当該アレイ。

【請求項 5 4】

アセチル化、アミド化、脱アミド化、プレニル化、ホルミル化、グリコシル化、ヒドロ 50

キシル化、メチル化、ミリストイル化、リン酸化、ユビキチン化、リボシル化又は硫酸化から選択する翻訳後修飾を触媒する酵素の潜在的基質を試料中で同定する方法であって、下記：

(1) プロテオーム中のすべてのタンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該酵素のすべての候補の翻訳後修飾部位を同定し；

(2) 少なくとも1つの該候補の翻訳後修飾部位を含むすべてのペプチド断片をコンピューターにより同定し、該断片は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想された通りに生成し；

(3) (2)で同定された各断片について、該試料中の該断片に対してユニークな一つのPETを同定し；

10

(4) (3)で同定された各PETに特異的な捕捉剤をそれぞれ獲得して、該捕捉剤を請求項53に記載のアレイにおいて固定化し；

(5) 該捕捉剤のアレイを、該処理にかけた該プロテオームの試料と接触させ、そして

(6) 該捕捉剤に結合した任意の断片内の該翻訳後修飾を有する残基の存在を検出することを含み、特定の捕捉剤に結合した特定の断片内の該翻訳後修飾を有する残基の存在が、該特定の断片が由来したタンパク質が該酵素の基質であることを示す、当該方法。

【請求項55】

プロテオーム内の選択した数のシグナル変換経路のどれが刺激に応答して活性化され又は阻害されるかを測定するための捕捉剤のアレイであって、下記を含む当該アレイ：

各々固体支持体上の別々のアドレス可能な位置に固定された複数の捕捉剤であって、該捕捉剤の各々は、該シグナル変換経路の少なくとも一種のキータンパク質の処理から予想されたとおりに生成するペプチド断片と結びついたユニークなPETに特異的に結合し、該ペプチド断片は、該経路の活性化又は阻害に際して予想通りに翻訳後修飾される少なくとも1つの部位を包含し；該シグナル変換経路の各々は、少なくとも1つのキータンパク質により表される。

20

【請求項56】

前記のシグナル変換経路が、IL-4、IL-13、又はToken様レセプターにより活性化される免疫経路；アドレナリン作動性、PAC1レセプター、細胞性粘菌cAMP化学走性、Wnt/Ca²⁺/cGMP、又はGタンパク質依存性7回膜貫通レセプターにより活性化される7回膜貫通レセプター経路；マウス又はキイロショウジョウバエの概日リズム経路；インスリン経路；FAS経路；TNF経路；Gタンパク質共役レセプター経路；インテグリン経路；MAPK、JNK、又はp38のミトゲン活性化プロテインキナーゼ経路；エストロゲンレセプター経路；ホスホイノシチド3-キナーゼ経路；トランスフォーミング成長因子(TGF-)経路；B細胞抗原レセプター経路；Jak-STAT経路；STAT3経路；T細胞シグナル変換経路；1型インターフェロン(/)経路；ジャスモネート生化学経路；又はジャスモネートシグナリング経路である、請求項55に記載のアレイ。

30

【請求項57】

前記のプロテオームが、ヒト、マウス、ラット、カエル(アフリカツメガエル)、魚類(ゼブラフィッシュ)、ハエ(キイロショウジョウバエ)、線虫(C. elegans)、分裂又は出芽酵母、又は植物(シロイスナズナ)のものである、請求項55に記載のアレイ。

40

【請求項58】

前記の翻訳後修飾が、チロシン、セリン、又はスレオニン残基におけるリン酸化である、請求項55に記載のアレイ。

【請求項59】

前記の刺激が、成長因子、サイトカイン、ホルモン、ステロイド、脂質、抗原、小型分子(Ca²⁺、cAMP、cGMP)、浸透圧ショック、熱又は冷却ショック、pH変化、イオン強度変化、機械的力、ウイルス又は細菌感染、又は隣接細胞又はコートタンパク質を有し若しくは有さない表面との付着又は分離、による細胞の処理である、請求項55に記載のアレイ。

50

【請求項 6 0】

少なくとも一つの該シグナル変換経路の活性化又は阻害は、他のシグナル変換経路と異なる種類の翻訳後修飾により明示される、請求項 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 6 1】

少なくとも 3、5、10、20、50、100、200、500、又は1000のシグナリング経路が表される、請求項 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 6 2】

少なくとも2種の異なる生物のシグナリング経路が表される、請求項 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 6 3】

異なる生物の類似のシグナリング経路が表される、請求項 6 2 に記載のアレイ。

【請求項 6 4】

すべての捕捉剤が、同じシグナル変換経路に属するタンパク質に対して特異的であり、該シグナル変換経路のすべてのタンパク質が、予想通りに翻訳後修飾され、表される、請求項 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 6 5】

前記のキータンパク質の少なくとも一つが、少なくとも2つのシグナル変換経路の活性化又は阻害に際して翻訳後修飾される、請求項 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 6 6】

下記の指示を更に含む、請求項 3 7、5 3 又は 5 5 に記載のアレイ：

(1) 試料含有ポリペプチド分析物を、このアレイに適合した方法で変性及び／又は断片化させ；

(2) 該ポリペプチド分析物又はその断片の該捕捉剤との相互作用を検出する。

【請求項 6 7】

指示が、更に、校正手順及び調製手順のためのデータ、及びこれらの捕捉剤の性能特性についての統計データの少なくとも1つを含む、請求項 6 6 に記載のアレイ。

【請求項 6 8】

少なくとも50%の回収率を有する、請求項 3 7、5 3 又は 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 6 9】

少なくとも90%の、前記の試料におけるタンパク質の出現についての全体的な陽性予測値を有する、請求項 3 7、5 3 又は 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 7 0】

99%以上の、前記の試料におけるタンパク質の出現についての全体的な診断感度(DSN)を有する、請求項 3 7、5 3 又は 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 7 1】

前記の支持体に結合した少なくとも1,000又は10,000の異なる捕捉剤を含む、請求項 3 7、5 3 又は 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 7 2】

前記の捕捉剤が、前記の支持体に、100捕捉剤/cm²の密度で結合している、請求項 3 7、5 3 又は 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 7 3】

前記の捕捉剤に結合するPET部分を含む少なくとも一種の標識された参照用ペプチドを更に含み、該捕捉剤の該ポリペプチド分析物との結合は、該参照用ペプチドを利用する比較結合アッセイにより検出される、請求項 3 7、5 3 又は 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 7 4】

アドレス可能なアレイが、ビーズの集合であり、その各々は別々の捕捉剤種及びそのビーズを同定する少なくとも一つの標識を含む、請求項 3 7、5 3 又は 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 7 5】

プロテオームに由来する試料中の選択した数のシグナル変換経路のどれが刺激に応答し

10

20

30

40

50

て活性化され又は阻害されるのかを測定するために、請求項 55 に記載のアレイを利用する方法であって、下記：

(1) 該試料を該刺激に投じ；

(2) 該試料を主題の発明の処理にかけて、請求項 55 に記載のペプチド断片を溶液に可溶性にし；

(3) 該処理後に該試料を主題の発明のアレイに接触させ；

(4) 該捕捉剤に結合した任意の断片内の翻訳後修飾された残基の存在を検出し及び／又はその量を定量する

ことを含み、該刺激後の、該アレイ上の特定の捕捉剤に結合した特定の断片中の翻訳後修飾された残基の存在及び／又はその量の変化が、該特定の断片により表されるシグナル変換経路が活性化又は阻害されたことを示す、当該方法。 10

【請求項 76】

前記の刺激が、薬物の候補の類似体により実施され、特定のシグナル変換経路の活性化又は阻害がモニターされる、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

前記の特定のシグナル変換経路が、前記の薬物により影響を受けるものである、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

前記の特定のシグナル変換経路の前記の類似体及び前記の薬物による活性化／阻害の程度を比較することを更に含む、請求項 77 に記載の方法。 20

【請求項 79】

前記の特定のシグナル変換経路が、前記の薬物の副作用を媒介するものである、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 80】

バイオテクノロジー又は製薬事業のための事業方法であって、下記を含む当該方法：

(i) 請求項 44 に記載の方法を利用して、翻訳後修飾を触媒する酵素の少なくとも 1 つの基質を同定し；

(ii) 適宜、該酵素による該基質の翻訳後修飾を確認し；

(iii) 第三者に、該基質を製造し又は該基質の該酵素の標的としての利用を探究する権利をライセンスする。 30

【請求項 81】

翻訳後修飾酵素の基質を同定するためのタンパク質検出アレイを提供する事業方法であって、下記を含む当該事業方法：

(i) プロテオーム内で、前記の翻訳後修飾のための少なくとも一つの部位を有する少なくとも一種のタンパク質又はその断片を同定し；

(ii) (i) で同定された少なくとも一種のタンパク質又はその断片の各々に対する少なくとも一種の P E T を同定し；

(iii) (ii) で同定された該 P E T の各々に対する少なくとも一種の捕捉剤を生成し、該捕捉剤の各々は、該捕捉剤が生成された該 P E T の一つに特異的に結合し；

(iv) (iii) で生成された捕捉剤のアレイを製作し、該捕捉剤の各々は、該固体支持体の異なる別々の領域又はアドレスに結合され； 40

(v) 診断及び／又は研究実験における利用のために、(iv)における該捕捉剤のアレイをパッケージ化する。

【請求項 82】

捕捉剤のアレイのマーケティングを更に含む、請求項 81 に記載の事業方法。

【請求項 83】

捕捉剤のアレイを分配することを更に含む、請求項 81 に記載の事業方法。

【請求項 84】

複数の捕捉剤を含む組成物であって、前記の複数の捕捉剤が、集合的に、一生物のプロテオーム中の翻訳後修飾酵素のすべての潜在的基質と特異的に相互作用することができ、 50

該捕捉剤の各々が、翻訳後修飾部位を含む該潜在的基質又はその断片中の唯一つの P E T を認識して相互作用することができる、当該組成物。

【請求項 8 5】

前記の捕捉剤が、ヌクレオチド；核酸；P N A (ペプチド核酸)；タンパク質；ペプチド；炭水化物；人工ポリマー；及び小型有機分子よりなる群から選択される、請求項 8 4 に記載の組成物。

【請求項 8 6】

前記の捕捉剤が、抗体であり、又は抗原結合性のその断片である、請求項 8 5 に記載の組成物。

【請求項 8 7】

前記の捕捉剤が、完全長抗体、又は F a b 断片、F (a b')₂ 断片、F d 断片、F v 断片、d A b 断片、単離された相補性決定領域 (C D R)、一本鎖抗体 (s c F v)、又はこれらの誘導体から選択する機能的抗体断片である、請求項 8 6 に記載の組成物。

【請求項 8 8】

前記の捕捉剤の各々が、一本鎖抗体である、請求項 8 6 に記載の組成物。

【請求項 8 9】

研究及び開発におけるマーケティングのために捕捉剤のアレイを生成するための事業方法であって、下記を含む当該事業方法：

(1) 翻訳後修飾が一生物内の少なくとも一つのシグナル変換経路の活性化を表す少なくとも一種のタンパク質を同定し；

(2) 該タンパク質の各々、又は該翻訳後修飾のための少なくとも一つの部位を含むその断片に対する少なくとも一種の P E T を同定し；

(3) (2) で同定された該 P E T の各々に対する少なくとも一種の捕捉剤を生成し、該捕捉剤の各々は、該捕捉剤が生成された該 P E T の一つに特異的に結合し；

(4) 固体支持体上に (3) で生成された捕捉剤のアレイを製作し、該捕捉剤の各々は、該固体支持体の異なる別々の領域に結合され；

(5) (4) の該捕捉剤のアレイを、商業的及び / 又は学術的研究室における診断及び / 又は研究用途のためにパッケージ化する。

【請求項 9 0】

(4) の捕捉剤のアレイ又は (5) の捕捉剤のパッケージ化されたアレイの潜在的顧客及び / 又は販売業者へのマーケティングを更に含む、請求項 8 9 に記載の事業方法。

【請求項 9 1】

(4) の捕捉剤のアレイ又は (5) の捕捉剤のパッケージ化されたアレイを顧客及び / 又は販売業者に販売することを更に含む、請求項 8 9 に記載の事業方法。

【請求項 9 2】

研究及び開発におけるマーケティングのために捕捉剤のアレイを生成するための事業方法であって、下記を含む当該事業方法：

(1) 翻訳後修飾が一生物内の少なくとも一つのシグナル変換経路の活性化を表す少なくとも一種のタンパク質を同定し；

(2) 該タンパク質の各々又は翻訳後修飾のための少なくとも一つの部位を含むその断片に対する少なくとも一種の P E T を同定し；

(3) 第三者に、(2) で同定された少なくとも一種の P E T を製造し又は利用する権利をライセンスする。

【請求項 9 3】

宿主動物を、タンパク質の存在又は過剰発現と関連する病気に対して免疫化する方法であって、下記を含む当該方法：

(1) 該タンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該宿主動物のプロテオーム内の該タンパク質にユニークな少なくとも一種の P E T を同定し；

(2) (1) で同定された少なくとも一種の P E T を含むペプチド免疫原を該宿主動物に投与する。

10

20

30

40

50

【請求項 9 4】

前記の少なくとも一種の P E T を、前記の宿主動物に、該宿主動物の免疫応答を増進させるようにデザインされた配合物で投与する、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記の配合物が、リボ多糖類 (L P S)、脂質 A、ムラミルジペプチド (M D P)、グルカン又はサイトカインから選択する付加的アジュバントを伴って又は伴わずにリポソームを含む、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記のサイトカインが、インターロイキン、インターフェロン、又はコロニー刺激因子である、請求項 9 4 に記載の方法。

10

【請求項 9 7】

前記の配合物が、前記の少なくとも一種の P E T をコードするウイルス又は細菌性ベクターを含む、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記のタンパク質が、宿主動物とは異なる生物に由来する、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記のタンパク質が、腫瘍細胞、感染性因子又は寄生性因子に由来する、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記の感染性因子が、S A R S ウイルスである、請求項 9 3 に記載の方法。

20

【請求項 1 0 1】

免疫組織化学で使用するためのマーカータンパク質に特異的な抗体を生成する方法であって、該マーカータンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該マーカータンパク質にユニークな少なくとも一種の P E T を同定することを含み、該 P E T が該マーカータンパク質の表面に位置された、当該方法。

【請求項 1 0 2】

該 P E T が、免疫組織化学で用いる固定条件下で架橋形成することの知られた残基を排除する、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

試料中の関連タンパク質のファミリーを同時に明確に検出 / 定量する方法であって、下記を含む当該方法：

30

(1) タンパク質の試料中に存在することが予想される関連タンパク質の該ファミリーについてのアミノ酸配列をコンピューター分析して、該タンパク質のファミリーにユニークな共通 P E T 配列を同定し；

(2) 該共通 P E T に選択的且つ特異的に結合する捕捉剤を生成し；

(3) 該試料を (2) で同定された捕捉剤と接触させ；そして

(4) 該捕捉剤に結合したタンパク質の存在を検出し及び / 又はその量を測定することを含み、それにより、該試料中の関連タンパク質のファミリーを同時に検出 / 定量する。

【請求項 1 0 4】

前記の関連タンパク質のファミリーが、ステップ (3) の前に、プロテアーゼ又は化学薬剤により変性されて消化される、請求項 1 0 3 に記載の方法。

40

【請求項 1 0 5】

前記の関連タンパク質のファミリーの各メンバーにユニークな少なくとも一種の P E T を同定して、当該各メンバーの検出 / 定量を促進することを更に含む、請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記の関連タンパク質のファミリーが、関連するキナーゼ又はサイトカインのファミリーを含む、請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記の試料が、唾液、粘液、汗、全血液、血清、尿、羊水、生殖器液、糞便、骨髓、血

50

漿、脊髄液、囲心腔液、胃液、腹液、腹膜腔液、胸膜液、滑液、囊胞液、脳脊髄液、肺洗浄液、リンパ液、涙、前立腺液、他の身体部分からの抽出液、又は他の腺からの分泌物から選択する体液であり；又は上清、全細胞溶解物、又は細胞画分(細胞性物質の溶解及び分画により得られる)、生物学的実在物又は人工的環境で成長した細胞から直接得られる細胞の抽出物又は画分から選択する体液である、請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

試料中の標的タンパク質の P E T と関係する検出 / 定量における利用のために試料を処理する方法であって、該試料の全タンパク質を変性させること、及び / 又は該試料の全タンパク質をプロテアーゼ、化学的薬剤、物理的剪断、又は超音波処理によって断片化することを含む、当該方法。

10

【請求項 1 0 9】

前記の変性が、熱変性又は化学的変性である、請求項 1 0 8 に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

前記の熱変性で、その後又は同時に、熱安定性プロテアーゼを用いるタンパク質分解を行なう、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

前記の熱変性が、2 サイクル以上の熱変性と、その後のプロテアーゼ消化を含む、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

前記の 2 サイクル以上の熱変性の各々が、約 9 0 で変性させた後に、約 5 0 でプロ

20

【請求項 1 1 3】

前記の断片化が、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、パパイン、カルボキシペプチダーゼ、カルpain、ズブチリシン、g l u c - C、エンド l y s - C、又はプロテイナーゼ K から選択するプロテアーゼにより行なわれる、請求項 1 0 8 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

前記の試料が、唾液、粘液、汗、全血液、血清、尿、羊水、生殖器液、糞便、骨髓、血漿、脊髄液、囲心腔液、胃液、腹液、腹膜腔液、胸膜液、滑液、囊胞液、脳脊髄液、肺洗浄液、リンパ液、涙、前立腺液、他の身体部分からの抽出液、又は他の腺からの分泌物から選択する体液であり；又は上清、全細胞溶解物、又は細胞画分(細胞性物質の溶解及び分画により得られる)、生物学的実在物又は人工的環境で成長した細胞から直接得られる細胞の抽出物又は画分から選択する体液である、請求項 1 0 8 に記載の方法。

30

【請求項 1 1 5】

前記の標的タンパク質が、前記の試料中の他のタンパク質と複合体又は凝集体を形成し又は形成する傾向がある、請求項 1 0 8 に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

前記の標的タンパク質が、T G F - ベータタンパク質である、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

表 S A R S に列記した、S A R S ウイルス特異的な P E T アミノ酸配列。

40

【請求項 1 1 8】

P E T 配列に特異的な抗体を生成する方法であって、該方法は、下記：

(1) 動物に該 P E T 配列を含むペプチド免疫原を投与し；

(2) 該 P E T 配列に特異的な抗体を、該 P E T 配列を含むペプチド断片を利用してスクリーニングする

ことを含み、該ペプチド断片は、予想された通りに、該 P E T 配列を含むタンパク質の処理から生成する、当該方法。

【請求項 1 1 9】

前記のペプチド免疫原が、本質的に、前記の P E T 配列からなる、請求項 1 1 8 に記載の方法。

50

【請求項 1 2 0】

前記の P E T 配列の N 又は C 末端、又は両方が、遊離の N 又は C 末端、又は両方を排除するためにブロックされる、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

一種より多くのペプチド免疫原(各々は、P E T 配列を含む)を、前記の動物に投与する、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記の一種より多くのペプチド免疫原が、種々のタンパク質に由来する P E T 配列を含む、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記のペプチド免疫原が、一種より多くの P E T 配列を含む、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記の一種より多くの P E T 配列が、短いリンカー配列によって、結合される、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記の一種より多くの P E T 配列が、種々のタンパク質に由来する、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

ゲノム研究は、遺伝子配列決定法の進歩及び遺伝子、それらがコードするタンパク質及びそれらが関与する経路の研究のための高スループットな方法の増大する利用可能性のおかげで、今や、「産業的」速度と規模に達している。D N A マイクロアレイの開発は、遺伝子発現並びにゲノム D N A 変異の大規模にパラレルな研究を可能にした。

【0 0 0 2】

D N A マイクロアレイは、進歩した医学診断における見込みを示した。一層詳細には、幾つかのグループは、正常組織と病気の組織の遺伝子発現パターンを全ゲノムレベルで比較した場合に、特定の病気に特徴的な発現パターンを認めることができることを示した。Bittner等、(2000) *Nature* 406:536-540; Clark等、(2000) *Nature* 406:532-535; Huang 等、(2000) *Science* 294:870-875; 及びHughes等、(2000) *Cell* 102:109-126。例えば、悪性型の前立腺癌の患者に由来する組織試料は、この病気の中位の悪性型の患者に由来する組織試料に対する m R N A 発現パターンの認識できる差異を示す。Dhanasekaran等、(2000) *Nature* 412 (2001), 822-826頁参照。

【0 0 0 3】

しかしながら、James Watsonが最近指摘したように、タンパク質は、実際、「生物学における役者」である(「A Cast of Thousands」*Nature Biotechnology* 2003年3月)。一層魅力的なアプローチは、鍵となるタンパク質を直接モニターすることであろう。これらは、D N A マイクロアレイ分析により同定されるバイオマーカーであってよい。この場合、必要とされるアッセイは、比較的単純であってよく、5 ~ 1 0 のタンパク質を調べるだけでよい。他のアプローチは、血液、唾液又は尿などの直接的分析などのために、数百又は数千のタンパク質の特徴を検出するアッセイを利用することである。身体が特定の病気に対して特定の仕方で反応して、複雑なデータセット中に個別的な「生体識別特性」例えば血中の 5 0 0 のタンパク質のレベルを生成すると考えることは妥当なことである。殆どの病気を診断するために利用できる、未来における単一の血液検査を想像することができよう。

【0 0 0 4】

基礎研究用ツールとしての大規模なタンパク質検出アッセイの開発の動機付けは、医学的診断のためのそれらの開発の動機付けとは異なっている。生体識別特性の有用性は、遺伝的、生理的又は環境的刺激に対する細胞応答の分子的基礎を理解するために研究者が望

10

20

30

40

50

む一面である。DNAマイクロアレイは、この役割において十分な仕事をするが、タンパク質の検出は、タンパク質レベルの一層正確な測定を可能にするであろうし、一層重要なことには、種々のスプライス変異体又はイソ型の存在を定量するためにデザインすることができよう。これらの事象は、しばしば、タンパク質活性に著しい効果を有するが、該事象に対しては、DNAマイクロアレイは、大抵又は完全に盲目である。

【0005】

これは、タンパク質レベルで行なわれるべき類似の実験を可能にするタンパク質検出用マイクロアレイ(PDM)などの装置の開発に、特に、数百又は数千のタンパク質のレベルを同時にモニターすることのできる装置の開発に大きな関心を誘発した。

【0006】

本発明の前に、PDMは、DNAマイクロアレイの複雑さに近いものさえ存在していない。大規模にパラレルな(例えば、細胞全体又はプロテオーム全体の)タンパク質検出への現在のアプローチには幾つかの問題がある。第一に、試薬生成が困難である：生物体内の各タンパク質に対する検出剤を単離するために個々の標的タンパク質を単離し、次いで、精製したタンパク質に対する検出剤を開発する必要がある。ヒトの体内のタンパク質の数は、現在、約30,000と見積もられているので、これは、多くの時間(数年)と供給源を必要とする。その上更に、ネイティブなタンパク質に対する検出剤は、該検出剤が認識するのがタンパク質のどの部分であるのかを知ることが困難な仕事であるので、一層限定されていない特異性を有する。この問題は、多数の検出剤と一緒に整列させた場合にかなりの交差反応性を引き起こし、大規模なタンパク質検出用アレイを構築することを困難にしている。これらの方法は、典型的には、生物学的試料中に可溶性タンパク質のみを含む。それらは、しばしば、現在偏在性が認められているスプライス変異体を区別することができない。それらは、オルガネラ若しくは細胞膜に結合し又は試料を検出のために処理する際に不溶性である多数のタンパク質を排除する。第三に、現在の方法は、すべてのタンパク質に対し又はすべての型の生物学的試料に対して一般的なものではない。タンパク質は、化学的特性において、全く広範に変化する。タンパク質のグループは、それらを検出のために安定に可溶性に保つために異なる処理条件を必要とする。一つの条件は、すべてのタンパク質に適当ではありえない。更に、生物学的試料は、それらの化学的性質において変化する。同じと考えられた個々の細胞は、それらの生成及び最終的な死の過程において異なるタンパク質を発現する。尿及び血清のような生理学的液体は、比較的単純であるが、生検組織試料は、非常に複雑である。各型の試料を処理して、最大のタンパク質可溶化及び安定化を達成するためには、種々のプロトコールが必要である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

現在の検出方法は、一様に全タンパク質にわたって有効ではなく又は多数のタンパク質(例えば、>5,000)の同時の検出を可能にするために高度に多重化されえない。光学的検出方法は、費用に対し最も効率のよい方法であろうが、種々のタンパク質にわたる一様性に欠けている。試料中のタンパク質は、染料分子で標識しなければならず、タンパク質の異なる化学的特性は、標識の効率の不一致へと導く。標識は又、検出剤と分析物タンパク質との間の相互作用に干渉して、定量における更なる誤りへと導きうる。非光学的検出方法は、開発されているが、計器装備が全く高価であり、中位の多さの試料(例えば、>100試料)のパラレル検出のための多重化さえ非常に困難である。

【0008】

現在の技術の他の問題は、それらが、タンパク質複合体形成、タンパク質構造を変化させる多数の酵素反応、及びタンパク質のコンホメーション変化の複雑な網を含む細胞内の生命過程によって悩まされることである。これらの過程は、試料中に存在することが知られた結合部位をマスクし又は露出させることができる。例えば、前立腺特異的な抗原(PSA)は、遊離(未結合)形態例えばプロPSA、BPSA(BPH結合した遊離PSA)、及び複合体化形態例えばPSA-ACCT、PSA-A2M(PSA-アルファ-マクログ

10

20

30

40

50

ロブリン)及びPSA-API(PSA-アルファ₁プロテアーゼインヒビター)を含む多くの形態で血清中に存在することが知られている(Stephan C.等(2002) Urology 59:2-8参照)。同様に、サイクリンEは、完全長の50kDタンパク質としてのみならず、5つの他の分子量の形態(34~49kDの大きさ)でも存在することが知られている。事実、低分子量形態のサイクリンEは、乳癌に対して完全長タンパク質よりも一層鋭敏なマーカーであると考えられている(Keyomarsi K.等(2002) N.Eng.J.Med.347(20):1566-1575参照)。

【0009】

検出アッセイ前の試料の収集及び取扱いも又、試料中に存在するタンパク質の性質に影響を与えうるので、これらのタンパク質を検出する能力に影響を与えう。Evans M.J.等(2001) Clinical Biochemistry 34:107-112及びZhang D.J.等(1998) Clinical Chemistry 44(6):1325-1333により示されたように、免疫アッセイを標準化することは、試料の取扱い及び血漿又は血清中のタンパク質の安定性の可変性のために困難である。例えば、PSA試料の取扱い例えば試料の凍結は、試料中の種々の形態のPSAの安定性及び相対的レベルに影響を与える(Leinonen J, Stenman UH (2000) Tumour Biol.21(1):46-53)。

【0010】

最後に、現在の技術は、予測不能な仕方で(例えば、分析エラーへと導くことにより)免疫アッセイの結果に影響を与える自己抗体の存在に悩まされている(Fitzmaurice T.F.等(1998) Clinical Chemistry 44(10):2212-2214)。

【0011】

これらの問題は、異質タンパク質抗原に関する免疫アッセイを標準化することは可能であるのかどうかという疑問を促した(Stenman U-H. (2001) Immunoassay Standardization: Is it possible? Who is responsible? Who is capable? Clinical Chemistry 47(5) 815-820)。従って、当分野には、生物学的試料中で発現されるタンパク質の効率的で簡単なパラレル検出方法に対する、特に、タンパク質化学の複雑さにより引き起こされる不正確さを克服することのできる方法に対する、及び所与の細胞型において所与の時点で発現されるタンパク質のすべて又は主要部を検出することのできる方法に対する、又は生物学的試料において発現されたタンパク質のプロテオームワイドの検出及び定量に対する大きな要求が存在している。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、再現性のあるタンパク質の検出及び定量(例えば、複雑な生物学的試料中でのパラレル検出及び定量)のための方法及び試薬に向けられている。本発明のある具体例の顕著な特徴は、試薬生成の複雑さを軽減し、生物体内のすべてのタンパク質のクラスの一層大きいカバーを達成し、試料処理及び分析物安定化工程を大いに単純化し、そして光学的又は他の自動化検出法による効果的で信頼性のあるパラレル検出、及びタンパク質及び/又は翻訳後修飾された形態の定量を可能にし、そして大規模なプロテオームワイドのタンパク質検出のための最少の交差反応性及び十分限定された特異性を有する標準化されたタンパク質捕捉剤の多重化を可能にする。

【0013】

本発明の具体例は又、試料中のタンパク質の多数の形態での存在(例えば、様々な翻訳後修飾された形態又は様々な複合体化し若しくは凝集した形態);血漿又は血清などの試料の取り扱い及び試料中のタンパク質の安定性の可変性;及び試料中の自己抗体の存在により引き起こされる検出方法における不正確さをも克服する。ある具体例において、標的化断片化プロトコールを利用して、本発明の方法は、前述の理由の一つによりマスクされているかもしれない関心あるタンパク質上の結合部位が、捕捉剤との相互作用に利用可能になることを保証する。他の具体例においては、変化した(或は、隠れた)PET部分を溶媒に接近させて捕捉剤と相互作用できるように、これらの試料タンパク質を、それらが変性し、適宜、アルキル化される条件にかける。結果として、本発明は、増大した感度及び一層正確なタンパク質定量能力を有する検出方法を与える。本発明のこの利点は、例えば、タンパク質マーカー型の病気を検出するアッセイ(例えば、PSA又はサイクリンEベ

ースのアッセイ)において、これらのアッセイの予測値、感度及び再現性に改良を与えるので、特に有用である。本発明は、すべての試料からのすべてのタンパク質についての検出及び測定アッセイを標準化することができる。

例えば、Punglia等(N.Engl.J.Med. 349(4): 335-42, 7月、2003年)による最近の研究は、標準的なP S Aベースの前立腺癌のスクリーニングにおいて、生検を行なうためのP S Aの閾値を4 . 1 n g / m lに設定したならば、若年者の癌の8 2 パーセント及び年配者の癌の6 5 パーセントが見落とされるであろうということを示した。それ故、前立腺生検を推奨するためのP S Aの一層低い閾値レベルは、特に若年者において、P S A試験の臨床値を改善することができる。しかしながら、一層低い検出限界では、バックグラウンドが重大な問題となりうる。もしアッセイの感度/選択性を、例えば本発明の方法によって改善することができれば、非常に有利である。

10

特定の具体例において、この発明は、試料中の特定の改変ポリペプチドの存在を検出して定量する方法を提供する。一般的な意味において、この発明は、ペプチド断片上の改変部位と独自に関連するU R S又はP E Tを同定する方法であって、該P E Tを次いで捕捉して、特異的な捕捉試薬によって検出/定量することのできる当該方法を提供する。この方法は、例えばリン抗体によって確実に検出できる限り、事実上すべての種類の翻訳後修飾(リン酸化、グリコシル化などを含むが、これらに限られない)に適用される。この方法は又、同一タンパク質の選択的スプライシング型の検出にも適用される。

【0014】

本発明は、少なくとも部分的に、個々のタンパク質中に存在するユニーク認識配列(U R S)又はプロテオームエピトープタグ(P E T)の利用が、個々のタンパク質の再現可能な検出及び定量を、生物学的試料中のタンパク質の環境中でパラレルに可能にしようという理解に基づいている。このP E Tベースのアプローチの結果として、この発明の方法は、特異的タンパク質を、分析のために全タンパク質の保存を必要とせずそのネイティブな三次構造さえも必要としない仕方で検出する。その上、この発明の方法は、細胞膜に結合した又はオルガネラ膜に結合したタンパク質などの可溶性タンパク質を含む試料中の殆どの又はすべてのタンパク質の検出に適している。

20

【0015】

本発明は又、少なくとも部分的に、ユニーク認識配列が、特異的生物体のプロテオームに特徴的なプロテオームエピトープタグとして役立ちうるし、特異的生物体の認識及び検出を可能にできるという理解にも基づいている。

30

【0016】

本発明は又、少なくとも部分的に、予め定めた特異性を有するアフィニティー剤(例えば、抗体)を、限定された短い長さのペプチドにつき生成することができ、抗体がタンパク質又はペプチドエピトープを認識する場合には、4 ~ 6 個(平均)のアミノ酸のみが臨界的であるという理解にも基づいている。例えば、Lerner RA (1984) Advances In Immunology. 36:1-45を参照されたい。

【0017】

本発明は又、少なくとも部分的に、主題の方法は、試料中のすべてのタンパク質を変性させ(熱変性及び/又は化学的変性を含む)且つ/又は断片化させ(サーモプロテアーゼによる消化を含むプロテアーゼ消化などによる)、そうでなければ隠れたP E T(タンパク質複合体/凝集体におけるP E Tを含む)が溶媒に近づくことのできるタンパク質分析物の可溶性のセットを生成することによって、再現可能で正確な(アッセイ内で及びアッセイ間で)タンパク質の測定を与えるという理解に基づいている。

40

本発明は又、少なくとも部分的に、断片化ペプチド上のP E Tと関連するタンパク質改変は、関連したP E Tを分離してから該改変の検出/定量を行なうことによって容易に検出して定量することができるという理解にも基づいている。

【0018】

従って、一面において、本発明は、生物体プロテオーム中のタンパク質(例えば、膜に結合したタンパク質)の存在を包括的に検出する方法を提供する。この方法は、可溶性の

50

ポリペプチド分析物の集合を生成するように変性され且つ／又は断片化された試料を用意すること；それらのポリペプチド分析物を複数の捕捉剤(例えば、固体支持体例えばアレイ上に固定化された捕捉剤)と、捕捉剤と対応するユニーク認識配列との相互作用が起き、それにより生物体プロテオーム中のタンパク質の存在が包括的に検出されるような条件下で接触させることを含む。

【0019】

この方法は、例えば、診断(例えば、臨床診断又は環境診断)、薬物送達、タンパク質配列決定又はタンパク質プロファイリングにおいて利用するのに適している。一具体例において、生物体のプロテオームの少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%は、整列された捕捉剤から検出可能である。

10

【0020】

捕捉剤は、PETを捕捉するタンパク質、ペプチド、抗体例えば一本鎖抗体、人工タンパク質、RNA又はDNAアプタマー、アロステリックリボザイム、小型分子又は電子工学的手段であってよい。

【0021】

試験すべき試料(例えば、ヒト、酵母、マウス、C.エレガンス、キイロショウジョウバエ又はアラビドプシス・サリアナ試料例えば全細胞溶解物)を、タンパク質分解剤を利用して断片化させることができる。タンパク質分解剤は、ポリペプチドを特異的アミノ酸残基間(即ち、ポリペプチド開裂パターン)で予想されたとおりに開裂させることのできる任意の薬剤であってよい。この開裂の予想可能性は、コンピューターが断片化パターンをイン・シリコで生成することを可能にし、これは、試料にユニークなPETの検索方法を大いに助成するであろう。

20

本発明のこの面の一具体例によれば、タンパク質分解剤は、タンパク質分解酵素である。タンパク質分解酵素の例には、トリプシン、カルパイン、カルボキシペプチダーゼ、キモトリプシン、V8プロテアーゼ、ペプシン、パパイン、ズブチリシン、トロンピン、エラスターゼ、gluc-C、endolys-C又はプロテイナーゼK、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、MetAP-2、アデノウイルスプロテアーゼ、HIVプロテアーゼなどが含まれるが、これらに限られない。

30

下記の表は、種々のプロテアーゼを利用するヒトのプロテオームにおける5量体PETの分析結果をまとめたものである。全部で23,446の配列に、プロテアーゼ消化の前にタグを付けた。

【0022】

【表1】

プロテアーゼ	開裂部位	断片長	タグ付けしたタンパク質
キモトリプシン	W, F, Yの後	12.7	21,990
S.A. V-8 E 特異的	Eの後	13.7	23,120
プロリン後開裂酵素	Pの後	15.7	23,009
トリプシン	K, Rの後	8.5	22,408

40

本発明のこの面の他の具体例によれば、タンパク質分解剤は、タンパク質分解性化学剤例えばシアノゲンブロミド及び2-ニトロ-5-チオシアノベンゾエートである。更に別の具体例においては、試験試料のタンパク質を、物理的剪断によって；超音波処理により、又はこれらの若しくは他の処理ステップの組合せによって断片化させることができる。

【0023】

ある具体例に関する、特に、複雑な試料を分析する場合に重要なことは、ユニーク認識配列として役立つペプチド好ましくは可溶性ペプチドを再現可能に生成することの知られた断片化プロトコルを開発することである。この断片化から生成されたポリペプチド分析物の集合は、5~30、5~20、5~10、10~20、20~30又は10~30

50

アミノ酸長又はそれより長くてよい。上に列挙した値の中間の範囲(例えば、7 ~ 15又は15 ~ 25)も又、この発明の部分である。例えば、上に列挙した何れかの値の組合せを上限及び/又は下限として利用する範囲は、包含される。

【0024】

このユニーク認識配列は、直鎖状配列又は非隣接配列であってよく、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、又は30アミノ酸長であってよい。ある具体例においては、このユニーク認識配列は、配列番号：1 ~ 546よりなる群又はその部分集合から選択する。

【0025】

一具体例において、検出されるタンパク質は、病原性生物体例えば炭疽菌、天然痘、コレラ毒素、黄色ブドウ球菌毒素、志賀菌毒素、細胞傷害性壊死因子1、大腸菌熱安定性毒素、ボツリヌス毒素、又は破傷風神経毒素に特徴的なものである。

【0026】

他の面において、本発明は、試料中のタンパク質の存在を、好ましくは同時に検出する方法又は多数のタンパク質の平行検出を提供する。この方法は、可溶性ポリペプチド分析物の集合を生成するように変性され且つ/又は断片化された試料を用意すること；複数の捕捉剤が結合された複数の別個の領域を有する支持体を含むアレイを用意すること(各捕捉剤は、異なる別個の領域に結合され、各捕捉剤は、タンパク質内のユニーク認識配列を認識して相互作用することができる)；捕捉剤のアレイをポリペプチド分析物と接触させること；及び何れの個別の領域が試料への特異的結合を示したかを測定し、それにより試料中のタンパク質の存在を検出することを含む。

【0027】

更に説明すると、本発明は、パッケージされたタンパク質検出用アレイを提供する。かかるアレイには、複数の特徴を有するアドレス可能アレイが含まれ、各特長は、分析物タンパク質のユニーク認識配列(URS)又はPETと、例えば、分析物タンパク質が、タンパク質分解及び/又は変性により生成された可溶性タンパク質である条件下で選択的に相互作用する別個の種類の捕捉剤を含む。このアレイの特徴は、分析物と捕捉剤との間の相互作用の正体を与えるパターンで又は標識を配列されて、例えば、試料中に存在するタンパク質の正体及び/又は量を確認することである。このパッケージされたアレイには又、(i)アドレス可能アレイを、タンパク質のアミド主鎖位置での変性及び/又は開裂により生成されたポリペプチド分析物を含む試料と接触させ；(ii)該ポリペプチド分析物と該捕捉剤部分との相互作用を検出し；そして(iii)ポリペプチド分析物の又はそれらが由来したネイティブなタンパク質の正体を、捕捉剤部分との相互作用に基づいて測定するための指示も含まれうる。

【0028】

尚更なる面において、本発明は、試料中のタンパク質の存在を、可溶性ポリペプチド分析物の集合を生成するように変性され且つ/又は断片化された試料を用意し；その試料を複数の捕捉剤と接触させることにより検出する方法であって、各捕捉剤が、タンパク質中のユニーク認識配列を、試料中のタンパク質の存在が検出されるような条件下で認識して、該配列と相互作用することのできる当該方法を提供する。

【0029】

他の面において、本発明は、試料中のタンパク質の存在を、複数の捕捉剤が結合された複数の別個の領域(特徴)を有する支持体を含む捕捉剤のアレイを用意し；該アレイを該試料と接触させ；そして何れの別個の領域が該試料への特異的結合を示すかを測定し、それにより試料中のタンパク質の存在を検出することによって検出する方法であって、上記の複数の捕捉剤が、生物体プロテオームの少なくとも50%と相互作用することができる当該方法を提供する。

【0030】

更なる面において、本発明は、生物体プロテオーム中のタンパク質の存在を、タンパク質を含む試料を用意して、該試料を、複数の捕捉剤と、該捕捉剤と対応するユニーク認識

10

20

30

40

50

配列との相互作用が起き、それにより生物体プロテオーム中のタンパク質の存在が包括的に検出されるような条件下で接触させることにより、包括的に検出する方法を提供する。

【0031】

他の面において、本発明は、複数の捕捉剤を提供するが、該複数の捕捉剤は、生物体のプロテオームの少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%相互作用することができ、各捕捉剤は、タンパク質内のユニーク認識配列を認識して該配列と相互作用することのできるものである。

【0032】

更に別の面において、本発明は、捕捉剤のアレイを提供し、該アレイは、複数の捕捉剤(例えば、少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、11000、12000又は13000の異なる捕捉剤)が結合された複数の別個の領域を有する支持体を含み、各捕捉剤は、異なる別個の領域に結合され、各捕捉剤は、タンパク質内のユニーク認識配列を認識して該配列と相互作用することができる。これらの捕捉剤は、支持体に例えばリンカーによって、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500又は1000捕捉剤/cm²の密度で結合されうる。一具体例において、別個の領域の各々は、他の別個の領域から物理的に分離されている。

【0033】

この捕捉剤アレイは、珪素、プラスチック、ガラス、ポリマー例えばセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル又はポリプロピレン、セラミック、フォトレジスト又はゴム表面を含む任意の適当な固体表面上に生成することができる。好ましくは、珪素表面は、二酸化珪素又は窒化珪素表面である。やはり好ましくは、このアレイは、チップ形態で作成する。これらの固体表面は、チューブ、ビーズ、ディスク、シリコンチップ、マイクロプレート、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、その他の多孔質膜、非多孔質膜例えばプラスチック、ポリマー、パースペクス、シリコン(他のものの内で)、複数のポリマーピン、又は複数のマイクロ滴定ウェル、又は任意の他のタンパク質の固定化及び/又は免疫アッセイ若しくは他の結合アッセイの実施に適した表面の形態であってよい。

【0034】

この捕捉剤は、タンパク質、ペプチド、抗体例えば一本鎖抗体、人工タンパク質、RNA又はDNAアプタマー、アロステリックリボザイム又は小型分子であってよい。

【0035】

更なる面において、本発明は、複数の単離されたユニーク認識配列を含む組成物であって、該ユニーク認識配列が、生物体プロテオームの少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%に由来する、当該組成物を提供する。一具体例において、各ユニーク認識配列は、異なるタンパク質に由来する。

【0036】

他の面において、本発明は、捕捉剤のアレイの製造方法を提供する。この方法は、生物体プロテオームの少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%に由来する複数の単離されたユニーク認識配列を用意すること；複数のユニーク認識配列と結合することのできる複数の捕捉剤を生成すること；及びそれらの複数の捕捉剤を、複数の別個の領域を有する支持体に結合させることを含み、各捕捉剤が異なる別個の領域に結合され、それにより捕捉剤のアレイが製造される。

【0037】

一つの基礎的面において、この発明は、多タンパク質試料例えば体液試料又は自然の組織試料又は微生物試料の溶解により生成された細胞試料中の複数の特異的タンパク質の存在を同時に検出するための装置を提供する。この装置は、試料との接触のための複数の固

10

20

30

40

50

定化捕捉剤を含み、それぞれ特異的に個々のユニーク認識配列と結合する剤の少なくとも部分集合、及びそれぞれの捕捉剤とユニーク認識配列との間の結合事象を検出するための手段例えば、捕捉剤に結合したユニーク認識配列の存在及び／又は濃度を検出するためのプローブを含む。これらのユニーク認識配列は、各配列の存在が、それが由来した標的タンパク質の試料(断片化前)中の存在を明白に指示するように選択する。各試料は、一組のタンパク質分解プロトコールにより、ユニーク認識配列が再現可能に生成されるように処理する。適宜、結合事象を検出するための手段には、結合したユニーク認識配列の量を示すデータを検出するための手段が含まれる。これは、該試料中の少なくとも2つの標的タンパク質の相対量の評価を可能にする。

【0038】

この発明は又、多タンパク質試料中の複数の特異的タンパク質の存在を同時に検出する方法をも提供する。この方法は、試料中のタンパク質を、予め決めたプロトコールを利用して変性させ且つ／又は断片化させて、複数のユニーク認識配列を生成させることを含み、試料中のその存在は、それらが由来した標的タンパク質の存在を明白に示す。試料中のこれらの認識配列の少なくとも一部は、ユニーク認識配列の少なくとも一部と特異的に結合する複数の捕捉剤と接触する。特定のユニーク認識配列への結合事象の検出は、それらの配列に対応する標的タンパク質の存在を示す。

【0039】

他の面において、本発明は、生物学的試料において行われるタンパク質結合アッセイの再現性を改良する方法を提供する。この改良は、一層大きい有効感度での標的タンパク質の存在の検出又は一層信頼できるタンパク質の定量(即ち、標準偏差の減少)を可能にする。これらの方法は、(1)試料を、A)標的タンパク質-タンパク質非共有又は共有結合性錯体形成又は凝集により引き起こされる標的タンパク質のマスキング、標的タンパク質の分解又は変性、標的タンパク質の翻訳後修飾、又は標的タンパク質の三次構造の環境に誘導された変化を阻害し、B)標的タンパク質を断片化し、それにより少なくとも一つのペプチドエピトープ(即ち、PET)であって、その濃度が試料中の標的タンパク質の真の濃度に比例する当該エピトープを生成する予め決めたプロトコールを利用して処理すること；(2)そのように処理した試料を、PETの捕捉剤と適当な結合条件下で接触させること、及び(3)結合事象を定性的又は定量的に検出することを含む。

【0040】

主題のアッセイのある具体例において、ここに記載の教示によって利用可能にされる捕捉剤を利用して、例えばELISA及び他の免疫アッセイと比較して増大した感度、ダイナミックレンジ及び／又は回収率を有する複合アッセイを開発することができる。かかる改良された性能特性は、次の少なくとも一つを含むことができる：参照標準例えば比較対照試料に対する0.95以上の回帰係数(R²)(一層好ましくは、0.97、0.99又は0.995よりも大きいR²)；少なくとも50パーセントの、一層好ましくは少なくとも60、75、80又は90パーセントの平均回収率；少なくとも90パーセントの、一層好ましくは少なくとも95、98又は99パーセントの試料中のタンパク質の存在についての平均陽性予想値；99パーセント以上の、一層好ましくは少なくとも99.5又は99.8パーセントの試料中のタンパク質の存在についての平均診断感度(DSN)；99パーセント以上の、一層好ましくは少なくとも99.5又は99.8パーセントの試料中のタンパク質の存在についての平均診断特異性(DSP)。

【0041】

この発明の他の面は、試料中の標的タンパク質上の翻訳後修飾の存在を検出する方法であって、(1)該標的タンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該翻訳後修飾のための少なくとも1つの候補の部位を同定し；(2)該標的タンパク質の少なくとも1つの断片のアミノ酸配列をコンピューターにより同定し、該断片は、該試料中の該標的タンパク質の処理から予想通りに生じて、該断片は、該試料中の該断片にユニークな該潜在的翻訳後修飾部位及びPET(プロテオームエピトームタグ)を含み；(3)該PETに特異的に結合する捕捉剤を生成させて、該捕捉剤を支持体に固定化し；(4)該試料を該処理にか

10

20

30

40

50

けて、該断片を溶液に可溶性にして、該試料を、該処理後、該捕捉剤に接触させて；(5) 該捕捉剤に結合された該断片において、該翻訳後修飾の存否を検出することを含む当該方法を提供する。

【0042】

一具体例において、該翻訳後修飾は、アセチル化、アミド化、脱アミド化、プレニル化、ホルミル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、メチル化、ミリストイル化、リン酸化、ユビキチン化、リボシル化又は硫酸化である。

【0043】

一具体例において、該翻訳後修飾は、チロシン、セリン又はスレオニンに対するリン酸化である。

10

【0044】

一具体例において、該アミノ酸配列のコンピューター分析のステップは、該PETを、pI、電荷、立体構造、溶解度、疎水性、極性及び溶媒露出領域の少なくとも1つをも含む基準に基づいてを同定するニアレスト・ネイバー分析(Nearest-Neighbor Analysis)を含む。

【0045】

一具体例において、この方法は、(3)で生成した該捕捉剤の、少なくとも一種の該PETのニアレスト・ネイバーに対する特異性を測定することを更に含む。

【0046】

一具体例において、ペプチド競合アッセイを、(3)で生成した該捕捉剤の、該PETのニアレスト・ネイバーに対する特異性の測定に利用する。

20

【0047】

一具体例において、前記のアミノ酸配列をコンピューター分析するステップは、示された溶解条件下で少なくとも閾値の溶解度を有すると予想された該PETを同定する溶解度分析を包含する。

【0048】

一具体例において、前記のPETの長さは、5～10アミノ酸、10～15アミノ酸、15～20アミノ酸、20～25アミノ酸、25～30アミノ酸、又は30～40アミノ酸から選択される。

【0049】

一具体例において、前記の捕捉剤は、完全長の抗体、又はFab断片、F(ab')₂断片、Fd断片、Fv断片、dAb断片、単離された相補性決定領域(CDR)、一本鎖抗体(scFv)、又はこれらの誘導体から選択する機能的な抗体断片である。

30

【0050】

一具体例において、前記の捕捉剤は、ヌクレオチド；核酸；PNA(ペプチド核酸)；タンパク質；ペプチド；炭水化物；人工ポリマー；又は小型有機分子である。

【0051】

一具体例において、前記の捕捉剤は、アプタマー、足場ペプチド、又は小型有機分子である。

【0052】

一具体例において、前記の処理は、前記の試料の、プロテアーゼ、化学薬剤、物理的剪断、又は超音波処理による変性及び／又は断片化である。

40

【0053】

一具体例において、前記の変性は、熱変性又は化学的変性である。

【0054】

一具体例において、前記の熱変性は、熱安定性プロテアーゼを利用するタンパク質分解をその後行なうか又は同時に行なう。

【0055】

一具体例において、前記の熱変性は、2サイクル以上の熱変性とその後のプロテアーゼ消化を含む。

50

【 0 0 5 6 】

一具体例において、前記の断片化は、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、パパイ
ン、カルボキシペプチダーゼ、カルパイン、ズブチリシン、g l u c - C、エンド l y s
- C、又はプロテイナーゼ K から選択するプロテアーゼによって行なう。

【 0 0 5 7 】

一具体例において、前記の試料は、唾液、粘液、汗、全血液、血清、尿、羊水、生殖器
液、糞便、骨髓、血漿、脊髄液、囲心腔液、胃液、腹液、腹膜腔液、胸膜液、滑液、囊胞
液、脳脊髄液、肺洗浄液、リンパ液、涙、前立腺液、他の身体部分からの抽出液、又は他
の腺からの分泌物から選択する体液であり；又は上清、全細胞溶解物、又は細胞画分(細
胞性物質の溶解及び分画により得られる)、生物学的実在物又は人工的環境で成長した細胞
から直接得られる細胞の抽出物又は画分に由来する。

10

【 0 0 5 8 】

一具体例において、前記の試料は、ヒト、マウス、ラット、カエル(アフリカツメガエル)、
魚類(ゼブラフィッシュ)、ハエ(キイロショウジョウバエ)、線虫(C. elegans)、分
裂又は出芽酵母、又は植物(シロイスナズナ)から得られる。

【 0 0 5 9 】

一具体例において、前記の試料は、膜結合したタンパク質の処理により生成される。

【 0 0 6 0 】

一具体例において、前記の処理は、前期の翻訳後修飾を保存する条件下で行なわれる。

【 0 0 6 1 】

一具体例において、前記の P E T 及び翻訳後修飾のための候補の部位は、重複しない。

20

【 0 0 6 2 】

一具体例において、前記の捕捉剤は、変性条件下で前記の P E T についての選択性につ
いて最適化される。

【 0 0 6 3 】

一具体例において、ステップ(5)は、前記の翻訳後修飾に特異的な第二捕捉剤を利用す
ることにより実施され、前記の第二捕捉剤は、酵素、蛍光標識、着色染料、化学発光性化
合物、コロイド粒子、放射性同位体、近赤外線染料、D N A デンドリマー、水溶性量子ド
ット、ラテックスビーズ、セレン粒子、又はユーロピウムナノ粒子から選択する検出可能
な部分により標識される。

30

【 0 0 6 4 】

一具体例において、前記の翻訳後修飾は、リン酸化であり、前記の第二の捕捉剤は、リ
ン酸化チロシン、リン酸化セリン、又はリン酸化スレオニンに特異的な標識された第二抗
体である。

【 0 0 6 5 】

一具体例において、前記の第二抗体は、酵素又は蛍光基により標識される。

【 0 0 6 6 】

一具体例において、前記の酵素は、H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ)である。

【 0 0 6 7 】

一具体例において、前記の翻訳後修飾は、リン酸化であり、第二の捕捉剤は、リンアミ
ノ酸を特異的に染める蛍光染料である。

40

【 0 0 6 8 】

一具体例において、前記の蛍光染料は、Pro-Q Diamond染料である。

【 0 0 6 9 】

一具体例において、前記の翻訳後修飾は、グリコシル化であり、前記の標識した第二捕
捉剤は、グリコシル化部位に結合した少なくとも一つの糖部分に特異的である標識された
レクチンである。

【 0 0 7 0 】

一具体例において、前記の翻訳後修飾は、ユビキチン化であり、前記の標識した第二捕
捉剤は、ユビキチンに特異的な標識した第二抗体である。

50

【 0 0 7 1 】

一具体例において、前記の試料は、前記の断片に対して 1 0 億モル過剰の無関係のタンパク質又はその断片を含む。

【 0 0 7 2 】

一具体例において、この方法は、更に、前記の捕捉剤に結合した前記の断片を定量することを含む。

【 0 0 7 3 】

一具体例において、ステップ(3)は、動物を前記の P E T 配列を含む抗原で免疫化することにより実施される。

【 0 0 7 4 】

一具体例において、前記の P E T 配列の N 又は C 末端、又は両方は、遊離の N 又は C 末端、又は両方を排除するためにブロックされる。

【 0 0 7 5 】

一具体例において、前記の P E T 配列の N 又は C 末端は、P E T 配列を異質のキャリアーポリペプチドに融合することによってブロックされ、又は小さい化学基によってブロックされる。

【 0 0 7 6 】

一具体例において、前記のキャリアーは、K L H 又は B S A である。

【 0 0 7 7 】

この発明の他の面は、プロテオーム中のキナーゼのすべての潜在的基質を同定するための捕捉剤のアレイであって、各々、固体支持体上の別々のアドレス可能な位置に固定された複数の捕捉剤を含む、当該アレイを提供する(各捕捉剤は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想された通りに生じるペプチド断片とユニークに関連した P E T に特異的に結合し、該ペプチド断片は、該キナーゼの少なくとも一つの潜在的なリン酸化部位を含んでいる)。

【 0 0 7 8 】

一具体例において、前記の固体支持体は、ビーズ又はアレイデバイス(表面に配列された前記の捕捉剤の正体をコード化する様式の)である。

【 0 0 7 9 】

一具体例において、前記のアレイは、1 0 0 以上の異なる捕捉剤を含む。

【 0 0 8 0 】

一具体例において、前記のアレイデバイスは、回折格子表面を含む。

【 0 0 8 1 】

一具体例において、前記の捕捉剤は、抗体又はその抗原結合部位であり、前記のアレイは、整列された E L I S A である。

【 0 0 8 2 】

一具体例において、前記のアレイデバイスは、表面プラズモン共鳴アレイである。

【 0 0 8 3 】

一具体例において、前記のビーズは、仮想アレイとしてコード化される。

【 0 0 8 4 】

この発明の他の面は、試料中のキナーゼの潜在的基質を同定する方法であって、(1)プロテオーム中のすべてのタンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、前記のキナーゼのすべての候補のリン酸化部位を同定し；(2)少なくとも1つの前記の候補のリン酸化部位を含むすべてのペプチド断片をコンピューターにより同定し、該断片は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想されたとおりに生成し；(3)(2)で同定された前記の各断片について、前記の試料中の前記の断片にユニークな1つの P E T を同定し；(4)(3)で同定された各 P E T に特異的な捕捉剤をそれぞれ獲得して、該捕捉剤を固定化して主題の発明のアレイを生成し；(5)該捕捉剤のアレイを前記の処理にかけた前記のプロテオームの試料と接触させ、そして(6)前記の捕捉剤に結合した任意の断片中のリン酸化残基の存在を検出することを含み、特定の捕捉剤に結合した特定の断片中のリン

10

20

30

40

50

酸化残基の存在が、該特定の断片が由来したタンパク質が該キナーゼの基質であることを示す、当該方法を提供する。

【0085】

一具体例において、前記のプロテオームは、ヒトのプロテオームである。

【0086】

一具体例において、前記の候補のリン酸化部位は、前記のキナーゼによるリン酸化の共通配列に基づいて予想される。

【0087】

一具体例において、前記の共通配列は、リン酸化部位のデータベースから得られる。

【0088】

一具体例において、前記の試料は、前記のキナーゼの公知のアゴニスト、又は前記のキナーゼが属するシグナリング経路の公知のアゴニストである薬剤によって予備処理される。

【0089】

一具体例において、前記の処理は、リン酸化を保存する条件下で行なわれる。

【0090】

一具体例において、この方法は、更に、前記の同定された基質の前記のキナーゼによるインビトロ又はイン・ビボでのリン酸化を確認することを含む。

【0091】

一具体例において、前記のプロテオーム及び前記のキナーゼは、同じ起源に由来する。

【0092】

一具体例において、ステップ(6)は、リン酸化された残基に特異的な標識された第二の捕捉剤を利用することにより実施される。

【0093】

この発明の他の面は、プロテオーム中の翻訳後修飾を触媒する酵素のすべての潜在的基質を同定するための捕捉剤のアレイであって、各々、固体支持体上の別々のアドレス可能な位置に固定された複数の捕捉剤を含む、当該アレイを提供する(各捕捉剤は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想された通りに生じるペプチド断片とユニークに関連したPETに特異的に結合し、該ペプチド断片は、該酵素の少なくとも一つの潜在的な翻訳後修飾部位を含んでいる)。

【0094】

この発明の他の面は、アセチル化、アミド化、脱アミド化、プレニル化、ホルミル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、メチル化、ミリストイル化、リン酸化、ユビキチン化、リボシル化又は硫酸化から選択する翻訳後修飾を触媒する酵素の潜在的基質を試料中で同定する方法であって、(1)プロテオーム中のすべてのタンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該酵素のすべての候補の翻訳後修飾部位を同定し；(2)少なくとも1つの該候補の翻訳後修飾部位を含むすべてのペプチド断片をコンピューターにより同定し、該断片は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想された通りに生成し；(3)(2)で同定された各断片について、該試料中の該断片に対してユニークな一つのPETを同定し；(4)(3)で同定された各PETに特異的な捕捉剤をそれぞれ獲得して、該捕捉剤を主題の発明のアレイにおいて固定化し；(5)該捕捉剤のアレイを、該処理にかけた該プロテオームの試料と接触させ、そして(6)該捕捉剤に結合した任意の断片内の該翻訳後修飾を有する残基の存在を検出することを含み、特定の捕捉剤に結合した特定の断片内の該翻訳後修飾を有する残基の存在が、該特定の断片が由来したタンパク質が該酵素の基質であることを示す、当該方法を提供する。

【0095】

この発明の他の面は、プロテオーム内の選択した数のシグナル変換経路のどれが刺激に応答して活性化され又は阻害されるかを測定するための捕捉剤のアレイであって、各々、固体支持体上の別々のアドレス可能な位置に固定された複数の捕捉剤を含む当該アレイ(該捕捉剤の各々は、該シグナル変換経路の少なくとも一種のキータンパク質の処理から予

10

20

30

40

50

想されたとおりに生成するペプチド断片と関連したユニークな P E T に特異的に結合し、該ペプチド断片は、該経路の活性化又は阻害に際して予想通りに翻訳後修飾される少なくとも 1 つの部位を包含し；該シグナル変換経路の各々は、少なくとも 1 つのキータンパク質により表される)を提供する。

【 0 0 9 6 】

一具体例において、前記のシグナル変換経路は、I L - 4、I L - 1 3、又はToken様レセプターにより活性化される免疫経路；アドレナリン作動性、P A C 1レセプター、細胞性粘菌 c A M P 化学走性、W n t / C a ²⁺ / c G M P、又はGタンパク質依存性7回膜貫通レセプターにより活性化される7回膜貫通レセプター経路；マウス又はキイロショウジョウバエの概日リズム経路；インスリン経路；F A S 経路；T N F 経路；Gタンパク質共役レセプター経路；インテグリン経路；M A P K、J N K、又はp 3 8のミトゲン活性化プロテインキナーゼ経路；エストロゲンレセプター経路；ホスホイノシチド3 - キナーゼ経路；トランスフォーミング成長因子 (T G F -) 経路；B細胞抗原レセプター経路；J a k - S T A T 経路；S T A T 3 経路；T細胞シグナル変換経路；1型インターフェロン(/) 経路；ジャスモネート生化学経路；又はジャスモネートシグナリング経路である。

10

【 0 0 9 7 】

一具体例において、前記のプロテオームは、ヒト、マウス、ラット、カエル(アフリカツメガエル)、魚類(ゼブラフィッシュ)、ハエ(キイロショウジョウバエ)、線虫(C. elegans)、分裂又は出芽酵母、又は植物(シロイスナズナ)のものである。

20

【 0 0 9 8 】

一具体例において、前記の翻訳後修飾は、チロシン、セリン、又はスレオニン残基におけるリン酸化である。

【 0 0 9 9 】

一具体例において、前記の刺激は、成長因子、サイトカイン、ホルモン、ステロイド、脂質、抗原、小型分子(C a ²⁺、c A M P、c G M P)、浸透圧ショック、熱又は冷却ショック、p H 変化、イオン強度変化、機械的力、ウイルス又は細菌感染、又は隣接細胞又はコートタンパク質を有し若しくは有さない表面との付着又は分離、による細胞の処理である。

【 0 1 0 0 】

一具体例において、少なくとも一つの該シグナル変換経路の活性化又は阻害は、他のシグナル変換経路と異なる種類の翻訳後修飾により明示される。

30

【 0 1 0 1 】

一具体例において、少なくとも3、5、10、20、50、100、200、500、又は1000のシグナリング経路が表される。

【 0 1 0 2 】

一具体例において、少なくとも2種の異なる生物のシグナリング経路が表される。

【 0 1 0 3 】

一具体例において、異なる生物の類似のシグナリング経路が表される。

【 0 1 0 4 】

一具体例において、すべての捕捉剤は、同じシグナル変換経路に属するタンパク質に対して特異的であり、該シグナル変換経路のすべてのタンパク質は、予想通りに翻訳後修飾され、表される。

40

【 0 1 0 5 】

一具体例において、前記のキータンパク質の少なくとも一つは、少なくとも2つのシグナル変換経路の活性化又は阻害に際して翻訳後修飾される。この具体例において、これらのキータンパク質の翻訳後修飾の状態は、シグナルは多くの異なる経路からこれらのキータンパク質に集まるので、異なる(又は、一見、無関係にさえ見える)シグナリング経路の間のクロストークを示しうる。

【 0 1 0 6 】

50

一具体例において、このアレイは、更に、(1)試料含有ポリペプチド分析物を、このアレイに適合した方法で変性及び／又は断片化させ；(2)該ポリペプチド分析物又はその断片の該捕捉剤との相互作用を検出するための指示を含む。

【0107】

一具体例において、これらの指示は、更に、校正手順及び調製手順のためのデータ、及びこれらの捕捉剤の性能特性についての統計データの少なくとも1つを含む。

【0108】

一具体例において、このアレイは、少なくとも50%の回収率を有する。

【0109】

一具体例において、このアレイは、少なくとも90%の、該試料におけるタンパク質の出現についての全体的な陽性予測値を有する。 10

【0110】

一具体例において、このアレイは、99%以上の、該試料におけるタンパク質の出現についての全体的な診断感度(DSN)を有する。

【0111】

一具体例において、前記のアレイは、前記の支持体に結合した少なくとも1,000又は10,000の異なる捕捉剤を含む。

【0112】

一具体例において、前記の捕捉剤は、前記の支持体に、100捕捉剤/cm²の密度で結合している。 20

【0113】

一具体例において、このアレイは、更に、前記の捕捉剤に結合するPET部分を含む少なくとも一種の標識された参照用ペプチドを含み、該捕捉剤の該ポリペプチド分析物との結合は、該参照用ペプチドを利用する比較結合アッセイにより検出される。

【0114】

一具体例において、このアドレス可能なアレイは、ビーズの集合であり、その各々は別々の捕捉剤種及びそのビーズを同定する少なくとも一つの標識を含む。

【0115】

この発明の他の面は、プロテオームに由来する試料中の選択した数のシグナル変換経路のどれが刺激に応答して活性化され又は阻害されるのかを測定するために、主題の発明のアレイを利用する方法であって、(1)該試料を該刺激に投じ；(2)該試料を主題の発明の処理にかけて、該主題の発明のペプチド断片を溶液に可溶性にし；(3)該処理後に該試料を主題の発明のアレイに接触させ；(4)該捕捉剤に結合した任意の断片内の翻訳後修飾された残基の存在を検出し及び／又はその量を定量することを含み、該刺激後の、該アレイ上の特定の捕捉剤に結合した特定の断片中の翻訳後修飾された残基の存在及び／又はその量の変化が、該特定の断片により表されるシグナル変換経路が活性化又は阻害されたことを示す、当該方法を提供する。 30

【0116】

一具体例において、前記の刺激は、薬物の候補の類似体により実施され、特定のシグナル変換経路の活性化又は阻害はモニターされる。 40

【0117】

一具体例において、前記の特定のシグナル変換経路は、前記の薬物により影響を受けるものである。

【0118】

一具体例において、この方法は、更に、前記の特定のシグナル変換経路の前記の類似体及び前記の薬物による活性化／阻害の程度を比較することを含む。

【0119】

一具体例において、前記の特定のシグナル変換経路は、前記の薬物の副作用を媒介するものである。

【0120】

この発明の他の面は、バイオテクノロジー又は製薬事業のための事業方法であって、(i)主題の発明の方法を利用して、翻訳後修飾を触媒する酵素の少なくとも1つの基質を同定し；(ii)適宜、該酵素による該基質の翻訳後修飾を確認し；(iii)第三者に、該基質を製造し又は該基質の該酵素の標的としての利用を探究する権利をライセンスすることを含む当該事業方法を提供する。

【0121】

この発明の他の面は、翻訳後修飾酵素の基質を同定するためのタンパク質検出アレイを提供する事業方法であって、(i)プロテオーム内で、前記の翻訳後修飾のための少なくとも一つの部位を有する少なくとも一種のタンパク質又はその断片を同定し；(ii)(i)で同定された少なくとも一種のタンパク質又はその断片の各々に対する少なくとも一種のPETを同定し；(iii)(ii)で同定された該PETの各々に対する少なくとも一種の捕捉剤を生成し、該捕捉剤の各々は、該捕捉剤が生成された該PETの一つに特異的に結合し；(iv)(iii)で生成された捕捉剤のアレイを製作し、該捕捉剤の各々は、該固体支持体の異なる別々の領域又はアドレスに結合され；(v)診断及び/又は研究実験における利用のために、(iv)における該捕捉剤のアレイをパッケージ化することを含む当該事業方法を提供する。

10

【0122】

一具体例において、この事業方法は、更に、該捕捉剤のアレイのマーケティングを含む。

【0123】

一具体例において、この事業方法は、更に、該捕捉剤のアレイを分配することを含む。

20

【0124】

この発明の他の面は、複数の捕捉剤を含む組成物であって、前記の複数の捕捉剤が、集合的に、一生物のプロテオーム中の翻訳後修飾酵素のすべての潜在的基質と特異的に相互作用することのできる、当該組成物を提供し、該捕捉剤の各々は、翻訳後修飾部位を含む該潜在的基質又はその断片中の唯一つのPETを認識して相互作用することができる。

【0125】

一具体例において、該捕捉剤は、ヌクレオチド；核酸；PNA(ペプチド核酸)；タンパク質；ペプチド；炭水化物；人工ポリマー；及び小型有機分子よりなる群から選択される。

30

【0126】

一具体例において、前記の捕捉剤は、抗体であり、又は抗原結合性のその断片である。

【0127】

一具体例において、前記の捕捉剤は、完全長抗体、又はFab断片、F(ab')₂断片、Fd断片、Fv断片、dAb断片、単離された相補性決定領域(CDR)、一本鎖抗体(scFv)、又はこれらの誘導体から選択する機能的抗体断片である。

【0128】

一具体例において、前記の捕捉剤の各々は、一本鎖抗体である。

【0129】

この発明の他の面は、研究及び開発におけるマーケティングのために捕捉剤のアレイを生成するための事業方法であって、(1)翻訳後修飾が一生物内の少なくとも一つのシグナル変換経路の活性化を表す少なくとも一種のタンパク質を同定し；(2)該タンパク質の各々、又は該翻訳後修飾のための少なくとも一つの部位を含むその断片に対する少なくとも一種のPETを同定し；(3)(2)で同定された該PETの各々に対する少なくとも一種の捕捉剤を生成し、該捕捉剤の各々は、該捕捉剤に生成された該PETの一つに特異的に結合し；(4)(3)で固体支持体上に生成された捕捉剤のアレイを製作し、該捕捉剤の各々は、該固体支持体の異なる別々の領域に結合され；(5)(4)の該捕捉剤のアレイを、商業的及び/又は学術的研究室における診断及び/研究用途のためにパッケージ化することを含む当該事業方法を提供する。

40

【0130】

50

一具体例において、この事業方法は、更に、(4)の捕捉剤のアレイ又は(5)の捕捉剤のパッケージ化されたアレイの潜在的顧客及び/又は販売業者のマーケティングを含む。

【0131】

一具体例において、この事業方法は、更に、(4)の捕捉剤のアレイ又は(5)の捕捉剤のパッケージ化されたアレイを顧客及び/又は販売業者に販売することを含む。

【0132】

この発明の他の面は、研究及び開発におけるマーケティングのために捕捉剤のアレイを生成するための事業方法であって、(1)翻訳後修飾が一生物内の少なくとも一つのシグナル変換経路の活性化を表す少なくとも一種のタンパク質を同定し；(2)該タンパク質の各々又は翻訳後修飾のための少なくとも一つの部位を含むその断片に対する少なくとも一種のPETを同定し；(3)第三者に、(2)で同定された少なくとも一種のPETを製造し又は利用する権利をライセンスすることを含む当該事業方法を提供する。

10

【0133】

この発明の他の面は、宿主動物を、タンパク質の存在又は過剰発現と関連する病気に対して免疫化する方法であって、(1)該タンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該宿主同粒のプロテオーム内の該タンパク質にユニークな少なくとも一種のPETを同定し；(2)(1)で同定された少なくとも一種のPETを該宿主動物に免疫原として投与することを含む当該方法を提供する。

【0134】

一具体例において、前記の少なくとも一種のPETを、前記の宿主動物に、該宿主動物の免疫応答を増進させるようにデザインされた配合物で投与する。

20

【0135】

一具体例において、前記の配合物は、リポ多糖類(LPS)、脂質A、ムラミルジペプチド(MDP)、グルカン又はサイトカインから選択する付加的アジュバントを伴って又は伴わずにリボソームを含む。

【0136】

一具体例において、前記のサイトカインは、インターロイキン、インターフェロン、又はコロニー刺激因子である。

【0137】

一具体例において、前記の配合物は、前記の少なくとも一種のPETをコードするウイルス又は細菌性ベクターを含む。

30

【0138】

一具体例において、前記のタンパク質は、宿主動物とは異なる生物に由来する。

【0139】

一具体例において、前記のタンパク質は、腫瘍細胞、感染性因子又は寄生性因子に由来する。

【0140】

一具体例において、前記の感染性因子は、SARSウイルスである。

【0141】

この発明の他の面は、免疫組織化学で使用するためのマーカータンパク質に特異的な抗体を生成する方法であって、該マーカータンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該マーカータンパク質にユニークな少なくとも一種のPETを同定することを含み、該PETが該マーカータンパク質の表面に位置される、当該方法を提供する。

40

【0142】

一具体例において、該PETは、免疫組織化学で用いる固定条件下で架橋形成することの知られた残基を排除する。

【0143】

この発明の他の面は、試料中の関連タンパク質のファミリーを同時に明確に検出/定量する方法であって、(1)タンパク質の試料中に存在することが予想される関連タンパク質の該ファミリーについてのアミノ酸配列をコンピューター分析して、該タンパク質のファ

50

ミリーにユニークな共通 P E T 配列を同定し；(2)該共通 P E T に選択的且つ特異的に結合する捕捉剤を生成し；(3)該試料を(2)で同定された捕捉剤と接触させ；そして(4)該捕捉剤に結合したタンパク質の存在を検出し及び／又はその量を測定することを含み、それにより、該試料中の関連タンパク質のファミリーを同時に検出／定量する、当該方法を提供する。

【0144】

一具体例において、前記の関連タンパク質のファミリーは、ステップ(3)の前に、プロテアーゼ又は化学薬剤により変性されて消化される。

【0145】

一具体例において、この方法は、更に、前記の関連タンパク質のファミリーの各メンバーにユニークな少なくとも一種の P E T を同定して、当該各メンバーの検出／定量を促進することを含む。

【0146】

一具体例において、前記の関連タンパク質のファミリーは、関連するキナーゼ又はサイトカインのファミリーを含む。

【0147】

一具体例において、前記の試料は、唾液、粘液、汗、全血液、血清、尿、羊水、生殖器官液、糞便、骨髓、血漿、脊髄液、囲心腔液、胃液、腹液、腹膜腔液、胸膜液、滑液、囊胞液、脳脊髄液、肺洗浄液、リンパ液、涙、前立腺液、他の身体部分からの抽出液、又は他の腺からの分泌物から選択する体液であり；又は上清、全細胞溶解物、又は細胞画分(細胞性物質の溶解及び分画により得られる)、生物学的実在物又は人工的環境で成長した細胞から直接得られる細胞の抽出物又は画分から選択する体液である。

【0148】

この発明の他の面は、試料中の標的タンパク質の P E T と関係する検出／定量における利用のために試料を処理する方法であって、該試料の全タンパク質を変性させること、及び／又は該試料の全タンパク質をプロテアーゼ、化学的薬剤、物理的剪断、又は超音波処理によって断片化することを含む、当該方法を提供する。

【0149】

一具体例において、前記の変性は、熱変性又は化学的変性である。

【0150】

一具体例において、前記の熱変性は、その後又は同時に、熱安定性プロテアーゼを用いるタンパク質分解を行なう。

【0151】

一具体例において、前記の熱変性は、2サイクル以上の熱変性と、その後のプロテアーゼ消化を含む。

【0152】

一具体例において、前記の2サイクル以上の熱変性の各々は、約90 で変性させた後に、約50 でプロテアーゼ消化を行なうことにより実施される。

【0153】

一具体例において、前記の断片化は、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、パパイシ、カルボキシペプチダーゼ、カルパイン、ズブチリシン、g l u c - C、エンド l y s - C、又はプロテイナーゼ K から選択するプロテアーゼにより行なわれる。

【0154】

一具体例において、前記の試料は、唾液、粘液、汗、全血液、血清、尿、羊水、生殖器官液、糞便、骨髓、血漿、脊髄液、囲心腔液、胃液、腹液、腹膜腔液、胸膜液、滑液、囊胞液、脳脊髄液、肺洗浄液、リンパ液、涙、前立腺液、他の身体部分からの抽出液、又は他の腺からの分泌物から選択する体液であり；又は上清、全細胞溶解物、又は細胞画分(細胞性物質の溶解及び分画により得られる)、生物学的実在物又は人工的環境で成長した細胞から直接得られる細胞の抽出物又は画分から選択する体液である。

【0155】

10

20

30

40

50

一具体例において、前記の標的タンパク質は、前記の試料中の他のタンパク質と複合体又は凝集体を形成し又は形成する傾向がある。

【0156】

一具体例において、前記の標的タンパク質は、TGF-ベータタンパク質である。

【0157】

この発明の他の面は、表SARSに列記したように、SARSウイルス特異的なPETアミノ酸配列を提供する。

【0158】

この発明の他の面は、PET配列に特異的な抗体を生成する方法であって、(1)動物に該PET配列を含むペプチド免疫原を投与し；(2)該PET配列に特異的な抗体を、該PET配列を含むペプチド断片を利用してスクリーニングすることを含む、当該方法を提供する(該ペプチド断片は、予想された通りに、該PET配列を含むタンパク質の処理から生成する)。

10

【0159】

一具体例において、前記のペプチド免疫原は、本質的に、前記のPET配列からなる。

【0160】

一具体例において、前記のPET配列のN又はC末端、又は両方は、遊離のN又はC末端、又は両方を排除するためにブロックされる。

【0161】

一具体例において、一種より多くのペプチド免疫原(各々は、PET配列を含む)を、前記の動物に投与する。

20

【0162】

一具体例において、前記の一種より多くのペプチド免疫原は、種々のタンパク質に由来するPET配列を含む。

【0163】

一具体例において、前記のペプチド免疫原は、一種より多くのPET配列を含む。

【0164】

一具体例において、前記の一種より多くのPET配列は、短いリンカー配列によって、結合される。

【0165】

一具体例において、前記の一種より多くのPET配列は、種々のタンパク質に由来する。

30

【0166】

この発明のすべての具体例(この発明の種々の面について特別に記載されたものを含む)は、適宜、この発明の他の任意の具体例と組み合わせることができるということも又、企図される。

【0167】

この発明の他の特徴及び利点は、下記の詳細な説明及び請求の範囲から明らかとなる。

【0168】

40

図面の簡単な説明

図1は、インターロイキン8レセプターAの配列及びこの配列中の5量体のユニーク認識配列(URS)又はPETを描いている。

図2は、ヒスタミンH1レセプターの配列及びこの配列中のトリプシン消化で破壊されない5量体のユニーク認識配列(URS)又はPETを描いている。

図3は、複雑な試料に由来するPETの平行認識のための別の形式である。この型の「仮想アレイ」においては、多くの異なるビーズの各々は、異なるPETに向けられた捕捉剤を示している。各異なるビーズは、特徴的な比の2つの染料(染料1及び染料2)の共有結合によるカラーコードを付されている。明確化のために、2つの異なるビーズしか示していない。試料の添加に際して、この捕捉剤は、同起源のPETが試料中に存在するな

50

らば、それに結合する。その後、第三の蛍光タグに結合された二次的結合性リガンド(この場合、標識 P E T ペプチド)の混合物を、これらのビーズの混合物に添加する。これらのビーズを、次いで、染料 1 と染料 2 の比をビーズごとに解明し、そうしてビーズ上に捕捉された P E T を同定することのできるフローサイトメトリー他の検出方法を利用して分析することができ、同時に、染料 3 の蛍光強度を読んで、ビーズ上の標識 P E T の量を定量する(分析物 P E T レベルを逆に反映する)。

図 4 は、細胞内タンパク質及び膜タンパク質の抽出の結果の図解である。上段パネル：M：タンパク質のサイズマーカー；H - S：H E L A - 上清；H - P：H E L A - ペレット；M - S：M O L T 4 - 上清；M - P：M O L T 4 - ペレット。下段パネルは、タンパク質の > 90 % が、可溶化されることを示している。簡単にいえば、細胞を P B S 中で洗ってから、0.5 % トリトン X - 100 を含む緩衝液中に懸濁させて(5×10^6 細胞 / ml)、ダウンスホモゲナイザー中でホモジェナイズした(30 ストローク)。ホモジェナイズした細胞を遠心分離して、可溶性部分とペレットを分離し、これら両者を、共に、ゲルにロードした。

図 5 は、P E T 特異的な抗体の生成のための方法の図解である。

図 6 は、本発明の方法における使用の前の、試料の調製の一般的計画を図解したものである。左側は、化学的変性とその後のプロテアーゼ消化のための工程を示しており、右側は、好適な熱変性及び断片化を図解している。この図解では、最も一般的に用いられるプロテアーゼのトリプシンが描かれているが、本願に記載された任意の他の適当なプロテアーゼを利用することができる。この工程は、単純で、丈夫で且つ再現性があり、血清、細胞溶解物及び組織を含む主要な試料型に一般的に適用可能である。

図 7 は、図 6 に記載したような熱変性又は化学的変性を利用する血清試料の予備処理の例を図解している。

図 8 は、血清タンパク質及び細胞溶解物(M O L T 4 及び H e l a 細胞)の熱変性及び化学的変性の結果を示している。

図 9 は、成熟 T G F - ベータ二量体の構造、及び一つの成熟 T G F - ベータの L A P 及び L T B P との複合体形態を図解している。

図 10 は、(A K T) キナーゼの基質の同定のための P E T ベースのアレイを描いている。

図 11 は、配列決定されたゲノムを有する生物中の又は公知のプロテオームを有する試料中の所与の長さのすべての P E T を同定するための一般的アプローチを図解している。たとえこの説明のための図において、タンパク質配列が、4 ~ 10 アミノ酸の P E T を同定するために 4 ~ 10 アミノ酸長の重複するペプチドに解剖されていても、同じ計画を、任意の他の長さの P E T について利用することができる。

図 12 は、P E T について全ヒトプロテオームを検索した結果(29,076 タンパク質、約 1200 万の 4 ~ 10 重複ペプチドに対応)、及び 4 ~ 10 の各 N について同定された P E T の数を列記している。

図 13 は、少なくとも一つの P E T を有するヒトタンパク質のパーセンテージの結果を示している。

図 14 は、更に、ヒトのプロテオームのトリプシン消化から生成したデータを与える。

図 15 は、複合ペプチド混合物中の標的ペプチドの特異的捕捉及び定量的ための蛍光サンドイッチ免疫アッセイの図式表示、二次抗体により検出される読み出し蛍光シグナルの結果を図解している。

図 16 は、タグ付き P S A タンパク質を検出するために用いられるサンドイッチアッセイを図解している。

図 17 は、S H I P - 2 及び A B L 中のホスホペプチドの検出のための P E T 及びそれらのニアレスト - ネイバーを図解している。

図 18 は、N タンパク質を N + 1 P E T 特異的な抗体を用いて検出するためのサンドイッチアッセイを利用するための一般的アプローチを図解している。

図 19 は、一般的な P E T 及び関連キナーゼの検出に有用なキナーゼ特異的な P E T を

10

20

30

40

50

図解している。

図 20 は、ヒトプロテオーム及び関連コロナウイルスの両方における S A R S 特異的な P E T 及びそれらのニアレスト - ネイバーを示している。

図 21 は、標準化した血清 T G F - ベータ測定のための P E T ベースのアッセイのデザインを示している。

図 22 は、サンドイッチアッセイを利用する P E T 関連タンパク質修飾の検出の一般的原理を示すことに向けられた計画である。

図 23 は、翻訳後修飾(例えば、リン酸化又はグリコシル化)の検出の一具体例の図式表示である。標的ペプチドは、一層小さい P E T 含有断片を生成するためにプロテアーゼ例えばトリプシンにより消化される。これらの断片の一つ(P T P 2)は又、少なくとも一つの関心ある改変をも含む。一度断片が支持体上の捕捉剤により単離されれば、リン酸化の存在は、例えば、H R P 結合抗ホスホアミノ酸抗体により検出することができ；糖の修飾の存在は、例えばレクチンによって検出することができる。

図 24 は、P E T 特異的な抗体が、P E T 抗原に高度に特異的であって、P E T 抗原のニアレスト - ネイバーに結合しないことを図解している。

【発明を実施するための最良の形態】

【0169】

本発明は、試料中のタンパク質又はタンパク質、特に特定の種類の修飾(リン酸化、グリコシル化、選択的スプライシング、突然変異など)を有するタンパク質のパネルの存在を検出する(例えば、包括的に検出する)ための方法、試薬及びシステムを提供する。ある具体例において、この方法は、試料中の少なくとも一種のタンパク質の発現又は翻訳後修飾のレベルを定量するために利用することができる。この方法は、好ましくはペプチドの集合を生成するために断片化され且つ / 又は変性された試料を用意すること、及び該試料を複数の捕捉剤と接触させることを含み、各捕捉剤は、特定のタンパク質又は修飾状態に特徴的なユニーク認識配列(U R S)又は P E T を認識して該配列と相互作用することができる。結合データの検出及びデコンヴォリューションによって、試料中のタンパク質の存在及び / 又は量を測定することができる。

【0170】

第一のステップにおいて、生物学的試料が得られる。生物学的試料は、ここで用いる場合、任意の身体的試料例えば血液(血清又は血漿)、唾液、腹水液、胸膜滲出液、生検試料、単離された細胞及び / 又は細胞膜調製物をいう(図 4 参照)。哺乳動物から組織生検及び体液を得る方法は、当分野で周知である。

【0171】

回収した生物学的試料は、更に、生物学的試料及び試験するポリペプチドの性質(即ち、分泌性、膜緊留型又は細胞内可溶性ポリペプチド)に依って、洗剤ベースの又は洗剤を含まない(即ち、超音波処理)方法を利用して可溶化することができる。

【0172】

ある具体例において、洗剤を使わない方法例えば熱変性によって試料を変性させることができる。これは、将来の分析において洗剤が除去される必要があるか又は除去されるのが好ましい応用において特に有用である。

【0173】

ある具体例において、可溶化生物学的試料を、少なくとも一種のタンパク質分解剤と接触させる。消化を、効果的な条件下で、診断されるポリペプチドの完全な消化を保証するのに十分な時間にわたって実施する。生物学的試料を温度及び緩衝剤強度に関する適当な条件下で消化することのできる薬剤は、好適である。測定は、非特異的な試料消化を許さないように行ない、そうして、消化剤の量、反応混合条件(即ち、塩分濃度及び酸度)、消化時間及び温度を注意深く選択する。インキュベーション時間の最後に、タンパク質分解活性を停止して、非特異的なタンパク質分解活性を回避し(これは、延長された消化期間から生じうる)、そして他のペプチドベースの分子(即ち、タンパク質由来の捕捉剤)の更なるタンパク質分解を回避する(これらは、次のステップでこの混合物に加えられる)。

【 0 1 7 4 】

もし試料を熱変性させるならば、高温で活性なプロテアーゼ例えば好熱性細菌から単離されたものを、該変性後に利用することができる。

【 0 1 7 5 】

次の方法ステップにおいては、与えられた生物学的試料を、少なくとも一種の捕捉剤と接触させ、これらは、P E T 結合による相互作用によって、少なくとも一種のタンパク質分析物と区別して結合することができ、かかる結合相互作用の生成物を、試料中に見出されるタンパク質を同定し及び / 又は定量するために、試験し、必要であれば、デコンヴォリューションする。

【 0 1 7 6 】

本発明は、少なくとも部分的に、ユニーク認識配列 (U R S) 又は P E T は、コンピューター分析によって同定されうるが、所定試料中の個々のタンパク質を特性決定することができ、例えば、他のものの内から特定のタンパク質を同定し及び / 又はタンパク質の特定の翻訳後修飾型を同定することができるという理解に基づいている。P E T に結合する薬剤の利用は、幾つかの環境に由来する個々のタンパク質又は生物学的試料中の多くのタンパク質の検出及び定量のために利用されうる。主題の方法を利用して、例えば体液、細胞又は組織試料、細胞溶解物、細胞膜などの中のタンパク質又はタンパク質修飾の状態を評価することができる。ある具体例において、この方法は、スプライス変異体、アレル変異体及び / 又は点突然変異 (例えば、単一のヌクレオチド多型から生じる変化したアミノ酸配列) を区別する一組の捕捉剤を利用する。

10

20

【 0 1 7 7 】

試料調製即ち変性及び / 又はタンパク質分解の結果として、主題の方法を利用して、特異的タンパク質 / 修飾を、標的タンパク質の均質性を分析のために必要としない仕方で検出することができる (試料間の小さいが有意の差異に比較的不従順である)。この発明の方法は、試料中の全タンパク質 (細胞膜結合性の及びオルガネラ膜結合性のタンパク質を含む) のすべて又は何れかの選択した部分集合の検出に適している。

【 0 1 7 8 】

ある具体例において、この方法の検出ステップは、ネイティブなタンパク質の翻訳後修飾に鋭敏でないが、他の具体例においては、調製ステップは、関心ある翻訳後修飾を保存するようにデザインされ、この (これらの) 検出ステップは、タンパク質の修飾型と未修飾型とを区別できる一組の捕捉剤を利用する。検出して定量するために主題の方法を利用することのできる典型的な翻訳後修飾には、アシル化、アミド化、脱アミド化、プレニル化 (例えば、ファルネシル化又はゲラニル化)、ホルミル化、グリコシル化、ヒドロキシ化、メチル化、ミリスチル化、リン酸化、ユビキチン化、リボシル化及び硫酸化が含まれる。一つの特別な具体例において、評価すべきリン酸化は、チロシン、セリン、スレオニン又はヒスチジン残基のリン酸化である。他の特定の具体例において、評価すべき疎水性の基の添加は、脂肪酸例えばミリスレート又はパルミテートの添加であり、又はグリコシルホスファチジルイノシトールアンカーの添加である。ある具体例において、本発明を利用して、特定の病気例えば感染症、新生物 (新生組織形成)、癌、免疫系疾患又は障害、代謝疾患又は障害、筋肉及び骨格の疾患又は障害、神経系の疾患又は障害、シグナル疾患又は障害、又はトランスポーターの疾患又は障害のタンパク質修飾プロファイルを評価することができる。

30

40

【 0 1 7 9 】

ここで用いる場合、用語「ユニーク認識配列」、「U R S」、「プロテオームエピトープタグ」又は「P E T」は、特定の試料中で検出された場合に、それが由来したタンパク質がその試料中に存在することをはっきりと示すアミノ酸配列を意味することを意図している。例えば、P E T は、その試料中の存在が、該配列と選択的に結合するようにデザインされた捕捉剤との信頼すべき結合事象の検出により示される場合、必ず該配列を含むタンパク質が該試料中に存在することを意味するように選択する。有用な P E T は、タンパク質混合物が変性及び / 又は断片化された場合に溶媒が接近できる結合表面に存在しなけ

50

ればならず、選択された捕捉剤と最少の交差反応性で有意に特異的に結合しなければならない。ユニーク認識配列は、それが由来したタンパク質内に存在し且つ研究中の試料、細胞型、又は種に存在しうる他のタンパク質中には存在しない。その上、P E Tは、好ましくは、試料中に存在しうる他のタンパク質内に、ニアレスト・ネイバー分析により測定されるような如何なる密接に関連する配列をも有しない。P E Tは、タンパク質の表面領域、埋没領域、スプライスジャンクション、又は翻訳後修飾領域に由来してよい。

【0180】

おそらく、理想的なP E Tは、一つの種のプロテオーム中の一つのタンパク質中にだけ存在するペプチド配列である。しかし、実際は、ヒトの試料において有用なP E Tを含むペプチドは、他の生物のタンパク質構造中に存在しうる。成人の細胞試料において有用なP E Tは、その試料に対して「ユニークな」ものである(たとえ、それが、同じ生物の他の異なるタンパク質の構造中に、その生涯の異なる時点例えば胎生期に存在しえても、又は研究中の試料と異なる他の組織若しくは細胞型に存在しても)。P E Tは、たとえ同じアミノ酸配列が、異なるタンパク質に由来する試料中に存在しても、ユニークでありうる(但し、そのアミノ酸の少なくとも一つは誘導体化され、それらのペプチドを溶解させるバインダーを開発することができるならば)。

10

【0181】

ここでP E Tに関して「ユニークさ」という場合は、参照は、常に、前記に関連して行なわれる。従って、ヒトのゲノム内では、P E Tは、それが由来したタンパク質に対して真にユニークであるアミノ酸配列であってよい。或は、それは、正にそれが由来した試料に対してユニークであってよいが、同じアミノ酸配列が、例えばマウスゲノム中に存在してよい。同様に、多数の異なる生物に由来するタンパク質を含有しうる試料に言及する場合には、ユニークさは、はっきりと同定して種々の生物に由来する(例えば、宿主又は病原体に由来する)タンパク質を区別する能力をいう。

20

【0182】

従って、P E Tは、種内の一種より多くのタンパク質中に存在しうる(但し、それは、それが由来した試料に対してユニークである)。例えば、P E Tは、ある種の細胞型例えば肝細胞、脳細胞、心臓細胞、腎臓細胞又は筋肉細胞に対して；ある種の生物学的試料例えば血漿、尿、羊水、生殖腔液、骨髄、脊髄液、又は囲心腔液試料に対して；ある種の生物学的経路例えばGタンパク質共役型レセプターシグナリング経路又は腫瘍壊死因子(T N F)シグナリング経路に対してユニークであるアミノ酸配列であってよい。

30

【0183】

この意味において、本発明は、応用特異的なP E Tを、所与の試料中に存在するタンパク質の種類に依って同定する方法を提供する。この情報は、様々な起源から容易に得ることができる。例えば、一生物の全ゲノムが関係する場合には、その配列決定されたゲノムは、このゲノムによりコードされうる各タンパク質配列を与え、ときには、仮想的タンパク質さえ含む。この配列決定されたゲノムから得られる「仮想的に翻訳されたプロテオーム」は、試料中の全タンパク質を表すという点に関して最も包括的であると予想される。或は、試料中の転写されたm R N A種の型も又、如何なる種類のタンパク質が試料中に存在しうるかに関して有用な情報を提供することができる。これらの存在するm R N A種は、D N Aマイクロアレイ、S N P分析、又は他の任意の適当な分子生物学の分野で利用可能なR N A分析ツールによって同定されうる。R N A分析の更なる利点は、それが、選択的スプライシング及び突然変異などの情報をも提供することができることである。最後に、質量分析などの技術を利用する直接的なタンパク質分析は、特定の翻訳後修飾及び突然変異の存在を同定するのを助けることができ、それは、特定の応用のための特定のP E Tのデザインを助成することができる。

40

【0184】

これらのP E Tは、それが由来したネイティブなタンパク質において、隣接する又は隣接しないアミノ酸配列として見出されうる。それは、典型的には、大きいペプチド又はタンパク質の配列の一部を構成し、捕捉剤によって、無傷の又は部分的に分解された又は

50

消化されたタンパク質の表面において、又は予め決めた断片化プロトコールにより生成されたタンパク質の断片上で認識可能である。このPETは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20アミノ酸残基長であってよい。好適具体例において、URSは、6、7、8、9又は10アミノ酸残基長、好ましくは8アミノ酸残基長である。

【0185】

「～を区別することのできる捕捉剤」における用語「区別する」は、捕捉剤の、意図する分析物への結合と、試料中に存在する他のタンパク質(又は化合物)へのバックグラウンド結合における相対的差異をいう。特に、捕捉剤は、もし結合定数の差異が、結合における統計的に有意な差異がアッセイプロトコール及び検出感度下で生成されるようなものであれば、タンパク質(又は、改変種)の2つの異なる種を区別することができる。好適具体例において、この捕捉剤は、少なくとも0.5の、一層好ましくは少なくとも0.1、0.001又は0.0001の識別インデックス(D.I.)を有し、ここに、D.I.は、 $K_d(a)/K_d(b)$ として定義され、 $K_d(a)$ は、意図する分析物の解離定数であり、 $K_d(b)$ は、試料中に存在する任意の他のタンパク質(又は、この場合のように、改変型)の解離定数である。

10

【0186】

ここで用いる場合、用語「捕捉剤」には、ユニーク認識配列を含むタンパク質に、例えば、少なくとも検出可能な感度で、結合することのできる任意の薬剤が含まれる。捕捉剤は、ユニーク認識配列と(直接又は間接に)特異的に相互作用し、又は該配列に(直接又は間接に)結合することができる。好適具体例において、この捕捉剤は、抗体又はその断片(例えば、一本鎖抗体)であり、又はディスプレイされたライブラリーから選択されたペプチドである。他の具体例において、この捕捉剤は、人工タンパク質、RNA又はDNAアプタマー、アロステリックリボザイム又は小型分子であってよい。他の具体例において、この捕捉剤は、ユニーク認識配列の電子工学的(例えば、コンピューターベースの又は情報ベースの)認識を与えることができる。一具体例において、この捕捉剤は、自然には細胞中に見出されない薬剤である。

20

【0187】

ここで用いる場合、用語「包括的に検出する」には、試料中のタンパク質の少なくとも40%を検出することが含まれる。好適具体例においては、用語「包括的に検出する」には、試料中のタンパク質の少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%が含まれる。上に列挙した値の中間の範囲例えば50~70%又は75%~95%も又、この発明の部分である。例えば、上に列挙した値の何れかの組合せを上限及び/又は下限として利用する範囲は包含される。

30

【0188】

ここで用いる場合、用語「プロテオーム」は、一生物体中の化学的に別個のタンパク質の完全なセットをいう。

【0189】

ここで用いる場合、用語「生物」には、動物例えば鳥類、昆虫、哺乳動物例えばヒト、マウス、ラット、サル、又はウサギ；微生物例えば細菌、酵母及び真菌類例えば大腸菌、カンピロバクター菌、リステリア菌、レジオネラ菌、ブドウ球菌、連鎖球菌、サルモネラ菌、ボルダテラ菌、肺炎双球菌、根粒菌、クラミジア、リケッチア、放線菌、マイコプラズマ、ヘリコバクター・ピロリ、クラミジア・ニューモニア、コクシエラ・バーネッティイ、炭疽菌、及びナイセリア；原生動物例えばトリパノゾーマ・ブルセイ；ウイルス例えばヒト免疫不全ウイルス、ライノウイルス、ロータウイルス、インフルエンザウイルス、エボラウイルス、サル免疫不全ウイルス、ネコ白血病ウイルス、RSウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、パルボウイルス、カポジ肉腫随伴ヘルペスウイルス(KSHV)、アデノ随伴ウイルス(AAV)、シンドビスウイルス、ラッサウイルス、西ナイルウイルス、エンテロウイルス例えば23コクサッキーAウイルス、6コクサッキーBウイルス、及び28エコーウイルス、エプスタイン・バールウイルス、カリチ

40

50

ウイルス、アストロウイルス及びノーウォークウイルス；真菌類例えばクモノスカビ、アカパンカビ、酵母又はブクキニア；条虫例えば単包条虫、多包条虫、フォーゲル包条虫、及びヤマネコ包条虫；及び植物例えばシロイスナズナ、イネ、コムギ、トウモロコシ、トマト、アルファルファ、ナタネ、ダイズ、綿、ヒマワリ又はカノーラを含む任意の生きた生物が含まれる。

【0190】

ここで用いる場合、「試料」は、タンパク質分析物を含有しうる任意のものを指す。この試料は、生物学的試料例えば生物学的液体又は生物学的組織であってよい。生物学的液体の例には、尿、血液、血漿、血清、唾液、精液、大便、痰、脳脊髄液、涙、粘液、羊水などが含まれる。生物学的組織は、細胞(通常、特定の種類)の、ヒト、動物、植物、細菌、真菌類又はウイルス構造の構成材料の一つを形成する細胞間物質と一緒にになった凝集物であり、結合組織、上皮組織、筋肉組織及び神経組織が含まれる。生物学的組織の例には、臓器、腫瘍、リンパ節、動脈及び個々の細胞も又含まれる。この試料は又、イン・ビトロで調製された分子を含む標的タンパク質の混合物であってもよい。

10

【0191】

ここで用いる場合、「比較対照用試料」は、試験試料と比較して少なくとも一つの限定された面において異なるだけの対照用試料を指し、本発明の方法、キット又はアレイが、これらの試験試料と対照用試料との間で、例えば、発現されたタンパク質の量又は種類について及び/又はタンパク質修飾プロフィルについて、これらの限定された差異の効果を同定するために利用される。例えば、対照用生物試料は、生理学的に正常な状態から誘導することができ及び/又は種々の物理的、化学的、生理学的若しくは薬物での処理にかけることができ、又は、種々の生物学的ステージなどから得ることができる。

20

【0192】

「処理から予想された通りに生成する」は、ペプチド断片が、ある処理例えば特定のプロテアーゼ消化又は化学的断片化によって確実に生成されうることを意味する。これらの消化部位は、全く特異的であるので、特異的処理によって生成されるペプチド断片は、確実にイン・シリコで予想することができる。

【0193】

2000年のMacBeath及びSchreiberによる報告(Science 289 (2000), p1760-1763)は、タンパク質がマイクロアレイ形式にプリントされえてアッセイされうることを確立し、それにより、タンパク質チップへの期待に対する興奮を再び起こすのに大きな役割を有した。この後、短期間に、Snyderとその協同研究者は、ほぼ6000の酵母遺伝子産物を含むタンパク質チップの製造を報告し、このチップを利用して新規なクラスのカルモジュリン-及びリン脂質-結合性タンパク質(Zhu等、Science 293 (2001), p.2101-2105)を同定した。これらのタンパク質は、オープンリーディングフレームをクローン化して、これらのタンパク質の各々をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ-(GST)とHisタグ付き融合物として過剰生産することにより生成された。これらの融合物を利用して、各タンパク質の精製を促進し、そのHisタグ付きファミリーも又、タンパク質の固定化に利用した。この分野におけるこの及び他の参考文献は、数千のタンパク質を含有するマイクロアレイを製造することができて、結合相互作用を発見するために利用することができることを確立した。彼らは又、Hisタグにより固定化され、それ故、表面に一様に配向しているタンパク質が、アルデヒド表面にランダムに結合されているタンパク質よりも優れたシグナルを与えることをも報告した。

30

40

【0194】

関連する研究は、抗体アレイの構築に向けられている(de Wildt等、Antibody arrays for high-throughput screening of antibodyantigen interactions. Nat.Biotechnol. 18 (2000), p.989-994; Haab, B.B.等 (2001) Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. Genome Biol. 2, RESEARCH0004.1-RESEARCH0004.13)。特に、初期の目立つ報告において、de Wildt及びTomlinson は、濾紙上でscFv抗体断片を提示するファージライブ

50

ラリーを固定化して、複雑な混合物中で特異的抗原に対する抗体を選択した(前出)。この目的のためのアレイの利用は、スループットを大いに増大させ、抗体を評価する場合、ほぼ20,000のユニークなクローンを1サイクルでスクリーニングすることを可能にする。Brownとその協同研究者は、この概念を拡張して、抗体がアルデヒド改変ガラスに直接結合された分子的に限定されたアレイを造った。彼らは、115の市販の抗体をプリントし、同起源の抗原との相互作用を分析して、半定量的な結果を得た(前出)。Kingsmoreとその協同研究者は、類似のアプローチを利用して、75の別個のサイトカインを認識する抗体のアレイを、ローリングサークル増幅ストラテジー(Lizardi等、Mutation detection and single molecule counting using isothermal rolling circle amplification. Nat.Genet.19(1998), p.225-233)を利用して製造し、フェムトモル濃度のサイトカインを測定することができた(Schweitzer等、Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification. Nat.Biotechnol. 20(2002), p359-365)。

10

【0195】

これらの例は、タンパク質チップが演じうる多くの重要な役割を示し、これらのツールの製造における広まった活性の証拠を与えている。以下の数節は、この発明の様々な面について更に詳しく記載している。

【0196】

I. 捕捉剤の種類

ある好適具体例において、利用する捕捉剤は、PET部分との選択的な親和性反応をすることができるべきである。一般に、かかる相互作用は、非共有結合性である(もっとも、本発明は、PETと共有結合する捕捉用試薬の利用をも企図しているが)。

20

【0197】

利用できる捕捉剤の例には、ヌクレオチド；オリゴヌクレオチド、二本鎖若しくは一本鎖核酸(鎖状又は環状)、核酸アプタマー及びリボザイムを含む核酸；PNA(ペプチド核酸)；抗体(例えば、モノクローナル又は組換えにより処理した抗体又は抗体断片)、T細胞レセプター及びMHC複合体、レクチン及び足場ペプチドを含むタンパク質；ペプチド；他の天然のポリマー例えば炭水化物；プラスチックポリマーを含む人工ポリマー；小型有機分子例えば薬物、代謝産物及び天然産物などが含まれるが、これらに限られない。

【0198】

ある具体例においては、これらの捕捉剤を、永久に又は可逆的に、固体支持体例えばビーズ、チップ又はスライド上に固定化する。タンパク質の複雑な混合物を分析するために用いる場合には、捕捉剤(及びそれが結合したタンパク質)の正体を明らかにするための結合データのデコンヴォリューションのため及び(適宜)結合を定量するために、固定化捕捉剤を整列させ且つ/又は標識する。或は、これらの捕捉剤は、溶液中に遊離させて与えることができ(可溶性)、PET結合の平行なデコンヴォリューションのために他の方法を利用することができる。

30

【0199】

一具体例において、これらの捕捉剤は、蛍光分子又は酵素などのレポーター分子と結合体化して、例えば「サンドイッチ」型アッセイにおいて、基材(例えば、チップ又はビーズ)上の結合PETの存在を検出するために利用するが、該アッセイにおいては、一つの捕捉剤を支持体上に固定化して、一種のPETを捕捉し、その捕捉されたPETに特異的な標識した第二の捕捉剤を加えてその捕捉されたPETを検出/定量することもできる。この具体例においては、ペプチド断片は、2つのユニークな非重複PETを含んでおり、その一つは、固定化された捕捉剤により認識され、他の一つは、標識された検出用捕捉剤により認識される。関連する具体例において、このペプチド断片にユニークな一つのPETを、幾つかのタンパク質ファミリーのメンバーに共有される共通PETと共に利用することができる。これらの2つのPETの空間的配置は、一つの捕捉剤の結合が、他の捕捉剤の結合に実質的に影響を与えないようなものである。加えて、このペプチド断片の長さは、互いに適当に離れた2つのPETを含むようなものである。好ましくは、ペプチド断片は、サンドイッチアッセイのためには、少なくとも約15残基である。他の具体例にお

40

50

いては、標識された P E T ペプチドを競合結合アッセイで利用して、捕捉剤に結合する(試料由来の)未標識の P E T の量を測定する。この具体例においては、ペプチド断片は、1つの P E T を含むのに十分な長さであることを要するだけであり、それ故、5 ~ 8 残基程の短いペプチドが適当でありうる。

【0200】

一般に、サンドイッチアッセイは、競合結合アッセイより一層高感度(例えば、10、100または1000倍以上)である傾向がある。

【0201】

この発明の重要な利点は、検出すべきタンパク質の試料が存在しない場合でさえ、有用な捕捉剤を同定及び/又は合成しうることである。ヒト、ハエ(キイロショウジョウバエ)及び線虫(C.エレガンス)など幾つかの生物の全ゲノム解析が完了すれば、所定の長さの P E T 又はそれらの組合せをある種の生物の所定の単一タンパク質のために同定し、次いで、関心あるこれらのタンパク質の何れに対する捕捉剤でも、完全長タンパク質をクローン化して発現させることなく作成することができる。

【0202】

加えて、捕捉剤の抗原又は標的として役立つ任意の P E T の適否を、更に他の利用可能な情報に対してチェックすることができる。例えば、今や、多くのタンパク質のアミノ酸配列を、利用可能なゲノムでデータから推論することができるので、試料にユニークなタンパク質の構造から配列を、コンピューター検索によって測定することができ、そのペプチドのタンパク質中での位置、及び無傷のタンパク質においてそれに接近できるかどうかを測定することができる。一度適当な P E T ペプチドが見出されれば、それを、公知技術を利用して合成することができる。手に入れた P E T の試料を用いて、該ペプチドと相互作用する抗体又はペプチドバインダーなどの薬剤を、該ペプチドに対して高め又はパニングによってライブラリーから得ることができる。この状況においては、任意の選択した試料の断片化プロトコルがタンパク質を、P E T を破壊し又は傷つけることにより制限することのないことを保証するように注意しなければならない。これは、理論的及び/又は実験的に測定でき、このプロセスを、選択した P E T が捕捉剤によって確かに回収されるまで反復することができる。

【0203】

本発明の教示により選択された P E T セットは、それらが生成された元のタンパク質の酵素的開裂及びペプチドの選択により、又は好ましくはペプチド合成法によって、ペプチドを生成するために利用することができる。

【0204】

タンパク質分解により開裂されたペプチドは、周知の従来技術によって、クロマトグラフィー又は電気泳動手順によって分離して、精製して、復元することができる。

【0205】

合成ペプチドは、当分野で公知の古典的な方法によって、例えば、標準的な固相技術を利用することにより調製することができる。これらの標準的な方法は、排除固相合成、部分固相合成法、断片濃縮、古典的な溶液合成を包含し、組換え D N A 技術によるものさえ含まれる。例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963)(参考として、本明細書中に援用する)を参照されたい。固相ペプチド合成手順は、当分野で周知であり、John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses (第二版、Pierce Chemical Company, 1984)に一層記載されている。

【0206】

合成ペプチドは、調製用高性能液体クロマトグラフィー[Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. ニューヨーク]により精製することができ、その組成は、アミノ酸配列決定により確認することができる。

【0207】

加えて、他の添加剤例えば安定剤、緩衝剤、ブロッカーなども、捕捉剤と共に提供しうる。

【 0 2 0 8 】

A . 抗体

一具体例において、捕捉剤は、抗体又は抗体様分子(集合的に「抗体」という)である。従って、捕捉剤として有用な抗体は、完全長抗体又はその断片であってよく、これは、抗体の「抗原結合部分」を含む。用語「抗原結合部分」は、ここで用いる場合、抗原に特異的に結合する能力を保持している抗体の少なくとも一つの断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって遂行されうることが示されている。抗体の「抗原結合性部分」なる用語に包含される結合性断片の例には、(i) F a b 断片 (V_L 、 V_H 、 C_L 及び C_{H1} ドメインよりなる一価の断片) ; (ii) $F(a b')_2$ 断片 (ヒンジ領域でジスルフィド橋により結合された2つの F a b 断片を含む二価の断片) ; (iii) V_H 及び C_{H1} ドメインよりなる F d 断片 ; (iv) 抗体の単一アームの V_L 及び V_H ドメインよりなる F v 断片 ; (v) V_H ドメインよりなる d A b 断片 (Ward等 (1989) Nature 341:544-546) ; 及び (vi) 単離された相補性決定領域 (C D R) が含まれる。その上、F v 断片の2つのドメイン、 V_L 及び V_H は、別々の遺伝子によりコードされており、それらは、組換え法を利用して、合成リンカーによって結合することができ、該リンカーは、それらが単一のタンパク質の鎖として作成されることを可能にし、該タンパク質中で、 V_L 及び V_H 領域は、対合して一価の分子を形成する (一本鎖 F v (s c F v) として公知 ; 例えば、Bird等 (1988) Science 242:423-426 ; 及び Huston等 (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883 ; 及び Osbourn等、1998, Nature Biotechnology 16:778参照)。かかる一本鎖抗体も又、抗体の「抗原結合性部分」なる用語に包含されるものである。特定の s c F v の任意の V_H 及び V_L 配列を、完全な I g G 分子又は他のイソ型をコードする発現ベクターを生成するために、ヒト免疫グロブリン定常領域 c D N A 又はゲノム配列に結合させることができる。 V_H 及び V_L は又、タンパク質化学又は組換え D N A 技術を利用する F a b、F v 又は他の免疫グロブリン断片の生成においても利用することができる。他の形態の一本鎖抗体例えばディアボディーも又、含まれる。ディアボディーは、二価の、二重特異性抗体であり、その V_H 及び V_L ドメインは、一本鎖ポリペプチド上で発現されるが、同鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを利用しており、それにより、これらのドメインは、他方の鎖の相補性ドメインとの対合を強いられて、2つの抗原結合部位が造られる (例えば、Holliger, P.等 (1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448 ; Poljak, R.J.等 (1994) Structure 2:1121-1123参照)。

10

20

30

【 0 2 0 9 】

尚更に、抗体又はその抗原結合部分は、抗体又は抗体の部分の少なくとも一つの他のタンパク質又はペプチドとの共有又は非共有結合により形成される一層大きい免疫接着分子の部分であってよい。かかる免疫接着分子の例には、四量体 s c F v 分子を作るためのストレプトアビジンコア領域の利用 (Kipriyanov, S.M.等 (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) 及び二価のビオチン化 s c F v 分子を作るためのシステイン残基、マーカープепチド及びC末端ポリヒスチジンタグの利用 (Kipriyanov, S.M.等 (1994) Mol.Immunol.31:1047-1058) が含まれる。抗体部分例えば F a b 及び $F(a b')_2$ 断片は、全抗体から、慣用技術例えば、それぞれ、全抗体のパパイン又はペプシン消化を利用して製造することができる。その上、抗体、抗体タンパク質及び免疫接着分子は、標準的組換え D N A 技術を利用して得ることができる。

40

【 0 2 1 0 】

抗体は、ポリクローナルであってもモノクローナル抗体であってもよい。用語「モノクローナル抗体」及び「モノクローナル抗体組成物」は、ここで用いる場合、抗原の特定のエピトープと免疫反応することのできる唯一種の抗原結合部位を含む抗体分子の集団を指し、用語「ポリクローナル抗体」及び「ポリクローナル抗体組成物」は、特定の抗原と相互作用できる多数種の抗原結合部位を含む抗体分子の集団を指す。モノクローナル抗体組成物は、典型的には、それが免疫反応する特定の抗原に対する単一の結合親和性を示す。

【 0 2 1 1 】

当分野で認められた任意の方法を利用して、P E T に向けられた抗体を生成することが

50

できる。例えば、P E T (単独又はハプテンと結合したもの)を利用して、適当な患者(例えば、ウサギ、ヤギ、マウス又は他の哺乳動物又は脊椎動物)を免疫化することができる。例えば、米国特許第5,422,110号;5,837,268号;5,708,155号;5,723,129号及び5,849,531号(これらの各内容を参考として本明細書中に援用する)に記載された方法を利用することができる。免疫原性調製物には、更に、アジュバント例えば完全若しくは不完全フロイントアジュバント又は類似の免疫刺激剤が含まれる。適当な患者の、P E Tによる免疫化は、ポリクローナル抗P E T抗体応答を誘導する。この抗P E T抗体の免疫化された患者における力価は、標準的技術例えば固定化P E Tを利用する酵素結合免疫吸着アッセイ(E L I S A)によって経時的にモニターすることができる。

10

【0212】

P E Tに向けられた抗体分子は、哺乳動物から(例えば、血液から)単離し、更に、周知技術例えばプロテインAクロマトグラフィーにより精製してI g G画分を得ることができる。免疫化した後、適当な時点で(例えば、抗P E T抗体力価が最高のとき)、抗体産生細胞を患者から得て、例えば、標準的技術例えばKohler及びMilstein (1975) Nature 256:495-497により最初に記載されたハイブリドーマ技術(Brown等 (1981) J.Immunol.127:539-46; Brown等 (1980) J.Biol.Chem.255:4980-83; Yeh等 (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:2927-31; 及びYeh等 (1982) Int.J.Cancer 29:269-75も参照されたい)、一層最近のヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor等 (1983) Immunol Today 4:72)又はE B Vハイブリドーマ技術(Cole等 (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., p.77-96)によってモノクローナル抗体を製造するために利用することができる。モノクローナル抗体ハイブリドーマを生成するための技術は、周知である(一般的には、R .H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analysis, Plenum Publishing Corp., New York, ニューヨーク(1980); E.A. Lerner (1981) Yale J. Biol.Med., 54:387-402; M.L. Gefter等 (1977) Somatic Cell Genet.3:231-36を参照されたい)。簡単にいえば、不滅化細胞株(典型的には、ミエローマ)を、上記のように、P E T免疫原で免疫化した哺乳動物由来のリンパ球(典型的には、脾臓細胞)と融合させ、その結果生成したハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、P E Tに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定する。

20

【0213】

リンパ球と不滅化細胞株との融合に利用される多くの周知のプロトコールの何れでも、抗P E Tモノクローナル抗体を生成する目的のために適用することができる(例えば、G. Galfre等 (1977) Nature 266:55052; Gefter等、Somatic Cell Genet., 前出; Lerner, Yale J.Biol.Med., 前出; Kenneth, Monoclonal Antibodies, 前出を参照されたい)。その上、当業者は、かかる方法のやはり有用な多くの変法があることを認めよう。典型的には、不滅化細胞株(例えば、ミエローマ細胞株)は、リンパ球と同じ哺乳動物種に由来する。例えば、マウスハイブリドーマを、本発明の免疫原性調製物で免疫化したマウスに由来するリンパ球を不滅化マウス細胞株と融合させることによって作成することができる。好適な不滅化細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養培地(「H A T培地」)に感受性のマウスミエローマ細胞株である。多くのミエローマ細胞株(例えば、P 3 - N S 1 / 1 - A g 4 - 1、P 3 - x 6 3 - A g 8 . 6 5 3又はS p 2 / O - A g 1 4ミエローマ細胞株)の何れでも、標準的技術に従って、融合パートナーとして利用することができる。これらのミエローマ株は、A T C Cから入手できる。典型的には、H A T感受性のマウスミエローマ細胞を、ポリエチレングリコール(「P E G」)を利用して、マウス脾臓細胞に融合させる。その融合から生じたハイブリドーマ細胞を、次いで、H A T培地を利用して選択する。該培地は、未融合のミエローマ細胞及び非生産性の融合ミエローマ細胞を殺す(未融合脾臓細胞は、トランスフォームされないので数日後に死ぬ)。この発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を、ハイブリドーマ培養上清をP E Tに結合する抗体について例えば標準的E L I S Aアッセイを利用してスクリーニングすることによって検出する。

30

40

50

【 0 2 1 4 】

加えて、標的タンパク質 / P E T のアレイに対する抗体又は足場ライブラリーの自動化スクリーニングは、タンパク質発現プロファイリングのために利用されうる数千の試薬を開発するための最も迅速な方法であろう。その上、ライブラリーシステムに由来するポリクローナル抗血清、ハイブリドーマ又は選択も又、必要な捕捉剤を迅速に生成するために利用することができる。抗体単離のための高スループットな方法は、Hayhurst及びGeorgiou, Curr Opin Chem Biol 5(6):683-9, 2001年12月(参考として援用する)に記載されている。

【 0 2 1 5 】

P E T 特異的抗体の生成に利用される P E T 抗原は、好ましくは、中性基を生成するために、N又はC末端でブロックされ、最も好ましくは両端でブロックされる(図5参照)。何故なら、非中性化末端を有するペプチドに対して高められた抗体は、この発明の方法のためには機能性でないかもしれないからである。これらの P E T 抗原は、標準的な分子生物学又は化学的方法を利用して、例えばペプチドシンセサイザーを用いて、最も容易に合成することができる。これらの末端は、適宜、N H₂ - 又は C O O - 基又は任意の他のブロッキング剤でブロックして、遊離の末端を排除することができる。好適具体例においては、P E T の一端(N又はC末端)を、キャリアタンパク質例えば K L H 又は B S A と結合して抗体生成を容易にする。K L H は、カサガイヘモシアニン{原始的な軟体動物の海産巻貝のカサガイ(Megathura crenulata)で見出される酸素を運ぶ銅タンパク質}を表す。K L H は、複雑な分子配置を有して、多様な抗原構造を含んでおり、強力な非特異的免疫応答を宿主動物において誘出する。それ故、小さいペプチド(非常に免疫原性ではありえない)を免疫原として用いる場合には、それらを、好ましくは、宿主動物における増進された免疫応答のために、K L H 又は他のキャリアタンパク質(B S A)と結合させる。その結果生成した抗体は、関心ある P E T 含有トリプシン消化ペプチドに対応するポリペプチドを利用してアフィニティー精製することができる(図5参照)。

【 0 2 1 6 】

抗体生成において P E T の両端をブロックすることは、多くの場合(殆どの場合ではないが)、選択した P E T は、一層大きい(トリプシン消化)断片に含まれるので、有利でありうる。これらの場合において、P E T 特異的な抗体は、ペプチド断片の中央部で P E T に結合することを求められる。それ故、P E T の C 及び N 末端の両方をブロックすることは、消化した試料におけるペプチド断片の抗体結合を最もよく刺激する。同様に、もし、選択した P E T 配列が、標的断片の N 又は C 末端にあったならば、免疫原の他端だけが、好ましくは K L H 又は B S A などのキャリアーによってブロックされることを要する。

【 0 2 1 7 】

下記の図24は、P E T 特異的な抗体が、それらのそれぞれの P E T 抗原に対して、高度に特異的であって、高い親和性を有することを示している。

【 0 2 1 8 】

P E T 特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体を生成する場合、本質的に標的の P E T 配列を含むペプチド免疫原を、短いペプチド抗原についての標準的な抗体生成プロトコルに従って動物に投与することができる。一具体例において、この短いペプチド抗原は、K L H などのキャリアーと結合体化することができる。しかしながら、P E T 配列に特異的な抗体をスクリーニングする際に、P E T 配列を含む親ペプチド断片(トリプシン消化から生じた断片など)を用いることは好適である。これは、同定された抗体が、元の P E T 配列に特異的であるだけでなく、抗体をデザインした P E T ペプチド断片をも認識することができることを確実にする。適宜、この同定された抗体の特異性は、元の免疫原例えば末端ブロックした P E T 配列自体との反応によって更に確認することができる。

【 0 2 1 9 】

ある具体例において、異なる P E T 配列についての幾つかの異なる免疫原を、同じ動物に同時に投与して、異なる抗体が一の動物中に生成されうるようにすることができる。明らかに、各免疫原について、その免疫原に特異的な抗体を同定するには、別々のスクリー

ニングが必要である。

【0220】

別のぐたいれいにおいては、種々のPETを、動物への投与のための単一の層長い免疫原に、一緒に結合することができる。このリンカー配列は、可撓性のリンカー例えばGS、GSSS又はこれらの反復(例えば、三反復)であってよい。

【0221】

上記の両具体例において、種々の免疫原が、同じ又は異なる生物又はプロテオームに由来しうる。これらの方法は、すべて、抗体生成のコストを下げる強力な手段である。結合されたPET配列を免疫原として利用することの予想外の利点は、層長い免疫原は、ある状況で、短いPET配列を利用して生成したものより層高い親和性を有する抗体を生成することができることである。

10

【0222】

(i) PET特異的な抗体の知識データベース

本発明は又、抗体知識データベースをも提供し、それは、これらの抗体に関する様々な重要な情報を提供する。これらの抗体の特定の部分集合は、PET特異的な抗体であり、それらは、本願で示した基準に基づいてデ・ノボで生成され、又は従来技術における他の方法により生成されて、たまたまある種のPETを認識するものである。

【0223】

この知識で得たベースに含まれるべき情報は、全く包括的なものであってよい。かかる知識は、更に、公開されているか専有されているかで、分類することができる。公開された情報の例には、標的タンパク質名、抗体起源、カタログナンバー、潜在的応用などが含まれうる。典型的な専有された情報には、一種以上の生物又は特殊なサンプルにおける親のトリプシン処理断片、免疫原ペプチド配列及びそれらがPETであるか否かによらず、標的PETに対する親和性、他の関連エピトープ(例えば、ニアレスト-ネイバー)との交差反応の程度、及び様々なPETアッセイのための有用性が含まれる。

20

【0224】

この目的のために、1000の抗ペプチド抗体に関するかかる情報は、すでに、知識データベースにおいて集められ/生成されている。それらのうちで、約128の抗体が、トリプシン消化した試料に適合性であるようである。ある市販の抗体、免疫原及びそれらがたまたま含むPET配列、及びこれらのPETのニアレスト-ネイバーを、下記に列記する。

30

【0225】

【表 2】

市販の抗 P E T 抗体

タンパク質	P T P (免疫原／P E T 下線部)	ニアレストーネイバー
抗サイクリン F	TASPTSSVDGGLGALP. K	SASIDGGL; SSSSDGGL; TGSVDGGA; ESSSDGGL
抗ホスホ S H C (T y r 2 3 9)	FAGMPITLTVSTSSLNLMAADCK	ISTASLNL; ISTSSLNV; VSLSSLNL; MDTSSLNL
抗ホスホ P P 2 A (T y r 3 0 7)	EEEADINQLTEEFF. K	ADLNQLTQ; RDINQLSE; ADFNQLAE; ADINMVTE
抗 C d k 8	ATSQQPPQYSHQTHR	QEPPQYSH; QQQPQFSH; QQPPQHSK; QQPPQQQH

10

20

【 0 2 2 6 】

B . タンパク質及びペプチド

本発明の捕捉剤を生成する他の方法には、例えば Dower 等、W O 9 1 / 1 7 2 7 1、McCafferty 等、W O 9 2 / 0 1 0 4 7、Herzig 等、米国特許第 5, 8 7 7, 2 1 8 号、Winter 等、米国特許第 5, 8 7 1, 9 0 7 号、Winter 等、米国特許第 5, 8 5 8, 6 5 7 号、Holliger 等、米国特許第 5, 8 3 7, 2 4 2 号、Johnson 等、米国特許第 5, 7 3 3, 7 4 3 号及び Hoogenboom 等、米国特許第 5, 5 6 5, 3 3 2 号(これらの各々の内容を、参考として援用する)に記載されたファージディスプレイ技術が含まれる。これらの方法においては、メンバーが、それらの外表面に、異なる抗体、抗体結合部位又はペプチドを提示しているファージのライブラリーを生成する。抗体は、通常、F v 又は F a b 断片として提示される。所望の特異性を有するファージディスプレイ配列を、特異的 P E T に対するアフィニティー富化によって選択する。

30

【 0 2 2 7 】

酵母ディスプレイ及びイン・ビトロリボソームディスプレイなどの方法も又、本発明の捕捉剤を生成するために利用することができる。前述の方法は、例えば、Methods in Enzymology 328 巻 C 部：Protein-protein interactions & Genomics and Bradbury A. (2001) Nature Biotechnology 19:528-529(これらの各々の内容を参考として本明細書中に援用する)に記載されている。

40

【 0 2 2 8 】

関連する具体例において、タンパク質又はポリペプチドも又、本発明の捕捉剤として作用しうる。これらのペプチド捕捉剤も又、所定の P E T に特異的に結合し、例えば、固定化 P E T に対するファージディスプレイスクリーニングを利用して、又は任意の他の当分野で認められた方法を利用して同定することができる。一度同定されたならば、それらのペプチド捕捉剤は、ペプチド配列を製造するための周知の方法の何れかを利用することにより製造することができる。例えば、これらのペプチド捕捉剤は、原核又は真核宿主細胞中で、特定のペプチド配列をコードするポリヌクレオチドの発現により生成することができる。或は、かかるペプチド捕捉剤は、化学的方法によって合成することができる。組換

50

え体宿主における異種ペプチドの発現、ペプチドの化学合成、及びイン・ビトロ翻訳のための方法は、当分野で周知であり、Maniatis等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), 第二版、Cold Spring Harbor, N.Y.; Berger及びKimmel, Methods in Enzymology, 152巻、Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Merrifield, J. (1969) J. Am. Chem. Soc. 91:501; Chaiken, I.M. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. 11:255; Kaiser等 (1989) Science 243:187; Merrifield, B. (1986) Science 232:342; Kent, S.B.H. (1988) Am. Rev. Biochem. 57:957; 及びOfford, R.E. (1980) Semisynthetic Proteins, Wiley Publishing (これらを、参考として、そのまま本明細書中に援用する)に更に記載されている。

【0229】

これらのペプチド捕捉剤は又、溶液相及び固相化学合成を含む化学的なペプチド合成のための適当な方法によっても製造することができる。好ましくは、これらのペプチドは、固体支持体上で合成する。ペプチドを化学合成する方法は、当分野で周知である(例えば、Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) 及びGrant, G.A. (編). Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman and Company, New York (1992)を参照されたい)。これらのペプチド捕捉剤を作成するのに有用な自動化ペプチド合成機は、市販されている。

【0230】

C. 足場ペプチド

本発明で使用するための捕捉剤の生成への別のアプローチは、抗体を利用し、それらは、足場付きペプチド例えばタンパク質の表面に提示されたペプチドである。この考えは、ペプチドの自由度を、それを表面に露出されたタンパク質のループに組み込むにより制限することが、標的タンパク質への結合のエントロピーコストを低下させることができ、一層高い親和性を生じるというものである。例えば、チオレドキシン、フィブロンネクチン、トリ隣臓ポリペプチド(a P P)及びアルブミンは、多くの配列変化を許容するであろう表面ループを有する小さい、安定なタンパク質である。標的PETに選択的に結合する足場付きペプチドを同定するために、ランダムペプチドがネイティブなループ配列を置換するのに利用されていて、親和性突然変異の過程により、関心あるPETに選択的に結合するものが同定されるキメラタンパク質のライブラリーを生成させることができる。

【0231】

D. 単純ペプチド及びペプチド模倣化合物

ペプチドは又、小型分子とタンパク質の利点を併せ持つので、捕捉剤の魅力的な候補でもある。大きい、多様なライブラリーを生物学的に又は合成によって作ることができ、PET部分に対する結合スクリーニングにおいて得られる「ヒット」を大量に合成することができる。

【0232】

ペプチド様オリゴマー(Soth等 (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1:120-129)例えばペプチド(Figliozzi等 (1996) Methods Enzymol. 267:437-447)も又、捕捉剤として利用することができ、ペプチドを超えるある利点を有しうる。それらは、プロテアーゼを受け付けず、それらの合成は、特に、20種類の一般的アミノ酸において見出されない官能基の利用を考えるならば、ペプチドの合成よりも簡単で且つ安価でありうる。

【0233】

E. 核酸

他の具体例において、PETに特異的に結合するアプタマーも又、捕捉剤として利用することができる。ここで用いる場合、用語「アプタマー」、例えばRNAアプタマー又はDNAアプタマーには、標的分子に特異的に結合する一本鎖オリゴヌクレオチドが含まれる。アプタマーは、例えば、指数関数的富化によるリガンドの系統的進化と称するイン・ビトロ進化プロトコルを利用することにより選択される。アプタマーは、標的分子に固く且つ特異的に結合し; タンパク質に対する殆どのアプタマーは、1 pM ~ 1 nMの範囲内の K_d (解離平衡定数)で結合する。アプタマー及びそれらの製造方法は、例えば、E.N.B

10

20

30

40

50

rody等(1999) Mol.Diagn.4:381-388(内容を本明細書中に参考として援用する)に記載されている。

【0234】

一具体例において、主題のアプタマーは、タンパク質の代りに核酸よりなる非常に高親和性のレセプターを生成する方法である S E L E X を利用して生成することができる。例えば、Brody等(1999) Mol.Diagn.4:381-388を参照されたい。S E L E X は、伝統的なタンパク質ベースの抗体技術に代わる完全にイン・ビトロのコンビナトリアルケミストリーを提供する。ファージディスプレイと同様に、S E L E X は、特定の標的 P E T に対する特異的結合剤の生成に関与する動物宿主が不要であり、時間と労力が低減され、そして精製が簡単になるという点で有利である。

10

【0235】

更に説明するために、S E L E X は、例えば、公知のプライマー配列と隣接した20塩基長より大きいランダムオリゴヌクレオチドライブラリーを合成することにより実行することができる。ランダム領域の合成は、配列中の各位置において4種類の全ヌクレオチドを混合することにより達成することができる。従って、このランダム配列の多様性は、最大で、 4^n (ここに、 n は、配列の長さである) から、パリンδροーム及び対称性配列の頻度を引いたものである。S E L E X により与えられる一層大きい多様性は、3次元の結合部位を形成するオリゴヌクレオチドを選択する一層大きい機会を与える。高親和性オリゴヌクレオチドの選択は、ランダム S E L E X ライブラリーを固定化した標的 P E T にさらすことにより達成される。容易に結合して洗い去られない配列は、保持されて、その後の数ラウンドの S E L E X のために、P C R により増幅される(該 S E L E X は、別のアフィニティー選択と結合核酸配列の P C R 増幅よりなる)。典型的には、4 ~ 5 ラウンドの S E L E X は、アプタマーの高親和性セットを生成するのに十分である。

20

【0236】

それ故、数百~数千のアプタマーを、経済的に可能な仕方で、作ることができる。血液と尿を、タンパク質を捕捉して定量するアプタマーチップ上で分析することができる。S E L E X は又、5 - プロモ(5 - B r)及び5 - ヨード(5 - I)デオキシウリジン残基の利用にも適合された。これらのハロゲン化塩基は、タンパク質と特異的に架橋することができる。イン・ビトロ進化中の選択圧を、結合特異性と特異的光架橋性の両方について加えることができる。これらは、典型的なサンドイッチアッセイにおいて、一つの試薬、光架橋性アプタマーを2つの試薬、捕捉剤抗体及び検出用抗体の代用とするのに十分に独立のパラメーターである。結合、洗浄、架橋及び洗剤洗浄のサイクルの後に、タンパク質は、特異的に且つ共有結合によりそれらの同起源のアプタマーを結合する。他のタンパク質はこれらのチップ上に存在しないので、タンパク質特異的な汚れは、今や、チップ上のピクセルの意味のあるアレイを示す。アルゴリズムの学習及び後向き研究との結合により、この技術は、丈夫でしかもシンプルな診断用チップへと導くはずである。

30

【0237】

更に別の関連する具体例において、捕捉剤は、アロステリックリボザイムであってよい。用語「アロステリックリボザイム」は、ここで用いる場合、様々なエフェクター例えばヌクレオチド、二次メッセンジャー、酵素補因子、医薬、タンパク質、及びオリゴヌクレオチドにより引き金を引かれたときに触媒作用を遂行する一本鎖オリゴヌクレオチドを包含する。アロステリックリボザイム及びそれらの製造方法は、例えば、S. Seetharaman等(2001) Nature Biotechnol.19:336-341(内容を参考として本明細書中に援用する)に記載されている。Seetharaman等によれば、試作品のバイオセンサーは、特異のエフェクターにより引き金を引かれたときにリボザイム媒介の自己開裂を受ける処理されたRNA分子スイッチから組み立てられた。各々の型のスイッチは、金への固定化を与えて、個々にアドレス指定可能なピクセルを形成する5' - チオトリホスフェート部分を利用して製造される。各ピクセルを含むリボザイムは、それらの対応するエフェクターと共に存在する場合にのみ活性となり、それで、各型のスイッチは、特異的な分析物用センサーとして役立つ。7つの異なるRNAスイッチにより造られたアドレス指定されたアレイは、金属イオ

40

50

ン、酵素補因子、代謝産物、及び薬物分析物を含む複雑な混合物中の標的の状態を報告するために利用された。RNAスイッチのアレイは又、自然に生成された3', 5'-環状アデノシンーリン酸(cAMP)を細菌培養培地において検出することによって、アデニレートシクラーゼ機能について大腸菌株の表現型を測定するためにも利用された。

【0238】

F. プラスティボディー

ある具体例において、主題の捕捉剤は、プラスティボディーである。用語「プラスティボディー」は、選択したテンプレート分子を刻印されたポリマーを指す。例えば、Bruggemann (2002) Adv Biochem Eng Biotechnol 76:127-63; 及びHaupt等 (1998) Trends Biotech. 16:468-475を参照されたい。このプラスティボディーの原理は、分子刻印即ち、ポリマー鎖の側鎖にグラフトされ、それにより例えば抗体の結合部位を模倣するペンダント官能基の立体規則性ディスプレイにより生成されうる認識部位に基づいている。

10

【0239】

G. 2つの低親和性リガンドに由来するキメラ結合剤

適当な捕捉剤を生成するための更に別の戦略は、2つ以上の控えめの親和性のリガンドを結合させて、高い親和性の捕捉剤を生成することである。適当なリンカーがあれば、かかるキメラ化合物は、PETに対する2つの個々のリガンドの親和性の積に近い親和性を示すことができる。説明のために、化合物の集合を、標的PETの弱い相互作用相手について高濃度でスクリーニングする。次いで、互いに競争しない化合物を同定し、キメラ化合物のライブラリーを、異なる長さのリンカーにより作成する。次いで、このライブラリーを、PETに対する結合について、ずっと低濃度でスクリーニングして、高い親和性のバインダーを同定する。かかる技術は又、ペプチド又は任意の他の型の控えめの親和性のPET結合性化合物にも適用することができる。

20

【0240】

H. 捕捉剤の標識

本発明の捕捉剤は、当業者に公知の技術例えば蛍光標識、放射性標識、色標識、光学標識、及び他の物理的又は化学的標識を利用して、後記のように、検出を可能にするように改変することができる。

【0241】

I. その他

加えて、任意所定のPETについて、上記の捕捉剤の範疇の各々に属する多数の捕捉剤を利用することができる。これらの多数の捕捉剤は、PETに対する種々の特性例えば親和性/アビディティー/特異性を有しうる。異なる親和性は、幾つかのタンパク質が示しうる発現の動的範囲をカバーするのに有用である。特定の利用に応じて、捕捉剤の任意所定のアレイにおいて、異なる種類/量の捕捉剤が、最適の全体的性能を達成するように、単一のチップ/アレイ上に存在することができる。

30

【0242】

好適具体例において、捕捉剤を、関心あるタンパク質の表面例えば親水性領域に位置するPETに対して高めることができる。関心あるタンパク質の表面に位置するPETは、当分野で利用できる周知のソフトウェアの何れかを利用して同定することができる。例えば、Naccessプログラムを利用することができる。

40

【0243】

Naccessは、PDB (Protein Data Bank)フォーマットのファイルからの分子の接近可能な領域を計算するプログラムである。それは、タンパク質及び核酸の両方について、原子及び残基の接近可能性を計算することができる。Naccessは、プローブが巨大分子のファンデルワールス面の周りを回る場合の原子の接近可能な領域を計算する。かかる三次元座標のセットは、Brookhaven国立研究所のPDBから入手できる。このプログラムは、Lee及びRichards (1971) J.Mol.Biol., 55, 379-400の方法を利用しており、それにより、所定半径のプローブは、分子表面の周囲を回り、その中心により追跡された道筋が接近可能な面である。

50

【 0 2 4 4 】

Boger, J., Emini, E.A. & Schmidt, A., Surface probability profile-An heuristic approach to the selection of synthetic peptide antigens, Reports on the Sixth International Congress in Immunology (Toronto) 1986 250頁に記載された溶媒接近可能性方法も又、関心あるタンパク質の表面に位置する P E T を同定するために利用することができる。パッケージ M O L M O L (Koradi, R.等 (1996) J.Mol.Graph.14:51-55)及び Eisenhaber の A S C 法 (Eisenhaber 及び Argos (1993) J.Comput.Chem.14:1272-1280 ; Eisenhaber 等 (1995) J.Comput.Chem.16:273-284) も又、利用することができる。

【 0 2 4 5 】

他の具体例においては、タンパク質の接近可能なペプチド表面よりも、無傷のタンパク質の消化により生成されたペプチドと結合するようにデザインされた捕捉剤を高めることができる。この具体例においては、研究中の試料内のすべての P E T を再現可能に生成する断片化プロトコルを利用することが好ましい。

10

【 0 2 4 6 】

I I . 捕捉剤を含むツール (アレイなど)

ある具体例において、複雑な化学的若しくは生物学的試料又は多数の化合物の効率的なスクリーニングのための捕捉剤のアレイ例えば高密度アレイを構築するためには、これらの捕捉剤を、固体支持体 (例えば、平面の支持体又はビーズ) の上に固定化することが必要である。当分野では、生物学的分子を固体支持体に結合させるための様々な方法が知られている。一般的には、Affinity Techniques Enzyme Purification: Part B, Meth.Enz.34 (W.B. Jakoby 及び M. Wilchek 編、Acad.Press, N.Y. 1974) 及び Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography, Adv.Exp.Med.Biol.42 (R. Dunlap, Plenum Press, N.Y. 1974) を参照されたい。下記は、アレイを構築する際に考慮すべきことである。

20

【 0 2 4 7 】

A . 形式及び表面の考慮すべき問題

タンパク質のアレイは、ありふれた免疫アッセイ例えば E L I S A 及びドットブロッキングの小型化としてデザインされ (しばしば、蛍光読出しを利用)、多数のアッセイを同時に実行することを可能にするロボット工学及び高スループット検出システムによって促進された。一般的な物理的支持体には、スライドガラス、シリコン、マイクロウェル、ニトロセルロース若しくは P V D F 膜、及び磁気その他のマイクロビーズが含まれる。平面上に送達されたタンパク質の微小液滴が広く利用されているが、関連する別の構成には、マイクロな液体中での発展に基づく C D 遠心分離装置 [Gyros] 及び特殊化チップデザイン例えばプレート中の処理されたマイクロチャンネル [The Living Chip (商標)、Biotrove] 及びシリコン表面上の小さい 3 D ポスト [Zyomyx] が含まれる。懸濁液中の粒子も又、それらが同定のためにコード化され ; システムが、マイクロビーズ [Luminex, Bio-Rad] 及び半導体ナノクリスタル [QDots (商標)、Quantum Dots] のためのカラーコーディング、並びにビーズ [UltraPlex (商標)、Smartbeads] 及びマルチメタルマイクロロッド [Nanobarcodes (商標) 粒子、Surremed] のためのバーコーディングを含む場合には、アレイの基礎として利用することができる。ビーズは又、半導体チップ上に二次元アレイに組み立てることもできる [LEAPS 技術、BioArray Solutions]。

30

40

【 0 2 4 8 】

B . 固定化で考慮すべきことから

タンパク質例えば抗体の固定化における変数には、カップリング試薬及び結合される表面の性質の両方が含まれる。理想的には、利用する固定化方法は、再現可能であり、種々の特性 (大きさ、親水性、疎水性) のタンパク質に適用可能であり、高スループット及び自動化に従順であり、そして完全に機能的なタンパク質活性の保持と両立すべきである。表面結合されたタンパク質の向きは、そのリガンド又は基質 (活性状態) への提示における重要な因子として認められており ; 捕捉剤アレイに関して、最も効率的な結合結果は、方向付けられた試薬を用いて得られ、これは、一般に、タンパク質の部位特異的な標識を必要とする。

50

【0249】

良好なタンパク質アレイ支持体表面の特性は、カップリング手順の前後で化学的に安定であり、良好なスポット形態を与え、最小の非特異的結合を提示し、検出システムにおいてバックグラウンドに寄与せず、そして種々の検出系と両立すべきであることである。

【0250】

タンパク質固定化の共有結合法及び非共有結合法の両方が利用され、様々な賛否両論がある。表面への受動的吸着は、方法論的に単純であるが、定量的又は方向付けた制御が殆どできず；タンパク質の機能的特性を変えるかもしれず、そして再現性及び効率、変化しやすい。共有結合法は、安定な結合を与え、ある範囲のタンパク質に適用できて且つ良好な再現性を有するが；方向付けが変わりやすく、化学的誘導体化が、タンパク質の機能を変え、安定な相互作用性の表面を必要とする。タンパク質上のタグを利用する生物学的捕捉方法は、安定な結合を提供し且つ該タンパク質と特異的に、再現可能な向きで結合するが、生物学的試薬は、先ず適当に固定化されなければならない、そのアレイは、特殊な取扱いを必要とし変わり易い安定性を有する。

10

【0251】

タンパク質アレイの作成のために、幾つかの固定化用化学及びタグが、記載されている。共有結合のための基材には、アミノ又はアルデヒド含有シラン試薬で被覆されたスライドガラス[Telechem]が含まれる。Versalinx(商標)システム[ProLinx]においては、可逆的共有結合が、フェニルジボロン酸で誘導体化されたタンパク質と、支持体表面に固定化されたサリチルヒドロキサム酸との間の相互作用により達成される。これは又、低いバックグラウンド結合及び低い固有の蛍光をも有して、固定化されたタンパク質が機能を保持することを可能にする。未修飾タンパク質の非共有結合は、HydroGel(商標)[PerkinElmer]などの多孔性構造中に、3次元ポリアクリルアミドゲルベースで生じ；この基材は、ガラスマイクロアレイに特に低いバックグラウンドを与え、高いタンパク質機能の容量及び保持を有することが報告されている。広く用いられている生物学的捕捉方法は、ビオチン/ストレプトアビジン又はヘキサヒスチジン/Ni相互作用(適宜改変されたタンパク質を有する)によるものである。ビオチンは、二酸化チタン[Zyomyx]又は五酸化タンタル[Zeptron]などの表面に固定化されたポリリジン主鎖に結合させることができる。

20

【0252】

Arenkov等は、例えば、微細加工されたポリアクリルアミドゲルを利用してタンパク質を捕捉し、次いで、微細電気泳動によりマトリクスを通過する拡散を加速することによって、タンパク質を、それらの機能を保持しながら固定化する方法を記載している(Arenkov等(2000), Anal Biochem 278(2):123-31)。特許文献も又、生物学的分子を固体支持体に結合するための多くの異なる方法を記載している。例えば、米国特許第4,282,287号は、多層のビオチン、アビジン及び増量剤の連続適用によってポリマー表面を改変する方法を記載している。米国特許第4,562,157号は、生化学的リガンドを、光化学的に反応性のアリアルジドに結合することにより表面に結合する技術を記載している。米国特許第4,681,870号は、遊離のアミノ基又はカルボキシル基をシリカマトリクスに導入するための方法であって、該基が、次いで、カルボジイミドの存在下でタンパク質と共有結合する当該方法を記載している。加えて、米国特許第4,762,881号は、ポリペプチド鎖を固体基材に結合する方法であって、光感受性の不自然アミノ酸基を該ポリペプチド鎖に組み込み、その生成物を低エネルギー紫外線に曝すことによって結合する当該方法を記載している。

30

40

【0253】

支持体の表面は、更なる結合化学に利用できる少なくとも一つの反応性の化学基を有するように、又は該基を有するように化学的に誘導体化されるものを選択する。支持体と捕捉剤との間に挿入された随意の可撓性のアダプター分子があってもよい。一具体例において、捕捉剤は、物理的に、支持体上に吸着される。

【0254】

この発明のある具体例においては、捕捉剤を、捕捉剤のPET結合領域とそれが支持体

50

と結合される領域とを離す仕方で、支持体上に固定化される。好適具体例において、この捕捉剤は、その一端と支持体上のアダプター分子との共有結合を形成するように巧みに処理される。かかる共有結合は、シッフ塩基結合、マイケル付加により生成される結合又はチオエーテル結合によって形成されうる。

【0255】

アダプターによる結合又は直接捕捉剤による結合を可能にするために、基材の表面は、適当な反応性の基を造るための準備を必要としうる。かかる反応性の基は、単純な化学的部分例えばアミノ、ヒドロキシル、カルボキシル、カルボキシレート、アルデヒド、エステル、アミド、アミン、ニトリル、スルホニル、ホスホリル、又は同様に化学的に反応性の基を包含することができよう。或は、反応性の基は、スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド、ニトリロトリ酢酸、活性化ヒドロキシル、ハロアセチル(例えば、プロモアセチル、ヨードアセチル)、活性化カルボキシル、ヒドラジド、エポキシ、アジリジン、スルホニルクロリド、トリフルオロメチルジアジリジン、ピリジルジスルフィド、N - アシル - イミダゾール、イミダゾールカーバメート、アリールアジド、アンヒドリド、ジアゾアセテート、ベンゾフェノン、イソチオシアネート、イソシアネート、イミドエステル、フルオロベンゼン、ピオチン及びアビジンを含む(但し、これらに限られない)一層複雑な部分を含むことができる。かかる反応性の基を、機械的、物理的、電氣的又は化学的手段によって基材上に配置する技術は、当分野で周知であり、例えば、米国特許第4,681,870号(参考として本明細書中に援用する)に記載されている。

10

【0256】

一度反応性の基の基材上の初期の準備が完了したならば(必要ならば)、アダプター分子を、適宜、該基材の表面に加えて、該表面を更なる結合化学に適したものにすることができる。かかるアダプターは、基材上の反応性の基と捕捉剤との連続的結合を形成する化学結合の主鎖及び該主鎖に沿った自由に回転する複数の結合を有して、既に基材上にある反応性の基と固定化すべき捕捉剤とを共有結合により結させる。基材アダプターは、化合物の任意の適当なクラスから選択することができ、有機酸、アルデヒド、アルコール、チオール、アミンなどのポリマー又はコポリマーを含むことができる。例えば、ヒドロキシル - 、アミノ - 又はジ - カルボン酸例えばグリコール酸、乳酸、セバシン酸又はサルコシンのポリマー又はコポリマーを用いることができる。或は、飽和又は不飽和の炭化水素例えばエチレングリコール、プロピレングリコール、糖類などのポリマー又はコポリマーを利用することができる。好ましくは、この基材アダプターは、結合すべき捕捉剤が、試料溶液中の分子と自由に相互作用して有効な結合を形成することを可能にするのに適当な長さであるべきである。これらの基材アダプターは、分枝していてもいなくてもよいが、この及び他のアダプターの構造的属性は、立体化学的に捕捉剤の関連機能例えば、P E T相互作用に干渉すべきでない。当業者に公知の保護基を利用して、アダプターの最後の基の望ましくない反応又は時期尚早の反応を防止することができる。例えば、米国特許第5,412,087号(本明細書中に参考として援用する)は、アダプターのチオール基における光除去可能な保護基の利用を記載している。

20

30

【0257】

捕捉剤の結合親和性を保存するために、捕捉剤を、それが支持体基材に、そのリガンド即ちP E Tとの相互作用の原因である領域から離れた領域で結合するように改変することは好ましい。

40

【0258】

捕捉剤を、基材表面の又はアダプター上の反応性の末端基に結合する方法には、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミド結合、カーバメート結合、尿素結合、エステル結合、カーボネート結合、エーテル結合、ヒドラゾン結合、シッフ塩基結合、及び例えばイオン性又は疎水性相互作用により媒介される非共有結合性結合などの結合を形成する反応が含まれる。反応の種類は、勿論、基材/アダプター及び捕捉剤の両者の利用可能な反応性の基に依存する。

【0259】

50

C. アレイ作成において考慮すべきことから

好ましくは、固定化捕捉剤は、固体支持体上例えばシリコンベースのチップ又はスライドガラス上でアレイに配列させる。所定の公知のタンパク質(前に存在が認識されたもの)の存在(及び、適宜、濃度)を検出するようにデザインされた少なくとも一つの捕捉剤は、アレイ中の複数のセル/領域の各々に固定化される。従って、特定のセル/領域でのシグナルは、試料中の公知のタンパク質の存在を示し、そのタンパク質の正体は、そのセルの位置によって示される。或は、一つ又は複数のPETの捕捉剤を、ビーズ上に固定化する(適宜、それらを、意図する標的分析物を同定するために標識する)か又はマイクロウェルプレートなどのアレイに分配する。

【0260】

一具体例において、マイクロアレイは、高密度であり、 1 cm^2 当たり、約100スポットより大きい、好ましくは、約1000、1500、2000、3000、4000、5000スポットより大きい、更に好ましくは、約9000、10000、11000、12000又は13000スポットより大きい密度を有し、捕捉剤を、高密度の反応性の基を造るよう官能化され又は反応性の基を有する高密度のアダプターの付加により官能化された支持体表面に結合させることにより形成される。他の具体例において、このマイクロアレイは、試料中で、病気の診断、細胞型の決定、病原体の同定などの証拠を提供するパターンを生成する特異的タンパク質の様々な組合せを検出するために選択された比較的少数(例えば、10~50)の捕捉剤を含む。

【0261】

基材又は支持体の特徴は、意図する用途によって変わりうるが、それらの基材の形状、材料及び表面改変は、考慮しなければならない。基材が実質的に二次元の又は平らな少なくとも一つの面を有することは好適なことであるが、それは、へこみ、突起、段、隆起、段丘などを含んでもよく、如何なる幾何学的形態(例えば、円筒形、円錐形、球形、凹面、ひも状、又はこれらの任意のものの組合せ)を有してもよい。適当な基材材料には、ガラス、セラミック、プラスチック、金属、合金、炭素、紙、アガロース、シリカ、石英、セルロース、ポリアクリルアミド、ポリアミド、及びゼラチン並びに他のポリマー支持体、他の固体材料支持体又は可撓性膜支持体が含まれるが、これらに限られない。基材として利用しうるポリマーには、ポリスチレン；ポリ(テトラ)フルオロエチレン(PTFE)；ポリビニリデンジフルオリド；ポリカーボネート；ポリメチルメタクリレート；ポリビニルエチレン；ポリエチレンイミン；ポリオキシメチレン(POM)；ポリビニルフェノール；ポリラクチド；ポリメタクリルイミド(PMI)；ポリアルケンシルホン(PAS)；ポリプロピレン；ポリエチレン；ポリヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)；ポリジメチルシロキサン；ポリアクリルアミド；ポリイミド；及び様々なブロックコポリマーが含まれるが、これらに限られない。この基材は又、多層構造中に材料(水透過性又は非透過性)の組合せを含むこともできる。この基材の好適具体例は、表面にSi-OH官能基を有する単純な $2.5\text{ cm} \times 7.5\text{ cm}$ のスライドガラスである。

【0262】

アレイの作成方法は、ロボットによる密着プリンティング、インクジェット、圧電スポットティング及びフォトリソグラフィーを包含する。多くの市販のアレイ[例えば、Packard Bioscience]並びに手動装置[V & P Scientific]が利用可能である。細菌コロニーを、イン・シトゥでタンパク質発現を誘導するために、PVD膜上に、ロボットによってグリッドに据えることができる。

【0263】

ナノアレイは、スポットの大きさ及び密度の限界にあり、ナノメートルの空間的スケールのスポットは、数千の反応を1平方mm未満の単一チップ上で行なうことを可能にする。BioForce Laboratoriesは、85平方ミクロン中に1521のタンパク質のスポットを有する(2500万スポット/平方cmに匹敵する)光学検出の限界にあるナノアレイを開発したが；それらの読出し方法は、蛍光及び原子間力顕微鏡(AFM)である。

【0264】

10

20

30

40

50

スライドガラス上のアレイを有する自動化試料インキュベーション及び洗浄のためのミクロな液体のシステムが、NextGen及びPerkinElmerによって同時に開発された。

【0265】

例えば、捕捉剤マイクロアレイは、少量の反応物質を基材表面の特定の位置に分配する「スポッティング」を含む多くの方法によって生成することができる。スポッティングのための方法には、ミクロな液体のプリンティング、マイクロスタンピング(例えば、米国特許第5,515,131号、米国特許第5,731,152号、Martin, B.D.等(1998), Langmuir 14:3971-3975及びHaab, BB等(2001) Genome Biol 2 及びMacBeath, G.等(2000) Science 289:1760-1763参照)、マイクロコンタクトプリンティング(例えば、PCT公開WO 96/29629参照)、インクジェットヘッドプリンティング(例えば、Roda, A.等(2000) BioTechniques 28:492-496,及びSilzel, J.W.等(1998) Clin Chem 44:2036-2043参照)、ミクロな液体の直接的塗布(Rowe, C.A.等(1999) Anal Chem 71:433-439及びBernard, A.等(2001), Anal Chem 73:8-12)及びエレクトロスプレー付着(Morozov, V.N.等(1999) Anal Chem 71:1415-1420及びMoerman R.等(2001) Anal Chem 73:2183-2189)が含まれるが、これらに限られない。一般に、分配装置には、試料分配量を制御するための較正手段が含まれており、試料を支持体表面に対して動かして位置決めするための構造も含まれる。アレイにおける捕捉剤ごとに分配すべき液体の容積は、そのアレイの意図する用途及び利用可能な装備によって変化する。好ましくは、一度の分配により形成される容積は、100 nL未満であり、一層好ましくは、10 nL未満であり、最も好ましくは、約1 nLである。その結果生成されたスポットのサイズは、そのように変化し、好適具体例において、これらのスポットは、20,000 µm未満の直径であり、一層好ましくは、2,000 µm未満の直径であり、最も好ましくは、約150~200 µmの直径である(約1600スポット/平方センチメートルが得られる)。ブロッキング剤の溶液をこのマイクロアレイに加えて、捕捉剤に結合しなかった反応性の基による非特異的結合を防止することができる。例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、又は無脂肪乳の溶液をブロッキング剤として用いて、後続のアッセイにおけるバックグラウンド結合を減少させることができる。

10

20

【0266】

好適具体例において、高い精度の、密着プリンティングロボットを利用して、小さい容積の溶解した捕捉剤をミクロ滴定プレートのウェルからピックアップして、約1 nLの溶液を基材例えば化学的に誘導体化された顕微鏡用のスライドガラスの表面上の規定された位置に繰り返し送達する。かかるロボットの例には、Affymetrix(カリフォルニア、Santa Clara在)から市販されているGMS 417 Arrayer、及びBrown研のウェブサイト(<http://cmgm.stanford.edu/pbrown>)からダウンロードできる指示に従って構築されるスプリットピンアレイヤーが含まれる。これは、スライドガラス上の化合物の顕微鏡的スポットの形成を生じる。しかしながら、当業者は、本発明が、1 nLの容積の溶液の送達に限定されず、特定のロボット装置の利用に限定されず、又は化学的に誘導体化されたスライドガラスの利用に限定されないこと、及びピコリットル以下の容積を送達することのできる別の送達手段を利用することができることを認めよう。それ故、高精度のアレイロボットに加えて、インクジェットプリンター、圧電プリンター及び小容積ピペッティングロボットを含む(これらに限られない)これらの化合物を送達するための他の手段を利用することができる。

30

40

【0267】

一具体例において、本発明の捕捉剤を含む組成物(例えば、マイクロアレイ又はビーズ)は、他の成分例えば特定のペプチド、代謝産物、薬物又は薬物候補、RNA、DNA、脂質などを認識して結合する分子をも含むことができる。従って、PETに幾らかしか結合しない捕捉剤のアレイは、この発明の具体例を構成することができる。

【0268】

二次元マイクロアレイに代わるものとして、蛍光活性化セルソーティング(FACS)と組み合わせたビーズベースのアッセイが、複合免疫アッセイを実施するために開発されてい

50

る。蛍光活性化セルソーティングは、20年より長く、診断において日常的に用いられてきた。mAbを利用して、細胞表面マーカーが、正常及び新生物細胞の集団において同定され、これらは、様々な形態の白血病の分類を可能にし、又は病気のモニターを可能にする(最近、Herzenberg等 Immunol Today 21(2000), p.282-390により総説された)。

【0269】

ビーズベースのアッセイシステムは、マイクロアレイアッセイに慣用的に用いられている二次元基材の代りに、ミクロスフェアを捕捉分子のための固体支持体として利用する。個々の免疫アッセイにおいて、捕捉剤を、別の種類のミクロスフェアに結合させる。この反応は、これらのミクロスフェアの表面で起きる。個々のミクロスフェアは、赤及び橙色の蛍光色素の様な及び別個の混合物により色分けされる。適当な捕捉分子への結合の後、異なる色分けのビーズのセットをプールすることができ、免疫アッセイを単一反応バイアル中に行なう。PET標的とそれらの各捕捉剤との異なる種類のビーズ上での生成物形成を、蛍光ベースのレポーターシステムによって検出することができる。シグナル強度は、フローサイトメーターで測定され、これは、捕捉された標的の量を個々のビーズ上で定量することができる。各ビーズの種類及び各固定化標的は、第二蛍光シグナルにより測定される色分けを利用して同定される。これは、単一試料に由来する多数の標的の複合的定量を可能にする。感度、信頼性及び精度は、標準的マイクロ滴定ELISA手順で認められるものと類似している。色分けされたミクロスフェアを利用して、最大100の異なる種類のアッセイを同時に行なうことができる(LabMAPシステム、ラボラトリー・マルチプル・アナライト・プロファイリング、米国、テキサス、Austin在、Luminex)。例えば、ミクロスフェアベースのシステムは、生物学的試料に由来するサイトカイン又は自己抗体を同時に定量するために用いられてきた(Carson及びVignali, J Immunol Methods 227 (1999), p41-52; Chen等、Clin Chem 45(1999), p1693-1694; Fulton等、Clin Chem 43 (1997), p.1749-1756)。Bellisario等(Early Hum Dev 64(2001), p21-25)は、この技術を利用して、新生児の乾燥させた血液スポット試料に由来する3つのHIV-1抗原に対する抗体を測定した。

10

20

【0270】

ビーズベースのシステムは、幾つかの利点を有している。捕捉剤分子は、別々のミクロスフェアに結合されているので、個々のカップリング事象を、完全に分析することができる。従って、複合免疫アッセイのために、品質制御されたビーズだけをプールすることができる。その上、もし更なるパラメーターがこのアッセイに含まなければならないならば、新しい型の積載ビーズを加えなければならないだけである。洗浄ステップは、このアッセイを行なう際には必要とされない。この試料は、異なる種類のビーズ及び蛍光標識された検出用抗体と共にインキュベートされる。サンドイッチ免疫複合体の形成後に、ミクロスフェアの表面に限定的に結合されたフルオロフォアだけが、フローサイトメーターで計数される。

30

【0271】

D. 関連する非アレイ形式

捕捉剤のアレイに代わるものは、いわゆる「分子インプリンティング」技術により作成されたものであり、該技術においては、ペプチド(例えば、選択されたPET)をテンプレートとして利用して、構造的に相補性の配列特異的な空隙を重合可能なマトリクス中に生成し;その後、これらの空隙は、適当な一次アミノ酸配列を有する(消化された)タンパク質を特異的に捕捉することができる[ProteinPrint(商標)、Aspira Biosystems]。説明のために、選択したPETを合成することができ、重合可能なモノマーの万能マトリクスが該ペプチドの周囲で自動組み立てされ、空間内に架橋される。次いで、このPET又はテンプレートを除去すると、形状及び機能において相補的な空隙が残る。これらの空隙は、フィルム、アレイの分離された部位又はビーズの表面上に形成することができる。断片化したタンパク質の試料をこの捕捉剤にさらすと、このポリマーは、選択的に当該PETを含む標的タンパク質を保持して他のすべてを排除する。洗浄後に、結合したPET含有ペプチドが残る。一般的な染色及びタグ手順、又は下記の任意の非標識技術を利用して、発

40

50

現レベル及び／又は翻訳後修飾を検出することができる。或は、捕捉されたペプチドを、更なる分析例えば質量分析のために溶出させることができる。WO 01 / 61354 A 1、WO 01 / 61355 A 1 及び関連する出願／特許を参照されたい。

【0272】

診断及び発現プロファイリングにおいて利用することの出来る他の方法は、ProteinChip(登録商標)アレイ[Ciphergen]であり、該方法において、固相クロマトグラフィー表面は、血漿又は腫瘍抽出物などの混合物に由来する類似の帯電特性又は疎水性を有するタンパク質と結合し、SELDI-TOF質量スペクトル分析が、保持されたタンパク質の検出に利用される。ProteinChip(登録商標)は、新規な病気のマーカーを同定する能力を有すると信じられている。しかしながら、この技術は、一般に、特異的なリガンド相互作用の検出のための個々のタンパク質の固定化を含まないので、ここで論じているタンパク質アレイとは異なるものである。

10

【0273】

E. 単一アッセイ形式

PET特異的な親和性捕捉剤は又、単一アッセイ形式においても利用することができる。例えば、かかる薬剤は、循環剤例えばPSAの検出のための一層良好なアッセイを、増大された感度、ダイナミックレンジ及び／又は回収率を与えることにより開発するために利用することができる。例えば、単一アッセイは、伝統的なELISA及び他の免疫アッセイを超える機能性能特性例えば：参照標準例えば比較対照試料についての0.95以上の回帰係数(R²)、一層好ましくは0.97、0.99又は0.995より大きいR²；少なくとも50パーセントの、一層好ましくは少なくとも60、75、80又は90パーセントの回収率；少なくとも90パーセントの、一層好ましくは少なくとも95、98又は99パーセントの試料中のタンパク質の存在についての陽性予測値；99パーセント以上の、一層好ましくは少なくとも99.5パーセントの又は99.8パーセントの試料中のタンパク質の存在についての診断感度(DSN)；99パーセント以上の、一層好ましくは少なくとも99.5又は99.8パーセントの試料中のタンパク質の存在についての診断特異性(DSP)の少なくとも一つを有することができる。

20

【0274】

III. 結合事象の検出方法

この発明の捕捉剤並びにこれらの捕捉剤を含む組成物例えばマイクロアレイ又はビーズは、健康産業において例えば治療、診断、イン・ビボイメージング又は薬物の発見において広範囲の応用を有する。本発明の捕捉剤は又、産業及び環境における応用例えば環境診断薬、産業診断薬、食品安全性、毒物学、反応触媒、又は高スループットスクリーニングにおける応用；並びに農業及び基礎研究例えばタンパク質配列決定における応用をも有する。

30

【0275】

本発明の捕捉剤は、強力な分析用ツールであり、ユーザーが、特異的なタンパク質、又は複雑な試料中に存在する関心ある一群のタンパク質を検出することを可能にする。加えて、この発明は、試料の効率的で迅速な分析；試料の保存及び直接的な試料の比較を可能にする。この発明は、タンパク質試料の「多パラメーター」分析を可能にする。ここで用いる場合、タンパク質試料の「多パラメーター」分析は、複数のパラメーターに基づくタンパク質試料の分析を包含することを意図している。例えば、タンパク質試料を、複数のPETと接触させることができ、各PETは、試料中の異なるタンパク質を検出することができる。試料中で検出されたタンパク質の組合せ(及び、好ましくは、相対的濃度)に基づいて、当業者は、試料の正体を決定し、病気若しくは病気の素因を診断し、又は病気の段階を診断することができる。

40

【0276】

本発明の捕捉剤は、タンパク質又はポリペプチドの検出に適した任意の方法例えば免疫沈降、免疫細胞化学、ウェスタンブロット又は核磁気共鳴分光分析(NMR)において利用することができる。

50

【0277】

捕捉剤と相互作用するタンパク質の存在を検出するために、当分野で公知の様々な方法を利用することができる。検出すべきタンパク質を検出可能な標識で標識することができる。用語「標識」は、ここでは、広い意味に用いて、直接に又はシグナル生成系の少なくとも一つの更なるメンバーとの相互作用によって検出可能なシグナルを与えることのできる薬剤を指す。直接検出できる標識及び本発明において用途を見出すことができる標識には、例えば、蛍光標識例えばフルオレセイン、ローダミン、BODIPY、シアニン染料(例えば、Amersham Pharmacia製)、Alexa染料(例えば、Molecular Probe, Inc.製)、蛍光染料、ホスホルアミダイト、ビーズ、化学発光化合物、コロイド粒子などが含まれる。適当な蛍光染料は、当分野で公知であり、フルオレセインイソチオシアネート(FITC); ローダミン及びローダミン誘導体; テキサスレッド; フィコエリトリン; アロフィコシアニン; 6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM); 2', 7'-ジメトキシ-4, 5-ジクロロカルボキシフルオレセイン(JOE); 6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX); 6-カルボキシ-2, 4, 7, 4, 7-ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)、5-カルボキシフルオレセイン(5-FAM); N, N, N', N'-テトラメチルカルボキシローダミン(TAMRA); スルホン化ローダミン; Cy3; Cy5などが含まれる。放射性同位元素例えば³⁵S、³²P、³H、¹²⁵Iなども又、標識に利用することができる。加えて、標識には、近赤外染料(Wang等、Anal.Chem., 72:5907-5917(2000)、アップコンバーティング蛍光体(Hampl等、Anal.Biochem., 288:176-187(2001)、DNAデンドリマー(Stears等、Physiol.Genomics 3:93-99(2000)、量子ドット(Bruchez等、Science 281:2013-2016(1998)、ラテックスビーズ(Okana等、Anal.Biochem. 202:120-125(1992)、セレン粒子(Stimpson等、Proc.Natl.Acad.Sci. 92:6379-6383(1995)及びユーロピウムナノ粒子(Harma等、Clin.Chem. 47:561-568(2001))も含まれうる。この標識は、好ましくは、変わり易いシグナルを与えないで、所定期間にわたって一定した再現性のあるシグナルを与えるものである。

10

20

【0278】

非常に有用な標識剤は、水溶性の量子ドット、又はいわゆる「官能化ナノクリスタル」又は「半導体ナノクリスタル」である(米国特許第6, 114, 038号に記載されたものなど)。一般に、量子ドットを製造することができ、それは、以前に、記載されたように(Bawendi等、1993, J.Am.Chem.Soc. 115:8706)、相対的単分散(例えば、調製物において量子ドット間で凡そ10%未満で変化するコアの直径)を生じる。量子ドットの例は、CdSe、CdS及びCdTe(集合的に「CdX」と呼ばれる)よりなる群から選択されるコアを有することが当分野で公知である(例えば、Norris等、1996, Physical Review B. 53:16338-16346; Nirmal等、1996, Nature 383:802-804; Empedocles等、1996, Physical Review Letters 77:3873-3876; Murray等、1996, Science 270:1355-1358; Effort等、1996, Physical Review B. 54:4843-4856; Sacra等、1996, J.Chem.Phys. 103:5236-5245; Murakoshi等、1998, J.Colloid Interface Sci. 203:225-228; Optical Materials and Engineering News, 1995, Vol.5, No.12; 及びMurray等、1993, J.Am.Chem.Soc. 115:8706-8714; (これらの開示を参考として本明細書中に援用する)を参照されたい)。

30

【0279】

CdX量子ドットは、その上に一様に付着した無機被覆(「シェル」)により不動態化している。コア量子ドットの表面の不動態化は、この無機被覆の性質に依って、化学発光放射の量子収率の増大を生じうる。この量子ドットの不動態化に利用されるシェルは、好ましくは、YZよりなる(ここに、Yは、Cd又はZnであり、Zは、S又はSeである)。CdXコア及びYZシェルを有する量子ドットは、当分野で記載されている(例えば、Daneke等、1996, Chem.Mater. 8:173-179; Dabbousi等、1997, J.Phys.Chem.B 101:9463; Rodriguez-Viejo等、1997, Appl.Phys.Lett. 70:2132-2134; Peng等、1997, J.Am.Chem.Soc. 119:7019-7029; 1996, Phys.Review B. 53:16338-16346; (これらの開示を、参考として本明細書中に援用する)参照)。しかしながら、上記の量子ドットは、無機シェルを利用して不動態化しており、有機、非極性(又は弱く極性)の溶媒中でしか可溶性でない。量子

40

50

ドットを生物学的応用において有用なものとするために、量子ドットは水溶性であることが望ましい。「水溶性」は、ここで用いる場合、水ベースの溶液例えば水又は水ベースの溶液又は緩衝剤溶液(当業者に公知の生物学的又は分子検出システムにおいて利用されるものを含む)において十分に溶解性であるか懸濁可能であることを意味する。

【0280】

米国特許第6,114,038号は、非同位体検出システムで用いるための官能化ナノクリスタルを含有する組成物を与えている。この組成物は、少なくとも一つの更なる化合物を連続的様式で操作可能に結合することにより水溶性で且つ官能化されている量子ドット(一層のキャッピング化合物でキャップされている)を含む。好適具体例において、少なくとも一つの更なる化合物は、ナノクリスタル上に連続層を形成する。一層詳細には、これらの官能化ナノクリスタルは、このキャッピング化合物でキャップされた量子ドットを含み、且つこのキャッピング化合物に操作可能に結合された少なくとも一のジアミノカルボン酸を有する。従って、これらの官能化ナノクリスタルは、このキャッピング化合物を含む第一の層及びジアミノカルボン酸を含む第二の層を有することができ；そして更に、アミノ酸の層、アフィニティーリガンドの層、又はこれらの組合せを含む多層を含む少なくとも一つの連続層を含むことができる。この組成物は、高い量子収量の分離した発光ピークを有する検出可能な発光放射を生じる単一波長の光で励起させることのできる量子ドットのクラスを含む。かかる官能化ナノクリスタルを利用して、本発明の捕捉剤を、それらの、結合事象の検出及び/又は定量における利用のために標識することができる。

10

【0281】

米国特許第6,326,144号は、量子ドットの特定のサイズを選択することにより所望のエネルギーに同調できる特徴的なスペクトル放射を有する量子ドット(QD)を記載している。例えば、2ナノメートルの量子ドットは、緑色光を放射し、5ナノメートルの量子ドットは、赤色光を放射する。これらの量子ドットの放射スペクトルは、試料のサイズ不均一度に依存する25~30nmの狭い準位幅、及び対称的なテイリング領域のないガウス型又は殆どガウス型の線形状を有する。同調可能性、狭い準位幅、及びテイリング領域のない対称的放射スペクトルの組合せは、システム内の多様なサイズの量子ドットの高い解像度を与えて、研究者が、QDで標識した様々な生物学的部分を同時に調べることを可能にする。加えて、ナノクリスタル量子ドットの励起波長の範囲は広く、エネルギーにおいて、すべての利用可能な量子ドットの放射波長より高くてよい。従って、これは、単一光源(通常、紫外線又は青色領域のスペクトル)を有するシステム内のすべての量子ドットの同時励起を与える。QDは又、慣用の有機蛍光染料よりも丈夫であり、それらの有機染料よりも光退色に耐性である。QDの丈夫さは又、調べている系内の有機染料の分解産物の汚染の問題をも軽減する。これらのQDは、タンパク質、核酸及び他の天然の生物学的分子の捕捉剤の標識に利用することができる。セレン化カドミウム量子ドットナノクリスタルは、カリフォルニア、HaywardのQuantum Dot Corporationから入手可能である。

20

30

【0282】

或は、試験すべき試料を標識せずに、第二ステージの標識試薬を、試料中のタンパク質の存在を検出し又は量を定量するために加える。かかる「サンドイッチベースの」検出方法は、各タンパク質について2つの捕捉剤(一つは、PETを捕捉し、一つは、一度それが捕捉されたならば標識する)を開発しなければならないという不都合を有する。かかる方法は、それらが一つのペプチド上の異なる点における2つの結合反応を利用し、従って、ノイズ比に対する増大したシグナルの故に、タンパク質の存在及び/又は濃度を一層正確に且つ高精度で測定することができるので、ノイズ比に対して本質的に改良されたシグナルによって特徴付けられるという利点を有する。

40

【0283】

更に別の具体例において、主題の捕捉剤アレイは、「仮想アレイ」であってよい。例えば、抗体その他の捕捉剤をビーズ上に固定化した仮想アレイを生成することができ、その正体は、結合した捕捉剤の故にそれが特異的である特定のPETに関して、2種以上の共

50

有結合した染料の特定の比率によりコード化されるものである。コード化されたPETビーズの混合物を試料に加えて、固定化捕捉剤により認識されるPET実在物の捕捉を生じる。

【0284】

捕捉された種を定量するために、捕捉されたPETに結合する蛍光標識された抗体を利用するサンドイッチアッセイ、又は捕捉剤に対する蛍光標識されたリガンドを利用する競合結合アッセイをこの混合物に加える。一具体例において、標識されたリガンドは、分析物のPETと捕捉剤への結合について競合する標識されたPETである。次いで、これらのビーズを、各ビーズ上の様々な蛍光シグナルの強度を読むフローサイトメーターなどの機器に導入して、該ビーズの正体を、染料の比を測定することにより決定することができる(図3)。この技術は、比較的早くて効率的であり、研究者が、殆どの関心あるPETのセットをモニターするために適合させることができる。

10

【0285】

他の具体例において、捕捉剤のアレイを、イオン化に適したマトリクスに包埋する(例えば、Fung等(2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:65-69に記載のように)。試料の添加及び未結合分子の除去(洗浄による)後に、保持されたPETタンパク質を質量分光分析により分析する。幾つかの場合には、イオン化の前に、結合種のトリプシンによる更なるタンパク質分解性消化が必要とされうる(特に、エレクトロスプレーが、ペプチドのイオン化の手段ならば)。

【0286】

上記のすべての試薬は、これらの捕捉剤を標識するために利用することができる。好ましくは、標識すべき捕捉剤を、検出すべきタンパク質上に存在する基例えばアミン基、チオール基又はアルデヒド基と反応する活性化染料と結合させる。

20

【0287】

この標識は又、適当な基質の添加後に検出可能な産生物シグナルを与えることのできる共有結合された酵素であってもよい。本発明で利用するのに適した酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、マレートデヒドロゲナーゼなどが含まれる。

【0288】

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)も又、捕捉剤と相互作用するタンパク質の検出に利用することができる。ELISAにおいて、指標分子は、酵素に共有結合されて、分光光度計により、酵素が純粋な基質を相関生成物に変換する初速度を測定することにより定量されうる。ELISAを実施する方法は、当分野で周知であり、例えば、Perlmann, H.及びPerlmann, P.(1994). *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cell Biology: A Laboratory Handbook*. San Diego, カリフォルニア、Academic Press, Inc., 322-328; Crowther, J.R.(1995). *Methods in Molecular Biology*, Vol.42-ELISA: Theory and Practice. Humana Press, Totowa, ニュージャージー; 及びHarlow, E.及びLane, D.(1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 553-612に記載されている(これらの各々の内容を参考として援用する)。サンドイッチ(捕捉)ELISAは又、2つの捕捉剤と相互作用するタンパク質を検出するために利用することができる。これらの2つの捕捉剤は、同じペプチド(例えば、上記のように、関心ある試料の断片化により生成されたペプチド)上に存在する2つのPETと特異的に相互作用することができてよい。或は、これらの2つの捕捉剤は、共に同じペプチド(例えば、上記のように、関心ある試料の断片化により生成されたペプチド)上に存在する一つのPET及び一つのユニークでないアミノ酸配列と特異的に相互作用することができてよい。関心あるタンパク質の定量のためのサンドイッチELISAは、試料中のタンパク質の濃度が低く且つ/又は関心あるタンパク質が高濃度の夾雑タンパク質を含む試料中に存在する場合に、特に価値がある。

30

40

【0289】

高スループットのための完全に自動化されたマイクロアレイベースのアプローチである

50

E L I S A は、Mendoza等(BioTechniques 27:778-780, 782-786, 788, 1999)により記載された。このシステムは、テフロン(登録商標)マスクにより分離された96ウェルを有する光学的に均一なガラス板よりなつた。100より多くの捕捉剤分子が、各ウェル中に固定化された。試料のインキュベーション、洗浄及び蛍光ベースの検出を、自動化液体ピペッターにより行なつた。これらのマイクロアレイを、スキャニング電荷結合素子(CCD)検出器を利用して定量的にイメージ形成した。そうして、整列させた抗原の多重検出の、高スループット様式での実行可能性を、成功裏に示すことができた。加えて、Silzel等(Clin Chem 44 p.2036-2043, 1998)は、多数のIgGサブクラスを、マイクロアレイ技術を利用して、同時に検出することができることを示すことができた。Wiese等(Clin Chem 47 p.1451-1457, 2001)は、前立腺特異的な抗原(PSA)、-(1)-抗キモトリプシン結合PSA及びインターロイキン6(マイクロアレイ形式)を測定することができた。Arenkov等(前出)は、マイクロアレイサンドイッチ免疫アッセイ及び直接抗原又は抗体検出実験を、改変ポリアクリルアミドゲルを固定化捕捉剤分子の基質として利用して行なつた。

10

20

30

40

50

【0290】

当分野で記載されたマイクロアレイアッセイ形式の殆どは、化学発光又は蛍光ベースの検出方法に依存している。感度に関する更なる改良には、蛍光標識及び導波管技術の適用が含まれる。蛍光ベースのアレイの免疫センサーは、Rowe等(Anal Chem 71 (1999), p.433-439; 及びBiosens Bioelectron 15 (2000), p.579-589)により開発されて、サンドイッチ免疫アッセイ形式を利用する臨床分析物の同時検出に適用された。ビオチン化した捕捉用抗体を、アビジンコートした導波管上にフローチャンバモジュールシステムを利用して固定化した。捕捉用分子の別々の領域を、導波管表面に垂直に配置した。関心ある試料をインキュベートして、標的をそれらの捕捉用分子に結合させた。捕捉された標的を、次いで、適当な蛍光標識した検出用分子を利用して可視化した。このアレイ免疫センサーは、標的の、様々な臨床試料における生理的に適当な濃度での検出及び測定に適していることが示された。

【0291】

導波管技術を利用する更なる感度の増大が、二次元導波管技術の開発により達成された(Duveneck等、Sens Actuators B B38 (1997), p.88-95)。薄いフィルム導波管が、高屈折率の物質例えば Ta_2O_5 (該物質を透明基材上に付着させる)から生成される。所望の波長のレーザー光を回折格子手段によって二次元導波管に結合させる。光は二次元導波管内を伝搬して、1平方センチメートルより大きい領域が、均一に明るくなりうる。この面において、伝搬する光は、いわゆるエバネセント場を生成する。これは、この溶液に及んで、表面に結合された蛍光体のみを活性化する。周囲の溶液中の蛍光体は、励起されない。表面近くにおいて、励起場強度は、標準的共焦点励起により達成されるものの100倍でありうる。CCDカメラを利用して、二次元導波管の全領域を横切るシグナルを同時に同定する。従って、二次元導波管における捕捉用分子のマイクロアレイ形式での固定化は、高感度の小型化されて平行化された免疫アッセイの性能を与える。このシステムは、40fMもの低濃度のインターロイキン6を検出するために成功裏に利用され且つ未結合の検出用分子を除去するのに通常必要とされる洗浄ステップなしでアッセイを行なうことができるという利点を有する(Weinberger等、Pharmacogenomics 1 (2000), p.395-416)。

【0292】

感度を増大させるために遂行された別の戦略は、シグナル増幅手順に基づいている。例えば、イムノRCA(免疫ローリングサークル増幅)は、検出用分子(例えば、サンドイッチ型アッセイ形式における第二の捕捉剤)に共有結合されたオリゴヌクレオチドプライマーを含む。この結合したオリゴヌクレオチドに相補的な環状DNAをテンプレートとして利用して、DNAポリメラーゼは、該結合したオリゴヌクレオチドを伸張させて、検出用分子に結合したままの数百コピーの環状DNAよりなる長いDNA分子を生成する。数千の蛍光標識されたヌクレオチドの組込みは、強力なシグナルを生成する。Schweitzer等(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97 (2000), p.10113-10119)は、この検出技術を、マイクロアレイベースのアッセイにおける利用について評価した。h u I g E 及び前立腺特異

的抗原についてのサンドイッチ免疫アッセイは、マイクロアレイ形式で行なわれた。これらの抗原は、フェムトモル濃度で検出することができ、個々の抗体 - 抗原複合体から生じた別々の蛍光シグナルを計数することにより単一の特異的に捕捉された抗原を記録することが可能であった。これらの著者は、ローリングサークルDNA増幅を利用する免疫アッセイが、抗原の超高感度検出のための多用途プラットフォームであり、従って、タンパク質マイクロアレイ技術における利用に適していることを示した。

【0293】

放射免疫アッセイ(RIA)も又、捕捉剤と相互作用するタンパク質の検出に利用することができる。RIAにおいては、指標分子を、放射性同位元素で標識して、放射性崩壊事象をシンチレーションカウンターで計数することにより定量することができる。直接的又は競合RIAを実施する方法は、当分野で周知であり、例えば、Cell Biology: A Laboratory Handbook, San Diego, カリフォルニア、Academic Press, Inc.(内容を参考として本明細書中に援用する)に記載されている。

10

【0294】

他の免疫アッセイは、一般に、細胞試料中のタンパク質のレベルを定量するために利用され、当分野で周知であって、本発明における利用のために適合させることができる。この発明は、特定のアッセイ手順に限定されず、それ故、均一手順及び不均一手順の両方を包含するものである。この発明により行なわれうる典型的な他の免疫アッセイには、蛍光偏光免疫アッセイ(FPIA)、蛍光免疫アッセイ(FIA)、酵素免疫アッセイ(EIA)、免疫比濁法(NIA)が含まれる。指標部分(又は、標識基)を、患者の抗体に結合させることができ、該部分は、この方法の様々な用途の要求に合うように選択するが、それらは、しばしば、アッセイ装置及び適合性の免疫アッセイ手順の利用可能性により指図される。上記の様々な免疫アッセイの実施において用いるべき一般的技術は、当業者には公知である。一具体例において、生物学的試料におけるタンパク質レベルの測定は、マイクロアレイ分析(タンパク質チップ)により実施されうる。

20

【0295】

幾つかの他の具体例において、捕捉剤と相互作用するタンパク質の存在の検出は、標識なしで達成することができる。例えば、タンパク質の捕捉剤に結合する能力の測定は、実時間バイオモレキュラーインタラクションアナリシス(BIA)などの技術を利用して達成することができる。Sjolander, S.及びUrbaniczky, C. (1991) Anal.Chem.63:2338-2345 及びSzabo等 (1995) Curr.Opin.Struc.Biol.5:699-705。ここで用いる場合、「BIA」は、生体特異的な相互作用を、如何なる反応体をも標識せずに、実時間で研究するための技術である(例えば、BIACore)。

30

【0296】

他の具体例において、特定の回折格子表面を有するバイオセンサーを利用して、処理した(消化した)生物学的試料中の非標識PET含有ペプチドとバイオセンサー表面の固定化捕捉剤との間の結合を検出/定量することができる。この技術の詳細は、B. Cunningham, P. Li, B. Lin, J. Pepper, 「Colorimetric resonant reflection as a direct biochemical assay technique」Sensors and Actuators B, Vol 81, p.316-328, 2002年1月5日、及びPCT No. WO 02 / 061429 A2及びUS 2003 / 0032039に一層詳しく記載されている。簡単にいえば、導波モードの共鳴現象を利用して、平行化された白色光で照らされた場合に単一波長(色)だけを反射するようにデザインされた光学的構造を生成する。分子をこのバイオセンサーの表面に結合させたときに、反射した波長(色)は、格子に結合された光の経路の変化のためにシフトする。レセプター分子を格子表面に結合することにより、相補的結合分子を、如何なる種類の蛍光プローブ又は粒子標識の利用もなしで検出/定量することができる。このスペクトルのシフトを分析して、与えられた発現データを測定すること、及び特定の指示の存否を示すことができる。

40

【0297】

このバイオセンサーは、典型的には、高い屈折率を有する物質よりなる二次元の格子、この二次元格子を支持する基材層、及びこの二次元格子の表面(基材層の反対側)に固定さ

50

れた少なくとも一つの検出用プローブを含む。バイオセンサーが照らされると、共鳴格子効果が、反射放射スペクトルに生じる。この二次元格子の深さ及び周期は、共鳴格子効果の波長より小さい。

【0298】

光学的波長の狭いバンドは、このバイオセンサーから、それが広いバンドの光学的波長で照らされたときに反射しうる。その基材は、ガラス、プラスチック又はエポキシを含むことができる。この二次元格子は、硫化亜鉛、二酸化チタン、酸化タンタル、及び窒化珪素よりなる群から選択する材料を含むことができる。

【0299】

この基材及び二次元格子は、適宜、単一ユニットを含むことができる。この二次元格子を構成する単一ユニットの表面は、高い屈折率を有する材料で被覆され、少なくとも一つの検出用プローブが、該高い屈折率を有する材料の表面に固定化される(単一ユニットの反対側)。この単一ユニットは、ガラス、プラスチック及びエポキシよりなる群から選択する材料よりなっておりよい。

10

【0300】

このバイオセンサーは、適宜、基材層の反対側の二次元格子の表面に被覆層を含むことができる。少なくとも一つの検出用プローブが、二次元格子の反対側の被覆層の表面に固定化される。この被覆層は、高い屈折率の二次元格子材料より一層低い屈折率を有する材料を含むことができる。例えば、被覆層は、ガラス、エポキシ及びプラスチックを含むことができる。

20

【0301】

二次元格子は、線、四角形、円、楕円、三角形、台形、正弦波、卵形、長方形及び六角形よりなる群から選択する形状の反復パターンよりなっておりよい。形状の反復パターンは、直線的グリッド即ち平行線のグリッド、長方形グリッド、又は六角形のグリッドに配置することができる。二次元格子は、約0.01ミクロン～約1ミクロンの周期及び約0.01ミクロン～約1ミクロンの深さを有することができる。

【0302】

説明のために、マイクロアレイスライド、マイクロ滴定プレート又は他のデバイスの表面に埋められた熱量測定共鳴光学的バイオセンサーの表面で起きる生化学的相互作用は、センサー表面で、蛍光タグ又は熱量測定標識の利用なしで、直接検出して測定することができる。このセンサー表面は、平行化白色光で照らされた場合に、狭いバンドの波長(色)だけを反射するようにデザインされた光学的構造を含む。この狭い波長は、波長の「ピーク」として記載される。「ピーク波長値」(PWV)は、生物学的物質がセンサー表面付着し又は該表面から除去されたとき例えば結合が起きたようなときに変化する。かかる結合に誘導されたPWVの変化は、US 2003/0032039に開示された測定用機器を利用して測定することができる。

30

【0303】

一具体例において、この機器は、平行化白色光をセンサー構造に向けることによりバイオセンサー表面を照らす。照らされる光は、平行化光のスポットの形態をとってよい。或は、この光は、扇型の光線の形態で生成される。この機器は、照らされたバイオセンサー表面からの反射光を集める。この機器は、このバイオセンサー表面の多くの位置からの反射光を同時に集めることができる。この機器は、光を、バイオセンサー表面を横切る不連続な幾つかの位置に向ける複数の照明プローブを含むことができる。この機器は、バイオセンサーが埋め込まれたマイクロ滴定プレート内の離れた位置のピーク波長値(PWV)を、分光計を利用して測定する。或は、イメージング分光計を利用する。この分光計は、センサー表面のPWVイメージマップを生成することができる。一具体例において、この測定機器は、空間的に、PWVイメージを200ミクロン未満の解像度で分析する。

40

【0304】

一具体例において、サブ波長構造化面(SWS)を利用して、鋭い光学的共鳴反射を、特定の波長で造ることができ、これは、生物学的物質例えば特異的結合性物質又は結合パー

50

トナー又はこれら両者の相互作用を高感度で追跡するために利用することができる。熱量共鳴回折格子面は、特異的結合性物質(例えば、本発明の固定化捕捉剤)のための表面結合プラットフォームとして作用する。SWSは、薄いフィルムコーティングの効果を模倣することのできる非在来型の回折光学部品である。(Peng及びMorris,「Resonant scattering from two-dimensional gratings」、J.Opt.Soc.Am.A, Vol.13, No.5, p.993, 5月; Magnuss on及びWang,「New principle for optical filters」、Appl.Phys.Lett., 61, No.9, p.1022, 1992年8月; Peng及びMorris,「Experimental demonstration of resonant anomalies in diffraction from two-dimensional gratings」、Optics Letters, Vol.21, No.8, p.549, 1996年4月)。SWS構造は、表面起伏、二次元格子を含み、該格子においては、入射光の波長と比べて格子周期が小さく、それで反射及び伝達されるゼロ次以外の回折次数は伝搬できない。SWS表面狭帯域フィルターは、基材層と格子の溝を満たす被覆層との間に挟まれた二次元格子を含むことができる。適宜、被覆層は、利用されない。格子領域の有効屈折率が基材又は被覆層より大きい場合には、導波管が造られる。フィルターをこのようにデザインする場合には、入射光は、導波管領域に進む。二次元格子構造は、狭帯域の波長の光を選択的に導波管に結合する。この光は、短距離(10~100マイクロメートルのオーダー)だけ伝搬し、散乱を受け、そして前方及び後方へ伝搬するゼロ次の光と結合する。鋭敏なカップリング条件は、共鳴格子効果を反射した放射スペクトルに生成することができ、狭帯域の反射又は伝達波長(色)を生じる。この二次元格子の深さ及び周期は、共鳴格子効果の波長より小さい。

10

【0305】

20

この構造の反射又は伝達色は、分子例えば捕捉剤若しくはそれらのPET含有結合パートナー又はこれら両方を被覆層の上面又は二次元格子表面に添加することにより調節することができる。これらの添加された分子は、この構造を通る入射放射の光学距離を増し、そうして、最大の反射率又は透過率が生じる波長(色)を改変する。従って、一具体例において、バイオセンサーは、白色光で照らされたときに単一波長だけを反射するようにデザインされる。特異的な結合物質がこのバイオセンサーの表面に結合した場合には、反射した波長(色)は、格子に結合された光の光路の変化のためにシフトする。特異的結合物質のバイオセンサー表面への結合により、相補的結合パートナー分子を、如何なる種類の蛍光プローブ又は粒子標識も利用することなく検出することができる。この検出技術は、例えば、約0.1nmの厚みのタンパク質結合の変化を分析することができ、且つバイオセンサーの液体に浸した又は乾燥した表面により実施することができる。このPWV変化は、例えば通常の入射角で光ファイバプローブによる、例えばバイオセンサーの小さいスポットを照らす光源よりなる検出システムにより検出することができる。分光計は、反射光を、例えば、やはり通常の入射角の第二の光ファイバプローブによって集める。励起/検出システムとバイオセンサー表面との間の物理的接触が生じないので、空間結合プリズムは必要ない。それ故、このバイオセンサーは、一般に用いられるアッセイプラットフォーム(例えば、マイクロ滴定プレート及びマイクロアレイスライドを含む)に適合させることができる。分光計の読みは、数ミリ秒で行なうことができ、従って、バイオセンサーの表面で並行して起きる多数の分子の相互作用を効率的に測定すること及び反応速度論をリアルタイムでモニターすることができる。

30

40

【0306】

上記のバイオセンサーの様々な具体例、変形物は、US 2003/0032039(参考として、そっくりそのまま本明細書中に援用する)に見出すことができる。

【0307】

少なくとも一つの特異的捕捉剤を、二次元格子又は被覆層(存在する場合)上に固定化することができる。固定化は、上記の方法の何れかによって起こりうる。適当な捕捉剤は、例えば、核酸、ポリペプチド、抗原、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、一本鎖抗体(scFv)、F(ab)断片、F(ab')₂断片、Fv断片、小型有機分子であってよく、細胞、ウイルス又は細菌であってもよい。生物学的試料を、例えば、血液、血漿、血清、胃腸の分泌液、組織若しくは腫瘍のホモジェネート、滑液、大便、唾液、痰、囊胞液

50

、羊水、脳脊髄液、腹腔液、肺洗浄液、精液、リンパ液、涙又は前立腺液から得ること及び／又は導くことができる。好ましくは、少なくとも一つの特異的捕捉剤を、バイオセンサー上の別個の位置のマイクロアレイに配置する。捕捉剤のマイクロアレイは、少なくとも一種の特異的捕捉剤をバイオセンサー表面に含み、それで、バイオセンサー表面は、各々異なる捕捉剤又は異なる量の特異的捕捉剤を有する複数の別個の位置を含む。例えば、一つのアレイは、1、10、100、1,000、10,000、又は100,000の別個の位置を含むことができる。多数の別個の位置を有するバイオセンサー表面は、少なくとも一種の特異的捕捉剤が典型的にはx-y座標内に規則的なグリッドパターンで置かれているので、マイクロアレイと呼ばれる。しかしながら、マイクロアレイは、規則的な又は不規則なパターンで置かれた少なくとも一つの特異的捕捉剤を含むことができる。

10

【0308】

マイクロアレイスポットは、直径が約50ミクロンから約500ミクロンに及びうる。或は、マイクロアレイスポットは、直径が約150ミクロンから約200ミクロンに及びうる。少なくとも一種の特異的捕捉剤を、それらの特異的PET含有結合パートナーに結合させることができる。

【0309】

一つのバイオセンサーの具体例において、バイオセンサー上のマイクロアレイは、少なくとも一種の特異的捕捉剤の微小液滴を、例えば二次元格子又は被覆層表面上のx-y座標の位置に置くことにより造られる。バイオセンサーを、少なくとも一つのPET結合パートナーを含む試験試料にさらした場合、それらの結合パートナーは、優先的に、それらのPET結合パートナーに対する高い親和性を有する捕捉剤を含むマイクロアレイ上の別個の位置に結合する。これらの別個の位置の幾つかは、結合パートナーをそれらの表面に集めるが、他の位置は集めない。従って、特異的捕捉剤は、そのPET結合パートナーに特異的に結合するが、バイオセンサー表面に加えられた他のPET結合パートナーには実質的に結合しない。別の具体例においては、核酸マイクロアレイ(例えば、アプタマーアレイ)が与えられ、該マイクロアレイにおいては、アレイ内の各別個の位置が異なるアプタマー捕捉剤を含む。マイクロアレイスポットターを利用する特異的捕捉剤のバイオセンサーへの塗布により、1平方インチ当たり10,000の特異的結合物質の密度を得ることができる。光ファイバプローブの照明光線を単一マイクロアレイ位置に集中して送ることにより、バイオセンサーは、標識なしのマイクロアレイ読み出しシステムとして利用

20

30

【0310】

約0.1ng/ml未満の濃度のPET結合パートナーの検出のためには、バイオセンサーに結合した結合パートナーを増幅して、バイオセンサー表面の追加層に変換することができる。バイオセンサー上に付着した増大した量を、増大した光学距離の結果として検出することができる。一層大きい量のバイオセンサー表面への組込みにより、その表面上の結合パートナーの光学密度も増大し、従って、この追加量のない場合よりも一層大きい共鳴波長シフトを与える。この量の追加は、例えば、酵素的に、「サンドイッチ」アッセイにより又は該量(例えば、PETペプチドに特異的な第二の捕捉剤)を、適当に結合されたビーズ又は様々な大きさ及び組成のポリマーの形態で、バイオセンサー表面に直接塗布することによって達成することができる。これらの捕捉剤は、PET特異的であるので、異なる種類及び特異性の多数の捕捉剤を、一緒に、捕捉されたPETに加えることができる。この原理は、他の型の光学的バイオセンサーに利用されて、該量の増幅なしで達成される感度限界を超える1500倍の感度増大が示されている。例えば、Jenison等「Interference-based detection of nucleic acid targets on optically coated silicon」、Nature Biotechnology, 19:62-65, 2001を参照されたい。

40

【0311】

別の具体例において、バイオセンサーは、表面起伏容積回折構造(SRVDバイオセンサー)を包含する。SRVDバイオセンサーは、広帯域の光学波長で照らされたときに、主として特定の狭帯域の光学波長で反射する表面を有する。特異的捕捉剤及び／又はPET

50

T結合パターンをSRVDバイオセンサー上に固定化した場合、反射された光の波長は、シフトする。一次元的表面例えば薄膜干渉フィルター及びブラッグ反射体は、反射し又は透過した波長の狭帯域を広帯域励起源から選択することができる。しかしながら、追加の物質例えば特異的捕捉剤及び/又はPET結合パートナーのそれらの上面への付着は、共鳴波長ではなく、共鳴準位幅の変化だけを生じる。対照的に、SRVDバイオセンサーは、追加の物質例えば特異的捕捉剤及び/又は表面への結合パートナーにより反射波長を変える能力を有する。

【0312】

SRVDバイオセンサーは、第一及び第二の表面を有するシート材料を含む。このシート材料の第一の表面は、起伏容積回折構造を規定する。シート材料は、例えば、プラスチック、ガラス、半導体ウェハー、又は金属フィルムを含むことができる。起伏容積回折構造は、例えば、上記のような二次元格子、又は三次元の表面起伏容積回折格子であってよい。起伏容積回折構造の深さ及び周期は、バイオセンサーから反射される光の共鳴波長より小さい。三次元の表面起伏容積回折格子は、例えば、三次元の位相量子化した段丘面起伏パターンであってよく、その溝のパターンは、階段状ピラミッドに似ている。かかる格子を広帯域放射の光線で照らしたならば、光は、等しく間隔をあけた段丘から、周囲の媒質の屈折率と段間隔の積の2倍により与えられる波長で、可干渉的に反射される。所定波長の光は、半波長離れた段から、段数に反比例する帯域幅で、干渉的に屈折又は反射される。この反射又は屈折された色は、新しい波長が選択されるような誘電体層の付着によって、該コーティングの屈折率に依存して、制御することができる。

【0313】

階段状構造は、先ず、薄いフォトレジストフィルムを3つのレーザー光線に可干渉的にさらすことにより、前に記載されたように、フォトレジストで製造することができる。例えば、Cowen, 「The recording and large scale replication of crossed holographic grating arrays using multiple beam interferometry」 (International Conference on the Application, Theory, and Fabrication of Periodic Structures, Diffraction Gratings), 及び Moire Phenomena II, Lerner等、Proc.Soc.Photo-Opt.Instrum.Eng., 503, 120-129, 1984; Cowen, 「Holographic honeycomb microlens」 Opt.Eng.24,796-802(1985); Cowen及びSlafer, 「The recording and replication of holographic micropatterns for the ordering of photographic emulsion grains in film systems」 J Imaging Sci.31,100-107, 1987を参照されたい。フォトレジストに特徴的な非線形エッチングを利用して露出されたフィルムを現像して、三次元的起伏パターンを造る。このフォトレジスト構造を、次いで、標準的なエンボス手順を利用して複製する。例えば、薄い銀フィルムをフォトレジスト構造上に付着させて、導電層を形成することができ、該層上に薄いニッケルのフィルムを電気めっきすることができる。次いで、このニッケル「マスター」プレートを利用して、直接、ビニールなどのプラスチックフィルム(熱又は溶剤により軟化させてある)に浮彫り細工を施す。階段状ピラミッドに似た三次元相量子化段丘面浮き彫りパターンのデザイン及び加工を記述する理論が記載されている: 「Aztec surface-relief volume diffractive structure」 J.Opt.Soc.Am.A,7:1529(1990)。三次元相量子化段丘面浮き彫りパターンの例は、階段状ピラミッドに似たパターンであってよい。各逆ピラミッドは、直径約1ミクロンである。好ましくは、各逆ピラミッドは、直径約0.5~5ミクロンであってよい(例えば、約1ミクロンを含む)。これらのピラミッド構造は、直径150~200ミクロンの典型的なマイクロアレイスポットが数百の階段状ピラミッド構造を組み込むことができるように、最密であってよい。これらの浮き彫り容積回折構造は、約0.1~1ミクロンの周期及び約0.1~1ミクロンの深さを有する。

【0314】

少なくとも一種の上記の特異的な結合物質を、SRVDバイオセンサーの反射材上に固定化する。少なくとも一種の特異的な結合物質を、上記のように、反射材上に、マイクロアレイの別個の位置に配置することができる。

【0315】

S R V D バイオセンサーは、広帯域の光学波長で照らされた場合、主として第一の単一の光学波長で光を反射し、少なくとも一種の結合物質を反射面上に固定化した場合には、第二の単一の光学波長で光を反射する。この第二の光学波長での反射は、光学的干渉から生じる。S R V D バイオセンサーは又、少なくとも一種の特異的な捕捉剤をそれらのそれぞれの P E T 結合パートナーに結合させた場合には、光学的干渉のために、第三の単一の光学波長でも光を反射する。反射された色の読出しは、顕微鏡の対物レンズを個々のマイクロアレイスポットに焦点を合わせて、反射されたスペクトルを分光器若しくはイメージング分光計の補助により読むことによって逐次的に行なうことができ、又は、例えば、マイクロアレイの反射したイメージを高解像度のカラー C C D カメラを組み込んだイメージング分光計にかけることによって並行して行なうことができる。

10

【 0 3 1 6 】

S R V D バイオセンサーは、例えば、金属マスタープレートを製造して、浮き彫り容積回折構造を例えばビニールのようなプラスチック材料に刻印することによって製造することができる。刻印した後に、その表面を、例えば金、銀又はアルミニウムなどの薄い金属フィルムのブランケット付着により反射するようにする。写真平版技術、エッチング及びウェハー結合手順に依存する M E M S ベースのバイオセンサーと比較して、S R V D バイオセンサーの製造は、非常に安価である。

【 0 3 1 7 】

S W S 又は S R V D バイオセンサーの具体例は、内面を含むことができる。一つの好適具体例において、かかる内面は、液体を含有する容器の底面である。液体含有容器は、例えば、マイクロ滴定プレートのウェル、試験管、ペトリ皿、又はマイクロな液体のチャンネルであってよい。一具体例において、S W S 又は S R V D バイオセンサーは、マイクロ滴定プレートに組み込まれる。例えば、S W S バイオセンサー又は S R V D バイオセンサーは、マイクロ滴定プレートの底面に、これらの反応容器の壁を共鳴反射面上に、各反応「スポット」が別個の試験試料にさらされるように組み立てることによって組み込むことができる。それ故、各個別のマイクロ滴定プレートのウェルは、別々の反応容器として作用しうる。それ故、別々の化学反応が、隣接するウェル内で混合反応液なしで起き、化学的に別個の試験溶液を個別のウェルに適用することができる。

20

【 0 3 1 8 】

この技術は、多くの生体分子相互作用が並行的に測定される応用において、特に、分子標識が研究中の分子の機能を変化させ又は阻害する場合に有用である。タンパク質標的を用いる医薬化合物の高スループットスクリーニング、及びプロテオミクスのためのタンパク質 - タンパク質相互作用のマイクロアレイスクリーニングは、この発明の組成物及び方法により与えられる感度及びスループットを必要とする応用の例である。

30

【 0 3 1 9 】

表面プラズモン共鳴、共鳴鏡及び導波管バイオセンサーと異なり、記載した組成物及び方法は、数千の個別の結合反応がバイオセンサー表面で同時に起きることを可能にする。この技術は、多数の生体分子相互作用が並行的に(例えば、アレイ中で)測定される応用において、特に、分子標識が研究中の分子の機能を変化させ又は阻害する場合に有用である。これらのバイオセンサーは、特に、タンパク質標的を用いる医薬化合物ライブラリーの高スループットのスクリーニング、及びプロテオミクスのためのタンパク質 - タンパク質相互作用のマイクロアレイスクリーニングに適している。この発明のバイオセンサーは、例えば、プラスチックエンボス手順を利用して、大きい領域で製造することができ、従って、一般的な使い捨ての研究室用のアッセイプラットフォーム例えばマイクロ滴定プレート及びマイクロアレイスライドに安価に組み込むことができる。

40

【 0 3 2 0 】

他の類似のバイオセンサーも又、本発明において利用することができる。多くのバイオセンサーが、オリゴヌクレオチドを含む様々な生体分子複合体、抗体 - 抗原相互作用、ホルモン - レセプター相互作用、及び酵素 - 基質相互作用を検出するために開発されている。一般に、これらのバイオセンサーは、高度に特異的な認識用エレメントと分子的認識を

50

定量可能なシグナルに変換するトランスデューサーの2つの構成要素からなる。シグナル変換は、蛍光、干渉法(Jenison等「Interference-based detection of nucleic acid targets on optically coated silicon」、Nature Biotechnology, 19,p.62-65; Lin等「A porous silicon-based optical interferometric biosensor」Science, 278,p.840-843, 1997)及び重量法(A. Cunningham, Bioanalytical Sensors, John Wiley & Sons (1998))を含む多くの方法により達成されてきた。光学ベースの変換方法の中で、蛍光化合物による分析物の標識を必要としない直接的な方法が、相対的なアッセイの容易性及び小型分子と容易に標識されないタンパク質との相互作用を研究する能力のために興味深い。

【0321】

これらの直接的な光学的方法は、表面プラズモン共鳴(SPR)(Jordan及びCorn,「Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of Electrostatic Biopolymer Adsorption onto Chemically Modified Gold Surfaces」、Anal.Chem.,69:1449-1456(1997); プラズモン共鳴粒子(PRP)(Schultz等、Proc.Natl.Acad.Sci., 97:996-1001(2000); 格子カップラー(Morhard等「Immobilization of antibodies in micropatterns for cell detection by optical diffraction」、Sensors and Actuators B,70,p.232-242,2000); 楕円偏光法(Jin等「A biosensor concept based on imaging ellipsometry for visualization of biomolecular interactions」、Analytical Biochemistry, 232,p.62-72,1995)、エバネセント波装置(Huber等「Direct optical immunosensing (sensitivity and selectivity)」、Sensors and Actuators B,6,p.122-126,1992)、共鳴光散乱(Bao等、Anal.Chem.,74:1792-1797(2002)、及び反射率(Brecht及びGauglitz「Optical probes and transducers」、Biosensors and Bioelectronics, 10,p.923-936,1995)を包含する。表面プラズモン共鳴(SPR)の光学現象における変化は、生物学的分子の間のリアルタイムの反応の指標として利用できる。これらの検出方法の理論的に予想される検出限界は、測定されており、診断的に適当な濃度範囲まで実行可能であることが実験的に確認されている。

【0322】

表面プラズモン共鳴(SPR)は、成功裏に、様々な生化学的分析物の簡単で迅速且つ非標識のアッセイのための免疫センサー形式に組み込まれた。タンパク質、複雑な結合体、毒素、アレルゲン、薬物及び農薬を、検出エレメントとして高い感度及び選択性を有する自然抗体又は合成レセプターを利用して直接測定することができる。免疫センサーは、抗原-抗体反応をリアルタイムでモニターすることができる。広範囲の分子を、 $10^{-9} \sim 10^{-13}$ モル/Lの範囲の下限で検出することができる。幾つかの上首尾に商業的に開発されたSPR免疫センサーが利用可能であり、それらのウェブページには、技術情報が豊富である。Wayne等(Methods 22:77-91,2000)は、多くの最近のSPRベースの免疫アッセイにおける開発、金表面の官能化、分子認識の新しいレセプター及び感度増強のための進歩した技術を総説して強調している。

【0323】

光学現象表面プラズモン共鳴(SPR)の利用には、1902年のWoodによるその初期の発見(Phil.Mag.4(1902),p.396-402)以来、多大な発展が見られた。SPRは、簡単な、直接的検出技術であり、それを利用して、薄い金属フィルム表面の非常に近くで起きる屈折率()の変化をプローブ検出することができる(Otto Z. Phys.216(1968),p.398)。この検出機構は、全反射部位に生成されたエバネセント場の特性を利用している。この場合は、金属フィルム内に透過し、振幅がガラス金属界面から指数関数的に減少する。表面プラズモン(金属フィルムの上面に沿って振動し伝搬する)は、平面偏光エネルギーの幾らかをこのエバネセント場から吸収して、全反射光の強度 I_r を変化させる。 I_r の入射角(又は反射角)に対するプロットは、角度で測った強度プロフィルを生じ、鋭い伏角を示す。最小伏角の正確な位置(即ち、SPR角 θ_r)は、少数のダイオードからの I_r シグナルを最小に適合させる多項式アルゴリズムを利用して測定することができる。上部金属面への分子の結合は、表面媒質の n の変化を引き起こし、それは、 θ_r のシフトとして観察することができる。

【0324】

10

20

30

40

50

バイオセンサー目的のための S P R の潜在的な能力は、1982 ~ 1983 年に、Liedberg 等により理解され、彼らは、免疫グロブリン G (I g G) 抗体上塗層を金検出フィルムに吸着させて、その後の I g G の選択的結合及び検出を生じた (Nylander 等、Sens. Actuators 3 (1982), p.79-84 ; Lieberg 等、Sens. Actuators 4 (1983), p.229-304)。バイオセンサー技術としての S P R の原理は、以前に総説されている (Daniels 等、Sens. Actuators 15 (1988), p.11-18 ; VanderNoot 及び Lai, Spectroscopy 6 (1991), p.28-33 ; Lundstrom Biosens. Bioelectron, 9 (1994), p.725-736 ; Liedberg 等、Biosens. Bioelectron, 10 (1995) ; Morgan 等、Clin. Chem. 42 (1996), p.193-209 ; Tapuchi 等、S. Afr. J. Chem. 49 (1996), p.8-25)。S P R のバイオセンサーへの応用は、ウイルス粒子から性ホルモン結合性グロブリン及び梅毒に至る広範囲の分子について示された。最も重要なことは、S P R は、多用途性及び、生体分子の蛍光又は放射性標識を必要とせずに結合相互作用をモニターする能力において、他の型のバイオセンサーを超える固有の利点を有することである。このアプローチは又、濃度、速度論的定数、及び個々の生体分子の相互作用ステップの結合特異性のリアルタイムの測定における有望性をも示した。抗体 - 抗原相互作用、ペプチド / タンパク質 - タンパク質相互作用、D N A ハイブリダイゼーション条件、ポリマーの生体適合性研究、生体分子 - 細胞レセプター相互作用、及び D N A / レセプター - リガンド相互作用を、すべて分析することができる (Pathak 及び Savelkoul, Immunol. Today 18 (1997), p.464-467)。商業的には、S P R ベースの免疫アッセイの利用は、Biacore (スウェーデン、Uppsala 在) (Jonsson 等、Ann. Biol. Clin. 51 (1993), p.19-26)、Windsor Scientific (英国) (Windsor Scientific IBIS Biosensor の W W W U R L)、Quantech (ミネソタ) (Quantech の W W W U R L) 及び Texas Instruments (テキサス、Dallas 在) (Texas Instruments の W W W U R L) などの会社により促進されてきた。

10

20

【0325】

更に別の具体例において、W O 0 2 / 0 7 4 9 9 7 に記載のように、蛍光ポリマースーパークエンチングベースのバイオアッセイを利用して、未標識 P E T のその捕捉剤への結合を検出することができる。この具体例においては、標的 P E T ペプチド及び化学部分の両方に特異的な捕捉剤を利用する。この化学部分は、(a) 捕捉剤のための認識エレメント、(b) 蛍光特性を変えるエレメント、及び (c) この認識エレメントと特性を変えるエレメントを結合する繋留エレメントを含む。蛍光ポリマーを含む組成物と捕捉剤を、一つの支持体上の同じ場所に配置する。化学部分が捕捉剤に結合した場合には、その化学部分の特性を変えるエレメントは、蛍光ポリマーにより放射される蛍光を変える (消光する) だけ、蛍光ポリマーに十分に近い。分析物試料が導入された場合、この標的 P E T ペプチドは (存在するならば)、この捕捉剤に結合し、それにより、この化学部分をレセプターから退去させ、消光減少及び検出される蛍光の増加を生じる。標的の生物学的薬剤の存在を検出するためのアッセイも又、この出願で開示する。

30

【0326】

他の関連する具体例において、これらの捕捉剤と P E T との間の結合事象は、U S 2 0 0 3 / 0 0 0 8 4 1 4 A 1 に記載されたような水溶性の発光性量子ドットを利用することにより検出することができる。一具体例において、水溶性発光性半導体量子ドットは、コア、キャップ及び親水性結合基を含む。I I B - V I B、I I I B - V B 又は I V B - I V B 半導体の何れのコアでもこの関連で利用することができるが、このコアは、キャップとの組合せにおいて、発光性量子ドットを生じるようではなければならない。I I B - V I B 半導体は、周期律表の I E B 族に由来する少なくとも一つの元素及び V I B 族に由来する少なくとも一つの元素を含む化合物などである。好ましくは、このコアは、大きさが約 1 n m から約 1 0 n m に及ぶ I I B - V I B、I I I B - V B 又は I V B - I V B 半導体である。このコアは、一層好ましくは、I I B - V I B 半導体であり、大きさにおいて約 2 n m から約 5 n m に及ぶ。最も好ましくは、このコアは、C d S 又は C d S e である。このことに関して、C d S e は、特に大きさが約 4 . 2 n m のものは、コアとして特に好ましい。

40

【0327】

50

この「キャップ」は、コアの半導体とは異なる半導体であって、コアに結合し、それにより、コア上に表面層を形成する。このキャップは、所定の半導体コアとの組合せに際して、発光性量子ドットを生じるようであればならない。このキャップは、コアを、コアより高いバンドギャップを有することにより不動態化すべきである。これに関して、キャップは、好ましくは、高いバンドギャップのⅢⅤ-ⅡⅥ半導体である。一層好ましくは、キャップは、ZnS又はCdSである。最も好ましくは、キャップは、ZnSである。コアがCdSe又はCdSである場合には、キャップは、好ましくは、ZnSであり、コアがCdSeである場合には、キャップは、好ましくは、CdSである。

【0328】

「結合基」は、ここで用いる場合、任意の安定な物理的又は化学的結合によって発光性半導体量子ドットのキャップの表面に結合することができ、量子ドットをもはや発光性にすることなく水溶性にすることのできる任意の有機基を指す。従って、この結合基は、親水性部分を含む。好ましくは、この結合基は、親水性量子ドットを少なくとも約1時間、1日、1週間又は1ヶ月にわたって溶液中に維持することを可能にする。望ましくは、結合基は、共有結合によりキャップに結合され、親水性部分が露出されるような仕方でキャップに結合される。好ましくは、親水性結合基は、硫黄原子を介して量子ドットに結合される。一層好ましくは、親水性結合基は、硫黄原子及び少なくとも1つの親水性結合基を含む有機基である。適当な親水性結合基には、例えば、カルボン酸若しくはその塩、スルホン酸若しくはその塩、スルファミン酸若しくはその塩、アミノ置換基、第四アンモニウム塩、及びヒドロキシが含まれる。本発明の親水性結合基の有機基は、好ましくは、C1 ~ C6アルキル基又はアリール基、一層好ましくは、C1 ~ C6アルキル基、尚一層好ましくは、C1 ~ C3アルキル基である。それ故、好適具体例において、本発明の結合基は、チオールカルボン酸又はチオールアルコールである。一層好ましくは、この結合基は、チオールカルボン酸である。最も好ましくは、この結合基は、メルカプト酢酸である。

【0329】

従って、水溶性発光性半導体量子ドットの好適具体例は、約4.2 nmの大きさのCdSeコア、ZnSキャップ及び結合基を含むものである。水溶性発光性半導体量子ドットの他の好適具体例は、CdSeコア、ZnSキャップ及び結合基メルカプト酢酸を含むものである。特に好適な水溶性発光性半導体量子ドットは、約4.2 nmのCdSeコア、約1 nmのZnSキャップ及びメルカプト酢酸結合基を含む。

【0330】

本発明の捕捉剤は、親水性結合基を介して量子ドットに結合できる。この捕捉剤は、任意の安定な物理的又は化学的結合などにより、水溶性発光性量子ドットの親水性結合基に、直接又は間接的に、任意の適当な手段によって、少なくとも1つの共有結合によって、捕捉剤又は量子ドットの機能を害しない随意のリンカーを介して結合することができる。例えば、結合基がメルカプト酢酸であって、核酸生体分子がこの結合基に結合するならば、リンカーは、好ましくは、第一アミン、チオール、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、ビオチンなどの分子である。結合基がメルカプト酢酸であって、タンパク質生体分子又はその断片がこの結合基に結合するならば、リンカーは、好ましくは、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、ビオチンなどの分子である。

【0331】

量子ドット捕捉剤結合体の利用により、PET含有試料は、上記のように結合体と接触した場合、発光の放射を促進する(結合体の捕捉剤がPETペプチドに特異的に結合する場合)。これは、捕捉剤が核酸アプタマー又は抗体である場合、特に有用である。アプタマーを利用する場合、蛍光クエンチャーを、自己対合ステムループ構造を介して量子ドットに隣接して位置させることができる(アプタマーがPET含有配列に結合しない場合)別の具体例を採用することができる。アプタマーがPETに結合する場合、ステムループ構造は、開き、そうして、クエンチング効果を和らげて、発光を生じる。

【0332】

他の関連する具体例において、US 2002/0117659 A1に記載されたような

ナノワイヤー又はナノチューブを含むナノセンサーのアレイを利用して、P E T - 捕捉剤相互作用の検出及び/又は定量を行なうことができる。簡単にいえば、「ナノワイヤー」は、1ナノメートルほどの薄い断面寸法を有することのできる伸長されたナノスケールの半導体である。同様に、「ナノチューブ」は、中空のコアを有するナノワイヤーであり、当業者に公知のナノチューブが含まれる。「ワイヤー」は、少なくとも半導体又は金属の伝導性を有する任意の材料を指す。これらのナノワイヤー/ナノチューブは、ナノワイヤーがさらされた試料中の分析物(例えば、P E T ペプチド)を測定するために構築されて配置されたシステムにおいて利用することができる。ナノワイヤーの表面は、捕捉剤で被覆することにより官能化されている。分析物の官能化ナノワイヤーへの結合は、ナノワイヤーの導電性又は光学特性の検出可能な変化を引き起こす。従って、分析物の存在を、ナノワイヤーの特性典型的には電気的特性又は光学特性の変化を測定することにより測定することができる。アミノ酸、タンパク質、糖、D N A、抗体、抗原及び酵素などを含む様々な生体分子実在物を被覆に利用することができるが、これらに限られない。ナノワイヤーの構築、様々な生体分子(例えば、本発明の捕捉剤)による官能化、及びナノワイヤー装置での検出などについて、一層詳細には、U S 2 0 0 2 / 0 1 1 7 6 5 9 A 1 (参考として援用する)を参照されたい。各々異なる捕捉剤を官能化原子団として有する多数のナノワイヤーを並行的に利用することができるので、この技術は、生物学的試料中のP E T 含有粒子の、P E T ペプチドの標識を必要としない、大規模なアレイ化検出に理想的に適している。このナノワイヤー検出技術は、p H 変化(H^+ 結合)、ピオチン - ストレプトアビジン結合、抗体 - 抗原結合、金属(Ca^{2+})結合を、ピコモルの感度で、リアルタイムで検出するために、上首尾に利用されてきた(Cui等、Science 293:1289-1292)。

10

20

【0333】

マトリクス補助レーザー脱着/イオン化飛行時間質量分析(M A L D I - T O F M S)は、レーザーパルスを利用して、タンパク質を表面から脱着し、その後、質量分析を行なって、それらのタンパク質の分子量を同定する(Gilligan等、Mass spectrometry after capture and small-volume elution of analyte from a surface plasmon resonance biosensor. Anal.Chem.74(2002),p.2041-2047)。この方法は、タンパク質の質量だけを界面で測定するので、及び脱着プロトコルが断片化を生じないだけ十分に穏やかであるので、M A L D I は、結合したP E T ペプチドの正体、又はP E T ペプチドの任意の酵素的改変を確認するような直接的で有用な情報を与えることができる。この問題に関しては、M A L D I を利用して、固定化捕捉剤に結合したタンパク質を同定することができる。結合したタンパク質を同定するのに重要な技術は、アレイ(及び該アレイに選択的に結合したタンパク質)をプロテアーゼで処理してから、その結果生成したペプチドを分析して、配列データを得ることに依存している。

30

【0334】

I V . 試料及びそれらの調製

これらの捕捉剤又は捕捉剤のアレイを、典型的には、試料例えば生物学的液体、水試料又は食料試料(ペプチドの集合を生成するように断片化してある)と、関心あるタンパク質に対応するP E T との結合に適した条件下で接触させる。

【0335】

本発明の捕捉剤を利用してアッセイすべき試料は、様々な生理学的起源、環境的起源又は人工的起源から引き出すことができる。特に、生理学的試料例えば患者又は生物の体液又は組織試料を、アッセイ試料として利用することができる。かかる液体には、唾液、粘液、汗、全血液、血清、尿、羊水、性器液、糞便、骨髄、血漿、脊髄液、囲心腔液、胃液、腹腔液、腹膜液、胸膜液及び他の身体部分からの抽出物、及び他の腺からの分泌物が含まれるが、これらに限られない。或は、患者から採取された細胞から引き出し又は培養で増殖させた生物学的試料を利用することができる。かかる試料には、上清、全細胞溶解物、又は細胞材料の溶解及び分画から得られた細胞画分が含まれる。細胞及びその画分(生物学的実在物から直接のもの及び人工的環境で成長させたものを含む)の抽出物も又、利用することができる。加えて、生物学的試料は例えば血液、血漿、血清、胃腸分泌液、組

40

50

組織若しくは腫瘍のホモジェネート、滑液、糞便、唾液、痰、囊胞液、羊水、脳脊髄液、腹腔液、肺洗浄液、精液、リンパ液、涙又は前立腺液から得ることができ且つ／又は引き出すことができる。

【0336】

本発明の方法における利用の前の試料調製の一般的計画は、図6(D2のスライド45)に記載してある。簡単にいえば、試料を、抽出及び／又は希釈して試料中に存在するある種の物質による干渉を最小にすることにより調製することができる。次いで、この試料を化学的に還元し、変性させ、アルキル化し、又は熱変性にかけることができる。変性工程にかかわらず、変性した試料を、次いで、その後のアッセイで用いる前に、プロテアーゼ例えばトリプシンにより消化する。もし化学的変性を利用するのであれば、脱塩工程をプロテアーゼ消化の直後に加えることができる。この工程は、一般に、単純で、丈夫で且つ再現性があり、血清、細胞溶解物及び組織を含む主な試料型に一般に適用可能である。

10

【0337】

試料は、無関係の物質を除去するために前処理し、安定化させ、緩衝処理し、保存し、濾過し、或は、条件付けすることができる(所望し又は必要であるならば)。試料中のタンパク質は、典型的には、この発明の方法の部分として又はこれらの方法の実施に先立って断片化される。断片化は、任意の当分野で認められた所望の方法を利用して例えば化学的開裂(例えば、シアノゲンプロミド)；酵素的手段(例えば、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、パパイン、カルボキシペプチダーゼ、カルパイン、ズプチリシン、gluc-C, endo-lys-C及びプロテイナーゼKなどのプロテアーゼの利用、又はこれらの集合又は下位集合)；又は物理的手段(例えば、物理的剪断による断片化又は超音波処理による断片化)を利用して行なうことができる。ここで用いる場合、用語「断片化」、「開裂」、「タンパク質分解性開裂」、「タンパク質分解」、「制限」などは、交換可能に用い、タンパク質中の化学結合典型的にはペプチド結合を切断してペプチド(即ち、タンパク質の断片)の集合を生成することを指す。

20

【0338】

この断片化の目的は、可溶性であって捕捉剤との結合に利用できるPETを含むペプチドを生成することである。本質において、試料調製物は、試料中に存在しうる関連タンパク質の上又は内部に存在するすべてのPETが捕捉剤との反応に利用できる程度を保証するようにデザインされる。この戦略は、タンパク質チップをデザインするための以前の試みで遭遇した、タンパク質-タンパク質複合体形成、翻訳後修飾などにより引き起こされる多くの問題を回避することができる。

30

【0339】

一具体例において、関心ある試料を、予め決めたプロトコールを利用して処理する。該プロトコールは、(A)標的タンパク質-タンパク質非共有結合若しくは共有結合性複合体形成若しくは凝集、標的タンパク質分解若しくは変性、標的タンパク質の翻訳後修飾、又は標的タンパク質の三次構造に環境的に誘導された変化により引き起こされる標的タンパク質のマスキングを阻止し、そして(B)標的タンパク質を断片化し、それにより、少なくとも一つのペプチドエピトープ(即ち、PET)を生成し、その濃度は、試料中の標的タンパク質の真の濃度に直接比例する。この試料処理プロトコールは、所定の捕捉剤との反応に利用できるPETを再現可能に生成するようにデザインされて、経験的に試験される。この処理は、タンパク質分離；タンパク質分画；溶媒の改変例えば極性の変化、浸透圧変化、希釈又はpH変化；加熱；凍結；沈殿；抽出；試薬例えばエンド、エキソ又は部位特異的プロテアーゼとの反応；非タンパク質分解性消化；酸化；還元；幾つかの生物学的活性の中和、及び当業者に公知の他のステップを含むことができる。

40

【0340】

例えば、試料を、ジスルフィド/ジチオール交換によりダイマー又は他の凝集体の形成を阻止するためにアルキル化剤及び還元剤で処理することができる。PET含有ペプチドの試料を処理して、リン酸化、メチル化、グリコシル化、アセチル化、プレニル化を含む(これらに限られない)二次的修飾を、例えば、それぞれの修飾に特異的な酵素例えばホス

50

ファターゼなどを利用して除去することもできる。

【0341】

一具体例において、試料のタンパク質は、変性、還元及び／又はアルキル化されるが、タンパク質分解的に開裂されない。タンパク質は、熱変性又は有機溶媒によって変性させてから、直接検出にかけ又は適宜更なるタンパク質分解性開裂を行なうことができる。

【0342】

溶液中での酵素消化前のタンパク質の熱変性の利用(50～90℃で約20分間)は、後続の分析の前に行なうことが好ましいか又は必要とされうる精製／濃縮を必要としないので、化学的変性(例えば、6～8M グアニジンHCl又は尿素)を超えて好適である。Park及びRussellは、タンパク質分解に耐性のタンパク質の酵素消化が、熱変性により有意に増進されることを報告した(Anal.Chem., 72(11): 2667-2670, 2000)。タンパク質分解に感受性のネイティブなタンパク質は、熱変性後に、同様の又は僅かに低い消化収率を示す。消化に耐性のタンパク質は、熱変性後に、タンパク質の大きさに無関係に、一層消化を受け易くなる。例えば、消化断片に由来するアミノ酸配列範囲は、ミオグロビンで15%から86%に、オバルブミンで0%から43%に増大する。これは、本発明による一層迅速で信頼できるタンパク質同定法(特に、プロテアーゼ耐性タンパク質に対する同定法)へと導く。

【0343】

たとえ幾つかのタンパク質が熱変性に際して凝集しても、それらのタンパク質凝集物は、トリプシンによって用意に消化されて、タンパク質の同定に十分な数の消化断片を生成する。事実、タンパク質凝集は、殆どの事例で熱変性が消化を促進する理由でありうる。タンパク質凝集は、タンパク質の変性形態のオリゴマー化の生成物であると考えられている(Copeland, R.A. Methods for Protein Analysis; Chapman & Hall: New York, NY, 1994)。一般に、タンパク質の疎水性部分は、そのタンパク質の内側に位置しており、比較的疎水性の乏しい部分が水性環境に露出している。熱変性中、無傷のタンパク質は、徐々に折り畳みが解けて変性したコンホメーションになり、ネイティブなコンホメーションに折り畳まるのを防ぐのに十分なエネルギーが与えられる。他の変性したタンパク質と相互作用する確率は、増大し、そうして、これらのタンパク質の露出した疎水性部分の間の疎水性相互作用を与える。加えて、変性したタンパク質のタンパク質凝集物は、一層多くの開裂部位が環境に露出しているので、変性してないタンパク質より一層プロテアーゼに不安定な構造を有しうる。タンパク質凝集物は、容易に消化され、それで、タンパク質凝集物は、トリプシン消化の3時間後には認められない(Park及びRussell, Anal. Chem., 72(11): 2667-2670, 2000)。その上、タンパク質凝集物のトリプシン消化は、一層特異的な開裂生成物を生成する。

【0344】

普通のプロテアーゼ例えばトリプシンは、変性後に用いることができる。この工程を、変性及び消化を一回行なった後に、一回以上反復することができる。或は、この熱変性工程は、好熱性のトリプシン様酵素を利用することにより、更に助成することができ、それで、変性及び消化を同時に行なうことができる。例えば、Nongporn Towatana等(J of Bio science and Bioengineering 87(5): 581-587, 1999)は、Bacillus sp. PS719(温泉土壌試料から単離された新規な好塩基性の好熱性細菌)の培養上清からのアルカリプロテアーゼの見かけの均一までの精製を報告した。このプロテアーゼは、アゾカゼインに対して、pH 9.0で75℃で最大活性を示した。この酵素は、pH 8.0～10.0の範囲で、Ca²⁺の非存在下で、最高80℃まで安定であった。この酵素は、N - p - トシル - L - リジノクロロメチルケトン(TLCK)に加えて、フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)及び3, 4 - ジクロロイソクマリン(DCI)が、その活性を完全に阻害したので、トリプシン様セリンプロテアーゼであるようである。試験した様々なオリゴペプチジル - p - ニトロアニリドのうちで、このプロテアーゼは、基質の切れ易い結合のカルボキシル側のアルギニン残基での開裂に優先性を示し、p - ニトロアニリドをN - カルボベンゾキシ(CBZ) - L - アルギニン - p - ニトロアニリドから、それぞれ、0.6mM及

び $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{mg タンパク質}^{-1}$ の K_m 及び V_{max} 値で遊離させる。

【0345】

或は、既存のプロテアーゼを、化学修飾して、この種の応用における利用のために、増進された熱安定性を達成することができる。Mozhaev等(Eur J Biochem. 173(1): 147-54, 1988)は、実験的に、以前に提示されたタンパク質分子の表面に位置する非極性クラスターの水との接触がタンパク質を不安定化させるという考えを確認した。タンパク質安定化は、タンパク質小球体の表面領域の化学的修飾による人為的な親水化により達成することができるということが示された。2つの実験系が、親水化アプローチの確認のために研究された。一方の実験において、トリプシンの表面チロシン残基が、2段階の修飾手順(テトラニトロメタンによるニトロ化及びその後の亜ジチオン酸ナトリウムによる還元)を利用して、アミノチロシンにトランスフォームされた。この修飾された酵素は、不可逆的な熱不活性化に対してずっと安定であった: この安定化効果は、トリプシン内のアミノチロシン残基の数と共に増大し、この修飾酵素は、ネイティブなものの100倍安定にさえなることができた。他方の実験において、アルファ-キモトリプシンを、芳香族カルボン酸の無水物又は塩化無水物での処理により、共有結合により修飾した。その結果、異なる数の更なるカルボキシル基(修飾試薬の構造によって最大5個)が、各修飾されたLys残基に導入された。ピロメリト酸及びメリト酸の環状無水物によるアルファキモトリプシンの利用可能なすべてのアミノ基のアシル化は、水性フィコール400/デキストラン70の二層系での分配により評価して、タンパク質のかかなりの親水化を生じた。これらの修飾酵素調製物は、高温(65~98)での不可逆的な熱不活性化に対して極めて安定であり; それらの熱安定性は、實際上、非常に好熱性の最近に由来するタンパク質分解酵素(今まで知られた最も安定なプロテイナーゼ)の安定性と同等のものであった。

【0346】

他の具体例において、試料を、還元剤例えばb-メルカプトエタノール又はDTTを用いて予備処理して、ジスルフィド結合を還元して、消化を容易にすることができる。

【0347】

分画は、任意の単一の又は多次元のクロマトグラフィー例えば逆相クロマトグラフィー(RPC)、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー又は親和性分画例えばイムノアフィニティー及び固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを利用して行なうことができる。好ましくは、この分画は、表面媒介による選択ストラテジーを含む。電気泳動(スラブゲル又はキャピラリー電気泳動)も又、試料中のペプチドを分画するために利用することができる。スラブゲル電気泳動法の例には、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)及びネイティブゲル電気泳動が含まれる。分画に利用することのできるキャピラリー電気泳動法には、キャピラリーゲル電気泳動(CGE)、キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)及びキャピラリーエレクトロクロマトグラフィー(CEC)、キャピラリー等電集束法、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー及びアフィニティークロマトグラフィー電気泳動が含まれる。

【0348】

タンパク質沈殿は、当分野で周知の技術を利用して行なうことができる。例えば、沈殿は、公知の沈殿剤例えばチオシアン酸カリウム、トリクロロ酢酸及び硫酸アンモニウムを利用して達成することができる。

【0349】

断片化に続いて、試料を、本発明の捕捉剤例えばここに記載の二次元支持体又はビーズ上に固定化された捕捉剤と接触させることができる。或は、断片化試料(ペプチドの集合を含む)を、例えば、大きさ、翻訳後修飾(例えば、グリコシル化又はリン酸化)又は抗原特性に基づいて分画し、その後、本発明の捕捉剤例えば二次元支持体又はビーズ上に固定化された捕捉剤と接触させる。

【0350】

図7は、血清試料の、熱変性又は化学的変性の何れかを利用する予備処理の図解例を与

えている。簡単にいえば、熱変性のためには、100 μ Lのヒト血清(約75 mg/mL全タンパク質)を先ず10倍希釈して約7.5 mg/mLにする。この希釈した試料を、次いで、90 に5分間加熱して、タンパク質を変性させ、その後、30分間トリプシン消化を55で行なう。このトリプシンは、消化後、80 で不活性化させる。

【0351】

化学的変性のためには、約4 mg/mLに希釈した約1.8 mLのヒト血清蛋白質を、50 mM HEPES緩衝液(pH 8.0)、8 M 尿素及び10 mM DTTの終濃度で変性させる。次いで、ヨードアセタミドを、終濃度25 mMまで加える。次いで、この変性した試料を、更に、プロテアーゼ消化のために約1 mg/mLまで希釈する。その消化した試料を、後続のアッセイで用いる前に、脱塩カラムを通過させる。

10

【0352】

図8は、血清タンパク質、細胞溶解物(MOLT4及びHeLa細胞)の、熱変性及び化学的変性の結果を示している。変性が、熱変性のレーン及び化学的変性のレーンの両方で全タンパク質ではなくても大部分について上首尾であったことは明らかであり、両方法は、タンパク質変性及び断片化に関して、匹敵する結果を達成した。

【0353】

上記の例は、単に説明の目的のものであり、制限するためのものではない。特定の用途に依るプロトコルの僅かの変更は、個々のアッセイにおける最適の結果のために容易に達成されう。

【0354】

20

V. PETの選択

本発明のPETの一つの利点は、PETが、イン・シリコで決定して、クローニング又はタンパク質の精製なしで、イン・ビトロで生成する(ペプチド合成などにより)ことができることである。PETは又、完全長のトリプシンにより生成した断片(更にいえば、任意の他の処理から予想された通りに生成する任意の他の断片)を超えて有利である。何故なら、完全長のトリプシンにより生成した断片は、その長さの故に、たとえトリプシンにより生成した断片自身がユニークであっても、一種以上のPETを含む傾向があるからである(一層長いペプチドストレッチであるほど、それがユニークであることはありそうなことである)。直接的意味は、完全長の(トリプシン)ペプチド断片よりも比較的短くてユニークなPETを利用することにより、本発明の方法は、同一のペプチド断片に対するユニークな特異性を有する多数の抗体(交差反応性抗体起源)を有する危険を完全に排除しなくても大いに軽減したことである。更なる利点を、PET選択方法例えばニアレスト・ネイバー分析及び優先順位付けのランク付け(下記参照)により加えることができ、これは、更に、交差反応の機会を排除する。これらのすべての特徴は、PETベースの方法を、特に、マルチプレックス技術を利用するゲノムワイズ分析に適したものとする。

30

【0355】

本発明のPETは、様々な方法で選択することができる。最も簡単な具体例において、所定の生物又は生物学的試料についてのPETを、関連データベースの力ずくの検索によって、所定の長さの理論的に可能なすべてのPETを利用して、発生させ又は同定することができる。この方法は、好ましくは、コンピューターにより、例えば、当分野で利用可能な配列検索ツール又はその変形物の何れかを利用して行う。例えば、5アミノ酸長のPET(可能なPETの候補の総数は、320万、後記の表2.2.2参照)を同定するために、320万の候補の各々を、問合せ配列として利用して、ヒトプロテオームに対する検索を後記のようにすることができる。1つより多くのヒットを有する如何なる候補(2以上のタンパク質において見出される)も、更なる検索を行なう前に直ちに排除する。検索の終わりに、1つ以上のPETを有するヒトタンパク質のリストが得られる(後記の実施例1参照)。同じ又は類似の手順を、任意の予め決めた生物又はデータベースに対して利用することができる。

40

【0356】

例えば、各ヒトタンパク質に対するPETを、次の手順を利用して同定することができ

50

る。ヒトタンパク質における限定された長さ N (アミノ酸) の 20^N により与えられるすべての可能なペプチドの発生を計算するためにパールプログラムが開発されている。例えば、全タグスペースは、4 量体ペプチドについて、 $160,000 (20^4)$ であり、5 量体ペプチドについて、 $3.2M (20^5)$ であり、6 量体ペプチドについて、 $64M (20^6)$ であり、以下同様である。予想されるヒトタンパク質配列は、 N アミノ酸のすべての可能なペプチドの存否について分析される。PET は、ヒトプロテオーム中に一度だけ出現するペプチド配列である。従って、特異的 PET の存在は、タンパク質配列の固有の特性であり、操作に依らない。このアプローチによって、決定的な PET のセットを規定することができ、試料の処理手順に依らずに利用できる (操作非依存性)。

【0357】

一具体例において、検索プロセスを早くするために、コンピュータアルゴリズムを開発し又は改変して、実際の検索を開始する前に、不必要な検索を排除することができる。

【0358】

上記の例を利用して、2つの高度に関連する (少数のアミノ酸の位置のみ異なる) ヒトタンパク質を整列させることができ、多数の候補の PET を、同一領域の配列に基づいて、排除することができる。例えば、20 アミノ酸の同一の配列の範囲があれば、5 アミノ酸の 16 の PET を、それらの 2 つの同一でないヒトタンパク質における同時の出現によって、検索なしで排除することができる。この排除プロセスは、できるだけ多くの高度に関連するタンパク質 (例えば、進化的に保存されたタンパク質例えばヒストン、グロビンなど) の対又はファミリーを利用して続けることができる。

【0359】

他の具体例においては、所定のタンパク質について同定された PET を、ある種の基準に基づいて順位付け、一層高いランクの PET を特異的捕捉剤の生成において用いるのが好ましいようにすることができる。

【0360】

例えば、ある PET は、自然にはタンパク質の表面に存在しえて、それ故、プロテアーゼにより消化した場合に可溶性であるので、よい候補となる。他方、ある PET は、タンパク質の内部又はコア領域に存在しえて、消化後でも容易に可溶性とならない。かかる溶解度特性は、利用可能なソフトウェアによって評価することができる。Boger, J., Emini, E. A. 及び Schmidt, A., Surface probability profile-An heuristic approach to the selection of synthetic peptide antigens, Report on the Sixth International Congress in Immunology (Toronto) 1986 p.250 に記載された溶媒接近可能性法も又、関心あるタンパク質の表面に位置している PET を同定するために利用することができる。パッケージ MOLMOL (Koradi, R. 等 (1996) J. Mol. Graph. 14:51-55) 及び Eisenhaber の ASC 法 (Eisenhaber 及び Argos (1993) J. Comput. Chem. 14:1272-1280; Eisenhaber 等 (1995) J. Comput. Chem. 16:273-284) も又、利用できる。表面 PET は、一般に、内部 PET よりも一層高いランキングを有している。一具体例においては、PET 又は PET を含有するタンパク質分解された断片について計算することができる $\log P$ 又は $\log D$ 値を、計算して、タンパク質試料が捕捉剤と接触する条件下での類似の溶解度に基づいて PET を順位付けるために利用することができる。

【0361】

方法にかかわらず、PET は、生成され、理想的 PET は、好ましくは、8 アミノ酸長であり、親のトリプシンペプチドは、20 アミノ酸長より短い。これは、抗体が、典型的に 4 ~ 8 アミノ酸のペプチドエピトープを認識し、それ故、12 ~ 20 アミノ酸のペプチドが慣用的に抗体生成のために用いられる訳である。

【0362】

トリプシンは、ある具体例においては好適な消化酵素であるので、これらの具体例における PET は、試料の調製中にトリプシンにより開裂されないように、配列の中間部に K 又は R を含むべきでない。一層一般的な意味において、選択した PET は、特に PET が消化後に破壊されるのが好ましい場合を除いて、消化後に破壊されることが予想される消

10

20

30

40

50

化部位を含むべきでなく又は該部位と重複すべきでない。

【0363】

加えて、理想的 P E T は、好ましくは、疎水性の親のトリプシンペプチドを有さず、高度に抗原性であり、最小数(好ましくは、0)の、ニアレスト・ネイバー分析により規定される密接に関係するペプチド(ニアレスト・ネイバーペプチド又は N N P)を有する。

【0364】

何れの P E T にも、注釈が付随してもよく、該注釈は、有用な情報例えばその P E T がある種のプロテアーゼ(例えばトリプシン)によって破壊されうるか、比較的硬い又は柔軟な構造を有する消化されたペプチド上に出現することがありそうかというような情報を含むことができる。これらの特性は、特に、所定のタンパク質に結合した多数の P E T がある場合に特異的捕捉剤を生成するならば、用途につき P E T を順位付けするのを助けることができる。P E T は、所定の生物における特定の用途に依って変化しうるので、順位は、特定の用法に依って変化しうる。あるプロテアーゼにより破壊される確立のために低ランキングでありうる P E T は、異なるプロテアーゼを利用する異なる断片化計画においては一層高くランクされうる。

10

【0365】

他の具体例において、抗体生成のためにタンパク質から最適の P E T を選択するためのコンピュータアルゴリズムは、抗体・ペプチド相互作用のデータを考慮する。Nearest-Neighbor Analysis (N N A)などのプロセスを利用して、各タンパク質について最もユニークな P E T を選択することができる。タンパク質中の各 P E T は、それが有する nearest neighbors の数に基づく相対的スコア(又は、P E T ユニークネス・インデックス)を与えられる。P E T ユニークネス・インデックスが高いほど、その P E T は、一層ユニークである。P E T ユニークネス・インデックスは、アミノ酸置換マトリクス例えば表 V I I I の Getzoff, ED, Tainer JA 及び Lerner RA The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. 1988. Advances. Immunol. 43:1-97 のものを利用して計算することができる。このマトリクスにおいて、各アミノ酸の残りの 19 アミノ酸による置換可能性が、単一変異の(ペプチド配列中の各アミノ酸を残りの 19 アミノ酸で置換した)多数のペプチドに対する抗体の交叉反応性についての実験データに基づいて計算された。例えば、タンパク質に由来する各 8 量体 P E T は、ヒトプロテオーム中に存在する 870 万の 8 量体と比較されて、P E T ユニークネス・インデックスが計算される。このプロセスは、特定のタンパク質について最もユニークな P E T を選択するだけでなく、この P E T についての Nearest Neighbor Peptide をも同定する。これは、Nearest Neighbor Peptide は、特定の抗体と交叉反応することが最もありそうなので、P E T 特異的抗体の交叉反応性の限定に重要になる。

20

30

【0366】

P E T ユニークネス・インデックスの他に、各 P E T について下記のパラメーターも又、計算することができて、P E T のランク付けを助ける：

a) P E T 溶解度インデックス：これは、P E T の L o g P 及び L o g D の計算を含む。

b) P E T 疎水性及び水接近容易性：親水性ペプチド及び良好な水接近容易性を有するペプチドが選択される。

40

c) P E T 長：一層長いペプチドは、溶液中でコンホメーションを有する傾向があり、我々は、8 アミノ酸の限定された長さの P E T ペプチドを利用する。P E T 特異的な抗体は、一層短いペプチド配列中のエピトープの限定された数のために、一層良好な限定された特異性を有する。これは、これらの抗体を利用する複合的アッセイには非常に重要である。一具体例においては、この方法により精製された抗体だけが、複合的アッセイに利用される。

d) 進化保存インデックス：各ヒト P E T は、P E T 配列が、種を超えて保存されているかどうかを示すために、他の種と比較される。理想的には、例えば、マウスとヒトの配列の間で、最小の保存を有する P E T が選択される。マウスにおける良好な免疫応答及び

50

モノクローナル抗体を生成する可能性を最大にする。

【0367】

V I . この発明の応用

A . 研究及び診断的応用

本発明の捕捉剤は、生きている系のプローブ検査及び診断応用における強力なツールを与える(例えば、臨床的、環境的及び産業的応用、並びに食品安全性の診断への応用)。臨床診断応用のために、これらの捕捉剤を、一種以上の診断標的(例えば、病気に関連するタンパク質、タンパク質の集合、又はタンパク質のパターン)に対応する一種以上のPETに結合するようにデザインする。特定の個々の病気に関連するタンパク質には、例えば、前立腺特異的抗原(PSA)、前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)又は前立腺特異的膜抗原(PSMA)(前立腺癌診断用); 乳癌診断のためのサイクリンE; アネキシン例えばアネキシンV(例えば癌、虚血又は移植の拒絶における細胞死の診断用); 又は - アミロイドブラーク(アルツハイマー病診断用)が含まれる。

10

【0368】

従って、本発明のPET及び捕捉剤は、代理マーカーの源として利用することができる。例えば、それらを、障害又は病気のマーカーとして、病気の前兆のマーカーとして、病気の素因のマーカーとして、薬物活性のマーカーとして、又はタンパク質発現の薬理ゲノム学的プロフィルのマーカーとして利用することができる。

【0369】

ここで用いる場合、「代理マーカー」は、病気若しくは障害の存否と、又は病気若しくは障害の進行(例えば、腫瘍の存否)と相関する目標の生化学的マーカーである。かかるマーカーの存在又は量は、病気の原因とは無関係である。それ故、これらのマーカーは、特定の治療コースが病気又は障害の軽減に有効であるかどうかを指示するのに役立つ。代理マーカーは、病気又は障害の存在又は程度を標準的な方法論によって評価することが困難な場合(例えば、初期ステージの腫瘍)、又は潜在的に危険な臨床的終点に達する前に病気の進行を評価することが望ましい場合に、特に有用である(例えば、心臓血管病の評価は、心臓血管病と関係するタンパク質に対応するPETを代理マーカーとして利用して行なうことができるし、HIV感染の分析を、HIVタンパク質に対応するPETを代理マーカーとして利用して、心筋梗塞又は完全に発生したAIDSの望ましくない臨床結果より十分前に行なうことができる)。当分野における代理マーカーの利用の例には、Koome

20

30

【0370】

おそらく、この発明の最も重要な利用は、それが、強力な新しいタンパク質発現の分析技術(特定のタンパク質の組合せの存在及び特定のタンパク質の組合せの発現レベルについての試料の分析)の実施を可能にすることである。これは、広く、分子生物学の研究において価値のあることであり、特に、新規なアッセイの開発において価値がある。故に、この発明は、試料中の、幾つかの病気、生理的状态又は種の正体に特徴的なタンパク質、タンパク質のグループ、及びタンパク質発現パターンを同定することを可能にする。かかるマルチパラメトリックアッセイプロトコールは、もし検出されるタンパク質が不連続な又は離れた経路に由来するものならば、特に、有益な情報を与えるものである。例えば、この発明を利用して、正常な患者と癌患者の組織、尿又は血中におけるタンパク質の発現パターンを比較することができ、特定の種類の癌の存在下で、第一のタンパク質の群が正常より一層高レベルで発現されて他の群が一層低レベルで発現されることを発見することができる。他の例として、プロテインチップを利用して、様々な細菌株におけるタンパク質発現レベルを概観し、種々の株を特徴付ける発現パターンを発見し、そしてどの株がどの抗生物質に感受性かを測定することができる。その上更に、この発明は、特定のタンパク質の特定のパターンを検出するためのアレイ又は他の捕捉剤の配置を含む専門的なアッセイ装置の製造を可能にする。従って、この発明の実施による例を続けるならば、患者由来の細胞溶解調製物又は体液にさらして、その患者が癌を有しないか又は特定の種類の癌

40

50

を患っているという情報を与える、発現の存否又はパターンを示すことのできるチップを製造することができる。或は、試料にさらされて読まれて、感染細菌の種及びそれを破壊する抗生物質を示すプロテインチップを製造することができる。

【0371】

接合PETは、一つのペプチドであって、それをコードするRNAのスプライス部位に対応するタンパク質領域をまたぐ当該ペプチドである。接合PETに結合するようにデザインされた捕捉剤は、染色体再配置例えば癌に関連する染色体再配置により生成されたスプライス変異体並びに遺伝子融合物を検出するための分析に含まれる。かかる再配置の検出は、病気例えば癌の診断へと導きうる。今や、スプライス変異体が一般的であり、RNAスプライシングを制御する機構が様々な生理的過程の制御機構として進化してきたことが明らかになりつつある。この発明は、かかる種によりコードされるタンパク質の発現、及びかかるタンパク質の存在と病気又は障害との相関関係の検出を可能にする。癌に関連する染色体再配置の例には、骨髄性白血病及び非リンパ性急性白血病に関連する遺伝子FUS - ERGの間の転座t(16;21)(p11;q22)(Ichikawa H.等 (1994) Cancer Res.54(11):2865-8参照); ユーイング肉腫及び神経上皮腫に関連する遺伝子ERG - EWSの間の転座t(21;22)(q22;q12)(Kaneko Y.等 (1997) Genes Chromosomes Cancer 18(3):228-31参照); bcl2遺伝子に関与し且つ濾胞性リンパ腫に関連する転座t(14;18)(q32;q21); 及び肺胞横紋筋肉腫に関連する第二染色体上のPAX3遺伝子のコード領域と第13染色体上のFKHR遺伝子とを並置させる転座(Barr F.G.等 (1996) Hum.Mol.Genet.5:15-21参照)が含まれる。

10

20

【0372】

環境及び産業的診断における応用のために、これらの捕捉剤は、それらが、生物戦用の薬剤(例えば、炭疽菌、天然痘、コレラ毒素)に対応する一種以上のPET及び/又は他の環境毒素(黄色ブドウ球菌α-トキシン、志賀毒素、1型細胞傷害性壊死因子、大腸菌熱安定性毒素、並びにボツリヌス及び破傷風神経毒)又はアレルゲンに対応する一種以上のPETに結合するようにデザインされる。これらの捕捉剤は又、細菌、プリオン、寄生虫などの感染性因子に対応する一種以上のPET又はウイルス(例えば、1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)、HIV-2、サル免疫不全ウイルス(SIV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、インフルエンザ、口蹄疫ウイルス、及びエボラウイルス)に対応するPETに結合するようにデザインすることもできる。

30

【0373】

下記の部分は、一つの特定の状況における、本発明の診断用途(血清バイオマーカーアッセイ)の一般的概念を説明するものである。

【0374】

ヒトの血漿中で見出されるタンパク質は、身体中で多くの重要な機能を行なっている。従って、これらのタンパク質の過剰又は過少発現は、直ちに病気を引き起こし又はその存在を示しうる。研究は、複雑な血清プロテオームパターンが、腎臓などの器官の根底にある病理学的状態を反映しうることを示している(Petricoin等、Lancet 359: 572-577, 2002)。それ故、血清試料の入手容易さ、及び血清が包括的にヒトの表現型(特定の時点における身体の状態)の見本になるという事実は、血清を、沢山の応用のための魅力的な選択肢とし、該応用には、臨床及び診断応用(病気の早期の検出及び診断、病気の進行の監視、治療の監視など)、発見的応用(新規なバイオマーカーの発見など)、及び薬物開発(薬物の効力と毒性、及び各個人用の医薬)が含まれる。事実、病気の指標としての血漿中のタンパク質を測定する免疫アッセイに、年間100万ドルより多くが消費されている(Plasma Proteome Institute (PPI), Washington, D.C.)。

40

【0375】

数十年の調査にもかかわらず、500程の血漿中で検出されるタンパク質のうちの、ひと握り(約20)のタンパク質が、日常的に診断目的で測定されているだけである。これらには、心臓発作の指標としての心臓タンパク質(トロポニン、ミオグロビン、クレアチンキナーゼ); 糖尿病の管理のためのインスリン; 薬物毒性の指標としての肝臓の酵素(アラ

50

ニン又はアスパラギン酸トランスアミナーゼ) ; 及び凝固異常の管理のための凝固因子が含まれる。血漿中の約 150 のタンパク質が、一般的でない病気の診断のために、幾つかの研究室で測定されている。

【0376】

加えて、血漿中のタンパク質は、少なくとも 100 万倍濃度が異なる。例えば、血清アルブミンは、 $35 \sim 50 \text{ mg/mL}$ ($35 \sim 50 \times 10^9 \text{ pg/mL}$) の正常濃度範囲を有し、重傷の肝臓病又は栄養不良の指示として臨床的に測定されているが、他方、インターロイキン 6 (IL - 6) は、 $0 \sim 5 \text{ pg/mL}$ の正常範囲を有し、炎症又は感染症の敏感な指標として測定されている。

【0377】

従って、すべての血清タンパク質の参照レベル、及び任意の条件下で血清タンパク質レベルを測定するための信頼できるアッセイに対する要求がある。しかしながら、異質な抗原に対する免疫アッセイの標準化は、約 10 年前には殆ど不可能であった (Ekins, Scand J Clin Lab Invest. 205:33-46, 1991)。主要な障害の一つは、同じ標準と分析物を有する見かけの必要性である。これは、少数の小さいペプチドでのみ必要となるだけである。一層大きいペプチド及びタンパク質では、これらの問題は、一層面倒になる傾向がある。何故なら、生物学的試料は、しばしば、分析物のプロ形態、スプライス変異体、断片、及び複合体を含むからである (Stenman, Clinical Chemistry 47:815-820, 2001)。一つのかかる問題は、血清 TGF - ベータレベルの測定によって例示されている。

【0378】

TGF - ベータサブファミリータンパク質は、傷の治癒、発生、発癌、及びアテローム性動脈硬化を含む生物学的機能の別種のアレイを有する構造的に関連する多機能タンパク質のコレクションである。少なくとも 3 つの公知の哺乳動物 TGF - ベータタンパク質 (ベータ 1、ベータ 2 及びベータ 3) があり、これらは、少なくともインビトロで類似の機能を有すると考えられている。これらの 3 つのイソ型の各々は、プレプロタンパク質として生成され、迅速に二量体化される。シグナル配列の喪失後に、糖部分が、潜在関連ペプチド即ち LAP として知られるプロタンパク質領域に付加される。加えて、タンパク質分解による LAP と成熟二量体 (機能的タンパク質) との間での開裂があるが、開裂された LAP は、依然成熟二量体と会合したままで、小さい潜在的複合体として知られた複合体を形成する。分泌前又は細胞外環境において、この小さい潜在的複合体は、多数の他のタンパク質に結合して、多数の一層高分子の潜在的複合体を形成することができる。これらのタンパク質のうちで最もよく特性決定されたものは、潜在的 TGF - ベータ結合性タンパク質ファミリー LTBP 1 - 4 及びフィブリリン - 1 及び - 2 である (図 9 参照)。一度細胞外環境に入れば、この TGF - ベータ複合体は、一層多くのタンパク質にさえ結合して他の複合体を形成することができる。公知の可溶性 TGF - ベータ結合性タンパク質は、デコリン、アルファ - フェトプロテイン (AFP)、ベータグリカン細胞外ドメイン、 - アミロイド前駆体、及びフェチュインを包含する。様々なイソ型、複合体、プロセッシング段階などを仮定すると、血清 TGF - ベータタンパク質レベルを正確に測定することは非常に困難であり、TBG - ベータの 100 倍異なる血清中のレベルが、異なるグループにより報告されている (Grainger など、Cytokine & Growth Factor Reviews 11: 133-145, 2000 参照)。

【0379】

他の問題が、免疫アッセイにおける抗動物抗体の偽陽性 / 偽陰性の効果から生じる。特に、血清試料中の特異的抗原についてのサンドイッチ型アッセイにおいては、所望の抗原を捕捉する代わりに、固定化した捕捉用抗体を血清試料中の抗動物抗体に結合することができ、これに更に標識した第 2 抗体を結合させることができ、偽陽性の結果が生じる。他方、多すぎる抗動物抗体は、捕捉用抗体と所望の抗原との間の相互作用、及び標識した第 2 抗体と所望の抗原との間の相互作用をブロックして、偽陰性へと導く。これは、Rotmensch 及び Cole (Lancet 355: 712-715, 2000) による最近の研究で示された重大な問題であり、該研究は、女性が、妊娠でないときの恒常的に陽性のヒト絨毛性ゴナドトロピン (h

10

20

30

40

50

C G)試験結果に基づいて、妊娠後絨毛癌を有すると診断された12例すべてにおいて、誤診がなされて、殆どの女性が、必要のない手術や化学療法にかけられたことを示している。かかる抗動物抗体と関連する診断上の問題は又、他書でも報告されている(Hennig等、The influence of naturally occurring heterophilic anti-immunoglobulin antibodies on direct measurement of serum proteins using sandwich ELISAs. Journal of Immunological Methods 235: 71-80, 2000; Covinsky等、An IgM Antibody to Escherichia coli Produces False-Positive Results in Multiple Immunometric Assay. Clinical Chemistry 46: 1157-1161, 2000)。

【0380】

これらのすべての問題は、本発明の方法によって効率的に解決することができる。血清試料を消化して、すべての形態の標的タンパク質を均一なPET含有ペプチドに変換することにより、本発明の方法は、試料の複雑さを大いに減少させる。抗動物抗体、タンパク質複合体、様々なイソ型は、もはや、消化した血清試料において、重要な因子であるとは予想されず、従って、一層信頼できる、再現性のある、正確なアッセイ結果を促進するとは予想されない。

【0381】

本発明の方法は、決して一つ特定の血清タンパク質例えばTGF-ベータに限られるものではない。それは、ペプチドホルモン、候補の病気のバイオマーカー(例えば、PSA、CA125、MMPなど)、血清の病気及び病気以外のバイオマーカー、及び急性期応答タンパク質を含む広範な血清タンパク質において広い応用を有している。例えば、下記の型の血清バイオマーカーの測定は、臨床及び診断用途で広い応用を有するであろう：1)病状マーカー(炎症、感染症などのためのマーカー)、及び2)薬物及びホルモンの効果(例えば、アルコール、アンドロゲン、抗癲癇薬、エストロゲン、妊娠、ホルモン置換療法など)を示すマーカーを含む病状以外のマーカー。測定することのできる典型的な血清タンパク質には、ApoA-I、アンドロゲン、AAT、AAG、A2M、Aib、Apo-B、ATIII、C3、Cp、C4、CRP、SAA、Hp、AGP、Fb、AP、FIB、FER、PAL、PSM、Tf、IgA、IgG、IgM、IgE、FN、B2M、及びRBPが含まれる。

【0382】

これらの血清タンパク質の一つの好適なアッセイ法は、PET特異的な捕捉剤及び結合の検出のための少なくとも一種の標識した第2捕捉剤を利用するサンドイッチアッセイである。これらのアッセイは、本願の教示に従って、アレイ形式で実施することができ、該形式においては、種々の捕捉剤(PET特異的な抗体など)を、単一(又は少数)のマイクロアレイ上に、多数の血清バイオマーカーの同時検出/定量に使用するために配列させることができる。

【0383】

血液研究財団(FBR, メイン、Scarborough在)は、血清タンパク質の、開業医及び研究者による日々の利用のための効用及び説明についての152頁のガイドを作成した。このガイドは、この主題についての世界の文献の粋を含み、完全な索引を付けてあり、所与の病状(第I部)並びに個々のタンパク質(第II部)により提示されている。この本は、一般に、試験結果の解釈並びにどの試験を命令するのが適当であるか(又は適当でないか)及び何故か(又は何故でないか)に関する指針を与えるのに有用である。第II部は、血清タンパク質についての一般的情報をカバーしているが、各タンパク質に関する背景情報に関しても助けとなりうる。その全内容を、参考として、本明細書中に援用する。

【0384】

B. 高スループットスクリーニング

この発明の捕捉剤を含む組成物例えばマイクロアレイ、ビーズ又はチップは、特定の捕捉剤と相互作用することができる化合物を同定し、又はPETとの結合について競合する分子を検出するための非常に多数の化合物の高スループットのスクリーニングを可能にする。マイクロアレイは、天然の又は合成の化合物の大きいライブラリーをスクリーニング

して、捕捉剤についての天然又は非天然リガンドの競合相手を同定するのに有用であり、それらは、診断、予知、治療又は科学的に興味深いものでありうる。

【0385】

本発明の捕捉剤を用いるマイクロアレイ技術の利用は、正常な及び病気の血清、細胞及び組織に由来する多数のタンパク質の包括的なプロファイリングを可能にする。

【0386】

例えば、一度マイクロアレイが形成されれば、それを、高スループットの薬物の発見に(例えば、化合物のライブラリーの、それらの、標的タンパク質に結合してその活性を調節する能力についてのスクリーニング);高スループットの標的的同定に(例えば、タンパク質と病気過程との相関関係);高スループットの標的確認に(例えば、タンパク質を例えば突然変異誘発により操作して、その操作のそのタンパク質又は他のタンパク質に対する効果をモニターする);又は基礎的研究(例えば、鍵となる発生若しくは細胞周期タイムポイントにおけるタンパク質発現パターンの研究又は様々な刺激に対する応答におけるタンパク質発現パターンの研究)に利用することができる。

10

【0387】

一具体例において、この発明は、関心あるリガンドの活性を調節する試験化合物例えば小型分子を同定する方法を提供する。この具体例によれば、捕捉剤は、リガンド及び試験化合物にさらされる。次いで、捕捉剤とリガンドとの間の結合の存否を検出して、試験化合物のリガンドに対する調節効果を測定する。好適具体例において、同じ細胞内の経路で作用するリガンドに結合する捕捉剤のマイクロアレイを利用して、試験化合物のこれらすべてのタンパク質に対する効果を、並行的様式でプロファイリングする。

20

【0388】

C. 薬物プロテオミクス

本発明の捕捉剤又は該捕捉剤を含むアレイは又、患者のタンパク質発現プロファイルとその患者の外来化合物又は薬物に対する応答の間の関係を研究するために利用することもできる。治療剤の代謝における差異は、投与量と薬理学的に活性な薬物との血中濃度の関係を変えることにより、重大な毒性又は治療の失敗へと導きうる。従って、これらの捕捉剤の前述の様式での利用は、薬理学的に活性な薬物を患者に投与すべきかの決定において、並びに投薬量及び/又はその薬物を用いる治療養生法をぴったりに調整することにおいて、内科医又は臨床医を助けうる。

30

【0389】

D. タンパク質プロファイリング

上記のように、本発明の捕捉剤は、任意の生物学的状態の特性決定をタンパク質プロファイリングによって可能にする。用語「タンパク質プロファイル」は、ここで用いる場合、所定の条件セットの下で所定の組織又は細胞について得られるタンパク質発現パターンを包含する。かかる条件には、細胞成長、アポトーシス、増殖、分化、トランスフォーメーション、腫瘍形成、転移、及び発癌物質への曝露が含まれるが、これらに限られない。

【0390】

本発明の捕捉剤は又、2つの細胞の又は異なる細胞集団のタンパク質発現パターンを比較するために利用することもできる。2つの細胞又は細胞集団のタンパク質発現を比較する方法は、特に、生物学的過程の理解に有用である。例えば、これらの方法を利用して、異なる条件にさらされた同じ細胞又は密接に関連する細胞のタンパク質発現パターンを比較することができる。最も典型的には、一細胞又は細胞集団のタンパク質の内容を、対照細胞又はその集団のタンパク質の内容と比較する。上記のように、これらの細胞又は細胞集団の一方は新生物であってよく、他方は、そうでない。他の具体例においては、2つのアッセイされる細胞又は細胞集団の一方は、病原体に感染してよい。或は、2つの細胞又は細胞集団の一方は、化学的、環境的又は熱的ストレスにさらされており、他方は、対照として働く。更なる具体例において、これらの細胞又は細胞集団の一方を薬物又は潜在的薬物にさらすことができ、そのタンパク質発現パターンを対照用細胞と比較することができる。

40

50

【0391】

かかる異なるタンパク質発現をアッセイする方法は、新しい潜在的薬物標的の同定及び確認並びに薬物スクリーニングに有用である。例えば、この発明の捕捉剤及び方法を利用して、腫瘍細胞で過剰発現されるが正常細胞では過剰発現されないタンパク質を同定することができる。このタンパク質は、薬物介入の標的たりうる。次いで、この過剰発現されるタンパク質の作用に対する阻害剤を開発することができる。或は、この過剰発現を阻止するためのアンチセンスストラテジーを開発することができる。他の例において、薬物又は潜在的薬物にさらされた細胞又は細胞集団のタンパク質発現パターンを、その薬物にさらされていない他の細胞又は細胞集団のそれと比較することができる。この比較は、この薬物が標的タンパク質に対して所望の効果(薬物効力)を有するかどうか及びこの細胞又は細胞集団の他のタンパク質も影響されるかどうか(薬物特異性)についての洞察を与える。

10

【0392】

E. タンパク質の配列決定、精製及び特性決定

本発明の捕捉剤は又、タンパク質配列決定に利用することもできる。簡単にいえば、ユニークな認識配列の公知の組合せと相互作用する捕捉剤が増す。その後、関心あるタンパク質を、ここに記載の方法を利用して断片化してペプチドの集合を生成してから、その試料をこれらの捕捉剤と相互作用させる。ペプチドの集合とこれらの捕捉剤との間の相互作用パターンに基づいて、ペプチドの集合のアミノ酸配列を解読することができる。好適具体例において、これらの捕捉剤は、アレイ上に、ペプチド-捕捉剤相互作用の容易な測定を与える予め決めた位置に固定化することができる。これらの配列決定方法は、更に、アミノ酸多型(例えば、関心あるタンパク質中の単一のアミノ酸多型又は突然変異)の同定をも可能にする。

20

【0393】

他の具体例において、本発明の捕捉剤は又、タンパク質精製に利用することもできる。この具体例において、PETは、リガンド/アフィニティータグとして作用して、タンパク質のアフィニティー精製を可能にする。タンパク質の表面上に露出したPETに対して高められた捕捉剤は、関心あるカラムに、当分野で公知の技術を利用して結合することができる。カラムの選択は、捕捉剤のアミノ酸配列に依存し、その末端は、マトリクスに結合される。例えば、捕捉剤のアミノ末端がマトリクスに結合するべきものであれば、アフィゲル(Biorad)などのマトリクスを利用することができる。システイン残基による結合が望ましいならば、エポキシ-セファロース-6Bカラム(Pharmacia)を利用することができる。次いで、関心あるタンパク質を含む試料を、このカラムを通して流し、関心あるタンパク質を、例えば、J. Nilsson等(1997)「Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins」, Protein Expression and Purification, 11:11-16(内容を参考として援用する)に記載されたような当分野で公知の技術を利用して溶出させることができる。この発明のこの具体例は又、研究すべきタンパク質への人工的なアフィニティータグの導入を必要とせずに、ネイティブな条件下でのタンパク質-タンパク質相互作用の特性決定をも可能にする。

30

【0394】

更に別の具体例において、本発明の捕捉剤は、タンパク質の特性決定に利用することができる。同じ遺伝子産物の択一的形態例えば異なる翻訳後修飾(例えば、同じタンパク質のリン酸化対非リン酸化バージョン又は同じタンパク質のグリコシル化対非グリコシル化バージョン)を有するタンパク質又は選択的スプライシングを受けた遺伝子産物を識別する捕捉剤を生成することができる。

40

【0395】

この発明の有用性は、診断に限られない。ここに記載したシステム及び方法は又、スクリーニングにも有用であり得、病気の結果を予測し、治療様式の示唆を病的細胞のプロファイリング、通常の病変の結果の予測及び病変の悪性形質転換に対する罹病性に基づいて与える。

【0396】

50

F. 翻訳後修飾の検出

主題のコンピュータで生成された P E T は、翻訳後修飾の適当な存否によって分析することもできる。100を超えるかかる異なるアミノ酸残基の修飾が知られており、例には、アシル化、アミド化、脱アミド化、プレニル化(例えば、ファルネシル化又はゲラニル化)、ホルミル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、メチル化、ミリストイル化、リン酸化、ユビキチン化、リボシル化及び硫酸化が含まれるが、これらに限られない。所定のアミノ酸配列における推定の翻訳後修飾を測定できる配列分析ソフトウェアには、真核生物のタンパク質におけるセリン、スレオニン及びチロシンリン酸化部位(<http://www.cbs.dtu.dk/services/Net-Phos/>から入手可能)、G P I 修飾部位予測(<http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/>から入手可能)についてのニューラルネットワーク予測を生成する N e t P h o s サーバー及び全タンパク質分析のための E x P A S y プロテオミクス サーバー(www.expasy.ch/tools/より入手可能)が含まれる。

10

【0397】

ある具体例において、好適 P E T 部分は、翻訳後修飾されたアミノ酸配列は、試料調製及び/又は捕捉剤との相互作用を複雑にするので、如何なる翻訳後修飾をも欠くものである。上記にもかかわらず、関心あるポリペプチドの生物学的活性を示すことのできる P E T の翻訳後修飾形態を識別することのできる捕捉剤を生成して、本発明において利用することができる。非常に一般的な例は、ポリペプチド中のセリン、スレオニン又はチロシンのアミノ酸側鎖の O H 基のリン酸化である。ポリペプチドに依って、この修飾は、その機能活性を増大又は減少させうる。一具体例において、主題の発明は、一種以上のタンパク質の様々な翻訳後修飾形態の識別力のある結合及び同定を与えるように、多彩にされた捕捉剤のアレイを提供する。好適な別の具体例において、主題の発明は、関心ある修飾とユニークに結合した一種以上の P E T に対する特異的結合を与えるように多彩である捕捉剤のアレイを提供し、該修飾自体は、それを特異的に認識する標識した第二抗体などの更なる薬剤(例えば、ホスホチロシン抗体)によって容易に検出及び/又は定量されうる。

20

【0398】

一般的意味において、この発明は、タンパク質の修飾を検出/定量するための一般的手段を提供する。「修飾」は、ここでは、一般的に、翻訳後修飾、選択的スプライシング、多型、挿入、欠失、点突然変異などを含むアミノ酸配列における任意の種類の非野生型の変化を指す。試料中に存在する潜在的標的タンパク質内の特異的修飾を検出/定量するために、標的タンパク質の配列を、先ず、分析して、潜在的修飾部位(例えば、特異的キナーゼのためのリン酸化部位)を同定する。次に、かかる修飾部位を含む標的タンパク質の潜在的断片を同定する。この断片は、選択した処理方法例えばトリプシン消化又は他のプロテアーゼによる消化又は信頼できる化学的断片化に特異的である。次いで、修飾部位含有断片内の(及び該断片にユニークな) P E T を、本発明の方法を利用して同定することができる。2つ以上の方法の組合せを利用する断片化も又、企図される。この断片のサイズの絶対的な予測精度は、望ましいが、該断片が所望の P E T 及び修飾部位を常に含有するならば、必要ではない。

30

【0399】

同定された P E T に特異的な抗体又は他の捕捉剤が得られる。この捕捉剤を、次いで、サンドイッチ E L I S A 形式で用いて、修飾を含む捕捉された断片を検出する(図22参照)。この P E T の部位は、翻訳後修飾部位に近い。従って、P E T への捕捉剤による結合は、この修飾残基に特異的な検出剤の結合に干渉しないであろう。

40

【0400】

この発明のこの面の少数の特別の具体例を、下記に一層詳細に記載する。説明目的のためにのみ、下記のこの発明の様々な具体例における捕捉剤は、P E T に特異的な抗体である。しかしながら、上記の任意の捕捉剤が下記の具体例の各々において利用できるということは理解されるべきである。

【0401】

(i) リン酸化

50

リン酸基のタンパク質への可逆的な付加は、真核細胞内のシグナル伝達に重要であり、その結果、タンパク質リン酸化及び脱リン酸化は、多くの多様な細胞内過程を制御する。試料中のリン酸化ペプチドの存在を検出及び/又はその量を定量するために、抗ホスホアミノ酸抗体を利用して、ホスホペプチドの存在を検出することができる。

【0402】

多くの市販のホスホチロシン特異的抗体があり、それらは、本発明において用いるために適合させることができる。単に説明のために、Abcam社(英国、Cambridge在)のホスホチロシン抗体(a b 2 2 8 7)[1 3 F 9]は、マウスI g G 1イソ型モノクローナル抗体であり、ホスホチロシンと特異的に反応して、E L I S A並びにホスホセリン及びホスホスレオニンを用いる競合E L I S Aによって最少の反応性を示す。この抗体は、遊離のホスホチロシン、チログロブリン又はB S Aなどのキャリアーと結合させたホスホチロシンと反応して、未刺激の及び刺激された細胞溶解物の両方のタンパク質中のホスホチロシンの存在を検出する。

10

【0403】

同様に、RESEARCH DIAGNOSTICS INC (ニュージャージー、Flanders在)は、幾つかの類似の抗ホスホチロシン抗体を提供している。それらの内で、R D I - P H O S T Y R a b m bは、マウスm I g G 2 bイソ型モノクローナル抗体であって、ホスホチロシン含有タンパク質と強く特異的に反応して、ホスホチロシンにより特異的にブロックされうる。ホスホスレオニン又はホスホセリンの何れとの反応も検出されない。この抗体は、広い種間交差反応性を有するようであり、ヒト、ニワトリ、カエル、ラット、マウス及びイヌ起源の様々なチロシンリン酸化タンパク質と反応性であるようである。

20

【0404】

RESEARCH DIAGNOSTICS INC は又、R D I - P H O S S E R a b rなどのホスホセリン特異的な抗体も提供しており、これは、ホスホセリン含有タンパク質に対して作成されたアフィニティー精製されたウサギ抗体である。この抗体は、セリンがリン酸化されたタンパク質と特異的に反応し、ウエスタンブロット分析によれば、他のホスホスレオニン又はホスホチロシンとの有意の交差反応性を示さない。この抗体は、製造業者の示唆に従ってE L I S Aに適している。この会社は又、マウスI g G 1モノクローナル抗ホスホセリン抗体R D I - P H O S S E a b mをも提供し、これは、リン酸化されたセリン(遊離のアミノ酸又はB S A若しくはK L Hなどのキャリアーに結合されたもの)と特異的に反応する。非リン酸化セリン、ホスホスレオニン、ホスホチロシン、A m p M P又はA T Pとの交差反応性は認められない。

30

【0405】

R D I - P H O S T H R a b rは、RESEARCH DIAGNOSTICS INCから提供されるアフィニティー単離されたウサギ抗ホスホスレオニン抗体(抗p T)である。抗原捕捉E L I S A及び抗体捕捉E L I S Aの両方とも、抗ホスホスレオニン抗体が、スレオニンリン酸化タンパク質、ホスホスレオニン及びリジン-ホスホスレオニン-グリシンランダムポリマーを認識することをそれぞれ示した。直接的、競合的抗原捕捉E L I S Aは、これらの抗体が、遊離のホスホスレオニン、ホスピチンにより特異的に阻害されるが、有利のホスホセリン、ホスホチロシン、スレオニン及びA T Pによつては阻害されないことを示した。この会社は又、マウスI g G 2 bモノクローナル抗ホスホスレオニン抗体R D I - P H O S T H a b mをも提供し、これは、リン酸化されたスレオニン(遊離のアミノ酸又はB S A若しくはK L Hなどのキャリアーと結合したもの)と特異的に反応する。非リン酸化スレオニン、ホスホセリン、ホスホチロシン、A m p M P又はA T Pとの交差反応性は認められない。

40

【0406】

Molecular Probe(オレゴン、Eugene在)は、小さい分子蛍光体ホスホセンサー(P r o - Q D i a m o n d d y eと呼ぶ)を開発したが、これは、マイクロアレイ上に提示されたペプチド及びタンパク質中のリン酸化されたアミノ酸残基の超高感度の包括的検出及び定量をすることができる。蛍光P r o - Q D i a m o n dホスホセンサー色素技術の有

50

用性は、リンタンパク質及びホスホペプチド並びに小型化マイクロアレイアッセイ形式で行なわれるプロテインキナーゼ反応を利用して示される(Martin,等、Proteomics 3:1244-1255, 2003)。検出のための蛍光又は酵素タグで標識されたホスホアミノ酸選択的抗体を適用する代わりに、小さい、蛍光プローブをリン酸化状態の汎用センサーとして用いる。様々な市販のタンパク質アレイ基材上のリン酸化の検出限界は、リン酸残基の数に依って、312~625fgであることが見出された。Pro-Q Diamond色素による固定化ペプチド標的の酵素的リン酸化の特性表示は、特異的ペプチド標識と非特異的ペプチド標識との間の区別を、ピコグラムからサブピコグラムレベルの検出感度で容易に与える。Martin等(前出)は又、適当なプロトコール、Pro-Q染色で、特にマイクロアレイ上のペプチドについて用いる器具をも詳細に記載している(その全内容を、参考として、
10
本明細書中に援用する)。

【0407】

タンパク質中の修飾アミノ酸の質量分析による同定などの他の方法を超えるこの方法の利点の一つは、本発明は、高価な器具に依存せず、それ故、小さい又は大きい研究室で、産業又は学術的環境で、同様に用いるために容易に適合させることができるずっと簡単な技術を提供することである。

【0408】

一具体例において、本発明を利用して、特異的キナーゼ又はキナーゼサブファミリーの潜在的基質を同定することができる。公知のプロテインキナーゼの数が常に加速するペースで増大するにつれて、細胞内でどのプロテインキナーゼがどの基質と相互作用するかを
20
決定することは、一層興味深いものとなってきた。

【0409】

公知の基質のアミノ酸配列のアラインメントにより共通のリン酸化部位のモチーフを決定することは、この仕事において有用であることがわかっている。これらのモチーフは、潜在的タンパク質基質中の特異的プロテインキナーゼのためのリン酸化部位を予想するのに役立つ。下記の表は、単に、様々なよく研究されたプロテインキナーゼのための特異性モチーフについての公知のデータの幾つかを、特定のタンパク質中の公知のリン酸化部位の例と共にまとめたものである(一層広範囲の一覧については、Pearson, R.B., 及び Kemp, B.E. (1991)(T.Hunter及びB.M.Sefton(編)、Methods in Enzymology Vol. 200, p. 62-81. San Diego: Academic Press中)を参照されたい(参考として援用する))。リン酸
30
セプターは、太字で示してあり、特定の残基で交換可能に機能しうるアミノ酸は、スラッシュ(/)により分離されており、認識に強く寄与するとは思われない残基は、「X」で示されている。幾つかのプロテインキナーゼ例えばCKI及びGSK-3は、ホスホアミノ酸残基を、それらの認識モチーフに含んでおり、「階層的」プロテインキナーゼと呼ばれてきた(総説としては、Roach, J.Biol.Chem. 266, 14139-14142, 1991を参照されたい)。それらは、しばしば、それら自身のリン酸化部位の近くの残基における他のキナーゼによる事前のリン酸化を必要とする。S(p)は、かかる先在するホスホセリン残基を表している。

【0410】

【表 3】

プロテインキナーゼ	認識モチーフ ^a	リン酸化部位 ^b	タンパク質基質 (参考文献)
cAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA、cAPK)	R-X-S/T ^c R-R/K-X-S/T	Y ₇ LRRASLAQLT F ₁ RRLSIST A ₂₉ GARRKASGPP	推定のキナーゼ(2) ホスホリラーゼキナーゼ、 α 鎖(2) ヒストンH1、ウシ(2)
カゼインキナーゼI (CKI、CK-1)	S(P)-X-X-S/T	R ₄ TLSP(V)SSLPGL D ₄₃ IGS(p)ES(p)TEDQ	グリコーゲンシンターゼ ウサギ筋肉(4) α _{s1} -カゼイン(4)
カゼインキナーゼII (CKII、CK-2)	S/T-X-X-E	A ₇₂ DSESEDEED L ₃₇ ESEEEGVPST E ₂₆ DNSEDEISNL	PKA調節サブユニット、R ₁₁ (2) p34 _{cdc2} 、ヒト(5) アセチルCoA カルボキシラーゼ(2)
グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 (GSK-3)	S-X-X-X-S(p)	S ₆₄₁ VPPSPSLSP(p) S ₆₄₁ VPPSP(p)PSLSP(p)	グリコーゲンシンターゼ ヒト(部位3b)(6、2) グリコーゲンシンターゼ ヒト(部位3a)(6、2)
Cdc2プロテインキナーゼ	S/T-P-X-R/K ^c	P ₁₃ AKTPVK H ₁₂₂ STPPKKRK	ヒストンH1、ウシ 胸腺(2) 大型T抗原(2)
カルモジュリン 依存性プロテインキナーゼII (CaMKII)	R-X-X-S/T R-X-X-S/T-V	N ₂ YLRRRLSDSN K ₁₉₁ MARFVSCLR	シナプシン(部位1)(2) カルシニューリン(2)
ミトゲン活性化 プロテインキナーゼ (細胞外シグナルにより制御されるキナーゼ)(MAPK、Erk)	P-X-S/T-P ^d X-X-S/T-P	P ₂₄₄ LSP P ₉₂ SSP V ₄₂₀ LSP	c-Jun(7) サイクリンB(7) E1k-1(7)
cGMP依存性 プロテインキナーゼ (cGPK)	R/K-X-S/T R/K-X-X-S/T	G ₂₆ KKRKRSRKES F ₁ RRLSIST	ヒストンH2B(2) ホスホリラーゼキナーゼ (α 鎖)(2)
ホスホリラーゼ キナーゼ(PHK)	K/R-X-X-S-V/I	D ₆ QEKRKQISVRG P ₁ LSRTLVSVS	ホスホリラーゼ(2) グリコーゲンシンターゼ (部位2)(2)
プロテインキナーゼ C(PKC)	S/T-X-K/R K/R-X-X-S/T K/R-X-S/T	H ₅₉₄ EGTHSTKR P ₁ LSRTLVSVS Q ₄ KRPSQRSKYL	フィブリノーゲン(2) グリコーゲンシンターゼ (部位2)(2) ミエリン塩基性タンパク質(2)
Ab1チロシン キナーゼ	I/V/L-Y-X-X- P/F ^e		
上皮成長因子 レセプターキナーゼ (EGFRK)	E/D-Y-X E/D-Y-I/L/V	R ₁₁₆₉ ENAEYLRVAP A ₇₆₇ EPDYGALYE	自己リン酸化(2) ホスホリパーゼC-g (2)

10

20

30

40

一文字アミノ酸コード：

A＝アラニン、C＝システイン、D＝アスパラギン酸、E＝グルタミン酸、F＝フェニルアラニン、G＝グリシン、H＝ヒスチジン、I＝イソロイシン、K＝リジン、L＝ロイシン、M＝メチオニン、N＝アスパラギン、P＝プロリン、Q＝グルタミン、R＝アルギニン、S＝セリン、T＝スレオニン、W＝トリプトファン、V＝バリン、Y＝チロシン、X＝任意のアミノ酸

＊認識モチーフは、注釈を付したものの以外は、Pearson及びKemp(前出)から採用。

リン酸化部位の配列及び特異性モチーフの包括的一覧については、Pearson及びKempを参照されたい。

^b 下付き数字は、所与のポリペプチド鎖内の最初の残基の位置を指している。

^c (1)から採用。

^d (7)から採用。

^e (8)から採用。A b lによる基質認識の検討については、参考文献(8)及び(9)を参照されたい。

10

【0411】

上記の表で用いられた参考文献：

- 1 . Kennelly, P.J. 及び Krebs, E.G. (1991) J.Biol.Chem. 266, 15555-15558.
- 2 . Pearson, R.B. 及び Kemp, B.E. (1991) (T.Hunter 及び B.M.Sefton(編)、Methods in Enzymology Vol. 200, p.62-81. San Diego: Academic Press中)
- 3 . Roach, P.J. (1991) J.Biol.Chem. 266, 14139-14142.
- 4 . Flotow, H. 等、(1990) J.Biol.Chem. 265, 14264-14269.
- 5 . Russo, G.L. 等、(1992) J.Biol.Chem. 267, 20317-20325.
- 6 . Fiol, C.J. 等、(1990) J.Biol.Chem. 265, 6061-6065.
- 7 . Davis, R.J. (1993) J.Biol.Chem. 268, 14553-14556.
- 8 . Songyang, Z. 等、(1995) Nature 373, 536-539.
- 9 . Geahlen, R.L. 及び Harrison, M.L. (1990) (B.E. Kemp(編)、Peptides and Protein Phosphorylation, (p.239-253). Boca Raton: CRC Press中)

20

【0412】

しかしながら、プロテインキナーゼの特異性の決定基は複雑な3次元の相互作用を含んでいるので、これらのモチーフ(ホスホアクセプター残基周辺の一次構造を記述する短いアミノ酸配列)は、重大な問題の単純化しすぎである。それらは、可能な二次及び三次構造エレメント、又は他のポリペプチド鎖若しくは同じ鎖内の離れた位置からの決定基を考慮していない。その上、特定の特異性モチーフ中に記載された残基のすべてが、キナーゼによる認識及びリン酸化の決定において同じ影響力を有しうる訳ではない。加えて、潜在的認識配列は、生理的条件下で、タンパク質複合体の四次構造の内側深くに埋められうるものであり、従って、イン・ビボでは決して接近することはできない。結論として、それらは、用心して利用すべきである。本発明は、全プロテオームに基づく、イン・ビボ(又は、イン・ビボ)で関心のあるキナーゼによって現実的にリン酸化されるすべての潜在的なキナーゼの基質の正体を決定するための速くて便利な方法を提供する。

30

40

【0413】

特に、キナーゼのコンセンサス認識配列(又は、キナーゼファミリーが共有する基質特異性)は、例えば、Pearson及びKemp又は他のキナーゼ基質モチーフデータベースに基づいて同定されうる。例えば、AKT(又はPKB)キナーゼは、コンセンサスリン酸化部位配列RXRXXS/Tを有する。潜在的認識配列を含む生物(例えば、ヒト)中のすべてのタンパク質は、日常的な配列検索によって容易に同定することができる。本発明の方法を利用して、認識モチーフと少なくとも一つのPETの両方を含むこれらの潜在的基質の断片を、予め決めた処理(例えば、トリプシン消化)の後に生成することができる。これらの同定されたPETの各々に対する抗体(又は他の捕捉剤)を高め、アレイ上にプリントして、いわゆる「キナーゼチップ」(この場合、AKTチップ)を生成することができる。このチ

50

チップを利用して、研究すべき任意の試料を上記のように処理してから、該チップとインキュベートし、それで、すべての潜在的認識部位を含む断片を捕捉することができる。任意所定の「スポット」(特定の潜在的基質)におけるリン酸化の存否を、例えば、標識した第二抗体によって検出/定量することができる(図10参照)。こうして、この条件下で、この生物中のすべてのAKT基質の正体を、一実験で同定することができる。このアレイは、アレイ上の結合したペプチドを溶離させることにより、他の試料については拒絶される。種々のアレイを、好ましくは同じ実験で、組み合わせて利用して、多数のキナーゼに対する基質を測定することができる。

【0414】

チロシン残基の可逆的リン酸化は、細胞シグナリング、分化、及び成長などの生物学的過程の調節にとって重要な機構であり、もし統制解除されれば、様々な種類の癌を生じうる。それ故、これらの動的な細胞過程の分子レベルでの理解は、同時に並びに経時的に、多くのタンパク質を横切るチロシンリン酸化部位における変化を評価する能力を必要とする。従って、他の具体例において、本発明は、試料に特定の処理をした後(例えば、特定の成長因子又はサイトカイン処理を試料細胞に加える前後)に活性化される様々なシグナル変換経路を同定する方法を提供する。同じ方法を利用して、患者に由来する病気の試料と同じ患者の正常試料中のシグナル変換経路の状態を比較することもできる。

【0415】

様々な生物に存在する様々なシグナル変換経路についての知識は、目覚ましいペースで蓄積されつつある。Science誌のS T K E (Signal Transduction Knowledge Environment)は、公知のシグナル変換経路、それらの重要成分、該成分間の関係(阻害、刺激など)、及び異なる経路のキーマンバー間のクロストークの包括的で膨張しつつある一覧を維持している。「Connections Map」は、動的な図解によるインターフェースを細胞シグナリングデータベースに与えており、これは、現在、少なくとも次の広範な経路をカバーしている：免疫経路(I L - 4、I L - 13、トークン様レセプター)；7回膜貫通レセプター経路(アドレナリン作動性、P A C 1レセプター、ジクチオステリウム・ジスコジウムc A M P化学走性、W n t / C a ²⁺ / 環状G M P、Gタンパク質依存性7回膜貫通レセプター)；概日リズム経路(マウス及びキイロショウジョウバエ)；インスリン経路；F A S経路；T N F経路；Gタンパク質共役レセプター経路；インテグリン経路；ミトゲン活性化タンパク質キナーゼ経路(M A P K、J N K、p 38)；エストロゲンレセプター経路；ホスホイノシトール3キナーゼ経路；トランスフォーミング成長因子(T G F -)経路；B細胞抗原レセプター経路；J a k - S T A T経路；S T A T 3経路；T細胞シグナル変換経路；1型インターフェロン(/)経路；ジャスモネート生化学経路；及びジャスモネートシグナリング経路。未だ含まれていない多くの他の周知のシグナル変換経路は、他の科学文献に詳細に記載されており、それらは、P u b M e d又は一般的な検索ツールで容易に同定することができる。これらのシグナル変換経路の全部ではないにせよ殆どの活性化は、一般に、各経路の一種以上のメンバーのリン酸化レベルの変化によって特徴付けられる。

【0416】

こうして、一般的意味において、試料中の任意所定数のシグナリング経路の状態は、これらの選択した経路の一種以上のキーマンバーのリン酸化状態の「スナップ写真」を撮ることにより測定することができる。例えば、ミトゲン活性化タンパク質(M A P)1キナーゼ経路は、真核細胞において進化的に保存されている。これらの経路は、胎児の発生及び免疫応答などの生理的過程に必須であり、細胞の生存、アポトーシス、増殖、分化、及び移動を制御している。哺乳動物においては、M A Pキナーゼ(M A P K)の3つの主要なクラスが同定されており、それらは、基質特異性及び調節において異なっている。これらのサブグループは、細胞外シグナルに調節されるキナーゼ(E R K)、c - J u n N末端キナーゼ(J N K)、及びp 38 / R K / C S B Pキナーゼを含む。E R Kは、成長因子、細胞接着、腫瘍促進性ホルボールエステル、及び発癌遺伝子を含む一定範囲の刺激により活性化されるが、他方、J N K及びp 38は、優先的に、前炎症性サイトカイン、及び様々

10

20

30

40

50

な環境ストレス例えばUV及び浸透ストレスによって活性化される。この理由のため、後者は、ストレス活性化プロテインキナーゼとして分類される。MAPKの活性化は、キナーゼサブドメインV I I I中に位置するThr - Xaa - Tyrモチーフ中のスレオニン及びチロシン残基に対する二重リン酸化により達成される。このリン酸化は、二重特異的プロテインキナーゼMAPKキナーゼ(MAPKK)により媒介され、MAPKKは、更に、セリン/スレオニンプロテインキナーゼのMAPKKキナーゼにより媒介されるリン酸化により活性化される。これらの活性化キナーゼ以外に、幾つかの種類のタンパク質リン酸化も又、MAPK又はそれらの上流のキナーゼを脱リン酸化することにより、MAPK経路を制御することが示されている。これらのタンパク質ホスファターゼには、チロシン特異的ホスファターゼ、セリン/スレオニン特異的ホスファターゼ、及び二重特異的ホスファターゼ(DSP)が含まれる。それ故、MAPKの活性は、上流の活性化キナーゼ及びタンパク質ホスファターゼにより制御されえて、その活性化状態は、例えば、ERK1/2、JNK、及びp38のリン酸化状態により測定することができる。

10

【0417】

特に、特徴的リン酸化部位及びPETを含むERK1/2、JNK及びp38の断片は、本発明の方法を利用して同定することができる。次いで、かかるリン酸化部位と関連したPETを特異的に認識する捕捉剤を高めて、アレイ/チップ上に固定化することができる。試料(処理済み又は未処理の、従って、高レベル又は低レベルのこれらの経路のマーカのリン酸化を有する)を消化して、活性化の存否、及び程度、タイムコース、活性化の持続期間などを測定するために、該チップとインキュベートすることができる。

20

【0418】

同様に、多くの他の関連する又は認められた無関係の経路を、同じチップ上に製造することができる(何故なら、各経路は、公知の経路成分のもっともなものからひょっとしたらすべてによって表されうるから)。この種のチップは、薬物処理後に活性化されうる様々な経路の包括的な展望を与えることができる。経路特異的なチップも又、関心ある経路内の個々の成分の状態を更に測定するために組合せて利用することができる。

【0419】

事実上すべての種類のシグナル変換経路におけるこれらのキナーゼの重要な機能の故に、多くの薬物が、直接又は間接に、カリエスキナーゼ基質のリン酸化状態に影響を与えるということを見ることは驚くことではない。従って、この種のアレイは又、薬物標的の同定において利用することもできる。簡単にいえば、種々の薬物候補により処理した試料を、同じ種類のアレイとインキュベートして、ある選択した標的の一連の活性化プロフィルを生成することができる。これらのプロフィルは、好ましくは自動的に、どの薬物候補がリード分子と同じ又は類似の活性化プロフィルを有するかを決定するために比較することができる。

30

【0420】

この種の実験は又、候補の薬物の選択性に関する有用な情報をも生じるであろう(何故なら、候補の薬物又は薬物類似体が、実際に様々な経路に対して異なる効果を有するか、もしそうであれば、その差異が有意であるかどうかは、容易に決定することができるから)。

40

【0421】

同種の実験は又、望ましくない副作用又は毒性を欠く薬物候補のスクリーニングに適合させることもできる。

【0422】

この種の応用の一面は、断片化のための特定のプロテアーゼの選択に関係する。下記の表は、ヒト「キノーム」(全キナーゼ)中の潜在的リン酸化部位のプロテアーゼ感受性の分析から生じたデータを提供するものである。この表は、幾つかの最も頻繁に用いられるプロテアーゼの中からのプロテアーゼの選択の助けとなりうる。

【0423】

【表 4】

酵素	全ペプチド断片	S/T/Yを有するペプチド断片	
		= < 10 a a	> 10 a a
キモトリプシン	34, 094	10930 (43%)	14985 (57%)
S. A. V-8E 特異的酵素	34, 233	6753 (32%)	14917 (68%)
プロリン後開裂酵素	29, 715	7077 (37%)	12224 (63%)
トリプシン	54, 260	15, 217 (53%)	13311 (47%)

【0424】

10

(i i) グリコシル化

広範な真核生物の膜結合性及び分泌性タンパク質は、グリコシル化され、即ち、それらは、共有結合された炭水化物を含んでおり、それ故、糖タンパク質と呼ばれる。加えて、ある種の細胞内真核タンパク質も又、糖タンパク質である。真核生物中のポリペプチドのグリコシル化は、主として、3通りの仕方で起きる(Parekh等、Trends Biotechnol. 7:117, 1989)。アスパラギン側鎖へのグリコシド結合によるグリコシル化は、Nグリコシル化として知られている。かかるアスパラギン残基は、A s n - X a a - S e r / T h r のアミノ酸トリプレット配列中に現れるだけである(ここに、X a a は、如何なるアミノ酸であってもよい)。糖タンパク質の炭水化物部分は又、グリカンとしても知られている。O - グリカンは、Oグリコシド結合により、セリン又はスレオニン側鎖に結合している。ヒトでは、284, 535種の8量体タグが、このNX(S/T)配列を含み、228, 256種の8量体PETが、該このNX(S/T)配列を含んでいる。後者は、ヒトにおける全8量体ペプチドタグの約2.6%である。これらのN-及びO-結合によるグリコシル化は、最も複雑な翻訳後修飾の2つである。該ポリペプチドは又、ホスファチジルイノシトール脂質アンカーにも、炭水化物「ブリッジ」を介して結合され、全アセンブリは、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーとして知られている。

20

【0425】

最近の数年間に、これらの炭水化物部分の機能的重要性が、ますます認められるようになった(Rademacher等、Ann. Rev. Biochem. 57: 785, 1988)。ポリペプチド鎖に共有結合された炭水化物は、その糖タンパク質に、多くの機能例えばタンパク質分解による分解に対する耐性、細胞間での情報の変換、及びリガンドレセプター相互作用による細胞間接着を与えることができる(Gesundheit等、J.Biol.Chem.262:5197,1987; Ashwell及びHarford, Ann.Rev.Biochem.51:531,1982; Podskalny等、J.Biol.Chem.261:14076,1986; Dennis等、Science 236:582,1987)。糖の形態は、一連の生化学的修飾の産物であるので、細胞内の動揺は、それらの構造に重大な影響を有しうる。炭水化物機能の理解の増加に伴って、炭水化物の検出及び分析のための迅速で、信頼できて且つ鋭敏な方法に対する要求が、相対的に増してきている。

30

【0426】

レクチンは、ある種の糖残基と特異的に且つ可逆的に相互作用するタンパク質である。それらの特異性は、多糖類及び糖タンパク質への結合を(赤血球と腫瘍細胞の凝集さえ)可能にする。このレクチンと特異的糖残基との間の結合反応は、抗体と抗原の間の相互作用と類似している。レクチンに結合した基質は、競合結合物質又はイオン強度勾配により溶解されうる。加えて、他の手順の中で、レクチンを、ビオチン又はジゴキシゲニンで標識して、その後、アビジン結合体化ペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼを結合した抗ジゴキシゲニン抗体によりそれぞれ検出することができる(Carlsson SR: Isolation and characterization of glycoproteins. (Glycobiology. A Practical Approach. Fukuda M 及び Kobata A (編)、Oxford University Press, Oxford, p 1-25, 1993中)、参考として、本明細書中に援用する)。

40

【0427】

例えば、コンカナバリンA(ConA)は、-D-マンノース、-D-グルコース及

50

び利用可能な C - 3、C - 4 又は C - 5 水酸基を有する立体的に関連する残基を含む分子と結合する。Con A と同様に、レンズマメレクチンは、 α - D - マンノース、 α - D - グルコース、及び立体的に関連する残基と結合するが、レンズマメレクチンは、グルコシル残基とマンノシル残基の区別が一層鋭くなく、単糖類に低親和性で結合する。アガロース麦芽レクチンは、N - アセチル - β - D - グルコサミニル残基に特異的に結合する。Psathyrella velutina レクチン (PVL) は、優先的に、N - アセチルグルコサミンペー タ 1 - > 2 Man 基と相互作用する。これらのすべてのレクチンは、様々な種類のグリコシル化ペプチド断片の存在を、これらの PET 結合したグリコシル化ペプチド断片が試料から捕捉剤により捕捉された後に検出するために利用することができる。

【0428】

10

Glyko, Inc. (Prozyme社、カリフォルニア、San Leandro在) の GlycoTrack キットは、グリコシル化を、高い増幅力の発色試薬の結合前に、特異的炭水化物酸化反応を利用することにより検出する。簡単にいえば、溶液中の又は既に支持体に固定した試料を、過ヨウ素酸を用いて酸化する。これは、アルデヒド基を生成し、これらは、自発的にある種のヒドラジドと室温で、水性条件下で反応することができる。過ヨウ素酸酸化後のピオチン - ヒドラジドの利用は、炭水化物へのピオチンの組込みへと導く(9)。このピオチン化合物は、ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ結合体との反応により検出される。その後、膜上の糖タンパク質に結合されたアルカリホスファターゼと反応する基質を利用して、着色沈殿を生じて、可視化が達成される。

【0429】

20

Molecular Probes(オレゴン、Eugene在)は、糖タンパク質の検出のための、商標付きの Pro-Q Emerald 300 蛍光糖タンパク質着色剤を提供している。この新規な Pro-Q Emerald 300 蛍光糖タンパク質着色剤は、糖タンパク質上で、過ヨウ素酸酸化された炭水化物基と反応して、明るい緑色の蛍光シグナルを発する。グリコシル化の性質及び程度に依って、この着色は、酸性フクシン染料を用いる標準的な過ヨウ素酸 - シッフ塩基法の 50 倍以上鋭敏でありうる。製造業者によれば、この Pro-Q Emerald 300 糖タンパク質着色剤を用いる検出は、ピオチンヒドラジドとストレプトアビジン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ及び ECL 検出 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いる糖タンパク質の検出より遥かに容易である。この着色は、典型的なグリコシル化タンパク質 50 ng を検出することができる。捕捉されたグリコシル化された PET 含有ペプチド断片は、典型的ペプチドよりずっと小さいので、低ナノグラムから高ピコグラムほどの僅かな捕捉されたペプチドを、この着色剤を利用して検出することができる。

30

【0430】

こうして、試料中の糖タンパク質の存在を検出して定量するために、全タンパク質又は潜在的グリコシル化部位 N X S / T を含むサブpopulationを同定することができ、特異的な予め決めた処理から生じたペプチド断片を分析して結合した PET を同定することができる。次いで、これらの PET に対する捕捉剤を高めることができる。上記のリン酸化検出に類似した方法において、グリコシル化を、様々な検出方法を利用して、検出 / 定量することができる。

【0431】

40

(iii) その他の翻訳後修飾

捕捉剤、例えば、他の翻訳後修飾された残基に特異的な抗体も又、容易に利用することができる。

【0432】

14 の異なる販売者から入手可能な少なくとも 46 の市販の抗ユビキチン抗体がある。例えば、Cell Signaling Technology (マサチューセッツ、Beverly在) は、マウス抗ユビキチンモノクローナル抗体、クローン P4D1 (IgG1 イソ型、カタログ No. 3936) を提供しており、これは、すべての種のユビキチン、ポリユビキチン及びユビキチン化ペプチドに特異的である。

【0433】

50

抗アセチル化アミノ酸抗体も又、市販されている。Upstate Biotechnology (ニューヨーク、Lake Placid在)から市販されている抗アセチル化ヒストンH3及びH4抗体(カタログ番号06-599及び06-598)を参照されたい。事実、Alpha Diagnostic International, Inc. (テキサス、San Antonio在)は、注文により合成する抗アセチル化アミノ酸抗体を提供している。

【0434】

アルギニンのメチル化(ほぼ30年前に発見されたタンパク質修飾)は、最近、幾つかの新規なアルギニンメチルトランスフェラーゼが同定され、多くのタンパク質がアルギニン残基上のメチル化により制御されることが見出されたので、再び関心を持たれている。Mowen及びDavidは、詳細なプロトコルを、Science誌のS T K E (www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2001/93/p11)に公開したが、これは、新規な市販の試薬の利用可能性により可能となったアルギニンメチル化タンパク質の直接的同定のための指針を提供している。特に、次の2つの抗メチル化アルギニン抗体が記載されている：メチルアルギニンに対するマウスモノクローナル抗体、クローン7E6(IgG1)(Abcam, 英国、Cambridge在)(データシート：www.abcam.com/public/ab_detail.cfm?intAbID=412)、これは、モノ及び非対称性ジメチル化アルギニン残基と反応する；及びメチルアルギニンに対するマウスモノクローナル抗体、クローン21C7(IgM)(Abcam)(データシート：www.abcam.com/public/ab_detail.cfm?intAbID=413)、これは、非対称性ジメチル化アルギニン残基と反応する。アルギニンメチル化のイン・ビトロ及びイン・ビボ分析のための詳細なプロトコルが、提供されている。Mowen等、Cell 104: 731-741, 2001を参照されたい。

【0435】

たとえ現時点である特定の修飾に対する報告された抗体がなくても、その特定の修飾残基の型に対する抗体を高めることは、十分、当業者の能力の範囲内にある。かかる抗体が得られないと考える理由は、リン酸化アミノ酸などの比較的小さい原子団に対する抗体を高めることの以前の成功の故にない。抗翻訳後修飾抗体は、その反応性が翻訳後修飾の存在に依存することを確認するために、修飾されてない同じ抗原に対してチェックされるべきである。

【0436】

G. 免疫組織化学(IHC)

腫瘍組織/生検の免疫組織化学的分析は、伝統的に、癌の診断、モニタリング、及び予後分析において重要な役割を演じてきた。IHCは、典型的には、特異的病気マーカーに対する抗体(モノクローナル又はポリクローナル)を利用して、病気組織切片について行われる。しかしながら、2つの主要な問題が、この有用な手順を阻害しており、それで、しばしば、再現性のある定量的データを得ることが困難となる。一つの問題は、このアッセイで用いられる抗体の乏しい量に関係している。多くの抗体は、標的バイオマーカーに対する特異性を欠いており、病状と関係しない他のタンパク質と交叉反応する傾向があり、高いバックグラウンドを生じている。他の紛糾は、抗体が、組織/細胞の固定後に、未知のエピトープに接近する困難さを有するということである。

【0437】

例えば、Press等(Cancer Res. 54(10): 27721-7, 1994)は、7種のポリクローナル及び21種のモノクローナル抗体を、乳癌試料のパラフィン包埋ブロックからの切片で用いて得られた免疫組織化学染色を比較した。これらの抗体のHER2/neu抗原の過剰発現を検出する能力が、極めて変化しやすいということが見出され、これは、文献で報告された変化しやすい過剰発現率に対する重要な説明を与える。

【0438】

他の問題は、IHC前の試料の処理と関係している。一般に、抗原回復の効率は、同時プロトコルにおいて予想不能である。酵素消化と組合せた加熱は、より良い結果を与える傾向があるということも報告されている。しかし、抗体に対するエピトープは知られていないので、加熱/消化は、抗体認識に対する異なる程度の問題を引き起こしうる。

【0439】

それ故、P E T由来の抗体は、I H Cのための標準化試薬としての、ユニーク溶液を表す。ある好適具体例において、標的タンパク質の表面上に存在するP E Tは、P E T特異的抗体による容易な接近につき選択することができる。細胞固定の化学も又、P E Tの最適なアミノ酸配列を選択するように考慮することができる。例えば、ある種の残基が、固定後に架橋を形成することが知られていたならば、これらの残基が、P E T溶液に対して選択される。同様に、酵素認識部位と重複するエピトープは、選択されない。これらの処置は、I H C実験における首尾一貫した再現性のある結果及び高い成功率を達成する助けとなる。

【0440】

V I I . この発明の他の面

他の面において、この発明は、複数のユニーク認識配列を含む組成物を提供する(ここに、ユニーク認識配列は、一生物のプロテオームの少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%から導かれる)。一具体例において、これらのユニーク認識配列の各々は、異なるタンパク質から導かれる。

【0441】

本発明は、更に、特定の生物を、その生物のプロテオームエピトープタグに基づいて特定し及び/又は検出する方法をも提供する。これらの方法は、関心ある生物を含む試料(例えば、ここに記載した方法を利用して断片化して、ペプチドの集合を生成させた試料)を、その生物のプロテオームを特性決定し且つ/又は該プロテオームにおいてユニークであるユニーク認識配列の集合と接触させることを含む。一具体例において、プロテオームエピトープタグを含むユニーク認識配列の集合は、アレイ上に固定化される。これらの方法を利用して、例えば、特定の細菌又はウイルスを他の細菌又はウイルスのプールから識別することができる。

【0442】

本発明のユニーク認識配列は又、ユニーク認識配列が支持体に結合された複数の捕捉剤と結合されるタンパク質検出アッセイにも利用することができる。この支持体を、関心ある試料と接触させ、試料が捕捉剤の一つにより認識されるタンパク質を含む場合には、ユニーク認識配列は、捕捉剤に結合することにより提示される。これらのユニーク認識配列は、標識されうる(例えば、支持体からのシグナルの消失が、ユニーク認識配列が提示されたこと及びその試料が少なくとも一種の捕捉剤により認識されるタンパク質を含むことを示すように蛍光標識されうる)。

【0443】

本発明のP E Tは、治療応用で利用して、例えば、患者の病気を予防し又は治療することもできる。特に、これらのP E Tは、ワクチンとして利用して、患者における所望の免疫応答例えば腫瘍細胞、感染性因子又は寄生因子に対する免疫応答を誘出することができる。この発明のこの具体例においては、関心ある組織、関心ある感染性因子又は関心ある寄生因子に対してユニークであり又は例えばこれらにおいて過剰表現されるP E Tが選択される。P E Tは、例えば米国特許第5,925,362号及び国際公開No. WO 91/11465及びWO 95/24924(これらの各々の内容を参考として本明細書中に援用する)に記載されたような当分野で公知の技術を利用して患者に投与される。簡単にいえば、このP E Tは、免疫応答を増進するようにデザインされた配合物にて、患者に投与することができる。適当な配合物には、追加のアジュバントを有し若しくは有しないリポソーム及び/又はP E TをコードするDNAのウイルス又は細菌ベクター中へのクロニングが含まれるが、これらに限られない。これらのP E Tを組み込んだ配合物例えばリポソーム配合物は又、免疫系補助物質(少なくとも一種のリ多糖類(L P S)、リポドA、ムラミルジペプチド(M D P)、グルカンを含む)又はある種のサイトカイン(インターロイキン、インターフェロン、及びコロニー刺激因子例えばI L 1、I L 2、ガンマーインターフェロン及びG M - C S Fを含む)をも含むことができる。

【実施例】

10

20

30

40

50

【 0 4 4 4 】

実施例

この発明を、下記の実施例によって更に説明する(該実施例は、制限と解すべきではない)。この出願中で引用されたすべての参考文献、特許及び公開された特許出願並びに図面を、参考として、本明細書中に援用する。

【 0 4 4 5 】

実施例 1 : ヒトプロテオーム中のユニーク認識配列の同定

全 20 アミノ酸の何れかがペプチド中の特定の位置に存在しうるので、4 量体のすべての可能な結合(4つのアミノ酸残基を含むペプチド)は、 20^4 であり; 5 量体のすべての可能な結合(5つのアミノ酸残基を含むペプチド)は、 20^5 であり; 6 量体のすべての可能な結合(6つのアミノ酸残基を含むペプチド)は、 20^6 である。ヒトプロテオーム中のユニーク認識配列を同定するために、各可能な4量体、5量体又は6量体を、ヒトプロテオームに対して検索した(総数: 29, 076; ヒトプロテオームの起源: EBI Ensembl project release v 4.28.1、2002年3月12日、http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/)。 10

【 0 4 4 6 】

この分析の結果は、下記の通りであるが、5量体をユニーク認識配列として利用した場合、ヒトプロテオームの80.6%(23, 446配列)がそれら自身のユニーク認識配列を有することを示している。6量体をユニーク認識配列として利用すると、ヒトプロテオームの89.7%が、それら自身のユニーク認識配列を有する。対照的に、4量体をユニーク認識配列として利用した場合には、ヒトプロテオームの2.4%だけがそれら自身のユニーク認識配列を有する。 20

【 0 4 4 7 】

結果及びデータ

2. 1. 4 量体分析:

【 0 4 4 8 】

【表 5】

2. 1. 1. 配列スペース:

ヒトタンパク質配列の総数	29, 076	100%
* 1つ以上のユニークな4量体タグを有する配列の数	684	2.4%
0個のユニークな4量体タグを有する配列の数	28, 392	97.6%

* これらの684配列についての平均タグ/配列: 1. 1

【 0 4 4 9 】

【表 6】

2. 1. 2. タグスペース:

4量体の総数	$20^4 = 160, 000$	100%
0配列で見出される4量体	393	0.2%
# 1配列だけで見出される4量体	745	0.5%
1配列より多くの配列で見出される4量体	158, 862	99.3%

これらは、識別特性テトラペプチドである

【 0 4 5 0 】

2. 2. 5 量体分析:

【 0 4 5 1 】

【表 7】

2. 2. 1. 配列スペース :

ヒトタンパク質配列の総数	2 9, 0 7 6	1 0 0 %
* 1 つ以上のユニークな 5 量体タグを有する配列の数	2 3, 4 4 6	8 0. 6 %
0 個のユニークな 5 量体タグを有する配列の数	5, 6 3 0	1 9. 4 %

* これらの 2 3, 4 4 6 配列についての平均タグ / 配列 : 2 3. 9

【0 4 5 2】

【表 8】

10

2. 2. 2. タグスペース :

5 量体の総数	$20^5 = 3, 200, 000$	1 0 0 %
0 配列で見出される 5 量体	9 5 5, 0 0 7	2 9. 8 %
# 1 配列だけで見出される 5 量体	5 6 0, 3 0 9	1 7. 5 %
1 配列より多くの配列で見出される 5 量体	1, 6 8 4, 6 8 4	5 2. 6 %

これらは、識別特性ペプタペプチドである

【0 4 5 3】

2. 3. 6 量体分析 :

20

【0 4 5 4】

【表 9】

2. 3. 1. 配列スペース :

ヒトタンパク質配列の総数	2 9, 0 7 6	1 0 0 %
* 1 つ以上のユニークな 6 量体タグを有する配列の数	2 6, 0 6 9	8 9. 7 %
0 個のユニークな 6 量体タグを有する配列の数	3, 0 0 7	1 0. 3 %

* これらの 2 6 0 6 9 配列についての平均タグ / 配列 : 1 7 7

【0 4 5 5】

30

【表 10】

2. 3. 2. タグスペース :

6 量体の総数	$20^6 = 64, 000, 000$	1 0 0 %
0 配列で見出される 6 量体	5 7, 0 4 0, 2 9 6	8 9. 1 %
# 1 配列だけで見出される 6 量体	4, 6 0 9, 1 7 2	7. 2 %
1 配列より多くの配列で見出される 6 量体	2, 3 5 0, 5 3 2	3. 7 %

これらは、識別特性ヘキサペプチドである

【0 4 5 6】

40

ヒトプロテオームにおける類似の分析を、7 ~ 10 アミノ酸長の P E T 配列について行なって、結果を、下記の表にまとめている :

【0 4 5 7】

【表 1 1】

PET長さ (アミノ酸)	タグ付き配列 (数)	タグ付き配列 (総数 29076 の%)	平均PET (数/タグ付きタンパク質)
4	684	2.35%	3
5	23, 446	80.64%	24
6	26, 069	89.66%	177
7	26, 184	90.05%	254
8	26, 216	90.16%	268
9	26, 238	90.24%	272
10	26, 250	90.28%	275

10

【0458】

実施例 2：全細菌プロテオーム中のユニーク認識配列(又はPET)の同定

例えば特定の細菌を他のすべての細菌のプールから識別するために利用することのできる5量体PETを同定するために、各可能な5量体を、NCBIデータベース(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/eub_g.html)に対して検索した。この分析の結果を、以下に示す。

【0459】

【表 1 2】

結果及びデータ：

ユニーク 5 量体の数	データベース I D (NCBI RefSeq ID)	種の名称
6	NC_000922	肺炎クラミジア CWL 0 2 9
3 7	NC_002745	黄色ブドウ球菌 N 3 1 5 染色体
4 0	NC_001733	メタン生成細菌 小さい染色体外エレメント
5 8	NC_002491	肺炎クラミジア J 1 3 8
8 4	NC_002179	肺炎クラミジア AR 3 9
1 3 5	NC_000909	メタン生成細菌
2 0 6	NC_003305	アグロバクテリウム チュメファシエンス s t r. C 5 8 (U. Washington) 線状染色体
2 9 8	NC_002758	黄色ブドウ球菌 Mu 5 0 染色体
3 5 6	NC_002655	大腸菌 O 1 5 7 : H 7 EDL 9 3 3
3 8 6	NC_003063	アグロバクテリウム チュメファシエンス s t r. C 5 8 (Cereon) 線状染色体
4 7 9	NC_000962	ヒト型結核菌
4 8 1	NC_002737	化膿連鎖球菌
4 9 5	NC_003304	アグロバクテリウム チュメファシエンス s t r. C 5 8 (U. Washington) 環状染色体
5 5 1	NC_003098	肺炎連鎖球菌 R 6
5 6 7	NC_003485	化膿連鎖球菌 MGAS 8 2 3 2
5 7 7	NC_002695	大腸菌 O 1 5 7
5 9 2	NC_003028	肺炎連鎖球菌 T I G R 4
7 0 2	NC_003062	アグロバクテリウム チュメファシエンス s t r. C 5 8 (Cereon) 環状染色体
7 2 9	NC_001263	デイノコッカス ラディオデュランス 第 1 染色体
9 1 8	NC_003116	髄膜炎菌 Z 2 4 9 1
9 2 4	NC_000908	マイコプラズマ ゲニタリウム
9 6 0	NC_002755	ヒト型結核菌 CDC 1 5 5 1
9 7 7	NC_003112	髄膜炎菌 MC 5 8
9 7 9	NC_000921	ヘリコバクター ピロリ J 9 9
1 0 1 5	NC_000915	ヘリコバクター ピロリ 2 6 6 9 5
1 1 8 9	NC_000963	発疹チフスリケッチア
1 2 8 4	NC_001318	ボレリア ブルグドルフェリ 染色体
1 3 3 1	NC_002771	肺マイコプラズマ
1 4 2 6	NC_000912	肺炎マイコプラズマ
1 4 3 1	NC_002528	ブフネラ s p. APS
1 4 6 3	NC_000868	ピロコッカス アビシ
1 4 6 8	NC_000117	トラコーマクラミジア
1 4 6 8	NC_002162	ウレアプラズマ ウレアリティカム
1 4 7 8	NC_003212	リステリア イノキュア
1 5 5 3	NC_003210	リステリア モノサイトゲネス
1 5 7 7	NC_000961	ピロコッカス ホリコシ
1 6 3 0	NC_002620	クラミジア ムリダルム
1 6 3 6	NC_003103	リケッチア コノリイ マリシュ 7

10

20

30

40

50

1 7 6 9	NC_003198	チフス菌	
1 7 9 4	NC_000913	大腸菌 K 1 2	
1 8 9 4	NC_002689	サーモプラズマ ボルカニウム	
1 9 9 6	NC_003413	ピロコッカス フリオサス	
2 0 8 1	NC_002578	サーモプラズマ アシドフィルム	
2 1 0 6	NC_003197	ネズミチフス菌 L T 2	
2 1 3 7	NC_003317	マルタ熱菌 第1染色体	
2 4 0 2	NC_002677	癩菌	
2 7 3 5	NC_000918	アクイフェクス アエオリクス	10
2 8 0 3	NC_002505	コレラ菌 第1染色体	
2 9 0 0	NC_000907	インフルエンザ菌	
3 0 0 0	NC_003318	マルタ熱菌 第2染色体	
3 1 2 0	NC_000854	アエロパイラム ペルニックス	
3 2 2 9	NC_002662	ラクトコッカス ラクティス	
3 2 8 7	NC_002607	ハロバクテリウム s p. NRC-1	
3 2 9 8	NC_003454	フゾバクテリウム ナクレタム	
3 4 9 7	NC_001732	メタン生成細菌 大きい染色体外エレメント	
3 5 4 8	NC_002163	カンピロバクター ジェジュニ	20
3 5 5 1	NC_000853	サーモトガ マリティマ	
3 6 8 8	NC_003106	スルフォロバス トコダイ	
3 7 7 5	NC_002754	スルフォロバス ソルファタリカス	
3 8 4 2	NC_000919	梅毒トレポネーマ	
3 9 2 1	NC_003296	ラルストニア ソラナシアルム GMI 1000	
3 9 4 0	NC_000916	メタノバクテリウム サーモオートロフィカム	
4 1 6 5	NC_001264	デイノコッカス ラディオデュランス 第2染色体	
4 2 7 1	NC_003047	シノリゾビウム メリロッティ 1021 染色体	
4 3 3 8	NC_002663	パスツレラ ムルトシダ	
4 6 5 8	NC_003364	ピロバキュラム アエロフィラム	30
5 1 0 1	NC_000917	アルカエグロブス フルギダス	
5 7 8 7	NC_003366	ウェルシュ菌	
5 8 1 5	NC_003450	コリネバクテリウム グルタミカム	
6 5 2 0	NC_002696	コーロバクター	
6 8 6 6	NC_002506	コレラ菌 第2染色体	
6 8 9 1	NC_003295	ラルストニア ソラナシアルム 染色体	
7 0 7 8	NC_002488	キシレラ ファスティディオサ 染色体	
8 2 8 3	NC_003143	ペスト菌 染色体	
8 3 2 0	NC_000911	シネコシステイス PCC 6803	40
8 3 7 4	NC_002570	バチルス ハロデュランス	
8 6 6 0	NC_000964	枯草菌	
8 9 9 4	NC_003030	クロストリディウム アセチボラリス ATCC824	
1 1 7 2 5	NC_003552	メタノサルシナ アセチボラリス	
1 2 1 2 0	NC_002516	緑膿菌	
1 2 4 6 9	NC_002678	メソリゾビウム ロティ	
1 4 0 2 2	NC_003272	ネンジュモ s p. PCC 7120	

【 0 4 6 0 】

実施例 3 : 特異的な P E T の同定

50

図 1 1 は、配列決定されたゲノムを有する一生物中の又は公知のプロテオームを有する試料中の、所定の長さのすべての P E T を同定するための一般的アプローチを概説している。簡単にいえば、配列決定されたゲノム中のすべてのタンパク質配列は、日常的なバイオインフォーマチックツールを用いて容易に同定することができる。これらのタンパク質配列は、所望の長さの P E T に依って、4 ~ 1 0 アミノ酸長の短い重複するペプチドにパースされる。例えば、X アミノ酸のタンパク質は、(X - N + 1) の、N アミノ酸長の重複するペプチドを与える。理論的には、所定の長さ(例えば、N アミノ酸)のすべての可能なペプチドタグは、 20^N (好ましくは、 $N = 4 \sim 10$) と表されうる。これは、いわゆる、ペプチド断片のこの特定の長さについてのペプチドタグデータベースである。これらのパースした短い重複するペプチドの各々及び各配列をペプチドタグデータベースと比較することにより、すべての P E T (ペプチドタグデータベース中に唯一度出現)を同定することができるが、他方、すべての非 P E T (ペプチドデータベース中に一回より多く出現する)は排除されうる。

10

【 0 4 6 1 】

上記のように、可能な 4 量体、5 量体又は 6 量体の各々を、ヒトプロテオーム(総数：29,076 ヒトプロテオーム源：EBI Ensembl project release 4.28.1 2002 年 3 月 12 日、http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/)に対して検索して、ユニーク認識配列(P E T)を同定した。

【 0 4 6 2 】

前述の検索に基づいて、ヒトプロテオームの大部分についての特異的 P E T が同定された。図 1 は、インターロイキン 8 レセプター A の配列中で同定された 5 量体のユニーク認識配列を描いていたものである。図 2 は、トリプシン消化により破壊されないヒスタミン H 1 レセプター内で同定された 5 量体のユニーク認識配列を描いたものである。ヒトプロテオーム中で同定された 5 量体のユニーク認識配列の更なる例を如何に示す。

20

【 0 4 6 3 】

【表 1 3】

配列 ID*	5 量体 PETの数	5 量体 PET
ENSP00000000233	9	AMPVS CATQG CFTVW ICFTV MPNAM PNAMP SRTWY TWYVQ WYVQA (配列番号:1-9)
ENSP00000000412	30	CDFVC CGKEQ CWRTG DNFNP DNHCG FRVCR FYSCW GMEQF HLAFW IFNGS IMLIY IYIFR KGMEQ KTCDL MFPEY MISCN NETHI NWIML PFYSC QDCFY QFPHL RESWQ SNWIM VMISC YDNHC YIYIF YKGGD YLFEM YRGVG YSCWR (配列番号:10-39)
ENSP00000000442	2	ASNEC PASNE (配列番号:40-41)
ENSP00000000449	9	AQPWA ASTWR CLCLV FVICA LYCCP PRANR VNVLC YAQLW YCCPV (配列番号:42-50)
ENSP00000001008	20	AIQRM AKPNE AMCHL AWDIA CQORI ELKYE EMPMI FVHYT HSIYV HYTGW LYANM MIGDR QKSNT SWEMN SWLEY TEMPM WEMNS YAKPN YESSF YPNNK (配列番号:51-70)
ENSP00000001146	32	ATRDK CPCEG DKSCK DTHDT EWPRS FEVYQ FQIPK FSGYR GCPCE GHLFE HDTAP IFSHE KEMTM KLQCT KSCKL KYGNV LKHPT MGEHH MTMQE MYSIR NVFDP QLWQL RGIQA RYLDL STEWP THDTA TRTFP VMYSI VRTCL VSTEW WQLRW WSVMY (配列番号:71-102)
ENSP00000001178	8	ACKCF CKCFW FWLWY KCFWL LWYPH QKRRC WLWYP WYPHF (配列番号:103-110)
ENSP00000001380	26	AMEQT APCTI AYMER CTIMK DGLCN EQTWR FRSYG GMAYM GYHMP HIPNY KGRIP KLDMG MAYME MEQTW MNKRE PGMNK QGYHM TMSPK TWRLD VEQGY VNDGL WDQTR WRLLD YEAME YHMPC YNPCQ (配列番号:111-136)

10

20

30

40

ENSP00000001567	137	ATYYK CATYY CDNPY CEVVK CIKTD CINSR CKSPD CKSSN CNELP CQENY CSESF CYERE CYHFG CYMGK DFTWF DGWSA DIPIC DQYYP DREYH EEMHC EFDHN EFNCS EHGWA EINYR EKIPC EMHCS ESNTG ESTCG ESYAH EYHFG EYYCN FENAI FQYKC FTWFK GEWVA GNVFE GWTND HGRKF HGTIN HGWAQ HPGYA HPPSC HTVCI IHGVW IKHRT IMVCR INGRW IPCSQ IPVFM IVCGY IYKCR IYKEN KCNMG KGEWV KIPCS KPCDY KWSHP LPICY MENGW MGKWS MGYEY MIGHR NCSMA NDETW NEGYQ NETTC NGWSD NMGYE NQNHG NSVQC NVFEY NYRDG NYREC PCDYP PEVNC PICYE PPQCE PPYYY POCVA PYIPN QCYHF QIQLC QYKVG RDTSC REYHF RIKHR RKGEW RPCGH RVRVQ RWQSI SCDNP SDQTY SFTMI SITCG SRWTG STGWI SVEFN SWSOQ TAKCT TCIHG TCINS TCMEN TCYMG TMIGH TNDIP TSTGW TWFKL TYKCF VAIDK VCGYN VEFNC VFEYG VIMVC VNCSM VTYKC WDHII WFKLN WIHTV WQSIP WSDQT WTNDI YCNPR YHENM YHFGQ YKCFE YKCNM YKCRP YKIEG YMGKW YNGWS YNQNH YPDIK YQCRN YQYGE YSERG YWDHI YYKMD (配列番号:137-274)
ENSP00000001585	25	CVSKG EIIII GINYE GMKHA GWDLK HGMKH HHPKF IEKCV IIMDA INYEI KGYVF MEMIV MIVRA NYTIG QMEMI SHHPK TGSFR TRYKG VYGWD YGESK YGWDL YIHGM YNERE YTIGE YVFQM (配列番号:275-299)
ENSP00000002125	7	GRYQR KNMGI MGERF PIKQH QRNAR RYQRN YDMLM (配列番号:299-306)
ENSP00000002165	63	AHSAT AKFFN CKWGW CMTID DKLSW DQAKF DVWYT EYSWN FDQAK FEWFH FNAHQ FWWYV FYTCS HKWEN HPKAI HQMPC HTWRS IHQMP IPKYV IYETH KFFNA KWENC KWGWA KWPTS LMNIG LPHKW MPCKW MRPQE NANQW NCMTI NYPPS NYQPE PCKWG PDQYW PHKWE QMGSW QYWNS RNRTD SCGGN SKHHE TCSDR THTWR TIHQM TNDRW TPDVW TRFDP TVVTN VRGTV VVTND WENCM WFDQA WFWWY WGSEY GWGAL WNNWA WRSQN WWYWQ YEDFG YETHT YNPGH YSWNW YVEFM YYSLF (配列番号:307-369)

10

20

30

40

ENSP00000002494	74	AMNDA ANHGE AQWRN CVKLP CVQYK DAHKR DCVQY DIEQR DMAER DPKW DTANH EVSFM EYVID FEQYE FFEQY FGDCV FMNET HEIYR HERFL HFDQT HKQWK HKRAF HTAMN HWIQK KHFDQ KMLNQ KQMTS KOYAO KRAFH KWERF LNGRW LPHWI MFATM MKFMN MKMEF MLNQS MPQEG MYVKA NLPHW NTDH NVLKH PHWIK PVMDA QADEM QENCK QHTAM QNYVS QWKDL QYAOA RVFVM SFYDS SHERF TCDEM TDAHK TKLMP TVVRY TYQIL VMDAQ VMKFM VPVMD VRYLF VSFMN WDRYG WERFE WIKY WIOQH WISTN WKDYT WKKHV YAOAD YEVTY YGRRE YTDCV YVKAD (配列番号:369-443)
ENSP00000002594	7	CFKEN DGGFD FDLGD KLCFK KPMPN MPNPN PNPNH (配列番号:444-450)
ENSP00000002596	36	DRCLH EEHYS EHYSH ENEVH EYFHE FFDWE FHEPN FSWPH FYNHM GRDRC GVAPN HEYFH HFFDW HIVDG HKPYP HMQKH HMQNW HPQVD HVHMQ KGRAH KHKPY KTPAY MQNWL NHMQK QKHKP QNWLR RVYSM SMNPS SWPHQ TFDWH TQVfy WEEHY YCLRD YHVHM YNHMQ YPSIE (配列番号:451-486)
ENSP00000002829	60	ADIRM AWPSF CLVKN CQAYG CTYVN DHDRM DPSFI DRMYV GHCC L GIETH GYWRH HCCLV HDINR HDRMY HQYCQ HRCQA IETHF IFYLE IHQYC IHW A INFMR IQPWN KMPYP KWLFQ LIIHW LIQPW MCTYV MPYPR MRSHP NNFKH NPIRQ NSRWL NTDY NYQWM PIRQC PRNRR PVKTM PWNRT QDYIF QGYWR QTAMR RCQAY RMVFN SKDYV SNANK TGAWP VGVTH VINFM VKWLF WDGQA WPSFP WRHVP YAGVY YCQGY YNPMC YNSRW YPLQR YQAVY YQWMP YWRHV (配列番号:487-546)

* 使用した配列 ID は、http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ で与えられたものである。

【 0 4 6 4 】

図 1 2 は、P E T についての全ヒトプロテオーム(約 1 2 0 0 万の 4 ~ 1 0 重複ペプチドに対応する全部で 2 9 , 0 7 6 のタンパク質)の検索結果及び各 N (4 ~ 1 0) につき同定された P E T の数の一覧である。

【 0 4 6 5 】

図 1 3 は、少なくとも一の P E T を有するヒトタンパク質のパーセンテージの結果を示している。4 アミノ酸長の P E T については、6 8 4 のタンパク質(即ち、全ヒトタンパク質の約 2 . 3 5 %)だけが少なくとも一つの 4 量体 P E T を有するということが示されている。しかしながら、もし、少なくとも 6 アミノ酸の P E T を用いるならば、全タンパク質の少なくとも約 9 0 % が少なくとも一つの P E T を有する。加えて、5 量体 P E T が

10

20

30

40

50

ら 6 量体 (又はそれ以上) P E T になると、タンパク質当たりの平均 P E T 数が有意に増加し、その平均が 7 又は 8 量体を用いると急速にプラトーに達するということは、幾らか驚くべきことである。これらのデータは、少なくとも 6 アミノ酸 (好ましくは、7 ~ 9 アミノ酸、最も好ましくは、8 アミノ酸) の P E T が、殆どの応用に対して最適の長さを有するというを示している。その長さの有用な P E T を同定することは、その長さの P E T を検索する場合には、タンパク質当たりの P E T の大きい平均数の故に、一層容易である。

【 0 4 6 6 】

図 1 4 は、ヒトプロテオームのトリプシン消化から生じた更なるデータを提供する。特に、上段パネルは、タグ付きタンパク質 (少なくとも一つの P E T を有するタンパク質) 当たりの P E T の平均数の一覧 (トリプシン消化を伴うか又は伴わない) である。トリプシン消化は、タグ付きタンパク質当たりの P E T の平均数を凡そ $1/3 \sim 1/2$ だけ減じる。下段右パネルは、トリプシン断片のヒトプロテオームにおける分布をペプチド長に応じて示している。平均で、典型的なトリプシン断片は、約 8 . 5 アミノ酸長である。下段左パネルは、ヒトタンパク質から生成したトリプシン断片の数の分布を示している。平均で、ヒトタンパク質は、約 4 9 のトリプシン断片を有する。

10

【 0 4 6 7 】

下記の実施例 6 は、S A R S ウイルス特異的な 8 量体 P E T を同定する詳細な例を与える。これらの P E T は、潜在的に、ヒト又は他の哺乳動物における免疫化 (ワクチン製造) のための S A R S 特異的抗原として有用である。

20

【 0 4 6 8 】

実施例 4 : 2 つの重複しない P E T 配列を有する単一ペプチド配列の複雑な混合物における、サンドイッチ E L I S A アッセイを利用する検出及び定量

ここでは、複雑なペプチド混合物における特異的捕捉剤についての蛍光サンドイッチ免疫アッセイ及び標的ペプチドの定量を説明する。

【 0 4 6 9 】

ここに示した実施例においては、3 つの一般的に用いられるアフィニティーエピトープ配列 (H A タグ、F L A G タグ及び M Y C タグ) よりなるペプチドを、消化されたヒトタンパク質試料に由来する大過剰の無関係のペプチドと混合する (図 1 5)。ここでは、標的ペプチドの中央の F L A G エピトープが、F L A G 抗体によって最初に捕捉され、次いで、標識した抗体 (H A m A b 又は M Y C m A b) を利用して、第二のエピトープを検出する。最終的なシグナルを、第二抗体からの蛍光読み出しにより検出する。図 1 5 は、ピコモル濃度の H A - F L A G - M Y C ペプチドが、百万倍過剰の消化された無関係のタンパク質の存在下で検出されたことを示している。この方法の検出限界は、典型的には、約 1 0 p M 以下である。

30

【 0 4 7 0 】

サンドイッチアッセイを利用して、タグ付きヒト P S A タンパク質を、細胞培養の調整培地中に分泌された完全長タンパク質、及び同調整培地の消化により生成されたトリプシンペプチドの両方として検出した。この分析の結果を、図 1 6 に示した。この P S A タンパク質サンドイッチアッセイ (同図の左側) は、P S A タンパク質の濃度が、調整培地中で約 7 . 4 n M であることを示した。S D S - P A G E 分析は、試料中のすべてのタンパク質のトリプシン消化が完結したことを示した (殆どのトリプシン断片は、1 k D 未満であると予想されるので、消化後ゲル上に如何なる可視的バンドも存在しないことにより明示された)。同図の右側は、ほぼ同じ濃度 (8 n M) の最後の断片 (組換え P S A タンパク質のタグ含有部分) が、この消化された試料中に存在することを示した。一層高い濃度は、試料中の干渉性物質例えば完全長 P S A タンパク質に結合してその他の抗体との相互作用をマスクする他のタンパク質の排除に帰することができた。この種の干渉は、この実施例では比較的単純な調整培地を用いたのでそれほど重大ではないが、実際の生物学的試料においては、ずっと優勢であることが予想される (該試料においては、大きな干渉が、消化してない複雑な体液例えば血清中の未知のタンパク質から予想される)。

40

50

【0471】

同じサンドイッチアッセイを、抗チロシン、抗セリン、又は抗スレオニン抗体を利用して、リン酸化タンパク質などの修飾されたアミノ酸の検出のために利用することができる。例えば、図17は、ホスホプロテインSHIP-2が28アミノ酸のトリプシン断片を含むことを示しており、これは、8量体PET(YVLEGVPH)のN末端の一のチロシン残基上で及び同PETのC末端の一のセリン残基上でリン酸化されている。従って、このサンドイッチアッセイにおいて、トリプシン消化したSHIP-2タンパク質を、先ずPET特異的抗体を利用してプルダウンすることができ、リン酸化チロシン又はセリンの存在を、本明細書の他所に記載したようなリン特異的抗体を利用して検出/定量することができる。選択したPETの3つのニアレスト-ネイバーも又、この図に示してある。

10

【0472】

同様に、ホスホプロテインABLも又、8量体PETを、そのリン酸化部位を含むトリプシン断片上に含む。このリン酸化ペプチドは、ホスホチロシン特異的抗体によって容易に検出することができる。

【0473】

事実、一般的アプローチとして、このサンドイッチアッセイを利用して、N+1のPET特異的抗体を用いてNタンパク質を検出することができる：一のPETは、検出すべき全Nペプチドに共通であり、他方、各特異的ペプチドは又、ユニークなPETをも含む。すべてのNペプチドは、共通のPETに特異的な捕捉剤によってプルダウンすることができ、各特異的ペプチドの存在及び量を、ユニークなPETに特異的な抗体を利用して、個々に評価することができる(図18)。

20

【0474】

説明のために、殆どのキナーゼは、類似の触媒構造及び/又は触媒機構を共有することによってなんとか関係している。それ故、公知のすべての518のヒトキナーゼを表すのに88の5量体PETだけが必要であり、同じ目的のために、122の6量体PETが必要であるということは興味深いことである。図18は又、トップ20の最も一般的な6量体PETが、すべての公知のキナーゼの70%より多くをカバーすることをも示している。密接に関係したキナーゼは、一般的特徴を共有する傾向があり、主題のサンドイッチアッセイは、キナーゼのファミリーの同時の検出に適している。図19は、かかる例を与えるものであり、一つの5量体PETが、22の関連キナーゼのトリプシン断片に共有されている(各々は、ユニークな7量体又は8量体PETをも有する)。

30

【0475】

同じアプローチを、GPCR、プロテアーゼ、ホスファターゼ、レセプター、又は特異的酵素を含む他のタンパク質ファミリーについて利用することができる。ヒト原形質膜レセプトームは、<http://receptome.stanford.edu/HPMR>に開示されている。

【0476】

実施例5：ペプチド競合アッセイ

この発明のある具体例において、ペプチド競合アッセイを利用して、捕捉剤のその標的PETに対する結合特異性を、該PETの幾つかのニアレスト-ネイバー配列と比較して測定することができる。

40

【0477】

典型的なペプチド競合アッセイのために、次の説明のためのプロトコールを利用することができる：1µg/100µl/ウェルの各標的ペプチドを、コーティング緩衝液(炭酸緩衝液、pH9.6)を用いて、一晚4で、又は1時間、室温で、Maxisorb Plate中にコートする。これらのプレートを、300µlのPBST(1×PBS/0.05%ツイーン20)で4回洗う。次いで、300µlのブロッキング緩衝液(2%BSA/PBST)を加えて、それらのプレートを1時間室温でインキュベートする。ブロッキング後に、これらのプレートを、300µlのPBSTで4回洗う。

【0478】

合成した競合ペプチドを水に溶解させて、終濃度2mMの溶液とする。消化したヒト血

50

清中の競合ペプチドの連続希釈(例えば、100 pMから100 μM)を調製する。これらの特定の濃度の競合ペプチドを、次いで、等量の標的ペプチドに対する第一抗体と混合する。これらの混合物を、次いで、固定化された標的ペプチドをそれぞれ有するプレートのウェルに加える。結合を、2時間、室温で進行させる。これらのプレートを、300 μlのPBSTで4回洗う。次いで、標識した第一抗体に対する第二抗体(例えば、100 μlの5,000倍希釈した抗ウサギIgG-HRP)を加えて、更に1時間室温でインキュベートする。これらのプレートを、300 μlのPBSTで6回洗う。HRP標識活性の検出のために、100 μlのTMB基質(HRPの基質)を加えて、15分間室温でインキュベートする。100 μlの停止用緩衝液(2N HCL)を加えて、これらのプレートをOD₄₅₀で読む。ペプチド競合曲線を、競合ペプチドの濃度に対するABS(OD₄₅₀)を利用してプロットする。

10

【0479】

実施例6：SARS特異的PETの同定

配列回復

2028コロナウイルスペプチド配列のすべては、NCBIデータベースから得た(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/genomes/SARS/SARS.html>)。これらの配列は、少なくとも10の異なる種のコロナウイルスを表している。それらの内で、1098の非冗長ペプチド配列を同定した。一層大きい配列中に同様に現れた(包含された)各配列は除去されて、一層大きい配列が代表として残った。こうして生じた配列を、次いで、8アミノ酸の重複する領域(8量体)に分割したが、連続する8量体の間で1アミノ酸の配列差異があった。これらの8量体を、次いで、同様に生成されて、問題の種のプロテオーム(及び任意の他の必要と思われるタンパク質配列のセット)中に存在するすべての8量体よりなるデータベースに問い合わせた。一回だけ存在することが見出された8量体(それ自身だけであると同定された配列)をユニークとみなした。これらの配列の残りは、一層綿密な分析により、それらは実際、初期にユニークであると決定された配列と同程度に有用でありうるという理解により、初期に、非ユニークとして分類された。例えば、8量体は、その親配列の他のイソ型中に存在しえて、それ故、依然として、その親配列及びそのイソ型を他のすべての無関係のタンパク質からユニークに検出することにおいて有用であろう。

20

【0480】

全部で約650,000の8量体ペプチド配列が生成され、その約50,000が、PETであることが測定された。これらの内の、605が、SARS特異的であり、602が、ヒトに関係するPETであった。

30

【0481】

PET優先順位

一度PETが同定されたならば、全PETのプールから、特定の応用に最良の候補を選択しなければならない。

【0482】

一般に、PETは、それらの疎水性、抗原性、及び溶解度の予想に用いられる計算に基づいてランク付けされ、親水性で、抗原性で且つ可溶性のPETが、最高の特性を与えられる。次いで、これらのPETを、更に、各PETのニアレスト-ネイバー(少なくとも一配列の差異を有する類似の8量体)を問題のプロテオームにおいて測定することによってランク付けする。マトリクス計算は、BLOSUM、PAM、又は類似の配列類似性及び距離を決定するための所有プログラムを利用して実施される。最も遠いニアレスト-ネイバーを有するPETが、その特性を与えられる。

40

【0483】

親ペプチド配列を、次いで、イン・シリコでタンパク質分解により開裂させて、その結果生成した断片を、ユーザーの規定したサイズ/疎水性/抗原性/溶解度基準によって分類する。各断片中のPETの存在を評価して、PETを含まない断片を捨てる。残りの断片を、それらの内部でのPET置換に関して、実施すべきアッセイの種類に応じて分析する。例えば、サンドイッチアッセイは、単一断片中の2つの重複しないPETに向いてい

50

る。理想的な最終的選択は、実施すべきアッセイの要求に合致する許容しうるタンパク質分解断片中の、遠くに関係するニアレスト・ネイバーを有するだけの最も抗原性の P E T であろう。

【 0 4 8 4 】

図 20 は、ヒトプロテオーム及び関連するコロナウイルスの両方における、2つの S A R S 特異的 P E T 及びそれらのニアレスト・ネイバーを示している。

【 0 4 8 5 】

この方法を利用して同定されたすべての S A R S 特異的 P E T を、下記の表 S A R S に列記する。

【 0 4 8 6 】

10

表SARS SARSウイルス特異的PETの一覧

```
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] ISLCSCIC
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] SLCSCICT
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] LCSCICTV
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] CSCICTVV
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] SCICTVVQ
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] CICTVVQR
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] ICTVVQRC
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] CTVVQRCA
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] HVLEDPCCK
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] VLEDPCCKV
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] LEDPCCKVQ
>gi|30795153|gb|AAP41045.1| Orf10 [SARS コロナウイルス Tor2] EDPCKVQH
>gi|32187352|gb|AAP72981.1| Orf7b [SARS コロナウイルス HSR 1] MNELTLID
>gi|32187352|gb|AAP72981.1| Orf7b [SARS コロナウイルス HSR 1] NELTLIDF
>gi|32187352|gb|AAP72981.1| Orf7b [SARS コロナウイルス HSR 1] ELTLIDFY
>gi|32187352|gb|AAP72981.1| Orf7b [SARS コロナウイルス HSR 1] LTLIDFYL
>gi|32187352|gb|AAP72981.1| Orf7b [SARS コロナウイルス HSR 1] TLIDFYLC
>gi|32187352|gb|AAP72981.1| Orf7b [SARS コロナウイルス HSR 1] LIDFYLCF
```

20

30

40

>gi|30275674|gb|AAP30035.1| 推定の特性決定されてないタンパク質 3 [SARS
コロナウイルス BJ01] DEELMELD
>gi|30275674|gb|AAP30035.1| 推定の特性決定されてないタンパク質 3 [SARS
コロナウイルス BJ01] EELMELDY
>gi|30275674|gb|AAP30035.1| 推定の特性決定されてないタンパク質 3 [SARS
コロナウイルス BJ01] ELMELDYP
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] MLPPCYNF
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] LPPCYNFL
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] PPCYNFLK
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] PCYNFLKE
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] CYNFLKEQ
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] YNFLKEQH
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] NFLKEQHC
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] FLKEQHCK
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] LKEQHCKQ
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] KEQHCKQA
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] EQHCQKAS
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] QHCQKAST
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] HCQKASTQ
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] CQKASTQR
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] QKASTQRE
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] KASTQREA
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] ASTQREAE
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] STQREAEA
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] TQREAEAA
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] QREAEAAV
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-
HZ01] REAEAAVK

10

20

30

40

40

>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] LAAVGEIL
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] AAVGEILL
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] AVGEILLL
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] VGEILLLE
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] GEILLLEW
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] EILLLEWL
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] ILLLEWLA
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] LLLEWLAE
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] LLEWLAEV
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] LEWLAEVV
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] EWLAEVVK
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] WLAEVVKL
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] LAEVVKLP
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] AEVVKLPS
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] EVVKLPSR
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] VVKLPSRY
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] VKLPSRYC
>gi|31747859|gb|AAP69660.1| 特性決定されてないタンパク質 9c [SARS コロナウイルス ZJ-HZ01] KLPSRYCC
>gi|31416298|gb|AAP51230.1| エンベローブタンパク質 E [SARS コロナウイルス GZ01] VLLFLAFM
>gi|31416298|gb|AAP51230.1| エンベローブタンパク質 E [SARS コロナウイルス GZ01] LLFLAFMV
>gi|31416298|gb|AAP51230.1| エンベローブタンパク質 E [SARS コロナウイルス GZ01] LFLAFMVF
>gi|31416298|gb|AAP51230.1| エンベローブタンパク質 E [SARS コロナウイルス GZ01] FLAFMVFL
>gi|31416298|gb|AAP51230.1| エンベローブタンパク質 E [SARS コロナウイルス GZ01] LAFMVFL
>gi|31416298|gb|AAP51230.1| エンベローブタンパク質 E [SARS コロナウイルス GZ01] AFMVFLLV

10

20

30

40

>gi|31416298|gb|AAP51230.1|エンベロープタンパク質 E [SARS コロナウイルス GZ01]
 FMVFLLVLT
 >gi|31416298|gb|AAP51230.1|エンベロープタンパク質 E [SARS コロナウイルス GZ01]
 MVFLLVTL
 >gi|29836499|ref|NP_828854.1|小さいエンベロープタンパク質; タンパク質 sM; タンパク質 E
 [SARS コロナウイルス] VLLFLAFV
 >gi|29836499|ref|NP_828854.1|小さいエンベロープタンパク質; タンパク質 sM; タンパク質 E
 [SARS コロナウイルス] LLFLAFVV
 >gi|29836499|ref|NP_828854.1|小さいエンベロープタンパク質; タンパク質 sM; タンパク質 E
 [SARS コロナウイルス] LFLAFVVF
 >gi|29836499|ref|NP_828854.1|小さいエンベロープタンパク質; タンパク質 sM; タンパク質 E
 [SARS コロナウイルス] FLAFVVFL
 >gi|29836499|ref|NP_828854.1|小さいエンベロープタンパク質; タンパク質 sM; タンパク質 E
 [SARS コロナウイルス] LAFVVFL
 >gi|29836499|ref|NP_828854.1|小さいエンベロープタンパク質; タンパク質 sM; タンパク質 E
 [SARS コロナウイルス] AFVVFLV
 >gi|29836499|ref|NP_828854.1|小さいエンベロープタンパク質; タンパク質 sM; タンパク質 E
 [SARS コロナウイルス] FVVFLVLT
 >gi|29836499|ref|NP_828854.1|小さいエンベロープタンパク質; タンパク質 sM; タンパク質 E
 [SARS コロナウイルス] VVFLLVTL
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] MCLKILVR
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] CLKILVRY
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] LKILVRYN
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] KILVRYNT
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] ILVRYNTR
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] LVRYNTRG
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] VRYNTRGN
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] TAAFRDVL
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] AAFRDVLV
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] AFRDVLVV
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] FRDVLVVL
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] RDVLVVLN
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] DVLVVLNK
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] VLVVLNKR
 >gi|32187354|gb|AAP72983.1|Orf8b [SARS コロナウイルス HSR 1] LVVLNKR
 >gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
 MDPNQTNV
 >gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
 DPNQTNVV
 >gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
 PNQTNVVP
 >gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
 NQTNVVP
 >gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
 QTNVPPA
 >gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
 TNNVPPAL

10

20

30

40

>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
NVVPPALH
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
VVPPALHL
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
VPPALHLV
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
PPALHLVD
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
PALHLVDP
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
ALHLVDPQ
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
LHLVDPQI
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
HLVDPQIQ
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
LVDPQIQL
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
VDPQIQLT
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
DPQIQLTI
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
PQIQLTIT
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
QIQLTITR
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
IQLTITRM
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
QLTITRME
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
LTITRMED
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
TITRMEDA
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
ITRMEDAM
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
TRMEDAMG
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
RMEDAMGQ
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
MEDAMGQG
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
EDAMGQGQ
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
DAMGQGQN
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
AMGQGQNS

10

20

30

40

>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
MGQGQNSA
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
GQGQNSAD
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
QGQNSADP
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
GQNSADPK
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
QNSADPKV
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
NSADPKVY
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
SADPKVYP
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
ADPKVYPI
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
DPKVYPII
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
PKVYPIIL
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
KVYPIILR
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
VYPIILRL
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
YPIILRLG
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
PIILRLGS
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
IILRLGSQ
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
ILRLGSQL
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
LRLGSQLS
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
RLGSQLSL
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
LGSQLSLS
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
GSQLSLSM
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
SQLSLSMA
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
QLSLSMAR
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
LSLSMARR
>gi|31416303|gb|AAP51235.1| BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
SLSMARRN

10

20

30

40

>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
LSMARRNL
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
SMARRNLD
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
MARRNLDS
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
ARRNLDSL
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
RRNLDSLE
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
RNLDLSLEA
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
NLDLSLEAR
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
LDSLEARA
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
DSLEARAF
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
SLEARAFQ
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
LEARAFQS
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
EARAFQST
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
ARAFQSTP
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
RAFQSTPI
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
AFQSTPIV
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
FQSTPIVV
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
QSTPIVVQ
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
STPIVVQM
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
TPIVVQMT
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
PIVVQMTK
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
IVVQMTKL
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
VVQMTKLA
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
VQMTKLAT
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
QMTKLATT

10

20

30

40

>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
MTKLATTE
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
TKLATTEE
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
KLATTEEL
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
LATTEELP
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
ATTEELPD
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
TTEELPDE
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
TEELPDEF
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
EELPDEFV
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
ELPDEFVV
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
LPDEFVVV
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
PDEFVVVT
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
DEFVVVTA
>gi|31416303|gb|AAP51235.1|BGI-PUP7 [SARS コロナウイルス GZ01]
EFVVVTAK
>gi|31416304|gb|AAP51236.1|BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
ISLCSCIR
>gi|31416304|gb|AAP51236.1|BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
SLCSCIRT
>gi|31416304|gb|AAP51236.1|BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
LCSCIRTV
>gi|31416304|gb|AAP51236.1|BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
CSCIRTVV
>gi|31416304|gb|AAP51236.1|BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
SCIRTVVQ
>gi|31416304|gb|AAP51236.1|BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
CIRTVVQR
>gi|31416304|gb|AAP51236.1|BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
IRTVVQRC
>gi|31416304|gb|AAP51236.1|BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
RTVVQRC
>gi|31416304|gb|AAP51236.1|BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
HVLEDPCP
>gi|31416304|gb|AAP51236.1|BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
VLEDPCPT
>gi|31416304|gb|AAP51236.1|BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
LEDPCPTG

10

20

30

40

>gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 EDPCTGY
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 DPCPTGYQ
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 PCPTGYQP
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 CPTGYQPE
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 PTGYQPEW
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 TGYQPEWN
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 GYQPEWNI
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 YQPEWNIR
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 QPEWNIRY
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 PEWNIRYN
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 EWNIRYNT
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 WNIRYNTR
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 NIRYNTRG
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 IRYNTRGN
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 TAAFRDVF
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 AAFRDVFFV
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 AFRDVFVV
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 FRDVFVVL
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 RDVFVVLN
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 DVFVVLNK
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 VFVVLNKR
 >gi|31416304|gb|AAP51236.1| BGI-PUP(GZ29-nt-Ins) [SARS コロナウイルス GZ01]
 FVVLNKRT
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 MKIILFLT
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 KIILFLT

10

20

30

40

>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1] IILFLTLI
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 ILFLTLIV
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LFLTLIVF
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 FLTLIVFT
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LTLIVFTS
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1] 10
 TLIVFTSC
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LIVFTSCE
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 IVFTSCEL
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 VFTSCELY
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 FTSCELYH
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 TSCELYHY 20
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 SCELYHYQ
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 CELYHYQE
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 ELYHYQEC
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LYHYQECV
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 YHYQECVR
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 HYQECVRG 30
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 YQECVRGT
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 QECVRGTT
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 ECVRGTTV
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 CVRGTTVL
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 VRGTTVLL
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1] 40
 RGTTVLLK
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 GTTVLLKE

>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
TTVLLKEP
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
TVLLKEPC
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
VLLKEPCP
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
LLKEPCPS
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
LKEPCPSG
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
KEPCPSGT
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
EPCPSGTY
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
PCPSGTYE
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
CPSGTYEG
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
PSGTYEGN
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
SGTYEGNS
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
GTYEGNSP
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
TYEGNSPF
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
YEGNSPFH
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
EGNSPFHP
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
GNSPFHPL
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
NSPFHPLA
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
SPFHPLAD
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
PFHPLADN
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
FHPLADNK
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
HPLADNKF
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
PLADNKFA
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
LADNKFAL
>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
ADNKFALT

10

20

30

40

>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 DNKFALTC
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 NKFALTCT
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 KFALTCTS
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 FALTCTST
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 ALTCTSTH
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LTCTSTHF
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 TCTSTHFA
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 CTSTHFAF
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 TSTHFAFA
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 STHFAFAC
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 THFAFACA
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 HFAFACAD
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 FAFACADG
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 AFACADGT
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 FACADGTR
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 ACADGTRH
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 CADGTRHT
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 ADGTRHTY
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 DGTRHTYQ
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 GTRHTYQL
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 TRHTYQLR
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 RHTYQLRA
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 HTYQLRAR
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 TYQLRARS

10

20

30

40

>gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 YQLRARSV
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 QLRARSVS
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LRARSVSP
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 RARSVSPK
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 ARSVSPKL
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 RSVSPKLF
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 SVSPKLFI
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 VSPKLFIR
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 SPKLFIRQ
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 PKLFIRQE
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 KLFIRQEE
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LFIRQEEV
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 FIRQEEVQ
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 IRQEEVQQ
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 RQEEVQQE
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 QEEVQQEL
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 EEVQQELY
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 EVQQELYS
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 VQQELYSP
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 QQELYSP
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 QELYSPLF
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 ELYSPFL
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LYSPLFLI
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1|Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 YSPLFLIV

10

20

30

40

>gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 SPLFLIVA
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 PLFLIVAA
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LFLIVAAL
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 FLIVAALV
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LIVAAALVF
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 IVAALVFL
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 VAALVFLI
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 AALVFLIL
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 ALVFLILC
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LVFLILCF
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 VFLILCFT
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 FLILCFTI
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LILCFTIK
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 ILCFTIKR
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LCFTIKRK
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 CFTIKRKT
 >gi|31581511|gb|AAP33703.1| Orf7a [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 FTIKRKTE
 >gi|30026017|gb|AAP04587.1| RNA- 指向性RNA ポリメラーゼ [SARS コロナウイルス
 Taiwan] ILSDDGVX
 >gi|30026017|gb|AAP04587.1| RNA- 指向性RNA ポリメラーゼ [SARS コロナウイルス
 Taiwan] LSDDGVXV
 >gi|30026017|gb|AAP04587.1| RNA- 指向性RNA ポリメラーゼ [SARS コロナウイルス
 Taiwan] SDDGVXVL
 >gi|30026017|gb|AAP04587.1| RNA- 指向性RNA ポリメラーゼ [SARS コロナウイルス
 Taiwan] DDGVXVLN
 >gi|30275671|gb|AAP30032.1| 推定の特異性決定されていないタンパク質 2 [SARS
 コロナウイルス BJ01] LLIQQWIP
 >gi|30275671|gb|AAP30032.1| 推定の特異性決定されていないタンパク質 2 [SARS
 コロナウイルス BJ01] LIQQWIPF
 >gi|30275671|gb|AAP30032.1| 推定の特異性決定されていないタンパク質 2 [SARS
 コロナウイルス BJ01] IQQWIPFM

>gi|30275671|gb|AAP30032.1|推定の特性決定されていないタンパク質 2 [SARS
 コロナウイルス BJ01] QQWIPFMM
 >gi|30275671|gb|AAP30032.1|推定の特性決定されていないタンパク質 2 [SARS
 コロナウイルス BJ01] QWIPFMMS
 >gi|30275671|gb|AAP30032.1|推定の特性決定されていないタンパク質 2 [SARS
 コロナウイルス BJ01] WIPFMMSR
 >gi|30275671|gb|AAP30032.1|推定の特性決定されていないタンパク質 2 [SARS
 コロナウイルス BJ01] IPFMMSRR
 >gi|30275671|gb|AAP30032.1|推定の特性決定されていないタンパク質 2 [SARS
 コロナウイルス BJ01] PFMMSRRR
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01] 10
 QIQLSLLQ
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 IQLSLLQV
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 QLSLLQVT
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 LSLQVTA
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 SLLQVTAF
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 LLQVTAFQ 20
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 LQVTAFQH
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 QVTAFQHQ
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 STALQELQ
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 TALQELQI
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 ALQELQIQ
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 LQELQIQQ 30
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 QELQIQQW
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 ELQIQQWI
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 LQIQQWIIQ
 >gi|31416297|gb|AAP51229.1|BGI-PUP2 [SARS コロナウイルス GZ01]
 QIQQWIIQF
 >gi|30795147|gb|AAP41039.1|Orf4 [SARS コロナウイルス Tor2] LLIQQWIIQ
 >gi|30795147|gb|AAP41039.1|Orf4 [SARS コロナウイルス Tor2] LIQQWIIQF
 >gi|30314342|gb|AAP06763.1|RNA-指向性RNAポリメラーゼ [SARS コロナウイルス
 Hong Kong/03/2003] QDAVASKI 40
 >gi|30314342|gb|AAP06763.1|RNA-指向性RNAポリメラーゼ [SARS コロナウイルス
 Hong Kong/03/2003] DAVASKIL

>gi|30314342|gb|AAP06763.1| RNA-指向性RNA ポリメラーゼ [SARS コロナウイルス
Hong Kong/03/2003] YVDTENNL

>gi|31581509|gb|AAP33701.1| 膜タンパク質 M [SARS コロナウイルス Frankfurt
1] LACFVLAV

>gi|31581509|gb|AAP33701.1| 膜タンパク質 M [SARS コロナウイルス Frankfurt
1] ACFVLAVV

>gi|31581509|gb|AAP33701.1| 膜タンパク質 M [SARS コロナウイルス Frankfurt
1] CFVLAVVY

>gi|31581509|gb|AAP33701.1| 膜タンパク質 M [SARS コロナウイルス Frankfurt
1] FVLAVVYR

>gi|31581509|gb|AAP33701.1| 膜タンパク質 M [SARS コロナウイルス Frankfurt
1] VLAVVYRI

>gi|31581509|gb|AAP33701.1| 膜タンパク質 M [SARS コロナウイルス Frankfurt
1] LAVVYRIN

>gi|31581509|gb|AAP33701.1| 膜タンパク質 M [SARS コロナウイルス Frankfurt
1] AVVYRINW

>gi|31581509|gb|AAP33701.1| 膜タンパク質 M [SARS コロナウイルス Frankfurt
1] VVYRINWV

>gi|30027623|gb|AAP13444.1| M タンパク質 [SARS コロナウイルス Urbani]
HLRMAGHP

>gi|30027623|gb|AAP13444.1| M タンパク質 [SARS コロナウイルス Urbani]
LRMAGHPL

>gi|30027623|gb|AAP13444.1| M タンパク質 [SARS コロナウイルス Urbani]
RMAGHPLG

>gi|30027623|gb|AAP13444.1| M タンパク質 [SARS コロナウイルス Urbani]
MAGHPLGR

>gi|30027623|gb|AAP13444.1| M タンパク質 [SARS コロナウイルス Urbani]
AGHPLGRC

>gi|30027623|gb|AAP13444.1| M タンパク質 [SARS コロナウイルス Urbani]
GHPLGRCD

>gi|30027623|gb|AAP13444.1| M タンパク質 [SARS コロナウイルス Urbani]
HPLGRCDI

>gi|30027623|gb|AAP13444.1| M タンパク質 [SARS コロナウイルス Urbani]
PLGRCDIK

>gi|30275670|gb|AAP30031.1| 推定の特性決定されていないタンパク質 1 [SARS
コロナウイルス BJ01] LCWKCKSQ

>gi|30275670|gb|AAP30031.1| 推定の特性決定されていないタンパク質 1 [SARS
コロナウイルス BJ01] CWKCKSQN

>gi|30275670|gb|AAP30031.1| 推定の特性決定されていないタンパク質 1 [SARS
コロナウイルス BJ01] WKCKSQNP

>gi|30275670|gb|AAP30031.1| 推定の特性決定されていないタンパク質 1 [SARS
コロナウイルス BJ01] KCKSQNPL

>gi|30275670|gb|AAP30031.1| 推定の特性決定されていないタンパク質 1 [SARS
コロナウイルス BJ01] CKSQNPLL

>gi|30275670|gb|AAP30031.1| 推定の特性決定されていないタンパク質 1 [SARS
コロナウイルス BJ01] KSNQNP

>gi|30275670|gb|AAP30031.1| 推定の特性決定されていないタンパク質 1 [SARS
コロナウイルス BJ01] SQNP

10

20

30

40

>gi|30275670|gb|AAP30031.1| 推定の特性決定されてないタンパク質1 [SARS
 コロナウイルス BJ01] QNPLLYDA
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 TDTIVVTA
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 DTIVVTAG
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 TIVVTAGD
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 IVVTAGDG
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 VVTAGDGI
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 VTAGDGIS
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 TAGDGIST
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 AGDGISTP
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 IGGYSEDW
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 GGYSEDWH
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 GYSEDWHS
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 YSEDWHS
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 SEDWHS
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 EDWHS
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 DWHS
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 WHS
 >gi|31416296|gb|AAP51228.1| BGI-PUP1 [SARS コロナウイルス GZ01]
 WHSGVKDY
 >gi|30795146|gb|AAP41038.1| Orf3 [SARS コロナウイルス Tor2] FMRFFTLR
 >gi|30795146|gb|AAP41038.1| Orf3 [SARS コロナウイルス Tor2] MRFFTLRS
 >gi|30795146|gb|AAP41038.1| Orf3 [SARS コロナウイルス Tor2] RFFTLRSI
 >gi|30795146|gb|AAP41038.1| Orf3 [SARS コロナウイルス Tor2] FFFTLRSIT
 >gi|30795146|gb|AAP41038.1| Orf3 [SARS コロナウイルス Tor2] FTLRSITA
 >gi|30795146|gb|AAP41038.1| Orf3 [SARS コロナウイルス Tor2] TLRSTIAQ
 >gi|30795146|gb|AAP41038.1| Orf3 [SARS コロナウイルス Tor2] LRSITAQP
 >gi|30795146|gb|AAP41038.1| Orf3 [SARS コロナウイルス Tor2] RSITAQPV
 >gi|30421455|gb|AAP30714.1| 推定のヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス
 CUHK-Su10] RSSRSRC
 >gi|30421455|gb|AAP30714.1| 推定のヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス
 CUHK-Su10] SSSRSRCN
 >gi|30421455|gb|AAP30714.1| 推定のヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス
 CUHK-Su10] SSRSRCNS

>gi|30421455|gb|AAP30714.1| 推定のヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス
 CUHK-Su10] SRSRCNSR
 >gi|30421455|gb|AAP30714.1| 推定のヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス
 CUHK-Su10] RSRCSNRN
 >gi|30421455|gb|AAP30714.1| 推定のヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス
 CUHK-Su10] SRCNSRNS
 >gi|30421455|gb|AAP30714.1| 推定のヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス
 CUHK-Su10] RCNSRNST
 >gi|30421455|gb|AAP30714.1| 推定のヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス
 CUHK-Su10] CNSRNSTP
 >gi|31540949|gb|AAP49024.1| ヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス]
 PQGLPNNI
 >gi|31540949|gb|AAP49024.1| ヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス]
 QGLPNNIA
 >gi|31540949|gb|AAP49024.1| ヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス]
 GLPNNIAS
 >gi|31540949|gb|AAP49024.1| ヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス]
 LPNNIASW
 >gi|31540949|gb|AAP49024.1| ヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス]
 PNNIASWF
 >gi|31540949|gb|AAP49024.1| ヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス]
 NNIASWFT
 >gi|31540949|gb|AAP49024.1| ヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス]
 NIASWFTA
 >gi|31540949|gb|AAP49024.1| ヌクレオキャプシドタンパク質 [SARS コロナウイルス]
 IASWFTAL
 >gi|31581505|gb|AAP33697.1| スパイクタンパク質 S [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 HTSPDVDF
 >gi|31581505|gb|AAP33697.1| スパイクタンパク質 S [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 TSPDVDFG
 >gi|31581505|gb|AAP33697.1| スパイクタンパク質 S [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 SPDVDFGD
 >gi|31581505|gb|AAP33697.1| スパイクタンパク質 S [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 PDVDFGDI
 >gi|31581505|gb|AAP33697.1| スパイクタンパク質 S [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 DVDFGDIS
 >gi|31581505|gb|AAP33697.1| スパイクタンパク質 S [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 VDFGDISG
 >gi|31581505|gb|AAP33697.1| スパイクタンパク質 S [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 DFGDISGI
 >gi|31581505|gb|AAP33697.1| スパイクタンパク質 S [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 FGDISGIN
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1| スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 RAILTAFL
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1| スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 AILTAFLP
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1| スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 ILTAFLPA

10

20

30

40

>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
LTAFLPAQ
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
TAFLPAQD
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
AFLPAQDT
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
FLPAQDTW
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
LPAQDTWG
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
NFRVVPSR
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
FRVVPSRD
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
RVVPSRDV
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
VVPSRDVV
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
VPSRDVVR
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
PSRDVVRF
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
SRDVVRFP
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
RDVVRFPN
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
VYAWERKR
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
YAWERKRI
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
AWERKRIS
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
WERKRISN
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
ERKRISNC
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
RKRISNCV
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
KRISNCVA
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
RISNCVAD
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
YRVVLSY
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
RVVLSYE
>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
VVVLSYEL

10

20

30

40

>gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 VVLSYELL
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 VLSYELLN
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 LSYELLNA
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 SYELLNAP
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 YELLNAPA
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 YKTPTLKD
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 KTPTLKDF
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 TPTLKDFG
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 PTLKDFGG
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 TLKDFGGF
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 LKDFGGFN
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 KDFGGFNF
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 DFGGFNFS
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 ILPDPLKS
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 LPDPLKST
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 PDPLKSTK
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 DPLKSTKR
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 PLKSTKRS
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 LKSTKRSF
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 KSTKRSFI
 >gi|31416295|gb|AAP51227.1|スパイク糖タンパク質 S [SARS コロナウイルス GZ01]
 STKRSFIE
 >gi|30795145|gb|AAP41037.1|スパイク糖タンパク質 [SARS コロナウイルス Tor2]
 ILDISPCA
 >gi|30795145|gb|AAP41037.1|スパイク糖タンパク質 [SARS コロナウイルス Tor2]
 LDISPCAF
 >gi|30795145|gb|AAP41037.1|スパイク糖タンパク質 [SARS コロナウイルス Tor2]
 DISPCAFG

10

20

30

40

>gi|30795145|gb|AAP41037.1| スパイク糖タンパク質 [SARS コロナウイルス Tor2]
 ISPCAFGG
 >gi|30795145|gb|AAP41037.1| スパイク糖タンパク質 [SARS コロナウイルス Tor2]
 SPCAFGGV
 >gi|30795145|gb|AAP41037.1| スパイク糖タンパク質 [SARS コロナウイルス Tor2]
 PCAFGGVS
 >gi|30795145|gb|AAP41037.1| スパイク糖タンパク質 [SARS コロナウイルス Tor2]
 CAFGGVSV
 >gi|30795145|gb|AAP41037.1| スパイク糖タンパク質 [SARS コロナウイルス Tor2]
 AFGGVSVI
 >gi|30023954|gb|AAP13567.1| 推定の E2 糖タンパク質前駆体 [SARS
 コロナウイルス CUHK-W1] AFSPAQDT
 >gi|30023954|gb|AAP13567.1| 推定の E2 糖タンパク質前駆体 [SARS
 コロナウイルス CUHK-W1] FSPAQDTW
 >gi|30023954|gb|AAP13567.1| 推定の E2 糖タンパク質前駆体 [SARS
 コロナウイルス CUHK-W1] SPAQDTWG
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] DALCEKAS
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] ALCEKASK
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] LCEKASKY
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] CEKASKYL
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] EKASKYLP
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] KASKYLP
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] ASKYLPID
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] SKYLPIDK
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] SVIDLLN
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] LLLNDFVE
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] LLNDFVEI
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] LNDFVEII
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] NDFVEIHK
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] LVDSLNE
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] VDSLNEF
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] DSDLNEFV
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] SDLNEFVS
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] DLNEFVSD
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] LNEFVSDA
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] NEFVSDAD
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] EFVSDADS
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] ANYIFWRK
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] NYIFWRKT
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] YIFWRKTN
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] IFWRKTNP
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] FWRKTNPI
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] WRKTNPIQ
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] RKTNPIQL
 >gi|31416293|gb|AAP51225.1| orflab [SARS コロナウイルス GZ01] KTNPIQLS
 >gi|30795144|gb|AAP41036.1| レプリカーゼ 1AB [SARS コロナウイルス Tor2]
 SADASTFF

10

20

30

40

>gi|30795144|gb|AAP41036.1| レプリカーゼ 1AB [SARS コロナウイルス Tor2]
 ADASTFFK
 >gi|30795144|gb|AAP41036.1| レプリカーゼ 1AB [SARS コロナウイルス Tor2]
 DASTFFKR
 >gi|30795144|gb|AAP41036.1| レプリカーゼ 1AB [SARS コロナウイルス Tor2]
 ASTFFKRV
 >gi|30795144|gb|AAP41036.1| レプリカーゼ 1AB [SARS コロナウイルス Tor2]
 STFFKRVC
 >gi|30795144|gb|AAP41036.1| レプリカーゼ 1AB [SARS コロナウイルス Tor2]
 TFFKRVCG
 >gi|30795144|gb|AAP41036.1| レプリカーゼ 1AB [SARS コロナウイルス Tor2]
 FFKRVCGV
 >gi|30795144|gb|AAP41036.1| レプリカーゼ 1AB [SARS コロナウイルス Tor2]
 FKRVCGVSA
 >gi|31581504|gb|AAP33696.1| ポリプロテイン 1ab [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 ELFYSYAI
 >gi|31581504|gb|AAP33696.1| ポリプロテイン 1ab [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 LFYSYAIH
 >gi|31581504|gb|AAP33696.1| ポリプロテイン 1ab [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 FYSYAIHH
 >gi|31581504|gb|AAP33696.1| ポリプロテイン 1ab [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 YSYAIHHD
 >gi|31581504|gb|AAP33696.1| ポリプロテイン 1ab [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 SYAIHHDK
 >gi|31581504|gb|AAP33696.1| ポリプロテイン 1ab [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 YAIHHDKF
 >gi|31581504|gb|AAP33696.1| ポリプロテイン 1ab [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 AIHHDKFT
 >gi|31581504|gb|AAP33696.1| ポリプロテイン 1ab [SARS コロナウイルス Frankfurt 1]
 IHHDKFTD

10

20

30

【 0 4 8 7 】

実施例 7 : P E T 特異的な抗体は、それらの P E T 抗原に対して高度に特異的で且つ高い親和性を有している

それぞれの抗原に対して高度に特異的であり且つ高い親和性を有することが示された多くの P E T 特異的な抗体がある。下記の表は、それぞれの抗原に対する高い親和性 (低ナノモル ~ 高ピコモルの範囲) を示す幾つかの典型的な抗体を列記している。

【 0 4 8 8 】

【表 1 4】

ペプチド配列	長さ(a a)	親和性 (nM表示のK _D)	参考文献
GATPEDLNQKLAGN	1 4	1. 4	Cell 91:799, 1997
CRGTGSYNRSSFESSSG	1 7	2. 8	JIM 249:253, 2001
NYRAYATEPHAKKKS	1 5	0. 5	EJB 267:1819, 2000
RYDIEAKVTK	1 0	3. 5	JI 169:6992, 2002
DRVYIHPF	8	0. 5	JIM 254:147, 2001
PQSDPSVFPPLS	1 2	1 6 (scF v)	NG 21:163, 2003
YDVDPYAS (HAタグ)	8	2	engineOS
MDYKAFDN (FLAGタグ)	8	2. 3	engineOS
HHHHH (HISタグ)	5	2 5	Novagen

10

【0 4 8 9】

更に、下記の表は、それぞれの抗原に対する類似のナノモル範囲の親和性を有する3つの更なるPET特異的抗体を示している。

【0 4 9 0】

【表 1 5】

PET配列	A b名	親和性 (nM表示のK _D)	親タンパク質
EPAELTDA	P 1	5	PSA
YEVQGEVF	C 1	3 1	CRP
GYSIFSya	C 2	2 0 0	CRP

20

【0 4 9 1】

これらのPETは、ニアレスト-ネイバー分析を含む本願明細書中に示した基準に基づいて選択される。以下に列記したのは、上記のPETの2つの幾つかのニアレスト-ネイバーである。

30

【0 4 9 2】

PET LSEPAELTDAVK AAの違い

- NNP1	DEP <u>V</u> ELT <u>S</u> APTGHTFS	2
- NNP2	AGEA <u>A</u> ELQDAEVESAK	2
- NNP3	LQEP <u>A</u> ELV <u>E</u> SDGVPK	3
- NNP4	AQ <u>P</u> AE <u>L</u> V <u>D</u> SSGW	3
- NNP5	GLDPTQLT <u>D</u> ALTQR	3

10

PET YEVOGEVFTK AAの違い

- NNP1	HVEV <u>N</u> GEVFQK	2
- NNP2	SYEVL <u>G</u> EEFDR	2
- NNP3	QY <u>A</u> V <u>S</u> GEIFVVD	3
- NNP4	VYEE <u>Q</u> GE <u>I</u> ILK	3
- NNP5	LYEVR <u>G</u> ET <u>Y</u> LK	3

20

【0493】

PET特異的抗体は、単に高親和性の抗体であるだけでなく、他の密接に関係するペプチド配列と非常に僅かの(あるにしても)交差反応しか示さない高い特性の抗体でもある。

【0494】

例えば、図24は、実施例5に記載したペプチド競合アッセイを利用するペプチド競合の結果を示している。左パネルは、抗体P1(PSA由来の8量体PET配列EPAELTDAに特異的)が、抗原PET(EPAELTDA)によって効果的に競合されうる(約40 nMの半最大効果的ペプチド濃度)ことを示している。しかしながら、ヒトプロテオームで見出される2又は3アミノ酸の差異しか有しないそのニアレスト-ネイバー8量体PETの2つ(EPVELTSA及びDPTQLTDA)は、たとえ1000 μM(25,000倍高濃度)でも完全に無効である。同様に、右パネルは、抗体C1(CRP由来の8量体PET配列YEVQGEVFに特異的)が、抗原PET配列YEVQGEVFによって効果的に競合されうる(約1 μMの半最大効果的ペプチド濃度)ことを示している。しかしながら、ヒトプロテオームで見出される2アミノ酸の差異しか有しないそのニアレスト-ネイバー8量体PETの2つ(VEVNGEVF及びYEVLGEEF)は、たとえ1000 μM(少なくとも1,000倍高濃度)でも完全に無効である。

30

【0495】

実施例8：抗体の交差反応性：カリクレインAb

40

カリクレインは、セリンプロテアーゼ酵素ファミリーのサブファミリーである(Bhoola等、Pharmacol Rev 44:1-80, 1992; Clements J. The molecular biology of the kallikreins and their roles in inflammation. Farmer S. 編、The kinin system 1997: 71-97 Academic Press New York)。ヒトカリクレイン遺伝子ファミリーは、最近まで、脾臓/腎臓カリクレイン(hK1)をコードするKLK1; ヒト腺カリクレイン(hK2)をコードするKLK2; 及び前立腺特異的抗原(PSA; hK3)をコードするKLK3の3つのメンバーのみを含むと考えられていた(Riegman等、Genomics 14:6-11, 1992)。これらの3つの古典的なヒトカリクレインの中で最も知られているのは、PSAであり、これは、前立腺癌の診断及びモニタリングのために重要なバイオマーカーである。最近、これらの3つの古典的なカリクレインに対する高度の相同性を有する新規なセリンプロテアーゼがク

50

ローン化された。これらの新たに同定されたセリンプロテアーゼは、今や、拡張されたヒトカリクレイン遺伝子ファミリーに含まれている。染色体19q13.4上の全ヒトカリクレイン遺伝子座は、今や、KLK1~KLK15で示される15の遺伝子を含んでおり；それらのタンパク質は、hK1~hK15として知られている(Diamandis等、Clin Chem 46:1855-1858, 2000)。

【0496】

KLK13 (以前は、KLK-L4として知られていた)は、新たに同定されたカリクレイン遺伝子の一つである。このタンパク質は、PSA及びhK2と、それぞれ47%及び45%の配列同一性を有している(Yousef等、J Biol Chem 275:11891-11898, 2000)。mRNAレベルにおいて、KLK13の発現は、乳腺、前立腺、精巣、及び唾液腺で最大である(Yousef, 前出)。KLK13の機能は、依然として未知であるが、ヒトカリクレインファミリーの他のすべてのメンバーと同様に、生物学的液体中に存在することがありそうな分泌性セリンプロテアーゼをコードするものと予想されている。PSAの癌のバイオマーカーとしての顕著な役割及び最近、この遺伝子ファミリーの他のメンバーも又潜在的な癌のバイオマーカーであることが示された(Diamandis等、Clin Biochem 33:369-375, 2000; Luo等、Clin Chem 47:237-246, 2000; Diamandis等、Clin Biochem 33:579-583, 2000; Luo等、Clin Chim Acta 7:806-811, 2001; Diamandis等、Cancer Res 62:293-300, 2002)ことから、hK13も又、病気のバイオマーカーとして有用性を有しうる。生物学的液体及び組織中のhK13タンパク質を測定するための高い感度及び特異性を有する適当な方法を開発するために、及びこのタンパク質の診断その他の臨床的応用を更に研究するために、Kapadia等(Clinical Chemistry 49:77-86, 2003)は、完全長の組換えヒトKLK13を酵母発現系中にクローン化して発現させて、KLK13特異的なモノクローナル及びポリクローナル抗体を高めた。サンドイッチ型アッセイは、KLK13抗体が、全く特異的であることを明らかにした(組換えhK1、hK2、hK3、hK4、hK5、hK6、hK7、hK8、hK9、hK10、hK11、hK12、hK13、hK14、及びhK15タンパク質は、たとえhK13の1000倍高濃度でも測定可能な読みを生成しなかった)。

【0497】

しかしながら、他の関連タンパク質への交差反応性により規定されていて何らのエピトープ情報を伴わないこの型の抗体の特異性は、しばしば、誤りであり、従って、Kapadia等に提示されたデータは、用心して解釈すべきであるということには注意すべきである。一つには、無関係のタンパク質が、ファミリータンパク質より高い配列相同性又はコンホメーション類似性を有しうる。何れのhK13抗体も他の高度に関連するファミリーのメンバーと交差反応しないというのは、まったくの幸運であろう。しかしながら、hK13抗体により認識される特定のエピトープが他のタンパク質例えば同定されてないカリクレインファミリーのメンバー中に、又はhK13の選択的スプライシング型中に現れないという保証はないのである。それ故、抗体特異性は、選択したPETに最も相同なペプチド(ニアレスト-ネイバーペプチド)に対する反応性により一層よく規定される。抗体の交差反応性は、今や、広い動的範囲でペプチド競合アッセイを利用して容易に測定することができる。

【0498】

一方、ある状況では、全タンパク質ファミリー又は該ファミリーの特定のサブセットの検出が必要とされる。例えば、多数のカリクレインが卵巣癌において過剰発現されるということが既に示されている(Yousef及びDiamandis, Minerva Endocrinol 27:157-166, 2002に総説されている)。これらのカリクレインは、凝固及び繊維素溶解の経路に類似したカスケードの酵素的経路を形成することができるという実験的証拠がある。それ故、卵巣癌関連カリクレインのサブセットに特異的な単一抗体が、臨床状況において特に興味深い。最後に、用いられる競合相手の濃度は、Kapadiaのアッセイにおいて制限されている。

【0499】

これらの問題は、本発明のアプローチを用いて、容易に取り組むことができる。例えば

10

20

30

40

50

、下記の表は、hK1～hK11(hK6及び7を除く、これらは、それらの共通のPETを有している)についての一般的なPET、並びに列記した各hKタンパク質に特異的なPETを列記している。加えて、ファミリー特異的PET及びタンパク質特異的PETの両方とも、同じトリプシンペプチド中にある。

【0500】

hK1 HSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHR

hK2 IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVHK

hK3 GSQPWQVSLFNGLSFHCAGVLVDR

10

hK4 NSQPWQVGLFEGTSLR

hK5 HECQPHSQPWQAALFQGGQQLLCGGVLVGR

hK8 EDCSPHSQPWQAALVMENELFCSGVLVHR

hK9 VLNTNGTSGFLPGGYTCFPHSQPWQAALLVQGR

hK10 LLEGDECAPHSQPWQVALYER

hK11 PNSQPWQAGLFHLTR

20

hK6 CVTAGTSCLISGWGSTSSPQLR

Hk7 VMDLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLTPK

【0501】

これらのファミリー及び個々の特異的PET抗体(又は他の適当な捕捉剤)の利用によって、同じトリプシン消化を、すべての関心あるトリプシンペプチドを捕捉するサンドイッチ型アッセイ(ファミリー特異的なPET抗体を利用)に利用し、その後、特異的なファミリーメンバーの選択的な検出/定量をすることができる(例えば、差次的に標識された個々の特異的抗体を、好ましくは単一実験で利用)。

30

【0502】

加えて、同じアプローチを利用して、任意のタンパク質の選択的スプライシング型の存在を検出することができる。例えば、下記のhK15の3つの選択的スプライシング型がある(・は、トリプシン消化部位を表す)：

hK15-V1

R*LNPQVR*PAVLPTR*CPHPGEACVVSGWGLVSHEPGTAGSPR*SQG

40

hK15-V2 R*LNPQ-----

hK15-V3 R*LNPQGDSCGPLVCGGILQGIVSGDVPCDNTTK*PGVYTK

【0503】

従って、SGWGLVSHは、V1を検出するためのPETであり、3つのニアレスト-ネイバーペプチドは、AGWGIVNH、SGWGITNH、及びSGWGMVTEである。同様に、WGDVPCDNは、V1を検出するためのPETであり、3つのニアレスト-ネイバーペプチドは、WKDVPCED、WNDAPCDS、及びWNDAPCDKである。

50

【0504】

実施例9：血清タンパク質レベルの検出

一つより多くの形態で存在し及び／又は種々の複合体で存在する抗原の測定における基本的問題のために、正常なヒト血漿において全血清タンパク質(例えば、TGF- β 1タンパク質)のレベルで合意に達することは困難でありうる。本発明は、この問題を効率的に解決する方法を提供する。

【0505】

図21は、標準化血清TGF- β 測定のためのPETベースのアッセイのデザインを示している。成熟TGF- β のC末端モノマーは、上段パネルに赤いバーとして表示されている。下の配列は、4つのTGF- β タイソ型の各々に特異的なPET及びそれらのニアレスト-ネイバーを示している。このPETベースのアッセイを利用して、TGF- β タイソ型の一つを特異的に検出することができ、並びに血清試料中に存在するすべてのTGF- β タイソ型の総量を特異的に検出することができる。

10

【0506】

一般に、ここで用いた命名法及び本発明で利用した実験室手順は、分子的、生化学的、微生物学的及び組換えDNA技術を包含する。かかる技術は、文献に詳細に説明されている。例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrook等、(1989)；「Current Protocols in Molecular Biology」第I-III巻 Ausubel, R.M.編(1994)；Ausubel等、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons, メリーランド、Baltimore在、(1989)；Perbal, 「A Practical Guide to Molecular Cloning」、John Wiley & Sons, New York (1988)；Watson等、「Recombinant DNA」、Scientific American Books, New York；Birren等(編)「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」、第1-4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)；米国特許第4,666,828号；4,683,202号；4,801,531号；5,192,659号及び5,272,057号に示された方法論；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」、第I-III巻、Cellis, J.E.編、(1994)；「Current Protocols in Immunology」第I-III巻 Coligan J.E.編、(1994)；Stites等(編)、「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange, コネチカット、Norwalk在、(1994)；Mishell及びShiigi(編)、「Selected Methods in Cellular Immunology」、W.H. Freeman and Co., New York (1980)を参照されたい；利用可能な免疫アッセイは、特許及び科学文献に詳細に記載されており、例えば、米国特許第3,791,932号；3,839,153号；3,850,752号；3,850,578号；3,853,987号；3,867,517号；3,879,262号；3,901,654号；3,935,074号；3,984,533号；3,996,345号；4,034,074号；4,098,876号；4,879,219号；5,011,771号及び5,281,521号；「Oligonucleotide Synthesis」Gait, M.J.編 (1984)；「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B.D.及びHiggins S.J.編 (1985)；「Transcription and Translation」Hames, B.D.及びHiggins S.J.編 (1984)；「Animal Cell Culture」Freshney, R.I.編 (1986)；「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press, (1986)；「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B., (1984)及び「Methods in Enzymology」第1-317巻、Academic Press；「PCR Protocols: A Guide To Method And Applications」、Academic Press, カリフォルニア、San Diego在、(1990)；Marshak等、「Strategies for Protein Purification and Characterization A Laboratory Course Manual」CSHL Press (1996)を参照されたい(これらのすべてを、参考として、本明細書中に援用する)。他の一般的参考文献が、この文献中で与えられている。それらの中の手順は、当分野で周知であると考えられるが、読者の便宜のために与えられている。それらに含まれるすべての情報を、参考として、本明細書中に援用する。

20

30

40

【0507】

同等物

当業者は、ここに記載したこの発明の特定の具体例に対する多くの同等物を認め、或は日常の実験を利用して確認することができよう。かかる同等物は、後記の請求の範囲に包

50

含まれるものである。

【図面の簡単な説明】

【0508】

【図1】インターロイキン8レセプターAの配列及びこの配列中の5量体のユニーク認識配列(URS)を描いている図である。

【図2】ヒスタミンH1レセプターの配列及びこの配列中のトリプシン消化で破壊されない5量体のユニーク認識配列(URS)又はPETを描いている図である。

【図3】複雑な試料に由来するPETの平行認識のための別の形式を描いた図である。

【図4】細胞内タンパク質及び膜タンパク質の抽出の結果の図解である。

10

【図5】PET特異的な抗体の生成のための方法の図解である。

【図6】本発明の方法における使用の前の、試料の調製の一般的計画を図解した図である。

【図7】図6に記載したような熱変性又は化学的変性を利用する血清試料の予備処理の例を図解している図である。

【図8】血清タンパク質及び細胞溶解物(MOLT4及びHeLa細胞)の熱変性及び化学的変性の結果を示している図である。

【図9】成熟TGF-β二量体の構造、及び一つの成熟TGF-βのLAP及びLTBPとの複合体形態を図解している図である。

【図10】(AKT)キナーゼの基質の同定のためのPETベースのアレイを描いている図である。

20

【図11】配列決定されたゲノムを有する生物中の又は公知のプロテオームを有する試料中の所与の長さのすべてのPETを同定するための一般的アプローチを図解している図である。

【図12】PETについて全ヒトプロテオームを検索した結果(29,076タンパク質、約1200万の4~10重複ペプチドに対応)、及び4~10の各Nについて同定されたPETの数を列記している図である。

【図13】少なくとも一つのPETを有するヒトタンパク質のパーセンテージの結果を示している図である。

【図14】更に、ヒトのプロテオームのトリプシン消化から生成したデータを与える図である。

30

【図15】複合ペプチド混合物中の標的ペプチドの特異的捕捉及び定量のための蛍光サンドイッチ免疫アッセイの図式表示である。

【図16】タグ付きPSAタンパク質を検出するために用いられるサンドイッチアッセイを図解している図である。

【図17】SHIP-2及びABL中のホスホペプチドの検出のためのPET及びそれらのニアレスト-ネイバーを図解している図である。

【図18】Nタンパク質をN+1PET特異的な抗体を用いて検出するためのサンドイッチアッセイを利用するための一般的アプローチを図解している図である。

【図19】一般的なPET及び関連キナーゼの検出に有用なキナーゼ特異的なPETを図解している図である。

40

【図20】ヒトプロテオーム及び関連コロナウイルスの両方におけるSARS特異的なPET及びそれらのニアレスト-ネイバーを示している図である。

【図21】標準化した血清TGF-β測定のためのPETベースのアッセイのデザインを示している図である。

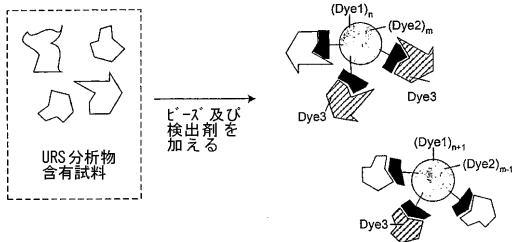
【図22】サンドイッチアッセイを利用するPET関連タンパク質修飾の検出の一般的原理を示すことに向けられた計画を示している図である。

【図23】翻訳後修飾(例えば、リン酸化又はグリコシル化)の検出の一具体例の図式表示である。

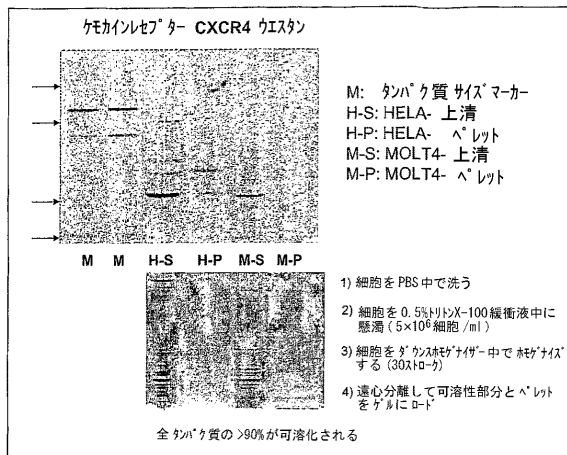
【図24】PET特異的な抗体が、PET抗原に高度に特異的であって、PET抗原のニ

50

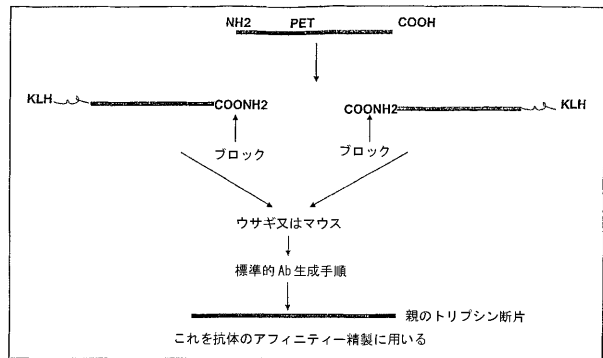
【図 3】



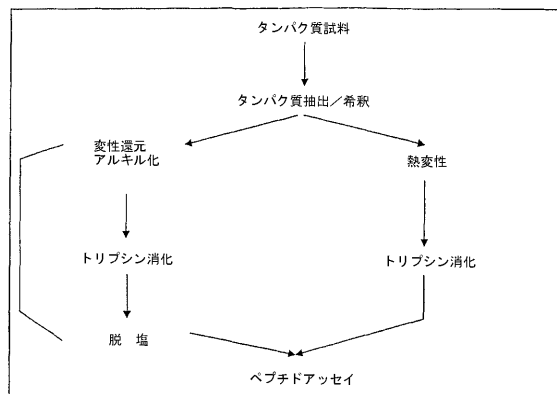
【図 4】



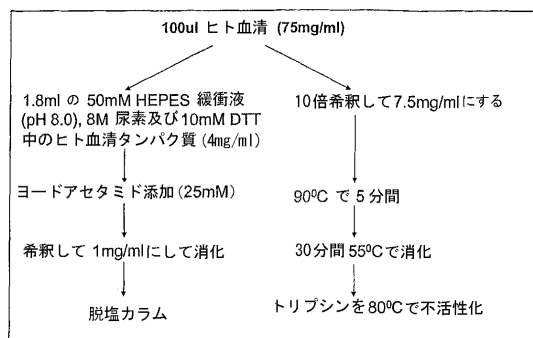
【図 5】



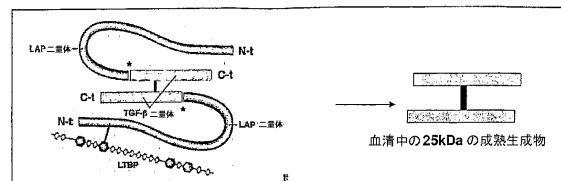
【図 6】



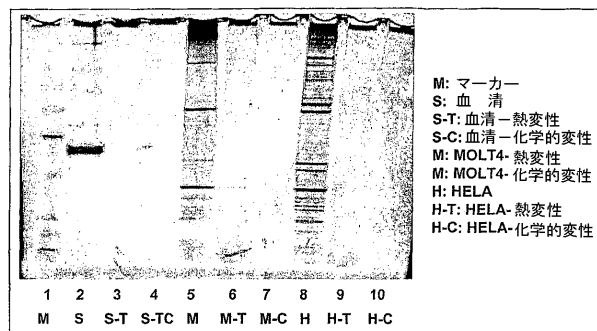
【図 7】



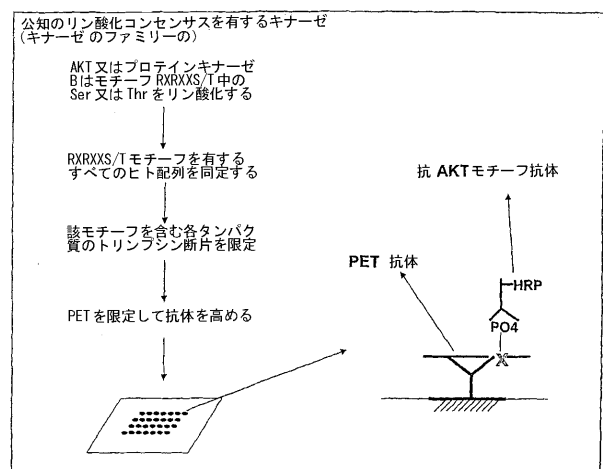
【図 9】



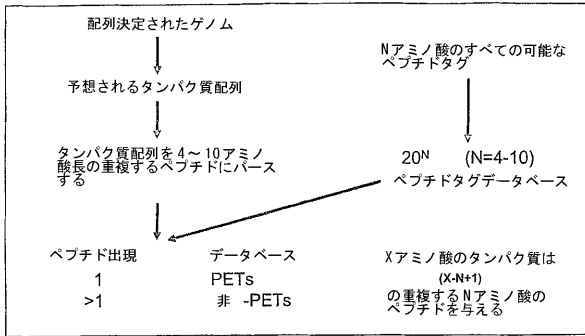
【図 8】



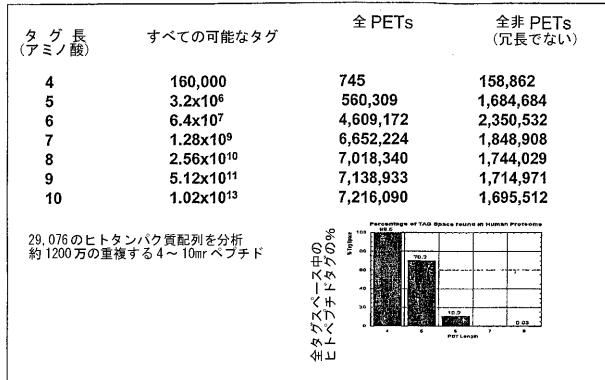
【図 10】



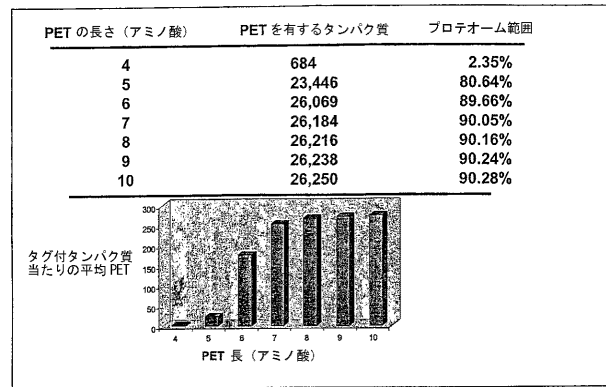
【図 1 1】



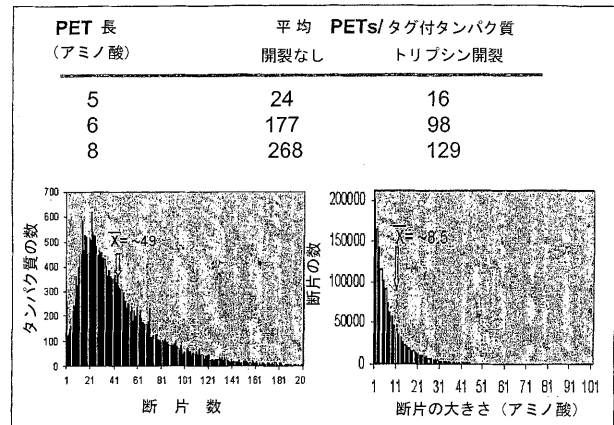
【図 1 2】



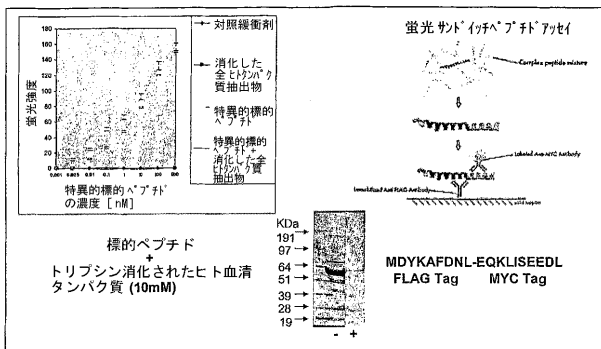
【図 1 3】



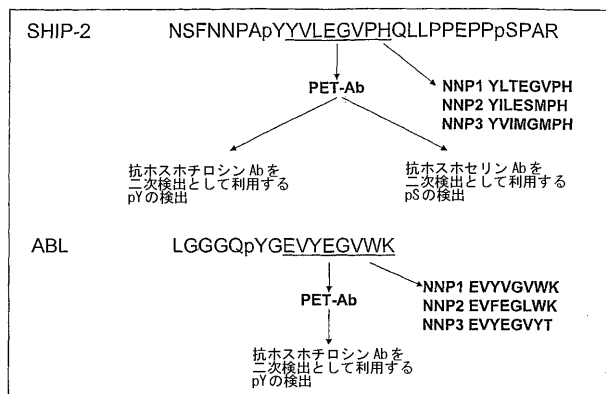
【図 1 4】



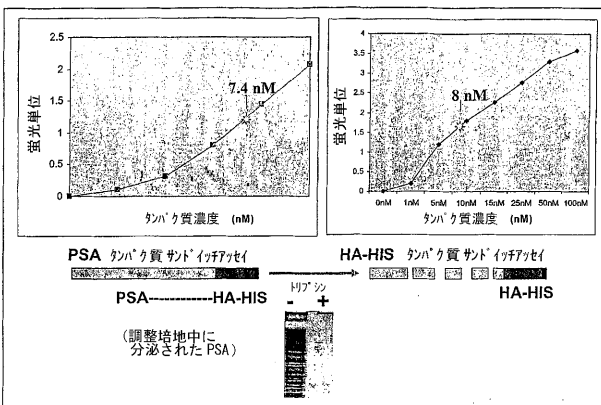
【図 1 5】



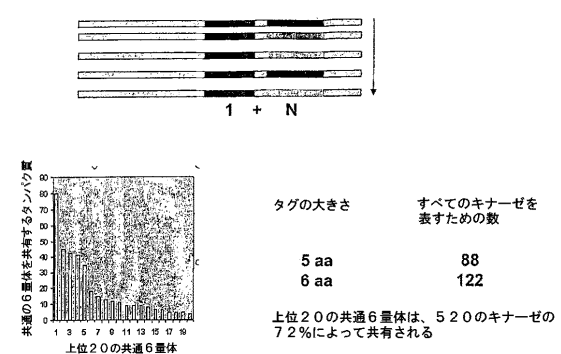
【図 1 7】



【図 1 6】



【図 1 8】



【手続補正書】

【提出日】平成18年8月1日(2006.8.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の標的タンパク質上の翻訳後修飾の存在を検出する方法であって、下記：

(1)該標的タンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該翻訳後修飾のための少なくとも1つの候補の部位を同定し；

(2)該標的タンパク質の少なくとも1つの断片のアミノ酸配列をコンピューターにより同定し、該断片は、該試料中の該標的タンパク質の処理から予想通りに生じて、該断片は、該試料中の該断片にユニークな該潜在的翻訳後修飾部位及びPET(プロテオームエピトームタグ)を含み；

(3)該PETに特異的に結合する捕捉剤を生成させて、該捕捉剤を支持体に固定化し；

(4)該試料を該処理にかけて、該断片を溶液に可溶性にして、該試料を、該処理後、該捕捉剤に接触させて；

(5)該捕捉剤に結合された該断片において、該翻訳後修飾の存否を検出する

ことを含み、適宜、更に、該捕捉剤に結合した該断片の量を定量することを含む当該方法。

【請求項2】

前記の翻訳後修飾が、アセチル化、アミド化、脱アミド化、プレニル化、ホルミル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、メチル化、ミリストイル化、リン酸化例えばチロシン、セリン若しくはスレオニンに対するリン酸化、ユビキチン化、リボシル化又は硫酸化である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記のアミノ酸配列のコンピューター分析のステップが、該PETを、pI、電荷、立体構造、溶解度、疎水性、極性及び溶媒露出領域の少なくとも1つをも含む基準に基づいてを同定するニアレスト-ネイバー分析を含み、適宜、(3)で生成した捕捉剤の、少なくとも一種のPETのニアレスト-ネイバーに対する特異性を測定すること(例えば、ペプチド競合アッセイを利用)を更に含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記のPETの長さを、5～10アミノ酸、10～15アミノ酸、15～20アミノ酸、20～25アミノ酸、25～30アミノ酸、又は30～40アミノ酸から選択する、請求項1～3の何れかに記載の方法。

【請求項5】

前記の捕捉剤が、完全長の抗体、又はFab断片、F(ab')₂断片、Fd断片、Fv断片、dAb断片、単離された相補性決定領域(CDR)、一本鎖抗体(scFv)、又はこれらの誘導体から選択する機能的な抗体断片であるか又は、ヌクレオチド；核酸；PNA(ペプチド核酸)；タンパク質；ペプチド；炭水化物；人工ポリマー；小型有機分子；アプタマー又は足場ペプチドであり、適宜、該捕捉剤が該PETに対する選択性について変性条件下で最適化される、請求項1～4の何れかに記載の方法。

【請求項6】

前記の処理が、前記の試料の、プロテアーゼ、化学薬剤、物理的剪断、又は超音波処理による変性、例えば熱変性及び/若しくは化学的変性及び/又は断片化(トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、パパイン、カルボキシペプチダーゼ、カルパイン、ズブチリシン、gluc-C、エンドリysin-C、又はプロテイナーゼKから選択するプロテアーゼなどによる)であり、好ましくは、前記の翻訳後修飾を保存する条件下で実施する、請求

項 1 ~ 5 の何れかに記載の方法。

【請求項 7】

前記の試料が、膜結合タンパク質の処理により生成される、請求項 1 ~ 6 の何れかに記載の方法。

【請求項 8】

前記の P E T 及び翻訳後修飾のための候補の部位が、重複しない、請求項 1 ~ 7 の何れかに記載の方法。

【請求項 9】

ステップ(5)が、前記の翻訳後修飾に特異的な第二捕捉剤を利用することにより実施され、前記の第二捕捉剤が、酵素(例えば、H R P)、蛍光標識、着色染料、化学発光性化合物、コロイド粒子、放射性同位体、近赤外線染料、D N A デンドリマー、水溶性量子ドット、ラテックスビーズ、セレン粒子、又はユーロピウムナノ粒子から選択する検出可能な部分により標識され、好ましくは、前記の翻訳後修飾が、リン酸化であり、前記の第二の捕捉剤が、リン酸化チロシン、リン酸化セリン、又はリン酸化スレオニンに特異的な標識された第二抗体である、請求項 1 ~ 8 の何れかに記載の方法。

【請求項 10】

ステップ(3)が、動物を前記の P E T 配列を含む抗原で免疫化することにより実施され、好ましくは、前記の P E T 配列の N 又は C 末端、又は両方が、遊離の N 又は C 末端、又は両方を排除するためにブロックされる(例えば、P E T 配列を異質のキャリアーポリペプチド例えば K L H 又は B S A に融合することによってブロックされ、又は小さい化学基によってブロックされる)、請求項 1 ~ 9 の何れかに記載の方法。

【請求項 11】

プロテオーム中のキナーゼのすべての潜在的基質を同定するための捕捉剤のアレイであって、各々固体支持体(ビーズ又はアレイデバイス(表面に配列された前記の捕捉剤の正体をコード化する様式の)など)上の別々のアドレス可能な位置に固定された複数の捕捉剤(抗体又はその抗原結合部分など)を含み、各捕捉剤は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想された通りに生じるペプチド断片とユニークに結びついた P E T に特異的に結合し、該ペプチド断片は、該キナーゼの少なくとも一つの潜在的なリン酸化部位を含み、適宜、10 ~ 100 以上の異なる捕捉剤を含む、当該アレイ。

【請求項 12】

試料中でキナーゼの潜在的基質を同定する方法であって、下記：

(1) プロテオーム中のすべてのタンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、前記のキナーゼのすべての候補のリン酸化部位を同定し；

(2) 少なくとも1つの前記の候補のリン酸化部位を含むすべてのペプチド断片をコンピューターにより同定し、該断片は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想されたとおりに生成し；

(3) (2)で同定された前記の各断片について、前記の試料中の前記の断片にユニークな1つの P E T を同定し；

(4) (3)で同定された各 P E T に特異的な捕捉剤をそれぞれ獲得して、該捕捉剤を固定化して請求項 11 に記載のアレイを生成し；

(5) 該捕捉剤のアレイを前記の処理にかけた前記のプロテオームの試料と接触させ、そして

(6) 前記の捕捉剤に結合した任意の断片中のリン酸化残基の存在を検出することを含み、特定の捕捉剤に結合した特定の断片中のリン酸化残基の存在が、該特定の断片が由来したタンパク質が該キナーゼの基質であることを示す、当該方法。

【請求項 13】

プロテオーム中の翻訳後修飾を触媒する酵素のすべての潜在的基質を同定するための捕捉剤のアレイであって、各々固体支持体上の別々のアドレス可能な位置に固定された複数の捕捉剤を含み、各捕捉剤は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想された通りに生じるペプチド断片とユニークに結びついた P E T に特異的に結合し、該ペ

チド断片は、該酵素の少なくとも一つの潜在的な翻訳後修飾部位を含んでいる、当該アレイ。

【請求項 14】

アセチル化、アミド化、脱アミド化、プレニル化、ホルミル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、メチル化、ミリストイル化、リン酸化、ユビキチン化、リボシル化又は硫酸化から選択する翻訳後修飾を触媒する酵素の潜在的基質を試料中で同定する方法であって、下記：

(1) プロテオーム中のすべてのタンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該酵素のすべての候補の翻訳後修飾部位を同定し；

(2) 少なくとも1つの該候補の翻訳後修飾部位を含むすべてのペプチド断片をコンピューターにより同定し、該断片は、該プロテオーム中のすべてのタンパク質の処理から予想された通りに生成し；

(3) (2)で同定された各断片について、該試料中の該断片に対してユニークな一つのPETを同定し；

(4) (3)で同定された各PETに特異的な捕捉剤をそれぞれ獲得して、該捕捉剤を請求項13に記載のアレイにおいて固定化し；

(5) 該捕捉剤のアレイを、該処理にかけた該プロテオームの試料と接触させ、そして

(6) 該捕捉剤に結合した任意の断片内の該翻訳後修飾を有する残基の存在を検出することを含み、特定の捕捉剤に結合した特定の断片内の該翻訳後修飾を有する残基の存在が、該特定の断片が由来したタンパク質が該酵素の基質であることを示す、当該方法。

【請求項 15】

プロテオーム内の選択した数のシグナル変換経路(少なくとも3、5、10、20、50、100、200、500、又は1000のシグナリング経路)のどれが刺激にตอบสนองして活性化され又は阻害されるかを測定するための捕捉剤のアレイであって、下記を含む当該アレイ：

各々固体支持体上の別々のアドレス可能な位置に固定された複数の捕捉剤であって、該捕捉剤の各々は、該シグナル変換経路の少なくとも一種のキータンパク質の処理から予想されたとおりに生成するペプチド断片と結びついたユニークなPETに特異的に結合し、該ペプチド断片は、該経路の活性化又は阻害に際して予想通りに翻訳後修飾(チロシン、セリン、又はスレオニン残基におけるリン酸化など)される少なくとも1つの部位を包含し；該シグナル変換経路の各々は、少なくとも1つのキータンパク質により表される。

【請求項 16】

すべての捕捉剤が、同じシグナル変換経路に属するタンパク質に対して特異的であり、且つ/又は該シグナル変換経路のすべてのタンパク質が、予想通りに翻訳後修飾され、表される、請求項15に記載のアレイ。

【請求項 17】

前記のキータンパク質の少なくとも一つが、少なくとも2つのシグナル変換経路の活性化又は阻害に際して翻訳後修飾される、請求項15又は16に記載のアレイ。

【請求項 18】

プロテオームに由来する試料中の選択した数のシグナル変換経路のどれが刺激(薬物の候補の類似体による刺激など)にตอบสนองして活性化され又は阻害されるのかを測定するために、請求項15に記載のアレイを利用する方法であって、下記：

(1) 該試料を該刺激に投じ；

(2) 該試料を請求項15に記載の処理にかけて、請求項15に記載のペプチド断片を溶液に可溶性にし；

(3) 該処理後に該試料を請求項15に記載のアレイに接触させ；

(4) 該捕捉剤に結合した任意の断片内の翻訳後修飾された残基の存在を検出し及び/又はその量を定量する

ことを含み、該刺激後の、該アレイ上の特定の捕捉剤に結合した特定の断片中の翻訳後修飾された残基の存在及び/又はその量の変化が、該特定の断片により表されるシグナル変

換経路が活性化又は阻害されたことを示す、当該方法。

【請求項 19】

前記のシグナル変換経路が、前記の薬物の副作用を媒介する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

複数の捕捉剤を含む組成物であって、前記の複数の捕捉剤が、集合的に、一生物のプロテオーム中の翻訳後修飾酵素のすべての潜在的基質と特異的に相互作用することができ、該捕捉剤の各々が、翻訳後修飾部位を含む該潜在的基質又はその断片中の唯一つの P E T を認識して相互作用することができる、当該組成物。

【請求項 21】

宿主動物を、タンパク質の存在又は過剰発現と関連する病気に対して免疫化する方法であって、下記を含む当該方法：

- (1) 該タンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該宿主動物のプロテオーム内の該タンパク質にユニークな少なくとも一種の P E T を同定し；
- (2) (1) で同定された少なくとも一種の P E T を含むペプチド免疫原を該宿主動物に投与する。

【請求項 22】

免疫組織化学で使用するためのマーカータンパク質に特異的な抗体を生成する方法であって、該マーカータンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該マーカータンパク質にユニークな少なくとも一種の P E T を同定することを含み、該 P E T が該マーカータンパク質の表面に位置された、当該方法。

【請求項 23】

試料中の関連タンパク質のファミリーを同時に明確に検出／定量する方法であって、下記を含む当該方法：

- (1) タンパク質の試料中に存在することが予想される関連タンパク質の該ファミリーについてのアミノ酸配列をコンピューター分析して、該タンパク質のファミリーにユニークな共通 P E T 配列を同定し；
- (2) 該共通 P E T に選択的且つ特異的に結合する捕捉剤を生成し；
- (3) 該試料を (2) で同定された捕捉剤と接触させ；そして
- (4) 該捕捉剤に結合したタンパク質の存在を検出し及び／又はその量を測定することを含み、それにより、該試料中の関連タンパク質のファミリーを同時に検出／定量する。

【請求項 24】

試料中の標的タンパク質の P E T と関係する検出／定量における利用のために試料を処理する方法であって、該試料の全タンパク質を変性させる (熱変性又は化学的変性などにより) こと、及び／又は該試料の全タンパク質をプロテアーゼ、化学的薬剤、物理的剪断、又は超音波処理によって断片化することを含む、当該方法。

【請求項 25】

P E T 配列に特異的な抗体を生成する方法であって、該方法は、下記：

- (1) 動物に該 P E T 配列を含むペプチド免疫原を投与し；
- (2) 該 P E T 配列に特異的な抗体を、該 P E T 配列を含むペプチド断片を利用してスクリーニングする

ことを含み、該ペプチド断片は、予想された通りに、該 P E T 配列を含むタンパク質の処理から生成する、当該方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No
PCT/US2004/038283

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G06F19/00 G01N33/68		
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) G06F 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/137119 A1 (KATZ EMIL ISRAEL) 26 September 2002 (2002-09-26) the whole document	1-43
A	WO 97/07132 A (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH OR; WANG, LINFA) 27 February 1997 (1997-02-27) the whole document	1-43
A	LIU AGATHA H ET AL: "Motif-based construction of a functional map for mammalian olfactory receptors." GENOMICS, vol. 81, no. 5, May 2003 (2003-05), pages 443-456, XP002336906 ISSN: 0888-7543 the whole document	1-43
-/-		
<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 20 July 2005		Date of mailing of the international search report 22 12. 2005
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 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lüdemann, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/US2004/038283

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2004/046164 A (ENGINEOS, INC; BENKOVIC, STEPHEN, J; CHAN, JOHN, W; LEE, FRANK, D; MEN) 3 June 2004 (2004-06-03) the whole document -----	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/038283

Box 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.: 44-92
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 93-102, 118-125 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 44-79, 84-88
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:
1-43

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2004/038283

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 93-102, 118-125 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 44-92

Claims: 80-83, 89-92: Rule 39.1(iii) PCT - Scheme, rules and method for doing business

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 44-79, 84-88

In view of the large number of independent claims and also the wording of the claims presently on file, which render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought, the present application fails to comply with the clarity and conciseness requirements of Article 6 PCT (see also Rule 6.1(a) PCT) to such an extent that a meaningful search is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and concise), namely claims 1-43.

Present claims 84-88 relate to an extremely large number of possible compounds. In fact, the claims contain so many options, that a lack of clarity (and conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and concise), namely claims 37-43.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/US2004/038283

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-43

A method for detecting the presence of a post-translational modification on a target protein within a sample, comprising steps 1)-5) of claim 1 and an array of capture agents for identifying all potential substrates of a kinase within a proteome according to claim 37.

2. claims: 93-100

A method of immunizing a host animal against a disease condition associated with the presence of an overexpression of a protein comprising the steps 1) and 2) of claim 93.

3. claims: 101-102, 118-125

A method of generating antibodies specific for a marker protein for use in immunohistochemistry, the method comprising computationally analyzing the amino acid sequence of said marker protein to identify one or more PET's unique to said marker protein, wherein said PET is located on the surface of said marker protein.

4. claims: 103-107

A method for simultaneous unambiguous detection/quantification of a family of related proteins in a sample, comprising steps 1)-4) of claim 103.

5. claims: 108-116

A method of processing a sample for use in PET-associated detection/quantitation of a target protein therein, the method comprising denaturing all proteins of said sample and/or fragmenting all proteins of said sample by a protease, etc.

6. claim: 117

A SARS virus-specific PET amino acid sequence as listed in Table SARS.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/038283

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002137119 A1	26-09-2002	JP 2002360278 A	17-12-2002
WO 9707132 A	27-02-1997	CA 2229540 A1	27-02-1997
		EP 0845004 A1	03-06-1998
		JP 11510683 T	21-09-1999
WO 2004046164 A	03-06-2004	AU 2003302118 A1	15-06-2004
		CA 2485560 A1	03-06-2004
		EP 1532439 A2	25-05-2005

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 フランク ディー . リー

アメリカ合衆国 0 2 4 6 7 マサチューセッツ、チェスナット ヒル、ノーフォーク ロード
6

(72)発明者 ジュン メング

アメリカ合衆国 0 2 4 5 8 マサチューセッツ、ニュートン、ジョージ ストリート 1 1

(72)発明者 デイビッド リビングストン

アメリカ合衆国 0 2 8 0 6 ロードアイランド、バリントン、ラムスティック ロード 2 0 6

Fターム(参考) 4B064 AG26 DA13

专利名称(译)	蛋白质组缩貌标签及其在蛋白质修饰分析中的使用方法		
公开(公告)号	JP2007511837A	公开(公告)日	2007-05-10
申请号	JP2006539990	申请日	2004-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	李针托米生物系统公司		
申请(专利权)人(译)	Ipitomi生物系统公司		
[标]发明人	フランクディーリー ジュンメング デイビッドリビングストン		
发明人	フランク ディー.リー ジュン メング デイビッド リビングストン		
IPC分类号	G06F19/00 G01N33/53 G01N37/00 C12P21/08 C12Q1/26 C12Q1/34 C12Q1/48 G01N33/68		
CPC分类号	B82Y5/00 B82Y10/00 C12Q1/26 C12Q1/34 C12Q1/48 C12Q1/485 G01N33/6803 G01N33/6842		
FI分类号	G06F19/00.600 G01N33/53.D G01N37/00.102 C12P21/08.ZNA		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/DA13		
代理人(译)	吉田拓海 中島卓		
优先权	10/712425 2003-11-13 US		
其他公开文献	JP2007511837A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过测量样品中一组蛋白质的独特特征识别序列(蛋白质组表位),可以确定样品中蛋白质的存在,特别是具有各种翻译后修饰(磷酸化,糖基化,甲基化,乙酰化等)的蛋白质。标签或PET)并利用与所述序列相互作用的一种或多种捕获剂。还提供了包含这些捕获剂或PET的阵列。

