

(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2004-515786
(P2004-515786A)

(43) 公表日 平成16年5月27日(2004.5.27)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 33/53
GO 1 N 27/62
GO 1 N 33/566
GO 1 N 37/00
// GO 1 N 30/88

F I

GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/53 M
GO 1 N 27/62 D
GO 1 N 27/62 V
GO 1 N 33/566

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-549970 (P2002-549970)
(86) (22) 出願日 平成13年12月13日 (2001.12.13)
(85) 翻訳文提出日 平成15年6月16日 (2003.6.16)
(86) 国際出願番号 PCT/US2001/049030
(87) 国際公開番号 W02002/048716
(87) 国際公開日 平成14年6月20日 (2002.6.20)
(31) 優先権主張番号 60/255,577
(32) 優先日 平成12年12月14日 (2000.12.14)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

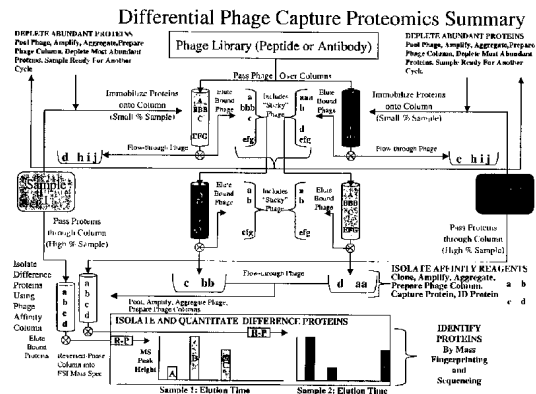
(71) 出願人 503216579
ポール・ストルーバント
アメリカ合衆国マサチューセッツ州017
60, ナティック, モーニングサイド・ア
ベニュー 30
(74) 代理人 100089705
弁理士 社本 一夫
(74) 代理人 100076691
弁理士 増井 忠式
(74) 代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74) 代理人 100080137
弁理士 千葉 昭男
(74) 代理人 100096013
弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的ファージ捕捉プロテオミクス

(57) 【要約】

本明細書に開示されるのは、親和性クロマトグラフィー及びファージディスプレイ技術を用いて、2つの生物学上のサンプルの間で異なる蛋白質と他の生物分子を同定し、単離し、そして比較するための方法である。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

蛋白質、ポリペプチド又は他の生物分子の同定方法であって、当該方法は、

(a) 第 1 のタイプの個体からの複合生物学サンプルを支持体に接着させることによりアレイを創製すること；

(b) 第 2 のタイプの個体からの複合生物学サンプルを支持体に接着させることによりアレイを創製すること；

(c) ペプチド - 核酸カップリングされたライブラリーを工程 (a) において形成されたアレイに少なくとも 1 回暴露すること；そして

(d) 第 1 の生成物を工程 (b) において形成されたアレイに少なくとも 1 回暴露することにより第 2 の生成物を創製すること
を含む。

10

【請求項 2】

工程：

(e) ペプチド - 核酸カップリングされたライブラリーを工程 (b) において形成されたアレイに少なくとも 1 回暴露することにより第 3 の生成物を創製すること；及び

(f) 第 3 の生成物を工程 (a) において形成されたアレイに少なくとも 1 回暴露することにより第 4 の生成物を創製すること

を含む、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 3】

さらに、工程：

(g) 第 2 の生成物と第 4 の生成物を比較すること

を含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

さらに、工程：

(g) 第 2 の生成物と第 4 の生成物を比較することによりプールされた生成物を生成し；
そして

(h) プールされた生成物を増幅すること

を含む、請求項 2 記載の方法。

30

【請求項 5】

さらに、工程：

(i) 増幅されたプール生成物の一部を支持体に接着させることによりアレイを提供し；
そして

(j) 第 1 のタイプ又は第 2 のタイプの個体からの複合生物学サンプルを工程 (i) により形成されたアレイに少なくとも 1 回暴露することにより第 5 の生成物を提供すること

を含む、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

さらに、工程：

(k) 第 1 のタイプ又は第 2 のタイプの個体からの複合生物学サンプルを工程 (i) により形成されたアレイに少なくとも 1 回暴露することにより第 6 の生成物を提供するが、但し、複合生物学サンプルは工程 (j) において使用されたのとは異なるタイプの個体からである、

請求項 5 記載の方法。

40

【請求項 7】

さらに、工程：

(i) 第 5 の生成物と第 6 の生成物を比較すること

を含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

複合生物学サンプルが組織由来である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

50

組織が、上皮、結合、筋肉及び神経からなる群から選択される、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

複合生物学サンプルが体液由来である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

体液が、髄液、血液、唾液、粘液、涙、涙液、精液、汗、乳汁、胆汁、血漿、血清、リンパ液、尿、胸膜流出液、気管支洗浄液、腹水及び滑液からなる群から選択される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

体液が髄液である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

複合生物学サンプルが器官の種類からである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

器官の種類が、皮膚、骨、軟骨、腱、靭帯、骨格筋、平滑筋、心臓、血液、血管、脳、脊髄、末梢神経、鼻、気管、肺、口、食道、胃、腸、腎臓、子宮、尿管、尿道、膀胱、視床下部、下垂体、甲状腺、膵臓、副腎、卵巣、卵管、膣、乳腺、精巣、精嚢、陰茎、リンパ、リンパ節、リンパ管、白血球細胞、T-細胞及びB-細胞からなる群から選択される、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

複合生物学サンプルが培養された細胞種である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

細胞種が上皮組織、結合組織、筋肉組織及び神経組織からなる群から選択される、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

複合生物学サンプルが疾患個体からであり、そして他の複合生物学サンプルが非疾患個体からである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】

複合生物学サンプルの一つが治療された個体からであり、そして他の複合生物学サンプルが非治療個体からである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 19】

ライブラリーがファージディスプレイライブラリーである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 20】

ライブラリーが抗体ライブラリーである、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

ライブラリーが組換えディスプレイライブラリーである、請求項 19 記載の方法。

【請求項 22】

ライブラリーが合成ペプチドライブラリーである、請求項 19 記載の方法。

【請求項 23】

第 1 生成物が、暴露工程 (c) の間にアレイに結合して次に解放された物質を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 24】

第 2 生成物が、暴露工程 (d) の間にアレイに結合しなかった物質を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 25】

第 3 生成物が、暴露工程 (e) の間にアレイに結合して次に解放された物質を含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 26】

第 4 生成物が、暴露工程 (f) の間にアレイに結合しなかった物質を含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 27】

工程 (a) 又は (b) の複合生物学サンプルを上記接着の前に処理することをさらに含む

10

20

30

40

50

、請求項 1 記載の方法。

【請求項 28】

処理が変性を含む、請求項 27 記載の方法。

【請求項 29】

工程 (a) 又は (b) の支持体が固相支持体である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 30】

工程 (a) の支持体及び工程 (b) の支持体が共に固相支持体である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 31】

工程 (a) 又は工程 (b) のアレイが複合生物学サンプルへの支持体の架橋結合により創製される、請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 32】

工程 (a) のアレイ及び工程 (b) のアレイが共に複合生物学サンプルへの支持体の架橋結合により創製される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 33】

第 5 生成物が暴露工程 (j) の間にアレイに結合して次に解放される物質を含む、請求項 5 記載の方法。

【請求項 34】

第 6 生成物が暴露工程 (k) の間にアレイに結合して次に解放される物質を含む、請求項 6 記載の方法。 20

【請求項 35】

第 2 生成物を精製する工程をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 36】

第 4 生成物を精製する工程をさらに含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 37】

第 2 生成物を質量測定分析により分析することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 38】

第 4 生成物を質量測定分析により分析することをさらに含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 39】

第 5 生成物を質量測定分析により分析することをさらに含む、請求項 5 記載の方法。 30

【請求項 40】

第 6 生成物を質量測定分析により分析することをさらに含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 41】

第 5 及び第 6 生成物を質量測定分析を用いて比較する、請求項 7 記載の方法。

【請求項 42】

ライブラリーを工程 (a) により形成されたアレイに 1 回より多く暴露することにより第 1 生成物を創製する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 43】

第 1 生成物を工程 (b) により形成されたアレイに 1 回より多く暴露することにより第 2 生成物を創製する、請求項 1 記載の方法。 40

【請求項 44】

ライブラリーを工程 (b) により形成されたアレイに 1 回より多く暴露することにより第 3 生成物を創製する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 45】

第 3 生成物を工程 (a) により形成されたアレイに 1 回より多く暴露することにより第 4 生成物を創製する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 46】

工程 (j) の複合生物学サンプルを工程 (i) により形成されたアレイに 1 回より多く暴露することにより第 5 生成物を創製する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 47】

工程 (k) の複合生物学サンプルを工程 (i) により形成されたアレイに 1 回より多く暴露することにより第 6 生成物を創製する、請求項 6 記載の方法。

【請求項 48】

工程 (c) 及び工程 (f) のアレイが同じアレイである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 49】

工程 (c) 及び工程 (f) のアレイが別のアレイである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 50】

工程 (d) 及び工程 (e) のアレイが同じアレイである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 51】

工程 (d) 及び工程 (e) のアレイが別のアレイである、請求項 2 記載の方法。

10

【請求項 52】

工程 (j) 及び工程 (k) のアレイが同じアレイである、請求項 6 記載の方法。

【請求項 53】

工程 (j) 及び工程 (k) のアレイが異なるアレイである、請求項 6 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、ファージディスプレイ技術を用いて蛋白質と他の生物学上の分子を同定及び単離する方法に関する。

【0002】

20

発明の背景

広範囲の生物学上のプロセスに関与する分子を同定して特性決定し、そしてこれらのプロセスを変調することができる新規な分子を発見することに関して、特に医薬及び農学の分野において増加する要求がある。新規な生物活性化合物を検索するための一つの方法は、天然物質又は合成された分子のライブラリーをスクリーニングすることであり、単純な結合反応から生理学的調製物を合成することまで複雑に変動し得るアッセイ技術を用いる。不幸なことに、多数の集団又はレパートリーから興味のある分子を選択することは、時間を浪費して経費がかさみ、そしてしばしば次の調査及び開発を必要とするリードを提供するだけである。

【0003】

30

最近、ライブラリーの生成及びこのアプローチの効率及び有効性を改善してきたそれらの選択の方法の両方においていくつかの発展があった。ファージディスプレイ技術は 1990 年代に大きく発展し、蛋白質 (又はペプチド) をファージウイルス粒子の表面上にディスプレイさせるインビトロ選択技術であり、当該蛋白質をコードする DNA がウイルス粒子中に含まれる。ディスプレイされた蛋白質とそれをコードする DNA の間のこの直接の物理的なつながりは、選択及び増幅の連続回転を可能にさせる。大きなファージディスプレイライブラリー (「PDLs」) を標的分子に対して生成してスクリーニングすることができる。これらの PDLs は様々なマクロ分子、例えば、受容体、ポリペプチド、酵素、糖質、及び抗体に対して有力なリガンドを示す、莫大な数の異なるペプチドを包含するかもしれない。個々のファージはディスプレイされた蛋白質と同族のリガンドとの相互作用によりライブラリーから捕捉することができ、そして捕捉されたファージは細菌の感染により増幅させることができる。即ち、ファージディスプレイ技術は標的分子に結合するペプチドの選択のための極めて強力な手段である。これらのペプチドは、例えば、ワクチン中の抗原として、酵素阻害剤として、又は受容体のアゴニスト又はアンタゴニストとして、多数の応用を見いだすかもしれない。

40

【0004】

診断試験及び疾患を治療するための薬剤を開発するための一つの戦略は、疾患の進行に因果関係を有する鍵となる細胞成分、例えば蛋白質の同定を含む。これはしばしば疾患に罹った個体と健康な個体の間か又は治療された患者と未治療の患者の間の蛋白質組成又は蛋白質作用の違いを観察することにより達成することができる。不幸なことに、生物分子を

50

分析する現在の方法は時間を浪費して高価であり、そして、検出、イメージ化、精製、及び分析において非効率さを被る。即ち、生物学上のサンプル間の特定の差異及び変化を検出する方法に関する要求が存在する。そのような方法は、診断及び薬剤の開発のための生物学上の標的の同定を促進するはずである。

【0005】

ゲノミクスによるアプローチは生物学上のプロセスの遺伝学上の基礎に関する我々の認識を前進させたが、顕著な限界を有する。例えば、同定された遺伝子、特に部分的なcDNA配列によりコードされる生成物の機能はしばしば未知であり、そして蛋白質の翻訳後修飾についての情報は、その遺伝子の配列の知見から、まれに演繹することができる。大部分の蛋白質は翻訳後修飾(例えばグリコシル化及びリン酸化)を経ることが今や明らかであり、それらの生化学特性に深く影響し得る。さらに、蛋白質の発現はしばしば翻訳後修飾制御に供されて、mRNAの細胞のレベルはその遺伝子産物の発現レベルと相関する必要はない。

10

【0006】

これらの理由から、蛋白質の発現及び糖質の発現のパターン、及び一般には翻訳後修飾のパターンを、生物学上のプロセス又は疾患のプロセスにおいて、蛋白質、オリゴサッカライド、及び他の生物分子の直接の分析を通して研究することにより、ゲノミックのデータを補足する必要がある。プロテオミクスの急速に成長する分野は、mRNAレベルよりも蛋白質のレベルにおける発現を検出及び定量することにより、正常状態と疾患状態の間の細胞蛋白質レベルのバリエーションを研究しようと努める。しかしながら、当該プロテオミクスアプローチは多くの障害に直面しており、サンプルの複雑さ、大きく相対的な豊富さの範囲(*large relative abundance range*)、及び蛋白質の定量を含む。技術的上の制約は、これまで、迅速であり、費用上有効であり、再現性があり、そして組織的な、生物学上のサンプル中に存在する蛋白質及び他の生物分子の分析法を妨げてきた。

20

【0007】

発明の概要

本発明は、広い範囲の相対的過剰さにわたる、サンプル間で異なる蛋白質と他の生物分子の単離と定量化の方法を特徴とする。発明は、公知の種、又は新規な配列又は新規な翻訳後修飾を有する種としての蛋白質の同定を提供し、そしてそのような蛋白質に対する特定の親和性試薬の特性決定と単離のための手段を供給する。

30

【0008】

一の側面において、発明は、蛋白質、ポリペプチド又は他の生物分子の同定方法を提供し、(a)第1のタイプの個体からの複合生物学サンプルを支持体に接着させることによりアレイを創製すること；(b)第2のタイプの個体からの複合生物学サンプルを支持体に接着させることによりアレイを創製すること；(c)ペプチド-核酸カップリングされたライブラリーを工程(a)において形成されたアレイに少なくとも1回暴露すること；及び(d)第1の生成物を工程(b)において形成されたアレイに少なくとも1回暴露することにより第2の生成物を創製する工程を含む。

40

【0009】

発明の一の態様において、上記方法は、さらに、(e)ペプチド-核酸カップリングされたライブラリーを工程(b)において形成されたアレイに少なくとも1回暴露することにより第3の生成物を創製し；(f)第3の生成物を工程(a)において形成されたアレイに少なくとも1回暴露することにより第4の生成物を創製する工程を含む。第2及び第4の生成物は、好ましくは質量測定分析により、比較されて、2つの生物学上のサンプルの間の差異を同定してよい。

【0010】

別の態様において、上記方法は、以下の追加の工程：(g)第2の生成物と第4の生成物を比較することによりプールされた生成物を生成し；(h)プールされた生成物を増幅し；(i)増幅されたプール生成物の一部を支持体に接着させることによりアレイを提供し

50

；(j)第1のタイプ又は第2のタイプの個体からの複合生物学サンプルを工程(i)により形成されたアレイに少なくとも1回暴露することにより第5の生成物を提供し；(k)第1のタイプ又は第2のタイプの個体からの複合生物学サンプルを工程(i)により形成されたアレイに少なくとも1回暴露することにより第6の生成物を提供するが、但し、複合生物学サンプルは工程(j)において使用されたのとは異なるタイプの個体からであり；そして第5の生成物と第6の生成物を比較することを含む。好ましい態様において、これらの生成物は、質量測定分析により比較する。

【0011】

発明の方法は、親和性クロマトグラフィーとファージディスプレイ技術を使用することにより2つの生物学上のサンプルの間の差異の同定を可能にさせる。この方法により、疾患個体から選ばれたサンプルを非疾患個体からのサンプルに対して比較することにより、2つのサンプルの間の生物分子の発現における差異を同定することができる。医療を施された個体及び医療を施されなかった個体からのサンプルを同様に比較することができる。そのようなサンプルの間の差異の同定は診断及び/又は薬剤の開発に有用な生物学上の標的及び情報を導くことができる。

10

【0012】

比較される生物学上のサンプルは様々な生物源から取得することができ、組織、例えば上皮組織、結合組織又は神経組織、又はそれら由来の培養細胞種を含む。あるいは、生物学上のサンプルは、体液、例えば、髄液(CSF)、血液、唾液、粘液、涙、腓液、精液、汗、乳汁、胆汁、血漿、血清、リンパ液、尿、胸膜流出液、気管支洗浄液、腹水、又は滑液から取得してよい。特に好ましい態様において、体液はCSFである。

20

【0013】

別の他の態様において、生物学上のサンプルは、器官の種類からであり、皮膚、骨、血管、脳、脊髄、末梢神経、鼻、気管、肺、口、食道、胃、腸、腎臓、子宮、尿管、尿道、膀胱、視床下部、下垂体、甲状腺、膵臓、副腎、卵巣、卵管、膣、乳腺、精巣、精囊、陰茎、リンパ、リンパ節、リンパ管、白血球細胞、T-細胞及びB-細胞を含む。

【0014】

発明のアレイは、複合生物学サンプルを固相支持体に架橋結合させることにより製造することができる。サンプルは、好ましくは、支持体に接着させる前に、蛋白質を変性させるために化学試薬で処理する。

30

【0015】

発明の好ましい態様において、ペプチド-核酸カップリングされたライブラリーは、ファージディスプレイライブラリーであり、もっとも好ましくは抗体ライブラリー又は組換え体ライブラリー又は合成ペプチドライブラリーである。

【0016】

ライブラリー又は複合生物学サンプルをアレイに暴露することにより形成された様々な生成物は、アレイに結合しなかった物質(即ち、フロースルー物質)又はアレイに結合して次に解放された物質(即ち、溶出結合生成物)の何れかを含んでよい。ライブラリー又は複合生物学サンプルは、複数回、アレイに暴露されることにより、生成物を生成してよい。

40

【0017】

発明の他の特徴及び利点は以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかになる。

定義

「接着させること(adhering)」は、共有結合又は非共有結合の何れかによる、別の物質の一部への一つの物質の一部の直接又は間接の結合(linking)を意味する。

【0018】

「増幅すること」は、数を増加させることを意味する。

「アレイ」は、多数の、ポリマー配列(例えば、蛋白質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド等)又は基質又は支持体の表面に関連する他の生物分子を意味する。

50

アレイの例は、蛋白質親和性カラム及びファージ親和性カラムを含む。

【0019】

「複合生物学サンプル (complex biological sample)」又は「生物学上のサンプル (biological sample)」は、あらゆる生存生物から得られるか、排泄されるか又は分泌されるあらゆる固形又は液体のサンプルを意味し、単細胞微生物 (例えば、細菌及び酵母) 及び多細胞生物 (例えば、植物及び動物、例えば脊椎動物又は哺乳類、及び特定すれば健康又は見かけ上健康なヒト被験者又は症状又は疾患に罹患したヒト患者) を含む。生物学上のサンプルは、あらゆる部位から得られる生物学上の液体又は生物の物質 (例えば、血液、血漿、血清、尿、胆汁、髄液、水性又は硝子液、又はあらゆる体分泌液)、浸出物 (transudate)、滲出物 (exudate) (例えば、膿瘍又は感染あるいは炎症のあらゆる他の部位から得られる液体)、又は関節 (正常な関節又は慢性関節リウマチ、骨関節症、通風又は敗血性関節炎のような疾患に罹った関節) から得られる液体であってよい。あるいは、生物学上のサンプルは、あらゆる器官又は組織 (生検標本又は解剖標本を含む) であり得るかまたは細胞 (一次細胞または培養細胞) またはあらゆる細胞、組織または器官により条件付けされた培地を含んでよい。所望なら、生物学上のサンプルを予備加工に供してよく、限定ではないが、予備分離技術及び/または変性を含む。例えば、細胞または組織を抽出し、そして別の亜細胞画分中の生物分子、例えば細胞の別の部分に見いだされる蛋白質または薬剤の別の分析のための亜細胞の分画化に供され得る。例えば、Deutcher (編纂), Methods In Enzymology 182: 147-238 (1990) を参照。同様に、免疫沈殿を実施して抗原的に関連する生物分子、例えば蛋白質を同定することができる。

10

20

【0020】

「暴露すること」は、2つの物質の間に接触を起こさせることを意味する。

「個体 (individual)」又は「被験者 (subject)」は、単細胞又は多細胞の生物、例えば、植物、動物、真菌、原生動物、又は細菌を意味する。好ましい態様において、個体は、哺乳類、もっとも好ましくはヒト又は他の霊長類種である。

【0021】

「ペプチド-核酸カップリングされたライブラリー」は、各ペプチドが (直接又は間接に) 上記ペプチドをコードするDNAに結合された、ペプチドのコレクションを意味する。ペプチド-核酸カップリングされたライブラリーの例は、ファージディスプレイライブラリー (「PDL」) のはずである。

30

【0022】

用語「ペプチド」、「蛋白質」及び「ポリペプチド」は本明細書において交換可能なように使用されて、翻訳後修飾に拘わらず (例えば、グリコシル化又はリン酸化)、ペプチド結合又は修飾されたペプチド結合により互いに連結した2つ又はそれ以上のアミノ酸のあらゆる鎖を意味する。

【0023】

本発明は、蛋白質を同定して分析するには有用であるが、あらゆる生物分子の同定及び分析のために、より一般的に適用可能である。本明細書にて使用されるとおり、用語「生物分子 (biomolecule)」は、生物学上のサンプル中に存在するあらゆる有機分子を意味し、そしてペプチド、ポリペプチド、蛋白質、脂肪酸、オリゴサッカライド、脂質、ステロイド、プロスタグランジン、プロスタサイクリン、及び核酸 (DNA 及び RNA を含む) を含む。

40

【0024】

「基質」又は「支持体」は、あらゆる孔性又は非孔性の水不溶性物質を意味し、好ましくは剛体 (rigid) 又は半剛体 (semi-rigid) である。表面は多くの形態の如何なる一つを有することもでき、例えば、膜、フィルター、チップ、スライド、ウエハース、繊維、磁気又は非磁気ビーズ、ゲル、管、ストリップ、プレート、ロッド、ポリマー、粒子、マイクロ粒子、キャピラリー等である。基質は、様々な表面形態を有することができる、例えば、ウエル、トレンチ、ピン、チャンネル及び孔 (pores) であり、ポリ

50

ペプチド、ポリヌクレオチド又は他の生物分子が結合される。基質は親水性であり得るか又は親水性にさせられることができ、そして無機粉末、例えば、シリカ、硫酸マグネシウム、及びアルミナ；天然ポリマー物質、特にセルロース性物質及びセルロース由来の物質、例えば繊維を含む紙、例えばフィルターペーパー、クロマトグラフィーペーパー等；合成又は修飾された天然ポリマー、例えば、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ポリ（塩化ビニル）、ポリアクリルアミド、架橋結合したデキストラン、アガロースポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（4-メチルブテン）、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ（エチレンテレフタレート）、ナイロン、ポリ（酪酸ビニル）、等；それらのみか又は他の物質と混合して使用され；バイオ硝子として利用可能な硝子、セラミック、金属等を含む。天然又は合成集合体、例えばリポソーム、ホスホリピッド小胞及びセルも用いることができる。標準に使用される支持体は孔が制御された硝子（CPG）であり、規定されたサイズの孔により均一に製造された硝子マトリックスからなる。蛋白質及び他の生物分子の基質又は表面上の固定化は、文献において共通に利用可能な良く知られた文献により達してよい。

10

【0025】

詳細な説明

疾患を診断して治療するための新規な方法の開発においては、疾患に付随した、鍵となる細胞成分、例えば蛋白質及び他の生物分子を同定することが重要である。そのような成分を同定する一つの方法は、疾患の個体と健康な個体の間の蛋白質の発現における差異を捜すことである。

20

【0026】

本発明は、サンプル中に存在する蛋白質及び他の生物分子の差異を決定するために、2つの複合生物学サンプルを比較する手段を提供する。好ましい態様において、蛋白質親和性マトリックスの対を、比較される2つの生物学サンプルから用意する。ファージディスプレイライブラリーを一連の捕捉工程中のマトリックスに暴露して、2つのサンプルの間で異なるそれらの蛋白質（即ち、「異なる蛋白質」）に結合するファージの単離をもたらす。これらのファージを増幅して、ファージ親和性マトリックスのセットを用意するのに使用する。比較される生物学サンプルを、次に、これらのファージマトリックスに暴露して、特異的に（*differentially*）発現される蛋白質を捕捉する。疾患被験者からのサンプルを健康被験者からのサンプルと比較することにより、治療上及び診断上重要な生物学上の標的及び薬剤開発のためのリード構造を同定することができる。例えば、疾患個体からのサンプルにのみ存在するか又は疾患サンプルにおいて異なる濃度にて存在することがわかった受容体は、疾患の診断又は治療のための有力な標的となるかもしれない。さらに、受容体に対して高い親和性及び特異性を有することがわかったリガンドは、薬剤開発のリード構造を提供する。さらに、治療においてその分配、レベル又は特性を変化させる蛋白質種は、動物、例えばヒト患者において有益か又は有毒な効果の指標を提供するかもしれない。

30

【0027】

サンプルは、広範囲の種類の種類から採取することができ、限定ではないが、皮膚、骨、軟骨、腱、靭帯、骨格筋、平滑筋、心臓、血液、血管、脳、脊髄、末梢神経、鼻、気管、肺、口、食道、胃、腸、腎臓、子宮、尿管、尿道、膀胱、視床下部、下垂体、甲状腺、膵臓、副腎、卵巣、卵管、膣、乳腺、精巣、精囊、陰茎、リンパ、リンパ節、リンパ管、白血球細胞、T-細胞及びB-細胞を含む。他の適切なサンプル源は、限定ではないが、上皮組織、結合組織、筋肉又は神経組織、又は体液、例えば、髄液（CSF）、血液、唾液、涙、粘液、膵液、精液、汗、乳汁、胆汁、血漿、血清、リンパ液、尿、胸膜流出液、気管支洗浄液、腹水、又は滑液を含む。

40

【0028】

サンプルの源は様々な因子、例えば、研究される疾患の性質又は症状に基づいて選択される。例えば、CSFは中枢神経系の疾患を研究するのに採取してよく、膵液は膵臓の疾患を研究するのに採取してよい。癌のような疾患状態においては、特定の種類の癌に直接関

50

係する何れの種類又は全ての種類の組織又は細胞（例えば、リンパ腫に関してのリンパ等）を分析してよい。様々な生物学上のサンプルを正確に回収して保存する方法は当業界で知られており、そしてサンプルの性質に依存して変更してよい。

生物学上のサンプルを用いた親和性マトリックスの用意

生物学上のサンプルを回収した後に、サンプル各々を別の支持体に接着させることにより、アレイ又はマトリックスのセットを創製する（図1）。発明の一つの態様において、アレイは、異なる蛋白質又は他の生物分子を非常に多数結合させる固相支持体又はゲルを含む親和性マトリックスである。適切なマトリックスの材料は、限定ではないが、紙、ガラス、セラミックス、金属、メタロイド、ポリアクリロイルモルフォリド、様々なプラスチック及びプラスチックコポリマー、例えば、NYLON（登録商標）、TEFRON（登録商標）、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（4-メチルブテン）、ポリスチレン、ポリスチレン/ラテックス、ポリメタクリレート、ポリ（エチレンテレフタレート）、レーヨン、ナイロン、ポリ（酪酸ビニル）、ポリビニリデンジフルオリド（PVDF）、シリコーン、ポリフォルムアルデヒド、セルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロース及び孔制御性ガラス（コントロールドポアガラス社、フェアフィールド、N. J.）、エアロゲル（例えば、Ruben et al., J. Materials Science 27: 4341-4349 (1992); Rao et al., J. Material. Science 28: 3021 (1993); Back et al., J. Phys. D. Appl. Phys. 22: 7309-734 (1989); Kim & Jang, J. Am. Cream. Soc. 74: 1987-92 (1991)等を参照）、及び親和性カラムにおける使用に適することが一般に公知の他の材料を含む。好ましい態様においては、支持体はストレプトアビジンセファロースカラムである。しかしながら、スクリーニングを他の固相又は溶液中で実施することができる。

10

20

30

40

50

【0029】

生物分子、例えば、蛋白質を、固相基体に結合して、そこで基体に接触した溶液中に存在する相補分子に相互作用する固定化リガンドとして機能する。スクリーニングされる源、例えばファージディスプレイライブラリーを、親和性マトリックスを通過させて、標的分子が固定化リガンドにより捕捉されることを可能にする。未結合の成分は結合した複合体から洗い流されることにより、親和性カラムに結合した標的分子を欠く溶液を提供するか、又は単離された標的分子それ自体を提供する。未結合のバックグラウンド物質が洗い流された後、結合物質を溶出するが、しばしば、標的とリガンドの間の対合を溶液中で弛緩させる（loosen）。親和性マトリックス中で捕捉された生物分子は、加熱、塩濃度の調節、又は脱安定化剤、例えばホルムアミド、TWEEN（商標）-20変性剤又はドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の使用により分離及び放出することができる。

【0030】

蛋白質及び他の生物分子を基体又は支持体に結合させるための多くの技術が当業界公知であり、例えば、Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, M. Aslam, A. Dent Groves Dictionaries, Inc. ニューヨーク、NY (1988)に記載された技術である。あらゆる適切な誘導化又は固相結合の方法を使用してよい。好ましい態様においては、蛋白質をビオチン化して、アビジン又はアビジン関連化合物（例えば、ストレプトアビジン）を含む基体又は支持体を用いることにより、複合生物学サンプルの蛋白質を接着させる。ビオチンは特異的にアビジン関連化合物に結合して、それにより蛋白質を基体に結合させる。他のよく知られた特異的結合対もサンプル蛋白質の支持体への結合のための手段として使用してよい。

【0031】

サンプルを支持体に接着させる前に、サンプルの蛋白質を変性させて、さらに完全な分析を可能にさせてよい。様々な解離方法が当業界公知であり、蛋白質複合体を解体して（break up）、蛋白質を可溶化して、サンプル内の蛋白質の折り畳みをほどくために使用してよい。これらの方法は、例えば、グアニジンHCl、ギ酸、様々なカオトロブ、

洗剤 (detergent)、加熱、相分割 (phase partitioning)、及び誘導化による処理を含む。あるいは、サンプル中の蛋白質の解離が保存されるべきであるなら、そのような処理を省いて、蛋白質複合体を任意に架橋結合させて安定性を増大させてよい。解離を保存することにより、蛋白質複合体の一つのメンバーに対するファージが、複合体の一つより多い成分の単離及び同定を可能にさせるかもしれない。

ペプチド - 核酸カップリングされたライブラリー

本発明によれば、上記の蛋白質親和性マトリックスを用いてペプチド - 核酸カップリングライブラリーをスクリーニングし、ペプチドのコレクションを作成するが、但し、各ペプチドはそれをコードする DNA に結合する。好ましい態様において、ライブラリーはファージディスプレイライブラリーである。ディスプレイ技術は所望の特性に関してスクリーニングできる、モジュールコードされた生物分子のライブラリーを創製する方法のコレクションを表す。最重要なディスプレイ技術の特長のうちの2つは、極めて高い検出感度と初期スクリーニング後に迅速に所望の化合物の構造を決定する能力である。様々なファージライブラリーを本発明において使用することができ、免疫又は非免疫、及び単鎖 Fv 又は Fab 断片抗体ライブラリー；及び組換えディスプレイ又は合成ペプチドライブラリーを含む。適切なファージディスプレイライブラリー及びそれらの調製のための技術の例は、当業界においてよく知られており、例えば、Barbas, F., et al., Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York (2001) に記載されている。使用できる他のライブラリーは、Li, M., "Applications of display technology in protein analysis", Nature Biotechnology 18: 1251 - 1258 (2000) により記載される。

10

20

【0032】

ペプチドライブラリーは、所定の長さの多大な数のペプチドを含み、それらの配列は各位置においてアミノ酸残基を変更させるようにランダムに生成された。そのようなライブラリーを使用する通常のゴールは、スクリーニングされるほとんど全ての蛋白質に対して見いだされるバインダーの典型的なプールから高親和性バインダーを選択することである。そのもっとも単純な形態において、発明の方法は、中度 / 低度親和性の単一のバインダーを用い、最適な蛋白質捕捉及び放出のプロセスの間に選択される。

【0033】

ファージディスプレイライブラリーはそれらの特定の特性に基づいて選択でき、必要とされる分析の種類と単離される親和試薬の特性に依存する。例えば、ペプチドと抗体ファージディスプレイライブラリーの間での選択は、所望の親和試薬がペプチドであるか抗体であるかに関連した。使用されたライブラリーは、好ましくは、可能な限り大きくて多様な、選択されたサンプルに関して特異的なバインダーの集団を含む。ライブラリーの適合可能な混合物を用いることにより、選択されたサンプルから可能な限り多くの種を捕捉することができる。究極には、あらゆる特定の種のサンプル中の全ての公知の種に関するバインダーを含む、「パンプロテオミク」及び「プロテオミクサブセット」ライブラリーを開発できる。

30

【0034】

2つの配列の間で異なる蛋白質を結合するファージを捕捉するために、ファージライブラリーを、2つの異なる生物学上のサンプルから生成された蛋白質親和性マトリックスに通過させる。ファージ暴露の配列を図2及び3に示す。最初に、ファージライブラリーを第1の生物学上のサンプルから用意された蛋白質親和性マトリックスに暴露する。未結合のファージを洗い流して、結合したファージを解放させて、次に第2の生物学上のサンプルから用意された蛋白質親和性マトリックスに暴露する。この第2の暴露工程からのフロースルーを残し、第1生物学サンプルには存在するが第2サンプルには存在しない蛋白質に結合するファージを含む。

40

【0035】

同一のファージライブラリーを逆の順序で親和性マトリックスに暴露するが、即ち、ライ

50

ブラリーを第2サンプルから用意された蛋白質親和性マトリックスに最初に暴露する。未結合のファージを洗い流して、結合したファージを溶出して、次に第1サンプルから用意された蛋白質親和性マトリックスに暴露する。第2暴露工程からのフロースルーを残し、第2生物学サンプルには存在するが第1サンプルには存在しない蛋白質に結合するファージを含む。

【0036】

即ち、ファージライブラリーは2つの捕捉工程を通る。第1工程において、ファージライブラリーは生物学上のサンプルから用意された蛋白質親和性マトリックスを通過して、結合したファージが回収される。第2の捕捉工程において、第1サンプルから用意された蛋白質親和性マトリックスに結合したファージは第2サンプルから用意された蛋白質親和性マトリックスに暴露される。逆に、第2サンプルから用意された蛋白質親和性マトリックスに結合したファージは第1サンプルから用意された蛋白質親和性マトリックスに暴露される。捕捉工程のこの組み合わせが、第1サンプルと第2サンプルの間で異なるそれらの蛋白質に結合できるファージの単離をもたらす。第2捕捉工程からのフロースルーファージをプールし、増幅し、そして次のスクリーニングのための同一のファージ親和性マトリックスのセットを用意するために使用してよい。さらに、上記ファージを使用して、「異なる」蛋白質に対する親和性試薬を単離してよい(図7)。

ファージ親和性マトリックス

上で論じたとおり、蛋白質親和性マトリックスへの暴露によりファージディスプレイライブラリーから選択されたファージを使用することにより、ファージ親和性マトリックスのセットを生成する(図4)。親和性マトリックスとしてファージを調製する方法は当業界にて公知であり、そして例えばSmith et al., Journal of Immunological Methods 215:151-161(1998)により記載される。これらのファージ親和性マトリックスを用いることにより、比較される生物学上のサンプルを直接スクリーニングすることができる。ファージマトリックスにサンプルを通過させる前に、それらは上で論じたとおりに蛋白質複合体を解体するための様々な解離方法の何れかを使用して処理して、蛋白質を可溶化して、折り畳まれていない蛋白質により完全な分析をさせる。架橋結合させた繊維状ファージを親和性精製のために首尾よく直接用いることができ、そして親和性捕捉ペプチドをコードする凝集ファージの直接の使用は、適切なペプチド配列を翻訳して(decode)、それを合成して、次に親和性捕捉マトリックスを調製する要求を回避させるが、これは所望であれば実施できる。

【0037】

図5に示すとおり、2つの異なる個体からの複合生物学サンプルをファージ親和性マトリックスに暴露する。ファージマトリックスに結合する蛋白質は、2つのサンプル間で異なるそれらの蛋白質を含む。ファージマトリックスに結合しない蛋白質を洗い流して、結合した蛋白質を溶出して、当業界公知の様々な同定方法及び定量方法を用いて分析する(図6)。(Gygi, S. P., et al., Nature Biotechnology 17:994-999(1999); Gygi, S. P., Curr. Opin. Biotechnol 11:396-401(2000); Oda, Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:6591-6596(1999); Mirgorodskaya, O. A., et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 14:1226-1232(2000); Munchbach, M., et al., Anal. Chem. 72:4047-4057(2000); Link, A. J., et al., Electrophoresis 18:1314-1334(1997); Washburn et al., Nature Biotechnology 19:242-247(2001)を参照)。好ましい態様において、溶出した蛋白質は逆相カラムをESI質量測定分析へ通過させる。蛋白質は質量フィンガープリンティング及び配列決定により同定される。一方のサンプルには存在して他方には存在しない蛋白質を同定することに加えて、当業者は、発明の方法が2つのサンプル間の蛋白質の異なるレベルを測定するためにも使用できることを認識する。

もっとも豊富な (*abundant*) 蛋白質の消耗 (*depletion*)

図 8 に示すとおり、発明の一つの態様において、生物学上のサンプルに含まれるもっとも豊富な蛋白質は、初期捕捉工程後に結合したファージを回収して (図 2)、ファージを増幅して、ファージ親和性カラムを調製し、そして上で記載されて下の実施例に記載される方法を用いてサイクルを循環させることにより、消耗させる (*depleted*) ことができる。分析用装置の検出の限界に達するまで、図 8 及び 9 に示す工程を連続して繰り返すことができる。豊富な蛋白質が消耗したら、生物学上のサンプル間の差異を、本明細書に記載された技術に従い、あまり豊富でない蛋白質を含むサンプルを用いて分析することができる。これにより、生物学上のサンプル中に極めて少量しか存在しないかもしれない蛋白質の同定が可能になる。

10

【 0 0 3 8 】

本発明を、ヒト髄液 (*CSF*) のサンプルの対に対する本発明の方法の適用を記載する以下の実施例により例示する。実施例は、如何なる意味においても、発明の限定を意図しない。

【 0 0 3 9 】

実施例

工程 I . サンプル間で異なる蛋白質に対する蛋白質捕捉ファージ

(a) 2 つのサンプルのための蛋白質親和性マトリックスの用意 (図 1) 。

【 0 0 4 0 】

サンプルの回収。ヒト *CSF* のサンプルを滅菌コンテナー中の腰椎穿刺により 2 つの別々の個体から回収する。サンプルは、すぐに、分析のために氷浴中に入れて研究室に運ばれるべきである。研究室に到着したら、*CSF* サンプルを 2 , 0 0 0 g にて 1 0 分間 5 において遠心分離することにより、循環細胞を除去するべきである。サンプルは、すぐに処理するか又は分析まで - 7 において保存することができる (*Sanchez, J. C. and Hochstrasser, D. F., "Oroteome Analysis Protocols" in Methods in Molecular Biology, Vol. 112, ヒューマンプレス、トトワ、NJ (1999)*) 。

20

【 0 0 4 1 】

サンプルの調製。結合した蛋白質と他の種を解離するため、そして蛋白質の相互作用を最小にするため、サンプルのアリコート (1 0 0 μ l) を 3 M グアニジン *HCl* 及び 0 . 2 M ギ酸の最終濃度に作成して、氷上で 6 0 分間インキュベートする。それらを次に *HiTrap Desalting Column* (アマシャムファルマシアバイオテック) を *HPLC* システム上で 5 m l / 分の流速にてリン酸緩衝塩溶液 (*PBS*) と共に用いてバッファー交換し、そして最終容量 2 0 0 μ l に回収される。低分子量のフロースルーは *Seppak* カラムを通過させて、*PBS* で洗浄することにより、所望であれば追加の分析のためのペプチドを単離する。蛋白質のインビボの解離を保存するなら、次にグアニジン *HCl* とギ酸の添加を省き、そして次の工程の前に *PBS* で *CSF* アリコートに 1 : 2 希釈する。

30

【 0 0 4 2 】

蛋白質のビオチン化。次に工程において、バッファー交換したサンプル中の蛋白質をビオチン化する。使用の直前に、2 m M 酢酸ナトリウム *pH* 6 . 0 中に、*Sulfo-NHS-LC-Biotin* の 0 . 5 m g / m l 溶液を作成する。この溶液 5 0 μ l を脱塩した *CSF* サンプルに加え、そして氷上で 2 時間インキュベートする。5 0 0 μ l の 1 M *Tris-HCl* , *pH* 7 . 4 を加え、そしてさらに 3 0 分間インキュベートすることにより、残りのビオチンリンカーを不活性化する。未反応のビオチンを除去するため、*HiTrap Desalting Column* (アマシャムファルマシアバイオテック) を *HPLC* システム上で 5 m l / 分の流速にて *TBS* (5 0 m M *Tris-HCl* , *pH* 7 . 5 , 1 5 0 m M *NaCl*) と共に用いて脱塩し、そして最終容量 2 0 0 μ l に回収する (*Barbas, F., et al., Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, ニューヨーク (20*

40

50

01))。

【0043】

捕捉カラム製造。サンプル1と命名したヒトCSFサンプルからのビオチン化された脱塩溶液を、TBSで平衡化したHPLCシステム上でHiTrap Desalting Column (アマシャムファルマシアバイオテック) に、0.1 ml / 分にて通過させる。このカラムを20 ml のTBSにより1.0 ml 分にて洗浄して(「カラム1」)する。このプロセスを第2サンプルと命名した第2CSFサンプルに関して繰り返し、第2カラムを生じさせる(「カラム2」)。

【0044】

(b) 捕捉工程1 (図2)

蛋白質捕捉ファージ。5 ml のTBS中のファージペプチドライブラリーの 10^3 から 10^4 均等物(例えば、 2×10^8 クローンのライブラリーに関しては 2×10^1 粒子が 10^3 と均等のはずである)を、HPLCシステム上のカラム1及び2の各々にわたり $40 \mu\text{l}$ / 分の流速にて通過させる。カラムを20 ml のTBSで0.5 ml / 分の流速にて洗浄する。

【0045】

捕捉ファージを溶出する。結合したファージを1 ml のPanning Elution Buffer (グリシンによりpH 2.2に調節した0.1 M HCl)を流速0.5 ml / 分にて溶出して、画分を回収する。ファージを含む画分をプールし、そしてHiTrap Desalting Column (アマシャムファルマシアバイオテック)をHPLCシステム上で5 ml / 分の流速にてTBSと共に用いてバッファー交換し、そして最終容量約1 ml に回収される。(Barbas, F., et al., Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, ニューヨーク(2001))。

【0046】

(c) 捕捉工程3 (図3)

交換したカラムからの蛋白質捕捉ファージ。溶出してバッファー交換したファージをHPLCシステム上でカラム1から2に流速 $40 \mu\text{l}$ / 分にて通過させる。カラムを20 ml のTBSで0.5 ml / 分の流速にて洗浄する。このプロセスをカラム2から1の溶出してバッファー交換したファージに繰り返す。

【0047】

交換したカラムからの捕捉されたファージを溶出する。結合したファージを1 ml のPanning Elution Buffer (グリシンによりpH 2.2に調節した0.1 M HCl)を流速0.5 ml / 分にて溶出して、画分を回収する。ファージを含む画分をプールし、約 $140 \mu\text{l}$ の1 M Tris塩基、pH 9.1を用いて中和する。pHが上昇してpH 7.0 - 8.2の溶液を生じたことを確かめる。このプロセスをカラム2からの結合ファージに繰り返す。

【0048】

工程II. 特定のファージ捕捉相異蛋白質

(a) ファージ親和性マトリックスの用意 (図4)

ファージをプールする。カラム1及び2からのフロースルーファージをプールする。

【0049】

ファージを増幅する。以下のプロトコルに従い感染を準備する:

1. K91細胞の単一コロニーを2 ml のNZYを含む培養チューブに移す。激しく撹拌しながら(250 rpm)一晩 37°C においてインキュベートする。

【0050】

2. 20 ml のNZYを含む125 - mlのフラスコに $400 \mu\text{l}$ の一晩培養物を接種する。細胞が中期 - 対数相($\text{OD}_{595} = \sim 0.45$; これは1.5 - 2時間かかる)に達するまで、 37°C において激しく撹拌する(250 rpm)。

【0051】

10

20

30

40

50

3. 100 rpmまでの遅い攪拌を10分間用いて、細菌が、専断されたF. piliiを再生することを可能にする。OD₅₉₅を測定する；0.65を越えないことが好ましい（最良なのは0.55 - 0.65）。

【0052】

4. 培養物をオークリッジチューブに移して、600 g (2, 200 rpm)にてSORVALL SS34ローター（又は均等物）中で10分間室温又は4において遠心分離する。

【0053】

5. 上清を捨てて、細胞を20 mlの80 mM NaClに徐々に懸濁する。

6. 混合物を125 - ml培養フラスコに移して37において45分間穏やかに振る（100 rpm）。 10

【0054】

7. 混合物をオークリッジチューブに移して、850 g (2, 800 rpm)にてSS34ローター（又は均等物）中で10分間4にて遠心分離する。

8. 上清を注ぎだし、細胞を1 mlの4 N A Pバッファーに徐々に懸濁する。

【0055】

9. 使用する際は細胞を氷上に置き、そして冷凍庫中の氷上に保存する。細胞は直後に使用するのが最良であるが、数日間ファージ感染のための成分を持続する。それらを保存するチューブの穏やかな攪拌の後に凝集したままであれば、細胞はもはやコンピテントではない。細胞の最終濃度は約5 x 10⁹ 細胞/mlであるべきである。（Barbas, F., et al., Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, ニューヨーク (2001)）。 20

【0056】

空腹の細胞に溶出したファージを感染させる。

1. アガロースゲル電気泳動又は分光測光によりファージの濃度を測定する。

2. 希釈したウイルス粒子10 µl (10⁶ 粒子に等しいか又はそれ未満)を、マイクロ遠心分離管又は柔軟なELISAプレートの列の全域に分配することにより細胞を感染させる。10 µlの空腹か又は新鮮な高密度細胞 (~ 5 x 10⁷ 細胞)を加える。室温において10 - 15分間インキュベートする。

【0057】

3. 150 µl (マイクロタイタープレートに関して)を1 ml (マイクロ遠心分離管に関して)の0.2 µg/mlテトラサイクリン含有NZYに添加して混合することにより、テトラサイクリン耐性遺伝子を誘導する。39において30分間間欠的に振盪させる（又はELISAプレートを軽くたたく）。1.5 mlのマイクロ遠心分離管を用いるなら、チューブをピーカーの中に逆さまに置き、そしてインキュベーター中で振盪する、簡単に言えば、開ける前にチューブをマイクロ遠心分離し、そしてピペッティングにより細胞を混合する。 30

【0058】

4. 柔軟なマイクロタイタープレート中の感染細胞を15 µg/mlテトラサイクリン含有NZYにより希釈する。20 µlの細胞を180 µlのNZY + tetと1:10希釈のために混合して、198 µlのNZY + tetに2 µlを混合して1:1000希釈する。 40

【0059】

5. テトラサイクリン耐性形質導入ユニット (TU)の濃度を力価測定 (titering)により測定する。未知サンプルの力価測定は、通常、その粒子/ml数が公知で以前に力価測定された陽性対照ファージを感染させた細胞と一緒にこなう。良好な陽性対照はCsCl-精製fd-tet又はf88-4ファージのストックである。ファージ希釈バッファーのみを処理した細胞は、希釈ファージサンプルと平行して、陰性対照として機能する。コロニーを数える際、1コロニー = 1 TUである。

【0060】

6. プレート力価測定に関しては100 μ lの希釈感染細胞を、40 μ g/mlテトラサイクリンを含むNZY寒天プレート上にまく。希釈あたり1プレートをまく。プレートを倒置して37 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートする。

【0061】

7. スポット力価測定に関しては、それらの蓋を斜めにして37 $^{\circ}$ Cインキュベーター中でそれらをインキュベートすることにより乾燥したプレートを用いるか又は数時間フードを滅菌する。スポッティング前に、各スポット(プレートあたり16まで)が行くプレートをマークする。各スポットの上に希釈されたファージ15-20 μ lを注意深く打つ(dot)(これのためにはマルチチャンネルピペッターを使用できる)。寒天にドロップを吸収させて(スポットは平らになるべきである)、次にプレートを倒置して一晩30 $^{\circ}$ Cにおいてインキュベートする。

10

【0062】

8. コロニーのカウント(特にスポット力価測定から)には、テトラサイクリン耐性コロニーは小さいが見えるべきである。コロニーの過剰な成長を阻止するため、(1)夜に放置する前に37 $^{\circ}$ Cインキュベーターの外にプレートを取り出し、一晩室温にて試験させ(sit)、そしてコロニーが良好な大きさになるまで翌日に37 $^{\circ}$ Cにそれらを戻すか;又は(2)感染を夜遅く実施するなら、30 $^{\circ}$ Cにおいて一晩インキュベートして、翌日の早くに誰かにコロニーをチェックさせる。コロニーが最適なカウントサイズに達したら、カウントするまでそれらを4 $^{\circ}$ Cに保存するべきである。それらは、プレートがパラフィルムにより封印されるならば、数週間保存できる。(Barbas, F., et al., Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, ニューヨーク(2001))。

20

【0063】

大規模なファージの調製

1. 全部の単一の感染コロニーを拾い、そして220 μ lのNZY培地を含む1.5mlのマイクロ遠心分離チューブにて各々を混合する。全てのチューブの内容物をプールして、500mlのNZY及び15 μ g/mlのテトラサイクリンを含む2つの2リットルフラスコに、希釈したプール細胞を接種する。激しく(~200rpm)約20時間37 $^{\circ}$ Cにおいて振盪する。

【0064】

2. 100 μ l培養物を0.5mlマイクロ遠心分離チューブに移し、そしてフルスピード(14,000rpm)で2分間スピンすることにより細胞を沈殿させる。20 μ lのファージ含有上清を、5 μ lの5X Lysis Mix(Lysis Mixを暖めてSDSが溶液中にあることを確認する)を含む新しい0.5mlマイクロ遠心分離チューブに移し;ピペティングにより混合する。チューブを70 $^{\circ}$ C水浴中で15-20分間インキュベートして軽くマイクロ遠心分離する。15 μ lのサンプルを4x GBB中の0.8%アガロースゲルに負荷して、泳動させる。量のわかっているf88.4ファージを対照として用いる(2 \times 10¹⁰ファージ粒子=100ng DNA)。このゲルを、上記の手法を続ける前(ファージ収量が良好であることを確認する;~10¹²粒子/ml培養上清)か又は手法の終わりに(PEG-精製ファージのパーセント収量を測定するため)泳動させる。

30

40

【0065】

3. 工程1からの培養物を4つの250ml遠心分離ボトルに分配する(~230ml/ボトル)。2,400gにおいて10分間4 $^{\circ}$ Cにて遠心分離する。細胞の沈殿物を妨害しないように、ファージを含有する上清を新しいボトルに移し、そして6,200gにて10分間4 $^{\circ}$ Cにおいて再度遠心分離する。上清を注意深く、きれいな、風袋を測った、250ml遠心分離ボトルに注ぎ、そして各ボトルの培養容量を測定する(1g=1ml)。

【0066】

4. 0.15容のPEG/NaCl溶液を測定上清の各ボトルに加える。スクリュージャップをきつく締めて、ゆっくりと約100回ボトルを倒置することにより、徹底的に混合

50

する。混合物を少なくとも約4時間氷上又は4℃で一晩インキュベートする。

【0067】

5.6, 200 gにおける40分間4℃の遠心分離によりファージを沈殿させる。上清を捨てて、沈殿物を妨害しないように注意する。ボトルを再度軽く遠心分離することにより残りの上清を除去し、各ボトルを傾けることにより、沈殿物を残りの上清の向かい側にし、1 mlのピペッターにより吸引する。

【0068】

6.7. 5 mlのTBSを各ボトルに加えて、150 rpmにて37℃インキュベーター中で約30分間攪拌して沈殿物を懸濁する。軽く遠心分離することにより溶液を各ボトルの底に移動させる。各4つのボトルからの溶液を2つの風袋を測ったオークリッジチューブに移す。各ボトルを別の7.5 mlのTBSにより洗浄して、オークリッジチューブに加える。各チューブは今30 mlの全容量を有するであろう。チューブをTBSでバランスをとり、倒置によりファージを徹底的に混合する。

10

【0069】

7. チューブを10, 100 - 22, 700 gにて10分間4℃において遠心分離して、上清を透明にする。上清を新しく風袋を測定したオークリッジチューブに移し、そして容量を測定する(1 g = 1 ml)。

【0070】

8. 0.15容のPEG/NaCl溶液を各チューブに加えて、ゆっくりと約100回倒置する。チューブを少なくとも1時間氷の上でインキュベートすることにより、ファージを沈殿させる。重い沈殿物が出現するはずである。

20

【0071】

9. 10, 100 gにて40分間4℃において遠心分離することにより沈殿ファージを回収する。上記工程5のとおり上清を除去する。

10. 10 mlのTBSを各チューブに加える。ゆっくりと渦巻き各般することにより、ファージ沈殿物を懸濁し、そして室温において約1時間かけて沈殿物を柔らかくさせる。再び渦巻き攪拌して、軽く遠心分離することにより、溶液をドライブダウンさせる。(ファージをさらにCsCl密度勾配により精製するなら、5 mlのみのTBSを各チューブに加えて、ファージを懸濁して、2つの上清を一つのオークリッジチューブ中で混合する。

30

【0072】

11. チューブを10, 100 - 22, 700 gにて10分間室温において遠心分離することにより上清を透明にさせる。各チューブからの透明になった上清を15 mlのポリプロピレンスナップキャップチューブに注いで暗黒中で4℃において保存する。

【0073】

12. ファージ粒子の濃度と収量を測定するために、ファージのアリコート 5×10^8 Lys Maxで処理する(工程2におけるとおり)。1 - 5 - 及び10 μ lのサンプルを1.2%アガロースゲル上で4 x GBB中で、標準として公知の量の同じ様式で処理したファージを用いて電気泳動する。最初の培養物の上清からのサンプルを上げる上に含ませ(工程2)、パーセント収量を計算する。電気泳動分析もたった一つのDNA種が存在することを証明するために重要である; これは特にfd-tet誘導体に関して重要であり、テトラサイクリン遺伝子を欠損させることができ、約6 kbのゲノムによりファージを生成する。ファージ粒子の濃度は分光光度分析によりもっと正確に評価することができる; しかしながら、これはCsCl-精製されたファージに関して、より良好に実施される。ファージの感染特性(TU/ml)は力価測定により分析することができる; fd-tet誘導体の感染性は約20粒子/TUであり、野生型誘導体のそれは約1粒子/pfuである。

40

【0074】

13. ファージの最終濃度(それらをCsCl精製しないならば)は約 3×10^{13} / mlを越えないべきであり、そうしてファージの濃度が分かたら、TBSによりそれ

50

に応じて調節すべきである。細胞の成長を妨害するため、上記溶液を最終濃度 0.02% (w/v) のアジ化ナトリウム又は 20 mM の Na_2EDTA に調節することができる。ファージは長期間 50% (v/v) 滅菌グリセロール中で -18 において保存することができる。(Barbas, F., et al., Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, ニューヨーク (2001))。

【0075】

CsCl 上のファージの精製

1. 上記のファージの大規模な精製の後に、各調製物の最終容量は 10 ml のはずである。

【0076】

2. 4.83 g の CsCl を風袋測定した 50 ml ビーカー中に測りとる。ビーカーを再度風袋測定して、懸濁したファージを加える。TBS を 10.75 g の最終重量に加える (容器と CsCl : ファージに加えて + TBS = 10.75 g)。これは、12 ml の 1.3 g/ml の密度の 31% (w/w) CsCl 溶液を提供する。溶液の密度は、風袋測定したビーカー又はプラスチックカップ中で 1 ml を秤量して、次にそれを元のビーカーに戻すことにより (その設定のピペットが 1 g の 1 ml の水を秤量することを、最初に必ずチェックする) チェックすることができる。必要であれば、CsCl 又はバッファーにより密度を 1.3 g/ml に調製する。

【0077】

3. 各ビーカーの容量をポリアロマーチューブに移す。チューブがトップまで満たされていることを確認し (遠心分離の間につぶれる)、必要であれば、超過容量の 31% (w/w) CsCl の TBS 溶液を加える。溶液を一方から他方に移すか又は CsCl 溶液を一つのチューブに加えることによりチューブのバランスをとる。チューブを SW40 スイングバケットローターに入れて、37,000 rpm にて 48 時間 5 において遠心分離する。70.0 Ti ローターに関しては、58,000 rpm にて 20 時間スピンのさせる。

【0078】

4. ローターからチューブを注意深く抜いて、ラックに置き、そしてそれらをクランプスタンドにて 1 回に一つセットアップさせる。クランプされたチューブを強い可視光源により上部から照射する (例えば、ハロゲンデスクランプ)。チューブの上部に向かって 2 つのバンドが存在することになる。ファージのバンドは、弱くて、青っぽく、そして均質 (くすんだ外観) になり、狭くて、糸を引く、羊毛のような、不透明な白色のバンド (おそらくは PEG) のちょうど上に見えるはずである。良好なファージ調製物においては、ファージバンドが 5 mm の幅であって、その強度は約 1.33 g/ml である。

【0079】

5. 滅菌ピペットチップを吸引クランプに結合させて、吸引機を中間速度に設定する。ピペットチップをメニスカスに保って、ファージバンドを覆う液体を上部の縁の 2 mm 内まで吸引し、ファージバンドを妨害しないように注意する。ポリエチレン製運搬ピペット (好ましくは滅菌) 又はさらに良好には、蠕動ポンプを備えた滅菌ガラス製運搬ピペットによりファージバンドを捨てる。ファージバンドは粘性がある: 下に隠れている羊毛のようなバンドを避けるように試みる。CsCl 精製プラスチックに関するように、迅速に密封されるポリアロマーチューブを用いるなら、バンドをシリンジにより除去する。

【0080】

6. 抽出されたファージバンドを、ベックマン 60 Ti ローター用の 26 ml のスクリュウキャップポリカーボネート遠心分離チューブに移す。4-6 のファージバンドが単一のボトル中でプールされ得る。チューブの肩まで TBS を満たし、キャップをきつく締め、繰返し倒置して混合する。遠心分離に関しては、水を満たした別のチューブに対してバランスをとる。

【0081】

10

20

30

40

50

7. ベックマン60 Ti 固定角度ローター中でチューブを50,000rpmにて4時間遠心分離してファージを沈殿させる。上清を流して捨て、沈殿物を軽く低速で卓上遠心分離機上で遠心分離し、そして残った上清を捨て、沈殿物を液体から離して向ける (pointed away)。

【0082】

8. 沈殿物を10mlのTBSに懸濁する；ゆっくりと渦巻き攪拌して、軽く卓上遠心分離機上中で遠心分離することにより、溶液を下に向け、そして沈殿物を一晩4 において柔らかくする。渦巻き攪拌して沈殿物を溶解する。

【0083】

9. TBSをボトルの上部まで満たして、サイド遠心分離してファージを沈殿させ、そして上清を工程7におけるとおりに除去する。(注：この工程は任意であり、いくらか純粋なファージを提供する)。

【0084】

10. 12mlのTBSを開始培養物のリッター均等あたり用いて、工程9におけるとおりに沈殿物をTBSに懸濁する；これは期待された濃度の 3×10^{13} ウイルス粒子/mlを提供する。ファージを滅菌オークリッジチューブに移して、6,500gにて10分間遠心分離する。

【0085】

11. ファージ含有上清を15mlのポリプロピレンスナップキャップチューブに移す。この点にて、アジ化ナトリウムを保存剤として最終濃度0.02% (w/w)まで加える。あるいは、 Na_2EDTA を最終濃度20mMまで加えることができる。

【0086】

12. 分光光度分析及び/又はアガロースゲル電気泳動によりファージ粒子の濃度を測定する。

13. TBS/ゼラチン中でファージを 10^{-7} 、 10^{-8} 及び 10^{-9} に希釈して力価測定する。正確な陰性及び陽性の対照を含ませる。良好な感染力価(TU/ml)は、有形の粒子の濃度の約5%である(ウイルス粒子/ml)。

【0087】

14. ファージを4 において光から離して保存するか又は長期間の保存には50%のグリセロール中において-18 において保存する。これらの条件下で、力価は少なくとも数年安定である。(Barbas, F., et al., Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, ニューヨーク(2001))。

【0088】

(b) 同一ファージカラムの調製

架橋結合。1容のファージを(段落中の全ての以後の容量はこの容量に対する)水中の1.26mM pVIIサブユニットに相当する濃度において0.15容の0.5M NaCl及び0.15容の1M NaH_2PO_4 (NaOHによりpHを6.9に調整)と混合する。この溶液に、0.0026溶液の76.3mg/mlのNHS-デキストランを加える。すぐに、反応混合物を渦巻き攪拌により混合し、0.15溶液の50% PEGを加え、そして再び渦巻き攪拌する。ファージはPEG溶液中で沈殿する(最終濃度50%)。反応混合物を12-16時間密封されたチューブ中で室温において回転させ、そして未反応のN-ヒドロキシ-サクシニミドを8溶の1M エタノールアミン(HClによりpHを9に調整)及び0.89溶の5M NaClの添加によりクエンチする。室温において1-2時間さらに回転を続ける。TBS中の架橋結合ファージを希釈して(少なくとも約10倍)、遠心分離、吸引及び上清のデカントにより5-6回洗浄し、そして新鮮なTBSに沈殿物を懸濁する。最終沈殿物を10溶のTBSに懸濁して4 において保存する。

【0089】

カラムの調製。2つの0.5mlカラム(アマシャムファルマシアバイオテック、HR

5 / 2 , コード 18 - 0382 - 01) に、それぞれ、約 2×10^{13} 粒子に相当する架橋結合したファージを詰める。HPLCシステムのカラムをTBSで平衡化する(他のカラム又は非カラムのバッチ法も適する)。

【0090】

サンプルの調製。結合した蛋白質及び他の種を解離させるため、及び蛋白質の相互作用を最小にするため、初期ヒトCSFサンプル1及び2のアガロース(1.5ml)を最終濃度3MグアニジンHCl及び0.2Mギ酸に作成して、氷上で60分間インキュベートする。次に、HiTrap脱塩カラム(アマシャムファルマシアバイオテック)をHPLCシステム上で5ml/分の流速にてリン酸緩衝塩溶液(PBS)と共に用いてバッファー交換し、そして最終容量2mlに回収される。低分子量のフロースルーはSepPakカラムを通過させて、PBSで洗浄することにより、所望であれば追加の分析のためのペプチドを単離する。初期サンプル中の蛋白質の解離を保存するなら、次にグアニジンHClとギ酸の添加を省き、そして次の工程の前にPBSでCSFアリコートをして1:2希釈する。

10

【0091】

(c) 捕捉工程2(図5)

ファージカラムにより捕捉されたサンプル特異的(difference)蛋白質。1.5mlのサンプル1及び2を、HPLCカラム上のTBS中の専用の架橋結合ファージカラムを流速20 μ l/分にて通過させる。フロースルーを保存するが、消耗した蛋白質サンプルであり、且つ次のサイクルにおいて使用される。カラムを20mlのTBSで流速0.5ml/分において洗浄する。

20

工程III:異なる蛋白質の定量と同定(図6)

ファージ親和性カラムを用いた特異的蛋白質の単離。カラムからの結合蛋白質を1mlのPanning溶出バッファー(グリシンによりpHを2.2に調整した0.1MHCl)により流速0.5ml/分にて溶出して、100 μ lの画分を回収する。画分をプールして、約140 μ lのTris塩基により中和する。pH7.0-8.2の溶液を生じるように、pHが上がったことを確認する。

【0092】

(a) カチオン交換/逆相カチオン及びエレクトロスプレー質量測定分析による分析蛋白質のペプチドへの消化。上で調製されたサンプルを凍結乾燥し、そして8M尿素、200mM NH₄HCO₃, 及び20mM CaCl₂中に再度溶解して、ブラッドフォードアッセイを用いて定量する。エンドプロテアーゼLys-C(ベーリンガー-マンハイム)を最終基質対酵素比100:1に希釈し、そして37において15時間インキュベートする。Lys-C消化を水で4倍に希釈して、修飾されたトリプシン(ベーリンガー-マンハイム)を最終基質対酵素比50:1にて加える。トリプシン消化混合物を37において15時間インキュベートする。逆相カチオン上のペプチド混合物を脱塩し、凍結乾燥し、そして5mM K₂HPO₄、5%アセトニトリル(pH3)中に懸濁する(他の化学薬品及び酵素の消化法も適している)。

30

【0093】

(b) ペプチドの2Dクロマトグラフィー分離

二相性マイクロキャピラリーカチオン。融合シリカキャピラリー(100 μ m i.d. x 365 μ m o.d.)をCO₂-に基づくレーザープレーで引くことによりフリットのないカチオンを作成することにより、二相カチオンを構築する。カチオンに最初に8cmの5 μ m C18 RP粒子(218TP C18 Vydac)、そして次に4cmの5 μ m強カチオン交換粒子(PolySULFOETHYL アスパルタミド; ポリLC)を詰める。

40

【0094】

ペプチドの分離。ペプチド混合物を二相マイクロキャピラリーカチオン上に負荷する。以下の塩段階勾配を用いてSCXからRP粒子にペプチド画分を置き換える:(1)0%(1')0%(1'')0%, 0%(1''')0%(2)0-10%(3)10-20%(4)2

50

0 - 30% (5) 30 - 40% (6) 40 - 100% の SCX - B'、及び (7) 100% の SCX - C"。RP 粒子からペプチドを質量測定分析計へ、0 - 60% RP - B の直線勾配を用いて30分かけて300 n l / 分にて溶出する。移動相のバッファは、RP - A バッファに関して、0.5% 酢酸、5% アセトニトリル；RP - B に関しては、0.5% 酢酸、80% アセトニトリル、250 mM KCl；RP - C' に関しては、0.5% 酢酸、5% アセトニトリル、500 mM KCl (他の分離方法も適している)である。

【0095】

質量測定分析。Finnigan LCQ イオントラップ質量測定分析計 (Finnigan 社、サンホセ、CA) 上で質量測定分析を実施する。インテグラルクロマトグラフィ
10
ワークステーション (PE バイオシステムズ、フォスターシティ、CA) を、エレクトロスプレーイオン源を備えた LCQ イオントラップ質量測定分析計にカップリングさせる。エレクトロスプレー針を 5.5 kV の電位差にて操作して、加熱した脱溶媒化 (desolvation) キャピラリーを 250 に保つ。

【0096】

質量測定分析及びエレクトロスプレー質量測定分析による配列決定による同定と定量。自動化されたスペクトル及びデータの分析のために、各未加工の系列のスペクトルを、本明細書に記載されたとおりに処理する。最初に、単一か又は複数の荷電した親イオンに由来するスペクトルを同定する。処理された系列の質量スペクトルを、DEC アルファワーク
20
ステーション上で稼働するプログラム SEQUEST を用いて標準の ORFs に関連させる。用いられたプロテアーゼを考慮せずに全ての検索を実施するが、混合物中の多くの蛋白質は完全に消化されないからである。複数の荷電したペプチドに関しては、以下の基準を用いることにより、+2 か +3 の荷電状態を選択することを決定する：(1) 交差相関スコアが他の荷電状態のそれより 1 U 大きいよりも大きいか又は等しいなら、特定の荷電状態を選択する。(2) スコアを各荷電状態に指定する (トリプシン開始に関して +5, トリプシン終了に関して +5, 交差相関スコアが他の荷電状態より大きいなら +2, 予備スコアランキングが 50 より低いなら +2, そして最も高いスコアの荷電状態が選択される)。最後の蛋白質同定分析においてペプチドの選択された電荷及び捨てられた他の電荷状態からの SEQUEST 出力を使用する。各スペクトルに関して、交差相関スコアの値及び適合した配列を用いて、相関結果を濾過する。単一荷電ペプチドに関しては、交差相
30
関スコアを伴うスペクトルを、1.5 より大きいか又は等しいトリプシン性ペプチドに保持する。複数荷電ペプチドに関しては、交差相関を伴うスペクトルを、2 より大きいか又は等しいトリプシン性ペプチドに保持する。さらなる考慮からこれらの基準に合わない交差相関を伴う全てのスペクトルを除去する。蛋白質の同定のため、濾過した結果を分類して、ゲノム中の同じ注釈を付けられた ORFs 由来の唯一のペプチド配列を示す。一つ又はそれ以上の唯一のトリプシン性ペプチドに相関する質量スペクトルに基づく蛋白質の同定は、有効な同定とみなす。単独で蛋白質を同定するペプチドは、以下の基準に適合させた後に、手動により有効である。第1に、SEQUEST 交差相関スコアは、+1 トリプシン性ペプチドに関して 1.5 より大きいか、又は +2 又は +3 トリプシン性ペプチドに関しては 2 より大きくなければならない。第2に、MS / MS スペクトルはベースライン
40
ノイズを明らかに上回る断片イオンを伴う良質でなければならない。第3に、b 又は y イオンシリーズに対して同じ連続性がなければならない。第4に、プロリン残基に相当する y イオンは強烈なイオンであるべきである。第5に、未同定の強烈な断片イオンは +2 断片イオンか又は上記ペプチドの末端の一方からの一つ又は二つのアミノ酸の損失のいずれかに相当する。このプロセスを全部行なった後に、蛋白質の同定を公正に確信することができる。サンプル 1 と 2 に共通の蛋白質に関しては、おおよその相対的な豊富な比が Finnigan LCQUAN ソフトウェア及び分子イオンのピーク高を用いて測定できる (Link, A. J., et al., Direct Analysis of Protein Complexes Using Mass Spectrometry. Nature Biotechnology 17:676 - 682 (1999))。 50

【0097】

工程IV：特異的蛋白質に対する親和性試薬の単離

図7に示すとおりにフロースルーファージをプールする。ファージを増幅し、ファージ親和性マトリックス及びファージカラムを用意し、そして上記工程II(a) - (c)において記載されたおとりに特異的蛋白質を捕捉する。工程III(即ち、特異的蛋白質の定量及び同定を含む工程)において同定された蛋白質の数は、試験されることが必要な違うファージクローンの数を導く。

【0098】

同定された蛋白質に対するファージクローン特異性の特定は、以下のとおりに実施する：

1. 捕捉された蛋白質をファージ親和性カラムを用いて単離する。結合した蛋白質は、カラムから、1mlのPanning溶出バッファー(グリシンによりpH2.2に調節した0.1M HCl)を用いて、0.5ml/分の流速にて溶出して、100µl画分を回収する。画分をプールして、約140µlの1M Tris塩基、pH9.1により中和する。pH7.0 - 8.2の溶液を生じさせるようにpHが上昇したことを確認する。

10

【0099】

2. 溶出した蛋白質の同定。溶出した蛋白質は、上記工程IIIに記載されたとおりにLCQ質量測定分析計を用いて同定し、そして図6に例示されるが、主要な成分は単一の蛋白質であるべきなので、サンプルは装置に直接スプレーできる。

【0100】

3. ファージクローンの同定された蛋白質への特定。特定のファージクローンの、捕捉する蛋白質の同定との関連は、その特異性が定義されるのを可能にさせる。当該ファージは、蛋白質に対する特定の親和性試薬を提供して、必要なら、ペプチド又は抗体の同定が決定されることにより、よく確立された方法により、高純度のペプチド又は抗体の生産を可能にさせる。同じ蛋白質に結合する複数の別のファージクローンを単離してよい。それらの親和性はそれらの有用性を決定するかもしれない。

20

【0101】

工程V：最も豊富な蛋白質の消耗(図8)

上記の工程I(a)及び(b)に記載されたとおりに、蛋白質親和性マトリックスを用意して、初期捕捉工程を実施する。図2に示されたとおりに、結合したファージを、1mlのPanning溶出バッファー(グリシンによりpH2.2に調節した0.1M HCl)により流速0.5ml/分において溶出して、画分を回収する。ファージを含む画分をプールし、HiTrap脱塩カラム(アマシャムファルマシアバイオテック)を用いてHPLCシステム上で流速5ml/分にて、TBSとバッファー交換し、そして約1mlの最終容量を回収する。

30

【0102】

ファージカラムにより捕捉される最も豊富な蛋白質。カラム1及び2からの溶出ファージをプールする。ファージを増幅し、ファージ親和性マトリックス及びファージカラムを用意して、上記工程II(a) - (c)において記載された手法を用いて特異的蛋白質を捕捉する。1.5mlのサンプル1及び2をHPLC上のTBS中の専用の架橋結合ファージカラムに、流速20µl/分にて通過させる。フロースルーを残しておくが、消耗した蛋白質サンプルであって、次のサイクルに使用される(図9)。カラムを20mlのTBSで0.5ml/分の流速にて洗浄する。

40

【0103】

ファージ親和性カラムを用いた特異的蛋白質の単離。結合した蛋白質は、1mlのPanning溶出バッファー(グリシンによりpH2.2に調節した0.1M HCl)により流速0.5ml/分において溶出して、100µl画分を回収する。画分をプールし、約140µlの1M Tris塩基、pH9.1により中和する。pH7.0 - 8.2の溶液を生じさせるようにpHが上昇したことを確認する。溶出した蛋白質は必要ならばさらに精製し、さらなる構造研究及び機能研究のための「天然」物質の非常に貴重な源になり得て、DPCPから単離された特定の親和性試薬を用いた免疫親和性に基づいたアッセ

50

イの開発の基準を提供することを含む。

【0104】

工程V I . 豊富ではない蛋白質による新規なサイクル

消耗した蛋白質サンプルである工程Vからのフロースルーをも用いて、上記のサイクルを繰り返す(図9)。

【0105】

工程V I I . 豊富な蛋白質の消耗の継続

分析装置の消耗の限界に達するまで、工程V及びV Iを連続して繰り返すことができる。

【0106】

他の態様

本発明は好ましい態様に関して記載されてきたが、当業者は、その本質的な特徴を容易に確かめることができ、そして発明の精神及び範囲から逸脱することなく、様々な用途及び条件にそれを適合させるために発明の様々な変化及び修飾をなすことができる。当業者は、日常の実験を超えるものを用いることなく、本明細書に記載された発明の特定の態様の多数の均等物を認識又は確認することができる。そのような均等物は本発明の範囲に包含されることを意図する。

【0107】

この明細書中において言及された全ての刊行物及び特許は引用により本明細書に編入される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、2つの異なる生物学上のサンプルからの蛋白質親和性マトリックスの用意を示す模式的図面である。

【図2】

図2は、蛋白質親和性マトリックスによるファージの初期捕捉を示す模式的図面である。

【図3】

図3は、第1親和性カラムにより捕捉されたファージを次に第2カラムにおいて稼働させる次の捕捉工程、そのまた逆を示す模式的図面である。

【図4】

図4は、フロースルーファージをプールして増幅することによる、ファージ親和性マトリックスのセットの用意を示す模式的図面である。

【図5】

図5は、2つの異なる個体からの複合生物学サンプルをファージ親和性マトリックス/カラムのセットを通過させる第3捕捉工程を示す模式的図面である。

【図6】

図6は、ファージ親和性カラムに結合した蛋白質を溶出して質量分析により蛋白質を分析することにより2つの異なる複合生物学サンプルの間で異なる蛋白質の同定を示す模式的図面である。

【図7】

図7は、2つの複合生物学サンプルの間で異なる蛋白質に対する親和性試薬の単離を示す模式的図面である。

【図8】

図8は、2つの複合生物学サンプル内でもっとも豊富な蛋白質の消耗のサイクルを示す模式的図面である。

【図9】

図9は、対の複合生物学サンプルからの豊富な蛋白質の消耗に続く、豊富でない蛋白質の捕捉を示す模式的図面である。

【図10】

図1-9に示された特異的ファージ捕捉プロテオミクスのプロセスを要約した模式的図面である。

10

20

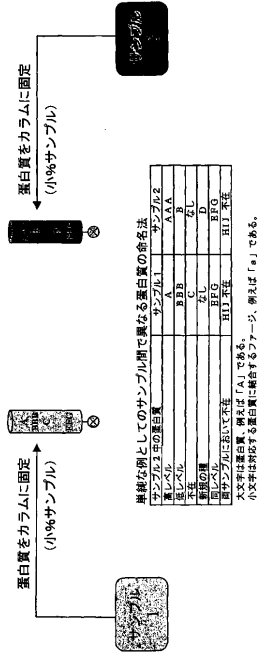
30

40

50

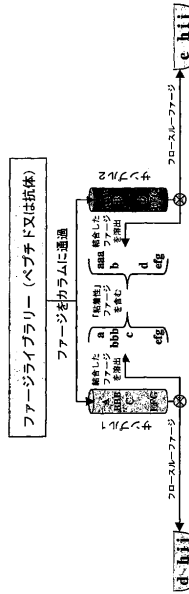
【 図 1 】

蛋白質親和性マトリックスの用意



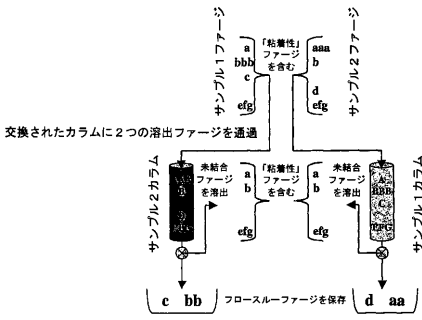
【 図 2 】

捕捉工程 1



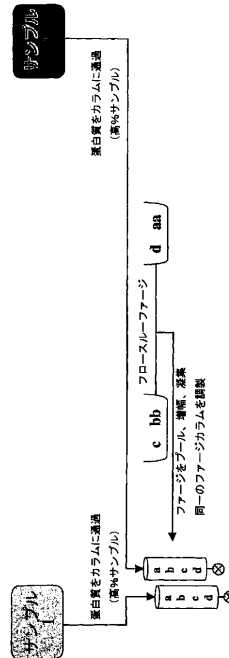
【 図 3 】

捕捉工程 2



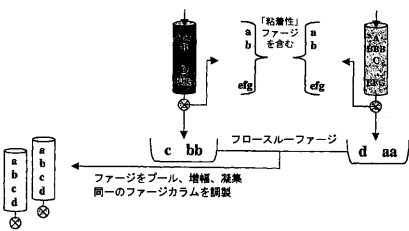
【 図 5 】

捕捉工程 3



【 図 4 】

フェージ親和性マトリックスの用意



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/48716 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68, 33/569, C12Q 1/68, G01N 33/543
- (21) International Application Number: PCT/US01/49030
- (22) International Filing Date: 13 December 2001 (13.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/255,577 14 December 2000 (14.12.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/255,577 (CIP) Filed on 14 December 2002 (14.12.2002)
- (71) Applicant and (72) Inventor: STROOBANT, Paul [NZ/US], 30 Morningside Avenue, Natick, MA 01760 (US).
- (74) Agent: BIEKER-BRADY, Kristina, Clark & Elbing LLP, 176 Federal Street, Boston, MA 02110-2214 (US).

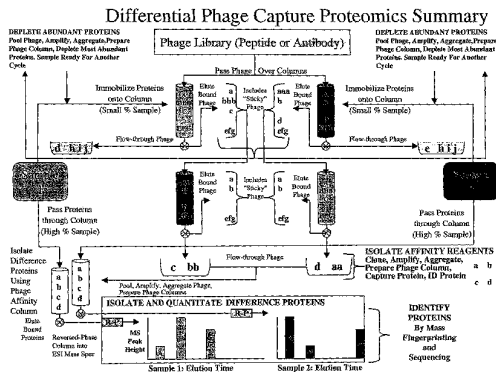
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: DIFFERENTIAL PHAGE CAPTURE PROTEOMICS



(57) Abstract: Disclosed herein are methods for identifying, isolating and comparing proteins and other biomolecules differing between two complex biological samples using affinity chromatography and phage display techniques.



WO 02/48716 A2

WO 02/48716

PCT/US01/49030

DIFFERENTIAL PHAGE CAPTURE PROTEOMICSField of the Invention

5 The invention relates to methods for identifying and isolating proteins and other biological molecules using phage display techniques.

Background of the Invention

10 There is an increasing need, particularly in the fields of medicine and agriculture, to identify and characterize the molecules which participate in a wide variety of biological processes and to find new molecules capable of modulating these processes. One way to search for novel bioactive compounds is to screen libraries of natural materials or synthesized molecules, using assay techniques which can range in complexity from simple binding reactions to elaborate physiological preparations. Unfortunately, selecting molecules of
15 interest from large ensembles or repertoires can be time-consuming and costly, and often only provides leads which require further investigation and development.

 Recently, there have been several developments both in the generation of libraries and in the methods of their selection which have
20 improved the efficiency and effectiveness of this approach. Phage display technology, largely developed in the 1990s, is an *in vitro* selection technique in which a protein (or peptide) is displayed on the surface of a phage virion, while the DNA encoding the protein is contained within the virion. This direct physical linkage between the displayed protein and the DNA encoding it
25 allows for successive rounds of selection and amplification. Large phage display libraries ("PDLs") can be generated and screened against target molecules. These PDLs may encompass an enormous number of different

WO 02/48716

PCT/US01/49030

peptides which represent potential ligands to a variety of macromolecules such as receptors, polypeptides, enzymes, carbohydrates, and antibodies. Individual phage can be captured from the libraries by virtue of the interaction of the displayed protein with a cognate ligand, and the captured phage can be
5 amplified by infection of bacteria. Thus, phage display technology is a very powerful tool for the selection of peptides that bind to target molecules. These peptides may find numerous applications, for example, as antigens in vaccine compositions, as enzyme inhibitors, or as agonists or antagonists of receptors.

One strategy for developing diagnostic tests and drugs for treating a
10 disease involves the identification of key cellular components, such as proteins, that are causally related to the disease process. This can often be accomplished by looking at differences in protein composition or protein action between diseased and healthy individuals or between treated and untreated patients. Unfortunately, present methods of analyzing biomolecules are time-consuming
15 and expensive, and suffer from inefficiencies in detection, imaging, purification, and analysis. Thus, there is a need for methods of detecting specific differences and changes between biological samples. Such methods would facilitate the identification of biological targets for diagnostic and drug development.

20 Although the genomics approach has advanced our understanding of the genetic basis of biological processes, it has significant limitations. For instance, the functions of products encoded by identified genes -- and especially by partial cDNA sequences -- are frequently unknown, and information about post-translational modifications of a protein can rarely be
25 deduced from a knowledge of its gene sequence. It is now apparent that a large proportion of proteins undergo post-translational modifications (such as glycosylation and phosphorylation) that can profoundly influence their biochemical properties. Furthermore, protein expression is often subject to

WO 02/48716

PCT/US01/49030

post-translational control, so that the cellular level of an mRNA does not necessarily correlate with the expression level of its gene product.

For these reasons, there is a need to supplement genomic data by studying the patterns of protein and carbohydrate expression, and of post-translational modification generally, in a biological or disease process through direct analysis of proteins, oligosaccharides, and other biomolecules. The burgeoning field of proteomics seeks to study variations in cellular protein levels between normal and diseased states by detecting and quantitating expression at the protein level, rather than the mRNA level. However, the proteomics approach faces numerous obstacles, including sample complexity, large relative abundance range, and quantitation of proteins. Technical constraints have heretofore impeded the rapid, cost-effective, reproducible, and systematic analysis of proteins and other biomolecules present in biological samples.

15 Summary of the Invention

The present invention features methods for isolation and quantitation of proteins and other biomolecules differing between samples over a wide range of relative abundance. The invention provides for the identification of proteins as known species, or as species with novel sequence or novel post-translational modifications, and supplies a means for characterization and isolation of specific affinity reagents against such proteins.

In one aspect, the invention provides a method of identifying a protein, polypeptide or other biomolecule that involves (a) adhering a complex biological sample from a first type of individual to a support to create an array; (b) adhering a complex biological sample from a second type of individual to a support to create an array; (c) exposing a peptide-nucleic acid coupled library at least one time to an array formed by step (a) to create a first product; and (d)

WO 02/48716

PCT/US01/49030

exposing the first product at least one time to an array formed by step (b) to create a second product.

In one embodiment of the invention, the method further includes the steps of (e) exposing a peptide-nucleic acid coupled library at least one time to an array formed by step (b) to create a third product; and (f) exposing the third product at least one time to an array formed by step (a) to create a fourth product. The second and fourth products may be compared, preferably via mass spectrometry, to identify differences between the two biological samples.

In another embodiment, the method includes the following additional steps: (g) combining the second and fourth products to produce a pooled product; (h) amplifying the pooled product; (i) adhering a portion of the amplified pooled product to a support to provide an array; (j) exposing a complex biological sample from the first or second type of individual at least one time to an array formed by step (i) to provide a fifth product; (k) exposing a complex biological sample from the first or second type of individual at least one time to an array formed by step (i) to provide a sixth product, wherein the complex biological sample is from a type of individual which is different from that used in step (j); and (l) comparing said fifth product and the sixth products. In a preferred embodiment, these products are compared using mass spectrometry.

The method of the invention allows for the identification of differences between two biological samples by using affinity chromatography and phage display techniques. With this method, a sample taken from a diseased individual can be compared against a sample taken from a non-diseased individual to identify differences in the expression of biomolecules within the two samples. Samples from medicated and non-medicated individuals can likewise be compared. The identification of differences between such samples can lead to biological targets and information useful for

WO 02/48716

PCT/US01/49030

diagnostic and/or pharmaceutical development.

The biological samples to be compared can be taken from a wide variety of biological sources, including tissues, such as epithelial, connective, muscle, or nerve tissue, or cultured cell types derived therefrom. Alternatively, 5 the biological samples may be taken from a body fluid, such as cerebrospinal fluid (CSF), blood, saliva, mucous, tears, pancreatic juice, seminal fluid, sweat, milk, bile, plasma, serum, lymph, urine, pleural effusions, bronchial lavage, ascites, or synovial fluid. In a particularly preferred embodiment, the body fluid is CSF.

10 In yet another embodiment, the biological samples are from an organ type, including skin, bone, cartilage, tendon, ligament, skeletal muscle, smooth muscle, heart, blood, blood vessel, brain, spinal cord, peripheral nerve, nose, trachea, lung, mouth, esophagus, stomach, intestine, kidney, uterus, ureters, urethra, bladder, hypothalamus, pituitary, thyroid, pancreas, adrenal gland, 15 ovary, oviduct, vagina, mammary gland, testicle, seminal vesicle, penis, lymph, lymph node, lymph vessel, white blood cell, T-cell and B-cell.

The arrays of the invention can be prepared by crosslinking the complex biological samples to a solid support. The samples are preferably treated with chemical agents to denature the proteins prior to being adhered to 20 the support.

In a preferred embodiment of the invention, the peptide-nucleic acid coupled library is a phage display library, most preferably an antibody library, or a recombinant display or synthetic peptide library.

25 The various products formed by exposing a library or complex biological sample to an array may include either material which did not bind to the array (i.e., flow-through product) or material which bound to the array and was subsequently released (i.e., eluted bound product). The library or complex biological sample may be exposed to the array multiple times in order to

WO 02/48716

PCT/US01/49030

produce the product.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description thereof and from the claims.

Definitions

5 By "adhering" is meant directly or indirectly linking a portion of one material to a portion of another material, either covalently or non-covalently.

By "amplifying" is meant increasing in number.

10 By "array" is meant a plurality of polymer sequences (e.g. proteins, peptides, oligonucleotides, polynucleotides, etc.) or other biomolecules which are associated with the surface of a substrate or support. Examples of arrays include a protein affinity column and a phage affinity column.

15 By "complex biological sample" or "biological sample" is meant any solid or fluid sample obtained from, excreted by, or secreted by any living organism, including single-celled micro-organisms (such as bacteria and yeast) and multicellular organisms (such as plants and animals, for instance a vertebrate or a mammal, and in particular a healthy or apparently healthy human subject or a human patient affected by a condition or disease). A biological sample may be a biological fluid obtained from any site or substance of the organism (e.g. blood, plasma, serum, urine, bile, cerebrospinal fluid, 20 aqueous or vitreous humor, or any bodily secretion), a transudate, an exudate (e.g. fluid obtained from an abscess or any other site of infection or inflammation), or fluid obtained from a joint (e.g. a normal joint or a joint affected by disease such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis, gout or septic arthritis). Alternatively, a biological sample can be obtained from any organ or 25 tissue (including a biopsy or autopsy specimen) or may comprise cells (whether primary cells or cultured cells) or medium conditioned by any cell, tissue or organ. If desired, the biological sample may be subjected to

WO 02/48716

PCT/US01/49030

preliminary processing, including but not limited to preliminary separation techniques and/or denaturation. For example, cells or tissues can be extracted and subjected to subcellular fractionation for separate analysis of biomolecules in distinct subcellular fractions, e.g. proteins or drugs found in different parts of the cell. See Deutscher (ed.), *Methods In Enzymology* 182:147-238 (1990). Similarly, immunoprecipitation can be performed to identify antigenically related biomolecules such as proteins.

By "exposing" is meant allowing contact to occur between two materials.

By "individual" or "subject" is meant a single-celled or multicellular organism, such as a plant, animal, fungus, protozoan, or bacterium. In a preferred embodiment, the individual is a mammal, most preferably a human or other primate species.

By "peptide-nucleic acid coupled library" is meant a collection of peptides wherein each peptide is linked (directly or indirectly) to the DNA that encodes the peptide. An example of a peptide-nucleic acid coupled library would be a phage display library ("PDL").

The terms "peptide", "protein" and "polypeptide" are used interchangeably herein and refer to any chain of two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, regardless of post-translational modification (e.g., glycosylation or phosphorylation).

The present invention is useful for identifying and analyzing proteins, but is more generally applicable to the identification and analysis of any biomolecule. As used herein, the term "biomolecule" refers to any organic molecule that is present in a biological sample, and includes peptides, polypeptides, proteins, fatty acids, oligosaccharides, lipids, steroids, prostaglandins, prostacyclines, and nucleic acids (including DNA and RNA).

WO 02/48716

PCT/US01/49030

By "substrate" or "support" is meant any porous or non-porous water insoluble material, which is preferably rigid or semi-rigid. The surface can have any one of a number of shapes, such as membranes, filters, chips, slides, wafers, fibers, magnetic or nonmagnetic beads, gels, tubing, strips, plates, rods, polymers, particles, microparticles, capillaries, and the like. The substrate can have a variety of surface forms, such as wells, trenches, pins, channels and pores, to which polypeptides, polynucleotides, or other biomolecules are bound. The substrate can be hydrophilic or capable of being rendered hydrophilic and includes inorganic powders such as silica, magnesium sulfate, and alumina; natural polymeric materials, particularly cellulosic materials and materials derived from cellulose, such as fiber containing papers, e.g., filter paper, chromatographic paper, etc.; synthetic or modified naturally occurring polymers, such as nitrocellulose, cellulose acetate, poly(vinyl chloride), polyacrylamide, cross linked dextran, agarose, polyacrylate, polyethylene, polypropylene, poly(4-methylbutene), polystyrene, polymethacrylate, poly(ethylene terephthalate), nylon, poly(vinyl butyrate), etc.; either used by themselves or in conjunction with other materials; glass available as Bioglass, ceramics, metals, and the like. Natural or synthetic assemblies such as liposomes, phospholipid vesicles, and cells can also be employed. A commonly used support is Controlled Pore Glass (CPG), which consists of a glass matrix prepared uniformly with pores of defined size. Immobilization of proteins and other biomolecules on a substrate or surface may be accomplished by well-known techniques, commonly available in the literature.

25 Brief Description of the Drawings

FIG. 1 is a schematic diagram showing the preparation of protein affinity matrices from two different biological samples.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

FIG. 2 is a schematic diagram showing an initial capture of phage by the protein affinity matrices.

FIG. 3 is a schematic diagram showing a subsequent capture step, in which phage that were captured by the first affinity column are then run through the second column, and vice versa.

FIG. 4 is a schematic diagram showing the preparation of a set of phage affinity matrices by pooling and amplifying the flow-through phage.

FIG. 5 is a schematic diagram showing a third capture step in which complex biological samples from two different individuals are passed through a set of phage affinity matrices/columns.

FIG. 6 is a schematic diagram showing the identification of proteins that differ between two separate complex biological samples by eluting proteins that bound to phage affinity columns and analyzing the proteins via mass spectrometry.

FIG. 7 is a schematic diagram showing the isolation of affinity reagents against proteins that differ between two complex biological samples.

FIG. 8 is a schematic diagram showing a cycle for depletion of the most abundant proteins within two different complex biological samples.

FIG. 9 is a schematic diagram showing the capture of less abundant proteins following the depletion of abundant proteins from a pair of complex biological samples.

FIG. 10 is a schematic diagram summarizing the process of differential phage capture proteomics as illustrated in FIGS 1-9.

Detailed Description

In developing new methods for diagnosing and treating a disease, it is important to identify the key cellular components, such as proteins and other biomolecules, that are associated with the disease. One way to identify such

WO 02/48716

PCT/US01/49030

components is to look for differences in protein expression between diseased and healthy individuals.

The present invention provides a means for comparing two complex biological samples in order to determine the differences in proteins and other biomolecules that are present in the samples. In a preferred embodiment, a pair of protein affinity matrices are prepared from the two biological samples to be compared. A phage display library is exposed to the matrices in a series of capture steps which results in the isolation of phage that bind to those proteins that are different between the two samples (i.e. the "difference proteins"). These phage are amplified and used to prepare a set of phage affinity matrices. The biological samples being compared are then exposed to these phage matrices in order to capture differentially expressed proteins. By comparing a sample taken from a diseased subject to a sample taken from a healthy subject, one can identify biological targets of therapeutic and diagnostic importance and lead structures for drug development. For example, a receptor that is found to exist on only a sample taken from a diseased individual, or at a different concentration in the diseased sample, may serve as a potential target for diagnosis or treatment of the disease. In addition, a ligand found to have high affinity and specificity for the receptor provides a lead structure for drug development. Furthermore, a protein species which changes its distribution, level, or characteristics during treatment may provide an indication of beneficial or toxic effect in an animal, such as a human patient.

Samples can be taken from a wide variety of organs types, including but not limited to skin, bone, cartilage, tendon, ligament, skeletal muscle, smooth muscle, heart, blood, blood vessel, brain, spinal cord, peripheral nerve, nose, trachea, lung, mouth, esophagus, stomach, intestine, kidney, uterus, ureters, urethra, bladder, hypothalamus, pituitary, thyroid, pancreas, adrenal gland, ovary, oviduct, vagina, mammary gland, testicle, seminal vesicle, penis,

WO 02/48716

PCT/US01/49030

lymph, lymph node, lymph vessel, white blood cell, T-cell and B-cell. Other suitable sample sources include, but are not limited to, epithelial, connective, muscle, or nerve tissue, or bodily fluids, such as cerebrospinal fluid (CSF), blood, saliva, tears, mucous, pancreatic juice, seminal fluid, sweat, milk, bile, plasma, serum, lymph, urine, pleural effusions, bronchial lavage, ascities, or synovial fluid.

The source of the sample is chosen based on a variety of factors, such as the nature of the disease or condition being studied. For instance, CSF may be taken to study a disease of the central nervous system, while pancreatic juice may be taken to study a disease of the pancreas. In a disease state such as cancer, any or all of the types of tissues or cells which are related directly to the particular type of cancer (e.g. lymph for lymphoma, etc.) may be analyzed. Methods for properly collecting and storing various biological samples are known in the art, and may vary depending on the nature of the sample.

15 Preparation of Affinity Matrices Using Biological Samples

After the biological samples have been collected, a set of arrays or matrices are created by adhering each of the samples to a separate support (FIG. 1). In one embodiment of the invention, the array is an affinity matrix that includes a solid support or gel to which is attached a multiplicity of different proteins or other biomolecules. Suitable matrix materials include, but are not limited to paper, glasses, ceramics, metals, metalloids, polacryloylmorpholide, various plastics and plastic copolymers such as NYLON™, TEFLON™, polyethylene, polypropylene, poly(4-methylbutene), polystyrene, polystyrene/latex, polymethacrylate, poly(ethylene terephthalate), rayon, nylon, poly(vinyl butyrate), polyvinylidene difluoride (PVDF), silicones, polyformaldehyde, cellulose, cellulose acetate, nitrocellulose, and controlled-pore glass (Controlled Pore Glass, Inc., Fairfield,

WO 02/48716

PCT/US01/49030

N.J.), aerogels (see, e.g., Ruben et al., *J. Materials Science* 27:4341-4349 (1992); Rao et al., *J. Material. Science* 28:3021 (1993); Back et al., *J. Phys. D. Appl. Phys.* 22:7309-734 (1989); Kim & Jang, *J. Am. Ceram. Soc.* 74:1987-92 (1991) and the like, and other materials generally known to be suitable for use
5 in affinity columns. In a preferred embodiment, the support is a streptavidin sepharose column. However, screening can be carried out on other solid phases or in solution.

Biomolecules, such as proteins, can easily be attached to a solid substrate where they act as immobilized ligands that interact with
10 complementary molecules present in a solution contacted to the substrate. The source to be screened, for example a phage display library, is passed over the affinity matrix, allowing target molecules to be captured by the immobilized ligands. Unbound components can be washed away from the bound complex to either provide a solution lacking the target molecules bound to the affinity
15 column, or to provide the isolated target molecules themselves. After unbound background substances are washed away, the bound material is eluted, often in an eluent that loosens the association between the target and the ligand. The biomolecules captured in a affinity matrix can be separated and released by denaturation either through heat, adjustment of salt concentration, or the use of
20 a destabilizing agent such as formamide, TWEENTM-20 denaturing agent, or sodium dodecyl sulfate (SDS).

Many techniques are known in the art for attaching proteins and other biomolecules to a substrate or support, such as those described in, for example, *Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical
25 Sciences*, M. Aslam, A. Dent Groves Dictionaries, Inc. New York, NY (1988). Any suitable derivatization or solid phase binding method may be used. In a preferred embodiment, the proteins of the complex biological sample are adhered by biotinylating the proteins and using a substrate or support that

WO 02/48716

PCT/US01/49030

includes avidin or an avidin-related compound (e.g. streptavidin). The biotin specifically binds to the avidin-related compound thereby attaching the proteins to the substrate. Other well known specific binding pairs may also be used as a means for attaching the sample proteins to the support.

- 5 Prior to adhering the samples to the support, the proteins of the sample may be denatured to allow for a more complete analysis. A variety of dissociative methods are known in the art and may be used to break up protein complexes, solubilize proteins, and unfold proteins within the samples. These methods include, for example, treatment with guanidine HCL, formic acid, 10 various chaotropes, detergents, heating, phase partitioning, and derivatization. Alternatively, if the associations of proteins in the sample are to be preserved, such treatments are omitted and the protein complexes may optionally be crosslinked to increase stability. By preserving associations, phage against one member of a protein complex may allow for the isolation and identification of 15 more than one component of a complex.

Peptide-Nucleic Acid Coupled Libraries

- In accordance with the present invention, the protein affinity matrices described above are used to screen a peptide-nucleic acid coupled library, which is made up of a collection of peptides, wherein each peptide is 20 linked to the DNA encoding it. In a preferred embodiment, the library is a phage display library. Display technology represents a collection of methods for creating libraries of modularly coded biomolecules that can be screened for desired properties. Two of the most important characteristics of display technologies are extremely high detection sensitivity and the ability to 25 determine the structure of a desired compound rapidly after initial screening. A variety of phage libraries can be used, in the present invention, including immune or nonimmune, and single-chain Fv or Fab fragment antibody

WO 02/48716

PCT/US01/49030

libraries; and recombinant-display or synthetic peptide libraries. Examples of suitable phage display libraries and techniques for their preparation are well known in the art and described in, for example, Barbas, F., et al., *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York (2001). Other
5 libraries which can be used are described by Li, M., "Applications of display technology in protein analysis", *Nature Biotechnology* 18:1251-1258 (2000).

Peptide libraries comprise vast numbers of peptides of a given length, whose sequences have been randomly generated to vary the amino acid residues at each position. The usual goal for using such libraries is to select
10 high affinity binders from the typical pool of binders that is found against nearly all proteins that are screened. In its simplest form, the method of the invention uses a single binder of moderate/low affinity, which is selected during the process for optimal protein capture and release

Phage display libraries can be selected based on their particular
15 properties, depending on the type of analysis required and the properties of the affinity reagents to be isolated. For example, the choice between peptide and antibody phage display libraries related to whether a desired affinity reagent is a peptide or an antibody. The library used preferably contains as large and diverse a population of binders specific for the chosen sample as possible.
20 Compatible mixtures of libraries can be used to capture as many species as possible from the chosen sample. Ultimately, "panproteomic" and "proteomic subset" libraries can be developed which contain binders for all known species in any particular type of sample.

The phage library is passed through the protein affinity matrices
25 generated from two different biological samples in order to capture phage that bind the proteins that differ between the two samples. The sequence of phage exposure is shown in FIGS. 2 and 3. First, the phage library is exposed to a protein affinity matrix prepared from the first biological sample. The unbound

WO 02/48716

PCT/US01/49030

phage is washed away, and the bound phage is released and then exposed to a protein affinity matrix prepared from the second biological sample. The flow-through from this second exposure step is retained and contains phage that bind to proteins present in the first biological sample but not the second sample.

5 An identical phage library is exposed to the affinity matrices in the reverse order, i.e., the library is first exposed to a protein affinity matrix prepared from the second sample. The unbound phage is washed away and the bound phage is eluted and then exposed to a protein affinity matrix prepared from the first sample. The flow-through from the second exposure step is
10 retained and contains phage that bind to proteins present in the second sample, but not the first sample.

Thus, the phage library goes through two capture steps. In the first step, the phage library is passed through the protein affinity matrices prepared from the biological samples and the bound phage are recovered. In the second
15 capture step, the phage which bound to the protein affinity matrix prepared from the first sample, are exposed to the protein affinity matrix prepared from the second sample. Conversely, phage which bound to the protein affinity matrix prepared from the second sample, are exposed to the protein affinity matrix prepared from the first sample. This combination of capture steps
20 results in the isolation of phage that are capable of binding to those proteins which are different between the first and second samples. The flow-through phage from the second capture step may be pooled, amplified, and used to prepare a set of identical phage affinity matrices for further screening. In addition, the phage may be used to isolate affinity reagents against the
25 "difference proteins" (See FIG. 7).

WO 02/48716

PCT/US01/49030

Phage Affinity Matrices

As discussed above, the phage which have been selected from the phage display library by exposure to protein affinity matrices are used to generate a set of phage affinity matrices (FIG. 4). Methods for preparing phage as an affinity matrix are known in the art and described, for example, by Smith et al., *Journal of Immunological Methods* 215:151-161 (1998). These phage affinity matrices can be used to directly screen the biological samples being compared. Prior to passing the samples through the phage matrix, they may be treated, as discussed above, using any of a variety of dissociative methods to break up protein complexes, solubilize proteins, and unfold proteins to allow a more complete analysis. Cross-linked filamentous phage can be successfully employed directly for affinity purifications, and the direct use of aggregated phage encoding an affinity capture peptide avoids the need to decode the appropriate peptide sequence, synthesize it and then prepare an affinity capture matrix, although this can be done if desired.

As shown in FIG. 5, complex biological samples from two different individuals are exposed to the phage affinity matrices. The proteins that bind to the phage matrices include those proteins which are different between the two samples. Proteins which fail to bind to the phage matrices are washed away and the bound proteins are eluted and analyzed (FIG. 6), using any of a variety of identification and quantitation methods known in the art. (See Gygi, S.P., et al., *Nature Biotechnology* 17:994-999 (1999); Gygi, S.P., et al., *Curr. Opin. Biotechnol* 11:396-401 (2000); Oda, Y, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6591-6596 (1999); Mirgorodskaya, O.A., et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14:1226-1232 (2000); Munchbach, M., et al, *Anal. Chem.* 72:4047-4057 (2000); Link, A.J. et al., *Electrophoresis* 18:1314-1334 (1997); Washburn et al., *Nature BioTechnology* 19: 242-247 (2001)). In a preferred embodiment, the eluted proteins are passed through a reverse phase column

WO 02/48716

PCT/US01/49030

into an ESI mass spectrometer. The proteins are identified by mass fingerprinting and sequencing. In addition to identifying proteins that are present in one sample but not the other, one skilled in the art will appreciate that the method of the invention can also be used to determine differing levels of a protein between two samples.

Depletion of Most Abundant Proteins

As shown in FIG. 8, in one embodiment of the invention, the most abundant proteins contained within the biological samples can be depleted by recovering the bound phage after the initial capture step (FIG. 2), amplifying the phage, preparing phage affinity columns, and repeating the cycle using the methods described above and in the Example below. The steps shown in FIGS. 8 and 9 can be continuously repeated until the limits of detection of the analytical device have been reached. Once the abundant proteins have been depleted, the differences in the biological samples can be analyzed according to the techniques described herein, using samples containing less abundant proteins. This allows for identification of proteins which may be present in very low quantities in the biological samples.

The present invention is illustrated by the following example which describes an application of the method of the present invention to a pair of samples of human cerebrospinal fluid (CSF). The example is in no way intended to be limiting of the invention.

EXAMPLE

Step I. Proteins Capture Phage Against Proteins Differing Between Samples

(a) Preparation of Protein Affinity Matrices for Two Samples (FIG. 1).

WO 02/48716

PCT/US01/49030

Sample Collection. Samples of human CSF are collected from two different individuals by lumbar puncture in a sterile container. The samples should immediately be placed in an ice bath and brought to the laboratory for analysis. On arrival in the laboratory, the CSF samples should be centrifuged to
5 remove circulating cells at 2,000g for 10 minutes at 5°C. The samples can be either processed immediately or stored at -7°C until analysis (Sanchez, J.C. and Hochstrasser, D.F., "Proteome Analysis Protocols" in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 112, Humana Press, Totowa, NJ (1999)).

Sample Preparation. To dissociate bound proteins and other
10 species, and to minimize protein interactions, aliquots of the samples (100µl) are made up to a final concentration of 3M guanidine HCl and 0.2M formic acid, and incubated in ice for 60 minutes. They are then buffer exchanged using a HiTrap Desalting Column (Amersham Pharmacia Biotech) on an HPLC system at a flow rate of 5ml/min with phosphate-buffered-saline (PBS)
15 and collected in a final volume of 200µl. The low molecular weight flow-through can be passed through a SepPak column and washed with PBS to isolate peptides for additional analysis if desired. If the *in vivo* associations of proteins are to be preserved, then the additions of guanidine HCl and formic acid are omitted, and the CSF aliquots are diluted 1:2 with PBS before the next
20 step.

Protein Biotinylation. In the next step, the proteins in the buffer exchanged samples are biotinylated. Immediately prior to use, make a 0.5mg/ml solution of Sulfo-NHS-LC-Biotin in 2mM sodium acetate, pH 6.0. Add 50 µl of this solution to the desalted CSF sample and incubate in ice for 2
25 hours. Add 500µl 1M Tris-HCl, pH 7.4, and incubate for a further 30 minutes to inactivate the remaining biotin linker. To remove unreacted biotin, desalt using a HiTrap Desalting Column (Amersham Pharmacia Biotech) on an HPLC system at a flow rate of 5ml/min with TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5,

WO 02/48716

PCT/US01/49030

150 mM NaCl) and collect in a final volume of 200 μ l (Barbas, F., et al., *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York (2001)).

- Capture Column Preparation.* Pass a biotinylated and desalted solution from a human CSF sample, named Sample 1, over a HiTrap
- 5 Streptavidin Sepharose Column (Amersham Pharmacia Biotech) on an HPLC system equilibrated with TBS at 0.1 ml/minute. Wash this column ("Column 1"), with 20 ml of TBS at 1.0 ml/minute. Repeat this process for a second human CSF sample, named Sample 2, to yield a second column ("Column 2").

(b) Capture Step One (FIG. 2)

- 10 *Proteins Capture Phage.* Pass 10^3 to 10^4 equivalents of a Phage Peptide Library (eg 2×10^{11} particles for a library of 2×10^8 clones would be 10^3 equivalents) in 5ml of TBS over each of Columns 1 and 2 on an HPLC system, at a flow rate of 40 μ l/minute. Wash the columns with 20 ml TBS at a flow rate of 0.5 ml/minute.
- 15 *Captured Phage are Eluted.* Elute the bound phage with 1 ml Panning Elution Buffer (0.1 M HCl adjusted to pH 2.2 with glycine) at a flow rate of 0.5 ml/minute and collect fractions. Pool the fractions containing phage, buffer exchange using a HiTrap Desalting Column (Amersham Pharmacia Biotech) on an HPLC system at a flow rate of 5 ml/min with TBS, and collect
- 20 in a final volume of about 1 ml. (Barbas, F. et al., *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York (2001)).

(c) Capture Step Two (FIG. 3)

- Proteins Capture Phage from Swapped Columns.* Pass the eluted and buffer exchanged phage from Column 1 over Column 2 on an HPLC
- 25 system, at a flow rate of 40 μ l/minute. Wash the column with 20 ml TBS at a flow rate of 0.5 ml/minute. Repeat this process with the eluted and buffer

WO 02/48716

PCT/US01/49030

exchanged phage from Column 2 over Column 1.

- Captured Phage from Swapped Columns are Eluted.* Elute the bound phage from Column 1 with 1 ml Panning Elution Buffer (0.1 M HCl adjusted to pH 2.2 with glycine) at a flow rate of 0.5 ml/minute and collect
- 5 fractions. Pool the fractions containing phage, and neutralize with about 140 μ l 1M Tris Base, pH 9.1. Verify the pH has been raised to yield a solution of pH 7.0-8.2. Repeat this process with the bound phage from Column 2.

Step II. Specific Phage Capture Difference Proteins

- (a) Preparation of Phage Affinity Matrix (FIG. 4)
- 10 *Pool Phage.* Pool the flow-through phage from Columns 1 and 2.
- Amplify Phage.* Cells for Phage Infection are prepared according to the following protocol:
1. Transfer a single colony of K91 cells to a culture tube containing 2 ml of NZY. Incubate overnight at 37°C with vigorous shaking (250 rpm).
 - 15 2. Inoculate a 125-ml flask containing 20 ml of NZY with 400 μ l of the overnight culture. Shake vigorously (250 rpm) at 37°C until the cells have reached mid-log phase ($OD_{595} = \sim 0.45$; this takes about 1.5-2 hours).
 3. Use slow shaking to 100 rpm for 10 minutes to allow the bacteria to regenerate sheared *F. pili*. Measure the OD_{595} ; it preferably should not be
 - 20 over 0.65 (best at 0.55-0.65).
 4. Transfer the culture to an Oak Ridge tube and centrifuge at 600g (2,200 rpm) in a SORVALL SS34 rotor (or equivalent) for 10 minutes at room temperature or 4°C.
 5. Discard the supernatant and gently resuspend the cells in 20 ml of
 - 25 80 mM NaCl.
 6. Transfer the mixture to a 125-ml culture flask and shake gently (100 rpm) at 37°C for 45 minutes.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

7. Transfer the mixture to an Oak Ridge tube and centrifuge at 850g (2,800 rpm) in an SS34 rotor (or equivalent) for 10 minutes at 4°C.
8. Pour off the supernatant and resuspend the cells gently in 1 ml of 4°C NAP buffer.
- 5 9. Keep the cells on ice when in use, and store on ice in the refrigerator. The cells are best used immediately, but will stay competent for phage infection for a few days. The cells are no longer competent if they remain aggregated after gently shaking of the tube in which they are stored. The final concentration of cells should be approximately 5×10^9 cells/ml.
- 10 (Barbas, F. et al., *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York (2001)).

Infect the Starved Cells With Eluted Phage.

1. Determine the concentration of the phage by agarose gel electrophoresis or spectrophotometry.
- 15 2. Infect cells by distributing 10 μ l of diluted virions (less than or equal to 10^6 particles) into microcentrifuge tubes or into wells across a row of a flexible ELISA plate. Add 10 μ l of starved or fresh, high-density cells ($\sim 5 \times 10^7$ cells). Incubate at room temperature for 10-15 minutes.
- 20 3. Induce the tetracycline-resistance genes by adding 150 μ l (for microtiter plates) to 1 ml (for microcentrifuge tubes) of NZY containing 0.2 μ g/ml tetracycline and mixing. Incubate at 39°C with intermittent shaking (or tapping the ELISA plate) for 30 minutes. If using 1.5 ml microcentrifuge tubes, place the tubes upside-down in a beaker and shake in an incubator. Briefly microfuge the tubes before opening, and mix the cells by pipetting.
- 25 4. Dilute the infected cells in flexible microtiter plates with NZY containing 15 μ g/ml tetracycline. Mix 20 μ l of cells with 180 μ l of NZY+tet for 1:10 dilutions, and 2 μ l in 198 μ l of NZY+tet for 1:1000 dilutions.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

5. The concentration of tetracycline-resistant transducing units (TU) is determined by titering. Titering of an unknown sample is usually done alongside cells infected with a positive control phage whose number of particles/ml is known and that has been previously titered. A good positive control is a stock of CsCl-purified fd-tet or f88-4 phage. Cells that have been treated with phage-dilution buffer alone, in parallel with the diluted phage samples, serve as the negative control. When counting colonies, 1 colony = 1 TU.
6. For plate titering, spread 100µl of diluted, infected cells onto NZY agar plates containing 40 µg/ml tetracycline. Spread one plate per dilution. Invert the plates and incubate overnight at 37°C.
7. For spot titering, use plates that have been dried by incubating them with their lids askew in a 37°C incubator or sterile hood for a few hours. Before spotting, mark the plates where each spot (up to 16 per plate) will go. Carefully dot 15-20 µl of diluted phage over each spot (a multichannel pipettor can be used for this). Let the agar absorb the drops (the spots should become flat), then invert the plates and incubate overnight at 30°C.
8. For colony counting (especially from spot titers), the tetracycline-resistant colonies should be small, but visible. To prevent the overgrowth of colonies, (1) take the plates out of the 37°C incubator before leaving for the night, let them sit overnight at room temperature, and put them back at 37°C the following day until the colonies reach the right size; or (2) if the infections are done late at night, incubate overnight at 30°C and have someone check the colonies at the beginning of the following day. Once the colonies have reached optimal counting size, they should be stored at 4°C until they are counted. They can be stored for several weeks if the plates are sealed with Parafilm. (Barbas, F. et al., *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York (2001)).

WO 02/48716

PCT/US01/49030

Large-Scale Preparation of Phage

1. Pick all single transfected colonies and mix each in a 1.5 ml microcentrifuge tube containing 220 μ l of NZY medium. Pool contents of all tubes, and inoculate each of two 2-liter flasks containing 500 ml of NZY and
5 15 μ g/ml of tetracycline with the diluted, pooled cells. Shake vigorously (~200rpm) for about 20 hours at 37°C.
2. Transfer 100 μ l of culture to a 0.5 ml microcentrifuge tube, and pellet the cells in a microfuge by spinning full-speed (14,000 rpm) for 2 minutes. Transfer 20 μ l of the phage-containing supernatant to a fresh 0.5 ml
10 microcentrifuge tube containing 5 μ l of 5X Lysis Mix (warm the Lysis Mix to make sure the SDS is in solution); mix by pipetting. Incubate tube in a 70°C water bath for 15-20 minutes and microfuge briefly. Load a 15 μ l sample onto a 0.8% agarose gel in 4x GBB, and run. Use a known quantity of f88.4 phage as a control (2×10^{10} phage particles = 100 ng DNA). Run this gel either before
15 going on in the procedure (to be sure the phage yield is good; $\sim 10^{12}$ particles/ml of culture supernatant), or at the end of the procedure (to determine the percent yield of PEG-purified phage).
3. Divide the culture from Step 1 among four 250-ml centrifuge bottles (~230 ml/bottle) Centrifuge at 2,400 g for 10 minutes at 4°C. Without
20 disturbing the cell pellet, transfer the phage-containing supernatant into clean bottles, and recentrifuge at 6,200g for 10 minutes at 4°C. Carefully pour the supernatant into fresh, tared, 250 ml centrifuge bottles and determine the culture volume in each bottle (1g = 1ml).
- 25 4. Add 0.15 volume of PEG/NaCl solution to each bottle of measure supernatant. Screw caps on tightly, and mix thoroughly by inverting the bottles gently approximately 100 times. Incubate the mixtures for at least 4 hours on ice or overnight at 4°C.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

5. Pellet the phage by centrifuging at 6,200g for 40 minutes at 4°C. Discard the supernatant, being careful not to disturb the pellet. Remove the residual supernatant by briefly recentrifuging the bottles, tilting each bottle so that the pellet is opposite the remaining supernatant, and aspirating with a 1-ml pipettor.
6. Add 7.5 ml of TBS to each bottle and shake at 150 rpm in a 37°C incubator for approximately 30 minutes to resuspend the pellets. Centrifuge briefly to drive the solution to the bottom of each bottle. Transfer the solution from all four bottles to two tared Oak Ridge tubes. Rinse each bottle with another 7.5 ml of TBS and add to the Oak Ridge tubes. Each tube should now have a total volume of 30 ml. Balance the tubes with TBS and mix the phage thoroughly by inversion.
7. Centrifuge the tubes at 10,100-22,700g for 10 minutes at 4°C to clear the supernatants. Transfer the supernatants to fresh, tared Oak Ridge tubes, and determine the volumes (1g = 1ml).
8. Add 0.15 volume of PEG/NaCl solution to each tube, and invert gently approximately 100 times. Allow the phage to precipitate by incubating the tubes for at least 1 hour on ice. A heavy precipitate should appear.
9. Collect the precipitated phage by centrifuging at 10,100g for 40 minutes at 4°C. Remove the supernatant as in Step 5 above.
10. Add 10 ml of TBS to each tube. Resuspend the phage pellet by gently vortexing, and then allowing the pellet to soften at room temperature for about 1 hour. Vortex again, and briefly centrifuge to drive the solution down. (If the phage are to be further purified on a CsCl density-gradient, add only 5 ml of TBS to each tube, resuspend the phage, and combine the two supernatants into a single Oak Ridge tube.)

WO 02/48716

PCT/US01/49030

11. Clear the supernatants by centrifuging the tubes at 10,100-22,700g for 10 minutes at room temperature or 4°C. Pour the cleared supernatant from each tube into a 15-ml polypropylene snap-cap tube and store at 4°C in the dark.
- 5 12. To determine the concentration and yield of phage particles, treat an aliquot of phage with 5x Lysis Mix (as in Step 2). Run 1- 5- and 10- μ l samples on a 1.2% agarose gel in 4x GBB, using as a standard a known amount of phage treated in the same way. Include on the gel a sample from the original culture supernatant (Step 2) to calculate the percent yield. Electrophoretic
- 10 analysis is also important for demonstrating that only one DNA species is present; this is especially important for fd-tet derivatives, which can delete the tetracycline genes, generating phage with approximately 6-kb genomes. The concentration of phage particles can be more accurately assessed by spectrophotometric analysis; however, this is better done with CsCl-purified
- 15 phage. The infectious properties of the phage (TU/ml) can be analyzed by titering; the infectivity of fd-tet-derivatives is about 20 particles/TU, whereas that of wild-type derivatives is about 1 particle/pfu.
13. The final concentration of phage (if they are not to be CsCl-purified) should not exceed approximately 3×10^{13} /ml, so once the phage
- 20 concentration is known, it should be adjusted accordingly with TBS. To impede cell growth, the solution can be adjusted to a final concentration of 0.02% (w/v) sodium azide or 20 mM Na₂EDTA. The phage can be stored long term in 50% (v/v) sterile glycerol at -18°C. (Barbas, F. et al., *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York (2001)).
- 25 *Phage Purification on CsCl Gradients*
1. Following the large-scale preparation of phage above, the final volume of each preparation should be 10 ml.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

2. Weigh out 4.83 g of CsCl into a tared 50-ml beaker. Tare the beaker again, and add the resuspended phage. Add TBS to a final weight of 10.75 g (over and above the weight of the vessel and CsCl: phage + TBS = 10.75 g). This should give 12 ml of a 31% (w/w) solution of CsCl with a density of 1.3 g/ml. The density of the solution can be checked by weighing 1ml in a tared beaker or plastic cup, and then returning it to the beaker it came from (be sure to first check that the pipet on that setting weighs 1 ml of water at 1g). If necessary, adjust the density to 1.3 g/ml with CsCl or buffer.
3. Transfer the volume of each beaker into a polyallomer tube. Be sure that the tubes are filled to the top (as they can collapse during centrifugation), and if necessary, add extra volume with a 31% (w/w) solution of CsCl in TBS. Balance the tubes, by transferring solution from one to another, or by adding more CsCl solution to one tube. Place the tubes in a SW40 swinging-bucket rotor and centrifuge at 37,000 rpm for 48 hours at 5°C.
- For the 70.0 Ti rotor, spin at 58,000 rpm for 20 hours.
4. Carefully remove the tubes from the rotor, place in a rack, and set them up, one at a time, in a clamp stand. Illuminate the clamped tube from the top with a strong, visible light source (such as a halogen desk lamp). There will be two bands toward the top of the tube. The phage band, which will be faint, bluish, and homogeneous (smoky looking), should be just visible above a narrow, stringy, flocculent, opaque white band (which is probably PEG). In a good phage preparation, the phage band is about 5 mm in width, and its density is approximately 1.33 g/ml.
5. Attach a sterile pipet tip to an aspirator pump and adjust the aspirator to a moderate speed. Hold the pipet tip at the meniscus, and aspirate the fluid overlying the phage band to within 2 mm of the upper edge, being careful not to disturb the phage band. Withdraw the phage band with a

WO 02/48716

PCT/US01/49030

- polyethylene transfer pipet (preferably sterile), or, better yet, a sterile, glass transfer pipet attached to a peristaltic pump. The phage band will be viscous; try to avoid the flocculent band that lies underneath. If using a quickseal polyallomer tube, remove the band with syringe, as for CsCl-purified plasmid.
- 5
6. Transfer the extracted phage bands to a 26-ml, screw-cap polycarbonate centrifuge tube for the Beckman 60 Ti rotor. 4-6 phage bands can be pooled in a single bottle. Fill the tube to the shoulder with TBS, close the cap firmly, and invert repeatedly to mix. For centrifugation, balance against another tube filled with water.
- 10
7. Centrifuge the tubes in a Beckman 60 Ti fixed-angle rotor at 50,000 rpm for 4 hours at 4°C to pellet the phage. Pour off and discard the supernatant, recentrifuge the pellet briefly at a low speed on a tabletop centrifuge, and discard the remaining supernatant, with the pellet pointed away from the liquid.
- 15
8. Resuspend the pellet in 10 ml of TBS; vortex gently, centrifuge briefly in a table-top centrifuge to drive the solution down, and allow the pellet to soften overnight at 4°C. Vortex to dissolve the pellet.
- 20
9. Top the bottle with TBS, recentrifuge to pellet the phage, and remove the supernatant as in Step 7. (Note: This step is optional, giving somewhat purer phage.)
- 25
10. Resuspend the pellet in TBS as in Step 9, using 12 ml of TBS per liter-equivalent of starting culture; this gives an anticipated concentration of 3×10^{13} virions/ml. Transfer the phage to a sterile Oak Ridge tube and centrifuge at 6,500g for 10 minutes.
11. Transfer the phage-containing supernatant to a 15-ml polypropylene, snap-cap tube. At this point, sodium azide can be added as a preservative to the cooled phage to a final concentration of 0.02% (w/v).

WO 02/48716

PCT/US01/49030

Alternatively, Na₂EDTA can be used at a final concentration of 20 mM.

12. Measure the concentration of phage particles spectrophotometrically, and/or by agarose gel electrophoresis.
13. Dilute the phage 10⁻⁷, 10⁻⁸ and 10⁻⁹ in TBS/gelatin and titer.
- 5 Include the proper positive and negative controls. A good infective titer (TU/ml) is approximately 5% of the concentration of physical particles (virions/ml).
14. Store the phage at 4°C away from light, or in 50% glycerol at -18°C for long-term storage. Under these conditions, titers are stable for at least several years. (Barbas, F. et al., *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York (2001)).

(b) Preparation of Identical Phage Columns

- Cross-Linking.* Mix one volume of phage (all subsequent volumes in the paragraph are relative to this volume) at a concentration corresponding to
- 15 1.26 mM pVIII subunits in water with 0.15 volume 0.5 M NaCl and 0.15 volume 1 M NaH₂PO₄ (pH adjusted to 6.9 with NaOH). To this solution add 0.0026 volume of 76.3 mg/ml NHS-dextran. Immediately mix the reaction mixture by vortexing, add 0.15 volume 50% PEG, and vortex again. The phage will precipitate in the PEG solution (final concentration 5%). Rotate the
 - 20 reaction mixture for 12-16 hours in a sealed tube at room temperature, and quench unreacted N-hydroxy-succinamide by adding 8 volumes 1M ethanolamine (pH adjusted to 9 with HCl) and 0.89 volumes 5 M NaCl. Continue rotation for an additional 1-2 hours at room temperature. Dilute the cross-linked phage in TBS (at least 10 volumes) and wash 5-6 times by
 - 25 centrifugation, aspiration or decanting the supernatant, and resuspend the pellet in fresh TBS. Suspend the final pellet in 10 volumes TBS and store at 4°C.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

Column Preparation. Pack two 0.5 ml columns (Amersham Pharmacia Biotech, HR 5/2, Code 18-0382-01), each with cross-linked phage equivalent to about 2×10^{13} particles. Equilibrate the columns on an HPLC system with

5 TBS (Other columns or non-column batch methods are also appropriate).

Sample Preparation. To dissociate bound proteins and other species, and to minimize protein interactions, make up aliquots (1.5 ml) of the original human CSF Samples 1 and 2 to a final concentration of 3M guanidine HCl and 0.2M formic acid, and incubate in ice for 60 minutes. Then buffer
10 exchange them using a HiTrap Desalting Column (Amersham Pharmacia Biotech) on an HPLC system at a flow rate of 5 ml/min with phosphate-buffered-saline (PBS) and collect in a final volume of 2 ml. Pass the low molecular weight flow-through over a SepPak column and wash with PBS to isolate peptides for additional analysis if desired. If the associations of proteins
15 in the original sample are to be preserved, then omit the additions of guanidine HCl and formic acid, and dilute the CSF aliquots 1:2 with PBS before the next step.

(c) Capture Step Three (FIG. 5)

Sample Difference Proteins Captured By Phage Columns. Pass 1.5
20 ml of Samples 1 and 2 over a dedicated cross-linked phage column in TBS on an HPLC system at a flow rate of 20 μ l/minute. Keep the flow-throughs, which are the depleted protein samples and which will be used in subsequent cycles. Wash the columns with 20 ml TBS at a flow rate of 0.5 ml/minute.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

Step III: Quantitation and Identification of Difference Proteins (FIG. 6)

Isolate Difference Proteins Using Phage Affinity Columns. Elute the bound proteins from the columns with 1 ml Panning Elution Buffer (0.1 M HCl adjusted to pH 2.2 with glycine) at a flow rate of 0.5 ml/minute and collect 100
5 μ l fractions. Pool the fractions and neutralize with about 140 μ l 1M Tris Base, pH 9.1. Verify the pH has been raised to yield a solution of pH 7.0-8.2.

(a) Analysis by Cation Exchange/Reversed-Phase Columns and Electrospray Mass Spectrometry

Digestion of Proteins to Peptides. Lyophilize the samples prepared
10 above, and resububilize in 8 M urea, 200mM NH_4HCO_3 , and 20 mM CaCl_2 and quantify using a Bradford assay. Add Endoprotease Lys-C (Boehringer-Mannheim) to a final substrate-to-enzyme ratio of 100:1, and incubate at 37°C for 15 hours. Dilute the Lys-C digestion fourfold with water, and add modified trypsin (Boehringer-Mannheim) to a final substrate-to-enzyme ratio of 50:1.
15 Incubate the trypsin digestion mixture at 37°C for 15 hours. Desalt the peptide mixture on a reversed-phase column, lyophilize, and resuspend in 5 mM K_2HPO_4 , 5% acetonitrile (pH3) (other chemical and enzymatic digestion methods are also appropriate).

(b) 2D Chromatographic Separation of Peptides.

20 *Biphasic Microcapillary Column.* Construct the biphasic column, by pulling a fused-silica capillary (100 μ m i.d. x 365 μ m o.d.) with a CO_2 -based laser puller to make a fritless column. Pack the column first with 8 cm of 5 μ m C18 RP particles (218TP C18 Vydac) and then with 4 cm of 5 μ m strong cation exchange particles (PolySULFOETHYL Aspartamide; Poly LC).

WO 02/48716

PCT/US01/49030

Peptide Separation. Load the peptide mixtures onto the biphasic microcapillary column. Displace peptide fractions from the SCX to the RP particles using the following salt step gradients: (1) 0% (1') 0% (1''), 0% (1''') 0% (2) 0-10% (3) 10-20% (4) 20-30% (5) 30-40% (6) 40-100% of SCX-B', and (7) 100% SCX-C'. Elute peptides from the RP particles into the mass spectrometer using a linear gradient of 0-60% RP-B over 30 minutes at 300 nl/minute. Mobile-phase buffers are, for RP-A buffer, 0.5% acetic acid, 5% acetonitrile; for RP-B, 0.5% acetic acid, 80% acetonitrile; for SCX-B', 0.5% acetic acid, 5% acetonitrile, 250 mM KCl; for SCX-C', 0.5% acetic acid, 5% acetonitrile, 500mM KCl (other separation methods are also appropriate).

Mass Spectrometric Analysis. Perform mass spectrometric analysis on a Finnigan LCQ ion trap mass spectrometer (Finnigan Corp., San Jose, CA) run and operate as described. Directly couple an Integral chromatography workstation (PE Biosystems, Foster City, CA) to an LCQ ion trap mass spectrometer equipped with an electrospray ion source. Operate the electrospray needle with a voltage differential of 5.5 kV, and hold the heated desolvation capillary at 250°C.

Identify and Quantitate Via Mass Fingerprinting and Sequencing With Electrospray Mass Spectrometry. For automated spectrum and data analysis, process each raw tandem spectrum as described here. First identify spectra derived from single or multiply charged parent ions. Correlate processed tandem mass spectra with standard ORFs using the program SEQUEST running on a DEC Alpha workstation. Perform all searches without considering the protease used because many proteins in the mixtures do not digest to completion. For multiply charged peptides, use the following criteria to determine whether to select the +2 or +3 charge state: (1) Choose a particular charge state if the cross-correlation score is greater than or equal to 1U more than that of the other charge state. (2) Assign a score to each charge

WO 02/48716

PCT/US01/49030

state (+5 for tryptic start, +5 for tryptic end, +2 if the cross-correlation score is greater than the other charge state, +2 if the preliminary score ranking is less than 50, and the charge state with the highest score is chosen. Use the selected charge of the peptide in the final protein identification analysis and the

5 SEQUEST output from the other charge state discarded. Filter the correlation results using the value of the cross-correlation score and the matched sequence for each spectrum. For singly charged peptides, retain spectra with a cross-correlation score to a tryptic peptide great than or equal to 1.5. For multiply

10 charged peptides, retain spectra with a cross-correlation to a tryptic peptide greater than or equal to 2. Eliminate all spectra with cross-correlation scores not meeting these criteria from further consideration. For the protein

identifications, sort the filtered results to show unique peptide sequences that are derived from the same annotated ORFs in the genome. Protein

15 identifications based on mass spectra correlating to one or more unique tryptic peptides are considered valid identifications. Single peptides that alone identify a protein are manually validated after meeting the following criteria. First, the SEQUEST cross-correlation score must be greater than 1.5 for a +1 tryptic peptide or greater than 2 for a +2 or +3 tryptic peptide. Second, the MS/MS spectrum must be of good quality with fragment ions clearly above baseline

20 noise. Third, there must be some continuity to the b or y ion series. Fourth, the y ions that correspond to a proline residue should be intense ions. Fifth, unidentified, intense fragment ions either correspond to +2 fragment ions or the loss of one or two amino acids from one of the ends of the peptide. After going through this process one can be fairly confident of a protein identification. For

25 proteins common to Samples 1 and 2, approximate relative abundance ratios can be determined using Finnigan LCQUAN software and peak heights of molecular ions (Link, A.J., et al., Direct Analysis of Protein Complexes Using Mass Spectrometry. *Nature Biotechnology* 17:676-682 (1999)).

WO 02/48716

PCT/US01/49030

Step IV: Isolation of Affinity Reagents Against Difference Proteins

Pool the flow-through phage as indicated in FIG. 7. Amplify phage, prepare phage affinity matrices and phage columns, and capture difference proteins as described in steps II(a)-(c) above. The number of proteins identified in step III (i.e. the step involving the quantitation and identification of difference proteins) (FIG. 6) is a guide to the numbers of distinct phage clones that need to be tested.

Assignment of phage clone specificity to identified protein is carried out as follows:

- 10 1. *Isolate Captured Protein Using Phage Affinity Columns.* Elute the bound protein from the column with 1 ml Panning Elution Buffer (0.1 M HCl adjusted to pH 2.2 with glycine) at a flow rate of 0.5 ml/minute and collect 100 μ l fractions. Pool the fractions and neutralize with about 140 μ l 1M Tris Base, pH 9.1. Verify the pH has been raised to yield a solution of pH 7.0-8.2.
- 15 2. *Identify Eluted Protein.* The eluted protein is identified using an LCQ Mass Spectrometer as described in step III above, and illustrated in FIG. 6, except that since the major component should be a single protein, the sample can be directly sprayed into the instrument.
- 20 3. *Assign Phage Clone to Identified Protein.* The association of a particular phage clone with the identity of the protein it captures, allows its specificity to be defined. The phage provide a specific affinity reagent against the protein, and if necessary, the identity of the peptide or antibody can be determined to allow the production of high purity peptide or antibody, via well established methods. Multiple distinct phage clones may be isolated which
- 25 bind to the same protein. Their affinities may determine their utility.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

Step V: Depletion of Most Abundant Proteins (FIG. 8)

Prepare protein affinity matrices and perform initial capture step as described in steps I(a) and (b) above. Elute the bound phage as indicated in FIG. 2 with 1 ml Panning Elution Buffer (0.1 M HCl adjusted to pH 2.2 with glycine) at a flow rate of 0.5 ml/minute and collect fractions. Pool the fractions

5 containing phage, buffer exchange using a HiTrap Desalting Column (Amersham Pharmacia Biotech) on an HPLC system at a flow rate of 5 ml/min with TBS, and collect in a final volume of about 1 ml.

10 *Most Abundant Proteins Captured By Phage Columns.* Pool the eluted phage from Columns 1 and 2. Amplify phage, prepare phage affinity matrices and phage columns, and capture difference proteins using the procedures described in steps II(a)-(c) above. Pass 1.5 ml of Samples 1 and 2 over a dedicated cross-linked phage column in TBS on an HPLC system at a

15 flow rate of 20 μ l/minute. Keep the flow-throughs, which are the depleted protein samples and which will be used for the next cycle (FIG. 9). Wash the columns with 20 ml TBS at a flow rate of 0.5 ml/minute.

Isolate Difference Proteins Using Phage Affinity Columns. Elute the bound proteins from the columns with 1 ml Panning Elution Buffer (0.1 M HCl

20 adjusted to pH 2.2 with glycine) at a flow rate of 0.5 ml/minute and collect 100 μ l fractions. Pool the fractions and neutralize with about 140 μ l 1M Tris Base, pH 9.1. Verify the pH has been raised to yield a solution of pH 7.0-8.2. The eluted proteins can be further purified if necessary, and can be an invaluable source of "native" material for further structural and functional studies,

25 including providing a standard for the development of immunoaffinity based assays using the specific affinity reagents isolated from DPCP.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

Step VI. New cycle with less abundant proteins

Using the flow-throughs from Step V, which are the depleted protein samples, the cycle described above is repeated (FIG. 9).

Step VII. Continuing depletion of abundant proteins

- 5 Steps V and VI can be continuously repeated until the limits of detection of the analytical device have been reached.

Other Embodiments

- 10 Although the present invention has been described with reference to preferred embodiments, one skilled in the art can easily ascertain its essential characteristics and without departing from the spirit and scope thereof, can make various changes and modifications of the invention to adapt it to various usages and conditions. Those skilled in the art will recognize or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are
15 intended to be encompassed in the scope of the present invention.

All publications and patents mentioned in this specification are herein incorporated by reference.

What is claimed is:

WO 02/48716

PCT/US01/49030

Claims

1. A method of identifying a polypeptide, said method comprising:
 - (a) adhering a complex biological sample from a first type of individual to a support to create an array;
5.
 - (b) adhering a complex biological sample from a second type of individual to a support to create an array;
 - (c) exposing a peptide-nucleic acid coupled library at least one time to an array formed by step (a) to create a first product; and
 - (d) exposing said first product at least one time to an array formed by
10.
 - step (b) to create a second product.
2. The method of claim 1, further comprising the steps of:
 - (e) exposing a peptide-nucleic acid coupled library at least one time to an array formed by step (b) to create a third product; and
 - (f) exposing said third product at least one time to an array formed
15.
 - by step (a) to create a fourth product.
3. The method of claim 2, further comprising the step of:
 - (g) comparing said second product and said fourth product.
4. The method of claim 2, further comprising the steps of:
 - (g) combining said second and fourth products to produce a pooled
20.
 - product; and
 - (h) amplifying said pooled product.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

5. The method of claim 4, further comprising the steps of:
(i) adhering a portion of said amplified pooled product to a support to provide an array; and
(j) exposing a complex biological sample from said first or second type of individual at least one time to an array formed by step (i) to provide a fifth product.
- 5
6. The method of claim 5, further comprising the step of:
(k) exposing a complex biological sample from said first or second type of individual at least one time to an array formed by step (i) to provide a sixth product, wherein said complex biological sample is from a type of individual which is different from that used in step (j).
- 10
7. The method of claim 6, further comprising the step of:
(l) comparing said fifth product and said sixth product.
8. The method of claim 1, wherein said complex biological sample is from a tissue.
- 15
9. The method of claim 8, wherein said tissue is selected from the group consisting of epithelial, connective, muscle, and nerve.
10. The method of claim 1, wherein said complex biological sample is from a body fluid.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

11. The method of claim 10, wherein said body fluid is selected from the group consisting of cerebrospinal fluid, blood, saliva, mucous, tears, pancreatic juice, seminal fluid, sweat, milk, bile, plasma, serum, lymph, urine, pleural effusions, bronchial lavage, ascities, and synovial fluid.
- 5
12. The method of claim 11, wherein said body fluid is cerebrospinal fluid.
13. The method of claim 1, wherein said complex biological sample is from an organ type.
- 10 14. The method of claim 13, wherein said organ type is selected from the group consisting of skin, bone, cartilage, tendon, ligament, skeletal muscle, smooth muscle, heart, blood, blood vessel, brain, spinal cord, peripheral nerve, nose, trachea, lung, mouth, esophagus, stomach, intestine, kidney, uterus, ureters, urethra, bladder, hypothalamus, pituitary, thyroid, pancreas, adrenal gland, ovary, oviduct, vagina, mammary gland, testicle, seminal vesicle, penis, lymph, lymph node, lymph vessel, white blood cell, T-cell and B-cell.
- 15
15. The method of claim 1, wherein said complex biological sample is from a cultured cell type.
- 20
16. The method of claim 15, wherein said cell type is derived from epithelial, connective, muscle or nervous tissue.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

17. The method of claim 1, wherein one of the complex biological samples is from a diseased individual and the other complex biological sample is from a non-diseased individual.
18. The method of claim 1, wherein one of the complex biological samples is from a medicated individual and the other complex biological sample is from a non-medicated individual.
19. The method of claim 1, wherein said library is a phage display library.
20. The method of claim 19, wherein said library is an antibody library.
21. The method of claim 19, wherein said library is a recombinant display library.
22. The method of claim 19, wherein said library is a synthetic peptide library.
23. The method of claim 1, wherein said first product comprises material that bound to the array during the exposing step (c) and was subsequently released.
24. The method of claim 1, wherein said second product comprises material that did not bind to the array during the exposing step (d).

WO 02/48716

PCT/US01/49030

25. The method of claim 2, wherein said third product comprises material that bound to the array during the exposing step (e) and was subsequently released.
26. The method of claim 2, wherein said fourth product comprises material that did not bind to the array during the exposing step (f).
27. The method of claim 1, further comprising treating the complex biological sample of step (a) or step (b) prior to said adhering.
28. The method of claim 27, wherein said treating comprises denaturing.
29. The method of claim 1, wherein the support of step (a) or step (b) is a solid support.
30. The method of claim 1, wherein both the support of step (a) and the support of step (b) are solid supports.
31. The method of claim 1, wherein the array of step (a) or step (b) is created by crosslinking said support to said complex biological sample.
32. The method of claim 1, wherein both the array of step (a) and the array of step (b) are created by crosslinking said support to said complex biological sample.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

33. The method of claim 5, wherein said fifth product comprises material that bound to the array during the exposing step (j) and was subsequently released.
34. The method of claim 6, wherein said sixth product comprises material that bound to the array during the exposing step (k) and was subsequently released.
35. The method of claim 1, further comprising the step of amplifying said second product.
36. The method of claim 2, further comprising the step of amplifying said fourth product.
37. The method of claim 1, further comprising analyzing said second product via mass spectrometry.
38. The method of claim 2, further comprising analyzing said fourth product via mass spectrometry.
39. The method of claim 5, further comprising analyzing said fifth product via mass spectrometry.
40. The method of claim 6, further comprising analyzing said sixth product via mass spectrometry.
41. The method of claim 7, wherein said fifth and sixth products are compared using mass spectrometry.

WO 02/48716

PCT/US01/49030

42. The method of claim 1, wherein said library is exposed to the array formed by step (a) more than one time to create said first product.
43. The method of claim 1, wherein said first product is exposed to the array formed by step (b) more than one time to create said second product.
5
44. The method of claim 2, wherein said library is exposed to the array formed by step (b) more than one time to create said third product.
45. The method of claim 2, wherein said third product is exposed to the array formed by step (a) more than one time to create said fourth product.
10
46. The method of claim 5, wherein the complex biological sample of step (j) is exposed to the array formed by step (i) more than one time to create said fifth product.
47. The method of claim 6, wherein the complex biological sample of step (k) is exposed to the array formed by step (i) more than one time to create said sixth product.
15
48. The method of claim 2, wherein the array of step (c) and step (f) are the same array.
49. The method of claim 2, wherein the array of step (c) and step (f) are separate arrays.
20

WO 02/48716

PCT/US01/49030

50. The method of claim 2, wherein the array of step (d) and step (e) are the same array.
51. The method of claim 2, wherein the array of step (d) and step (e) are separate arrays.
- 5 52. The method of claim 6, wherein the array of step (j) and step (k) are the same array.
53. The method of claim 6, wherein the array of step (j) and step (k) are different arrays.

Figure 1: Preparation of Protein Affinity Matrices

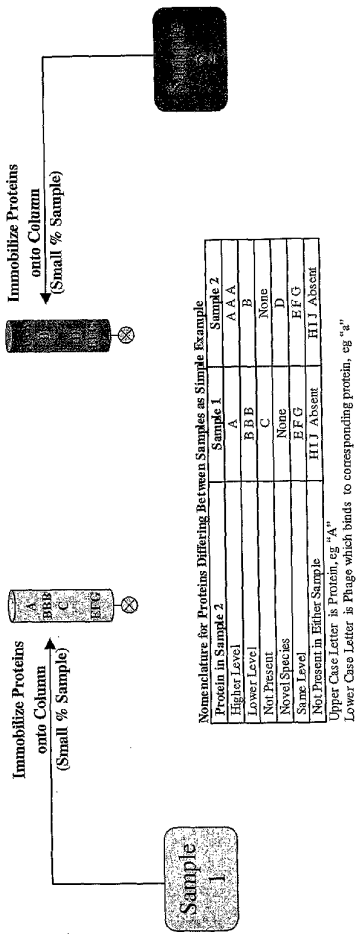


Figure 2: Capture Step One

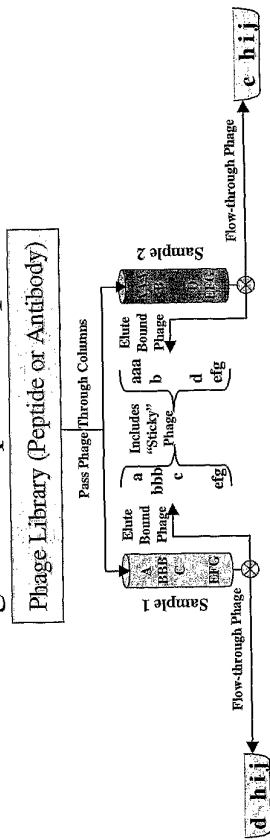


Figure 3: Capture Step Two

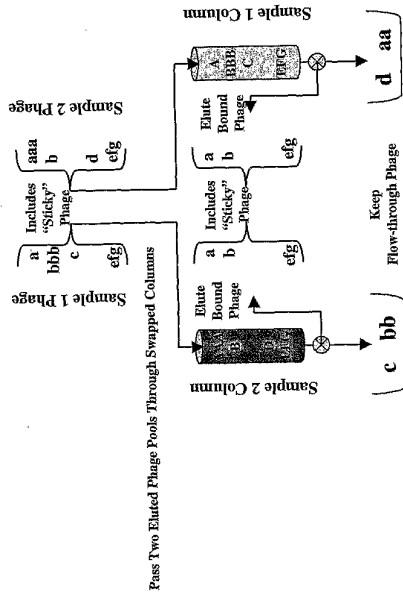


Figure 4: Preparation of Phage Affinity Matrix

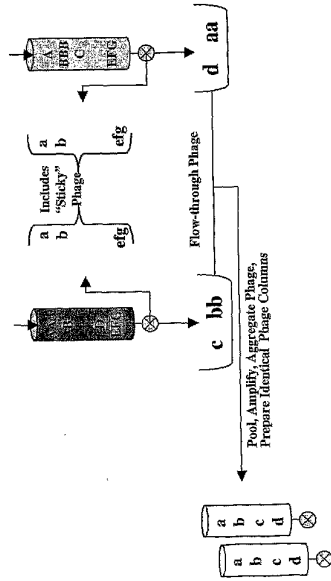


Figure 5: Capture Step Three

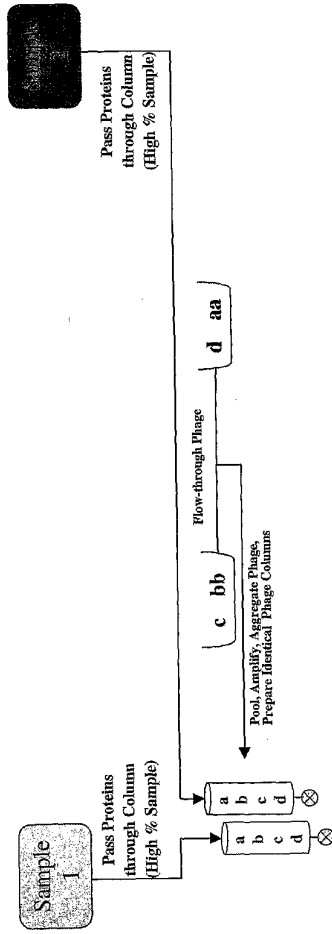


Figure 6: Quantitation and Identification of Difference Proteins

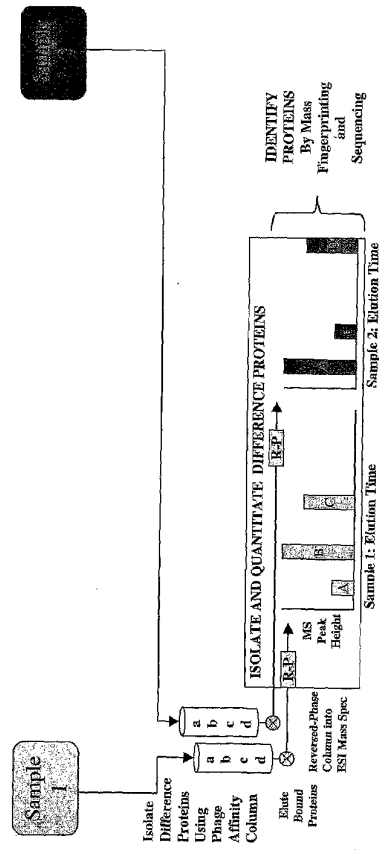


Figure 7: Affinity Reagents Against Difference Proteins

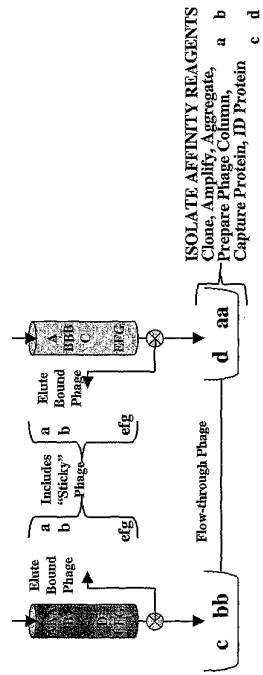


Figure 8: Depletion of Most Abundant Proteins

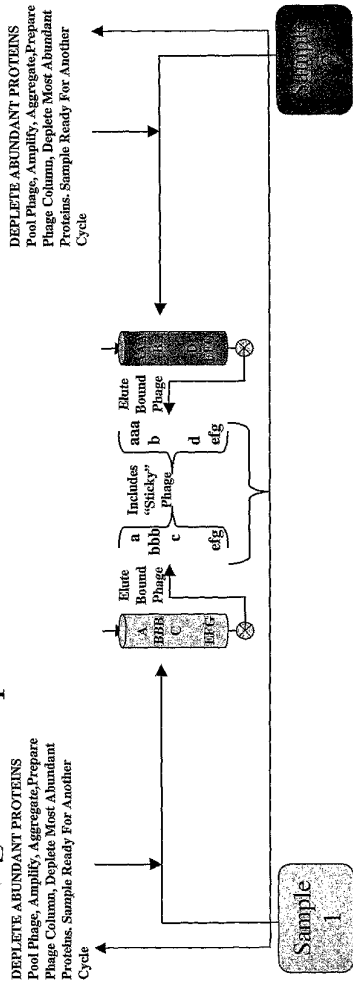
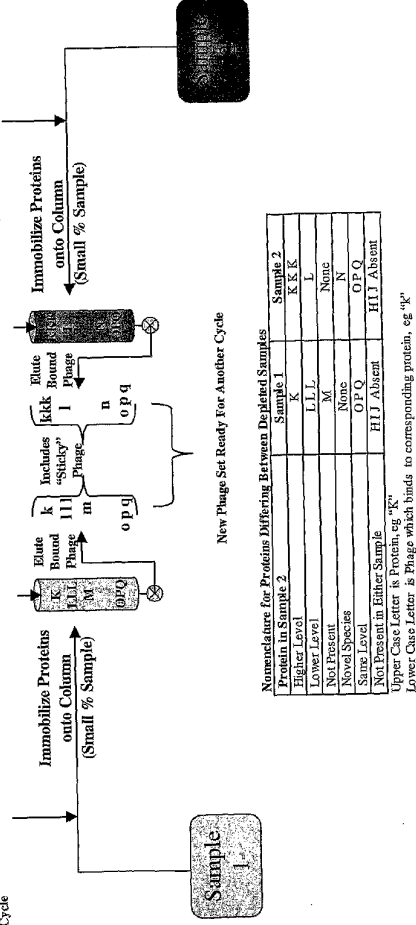


Figure 9: New Cycle With Less Abundant Proteins

DEplete ABUNDANT PROTEINS
 Pool Phage, Amplify, Aggregate, Prepare Phage Column, Deplete Most Abundant Proteins, Sample Ready For Another Cycle

DEplete ABUNDANT PROTEINS
 Pool Phage, Amplify, Aggregate, Prepare Phage Column, Deplete Most Abundant Proteins, Sample Ready For Another Cycle

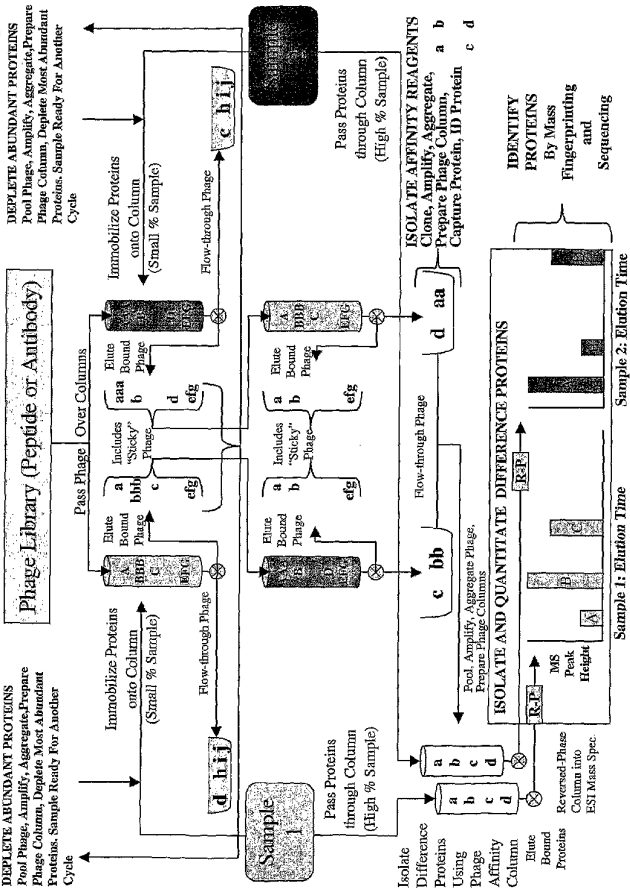


Nomenclature for Proteins Differing Between Depleted Samples

Protein in Sample 2	Sample 1	Sample 2
Higher Level	K	K K K
Lower Level	L L L	L
Not Present	M	None
Novel Species	None	N
Same Level	O P O	O P O
Not Present in Either Sample	H I J, Absent	H I J, Absent

Upper Case Letter is Protein, eg. "K"
 Lower Case Letter is Phage which binds to corresponding protein, eg. "k"

Figure 10: Differential Phage Capture Proteomics Summary



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

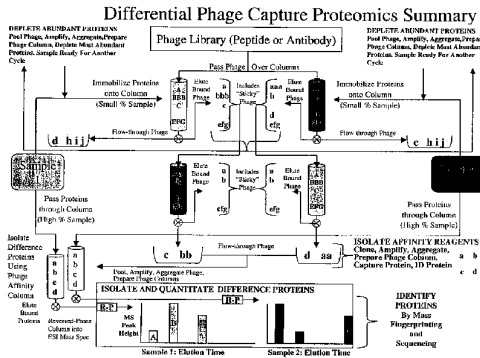
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/048716 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/49030
- (22) International Filing Date: 13 December 2001 (13.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/255,577 14 December 2000 (14.12.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 60/255,577 (CIP) Filed on 14 December 2002 (14.12.2002)
- (71) Applicant and (72) Inventor: STROOBANT, Paul [NZ/US]; 30 Morningside Avenue, Natick, MA 01760 (US).
- (74) Agent: BIEKER-BRADY, Kristina; Clark & Elbing LLP, 176 Federal Street, Boston, MA 02110-2214 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 30 May 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide to Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: DIFFERENTIAL PHAGE CAPTURE PROTEOMICS



WO 02/048716 A3

(57) Abstract: Disclosed herein are methods for identifying, isolating and comparing proteins and other biomolecules differing between two complex biological samples using affinity chromatography and phage display techniques.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US 01/49030
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 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) IPC 7 G01N C12N C07K		
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, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 35502 A (UNIV LIVERPOOL ; PENNINGTON STEPHEN ROY (GB)) 15 July 1999 (1999-07-15) figure 3 ---	1-53
A	WO 98 59360 A (YIP TAI TUNG ; CIPHERGEN BIOSYSTEMS INC (US); HUTCHENS T WILLIAM (U)) 30 December 1998 (1998-12-30) page 96, line 11 - page 98, line 5; claims 1-5; figures 22,23 --- -/-	1-53
<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 claim 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 15 January 2003		Date of mailing of the international search report 28/01/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer: GONCALVES M L F C

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US 01/49030
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE WILDT RUUD M T ET AL: "Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 18, no. 9, September 2000 (2000-09), pages 989-994, XP002162316 ISSN: 1087-0156 page 992, column 2, line 3 -page 993, column 1, line 1 ---	1-53
A	KOIVUNEN ERKKI ET AL: "Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries." JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 40, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 883-888, XP000982630 ISSN: 0161-5505 figure 1 ---	1-53
A	PAWELETZ CLOUD P ET AL: "Rapid protein display profiling of cancer progression directly from human tissue using a protein biochip." DRUG DEVELOPMENT RESEARCH., vol. 49, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 34-42, XP002162317 ISSN: 0272-4391 page 36, column 1, paragraph 4 -column 2, paragraph 4 ---	1-53
A	UTAL A ET AL: "Preliminary expression analysis in Alzheimer's disease using SELDI protein chips." SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 26, no. 1-2, 2000, pages Abstract No.-83.7, XP000989844 30th Annual Meeting of the Society of Neuroscience, New Orleans, LA, USA; November 04-09, 2000 ISSN: 0190-5295 the whole document ---	1-53
A	LI MIN: "Applications of display technology in protein analysis." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 18, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 1251-1256, XP002162318 ISSN: 1087-0156 cited in the application the whole document ---	
A	WO 99 39210 A (MILLER SAMUEL ;HUMPHERY SMITH IAN (AU)) 5 August 1999 (1999-08-05) claims 57,73 ---	1-53
	-/-	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/49030

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GYGI STEVEN P ET AL: "Measuring gene expression by quantitative proteome analysis." CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 11, no. 4, August 2000 (2000-08), pages 396-401, XP000987297 ISSN: 0958-1669 cited in the application the whole document -----	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			International application No	
Information on patent family members			PCT/US 01/49030	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9935502	A	15-07-1999	EP 1046038 A1	25-10-2000
			WO 9935502 A1	15-07-1999
			JP 2002501176 T	15-01-2002
WO 9859360	A	30-12-1998	AU 7981698 A	04-01-1999
			AU 754145 B2	07-11-2002
			AU 8375398 A	04-01-1999
			AU 8472198 A	04-01-1999
			CN 1272218 T	01-11-2000
			CN 1266537 T	13-09-2000
			CN 1266538 T	13-09-2000
			EP 0990256 A1	05-04-2000
			EP 0990257 A1	05-04-2000
			EP 0990258 A1	05-04-2000
			JP 2002507282 T	05-03-2002
			JP 2002511145 T	09-04-2002
			JP 3287578 B2	04-06-2002
			JP 2000516727 T	12-12-2000
			JP 2002250725 A	06-09-2002
			NO 996243 A	17-02-2000
			NZ 501836 A	25-10-2002
			NZ 501837 A	01-03-2002
			NZ 501838 A	28-08-2002
			WO 9859360 A1	30-12-1998
			WO 9859361 A1	30-12-1998
			WO 9859362 A1	30-12-1998
			US 6225047 B1	01-05-2001
US 2002123043 A1	05-09-2002			
US 2002177242 A1	28-11-2002			
US 2002142343 A1	03-10-2002			
US 2002155509 A1	24-10-2002			
US 2001014461 A1	16-08-2001			
WO 9939210	A	05-08-1999	AU 740830 B2	15-11-2001
			AU 2259799 A	16-08-1999
			WO 9939210 A1	05-08-1999
			CA 2319828 A1	05-08-1999
			EP 1051624 A1	15-11-2000
			JP 2002502038 T	22-01-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00 1 0 2
G 0 1 N 30/88 J

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

(72) 発明者 ポール・ストルーバント
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 7 6 0 , ナティック , モーニングサイド・アベニュー 3
0

专利名称(译)	特异性噬菌体捕获蛋白质组学		
公开(公告)号	JP2004515786A	公开(公告)日	2004-05-27
申请号	JP2002549970	申请日	2001-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	保罗罢工娄短打		
申请(专利权)人(译)	保罗Sutorubanto		
[标]发明人	ポール・ストルーバント		
发明人	ポール・ストルーバント		
IPC分类号	G01N27/62 B01J20/286 B01J20/32 C12N15/10 C40B30/04 C40B40/02 G01N30/02 G01N30/46 G01N30/62 G01N30/72 G01N30/88 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	C40B30/04 B01J20/286 B01J20/3242 B01J2220/54 C12N15/1037 C40B40/02 G01N30/02 G01N30/466 G01N30/468 G01N30/7266 G01N33/6803 G01N33/6845 G01N2030/625		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M G01N27/62.D G01N27/62.V G01N33/566 G01N37/00.102 G01N30/88.J		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/255577 2000-12-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开的是，通过使用亲和层析和噬菌体展示技术，鉴定蛋白质和其它生物分子在两个生物样品之间不同，分离和用于比较它是一种方法。

