

(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2006-504077

(P2006-504077A)

(43) 公表日 平成18年2月2日(2006. 2. 2)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	(2006. 01)	GO 1 N 33/543	5 2 5 G	4 H O 4 5
GO 1 N 33/53	(2006. 01)	GO 1 N 33/53	Z N A D	
GO 1 N 37/00	(2006. 01)	GO 1 N 37/00	1 O 2	
CO 7 K 16/18	(2006. 01)	CO 7 K 16/18		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2004-521607 (P2004-521607)	(71) 出願人	505013217
(86) (22) 出願日	平成15年7月10日 (2003. 7. 10)		プレジデント バイオシステムズ
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月21日 (2005. 2. 21)		台湾, タイペイ 1 1 O, チュンシャオ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/021559		イー. ロード セクション 4 5 6 O
(87) 国際公開番号	W02004/007669		, 1 Oエフー1
(87) 国際公開日	平成16年1月22日 (2004. 1. 22)	(74) 代理人	100072349
(31) 優先権主張番号	10/193, 377		弁理士 八田 幹雄
(32) 優先日	平成14年7月11日 (2002. 7. 11)	(74) 代理人	100110995
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 奈良 泰男
		(74) 代理人	100111464
			弁理士 齋藤 悦子
		(74) 代理人	100114649
			弁理士 宇谷 勝幸
		(74) 代理人	100129126
			弁理士 藤田 健

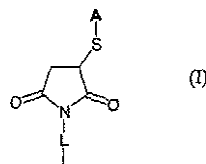
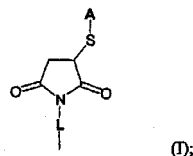
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテインチップ

(57) 【要約】

本発明は、表面を有する固体状の担体；および、前記表面に共有結合した化学式 (I) を有する複数の化合物を含む化合物結合基板を特徴とする。

【化1】



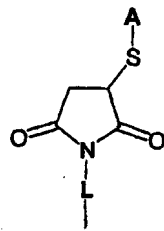
式中、Lは連結基であり、Aは、前記連結基の末端の1つに共有結合する免疫グロブリンGタンパク質結合分子である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面を有する固体状の担体；並びに、
前記表面に共有結合した化学式（I）を有する複数の化合物：

【化 1】



(I);

10

を含み、この際、Lは連結基または結合であり；および、Aはその末端の1つで共有結合している免疫グロブリンGタンパク質結合分子である、化合物結合基板。

【請求項 2】

免疫グロブリンGタンパク質のFc部位を含有する第1のポリペプチドを含むキメラタンパク質をさらに含み、前記キメラタンパク質が前記表面に結合する、請求項1に記載の化合物結合基板。

【請求項 3】

前記キメラタンパク質が、受容体タンパク質を有する第2のポリペプチドをさらに含む、請求項2に記載の化合物結合基板。 20

【請求項 4】

前記第2のポリペプチドが、受容体タンパク質の細胞外ドメインである、請求項3に記載の化合物結合基板。

【請求項 5】

前記受容体タンパク質がI型膜タンパク質である、請求項4に記載の化合物結合基板。

【請求項 6】

前記受容体タンパク質が腫瘍壊死因子-αである、請求項5に記載の化合物結合基板。

【請求項 7】

前記免疫グロブリンGタンパク質結合分子が、プロテインAまたはプロテインGである、請求項5に記載の化合物結合基板。 30

【請求項 8】

前記免疫グロブリンGタンパク質結合分子が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、または配列番号7のアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項5に記載の化合物結合基板。

【請求項 9】

前記免疫グロブリンGタンパク質結合分子が、そのC末端で硫黄原子に共有結合しているペプチドである、請求項1に記載の化合物結合基板。

【請求項 10】

免疫グロブリンGタンパク質のFc部位を含有する第1のポリペプチドを含むキメラタンパク質をさらに含み、前記キメラタンパク質が前記表面に結合する、請求項9に記載の化合物結合基板。 40

【請求項 11】

前記キメラタンパク質が、受容体タンパク質を有する第2のポリペプチドをさらに含む、請求項10に記載の化合物結合基板。

【請求項 12】

前記第2のポリペプチドが、受容体タンパク質の細胞外ドメインである、請求項11に記載の化合物結合基板。

【請求項 13】

前記受容体タンパク質がI型膜タンパク質である、請求項12に記載の化合物結合基板 50

。

【請求項 14】

前記受容体タンパク質が腫瘍壊死因子- α である、請求項 13 に記載の化合物結合基板

。

【請求項 15】

前記免疫グロブリン G タンパク質結合分子が、プロテイン A またはプロテイン G である、請求項 13 に記載の化合物結合基板。

【請求項 16】

前記免疫グロブリン G タンパク質結合分子が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、または配列番号 7 のアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項 13 に記載の化合物結合基板。 10

【請求項 17】

以下の段階：

式-L-X（L は連結基または結合であり、X はマレイミド基である）の化学基を含む表面を有する固体状の担体を準備し；

それぞれが自身の末端の 1 つにメルカプト基を有する複数の免疫グロブリン G タンパク質結合分子を準備し；そして、

前記免疫グロブリン G タンパク質結合分子を前記表面と接触させる、を有する方法により製造される、化合物結合基板。

【請求項 18】

20

以下の段階：

免疫グロブリン G タンパク質の Fc 部位を有する第 1 のポリペプチドおよび受容体タンパク質を有する第 2 のポリペプチドを含むキメラタンパク質を準備し；そして、

前記キメラタンパク質を前記表面と接触させる。

をさらに有する、請求項 17 に記載の化合物結合基板。

【請求項 19】

以下の段階：

(a) 式-L-NH₂（L は連結基または結合である）の化学基を含む複数の分子を有する表面を準備し；

(b) 無水マレイン酸を前記表面と接触させ；そして、

30

(c) マレイミド形成試薬を前記表面と接触させる、を有する、基板の調製方法。

【請求項 20】

段階 (c) 後に、それぞれがメルカプト基を含む複数のポリペプチドを前記表面と接触させることをさらに有する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

それぞれのポリペプチドが、最大で 1 つのメルカプト基を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

それぞれのポリペプチドが、その末端の 1 つにメルカプト基を含む、請求項 20 に記載の方法。 40

【請求項 23】

それぞれのポリペプチドが、その C 末端のみにメルカプト基を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

請求項 1 に記載の化合物結合基板；並びに、

免疫グロブリン G タンパク質の Fc 部位を有する第 1 のポリペプチドおよび受容体タンパク質を有する第 2 のポリペプチドを含むキメラタンパク質、を含み、前記キメラタンパク質が前記化合物結合基板に結合し、この際結合したキメラタンパク質が少なくとも 5×10^{15} 分子/cm² の密度を有する、基板。 50

【請求項 25】

前記免疫グロブリン G タンパク質結合分子が、その C 末端で硫黄原子に共有結合しているペプチドである、請求項 24 に記載の基板。

【請求項 26】

前記第 2 のポリペプチドが受容体タンパク質の細胞外ドメインである、請求項 24 に記載の基板。

【請求項 27】

前記受容体タンパク質が I 型膜タンパク質である、請求項 26 に記載の基板。

【請求項 28】

前記受容体タンパク質が腫瘍壊死因子- α である、請求項 27 に記載の基板。

10

【請求項 29】

前記免疫グロブリン G タンパク質結合分子が、プロテイン A またはプロテイン G である、請求項 27 に記載の基板。

【請求項 30】

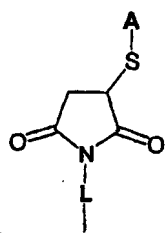
前記免疫グロブリン G タンパク質結合分子が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、または配列番号 7 のアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項 27 に記載の基板。

【請求項 31】

それぞれのアドレス可能な部位が、化学式 (I) :

【化 2】

20



(I);

式中、L は連結基または結合であり；および、A はその末端の 1 つで共有結合している免疫グロブリン G タンパク質結合分子である、

の化合物を有する、アドレス可能な複数の部位を有する基板を含み、それぞれのアドレス可能な部位が、免疫グロブリン G タンパク質の Fc 部位を有する第 1 のポリペプチドおよび受容体タンパク質を有する第 2 のポリペプチドを含むキメラタンパク質を有し、前記キメラタンパク質が前記免疫グロブリン G タンパク質結合分子に結合する、アレイ。

30

【請求項 32】

前記受容体タンパク質が、アドレス可能な部位間でそれぞれ固有である、請求項 31 に記載のアレイ。

【請求項 33】

前記受容体タンパク質が、それぞれのアドレス可能な部位間で同一である、請求項 31 に記載のアレイ。

【請求項 34】

前記免疫グロブリン G タンパク質結合分子が、その C 末端で硫黄原子に共有結合しているペプチドである、請求項 31 に記載のアレイ。

40

【請求項 35】

結合した前記キメラタンパク質が、少なくとも 5×10^{15} 分子 / cm^2 の密度を有する、請求項 34 に記載のアレイ。

【請求項 36】

リガンドを、請求項 3 に記載の化合物結合基板と接触させ；そして、前記リガンドが前記受容体タンパク質と結合するか否かを決定する、ことを含む、受容体結合リガンドの同定方法。

【請求項 37】

50

前記リガンドが蛍光ラベルされたものである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

試験化合物および受容体結合リガンドを、請求項 3 に記載の化合物結合基板と接触させ；そして、

前記リガンドの結合が、前記試験化合物が存在しない場合の結合と異なるか否かを決定する、
ことを含む、受容体タンパク質への受容体結合リガンドの結合を阻害する化合物の同定方法。

【請求項 39】

前記リガンドが蛍光ラベルされたものである、請求項 38 に記載の方法。

10

【請求項 40】

前記試験化合物が蛍光ラベルされたものである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

前記試験化合物がポリペプチドである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 42】

前記試験化合物が有機小分子である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 43】

請求項 1 に記載の化合物結合基板を含む、化合物の受容体への結合能を試験するためのキット。

【発明の詳細な説明】

20

【背景技術】

【0001】

背景

ヒトゲノムプロジェクトの完了により、30,000~40,000 個の遺伝子の配列が明らかとなった。遺伝子同定後の重要な課題は、全ての関連するコードされたタンパク質の機能、修飾および調節を理解することである。現在、mRNA 発現プロファイル、遺伝子の分解の表現型、ツーハイブリッド相互作用、およびタンパク質の細胞内での局在化を分析することにより、遺伝子の、そしてそれ故にタンパク質の、機能および調節に焦点を当てた多くの努力がなされている。例えば、Ross-Macdonald et al. (1999) Nature 402: 413; DeRisi et al. (1997) Science 278: 680; Uetz et al. (2000) Nature 403: 623; および Ito et al. (2000) Proc. Natl Acad. Sci. USA 97: 1143 を参照。これらの研究は有用ではあるが、タンパク質アレイによるタンパク質自身の生化学的活性の分析により、タンパク質の機能についてのより多くの情報がもたらされる。例えば、Zhu et al. (2001) Science 293: 2101; および, MacBeath & Schreiber (2000) Science 289: 1760 を参照。タンパク質の活性の分析だけでなく、タンパク質アレイは小分子のスクリーニング（薬物の発見）、薬物のバリデーション、治療法の開発、および診断に有用である。例えば、Flanagan (2002) Genetic Engineering 22 (10): 1 を参照。

30

40

【発明の開示】

【0002】

要約

本発明は、部分的には、受容体タンパク質に結合し、そしてそれにより受容体の活性を調節するリガンドの同定に有用な受容体タンパク質アレイの設計および調製に基づいている。

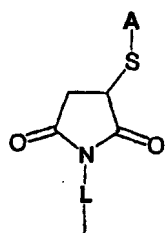
【0003】

一形態において、本発明は、表面を有する固体状の担体；並びに、前記表面に共有結合した化学式 (I) を有する複数の化合物；

50

【0004】

【化1】



(I);

【0005】

10

を含み、この際、Lは連結基または結合であり；および、Aは例えばその末端の1つで共有結合している免疫グロブリンGタンパク質結合分子である、化合物結合基板を特徴とする。

【0006】

いくつかの実施形態では、この化合物結合基板は、前記表面に結合するキメラタンパク質を含む。このキメラタンパク質としては、免疫グロブリンGタンパク質のFc部位を含むポリペプチド、および、受容体タンパク質の細胞外ドメイン（例えば、腫瘍壊死因子αタンパク質のようなI型膜タンパク質の細胞外ドメイン）のような受容体タンパク質を有する他のポリペプチドが挙げられる。かような化合物結合基板は、受容体結合リガンドを同定するために用いられうる。この同定は、リガンドを上記の化合物結合基板と接触させ、さらに、例えば蛍光法（例えば、前記リガンドは蛍光ラベルされたものである）によって、前記リガンドが受容体タンパク質に結合するか否かを決定することを含む。上記の化合物結合基板はまた、受容体結合リガンドの受容体タンパク質への結合を阻害する化合物（例えば、ポリペプチドまたは有機分子）を同定するためにも用いられうる。この同定は、試験化合物および受容体結合リガンドを上記の化合物結合基板と接触させ、さらに、前記リガンドの結合が、前記試験化合物が存在しない場合の結合と異なるか否かを決定することを含む。前記リガンドまたは前記試験化合物のいずれかは、蛍光ラベルされたものであってもよい。

20

【0007】

本発明はまた、化合物の受容体タンパク質への結合能を試験するためのキットを特徴とする。当該キットは、上記の化合物結合基板を含む。

30

【0008】

他の形態において、本発明は、上記の化合物結合基板、および前記化合物結合基板に結合するキメラタンパク質を含み、この際、結合したキメラタンパク質が少なくとも $5 \times 10^{15} \sim 5 \times 10^{16}$ 分子/cm² の密度を有する、基板を特徴とする。

【0009】

さらなる形態において、本発明は、以下の段階：式 $-L-X$ （Lは連結基または結合であり、Xはマレイミド基、すなわち $-N[C(O)CH]_2$ である）の化学基を含む表面を有する固体状の担体を準備し；それぞれが自身の末端の1つにメルカプト基、すなわち $-SH$ を有する複数の免疫グロブリンGタンパク質結合分子を準備し；そして、前記免疫グロブリンGタンパク質結合分子を前記表面と接触させる、を有する方法により製造される、化合物結合基板を特徴とする。この方法はまた、以下の段階：免疫グロブリンGタンパク質のFc部位を有するポリペプチドおよび受容体タンパク質を有する他のポリペプチドを含むキメラタンパク質を準備し；そして、前記キメラタンパク質を前記表面と接触させる、を含んでもよい。

40

【0010】

さらなる形態において、本発明は、基板の調製方法を特徴とする。この方法は、以下の段階：式 $-L-NH_2$ （Lは連結基である）の化学基を含む複数の分子を有する表面を準備し；無水マレイン酸を前記表面と接触させ；そして、マレイミド形成試薬（すなわち、 $ZnBr_2/HMDS$ のような、マレイミドの形成を誘導するのに適当な1以上の試薬）

50

を前記表面と接触させる、を有し、必要であれば、それぞれのポリペプチド、オリゴヌクレオチド、または有機分子がメルカプト基を含む（例えば、最大で1つのメルカプト基を含む）複数のポリペプチド、オリゴヌクレオチド、または有機分子を前記表面と接触させる、を有する。前記メルカプト基は、各ポリペプチドの末端の1つ（例えば、C末端）または各オリゴヌクレオチドの末端の1つ（例えば、3'末端もしくは5'末端）に位置してもよい。

【0011】

アレイもまた、本発明の範囲に含まれる。前記アレイは、それぞれのアドレス可能な部位が、上記化学式（I）の化合物を有し、それぞれのアドレス可能な部位が、免疫グロブリンGタンパク質のFc部位を有するポリペプチドおよび受容体タンパク質を有する他のポリペプチドを含むキメラタンパク質を有し、前記キメラタンパク質が前記免疫グロブリンGタンパク質結合分子に結合する、アドレス可能な複数の部位を有する基板を含む。いくつかの実施形態において、前記受容体タンパク質は、アドレス可能な部位間でそれぞれ固有である。他の実施形態において、前記受容体タンパク質は、それぞれのアドレス可能な部位間で同一である。

10

【0012】

本明細書で用いる場合、「基板」という語は、軟質および硬質の固体状基板の双方を含む。「軟質」とは、固体状基板が柔軟であることを意味する。例えば、軟質の基板は、少なくともある程度は壊れずに湾曲し、折りたたまれ、または同様に動かされうる。基板の表面は、平坦な表面（例えば、スライドまたはプレート）であってもよく、凸状の表面（例えば、ビーズ）であってもよく、凹状の表面（例えば、ウェル）であってもよい。有用な可能性のある基板としては、質量分析プレート（例えば、MALDI用）、ガラス（例えば、機能化ガラス、ガラススライド、多孔性ケイ酸ガラス、単結晶シリコン、石英、またはUV透過性石英ガラス）、プラスチックおよびポリマー（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリニフッ化ビニリデン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリカーボネート、PDMS、またはアクリル）、金属被覆基板（例えば、金）、シリコン基板、ラテックス、膜（例えば、ニトロセルロース、またはナイロン）、並びに、表面プラズモン共鳴に適当な屈折面が挙げられる。固体状の基板はまた、例えばゲルまたはマトリックスのように多孔性であってもよい。有用な可能性のある多孔性の基板としては、アガロースゲル、アクリルアミドゲル、焼結ガラス、デキストリン、および網目状のポリマー（例えば、マクロポラス架橋デキストリン、セファクリル、およびセファロース）が挙げられる。

20

30

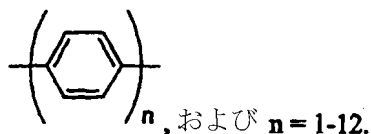
【0013】

「連結基」の語は、炭化水素鎖または結合を意味する。前記炭化水素鎖は、ヘテロ原子（例えば、N、S、またはO）を有するまたは有しない、直鎖状または分枝状のアルキル鎖でありうる。前記炭化水素鎖はまた、アリール基であってもよい。アルキル鎖の例としては、以下に制限されないが、メチレン単位、すなわち $-(CH_2)_n-$ およびnは1～12の鎖、並びに、エチレングリコール単位、すなわち $-(OCH_2CH_2)_n-$ およびnは1～12の鎖が挙げられる。アリール鎖の例は、フェニル部分、すなわち、

【0014】

【化2】

40



【0015】

およびnは1～12、の環状構造である。

【0016】

「免疫グロブリンGタンパク質」の語は、（1）Fab領域（VH、VL、およびCH₁ドメインを含む）、（2）ヒンジ領域、および（3）Fc部位（CH₂およびCH₃ドメインを含む）を含有するポリペプチドを意味する。例えば、米国特許第6,225,4

50

48号を参照。前記Fc領域は、免疫グロブリンポリペプチド上の定常領域であり、免疫グロブリンの重鎖上に位置し、抗原への結合には関与しないが、Fc受容体への結合に関与する。

【0017】

「免疫グロブリンGタンパク質結合分子」の語は、免疫グロブリンGタンパク質に対して高い親和性（例えば、 $1.0 \times 10^{-7} \sim 4.4 \times 10^{-8}$ MのKa）を有する分子（例えば、ペプチドまたは有機化合物）を意味する（Akerstrom & Bjork (1986) J. Biol. Chem. 261: 10240-10274に記載の結合アッセイにより規定される）。より具体的には、免疫グロブリンGタンパク質結合分子は、免疫グロブリンGタンパク質のFc部位に対して高い親和性を有する。免疫グロブリンGタンパク質結合分子の例としては、例えば配列番号1、2、3、4、または5のアミノ酸配列を含むペプチドのような、プロテインA、プロテインG、マウスおよびヒトの高親和性免疫グロブリンG受容体、プロテインAの免疫グロブリンG結合ドメイン、プロテインGの免疫グロブリンG結合ドメイン（例えば、Colbert D. et al. (1984) J. Biol. Response Modifiers 3: 255; およびOlsson, A. et al. (1987) E. J. Biochem 168: 319を参照）；配列番号6または配列番号7のアミノ酸配列を含む免疫グロブリンG結合受容体（例えば、Sears D. W. et al. (1990) J. Immunol. 144(1): 371; およびPeltz, G. A. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(3): 1013を参照）が挙げられる。

【0018】

【表 1】

ADFNKQQA FYEILPNLGERNGFIQSLKDDPSLEAKKLNQAPK (配列番号 : 1),
 AQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQANVLGEAEKLNDSQAPK
 (配列番号 : 2),
 TYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTE
 (配列番号 : 3),
 TYKLIVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTE
 (配列番号 : 4),
 TYKLIVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYANDNGVDGVWTYDDATKTFTVTE
 (配列番号 : 5),
 MWQLLLPTAL LLLVSAGMRT EDLPKAVVFL EPQWYRVLEK DSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNENLISSQ ASSYFIDAAT VDDSGEYRCQ TNLSTLSDPV
 QLEVHVGVLL LQAPRWVFKKEEDPIHLRCHS WKNTALHKVT YLQNGKDRKY
 FHHNSDFHIP KATLKDSGSY FCRGLVGSKNVSSSETVNTI TQGLAVSTIS
 SFSPPGYQVS FCLVMVLLFA VDTGLYFSVK TNI (配列番号 : 6),
 MILTSFGDDM WLLTLLLVV PVGGEVVNAT KAVITLQPPW VSIFQKENVT
 LWCEGPHLPGDSSTQWFING TAVQISTPSY SIPEASFQDS GEYRCQIGSS
 MPSPDVQLQI HNDWLLQASRRVLTEGEPL ALRCHGWKNK LVYNNVVFYRN
 GKSQFQSSDS EVAILKTNLS HSGIYHCSGTGRHRYTSAGV SITVKELFTT
 PVLRASVSSP FPEGSLVTLN CETNLLLQRP GLQLHFSFYVGSKILEYRNT
 SSEYHIARAE REDAGFYWCE VATEDSSVLK RSPELELQVL
 GPQSSAPVWFHILFYLSVGI MFSLNTVLYV KIHRLQREKK YNLEVPLVSE
 QGKKANSFQQ VRSDGVYEEVTATASQTTPK EAPDGPRSSV GDCGPEQPEP
 LPPSDSTGAQ TSQS (配列番号 : 7)

10

20

30

【0019】

免疫グロブリンGタンパク質結合分子はまた、プロテインA、プロテインG、高親和性免疫グロブリンG受容体、プロテインAの免疫グロブリンG結合ドメイン、もしくはプロテインGの免疫グロブリンG結合ドメインに対して、または、配列番号1、2、3、4、5、6、もしくは7に対して少なくとも60%（例えば、70%、80%、90%、95%、もしくは98%）相同なアミノ酸配列を含有するペプチドであってもよく、免疫グロブリンGタンパク質のFc部位に対して高い親和性を有する。2つのアミノ酸配列の「百分率相同性」は、カーリン（Karlin）およびアルツシュル（Altschul）（1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877）におけるのと同様にして改変された、カーリンおよびアルツシュルのアルゴリズム（1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268）を用いることにより、決定されうる。かようなアルゴリズムは、アルツシュルら（1990）J. Mol. Biol. 215: 403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）中に組み込まれる。本明細書中に記載のペプチド分子に相同なアミノ酸配列を得るために、BLASTタンパク質検索は、スコア=50、ワード長=3で、XBLASTプログラムを用いて行われうる。2つの配列間にギャップが存在する場合には、アルツシュルら（1997）Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402に記載されるのと同様のギャップBLASTが用いられうる。BLASTおよびギャップBLASTプログラムを用いる際には、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST

40

50

T) の初期パラメータが用いられうる。

【0020】

「キメラタンパク質」は、異なる源由来の配列の混合物を有するタンパク質である。本明細書で用いる場合、キメラタンパク質は、免疫グロブリンGタンパク質のFc部位を含有する第1のポリペプチド、および、例えば受容体タンパク質（受容体タンパク質の細胞外ドメイン）を含有する第2のポリペプチドを含む。前記第1のポリペプチドは、前記第2のポリペプチドのC末端に結合する。

【0021】

「受容体タンパク質」とは、細胞の表面上に見られ、ホルモン、抗体、薬物、ペプチド、またはウイルスのような特定の分子と相互作用するタンパク質を意味する。受容体タンパク質は、少なくとも1つの細胞外ドメイン、および、I型膜タンパク質のような少なくとも1つの細胞質ドメインを含む。「I型膜タンパク質」は、単一の膜貫通ドメイン、および細胞の細胞外側に面するN末端を有するタンパク質である。例えば、Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd edition, p 401を参照。I型膜タンパク質の例としては、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 受容体I、TNF- α 受容体II、GM-CSF受容体、EPO受容体、EGF受容体、インターロイキン4受容体、およびトロンボポエチン受容体が挙げられる。

10

【0022】

本発明は、以下の1以上の利点を提供する。上記の化合物結合基板の調製方法は、経済的かつ多用途であり、予期せぬ高い均質性、そしてそれ故に、順に添加されるキメラタンパク質との高い結合効率を示す化合物結合基板を提供する。さらに、受容体結合リガンドの同定、または受容体タンパク質への受容体結合リガンドの結合を阻害する化合物の同定が、高効率で、放射性ラベルを用いることなく達成されうる。本明細書で用いる場合、均質性とは、反応性基（例えば、メルカプト）を介して基板に共有結合する免疫グロブリンGタンパク質結合分子（例えば、ペプチド）の末端の1つに位置する反応性基が同一であることを意味する。本明細書で用いる場合、効率とは、キメラタンパク質が、基板または受容体結合リガンドと相互作用する能力を意味する。

20

【0023】

本発明の他の利点、特徴、および目的は、詳細な説明および特許請求の範囲から明らかであろう。

30

【0024】

図面の簡単な説明

図1は、キメラIgG融合受容体の概略図である。このキメラIgG融合受容体は、IgGタンパク質のFc部位および受容体の細胞外ドメインを含有する。

【0025】

図2は、プロテインチップの構造を示す。プロテインチップの構造は、(i) マレイミド修飾表面、(ii) 固定化されたプロテインAまたはプロテインG、(iii) キメラIgG融合受容体、および(iv) リガンドを含む。プロテインチップへのリガンドの結合は、蛍光または質量分析により検出されうる。

【0026】

図3は、キメラIgG融合受容体のSDS-PAGEの概略図である。キメラIgG融合受容体は、12.5%ドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により分析した。レーン1：タンパク質の分子量マーカー。レーン2：キメラIgG融合受容体（非還元条件下）。レーン3：キメラIgG融合受容体（還元条件下）。銀染色法によりゲルを染色し、矢印は、キメラIgG融合受容体の単量体およびジスルフィド結合した二量体を指した。

40

【0027】

図4は、プロテインAで被覆したチップ上でのTNFR1-IgGの滴定を示す。蛍光色素であるCy3を用いてラベル化したキメラIgG融合受容体(TNFR1-IgG、TNF受容体1の細胞外ドメインおよびIgGの定常領域を含有)を、種々の濃度で、プ

50

ロテインAチップ上にプリントした。結合した受容体は、蛍光スキャナにより検出した。

【0028】

図5は、TNFR1チップ上でのTNF α -Cy5の滴定を示す。蛍光色素であるCy5を用いてラベル化した種々の濃度のTNF α を、TNFR1-IgG(50 μ g/mL)とともに、プロテインAチップ上にプリントした。結合したTNF α -Cy5は、蛍光スキャナにより検出した。

【0029】

詳細な説明

本発明は、化合物結合基板、並びに、受容体タンパク質アレイの調製および受容体結合リガンドの同定へのその使用に関する。

10

【0030】

化合物結合基板の調製

本発明の化合物結合基板は、表面を有する固体状の担体、および、前記表面に共有結合した上記の化学式(I)を有する複数の化合物を含む。化学式(I)に関して、固定化された免疫グロブリンGタンパク質結合分子(以下、IgG結合分子と称する)は、マレイミド基および連結基を介して前記表面に連結された、末端の硫黄原子を含む。この硫黄原子から表面までの距離は、連結基の長さにより本質的に決定される。連結基の適当な長さは、固定化されたIgG結合分子がコンビナトリアルアッセイに用いられうるように選択される。具体的には、IgG結合分子へのIgGタンパク質のFc部位の結合の効率により、最適な長さが決定されうる。

20

【0031】

連結基は、任意の個数または組み合わせの原子または分子から形成されて、基板と硫黄原子との間に最適な距離を提供する。例えば、連結基は、有機ポリマー、例えばポリエチレングリコールの繰り返し単位、 $-(OCH_2CH_2)_n-O-$ から形成されて、許容しうる親水性条件および適切な長さを提供する。一般に、ポリエチレングリコール連結基は、約1~約12個の繰り返し単位を有する。

【0032】

固体状の担体は、固体状または多孔性かつ固体状の担体でありうる。いくつかの実施形態において、前記担体は、ビーズ、マイクロ粒子、ナノ粒子、マトリックス、またはゲルである。ビーズ、マイクロ粒子、およびナノ粒子は、例えば、スクリーニング用途に用いられうる。ビーズ、マトリックス、およびゲルは、例えばマトリックスをカラムクロマトグラフィに用いるように、例えば精製方法に用いられうる。ビーズは、有効表面積を増大させる内表面を有してもよく、分離コンポーネントを有してもよい。本明細書で用いる固体状の担体は、任意の軟質または硬質のいずれの材料からも作製されうる。一般に、この材料は、合成およびアッセイの分析条件の多様性に対して抵抗性である。もちろん、1以上の材料の混合物であってもよい。例えば、ガラススライドのようなガラス担体は、ポリマー材料を用いて被覆されて、固体状の担体を生成する。さらに、固体状の担体は任意の形状、例えば、平面状、管状、円形、で作製されてもよく、また、エッチ、リッジ、またはグリッドを含んで、パターン化された基板を生成してもよい。固体状の担体は、不透明でも、半透明でも、または透明でもよい。さらに、固体状の担体は、ウェルまたは堀を含んでもよい。例えば、Britland et al. (1992) Biotechno Prog 8: 155; Mooney et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93: 12287; Nicolaou et al. (1998) Langmuir 14: 1927, Williams et al. (1994) Biosens Bioelectron 9: 159; および、Whalley et al. (2000) Nature 405: 665を参照。

30

40

【0033】

上記の化合物結合基板は、本明細書に開示した方法により、調製されうる。より具体的には、当該方法は、以下の段階：マレイミド基を有する固体状の担体を準備し；それぞれ

50

が自身の末端の1つ（例えば、C末端）にメルカプト基を有する複数のIgG結合分子を準備し；そして、前記IgG結合分子を表面と接触させる、を含む。

【0034】

プロテインGのIgG結合ドメイン、プロテインG、プロテインAのIgG結合ドメイン、およびプロテインAを含むIgG結合分子は、IgGタンパク質に対して高い親和性を有するペプチドであってもよい。このペプチドは、化学的（例えば、ペプチド合成機上で）に、または生物学的（例えば、宿主細胞からの発現）に調製されうる。IgG結合ペプチドは、天然には存在しない類似体、例えば、D-アミノ酸、アミノ酸類似体、またはペプチドミメティクスを含みうる。末端の1つのメルカプト基は、例えば、メルカプト含有化学基またはシステインの組み込みにより、導入されうる。

10

【0035】

マレイミド基を有する固体状の担体は、本明細書に記載の方法により、調製されうる。固体状の担体（例えば、コーニング インコーポレイテッド ライフ サイエンス製のアミノスライド）の表面上で、無水マレイン酸をアミノと反応させてもよく；続いて、マレイミド形成試薬（例えば、 ZnBr_2 / HMD S）を添加してもよい。こうして調製した固体状の担体は、それぞれのポリペプチド、オリゴヌクレオチド、または有機分子がメルカプト基を含む、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、または有機分子を固定化するために用いられうる。

【0036】

上記の方法はまた、本発明の化合物結合基板を最終的に調製する目的で、本明細書に具体的に記載された段階の前または後に、適当な保護基を添加または除去する段階をさらに含んでもよい。さらに、種々の段階が、別の配列または順序で行われてもよい。上記の化合物結合基板の調製に有用な合成化学の変形および保護基の方法論（保護および脱保護）は本技術分野において周知であり、例えば、R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd Ed., John Wiley and Sons (1991) L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); および、L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995)、並びにこれらの続編の版に記載の方法論が挙げられる。

20

30

【0037】

キメラタンパク質の調製

本発明の方法を実施するために、IgGタンパク質のFc部位を含有するポリペプチドおよび、例えば受容体タンパク質（受容体タンパク質の細胞外ドメイン）を含有する他のポリペプチドを含むキメラタンパク質は、当業者に周知の方法により調製されうる。当該方法は、例えば、上記の成熟タンパク質をコードする組換え核酸を得るために、BamH I-Xho I制限DNA断片を交換することを含む。次いで、この組換え核酸をベクター、例えばpCEI発現ベクター中にライゲーションする。例えば、米国特許第5,580,756号、第5,521,288号、および第5,447,851号を参照。

40

【0038】

ベクターは、宿主細胞での核酸の発現に適当な形態の組換え核酸を含む。特に、かようなベクターは、発現させるべき核酸配列に動作可能なように連結された1以上の調節配列を含みうる。「調節配列」の語は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現調節因子（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含む。調節配列としては、ヌクレオチド配列の構成的な発現、並びに組織特異的な調節配列および／または誘導可能な配列を導くものが挙げられる。ベクターの設計は、軽質転換させる宿主細胞の選択や、タンパク質の所望の

50

発現レベルといった要因に依存しうる。ベクターは宿主細胞中に導入され、それにより上記のキメラタンパク質を産生する。

【0039】

ベクターは、キメラタンパク質を原核または真核宿主細胞で発現させるように設計される。キメラタンパク質は、例えば、大腸菌、昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母細胞、または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）もしくはCOS細胞）で発現する。適当な宿主細胞は、Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CAにさらに説明されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えばT7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写および翻訳されうる。 10

【0040】

「宿主細胞」の語は、特定の被験細胞のみならず、かような細胞の子孫または子孫となる可能性のある細胞を意味する。変異または環境による影響により、後の世代においてある種の修飾が生じるため、かような子孫は、実際には親細胞と同一ではないかもしれないが、それでも本明細書で用いる場合には、その語の範囲内に含まれる。

【0041】

ベクターは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術を介して、宿主細胞中に導入されうる。本明細書で用いる場合、「形質転換」および「トランスフェクション」の語は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈法、DEAEーデキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクチン、およびエレクトロポレーションのような、宿主細胞中への外来核酸（例えば、DNA）の導入用に本技術分野で認識されている種々の技術を意味するものとする。 20

【0042】

宿主細胞は、キメラタンパク質が産生されるように、適当な培地中で当該宿主細胞を培養し；そして、当該キメラタンパク質を培地または宿主細胞から単離する段階を経て、キメラタンパク質を産生する（すなわち、発現させる）ために用いられうる。

【0043】

こうして産生されたキメラタンパク質は、必要であれば、次いでカラムクロマトグラフィ（例えば、アフィニティカラムクロマトグラフィ）または他の技術により精製されうる。純度は、適当な任意の方法、例えば、カラムクロマトグラフィ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、または高速液体クロマトグラフィ分析、によって容易に測定されうる。 30

【0044】

スクリーンアッセイ

本発明は、受容体タンパク質に結合し、例えば受容体タンパク質とその結合リガンドとの結合に対して促進もしくは阻害作用を示し、または、例えば受容体タンパク質の活性に対して促進もしくは阻害作用を示す、リガンドまたは試験化合物（例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチドミメティクス、ペプチド、小分子または他の薬物）を同定する方法（本明細書中、「スクリーニングアッセイ」とも称する）を提供する。こうして同定されたりリガンドまたは化合物は、治療プロトコルにおいて、または受容体タンパク質の生物学的機能を明らかにするために用いられる。 40

【0045】

リガンドまたは試験化合物は、生物学的ライブラリー；ペプチドライブラリー（ペプチドの機能を有するが、酵素的分解に抵抗性であるにもかかわらず生物活性を維持している新規な非ペプチド骨格を有する分子のライブラリー；例えば、Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 2678-85を参照）；空間アドレス可能な平行固相または液相ライブラリー；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；および、アフィニティクロマトグラフィ選択を用いた合成ライブラリー法のような、本技術分野において周知のコンビナトリアルライブラリー法における膨大なアプ 50

ローチのいずれかを用いて得られる。生物学的ライブラリーおよびペプチドライブラリーによるアプローチはペプチドライブラリーに限定されるのに対し、他のアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の小分子ライブラリーに適用可能である (Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145)。分子ライブラリーの合成方法の例は本技術分野において、例えば、DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 6909; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho et al. (1993) *Science* 261: 1303; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; および、Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233 において見られる。

【0046】

任意の反応体のラベル化を用いるまたは用いない受容体タンパク質に対するリガンド（または試験化合物）の結合能は評価されうる。例えば、リガンド（または試験化合物）はラベル化される。放射性ラベルよりもむしろ、蛍光、化学発光、または電気化学的発光のようなラベルが用いられうる。蛍光ラベルの例としては、フルオレセイン、ロダミン（米国特許第5,366,860号、および第5,936,087号、第6,051,719号）、シアニン（米国特許第6,080,868号、およびWO97/45539号）、および金属ポルフィリン錯体（WO88/04777号）が挙げられる。他の例において、リガンドと受容体タンパク質との相互作用は、例えば、リガンドおよび受容体タンパク質の双方をラベル化し、蛍光エネルギー転移 (FET)（米国特許第5,631,169号、および第4,868,103号）を用いて検出される。第1の「ドナー」分子上のフルオロフォアラベルは、その発する蛍光エネルギーが、吸収したエネルギーによりその後蛍光を発しうる第2の「アクセプター」分子上のフルオロフォアラベルにより吸収されるように選択されうる。ラベルは、「アクセプター」分子のラベルが「ドナー」のラベルと区別されるように、異なる波長の光を発するものが選択される。FET結合の発生は、本技術分野において周知の標準的な蛍光検出手段により（例えば、フルオリメーター (fluorimeter)）を用いて）、従来のように測定されうる。さらなる例において、受容体タンパク質へのリガンドの結合能の測定は、リガンドも受容体タンパク質もラベル化せずに、リアルタイム生体分子相互作用分析（例えば、Sjolander & Urbaniak (1991) *Anal. Chem.* 63: 2338-2345 および Szabo et al. (1995) *Curr. Optic. Struct. Biol.* 5: 699-705 を参照）を用いて達成されうる。結合表面における質量の変化（結合発生の指標）により、表面付近の光の屈折率が変化し（表面プラズモン共鳴の光学的現象）、リガンドと受容体タンパク質との間のリアルタイム反応の指標として用いられる検出可能なシグナルが生じる。

【0047】

アレイ

本発明の基板上に作製されたアレイもまた、本発明の範囲内に含まれる。キメラタンパク質は、アレイの形態で固体状の基板上に付着しうる。このアレイは、上記のスクリーニングアッセイにおいて用いられうる。アレイは、 cm^2 あたり、少なくとも10、50、100、200、500、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 アドレスの密度、および／または、10、50、100、200、500、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 アドレス/ cm^2 以下の密度を有するものであってもよい。好ましくは、複数のアドレスは、少なくとも10、100、500、1,000、5,000、10,000、もしくは50,000 アドレス、

または9、99、499、4,999、9,999、もしくは49,999未満のアドレスを含む。アドレス間の中心と中心との距離は、5cm、1cm、100mm、10mm、1mm、10nm、1nm、0.1nm、もしくはそれ未満、および／またはこれらの間の範囲でありうる。各アドレスの最大直径は、5cm、1cm、100mm、10mm、1mm、10nm、1nm、0.1nm、もしくはそれ未満、および／またはこれらの間の範囲でありうる。各アドレスは、10mg、1mg、100ng、1ng、100pg、10pg、0.1pg、もしくはそれ未満、および／またはこれらの間の範囲の標的化合物を含有する。あるいは、各アドレスは、100、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸もしくは10⁹、もしくはそれ以上、および／またはこれらの間の範囲の、自身に結合したキメラタンパク質の分子を含有する。複数のアドレスに加えて、アドレスがアレイ上に付着しうる。アドレスは、1次元で、例えば直線状のアレイ；2次元で、例えば平面状のアレイ；または3次元で、例えば3次元のアレイとして、基板上に分布しうる。

10

【0048】

上記の平坦な表面を有する基板は、受容体タンパク質の多様なセット、または受容体タンパク質の限定的なセットのアレイを作製するために用いられうる。用途の一例においては、配列の異なる受容体タンパク質が、アレイの表面上に位置する。かようなアレイは、1つのリガンドまたは試験化合物を調べるのに用いられうる。他の例においては、同じ配列の受容体タンパク質が、アレイの表面上に位置する。かようなアレイは、複数のリガンドまたは試験化合物を調べるために用いられうる。

20

【0049】

これらに限定されないが、アブストラクト、記事、ジャーナル、出版物、テキスト、専門書、インターネットのウェブサイト、データベース、特許、および特許公報のような、本明細書において引用した参考文献は、印刷物の形態、電子の形態、コンピュータ読出し可能な媒体、または他の媒体にかかわらず、その全体が参照により明確に組み込まれる。

【0050】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明されるであろう。以下の実施例は例示のみを目的とするものであって、いかようにも本発明を限定するものとして解釈されることはないとは理解されるべきである。

【実施例】

30

【0051】

実施例

本発明を説明するために、実施例を記載する。キメラIgG融合受容体の実施例は、ヒトTNF-受容体1細胞外ドメイン(TNFR1-ED)およびヒトIgG1定常領域(ヒンジ、CH2およびCH3)融合受容体(TNFR1-IgG)である。被覆ガラススライドの実施例は、マレイミドガラススライドである。プロテインAの実施例は、システイン含有プロテインAである。これらの実施例は例示のみを目的とするものであり、本発明の範囲および思想に含まれるべきものである。

【0052】

キメラIgG融合受容体の調製

40

RT-PCR法を用いてHL60細胞系より調製した全RNAから、TNFR1-EDのcDNAをクローニングした。このPCR反応に用いたプライマーは：

【0053】

【表2】

5'末端プライマー：5'-GCGAGAGGATCCTGGCATGGGCTCTCCACC-3' (配列番号：8)

3'末端プライマー：3'-GACTCCTGAGTCCGTGGTGGAGCTCTCTCGC-5' (配列番号：9)

【0054】

であった。

【0055】

50

50℃にて30分間、逆転写反応を行い、反応混合物を、50℃、30秒間；68℃、1分間、および94℃、30秒間のプログラムを用い、サーマルサイクラー（パーキンエルマー（Perkin Elmer））にて30サイクルのポリメラーゼ連鎖反応に供した。反応混合物をゲル電気泳動にて分析し、次いで制限酵素BamHI/XhoIを用いて切断し、そして発現ベクターpCEI（エス・ワイ・ショー（S. Y. Shaw）により構築された、未発表）中にライゲーションした。ヒトIgG1重鎖定常領域をコードするpCEIプラスミドを、上述した手法（Seed & Aruffo）と同様にして調製した。TNFR1-IgGをコードする組換えプラスミド（pTNFR1-IgG）をNheI切断により直線状とし、次いでエレクトロポレーション法を用いてCHO細胞中に形質転換させた。TNFR1-IgGを産生させるために、100mMメトトレキサートに抵抗性の形質転換細胞を選択した。

10

【0056】

キメラIgG融合受容体の産生および精製

pTNFR1-IgG形質転換細胞を2週間かけて無血清培地（ハイクローン（Hyclone））中に順応させた。順応させた細胞を1Lのスピナーフラスコバイオリアクター中で増殖させて、TNFR1-IgGタンパク質を産生させた。このリアクターからの馴化培地を、プロテインAアフィニティカラム（アマシャム ライフ サイエンス（Amersham Life Science））に通した。0.1Mグリシン（pH3.0）を用いて、結合したタンパク質を溶出し、次いで10mMリン酸緩衝液（pH7）に対して透析した。

20

【0057】

システイン含有プロテインAの発現

コワン（Cowan）I（ATCC12598）の全ゲノムDNAから、プロテインAをコードするDNAをPCR法によりクローニングした。PCR反応用のプライマー配列は：

【0058】

【表3】

3'末端プライマー：3'-CCATTTCTTCTGCCGTTGACAGGACCAATCCCTAGGTCTCGC-5'

（配列番号：10）

5'末端プライマー：5'-GCGAGATCATGAAAAAGAAAAACATTTATTCAATTCG-3'

30

（配列番号：11）

【0059】

であった。

【0060】

この5'末端プライマーは、プロテインAのC末端にシステイン残基を導入するための付加配列を有するプロテインAの5'末端に対応していた。

【0061】

PCRにより増幅されたDNAを、BspHIおよびBamHIを用いて消化し、次いでpET21（ノバジェン（Novagen））のBspHI/BamHIサイトにライゲーションして、発現プラスミドpPASHを得た。システイン含有プロテインAを発現させるために、このpPASHで大腸菌BL21を形質転換させた。

40

【0062】

システイン含有プロテインA（PA-SH）の産生および精製

プラスミドpPA-SHで形質転換された大腸菌細胞を、アンピシリン（0.5mg/L）を含むLB培地中で、光学密度が0.3になるまで増殖させ、IPTGを添加してPA-SHの発現を誘導した。4時間誘導後、遠心分離により細胞を回収し、次いでホモジナイザー（マイクロフルイド システム（Microfluid System））を用いてホモジナイズした。上清中のPA-SHを、IgGアフィニティカラム（アマシャム ライフ サイエンス）に通して精製した。

50

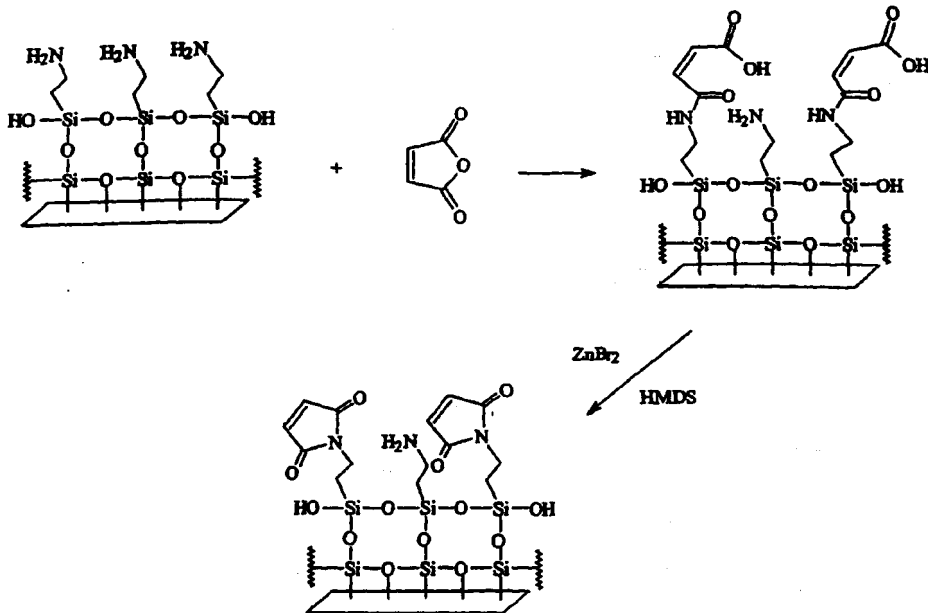
【0063】

マレイミド被覆ガラススライドの調製

スキーム1に示すように、アミンガラススライドを被覆して、マレイミド基で擬制された表面を得た。スキーム1においては、トルエン中、室温にて無水マレイン酸（1.6ミリモル）をアミンガラススライドと反応させることにより、マレイミド被覆ガラススライドを調製した。1時間後、 ZnBr_2 （1.6ミリモル）を添加し、HMDS（2.4ミリモル）を、30分間かけてゆっくりと反応混合物中に添加した。100℃にてさらに1時間、反応物を還流させた。反応後、水でスライドを洗浄し、 N_2 下で乾燥させた。

【0064】

【化3】



スキーム1. マレイミドチップの調製

【0065】

マレイミド被覆ガラススライドへのシステイン含有プロテインA（PA-SH）の固定化

チオール含有タンパク質は、チオエーテル結合を介して容易にマレイミド被覆ガラスに結合しうる。最終タンパク質濃度が1mg/mLとなるように、PA-SHを1mLのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解させた。このPA-SH溶液にトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（180μg）を添加して、PA-SHタンパク質を還元した。室温にて30分間反応を行い、次いで室温にて1時間以上のマレイミド被覆ガラススライドとの反応に用いた。蒸留水を用いてプロテインA被覆スライド（PAスライド）を洗浄し、PBS中の1%BSAを用いてブロッキングした。

【0066】

PAスライド上へのTNFR1-IgG融合受容体のコーティング

TNFR1-IgG分子のIgG部位とPAスライド上のプロテインA分子との間の親和性による相互作用を介して、PAスライド上にTNFR1-IgGをコーティングした。コーティングは、室温にて30分間、TNFR1-IgGタンパク質溶液（1mg/mL）中でPAスライドをインキュベートすることにより行った。TNFR1でコーティングされたスライドを、PBSおよび蒸留水を用いて洗浄し、乾燥条件下で貯蔵した。

【0067】

TNFR1-IgG融合受容体チップへの蛍光ラベルTNFαのプリント

蛍光色素Cy-3（アマシャム ライフ サイエンス）を用い、TNF-αをラベルした。TNF-α（50μg）を、100μLの炭酸水素ナトリウム溶液（20mM、pH 6.8）に溶解させた。この溶液にCy-3（1mg）を添加し、室温にてインキュベート

10

20

30

40

50

した。1時間後、10 μ Lのトリス緩衝液（1M、pH 8.0）を添加し、室温にて30分間、過剰なCy3をブロッキングした。ブロッキング反応が完了したら、1mgのBSAを添加し、反応混合物をリン酸緩衝液（10mM、pH 7.0）に対して透析した。0.01mg/mL～0.5mg/mLの濃度範囲の、Cy3ラベルTNF- α を用いて、TNFR1-IgG受容体チップへのその結合活性を調べた。TNFR1-IgG受容体チップへのCy3ラベルTNF- α のマイクロアレイは、500 μ mの針を備えるアフィメトリクス（Affymetrix）417（アフィメトリクス）で行った。0.1%ツイーン（Tween）20を添加したPBSを用いて、プリントしたスライドを洗浄し、次いで蛍光スキャナ（アクソン（Axon））で検出した。その結果から、TNFR1-IgG受容体チップへのCy3ラベルTNF- α の結合は0.1mg/mLの濃度で結合の最大値に達することが示される。 10

【0068】

TNFR1-IgG受容体チップへの蛍光ラベルTNF- α の競合的な結合

Cy3ラベルTNF- α （0.05mg/mL）を、等体積の種々の濃度の非ラベルTNF- α （0.01～0.5mg/mL）と混合することにより、蛍光ラベルTNF- α をTNFR1-IgG融合受容体に競合的に結合させた。500 μ mの針を備えるマイクロアレイヤー（アフィメトリクス）により、この混合物をTNFR1-IgG受容体チップ上にプリントした。0.1%ツイーン20を添加したPBSを用いて、プリントしたスライドを洗浄し、空气中で乾燥させ、次いで蛍光スキャナ（アクソン）で検出した。その結果から、TNFR1-IgG受容体へのCy3ラベルTNF- α の結合は、非ラベルTNF- α により用量依存的に阻害されることが示される。 20

【0069】

他の実施形態

本明細書に開示した全ての特徴は、任意に組み合わせて用いられうる。本明細書に開示したそれぞれの特徴は、同一の、均等な、または類似の目的を達成する他の特徴により置換されうる。よって、そうでないと明確に特記しない限り、開示したそれぞれの特徴は、均等な、または類似の一連の一般的な特徴の単なる例に過ぎない。

【0070】

上記の記載から、当業者であれば容易に本発明の本質的な特徴を確定することができ、本発明の思想および範囲から逸脱することなく、本発明を様々に変更および修飾して、種々の用途および条件に適応させうる。よって、他の実施形態もまた、特許請求の範囲に従い、本発明の技術的範囲に含まれる。 30

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】図1は、キメラIgG融合受容体の概略図である。このキメラIgG融合受容体は、IgGタンパク質のFc部位および受容体の細胞外ドメインを含有する。

【図2】図2は、プロテインチップの構造を示す。プロテインチップの構造は、（i）マレイミド修飾表面、（ii）固定化されたプロテインAまたはプロテインG、（iii）キメラIgG融合受容体、および（iv）リガンドを含む。プロテインチップへのリガンドの結合は、蛍光または質量分析により検出されうる。 40

【図3】図3は、キメラIgG融合受容体のSDS-PAGEの概略図である。キメラIgG融合受容体は、12.5%ドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により分析した。レーン1：タンパク質の分子量マーカー。レーン2：キメラIgG融合受容体（非還元条件下）。レーン3：キメラIgG融合受容体（還元条件下）。銀染色法によりゲルを染色し、矢印は、キメラIgG融合受容体の単量体およびジスルフィド結合した二量体を指した。

【図4】図4は、プロテインAで被覆したチップ上でのTNFR1-IgGの滴定を示す。蛍光色素であるCy3を用いてラベル化したキメラIgG融合受容体（TNFR1-IgG、TNF受容体1の細胞外ドメインおよびIgGの定常領域を含有）を、種々の濃度で、プロテインAチップ上にプリントした。結合した受容体は、蛍光スキャナにより検出 50

【図 3】

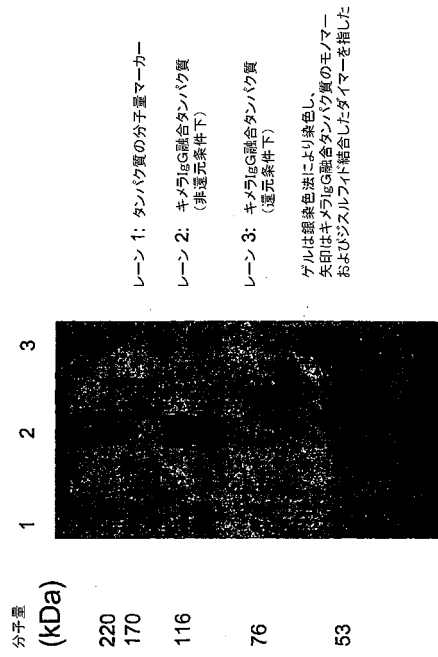


図 3

【図 4】

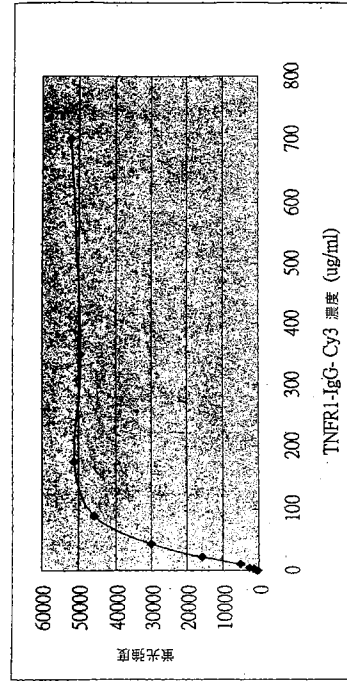


図 4

【図 5】

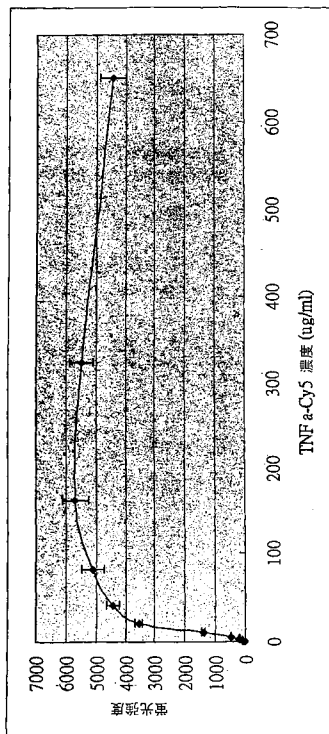


図 5

【配列表】

2006504077000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International appl PCT/US03/21559										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/533, 552; C07K 17/14, 19/00 US CL : 436/527, 546; 530/387.3, 391.1, 408 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) U.S. : 436/527, 546; 530/387.3, 391.1, 408 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	WEETALL, H.H. Preparation of Immobilized Proteins Covalently Coupled Through Silane Coupling agents to Inorganic Supports. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1993, Vol. 41, pages 157-188, especially the second and third structures of page 172.	1,9,17,43										
Y	BIENIARZ, C. Extended Length Heterobifunctional Coupling Agents for Protein Conjugations. Bioconjugate Chemistry. 1996, Vol. 7, pages 88-95, especially the last structure of Figure 2 of page 92.	1-18, 24-43										
Y	US 6,297,599 B1 (CHIN et al) 06 March 2001 (06.03.2001), col. 4, lines 18-33; col. 2, line 60 - col. 3, line 3; col. 3, lines 44-60.	1-18, 24-43										
Y	US 5,447,851 A (BEUTLER et al) 05 September 1995 (05.09.1995), col. 4, lines 49-67.	1-18, 24-43										
Y	US 6,329,209 B1 (WAGNER et al) 11 December 2001 (11.12.2001), Figure 4; col. 4, lines 48-67; col. 5, lines 16-33; col. 12, lines 16-40; col. 5, line 46 - col. 6, line 40.	1-18, 24-43										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 19 July 2005 (19.07.2005)		Date of mailing of the international search report 02 AUG 2005										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: JSAUS Commissioner of Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Mary (Molly) E. Ceperley Telephone No. (703) 308-1234										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International ap

PCT/US03/21559

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of

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

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-18 and 24-43

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT/US03/21559

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I, claim(s) 1-18 and 24-43, drawn to solid supports linked to immunoglobulin G protein-binding molecules and optionally further bound to chimeric proteins..

Group II, claim(s) 19-23, drawn to a method of forming a solid substrate having a linking group terminated with a maleimide functionality and a method which further contacts this substrate with polypeptides.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the maleimide-terminated product prepared by the method of invention II is chemically different in structure from the products of invention I which terminate in either an immunoglobulin G protein-binding molecule or a chimeric protein.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

APS, CAS ONLINE

search terms: structure search, maleimide, chimeric, antibody, receptor protein, immunoglobulin G, amine, glass, solid support, protein A, protein G, covalent, conjugate

フロントページの続き

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,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,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA ,ZM,ZW

(74)代理人 100130971

弁理士 都祭 正則

(72)発明者 シャウ, シーユ

台湾, タイナン, ユンフー ロード, セクション 2, 186-2

(72)発明者 ライ, ポーシウン

台湾, タイペイ 110, チュンシャオ イー. ロード セクション 4 560, 10エフー 1

(72)発明者 オウ, ジュンージュン

台湾, タイナン, ユンフー ロード, セクション 2, ナンバー 186-2

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA10 BA60 CA40 DA75 EA50 FA81

专利名称(译)	蛋白质芯片		
公开(公告)号	JP2006504077A	公开(公告)日	2006-02-02
申请号	JP2004521607	申请日	2003-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	生物总统		
申请(专利权)人(译)	生物总统		
[标]发明人	シャウシーユ ライポーシウン オウジュンジュン		
发明人	シャウ,シー-ユ ライ,ポー-シウン オウ,ジュン-ジュン		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00 C07K16/18 C07K14/715		
CPC分类号	C07K14/7151 C07K2319/00 C07K2319/30 G01N33/54353		
FI分类号	G01N33/543.525.G G01N33/53.ZNA.D G01N37/00.102 C07K16/18		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA60 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA81		
代理人(译)	宇谷 胜幸 藤田 健		
优先权	10/193377 2002-07-11 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的特征在于具有表面的固体载体;和化合物键合的基底, 其包含多个共价附着于表面的具有式 (I) 的化合物。 [化学式1] 其中L是连接基团, A是与连接基团的一个末端共价连接的免疫球蛋白G蛋白结合分子。

