(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2016-528486
(P2016-528486A)
(43)公表日　平成28年9月15日(2016.9.15)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	ZNAD	2G045
G01N 33/569	(2006.01)	G01N	33/569	L	4B050
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	501A	4B063
G01N 33/566	(2006.01)	G01N	33/566		4B064
G01N 37/00	(2006.01)	G01N	37/00	102	4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 88 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-521843 (P2016-521843)
(86)(22)出願日　平成26年6月20日 (2014.6.20)
(85)翻訳文提出日　平成28年2月19日 (2016.2.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/043404
(87)国際公開番号　WO2014/205344
(87)国際公開日　平成26年12月24日 (2014.12.24)
(31)優先権主張番号　61/837,929
(32)優先日　平成25年6月21日 (2013.6.21)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　508280195
ザ　ジョンズ　ホプキンス　ユニバーシティ
アメリカ合衆国　メリーランド州　２１２１８，ボルティモア，ノース　チャールズ　ストリート　３４００
(74)代理人　100102842
弁理士　葛和　清司
(72)発明者　チュー，ヘン
アメリカ合衆国　メリーランド州　２１２８６、タウソン、ファー　ヒルズ　ドライブ　７５１２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト膜蛋白質の機能および相互作用をプロファイリングするためのビリオンディスプレイアレイ

(57)【要約】
本明細書においては、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持するヒト膜結合蛋白質を含む組み換えビリオンアレイ、組み換えＨＳＶ－１ビリオン、ならびに使用の方法が提供され、ヒト膜結合蛋白質に結合するリガンドおよび／または薬物のスクリーニングのためのハイコンテント・ハイスループットアッセイ、診断アッセイ、プロテオームアッセイ、ならびにバイオセンサーアッセイを含む。それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する複数個の異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを含む組み換えＨＳＶ－１ビリオン、さらには異種膜ポリペプチドをコードする組み換えＨＳＶ－１細菌人工染色体（ＢＡＣ）クローンもまた提供される。

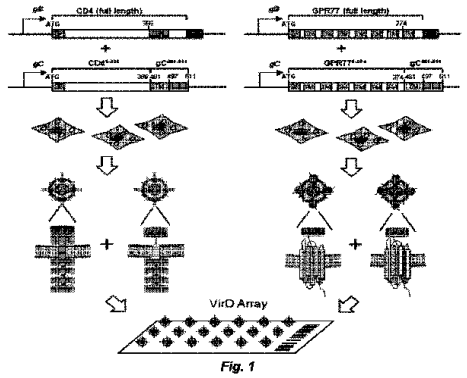


Fig. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
基板と、基板の表面と安定に結びついた複数個の組み換えビリオンマイクロスポットとを含むアレイであって、組み換えビリオンマイクロスポットが複数個の組み換えビリオンを含み、組み換えビリオンがそれらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する複数個の異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを含む、前記アレイ。
【請求項２】
組み換えビリオンが、組み換え単純ヘルペスウィルス（ＨＳＶ）ビリオンである、請求項１に記載のアレイ。
【請求項３】
組み換えＨＳＶビリオンが、単純ヘルペスウィルス１（ＨＳＶ－１）ビリオンを含む、請求項２に記載のアレイ。
【請求項４】
複数個の異種膜結合蛋白質が、ヒト膜結合蛋白質である、請求項３に記載のアレイ。
【請求項５】
膜結合蛋白質が、単一の膜貫通ドメインを有する古典的なＩ型膜蛋白質を含む、請求項４に記載のアレイ。
【請求項６】
古典的なＩ型膜蛋白質がＣＤ４を含む、請求項５に記載のアレイ。
【請求項７】
膜結合蛋白質が、マルチスパンＧ蛋白質共役受容体（ＧＰＣＲ）膜蛋白質を含む、請求項４に記載のアレイ。
【請求項８】
ＧＰＣＲがＧＰＲ７７を含む、請求項７に記載のアレイ。
【請求項９】
膜結合蛋白質が、イオンチャネル、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニル酸シクラーゼ、増殖因子受容体、ホルモン受容体、およびその組み合わせからなる群から選択される、請求項４に記載のアレイ。
【請求項１０】
基板が、セラミック物質、ガラス、金属、結晶質材料、プラスチック、ポリマーまたはコポリマー、およびその組み合わせからなる群から選択される物質を含む、請求項１に記載のアレイ。
【請求項１１】
基板がガラスを含む、請求項１０に記載のアレイ。
【請求項１２】
基板が、チップ、スライド、またはマイクロプレートとして構成される、請求項４に記載のアレイ。
【請求項１３】
基板の表面がコーティングされる、請求項４に記載のアレイ。
【請求項１４】
コーティングが、基板に対する組み換えビリオンマイクロスポットまたは膜結合蛋白質の親和性を増大させる材料である、請求項１３に記載のアレイ。
【請求項１５】
コーティングが、ニトロセルロース、シラン、チオール、ジスルフィド、ポリマー、共有結合したリンカー部分を含む誘導体化された単層または多層、およびその組み合わせからなる群から選択される、請求項１４に記載のアレイ。
【請求項１６】
基板がガラスを含み、スライドとして構成され、基板の表面またはその部分がニトロセルロースによってコーティングされる、請求項４に記載のアレイ。
【請求項１７】

アレイの少なくとも１つのまたは各マイクロスポット中の組み換えビリオンが、異種膜結合蛋白質の１つの種類のみを含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載のアレイ。
【請求項１８】
組み換えビリオンアレイが、該組み換えビリオンアレイの別個の位置に存在する複数個の異なる膜結合蛋白質を含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載のアレイ。
【請求項１９】
アレイのマイクロスポットの少なくとも２つまたはそれぞれが、異なる異種膜結合蛋白質を含む、請求項１８に記載のアレイ。
【請求項２０】
アレイの少なくとも２つのまたは各マイクロスポット中の組み換えビリオンが、２つまたは３つ以上の異なる異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを含む組み換えビリオンを含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載のアレイ。
【請求項２１】
２つまたは３つ以上の異なる異種膜結合蛋白質が２つの異なる膜結合蛋白質を含み、ヘテロ二量体対を含む、請求項２０に記載のアレイ。
【請求項２２】
組み換えビリオンアレイの１つのマイクロスポット中の１つまたは２つ以上の組み換えビリオンのエンベロープが、組み換えビリオンアレイの１つまたは２つ以上の別個のマイクロスポット中の組み換えビリオンのエンベロープによって含まれる１つまたは２つ以上の膜結合蛋白質と異なる膜結合蛋白質を含む、請求項１９に記載のアレイ。
【請求項２３】
アレイの１つのマイクロスポット中の組み換えビリオンによって含まれる異種膜結合蛋白質の種類が、同じアレイの１つまたは２つ以上の異なるマイクロスポット中の組み換えビリオンによって含まれる異種膜結合蛋白質と異なる、請求項１～１６のいずれか一項に記載のアレイ。
【請求項２４】
アレイのマイクロスポットの少なくとも２つまたはそれぞれが、同じ異種膜結合蛋白質の異なるバリアントを含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載のアレイ。
【請求項２５】
アレイがマイクロスポットのサブアレイを含み、サブアレイの少なくとも１つのまたは各マイクロスポットが異なる膜結合蛋白質を含み、サブアレイがより大きいアレイの一部として複数回反復される、請求項１～２４のいずれか一項に記載のアレイ。
【請求項２６】
１つのマイクロスポットの異種膜結合蛋白質が少なくとも１つの異なるマイクロスポットの異種膜結合蛋白質に関連する、請求項２３に記載のアレイ。
【請求項２７】
関連する異種膜結合蛋白質同士が同じ蛋白質ファミリーのメンバーである、請求項２６に記載のアレイ。
【請求項２８】
関連する異種膜結合蛋白質同士が機能的に関連する、請求項２６に記載のアレイ。
【請求項２９】
基板を含むアレイを作るための方法であって、
（ａ）基板の表面に複数個の組み換えビリオンを含む組み換えビリオンを含む溶液を接触させて、それによって表面に溶液をトランスファーし、組み換えビリオンは、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する複数個の異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを含むことと、
（ｂ）任意に接触ステップを複数回反復して、表面上のアレイにパターニングされた組み換えビリオンマイクロスポットを提供することと、
を含む、前記方法。
【請求項３０】

組み換えビリオンが組み換え単純ヘルペスウィルス（ＨＳＶ）ビリオンである、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
組み換えＨＳＶビリオンが単純ヘルペスウィルス１（ＨＳＶ－１）ビリオンである、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
複数個の異種膜結合蛋白質がヒト膜結合蛋白質である、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
膜結合蛋白質が単一の膜貫通ドメインを有する古典的なＩ型膜蛋白質である、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
古典的なＩ型膜蛋白質がＣＤ４である、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
膜結合蛋白質がマルチスパンＧ蛋白質共役受容体（ＧＰＣＲ）膜蛋白質である、請求項３２に記載の方法。
【請求項３６】
ＧＰＣＲがＧＰＲ７７である、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
膜結合蛋白質の少なくとも１つまたはそれぞれが、独立して、イオンチャネル、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニル酸シクラーゼ、増殖因子受容体、ホルモン受容体、およびその組み合わせからなる群から選択される、請求項３２に記載の方法。
【請求項３８】
基板が、セラミック物質、ガラス、金属、結晶質材料、プラスチック、ポリマーまたはコポリマー、およびその組み合わせからなる群から選択される物質を含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３９】
基板がガラスを含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
基板が、チップ、スライド、またはマイクロプレートとして構成される、請求項３２に記載の方法。
【請求項４１】
基板の表面の少なくとも一部がコーティングされる、請求項３２に記載の方法。
【請求項４２】
コーティングが、基板に対する組み換えビリオンマイクロスポット、膜結合蛋白質、または両方の親和性を増大させる材料である、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
コーティングが、ニトロセルロース、シラン、チオール、ジスルフィド、ポリマー、共有結合したリンカー部分を含む誘導体化された単層または多層、およびその組み合わせからなる群から選択される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
基板が、ガラスを含み、スライドとして構成され、基板の表面がニトロセルロースによってコーティングされる、請求項３２に記載の方法。
【請求項４５】
アレイの少なくとも１つのまたは各マイクロスポット中の組み換えビリオンが異種膜結合蛋白質の１つの種類のみを含む、請求項２９～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
組み換えビリオンアレイが、該組み換えビリオンアレイの別個の位置に存在する複数個の異なる膜結合蛋白質を含む、請求項２９～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】

アレイのマイクロスポットの少なくとも２つまたはそれぞれが、異なる異種膜結合蛋白質を含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
アレイの少なくとも１つのまたは各マイクロスポット中の組み換えビリオンが、２つまたは３つ以上の異なる異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを含む組み換えビリオンを含む、請求項２９～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
２つまたは３つ以上の異なる異種膜結合蛋白質が、ヘテロ二量体対に含まれる２つの異なる膜結合蛋白質を含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項５０】
組み換えビリオンアレイの１つのマイクロスポット中の１つまたは２つ以上の組み換えビリオンのエンベロープが、組み換えビリオンアレイの１つまたは２つ以上の別個のマイクロスポット中の組み換えビリオンのエンベロープによって含まれる１つまたは２つ以上の膜結合蛋白質と異なる膜結合蛋白質を含む、請求項４７に記載の方法。
【請求項５１】
アレイの１つのマイクロスポット中の組み換えビリオンによって含まれる異種膜結合蛋白質が、同じアレイの１つまたは２つ以上の異なるマイクロスポット中の組み換えビリオンによって含まれる異種膜結合蛋白質とは異なる種類である、請求項２９～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
アレイのマイクロスポットの少なくとも２つまたはそれぞれが、同じ異種膜結合蛋白質の異なるバリアントを含む、請求項２９～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
アレイがマイクロスポットのサブアレイを含み、少なくとも２つのまたは各サブアレイマイクロスポットは異なる膜結合蛋白質を含み、サブアレイはより大きいアレイの一部として複数回反復される、請求項２９～５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
１つのマイクロスポットの異種膜結合蛋白質が少なくとも１つの異なるマイクロスポットの異種膜結合蛋白質に関連する、請求項５１に記載の方法。
【請求項５５】
関連する異種膜結合蛋白質同士が同じ蛋白質ファミリーのメンバーである、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
関連する異種膜結合蛋白質同士が機能的に関連する、請求項５４に記載の方法。
【請求項５７】
方法が、請求項１～２８のいずれか一項に記載のアレイと標的を含む溶液を含む試料を接触させることと、標的と異種膜結合蛋白質の少なくとも１つまたは２つ以上との間の結合イベントを検出することとを含む、標的と異種膜結合蛋白質との間の結合イベントを検出するための方法。
【請求項５８】
標的が標識され、検出が標識の存在を検出することを含む、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
可視または赤外範囲の吸収、化学発光、蛍光、光導波路、表面プラズモン共鳴、表面電荷センサー、表面力センサー、またはその組み合わせを含む光学的検出法によって標識の検出が行われる、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
検出に先立って、結合していない標的を基板から洗浄することをさらに含む、請求項５８に記載の方法。
【請求項６１】
マイクロスポットのアレイが、アレイの組み換えビリオンマイクロスポットの少なくと

も１つまたはそれぞれの中の異種膜結合蛋白質の対応する標識された標的、および、未標識標的と一緒にインキュベーションされ、対応する標識された標的と未標識標的との間の競合を原因とする標識のシグナルの低下を測定することによって、組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質と未標識標的との間の結合イベントが特定される、請求項５７に記載の方法。

【請求項６２】

標識された対応する標的が、未標識標的とのインキュベーション前にアレイと一緒にインキュベーションされる、請求項６１に記載の方法。

【請求項６３】

標的が未標識であり、結合イベントが界面における物理的特性の変化によって特定される、請求項６１に記載の方法。

【請求項６４】

界面における物理的特性の変化が、屈折率または電気インピーダンスの変化である、請求項６３に記載の方法。

【請求項６５】

標的が未標識であり、標的の結合が質量分析によって検出される、請求項５７に記載の方法。

【請求項６６】

異種膜結合蛋白質が、単一の膜貫通ドメインを有する古典的なＩ型膜蛋白質である、請求項５７に記載の方法。

【請求項６７】

異種膜結合蛋白質が、マルチスパンＧ蛋白質共役受容体（ＧＰＣＲ）膜蛋白質である、請求項５７に記載の方法。

【請求項６８】

異種膜結合蛋白質が、イオンチャネル、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニル酸シクラーゼ、増殖因子受容体、およびホルモン受容体からなる群から選択される、請求項５７に記載の方法。

【請求項６９】

方法が、リガンドおよび／または薬物をスクリーニングすることを含み、アレイ上の複数個の異種膜結合蛋白質の少なくとも１つまたはそれぞれと結合または別様に相互作用するその能力について、可能性のあるリガンドおよび／または薬物の候補が直接的にスクリーニングされる、請求項５７～６８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７０】

アレイ上の異種膜結合蛋白質の１つまたは２つ以上の種類と結合または別様に相互作用するそれらの能力について、複数個の可能性のあるリガンドおよび／または薬物の候補が並行してスクリーニングされる、請求項６９に記載の方法。

【請求項７１】

方法が、標的試料の特定の成分と結合するそれらの能力について複数個の蛋白質をスクリーニングすることを含み、少なくとも１つのまたは各マイクロスポットに保持された特定の成分の存在または量について直接的または間接的に検出することを含む、請求項５７～６８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７２】

少なくとも１つのマイクロスポット上に保持された特定の成分をキャラクタリゼーションする追加のステップをさらに含む、請求項７１に記載の方法。

【請求項７３】

方法が、蛋白質－蛋白質結合相互作用についてアッセイすることを含み、組み換えビリオンアレイに結合についてアッセイされるべき少なくとも１つの蛋白質を含む試料を送達することと、少なくとも１つのまたは各マイクロスポットに保持された試料から蛋白質の存在または量について直接的または間接的に検出することとを含む、請求項５７～６８のいずれか一項の請求項に記載の方法。

【請求項７４】
方法が、組み換えビリオンアレイ上の異種膜結合蛋白質の１つまたは２つ以上と反応し得る試料中の複数個の標的の存在について並行してアッセイすることを含み、アレイに試料を送達することと、少なくとも１つのまたは各組み換えビリオンマイクロスポットの異種膜結合蛋白質との標的の相互作用を検出することとを含む、請求項５７～６８のいずれか一項の請求項に記載の方法。
【請求項７５】
方法が、組み換えビリオンアレイ上の異種膜結合蛋白質の１つまたは２つ以上に結合し得る試料中の複数個の標的の存在について並行してアッセイすることを含み、少なくとも１つのまたは各マイクロスポットに保持された標的の存在または量について直接的または間接的に検出することを含む、請求項５７～６８のいずれか一項の請求項に記載の方法。
【請求項７６】
方法が診断法を含み、アッセイされようとする複数個の標的の少なくとも１つまたはそれぞれが対象中の病原体の存在または病態のしるしである、請求項５７～６８のいずれか一項の請求項に記載の方法。
【請求項７７】
アレイに送達される試料が生体試料を含む、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
方法が、アレイの組み換えビリオンマイクロスポットの異種膜結合蛋白質に特異的に結合する抗体を検出することを含む、請求項５７～６８のいずれか一項の請求項に記載の方法。
【請求項７９】
アレイの組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質によって結合されるべき標的を含む溶液を含む試料の送達が、ブロッキング溶液の送達によって先行される、後続される、および／または伴われる、請求項５７～７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８０】
それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する複数個の異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを組み換えビリオンが含む、組み換えビリオン。
【請求項８１】
組み換えビリオンが組み換え単純ヘルペスウィルス（ＨＳＶ）ビリオンである、請求項８０に記載の組み換えビリオン。
【請求項８２】
組み換えＨＳＶビリオンが単純ヘルペスウィルス１（ＨＳＶ－１）ビリオンである、請求項８１に記載の組み換えビリオン。
【請求項８３】
複数個の異種膜結合蛋白質がヒト膜結合蛋白質である、請求項８２に記載の組み換えビリオン。
【請求項８４】
異種膜結合蛋白質が単一の膜貫通ドメインを有する古典的なＩ型膜蛋白質である、請求項８３に記載の組み換えビリオン。
【請求項８５】
古典的なＩ型膜蛋白質がＣＤ４である、請求項８４に記載の組み換えビリオン。
【請求項８６】
異種膜結合蛋白質がマルチスパンＧ蛋白質共役受容体（ＧＰＣＲ）膜蛋白質である、請求項８３に記載の組み換えビリオン。
【請求項８７】
ＧＰＣＲがＧＰＲ７７である、請求項８６に記載の組み換えビリオン。
【請求項８８】
異種膜結合蛋白質がイオンチャネル、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニル酸シクラーゼ、増殖因子受容体、およびホルモン受容体か

らなる群から選択される、請求項８３に記載の組み換えビリオン。
【請求項８９】
異種膜ポリペプチドをコードする組み換えＨＳＶ－１細菌人工染色体（ＢＡＣ）クローン。
【請求項９０】
異種膜結合蛋白質がヒト膜結合蛋白質である、請求項８９に記載の組み換えＨＳＶ－１ＢＡＣクローン。
【請求項９１】
異種膜結合蛋白質が単一の膜貫通ドメインを有する古典的なＩ型膜蛋白質である、請求項９０に記載の組み換えＨＳＶ－１ＢＡＣクローン。
【請求項９２】
古典的なＩ型膜蛋白質がＣＤ４である、請求項９１に記載の組み換えＨＳＶ－１ＢＡＣクローン。
【請求項９３】
異種膜結合蛋白質がマルチスパンＧ蛋白質共役受容体（ＧＰＣＲ）膜蛋白質である、請求項９０に記載の組み換えＨＳＶ－１ＢＡＣクローン。
【請求項９４】
ＧＰＣＲがＧＰＲ７７である、請求項９３に記載の組み換えＨＳＶ－１ＢＡＣクローン。
【請求項９５】
異種膜結合蛋白質がイオンチャネル、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニル酸シクラーゼ、増殖因子受容体、ホルモン受容体、およびその組み合わせからなる群から選択される、請求項９０に記載の組み換えＨＳＶ－１ＢＡＣクローン。
【請求項９６】
複数個の異なる抗体を含み、複数個の少なくとも約１０％が膜結合蛋白質に対する抗体である、抗体のライブラリー。
【請求項９７】
複数個の少なくとも約２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または１００％が膜結合蛋白質に対する抗体である、請求項９６に記載のライブラリー。
【請求項９８】
膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体が単一特異的抗体である、請求項９６または９７に記載のライブラリー。
【請求項９９】
膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体がその標的膜結合蛋白質に対して少なくとも約10^{-7}Ｍ（K_D）の結合親和性を有する、請求項９６～９８に記載のライブラリー。
【請求項１００】
結合親和性が少なくとも約10^{-8}Ｍ、10^{-9}Ｍ、10^{-10}Ｍ、10^{-11}Ｍ、10^{-12}Ｍ、10^{-13}Ｍ、10^{-14}Ｍ、10^{-15}Ｍ、または10^{-16}Ｍである、請求項９９に記載のライブラリー。
【請求項１０１】
膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体がその標的膜結合蛋白質の固有の形態に結合する、請求項９６～１００に記載のライブラリー。
【請求項１０２】
複数個が少なくとも約５０個の異なる抗体を含む、請求項９６～１０１に記載のライブラリー。
【請求項１０３】
複数個が少なくとも約７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５

０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、７００、７２５、７５０、７７５、８００、８２５、８５０、８７５、９００、または１０００個の異なる抗体を含む、請求項１０２に記載のライブラリー。

【請求項１０４】

複数個がヒト膜結合プロテオームまたはヒトプロテオームの少なくとも約０．５％に結合する、請求項９６～１０３に記載のライブラリー。

【請求項１０５】

複数個がヒト膜結合プロテオームまたはヒトプロテオームの少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％に結合する、請求項１０４に記載のライブラリー。

【請求項１０６】

膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体が、膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の別の抗体の結合親和性の少なくとも約２０％以内であるその標的に対する結合親和性を有する、請求項９６～１０５に記載のライブラリー。

【請求項１０７】

膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体が、膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の別の抗体の結合親和性の少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、または１９％以内であるその標的に対する結合親和性を有する、請求項１０６に記載のライブラリー。

【請求項１０８】

膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体、請求項９６～１０７に記載のライブラリー。

【請求項１０９】

膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体が免疫沈降抗体である、請求項９６～１０８に記載のライブラリー。

【請求項１１０】

膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体がＩｇＧ抗体である、請求項９６～１０９に記載のライブラリー。

【請求項１１１】

少なくとも１つのまたは各抗体が基板上に固定化される、請求項９６～１１０に記載の抗体のライブラリーを含むアレイ。

【請求項１１２】

基板が平面状である、請求項１１１に記載のアレイ。

【請求項１１３】

基板が粒子である、請求項１１１に記載のアレイ。

【請求項１１４】

基板が固体材料を含む、請求項１１１～１１３に記載のアレイ。

【請求項１１５】

基板が多孔質材料を含む、請求項１１１～１１３に記載のアレイ。

【請求項１１６】

固定化が可逆的である、請求項１１１～１１５に記載のアレイ。

【請求項１１７】

固定化が不可逆的である、請求項１１１～１１５に記載のアレイ。

【請求項１１８】

（ａ）ヒトプロテオームアレイまたはヒト膜結合プロテオームアレイによって、１つまたは２つ以上の膜結合蛋白質または膜結合蛋白質の抗原を含有する１つまたは２つ以上のビリオンによって免疫された動物から単離された抗体生成細胞から単離された１つまたは

２つ以上の抗体をスクリーニングすることと、
（ｂ）ヒトプロテオームアレイまたはヒト膜結合プロテオームアレイ上の単一の標的に単一特異的である抗体を、ライブラリーに選択することと、
を含む、請求項９６～１１０に記載のライブラリーを作る方法。
【請求項１１９】
先立つ抗体生成細胞からの１つまたは２つ以上の抗体をプレスクリーニングすることをさらに含む、請求項１１８に記載の方法。
【請求項１２０】
プレスクリーニングが、免疫細胞化学を実施することによっている、請求項１１９に記載の方法。
【請求項１２１】
プレスクリーニングが、１つまたは２つ以上の標的抗原を含む混合物との抗体生成細胞からの抗体の結合を特定することによっている、請求項１１９に記載の方法。
【請求項１２２】
混合物が粗ライセート、細胞、蛋白質、ペプチド、核酸、またはその組み合わせを含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２３】
混合物が生体試料を含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２４】
混合物がビリオンの混合物を含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２５】
１つまたは２つ以上のビリオンが複数個の膜結合蛋白質を含む、請求項１１９～１２４に記載の方法。
【請求項１２６】
１つまたは２つ以上のビリオンが膜結合蛋白質の複数個の抗原を含む、請求項１１９～１２４に記載の方法。
【請求項１２７】
１つまたは２つ以上のビリオンが、少なくとも約１００個の異なる膜結合蛋白質または膜結合蛋白質からの抗原を含む、請求項１１９～１２４に記載の方法。
【請求項１２８】
１つまたは２つ以上のビリオンが少なくとも約２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、５，６００、または５，６０１個以上の異なる膜結合蛋白質または膜結合蛋白質からの抗原を含む、請求項１２７に記載の方法。
【請求項１２９】
１つまたは２つ以上のビリオンがヒトプロテオームまたはヒト膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％を含む、請求項１１９～１２８に記載の方法。
【請求項１３０】
１つまたは２つ以上のビリオンがヒトプロテオームまたはヒト膜結合プロテオームの少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含む、請求項１２９に記載の方法。
【請求項１３１】
抗体生成細胞がＢ細胞である、請求項１１９～１３０に記載の方法。
【請求項１３２】
基板に抗体を固定化することをさらに含む、請求項１１９～１３１に記載の方法。
【請求項１３３】
基板が平面状である、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３４】

基板が粒子である、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３５】
基板が固体材料を含む、請求項１３２～１３４に記載の方法。
【請求項１３６】
基板が多孔質材料を含む、請求項１３２～１３４に記載の方法。
【請求項１３７】
固定化が可逆的である、請求項１３２～１３６に記載の方法。
【請求項１３８】
固定化が不可逆的である、請求項１３２～１３６に記載の方法。
【請求項１３９】
１つまたは２つ以上のビリオンが請求項８０～８８に記載の組み換えビリオンを含む、請求項１１９～１３８に記載の方法。
【請求項１４０】
（ａ）ヒト膜結合蛋白質を含む標的を含むヒト膜結合プロテオームアレイまたはヒトプロテオームアレイと複数個の抗体を接触させることと、
（ｂ）ヒト膜結合プロテオームアレイまたはヒトプロテオームアレイ上に存在する標的と複数個の抗体との間の結合を特定することと、
（ｃ）ヒト膜結合プロテオームアレイまたはヒトプロテオームアレイ上の単一の標的に抗体が結合するときに、単一特異的として抗体を同定し、ヒト膜結合プロテオームアレイまたはヒトプロテオームアレイ上に存在する標的がビリオンのエンベロープ中に含まれることと、
を含む、ヒト膜結合蛋白質に単一特異的な抗体を同定する方法。
【請求項１４１】
ヒトプロテオームアレイがヒトプロテオームまたはヒト膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％を含む、請求項１１８～１４０に記載の方法。
【請求項１４２】
ヒトプロテオームアレイがヒトプロテオームまたはヒト膜結合プロテオームの少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含む、請求項１４１に記載の方法。
【請求項１４３】
（ａ）請求項９６～１１０に記載の抗体のライブラリーとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的を接触させることと、
（ｂ）複数個の抗体とビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、
（ｃ）ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がライブラリーの抗体に結合するときに、標的に対する抗体を同定することと、
を含む、標的に対する抗体を同定する方法。
【請求項１４４】
（ａ）請求項１１１～１１７に記載のアレイとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的を接触させることと、
（ｂ）複数個の抗体とビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、
（ｃ）ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がアレイの抗体に結合するときに、標的に対する抗体を同定することと、
を含む、標的に対する抗体を同定する方法。
【請求項１４５】
（ａ）請求項９６～１１０に記載の抗体のライブラリーとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的を接触させることと、

（ｂ）複数個の抗体とビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、
（ｃ）ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がライブラリーの抗体に結合するときに、標的を同定することと、
を含む、標的を同定する方法。
【請求項１４６】
（ａ）請求項１１１～１１７に記載のアレイとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的を接触させることと、
（ｂ）複数個の抗体とビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、
（ｃ）ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がアレイの抗体に結合するときに、標的を同定することと、
を含む、標的を同定する方法。
【請求項１４７】
（ａ）リガンドとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的膜結合蛋白質を接触させることと、
（ｂ）リガンドとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、
（ｃ）ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がリガンドに結合するときに、標的の標的としてリガンドを同定することと、
を含む、標的膜結合蛋白質のリガンドを同定する方法。
【請求項１４８】
（ａ）リガンドと請求項１～２８に記載のアレイを接触させることと、
（ｂ）リガンドとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、
（ｃ）ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がリガンドに結合するときに、標的の標的としてリガンドを同定することと、
を含む、標的膜結合蛋白質のリガンドを同定する方法。
【請求項１４９】
リガンドがペプチド、脂質、脂肪酸、炭水化物、低分子、およびその組み合わせからなる群から選択される、請求項１４７または１４８に記載の方法。
【請求項１５０】
リガンドが標識を含む、請求項１４７～１４９に記載の方法。
【請求項１５１】
標識が蛍光色素および放射性同位体からなる群から選択される、請求項１５０に記載の方法。
【請求項１５２】
標識がＦｌｕｏ８、ＤｉＢＡＣ４、およびＡＮＧ－２からなる群から選択される蛍光色素である、請求項１４７～１５１に記載の方法。
【請求項１５３】
同定することが、（ａ）の後にリガンドと抗体を接触させることをさらに含む、請求項１４７～１５２に記載の方法。
【請求項１５４】
それに結合したときにリガンドが標的の立体配座の変化を誘導する、請求項１４７～１５３に記載の方法。
【請求項１５５】
アレイと１つまたは２つ以上の抗体を接触させることをさらに含む、請求項１５４に記載の方法。
【請求項１５６】
誘導された立体配座の変化を含む標的に対する抗体として、１つまたは２つ以上の抗体

の抗体を同定することをさらに含む、請求項１５５に記載の方法。
【請求項１５７】
リガンドが薬物である、請求項１４７～１５６に記載の方法。
【請求項１５８】
膜結合蛋白質が２つまたは３つ以上のサブユニットを含む、請求項８０～８８に記載の組み換えビリオン。
【請求項１５９】
２つまたは３つ以上のサブユニットを発現する１つまたは２つ以上のウィルスに共感染した宿主細胞から組み換えビリオンが作られる、請求項１５８に記載の組み換えビリオン。
【請求項１６０】
組み換えビリオンが２つまたは３つ以上のサブユニットを複合体として提示する、請求項１５９に記載の組み換えビリオン。
【請求項１６１】
膜結合蛋白質が逆転したトポロジーを含む遺伝子操作された膜結合蛋白質であり、その結果、遺伝子操作された膜結合蛋白質の細胞質ドメインが組み換えビリオンの外側に提示される、請求項８０～８８または１５７～１６０に記載の組み換えビリオン。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
本願は、２０１３年６月２１日出願の米国仮特許出願第６１／８３７,９２９号の優先権を請求し、この出願はその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。
【０００２】
連邦政府によって資金援助された研究または開発
本発明は、国立衛生研究所によって授与されたＧＭ０７６１０２、ＡＩ０６３１８２、ＲＲ０２０８３９、ＲＣ２ＣＡ１４８４０２、Ｕ５４ＨＧ００６４３４、およびＵ２４ＣＡ１６００３６の下で政府の援助によってなされた。政府はある権利を本発明に有する。
【背景技術】
【０００３】
ヒトプロテオームのおよそ１／３は、種々の生化学的活性を有する蛋白質ファミリーに属する膜蛋白質、例えば輸送体、チャネル、受容体、認識分子、および接着分子からなる。膜蛋白質は細胞生存、細胞ホメオスタシスの維持、細胞シグナル伝達、免疫監視、分子輸送、および細胞－細胞情報伝達にとって決定的に重要な分子である。蛋白質のこのクラスは、全ての処方薬の治療標的の７０％までに相当する。ゆえに、それらの生化学的活性について、活性立体配座の膜蛋白質をプロファイリングすることを可能にするハイスループットプラットフォームの開発は、低分子スクリーニング方法を合理化することによって創薬に重要な影響を有するであろう。しかしながら、膜蛋白質、とりわけマルチパス膜貫通（ＴＭ）ドメインを持つものは、悪名高いことに研究することが困難である。なぜなら、それらは固有の（native）立体配座を維持するためには膜中に埋め込まれなければならず、多くは、細胞の分泌経路を輸送中に起こるグリコシル化などの妥当な翻訳後修飾（ＰＴＭ）を要求するからである。膜蛋白質マイクロアレイは以前に報告されているが、界面活性剤を用いる生化学的精製がスループットおよび爾後の操作を限定している（Fang et al. (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:2394-5、Tang et al. (2006) Anal. Chem. 78:711-7 (2006)）。
【０００４】
膜蛋白質に対する可能な限り最高品質の再現性ある抗体試薬を作る信頼できるテクノロジーには、生物医学コミュニティにおいて重要なニーズもまたある。このテクノロジーパイプラインの継続中の改善は、医療研究コミュニティおよびより大きい生物医学コミュニティに直接的に資するであろう。

【０００５】
シングルおよびマルチパス（mulipass）膜結合蛋白質を検出するための抗体の使用は、新たなバイオマーカーを同定および多くのアッセイを実施するために用いられ得る。例えば、抗体は、臨床医療のためなどの診断用途（例えば、ＥＬＩＳＡおよび放射性免疫アッセイシステム）においてもまた広く用いられている。病理研究室における細胞および組織の分析は、組織切片およびフローサイトメトリー分析への抗体の使用を含んでいる。抗体は治療薬としてもまた有用である。
【０００６】
抗体の生産は費用がかかり且つ時間がかかり得、それゆえにより費用効果が高くてより時間がかからない抗体（特に膜蛋白質に対する高度に特異的な抗体）のハイスループット生産のための方法が望ましい。本開示はこれらのニーズを満たし、関連の利点を提供する。
【発明の概要】
【０００７】
いくつかの側面において、本開示の主題は、基板の表面と安定に結びついた複数個の組み換えビリオンマイクロスポットを含むアレイを提供し、組み換えビリオンマイクロスポットは複数個の組み換えビリオンを含み、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する複数個の異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを組み換えビリオンが含む。ある側面において、組み換えビリオンは組み換え単純ヘルペスウィルス（ＨＳＶ）ビリオン、例えば単純ヘルペスウィルス１（ＨＳＶ－１）ビリオンである。他の側面において、複数個の異種膜結合蛋白質はヒト膜結合蛋白質であり、単一の膜貫通ドメインを有する古典的なＩ型膜蛋白質（例えばＣＤ４）またはマルチスパンＧ蛋白質共役受容体（ＧＰＣＲ）膜蛋白質（例えばＧＰＲ７７）を含む。他の側面において、膜結合蛋白質はイオンチャネル、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニル酸シクラーゼ、増殖因子受容体、およびホルモン受容体からなる群から選択される。
【０００８】
他の側面において、アレイの基板はセラミック物質、ガラス、金属、結晶質材料、プラスチック、ポリマーまたはコポリマー、およびその組み合わせからなる群から選択される物質を含む。さらなる側面において、基板はチップ、スライド、またはマイクロプレートとして構成され得る。尚さらなる側面において、基板の表面はコーティングされ得、例えばコーティングは基板に対する組み換えビリオンマイクロスポットまたは膜結合蛋白質の親和性を増大させる材料であり得る。いくつかの側面において、コーティングはニトロセルロース、シラン、チオール、ジスルフィド、ポリマー、および共有結合したリンカー部分を含む誘導体化された単層または多層からなる群から選択され得る。特定の側面において、アレイの基板はガラスを含み、基板はスライドとして構成され得、基板の表面はニトロセルロースによってコーティングされ得る。
【０００９】
いくつかの側面において、アレイの少なくとも１つのまたは各マイクロスポット中の組み換えビリオンは異種膜結合蛋白質の１つの種類のみを含む。他の側面において、組み換えビリオンアレイは組み換えビリオンアレイの別個の位置に存在する複数個の異なる膜結合蛋白質を含む。さらなる側面において、アレイのマイクロスポットの少なくとも１つまたはそれぞれは異なる異種膜結合蛋白質を含む。尚さらなる側面において、アレイの少なくとも１つのまたは各マイクロスポット中の組み換えビリオンは、２つまたは３つ以上の異なる異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを含む組み換えビリオンを含み、２つまたは３つ以上の異なる異種膜結合蛋白質は、ヘテロ二量体対に含まれる２つの異なる膜結合蛋白質を含むことを含む。他の側面において、組み換えビリオンアレイの１つのマイクロスポット中の１つまたは２つ以上の組み換えビリオンのエンベロープは、組み換えビリオンアレイの１つまたは２つ以上の別個のマイクロスポット中の組み換えビリオンのエンベロープによって含まれる１つまたは２つ以上の膜結合蛋白質と異なる膜結合蛋白質を含む。さらなる側面において、アレイの１つのマイクロスポット中の組み換えビリオンによって

含まれる異種膜結合蛋白質の種類は、同じアレイの１つまたは２つ以上の異なるマイクロスポット中の組み換えビリオンによって含まれる異種膜結合蛋白質と異なる。別の側面において、アレイのマイクロスポットの少なくとも１つまたはそれぞれは同じ異種膜結合蛋白質の異なるバリアントを含む。尚さらなる側面において、アレイはマイクロスポットのサブアレイを含み、少なくとも１つのまたは各マイクロスポットは異なる膜結合蛋白質を含み、サブアレイはより大きいアレイの一部として複数回反復される。他の側面において、１つのマイクロスポットの異種膜結合蛋白質は少なくとも１つの異なるマイクロスポットの異種膜結合蛋白質に関連し得、例えば、関連する異種膜結合蛋白質同士は同じ蛋白質ファミリーのメンバーであるか、および／または機能的に関連する。いくつかの側面において、膜結合蛋白質は２つまたは３つ以上のサブユニットを含む。いくつかの側面において、組み換えビリオンは、２つまたは３つ以上のサブユニットを発現する１つまたは２つ以上のウィルスに共感染した宿主細胞から作られ得る。いくつかの側面において、組み換えビリオンは２つまたは３つ以上のサブユニットを複合体として提示（ディスプレイ）する。いくつかの側面において、膜結合蛋白質は逆転したトポロジーを含む遺伝子操作された膜結合蛋白質であり得、その結果、遺伝子操作された膜結合蛋白質の細胞質ドメインが組み換えビリオンの外側に提示され得る。

【００１０】

いくつかの側面において、基板の表面と安定に結びついた複数個の組み換えビリオンマイクロスポットを含むアレイ、アレイを作る方法が提供され、方法は、（ａ）表面を有する基板を提供することと、（ｂ）複数個の組み換えビリオンを含む組み換えビリオン（組み換えビリオンは、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する複数個の異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを含む）、例えばＨＳＶビリオン、例えばＨＳＶ－１ビリオンを含む溶液を提供することと、（ｃ）溶液中にピンの先端を浸漬することと、（ｄ）溶液から先端を除いて、先端に接着した溶液を提供することと、（ｅ）表面と溶液を接触させて、それによって表面に先端から溶液をトランスファーすることと、（ｆ）接触ステップを複数回反復して、表面上のアレイにパターニングされた組み換えビリオンマイクロスポットを提供するすることと、を含む。

【００１１】

他の側面においては、標的と異種膜結合蛋白質との間の結合イベントを検出するための方法が提供され、方法は、組み換えビリオンアレイと標的を含む溶液を含む試料を接触させることと、異種膜結合蛋白質の少なくとも１つまたは２つ以上と標的との間の結合イベントを検出することとを含む。標的は標識され得、検出ステップは光学的検出法によって標識の存在を検出することを含み得る。別の側面において、未標識標的とアレイの組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質の対応する標識された標的と一緒にマイクロスポットのアレイがインキュベーションされ得、未標識標的と対応する標識された標的との間の競合を原因とする標識のシグナルの低下を測定することによって、組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質と未標識標的との間の結合イベントが特定され得る。標的が未標識であり得るところでは、結合イベントは界面における物理的特性の変化によってまたは質量分析によって特定され得る。

【００１２】

いくつかの側面においては、組み換えビリオンアレイによって標的と異種膜結合蛋白質との間の結合イベントを検出するための方法が、リガンドおよび／または薬物をスクリーニングすることを含み、アレイ上の複数個の異種膜結合蛋白質と結合または別様に相互作用するその能力について、可能性のあるリガンドおよび／または薬物の候補が直接的にスクリーニングされ得る。複数個の可能性のあるリガンドおよび／または薬物の候補は、アレイ上の異種膜結合蛋白質の１つまたは２つ以上の種類と結合または別様に相互作用するそれらの能力について、並行してスクリーニングされ得る。他の側面において、結合イベントを検出するための方法は、

（ａ）標的試料の特定の成分に結合するそれらの能力について複数個の蛋白質をスクリーニングし、少なくとも１つのまたは各マイクロスポットに保持された特定の成分の存在

または量について直接的または間接的に検出することを含み、任意に少なくとも１つのマイクロスポットに保持された特定の成分をキャラクタリゼーションする追加のステップをさらに含むこと、

（ｂ）結合イベントを検出し、これが蛋白質－蛋白質結合相互作用についてアッセイすることを含み、結合についてアッセイされるべき少なくとも１つの蛋白質を含む試料を組み換えビリオンアレイに送達することと、少なくとも１つのまたは各マイクロスポットに保持され得る試料から蛋白質の存在または量について直接的または間接的に検出することとを含むこと、

（ｃ）組み換えビリオンアレイ上の異種膜結合蛋白質の１つまたは２つ以上と反応し得る試料中の複数個の標的の存在について並行してアッセイし、アレイに試料を送達することと、少なくとも１つのまたは各組み換えビリオンマイクロスポットの異種膜結合蛋白質との標的の相互作用を検出することとを含むこと、

（ｄ）組み換えビリオンアレイ上の異種膜結合蛋白質の１つまたは２つ以上に結合し得る試料中の複数個の標的の存在について並行してアッセイし、少なくとも１つのまたは各マイクロスポットに保持された標的の存在または量について直接的または間接的に検出することを含むこと、

（ｅ）診断法（アッセイされようとする複数個の標的が対象中の病原体の存在または病態のしるしであり、例えばアレイに送達される試料が生体試料を含む）、ならびに／あるいは、

（ｆ）アレイの組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質に特異的に結合する抗体を検出すること、

を含む。上に列挙されている方法のいずれかにおいて、アレイの組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質によって結合されるべき標的を含む溶液を含む試料の送達は、ブロッキング溶液の送達によって先行され得る、後続され得る、および／または伴われ得る。

【００１３】

他の側面においては組み換えビリオンが提供され、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する複数個の異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを組み換えビリオンが含み、例えば組み換えビリオンは組み換えＨＳＶビリオンであり得、例えばＨＳＶビリオンはＨＳＶ－１ビリオンであり得る。他の側面において、複数個の異種膜結合蛋白質はヒト膜結合蛋白質であり、単一の膜貫通ドメインを有する古典的なＩ型膜蛋白質（例えばＣＤ４）またはマルチスパンＧ蛋白質共役受容体（ＧＰＣＲ）膜蛋白質（例えばＧＰＲ７７）を含む。他の側面において、膜結合蛋白質はイオンチャネル、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニル酸シクラーゼ、増殖因子受容体、およびホルモン受容体からなる群から選択される。

【００１４】

さらなる側面において、異種膜ポリペプチドをコードする組み換えＨＳＶ－１細菌人工染色体（ＢＡＣ）クローンが提供される。特定の側面において、ＨＳＶ－１ＢＡＣクローンの異種膜結合蛋白質はヒト膜結合蛋白質であり得、単一の膜貫通ドメインを有する古典的なＩ型膜蛋白質（例えばＣＤ４）またはマルチスパンＧ蛋白質共役受容体（ＧＰＣＲ）膜蛋白質（例えばＧＰＲ７７）を含む。他の側面において、膜結合蛋白質はイオンチャネル、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニル酸シクラーゼ、増殖因子受容体、およびホルモン受容体からなる群から選択される。

【００１５】

いくつかの側面において、抗体のライブラリーが提供され、複数個の異なる抗体を含み、複数個の少なくとも１０％は膜結合蛋白質に対する抗体である。いくつかの側面において、複数個の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または１００％は膜結合蛋白質に対する抗体である。いくつかの側面において、膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体は単一特異的（monospecific）抗体であり得る。いくつかの側面において、膜結合蛋白質に対

する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体は、その標的膜結合蛋白質に対して少なくとも10^{-7}Ｍ（K_D）の結合親和性を有する。いくつかの側面において、結合親和性は少なくとも10^{-8}Ｍ、10^{-9}Ｍ、10^{-10}Ｍ、10^{-11}Ｍ、10^{-12}Ｍ、10^{-13}Ｍ、10^{-14}Ｍ、10^{-15}Ｍ、または10^{-16}Ｍであり得る。いくつかの側面において、膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体はその標的膜結合蛋白質の固有の形態に結合する。

【００１６】

いくつかの側面において、複数個の抗体は少なくとも５０個の異なる抗体を含む。いくつかの側面において、複数個の抗体は少なくとも７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、７００、７２５、７５０、７７５、８００、８２５、８５０、８７５、９００、または１０００個の異なる抗体を含む。

【００１７】

いくつかの側面において、複数個の抗体はヒト膜結合プロテオームまたはヒトプロテオームの少なくとも０．５％に結合する。いくつかの側面において、複数個の抗体はヒト膜結合プロテオームまたはヒトプロテオームの少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％に結合する。いくつかの側面において、膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体は、膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の別の抗体の結合親和性の少なくとも２０％以内であり得るその標的に対する結合親和性を有する。いくつかの側面において、膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体は、膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の別の抗体の結合親和性の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、または１９％以内であり得るその標的に対する結合親和性を有する。いくつかの側面において、膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体。いくつかの側面において、膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体は免疫沈降抗体であり得る。いくつかの側面において、膜結合蛋白質に対する複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体はＩｇＧ抗体であり得る。

【００１８】

いくつかの側面においてはアレイが提供され、本明細書に記載される抗体のライブラリーが提供され、少なくとも１つのまたは各抗体が基板上に固定化され得ることを含む。いくつかの側面において、基板は平面状であり得る。いくつかの側面において、基板は粒子であり得る。いくつかの側面において、基板は固体材料を含む。いくつかの側面において、基板は多孔質材料を含む。いくつかの側面において、固定化は可逆的であり得る。いくつかの側面において、固定化は不可逆的であり得る。

【００１９】

いくつかの側面において、本明細書に記載されるライブラリーを作る方法が提供され、ａ）１つまたは２つ以上の膜結合蛋白質または膜結合蛋白質の抗原を含有する１つまたは２つ以上のビリオンによって動物を免疫することと、ｂ）動物から抗体生成細胞を単離することと、ｃ）抗体生成細胞から１つまたは２つ以上の抗体を単離することと、ｄ）ヒトプロテオームアレイまたはヒト膜結合プロテオームアレイによってステップｃ）の１つまたは２つ以上の抗体をスクリーニングすることと、ｅ）ヒトプロテオームアレイまたはヒト膜結合プロテオームアレイ上の単一の標的に単一特異的である抗体をライブラリーに選択することと、を含む。いくつかの側面において、方法は、抗体単離に先立って抗体生成細胞からの１つまたは２つ以上の抗体をプレスクリーニングすることをさらに含む。いくつかの側面において、プレスクリーニングは免疫細胞化学を実施することによっている。いくつかの側面において、プレスクリーニングは、１つまたは２つ以上の標的抗原を含む

混合物との抗体生成細胞からの抗体の結合を特定することによっている。いくつかの側面において、混合物は粗ライセート、細胞、蛋白質、ペプチド、核酸、またはその組み合わせを含む。いくつかの側面において、混合物は生体試料を含む。いくつかの側面において、混合物はビリオンの混合物を含む。いくつかの側面において、１つまたは２つ以上のビリオンは複数個の膜結合蛋白質を含む。いくつかの側面において、１つまたは２つ以上のビリオンは膜結合蛋白質の複数個の抗原を含む。いくつかの側面において、１つまたは２つ以上のビリオンは少なくとも１００個の異なる膜結合蛋白質または膜結合蛋白質からの抗原を含む。いくつかの側面において、１つまたは２つ以上のビリオンは少なくとも２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、５，６００、または５，６０１個以上の異なる膜結合蛋白質または膜結合蛋白質からの抗原を含む。いくつかの側面において、１つまたは２つ以上のビリオンはヒトプロテオームまたはヒト膜結合プロテオームの少なくとも０．５％を含む。いくつかの側面において、１つまたは２つ以上のビリオンはヒトプロテオームまたはヒト膜結合プロテオームの少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含む。いくつかの側面において、抗体生成細胞はＢ細胞である。いくつかの側面において、基板に抗体を固定化することを含む。いくつかの側面において、基板は平面状であり得る。いくつかの側面において、基板は粒子であり得る。いくつかの側面において、基板は固体材料を含む。いくつかの側面において、基板は多孔質材料を含む。いくつかの側面において、固定化は可逆的であり得る。いくつかの側面において、固定化は不可逆的であり得る。いくつかの側面において、１つまたは２つ以上のビリオンは本明細書に記載される組み換えビリオンのいずれかを含む。

【００２０】

いくつかの側面においては、ヒト膜結合蛋白質に単一特異的な抗体を同定する方法が提供され、ヒト膜結合蛋白質を含む標的を含むヒト膜結合プロテオームアレイまたはヒトプロテオームアレイと複数個の抗体を接触させることと、ヒト膜結合プロテオームアレイまたはヒトプロテオームアレイ上に存在する標的と複数個の抗体との間の結合を特定することと、ヒト膜結合プロテオームアレイまたはヒトプロテオームアレイ上の単一の標的に抗体が結合するときに、単一特異的として抗体を同定し、ヒト膜結合プロテオームアレイまたはヒトプロテオームアレイ上に存在する標的はビリオンのエンベロープ中に含まれることとを含む。いくつかの側面において、ヒトプロテオームアレイはヒトプロテオームまたはヒト膜結合プロテオームの少なくとも０．５％を含む。いくつかの側面において、ヒトプロテオームアレイはヒトプロテオームまたはヒト膜結合プロテオームの少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含む。

【００２１】

いくつかの側面においては、標的に対する抗体を同定する方法が提供され、本明細書に記載される抗体のライブラリーとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的を接触させることと、複数個の抗体とビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がライブラリーの抗体に結合するときに、標的に対する抗体を同定することとを含む。

【００２２】

いくつかの側面においては、標的に対する抗体を同定する方法が提供され、本明細書に記載されるアレイとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的を接触させることと、複数個の抗体とビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がアレイの抗体に結合するときに、標的に対する抗体を同定することとを含む。

【００２３】
いくつかの側面においては、標的を同定する方法が提供され、本明細書に記載される抗体のライブラリーとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的を接触させることと、複数個の抗体とビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がライブラリーの抗体に結合するときに、標的を同定することとを含む。
【００２４】
いくつかの側面においては、標的を同定する方法が提供され、本明細書に記載されるアレイとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的を接触させることと、複数個の抗体とビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がアレイの抗体に結合するときに、標的を同定することとを含む。
【００２５】
いくつかの側面においては、標的膜結合蛋白質のリガンドを同定する方法が提供され、リガンドとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的膜結合蛋白質を接触させることと、リガンドとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がリガンドに結合するときに、標的の標的としてリガンドを同定することとを含む。
【００２６】
いくつかの側面においては、標的膜結合蛋白質のリガンドを同定する方法が、リガンドと本明細書に記載されるアレイを接触させることと、リガンドとビリオンのエンベロープ中に含まれる標的との間の結合を特定することと、ビリオンのエンベロープ中に含まれる標的がリガンドに結合するときに、標的の標的としてリガンドを同定することとを含む。いくつかの側面において、リガンドはペプチド、脂質、脂肪酸、および低分子からなる群から選択される。いくつかの側面において、リガンドは標識を含む。いくつかの側面において、標識は蛍光色素および放射性同位体からなる群から選択される。いくつかの側面において、標識はＦｌｕｏ８、ＤｉＢＡＣ４、およびＡＮＧ－２からなる群から選択される蛍光色素であり得る。いくつかの側面において、同定することは、（ａ）の後にリガンドと抗体を接触させることをさらに含む。いくつかの側面において、それに結合したときにリガンドは標的の立体配座の変化を誘導する。いくつかの側面において、方法は、アレイと１つまたは２つ以上の抗体を接触させることをさらに含む。いくつかの側面において、方法は、誘導された立体配座の変化を含む標的に対する抗体として、１つまたは２つ以上の抗体の抗体を同定することをさらに含む。いくつかの側面において、リガンドは薬物であり得る。
【００２７】
本開示の主題のある側面を以上に述べた。これらは本開示の主題によって全体的または部分的に扱われる。他の側面は、記載が進むにつれて、本明細書において下で最良に記載される付随する実施例および図面と関連づけられるときに明らかになるであろう。
【００２８】
参照による組み込み
本明細書において引用される全ての文書または文書の部分（公刊物、特許、特許出願、記事、書籍、マニュアル、および論文を含むが、これに限定されない）は、これをもって、各個々の文書が参照によって組み込まれると具体的かつ個々に表された場合と同じ程度まで、いずれかの目的のためにそれらの全体が参照によって明白に組み込まれる。
【００２９】
例えば、本明細書において言及される全ての公刊物および特許は、公刊物に記載されているキット、組成物、および方法論を記載および開示する目的のためにそれらの全体が参照によって本明細書に組み込まれ、それらは本明細書に記載される方法、キット、および組成物と関連して用いられ得る。本明細書において論じられる文書は、もっぱら本明細書の出願日に先立つそれらの開示ゆえに提供される。本明細書においては、いかなることも

、先行発明ゆえにまたはいずれかの他の理由でかかる開示に先んずる資格が本明細書に記載されている発明者にないという承認として解釈されるべきではない。

【００３０】

本開示の主題をここまで大まかに記載した。ここで付随する図面の参照がなされるが、それらは必ずしも一定の比率で引かれていない。

【図面の簡単な説明】

【００３１】

【図１】ＶｉｒＤアレイの開発を示している。（Ａ）ビリオンディスプレイシステムに用いられた２つの戦略の図式。第１はｇＢプロモーターからのＶ５エピトープによってタグづけされたＣＤ４またはＧＰＲ７７分子の発現を利用し、第２は糖蛋白質ＣのＴＭおよびＣ末端にＣＤ４またはＧＰＲ７７のエクトドメインを融合することによるキメラ発現法を用いる。ＣＤ４およびＧＰＲ７７シグナルペプチド（ＳＰ）が示されている。これらの遺伝子操作されたヒト遺伝子を発現する組み換えＨＳＶ－１ウィルスは、哺乳類細胞を感染させるために用いられ、ビリオンエンベロープ中にヒト膜蛋白質を組み込んでいるであろうこれらの細胞から放出されたウィルスは精製され、FASTスライド上に印刷された。（Ｂ）ＣＤ４およびＧＰＲ７７の細胞表面発現を実証する、組み換えウィルスに感染したＨＦＴ細胞の共焦点分析。ｇＤの細胞表面発現が類似の感染細胞について各パネルの差込図中に示されている。ｇＢプロモーターから発現されたＣＤ４およびＧＰＲ７７の細胞内分布が、細胞の透過処理後の抗Ｖ５抗体による染色によって可視化された。倍率は１００×であった。（Ｃ）感染細胞ライセート中のＣＤ４およびＧＰＲ７７の発現ならびに成熟ビリオン中へのこれらの蛋白質の組み込みが、抗Ｖ５抗体を用いるウェスタンブロット分析によって確認された。（Ｄ）ビリオン中へのＣＤ４の組み込みおよび分子の立体配座が、抗ＣＤ４（ＰＥコンジュゲーション）抗体による精製ビリオンの標識、その後のビリオンのＦＡＣＳ分析によって検討された。

【図２】ＶｉｒＤアレイによる機能および相互作用アッセイを示している。ＶｉｒＤアレイのレイアウトが図の中心に示されている。（Ａ）ＶｉｒＤアレイ上に固定化されたビリオンのインテグリティが抗ｇＤおよび抗ＶＰ５抗体によって確認された。全ての７つのビリオンは強い抗ｇＤシグナルを示したが、よりずっと低い抗ＶＰ５シグナルを示した。１％ＮＰ４０を用いる軽い界面活性剤処理は抗ｇＤシグナルを著しく減少させ、ＶｉｒＤアレイ上の抗ＶＰ５シグナルを増大させた。（Ｂ）ＶｉｒＤアレイ上のレクチン－グリカン相互作用。蛍光標識されたレクチン（すなわち、ＳＮＡ－ＩＩ、ＰＨＡ－Ｌ、ＣＡ、およびＷＧＡ）がプロービングされ、ＶｉｒＤアレイ上のグリカン構造をプロファイリングした。（Ｃ）抗ＣＤ４抗体染色。強い特異的なシグナルがｇＢ：ＣＤ４およびＣＤ４－ｇＣビリオン上に観察された。（Ｄ）抗ＧＰＲ７７抗体染色およびＧＰＲ７７－Ｃ５ａ相互作用。強い特異的なシグナルがｇＢ：ＧＰＲ７７およびＧＰＲ７７－ｇＣビリオン上に観察され、Ｃｙ５標識Ｃ５ａはＧＰＲ７７－ｇＣビリオンに対する強い結合活性およびｇＢ：ＧＰＲ７７ビリオンに対するより弱い結合シグナルを示したが、他のビリオン上には検出可能なシグナルを示さなかった。

【図３】ｇＢ：ＣＤ４に感染したＨＦＴ細胞の共焦点分析を示しており、ｇＤおよびＣＤ４の細胞内分布を示している。ＣＤ４染色は抗ＣＤ４および抗Ｖ５抗体両方を用いてイメージングされ、細胞内のＣＤ４の類似の分布を実証した。倍率は１００×であった。

【図４】ＨＳＶビリオン中のこれらの分子の組み込みおよび正しい提示をさらに実証ｅするために、ＣＤ４およびＧＰＲ７７のエクトドメインに対する抗体を用いるＥＬＩＳＡ実験が用いられたということを示している。

【図５】スポットあたり５０，０００まで低いビリオン（ＫＯＳプラーク形成単位）がＶｉｒＤアレイ上において抗ｇＤ抗体によって検出され得、力価が＞４００，０００ビリオンまで増大した後に抗ｇＤシグナルが飽和に達し始めたということを示している。

【図６】抗ｇＢおよび抗ｇＣ染色を示しており、それぞれｇＢ：ＣＤ４／ＧＰＲ７７およびＣＤ４／ＧＰＲ７７－ｇＣビリオン中におけるｇＢおよびｇＣ蛋白質の不在を確認している。ＮＰ４０処理は抗ｇＢおよび抗ｇＣシグナルを大いに減少させた。

【図７】抗原としてヒトＧＰＣＲを発現する組み換えＨＳＶ－１ウィルスを用いて抗体生産のための宿主を感染させて、ヒトＧＰＣＲに対して生成した抗体を示している。
【発明を実施するための形態】
【００３２】
本開示の主題がここで付随する図面を参照して以下によりくわしく記載され、本開示の主題のいくつかの態様が示されるが、全ての態様は示されない。同様の数字は一貫して同様の要素を言う。本開示の主題は多くの異なる形態で実現され得、本明細書に記載される態様に限定されるものとして解釈されるべきではない。むしろ、これらの態様は本開示が適用可能な法律要件を満足するように提供される。実際に、前述の記載および結びついた図面に示される教示を利して、本開示の主題が関わる分野の業者には本明細書に記載される多くの改変および他の態様が思い浮かぶであろう。ゆえに、開示される具体的な態様に本開示の主題が限定されないということと、改変および他の態様は添付の請求項の範囲に含まれることを意図されているということとは理解されるはずである。
【００３３】
本明細書において用いられている項の見出しは構成上の目的のみのためであり、記載されている主題を限定するものとして解釈されるべきではない。
【００３４】
本明細書に記載される方法および組成物は本明細書に記載される特定の方法論、プロトコール、細胞株、構築物、および試薬に限定されず、そのため、変わり得るということは理解されるはずである。本明細書において用いられる術語は特定の態様を記載する目的のみのためであり、本明細書に記載される方法および組成物の範囲を限定することは意図されておらず、それらは添付の請求項によってのみ限定されるであろうということもまた理解されるであろう。
【００３５】
いくつかの側面が、例示のための例の用途を参照して下に記載される。多数の具体的な詳細、関係、および方法は、本明細書に記載される特徴のくわしい理解を提供するために示されているということは理解されるはずである。しかしながら、具体的な詳細の１つまたは２つ以上なしにまたは他の方法によって本明細書に記載される特徴が実行され得るということを当業者は直ちに認識するであろう。本明細書に記載される特徴は行為またはイベントの例示される並びによって限定されず、いくつかの行為は異なる順序でおよび／または他の行為もしくはイベントと同時的に起こり得る。なおその上に、本明細書に記載される特徴に従う方法論を実装するためには、全ての例示された行為またはイベントが要求されるわけではない。
【００３６】
別様に定義されない限り、本明細書において用いられる全ての技術および科学用語は、請求される主題が属する分野の業者によって普通に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書の用語に複数個の定義がある場合には、この項のものが勝る。ＵＲＬまたは他のかかる識別子もしくはアドレスの参照がなされるところでは、かかる識別子は変化し得、インターネット上の特定の情報は現れては消え得るが、同等の情報はインターネットを探索することによって見いだされ得るということは理解される。その参照はかかる情報の利用性および公への配布の証拠である。
【００３７】
前述の大まかな記載および以下の詳細な記載が例示的および説明的であるのみであり、請求されるいずれかの主題を制限しないということは理解されるはずである。本明細書において、具体的に別様に述べられない限り単数形の使用は複数形を含む。本明細書および添付の請求項において用いられる場合、文脈が明確に別様に指定しない限り単数形「a」、「an」、および「the」は複数の指示物を含むということに注意しなければならない。本明細書において、別様に述べられない限り「または」の使用は「および／または」を意味する。なおその上に、用語「含む（including）」、さらには他の形態、例えば「含む（include）」、「含む（includes）」、および「含まれる（included）」の使用は、(用

語「含む（comprising）」と類似に)限定するものではない。

【００３８】

用語「約」または「およそ」は、当業者によって特定される特定の値の許容される誤差の範囲内を意味し得、どのように値が測定または特定されるか、すなわち測定システムの制約に部分的に依存するであろう。例えば、「約」は当分野の慣行によって１または１標準偏差超を意味し得る。その代わりに、「約」は所与の値の２０％まで、１０％まで、５％まで、または１％までの範囲を意味し得る。その代わりに、例えば生体システムまたはプロセスに関して、用語は値の１桁以内、５倍以内、より好ましくは２倍以内を意味し得る。特定の値が本明細書および請求項において記載されているところでは、別様に述べられない限り、特定の値について許容される誤差の範囲以内を意味する用語「約」が想定されるべきである。

【００３９】

さらに、用語「約」は、１つまたは２つ以上の数または数の範囲と関連して用いられるときに、全てのかかる数（範囲内の全ての数を含む）を言うと理解されるべきであり、示されている数値の上および下の境界を延ばすことによってその範囲を改変する。エンドポイントによる数の範囲の記述は、その範囲に入る全ての数（例えば整数（whole integer）。その画分を含む）（例えば、１～５という記述は１、２、３、４、および５、さらにはその画分、例えば１．５、２．２５、３．７５、４．１、および同様のものを含む）、およびその範囲内のいずれかの範囲を含む。

【００４０】

Ｉ．組み換えビリオンアレイ

本開示の主題は、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持するヒト膜蛋白質を含む新規のマイクロアレイの開発に少なくとも部分的に関する。下でよりくわしく記載される通り、ある側面においては、シングルおよびマルチパスヒト膜蛋白質は両方ともビリオン（例えば単純ヘルペスビリオン）のエンベロープ中において提示されるように遺伝子操作され得、次に、精製されたビリオンが例えばガラススライド上に印刷されて高密度ビリオンディスプレイ（ＶｉｒＤ）アレイを形成し得、その結果、提示された蛋白質がそれらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する。

【００４１】

したがって、１つの態様において、本開示の主題は、基板の表面と安定に結びついた複数個の組み換えビリオンマイクロスポットを含むアレイを提供し、組み換えビリオンマイクロスポットは複数個の組み換えビリオンを含み、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する複数個の異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを組み換えビリオンが含む。特定の態様において、異種膜結合蛋白質はヒト膜結合蛋白質である。

【００４２】

アレイ

アレイは、表面を覆う複数個の組み換えビリオンマイクロスポットを有する表面を含む少なくとも１つの基板をそれぞれ含み得る。アレイ上の少なくとも１つのまたは各組み換えビリオンマイクロスポットは複数個の組み換えビリオンを含み、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する複数個の異種膜結合蛋白質、例えばヒト膜結合蛋白質を含むエンベロープを組み換えビリオンが含む。アレイの基板の表面は複数個の組み換えビリオンを含まないマイクロスポットによってもまた覆われ得る。例えば、マイクロスポットは、校正スポット、コントロールスポット、および同様のものとして働く試薬、蛋白質、核酸、または他の物質を含み得る。

【００４３】

基板の表面上のマイクロスポットの全ての密度は少なくとも約１／ｃｍ^{2}もしくは少なくとも約１０／ｃｍ^2、約１０００／ｃｍ^{2}まで、または約５００／ｃｍ^{2}までであり得る。ある態様において、基板の表面上の全てのマイクロスポットの密度は約４００／ｃｍ^{2}まで、約３００／ｃｍ^{2}まで、約２００／ｃｍ^{2}まで、約１００／ｃｍ^{2}まで、約９０／ｃｍ^{2}まで、約８０／ｃｍ^{2}まで、約７０／ｃｍ^{2}まで、約６０／ｃｍ^{2}まで、または

約５０／ｃｍ^{2}までであり得る。

【００４４】

アレイ上のマイクロスポットはいずれかの便利な形状であり得、環状、楕円体（elliptoid）、卵形、環状、またはいくつかの他の類似曲線形状を含み、形状はある態様においてはアレイを作るために使用された特定の方法の結果であり得る。マイクロスポットはアレイの表面を横切るまたはその一面のいずれかの便利なパターン、例えばグリッドを形成する横列および縦列、環状パターン、ならびに同様のもので配置され得、一般的にスポットのパターンは基板の表面を横切るグリッドの形態で存在するであろう。

【００４５】

アレイ中において、マイクロスポットは基板の表面と安定に結びついており得る。「安定に結びつく」によって、マイクロスポットが結合および／または洗浄条件下で基板に対するそれらの位置を維持する(例えば、気水界面中を引かれたときにマイクロスポットが位置に留まり、生体機能を保持する)ということが意味され得る。したがって、マイクロスポットによって含まれる組み換えビリオンまたは他の物質は、基板表面と非共有結合的または共有結合的に安定に結びついており得る。非共有結合的な結びつきの例は、非特異的な吸着、静電に基づく結合(例えばイオン、イオン対相互作用)、疎水性相互作用、水素結合相互作用、表面水和力、および同様のものを含む。共有結合の例は、基板の表面に存在する官能基（例えば－ＮＨ$_2$）と組み換えビリオンマイクロスポットとの間に形成される共有結合を含み、官能基は天然に存在または導入されたコーティング材料のメンバーとして存在し得る。

【００４６】

１つの態様においては、異種膜結合蛋白質の１つの種類のみが、アレイの少なくとも１つのまたは各マイクロスポット中の組み換えビリオンによって含まれ得る。しかしながら、ある態様においては、単一のマイクロスポットは、複数の（すなわち２つまたは３つ以上の）異なる異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを含む組み換えビリオンを含み得る。例えば、ヘテロ二量体対に含まれる２つの異なる膜結合蛋白質は、１つのマイクロスポット中の組み換えビリオンのエンベロープ中に含まれ得る（例えばそれらの生体機能のためのいくつかのＧＰＣＲのヘテロ二量体化、Angers et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:3684-3689参照）。他の態様において、異種膜結合蛋白質の機能的な活性のためには、生体膜マイクロスポットは（例えばＧＰＣＲ活性のための）必要なコエフェクター（co-effector）および／またはアダプターを含み得る。

【００４７】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチド

「遺伝子」は、本明細書において用いられる場合、転写および翻訳された後に特定の蛋白質をコードする能力がある少なくとも１つのオープンリーディングフレームを含有するポリヌクレオチドを言う。

【００４８】

本明細書において用いられる場合、「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、リボヌクレオシド（アデノシン、グアノシン、ウリジン、またはシチジン。「ＲＮＡ分子」）もしくはデオキシリボヌクレオシド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、またはデオキシシチジン。「ＤＮＡ分子」）のリン酸エステルポリマー形態、またはそのいずれかのホスホエステルアナログ（例えばホスホロチオエートおよびチオエステル）を一本鎖形態または二本鎖螺旋において言う。二本鎖ＤＮＡ－ＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡ、およびＲＮＡ－ＲＮＡヘリックスが可能である。用語核酸分子、特にＤＮＡまたはＲＮＡ分子は、分子の１次および２次構造のみを言い得、それをいずれかの特定の３次形態に限定しない。それゆえに、この用語は、中でも直線状または環状ＤＮＡ分子（例えば制限断片）、プラスミド、および染色体中に見いだされる二本鎖ＤＮＡを含む。特定の二本鎖ＤＮＡ分子の構造を論ずる際に、配列は、ＤＮＡの非転写鎖（すなわち、ｍＲＮＡに相同な配列を有する鎖）に沿って５’から３’方向の配列のみを与える正常な慣例に従って本明細書に記載され得る。「組み換えＤＮＡ分子」は分子生物学的操作を受けたＤＮＡ

分子であり得る。

【００４９】

ポリヌクレオチド断片は、参照核酸と実質的に同一のヌクレオチド配列を共通部分に渡って含む、参照核酸と比べて減少した長さのヌクレオチド配列を言う。本開示の主題に従うかかる核酸断片は、適切なところでは、それが構成要素であり得るより大きいポリヌクレオチド中に含まれ得る。かかる断片は、本開示の主題に従って、長さが核酸の少なくとも約６、８、９、１０、１２、１５、１８、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３９、４０、４２、４５、４８、５０、５１、５４、５７、６０、６３、６６、７０、７５、７８、８０、９０、１００、１０５、１２０、１３５、１５０、２００、３００、５００、７２０、９００、１０００、または１５００個の一続きのヌクレオチドの範囲のオリゴヌクレオチドを含むか、またはその代わりにそれからなる。

【００５０】

用語「組み換えポリヌクレオチド」は、それらの元の天然環境中では一つながりのポリペプチド配列として見いだされない少なくとも約２つのポリヌクレオチド配列を含む、人工的に設計されたポリヌクレオチドを言う。または、組み換えポリヌクレオチドから発現されたポリペプチドを言う。

【００５１】

用語「精製ポリヌクレオチド」または「精製ポリヌクレオチドベクター」は、他の化合物（他の核酸、炭水化物、脂質、および蛋白質（例えば、ポリヌクレオチドの合成に用いられる酵素）を含むが、これに限定されない）から分離されたポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドベクター、または直線状ポリヌクレオチドからの共有結合的に閉じたポリヌクレオチドの分離を記載し得る。試料の少なくとも約５０％、好ましくは６０～７５％が単一のポリヌクレオチド配列および（直線状対共有結合的に閉じた）立体配座を見せるときに、ポリヌクレオチドは実質的に純粋であり得る。実質的に純粋なポリヌクレオチドは典型的には核酸試料の約５０％、好ましくは６０～９０％重量／重量、より通常は約９５％を含み、好ましくは約９９％超純粋である。ポリヌクレオチドの純度または均質性は、当分野において周知のいくつもの手段、例えば試料のアガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動、その後にゲルを染色することによって単一のポリヌクレオチドバンドを可視化することによって表され得る。ある目的のためには、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）または当分野において周知の他の手段を用いることによってより高い分解能が提供され得る。

【００５２】

用語「ポリペプチド」はポリマーの長さにかかわらずアミノのポリマーを言う。それゆえに、ペプチド、オリゴペプチド、および蛋白質はポリペプチドの定義に含まれる。この用語はポリペプチドの翻訳後修飾をもまた指定または除外しない。例えば、グリコシル基、アセチル基、リン酸基、脂質基、および同様のものの共有結合的な取り付けを含むポリペプチドは用語ポリペプチドによって明白に包含される。アミノ酸の１つまたは２つ以上のアナログ（例えば、天然に存在しないアミノ酸、無関係の生体システム中にのみ天然に存在するアミノ酸、哺乳類システムからの修飾アミノ酸などを含む）を含有するポリペプチド、置換された連結部、さらには天然に存在するおよび天然に存在しない両方の当分野において公知の他の改変を有するポリペプチドもまた定義に含まれる。

【００５３】

用語「組み換えポリペプチド」は、それらの元の天然環境中では一つながりのポリペプチド配列として見いだされない少なくとも２つのポリペプチド配列を含む、人工的に設計されたポリペプチドを言い得る。または、組み換えポリヌクレオチドから発現されたポリペプチドを言う。

【００５４】

用語「精製ポリペプチド」は、他の化合物（核酸、脂質、炭水化物、および他の蛋白質を含むが、これに限定されない）から分離されたポリペプチドを記載し得る。試料が単一のポリペプチド配列の少なくとも約５０％、好ましくは６０～７５％を含有するときに、

ポリペプチドは実質的に純粋であり得る。実質的に純粋なポリペプチドは、典型的には蛋白質試料の約５０％、好ましくは６０～９０％、より好ましくは９５～９９％重量／重量を含む。ポリペプチドの純度または均質性は当分野において周知のいくつもの手段（例えば、試料のアガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動、その後に、ゲルを染色することによってポリペプチドバンドを可視化すること）によって表され得る。ある目的のためには、ＨＰＬＣまたは当分野において周知の他の手段を用いることによってより高い分解能が提供され得る。

【００５５】

用語「単離」は、材料がその元々の環境（例えば、それが天然に存在する場合には天然環境）から除かれることを要求する。例えば、天然に存在するポリヌクレオチドまたは生体の動物中に存在するポリペプチドは単離されていないが、天然システム中で共存する材料のいくつかまたは全てから分離された同じポリヌクレオチドもしくはＤＮＡまたはポリペプチドは単離されている。かかるポリヌクレオチドはベクターの一部であり得るか、および／またはかかるポリヌクレオチドもしくはポリペプチドは組成物の一部であり得、ベクターまたは組成物がその天然環境の一部でないという点では尚単離されており得る。

【００５６】

用語「精製」は絶対的な純度を要求せず、むしろ、相対的な定義として意図される。出発材料または天然の材料から少なくとも約１桁、好ましくは２または３桁、より好ましくは４または５桁までの精製が明白に考えられる。一例として、０．１％濃度から１０％濃度への精製は２桁である。

【００５７】

「精製ポリヌクレオチド」または「精製ポリヌクレオチドベクター」は、他の化合物（他の核酸、炭水化物、脂質、および蛋白質（例えば、ポリヌクレオチドの合成に用いられる酵素）を含むが、これに限定されない）から分離されたポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドベクター、または直線状ポリヌクレオチドからの共有結合的に閉じたポリヌクレオチドの分離を記載し得る。試料の少なくとも約５０％、好ましくは６０～７５％が単一のポリヌクレオチド配列および（直線状対共有結合的に閉じた）立体配座を見せるときに、ポリヌクレオチドは実質的に純粋であり得る。実質的に純粋なポリヌクレオチドは、典型的には核酸試料の約５０％、好ましくは６０～９０％重量／重量、より通常は約９５％を含み、好ましくは約９９％超純粋である。ポリヌクレオチドの純度または均質性は当分野において周知のいくつもの手段（例えば、試料のアガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動、その後にゲルを染色することによって単一のポリヌクレオチドバンドを可視化すること）によって表され得る。ある目的のためには、ＨＰＬＣまたは当分野において周知の他の手段を用いることによってより高い分解能が提供され得る。

【００５８】

用語「精製ポリペプチド」は、他の化合物（核酸、脂質、炭水化物、および他の蛋白質を含むが、これに限定されない）から分離されたポリペプチドを記載し得る。試料が単一のポリペプチド配列の少なくとも約５０％、好ましくは６０～７５％を含有するときに、ポリペプチドは実質的に純粋であり得る。実質的に純粋なポリペプチドは典型的には蛋白質試料の約５０％、好ましくは６０～９０％、より好ましくは９５～９９％重量／重量を含む。ポリペプチドの純度または均質性は当分野において周知のいくつもの手段（例えば試料のアガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動、その後に、ゲルを染色することによってポリペプチドバンドを可視化すること）によって表され得る。ある目的のためには、ＨＰＬＣまたは当分野において周知の他の手段を用いることによってより高い分解能が提供され得る。

【００５９】

本明細書において、表現「ヌクレオチド配列」はポリヌクレオチドまたは核酸を無偏的に指すために使用され得る。より正確には、表現「ヌクレオチド配列」は核酸（nucleic）材料自体を包含し、それゆえに具体的なＤＮＡまたはＲＮＡ分子を生化学的にキャラクタリゼーションする配列情報（すなわち、４つの塩基文字から選ばれる連続した文字）に

制限されない。

【００６０】

用語「核酸」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」は本明細書において交換可能に用いられ、一本鎖または二本鎖形態の１ヌクレオチド超のＲＮＡ、ＤＮＡ、またはＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド配列を含む。用語「ヌクレオチド」は、一本鎖または二本鎖形態のいずれかの長さのＲＮＡ、ＤＮＡ、またはＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド配列を含む分子を記載するための形容詞として本明細書において用いられ得る。用語「ヌクレオチド」は、本明細書においては個々のヌクレオチドまたはヌクレオチドの変形を言う名詞としてもまた用いられ得、分子またはより大きい核酸分子中の個々の単位を意味し、プリンまたはピリミジン、リボースまたはデオキシリボース糖部分、およびリン酸基またはホスホジエステル連結部を、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド中のヌクレオチドの場合には含む。用語「ヌクレオチド」は、本明細書においては以下の改変の少なくとも１つを含む「改変ヌクレオチド」を包含するためにもまた用いられ得る。（ａ）代替的な連結基、（ｂ）プリンの類縁形態、（ｃ）ピリミジンの類縁形態、または（ｄ）類縁糖。類縁の連結基、プリン、ピリミジン、および糖の例は、例えばＰＣＴ特許出願公開第ＷＯ９５／０４０６４号参照。ポリヌクレオチド配列はいずれかの公知の方法（合成、組み換え、エクスビボ生成、またはその組み合わせを含む）、さらには当分野において公知のいずれかの精製法を用いて調製され得る。

【００６１】

用語「プロモーター」は、コード配列または機能性ＲＮＡの発現をコントロールする能力があるＤＮＡ配列を言う。一般的に、コード配列はプロモーター配列の３’に位置し得る。プロモーターはそれらの全体が固有の遺伝子に由来し得、または天然に見いだされる異なるプロモーターに由来する異なるエレメント同士から構成され得、または合成ＤＮＡセグメントさえも含み得る。異なるプロモーターが、異なる組織もしくは細胞型または発生の異なるステージにおいて、あるいは異なる環境または生理学的条件に応答して、遺伝子の発現を導き得るということは当業者によって理解される。大部分の時に大部分の細胞型中で遺伝子を発現させるプロモーターは、普通には「構成的プロモーター」と言われる。特異的な細胞型中で遺伝子を発現させるプロモーターは、普通には「細胞特異的プロモーター」または「組織特異的プロモーター」と言われる。発生または細胞分化の特異的なステージで遺伝子を発現させるプロモーターは、普通には「発生特異的プロモーター」または「細胞分化特異的プロモーター」と言われる。プロモーターを誘導する因子、生体分子、薬品、リガンド、光、または同様のものによる細胞の暴露または処理後に誘導されて遺伝子を発現させるプロモーターは、普通には「誘導性プロモーター」または「制御型プロモーター」と言われる。大部分の場合には制御配列の厳密な境界は完全に画定されてはいないので、異なる長さのＤＮＡ断片同士が同一のプロモーター活性を有し得るということはさらに認識される。

【００６２】

「プロモーター配列」は、細胞中でＲＮＡポリメラーゼに結合して下流（３’方向）のコード配列の転写を開始させる能力があるＤＮＡ制御領域であり得る。本開示の主題を定義する目的のために、プロモーター配列はその３’末端において転写開始部位と接しており得、上流（５’方向）に延びて、バックグラウンドを超える検出可能なレベルの転写を開始するために必要な塩基またはエレメントの最小数を含む。プロモーター配列内には、転写開始部位（便利には例えばヌクレアーゼＳ１によるマッピングによって画定される）、さらにはＲＮＡポリメラーゼの結合の原因の蛋白質結合ドメイン（コンセンサス配列）が見いだされるであろう。

【００６３】

コード配列は細胞内で転写および翻訳コントロール配列の「コントロール下」にあり得、ＲＮＡポリメラーゼがコード配列をｍＲＮＡに転写し、これは次にトランスＲＮＡスプライシングされて（コード配列がイントロンを含有する場合）、コード配列によってコードされる蛋白質に翻訳され得る。

【００６４】
「転写および翻訳コントロール配列」は、ＤＮＡ制御配列、例えばプロモーター、エンハンサー、ターミネーター、および同様のものであり、宿主細胞中でのコード配列の発現を可能にする。真核細胞においては、ポリアデニル化シグナルはコントロール配列である。
【００６５】
用語「作動可能に連結」は、１つの機能がもう一方によって影響され得るような、単一の核酸断片上の核酸配列同士の結びつきを言う。例えば、それがコード配列の発現に影響する能力がある（すなわち、コード配列がプロモーターの転写コントロール下にあり得る）ときには、プロモーターはコード配列に作動可能に連結され得る。コード配列は、センスまたはアンチセンスの向きで制御配列に作動可能に連結され得る。
【００６６】
用語「３’非コード配列」または「３’非翻訳領域（ＵＴＲ）」はコード配列の下流（３’）に位置するＤＮＡ配列を言い、ポリアデニル化［ポリ（Ａ）］認識配列とｍＲＮＡプロセシングまたは遺伝子発現に影響する能力がある制御シグナルをコードする他の配列とを含み得る。ポリアデニル化シグナルは、ｍＲＮＡ前駆体の３’末端へのポリアデニル酸トラクトの付加に影響することによって通常はキャラクタリゼーションされる。
【００６７】
用語「制御領域」は、第２の核酸配列の発現を制御する核酸配列を意味する。制御領域は、天然に特定の核酸を発現する原因となる配列（相同領域）を含み得、または異なる蛋白質もしくは合成蛋白質（異種領域）さえも発現する原因となる異なる起源の配列を含み得る。特に、配列は、遺伝子の転写を特異的または非特異的に、誘導的または非誘導的に促進または抑制する、原核、真核、もしくはウィルス遺伝子の配列または由来する配列であり得る。制御領域は複製起点、ＲＮＡスプライシング部位、プロモーター、エンハンサー、転写終結配列、およびシグナル配列を含み、それらは標的細胞の分泌経路にポリペプチドを導く。
【００６８】
用語「プライマー」は、標的ヌクレオチド配列に相補的であり得、標的ヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーションに用いられ得る特異的なオリゴヌクレオチド配列を意味する。プライマーは、ＤＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡポリメラーゼ、または逆転写酵素によって触媒されるヌクレオチド重合の開始点として働く。
【００６９】
用語「プローブ」は、試料中に存在する特異的なポリヌクレオチド配列を同定するために用いられ得る画定された核酸セグメントを意味し、核酸セグメントは、同定されるべき特異的なポリヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。
【００７０】
用語「塩基対形成」および「ワトソン・クリック塩基対形成」は本明細書において交換可能に用いられ、二重螺旋ＤＮＡ中に見いだされるものと同様にそれらの配列同一性ゆえに互いに水素結合し得るヌクレオチドを言い、チミンまたはウラシル残基が２つの水素結合によってアデニン残基と連結され、シトシンおよびグアニン残基が３つの水素結合によって連結される（Berg et al. (2011) Biochemistry, 7th revised international ed., ISBN-10:1429276355参照）。
【００７１】
用語「相補的」または「その相補物」は、相補的な領域の全体に渡って別の指定されたポリヌクレオチドとワトソン・クリック塩基対形成を形成する能力があるポリヌクレオチドの配列を言うために本明細書において用いられる。本開示の主題の目的のためには、第１のポリヌクレオチド中の各塩基がその相補的な塩基と対形成するときに、第１のポリヌクレオチドは第２のポリヌクレオチドに相補的だと判断される。相補的な塩基同士は一般的にＡおよびＴ（またはＡおよびＵ）またはＣおよびＧである。「相補物」は、「相補的なポリヌクレオチド」、「相補的な核酸」、および「相補的なヌクレオチド配列」からの

同意語として本明細書において用いられ得る。これらの用語はポリヌクレオチドの対に適用され、２つのポリヌクレオチドが実際に結合するであろう条件のいずれかの特定のセットではなく、もっぱらそれらの配列に基づく。

【００７２】

本開示の主題は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドのバリアントおよび断片にもまた関する。ポリヌクレオチドのバリアントは、用語が本明細書において用いられ得る場合には、参照ポリヌクレオチドと異なるポリヌクレオチドである。ポリヌクレオチドのバリアントは天然に存在するバリアント（例えば天然に存在するアレルバリアント）であり得るか、または天然に存在することが公知でないバリアントであり得る。ポリヌクレオチドのかかる天然に存在しないバリアントは変異導入技術（ポリヌクレオチド、細胞、または生物に適用されるものを含む）によってつくられ得る。一般的に、違いは限定されており、その結果、参照およびバリアントのヌクレオチド配列は総合的に密に類似であり、多くの領域において同一である。

【００７３】

本開示の主題に従うポリヌクレオチドのバリアントは、参照ポリヌクレオチドの少なくとも約８つの一続きのヌクレオチドのいずれかのポリヌクレオチド断片または参照ポリヌクレオチドに少なくとも約７０％同一、例えば少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一、好ましくは参照ポリヌクレオチドの少なくとも約８つの一続きのヌクレオチドのいずれかのポリヌクレオチド断片または参照ポリヌクレオチドに少なくとも約９９．５％同一、より好ましくは少なくとも約９９．８％同一であるヌクレオチド配列を含むが、これに限定されない。

【００７４】

バリアントポリヌクレオチド中に存在するヌクレオチドの変化はサイレントであり得、これはそれらがポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸を変えないということを意味する。しかしながら、ヌクレオチドの変化は、参照配列によってコードされるポリペプチド中のアミノ酸置換、追加、欠失、融合、および末端欠失をもまたもたらし得る。置換、欠失、または追加は１つまたは２つ以上のヌクレオチドを含み得る。バリアントはコードもしくは非コード領域または両方が変わっており得る。コード領域の変更は保存的または非保存的なアミノ酸置換、欠失、または追加を作り得る。

【００７５】

特に好ましい態様は、成熟膜結合蛋白質と実質的に同じ生体機能および／または活性を保持するポリペプチドをポリヌクレオチドがコードするものである。

【００７６】

ポリヌクレオチド断片は、参照核酸と実質的に同一のヌクレオチド配列を共通部分に渡って含む、参照核酸と比べて減少した長さのヌクレオチド配列を言う。本開示の主題に従うかかる核酸断片は、適切なところでは、それが構成要素であり得るより大きいポリヌクレオチド中に含まれ得る。かかる断片は、本開示の主題に従って、長さが核酸の少なくとも約６、８、９、１０、１２、１５、１８、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３９、４０、４２、４５、４８、５０、５１、５４、５７、６０、６３、６６、７０、７５、７８、８０、９０、１００、１０５、１２０、１３５、１５０、２００、３００、５００、７２０、９００、１０００、または１５００個の一続きのヌクレオチドの範囲であるオリゴヌクレオチドを含むか、またはその代わりにそれからなる。

【００７７】

かかる断片は「自立して」おり得、すなわち他のポリヌクレオチドの一部ではないかもしくはそれと融合していないか、または、それらは、それらが一部もしくは領域を形成する単一のより大きいポリヌクレオチド内に含まれ得る。実際に、これらの断片のいくつかは単一のより大きいポリヌクレオチド内に存在し得る。

【００７８】

任意に、かかる断片は、長さが少なくとも約８、１０、１２、１５、１８、２０、２５

、３５、４０、５０、７０、８０、１００、２５０、５００、または１０００ヌクレオチドの一つながりのスパンからなり得るか、または本質的になり得る。

【００７９】

本明細書に記載される場合、単離、精製、および組み換えポリペプチドは、参照配列の少なくとも約６アミノ酸、好ましくは少なくとも約８～１０アミノ酸、より好ましくは少なくとも約１２、１５、２０、２５、３０、４０、５０、または１００アミノ酸の一つながりのスパンを含み得る。他の好ましい態様において、アミノ酸の一つながりのストレッチは変異または機能上の変異の部位を含み、ポリペプチド配列中のアミノ酸の欠失、追加、スワッピング、または末端欠失を含む。

【００８０】

ポリペプチドは、ヒトもしくは哺乳類組織試料から単離またはヒトもしくは哺乳類遺伝子から発現され得る。ポリペプチドは当分野において公知のルーチン的な発現法によってつくられ得る。所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、いずれかの便利な宿主にとって好適な発現ベクター中にライゲーションされ得る。真核および原核宿主システムが両方とも組み換えポリペプチドを形成するために用いられ、より普通のシステムのいくつかの概要が本明細書において提供される。ポリペプチドはリシスされた細胞からまたは培養培地から単離され得、その意図される使用に必要とされる程度まで精製され得る。精製は当分野において公知のいずれかの技術、例えば差別的な抽出、塩分画、クロマトグラフィー、遠心分離、および同様のものによってであり得る（例えばAbbondanzo et al. (1993) Methods in Enzymology, Academic Press, New York. pp. 803-823参照）。

【００８１】

加えて、より短い蛋白質断片は化学合成によって作られ得る。その代わりに、蛋白質はヒトまたは非ヒト動物の細胞または組織から抽出される。蛋白質を精製するための方法は当分野において公知であり、粒子を破壊するための界面活性剤またはカオトロピック剤の使用、その後の例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、密度に従った沈降、およびゲル電気泳動によるポリペプチドの差別的な抽出および分離を含む。

【００８２】

ポリペプチドを発現するために参照ｃＤＮＡが用いられ得る。発現されるべきポリペプチドをコードする核酸は、従来のクローニングテクノロジーを用いて発現ベクター中のプロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、発現ベクター中の膜結合ポリペプチドはポリペプチドの全コード配列またはその部分を含み得る。例えば、インサートは膜結合ポリペプチドの少なくとも約１０個の一続きのアミノ酸を含むポリペプチドをコードし得る。

【００８３】

用語「パーセント同一性」は、当分野において公知の通りであり、２つもしくは３つ以上のポリペプチド配列または２つもしくは３つ以上のポリヌクレオチド配列間の関係であり得、配列を比較することによって特定される。当分野において、「同一性」は、適宜、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の配列関連性の程度をもまた意味し、かかる配列のストリング間のマッチによって特定される。「同一性」および「類似性」は公知の方法によって直ちに計算され得、Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, New York (1988)、Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, New York (1993)、Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, New Jersey (1994)、Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987)、およびSequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Stockton Press, New York (1991)に記載されているものを含むが、これに限定されない。同一性を特定するための好ましい方法は、試験された配列間のベストマッチを与えるように設計される。同一性および類似性を特定するための方法は公に利用可能なコンピュータプログラムに編まれている。配列アラインメントおよびパーセント同一

性計算は、LASERGENEバイオインフォマティクスコンピューティングスイート(DNASTAR Inc., Madison, Wis.)のMegalignプログラムを用いて実施され得る。配列のマルチプルアラインメントは、アラインメントのClustal法（Higgins and Sharp (1989) CABIOS. 5:151-153）を用いてデフォルトパラメータ（ペアワイズアラインメントのためのデフォルトパラメータを含む）によって実施され得る。

【００８４】

用語「配列分析ソフトウェア」は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の分析にとって有用であり得るいずれかのコンピュータアルゴリズムまたはソフトウェアプログラムを言う。「配列分析ソフトウェア」は市販または独立して開発され得る。典型的な配列分析ソフトウェアはプログラムのＧＣＧスイート（Wisconsin Package バージョン 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wis.）、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸ（Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410、およびＤＮＡＳＴＡＲ（DNASTAR, Inc., Madison, Wis.）を含むであろうが、これに限定されない。本明細書の文脈においては、配列分析ソフトウェアが分析に用いられるところでは、別様に指定されない限り、分析の結果は参照されるプログラムの「デフォルト値」に基づくであろうということが理解されよう。本明細書において用いられる場合、「デフォルト値」は、第１に初期化されたときにソフトウェアと一緒に元々読み込まれる値またはパラメータのいずれかのセットを意味するであろう。

【００８５】

膜結合蛋白質

用語「膜結合蛋白質」および「膜結合ポリペプチド」は、シングルおよびマルチプルパス膜結合蛋白質両方（例えばヒト膜結合蛋白質）を言うために本明細書において交換可能に用いられる。ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、さらにはかかるポリペプチドを含む融合ポリペプチドもまた一部を形成する。本開示の主題はヒトからの膜結合ポリペプチドを実現し、所与の膜結合ポリペプチドまたはそのバリアントもしくは断片の参照アミノ酸配列からなる、それから本質的になる、またはそれを含む単離または精製された膜結合ポリペプチドを含む。

【００８６】

１つの態様において、膜結合蛋白質はＣＤ４であり得、これは単一のＴＭドメインを有する古典的なＩ型膜蛋白質である。ＣＤ４はＴリンパ球の良くキャラクタリゼーションされた膜糖蛋白質であり、主要組織適合性複合体クラスＩＩ抗原と相互作用し、ヒト免疫不全ウィルスの受容体でもまたある（Carr et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:21286-95）。

【００８７】

別の態様において、膜結合蛋白質はＧＰＲ７７、マルチスパンＧ蛋白質共役受容体（ＧＰＣＲ）膜蛋白質であり得る。ＧＰＲ７７は自然免疫応答の補体システムに関与しており、カノニカルなリガンドが同定されている（すなわち補体成分Ｃ５ａ）（Cain & Monk (2002) J. Biol. Chem. 277:7165-9）。

【００８８】

追加の例示的な膜結合蛋白質はＧＰＣＲ（例えば、アドレナリン受容体、アンジオテンシン受容体、コレシストキニン受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体、ニューロテンシン受容体、ガラニン受容体、ドーパミン受容体、オピオイド受容体、セロトニン（erotonin）受容体、ソマトスタチン受容体など）、イオンチャネル（ニコチン性アセチルコリン受容体、ナトリウムおよびカリウムチャネルなど）、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニル酸シクラーゼ、増殖因子およびホルモンの受容体（上皮増殖因子（ＥＧＦ）受容体）、ならびに他の膜結合蛋白質を含むが、これに限定されない。かかる蛋白質の変異体または改変もまた用いられ得る。例えば、ＧＰＣＲのいくつかの単一または複数の点変異は機能を保持し、疾患に関与し得る（例えばStadel et al. (1997) Trends in Pharmocological Review 18:430-437参照）。

【００８９】

１つの態様において、組み換えビリオンアレイ内の複数個の組み換えビリオンのエンベロープは、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する異種膜結合蛋白質の１つの種類のみを含む。別の態様において、エンベロープは、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する異種膜結合蛋白質の１つの種類よりも多くを含む。例えば、いくつかのＧＰＣＲはそれらの生体機能のためにはヘテロ二量体化する（Angers et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:3684-3689）。１つの態様において、組み換えビリオンアレイの１つの位置の複数個の組み換えビリオンの１つまたは２つ以上のエンベロープによって含まれる膜結合蛋白質は、組み換えビリオンアレイの１つまたは２つ以上の別個の位置の複数個の組み換えビリオンの１つまたは２つ以上のエンベロープによって含まれる膜結合蛋白質と異なる。したがって、別の態様においては、複数個の異なる膜結合蛋白質が組み換えビリオンアレイの別個の位置に存在し得る。いくつかの態様において、組み換えビリオンアレイは少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または１００個の異なる膜結合蛋白質を含む。他の態様において、組み換えビリオンアレイは約10^3個の異なる膜結合蛋白質よりも多くまたは約10^4個の異なる膜結合蛋白質よりも多くを含み、さらには任意に約10^5個の異なる膜結合蛋白質よりも多くを含み得る。

【００９０】

別の態様においては、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する異種膜結合蛋白質の１つの種類よりも多くをエンベロープが含み得るが、蛋白質同士は関連している。したがって、１つの態様において、エンベロープによって含まれる２つまたは３つ以上の異なる膜結合蛋白質は同じ蛋白質ファミリーのメンバーである。異なる膜結合蛋白質同士は機能的に関連し得るか、または単に機能的に関連すると疑われ得る。別の態様において、固定化された膜結合蛋白質の機能は不明であり得、組み換えビリオンアレイの別個の位置の異なる膜結合蛋白質同士が構造もしくは配列の類似性を共有するか、または単純に構造もしくは配列の類似性を共有することを疑われる。

【００９１】

別の代替的な態様においては、アレイのマイクロスポットの少なくとも１つまたはそれぞれが、問題の異種膜結合蛋白質の同じ種類を異なるバージョンで含む。例えば、アレイのマイクロスポットの少なくとも１つまたはそれぞれは、問題の同じ蛋白質の異なるバリアント（すなわち、異なる点変異、欠失、置換、および同様のものを有する）を含み、例えば、アレイのマイクロスポットの少なくとも１つまたはそれぞれが同じ異種膜結合蛋白質の異なるバリアントを含む。もたらされるアレイは異種膜結合蛋白質の構造および機能の関係を体系的に検討するために用いられ得る。

【００９２】

別の態様において、アレイは実質的に同一なマイクロスポット（例えば、異種膜結合蛋白質の同じ種類を含むマイクロスポット）であり得るか、または実質的に同一なマイクロスポットのシリーズを含み得るが、これが使用中には異なるアナライト（標的）によって処理される。例えば、アレイは例えば１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、または５１個以上のマイクロスポットの「サブアレイ」を含み得、少なくとも１つのまたは各マイクロスポットが異なる膜結合蛋白質を含み、サブアレイはより大きいアレイの一部として複数回反復される。

【００９３】

別の態様においては、１つのマイクロスポットの異種膜結合蛋白質は別のマイクロスポットのものと異なり得るが、蛋白質同士は関連しており得る。例えば、１つの態様において、２つの異なる異種膜結合蛋白質は同じ蛋白質ファミリーのメンバーである。本発明アレイ上の異なる異種膜結合蛋白質同士は機能的に関連し得るか、または単に機能的に関連すると疑われ得る。しかしながら、別の態様においては、異種膜結合蛋白質の機能は不明であり得、アレイの異なるマイクロスポット上の異なる異種膜結合蛋白質同士は構造もしくは配列の類似性を共有するか、または構造もしくは配列の類似性を共有すると単純に疑

われる。その代わりに、異種膜結合蛋白質は蛋白質ファミリーの異なるメンバーの断片であり得る。さらなる態様において、異種膜結合蛋白質同士は薬理学的および生理学的分布または役割の類似性を共有する。

【００９４】

組み換えビリオン

組み換えビリオンは、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する複数個の異種膜結合蛋白質を含むエンベロープを含み得る。ウィルスは、生物の生細胞内でのみ複製し得る小さい感染性因子であり得る。ウィルス粒子はビリオンとしてもまた公知であり、典型的にはいくつかのパーツ、１）ＤＮＡまたはＲＮＡからつくられる遺伝物質、２）遺伝物質を守る蛋白質コート（典型的にはカプシドと呼ばれる）、および、いくつかの場合には、３）それらが細胞の外側にあるときに蛋白質コートを囲む脂質のエンベロープ、を含む。

【００９５】

アレイへの使用のためには、組み換えビリオンは、実施例に示されている通りに、または組み換えビリオンをつくる他の方法によって、多くの標準的な研究室マニュアル、例えばDavis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986)およびSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に記載されている通りつくられ得る。類似の方法は、本明細書に記載される組み換えビリオンをつくる方法において問題の異種遺伝子を導入するために用いられる。例えば、組み換えビリオンはＤＮＡコトランスフェクション後の相同組み換えを用いて構築され得る。細胞は問題の遺伝子を含有する少なくとも２つの異なるウィルスによってコトランスフェクションされ得、仔ウィルスプラークが精製され得る。組み換えビリオンの正しい遺伝子構成の最終的な検証は、核酸に対するプローブを用いるＤＮＡハイブリダイゼーション研究によって検証され得る。異種膜結合蛋白質をコードする異種核酸配列はゲノムＤＮＡライブラリーなどの天然のソースから標準的なクローニングおよびスクリーニング技術を用いて得られるか、または周知のおよび市販の技術を用いて合成され得る。

【００９６】

１つの態様において、異種膜結合蛋白質はヒト膜結合蛋白質であり、組み換えビリオンは組み換え単純ヘルペスウィルス（ＨＳＶ）ビリオン、例えば単純ヘルペスウィルス１型（ＨＳＶ－１）または２型（ＨＳＶ－２）、例えばＨＳＶ－１である。ヘルペスウィルス科は比較的大きい複雑なゲノムを有する有エンベロープ二本鎖ＤＮＡウィルスのファミリーの名前であり得、ヒト、馬、ウシ、マウス、豚、ニワトリ、亀、トカゲ、魚、および牡蠣などのいくつかの無脊椎動物さえも含む実に広範な脊椎動物宿主の核内で複製する。全てのヘルペスウィルスビリオンは４つの構造エレメントを有する。１）二本鎖ＤＮＡの単一の直線状分子のコア、２）カプシド蛋白質コート、３）ウィルス酵素を含む蛋白質カプシドとＤＮＡコアとの間の、非結晶質で場合によっては非対称な空間を含むテグメント、ならびに４）変更された宿主膜、さらにはいくつものウィルス糖蛋白質および他の膜蛋白質を含むエンベロープ。

【００９７】

ＨＳＶウィルスゲノムは良くキャラクタリゼーションされており、そのライフサイクルも同様であり、８０個超の固有のコードポリヌクレオチドの機能は大体定義されている。ＨＳＶゲノムは非常に良くキャラクタリゼーションされているので、遺伝子トランスファーベクターとしての使用のために直ちに操作される。これは、ＨＳＶ遺伝子が一般的に一つながりの直線状配列であるという事実によって増大する特徴である。なおその上に、その遺伝子のおおよそ半分は増殖にとって必須ではないので、トランスジェニック物質を収容するためにＨＳＶゲノムの大きいセグメントを欠失させる可能性が存在する（Glorioso et al. in Virus Vectors, Academic Press, New York (Kaplitt & Loewy, eds.) 1-23 (1995)）。

【００９８】

１次ＨＳＶ感染は宿主細胞中にウィルスを導入することによって始まり、２つの別々のステージ（細胞表面へのウィルスの取り付きおよび細胞膜とのウィルスエンベロープの融合）を含むプロセスである。溶解感染の３つの別々の相において、ひとたびウィルスが細胞に侵入すると、それは核に輸送され得、そこでウィルスＤＮＡは放出および転写され得る。ＨＳＶ感染の取り付きおよび融合のステップは主としてウィルスエンベロープの成分によって媒介され、これは少なくとも約１０個の糖蛋白質（ｇＢ、ｇＣ、ｇＤ、ｇＥ、ｇＧ、ｇＨ、ｇＩ、ｇＪ、ｇＬ、およびｇＭ）と４つの非グリコシル化内在性膜蛋白質（U_L２０、U_L３４、U_L４５、およびU_L４９．５）とを含有する膜状構造である。糖蛋白質のうち、ｇＢ、ｇＤ、ｇＨ、およびｇＬは野生型ヘルペスウィルスがそれらの宿主細胞に感染するのに必須である一方で、残りはウィルスの取り付きまたは内在化にとって必須ではない。ＨＳＶ－１侵入に先立って、細胞膜上の露出されたグリコサミノグリカンへのｇＣおよびｇＢの結合を介してビリオンは細胞表面に吸着される。次にその対応する受容体の１つ（例えばヘルペスウィルス侵入メディエータ（ＨＶＥＭ）またはネクチン－１）とのｇＤの相互作用によって侵入プロセスが開始され得る。受容体結合はｇＤの立体配座の変化をもたらし、細胞膜とウィルスエンベロープとの間の融合のエフェクターとしての第４のエンベロープ糖蛋白質ｇＨおよびｇＢの活性化を誘発する。

【００９９】

１つの態様において、ＨＳＶ－１のＫＯＳ株は野生型ウィルスとして用いられ得る。

【０１００】

１つの態様において、組み換えビリオンは１つまたは２つ以上のトランスジーン発現カセット（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された発現のためのポリヌクレオチド。任意にポリアデニル化配列または他のプロセシング配列を含む）を含む。かかるトランスジーン発現カセットは１つまたは２つ以上の異種膜結合蛋白質をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【０１０１】

１つの態様において、組み換えビリオンアレイ中への使用のための組み換えＨＳＶ－１ビリオンは、ＨＳＶ－１プロモーター配列に作動可能に連結され得るＨＳＶ－１ゲノムの座に、異種膜結合蛋白質をコードするポリヌクレオチド配列をクローニングすることによって作られ得る。例えば、ポリヌクレオチド配列は異種膜結合蛋白質をコードする全長ヒトオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）であり得、異種膜結合蛋白質をコードするＯＲＦはｇＢ座にクローニングされて、強いｇＢプロモーターのコントロール下で発現され得る。

【０１０２】

別の態様において、組み換えビリオンアレイへの使用のための組み換えＨＳＶ－１ビリオンは、ＨＳＶ－１プロモーター配列に作動可能に連結され得るＨＳＶ－１ゲノムの座に、融合またはキメラ蛋白質をコードするポリヌクレオチド配列をクローニングすることによって作られ得、融合蛋白質はＨＳＶ－１エンベロープ蛋白質またはその断片に融合した（または取り付けられた）異種膜結合蛋白質を含む。例えば、ポリヌクレオチド配列は、ｇＣの膜貫通（ＴＭ）および細胞質ドメインをコードするヌクレオチド配列に融合した（または取り付けられた）異種膜結合蛋白質をコードする全長ヒトＯＲＦを含み得、融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド配列はｇＣ座にクローニングされて、ｇＣプロモーターのコントロール下で発現され得る（例えばDolter et al. (1993) J. Virol. 67:189-95; Kouvatsis et al. (2007) Virus Res. 123:40-9参照）。

【０１０３】

用語「融合」および「キメラ（chimeric）」または「キメラ（chimera）」は交換可能に用いられ、天然には一緒に繋がり合わさっていない２つもしくは３つ以上のポリペプチド配列を繋げ合わせることによって作出されたポリペプチドもしくは蛋白質、または天然には一緒に繋がり合わさっていない２つもしくは３つ以上のポリヌクレオチド配列を繋げ合わせることによって作出されたポリヌクレオチドもしくは遺伝子を言う。例えば、融合ポリペプチドをコードする単一の融合ポリヌクレオチドから融合ポリペプチドが発現され

得る。

【０１０４】

ＨＳＶ－１エンベロープ糖蛋白質は、ウィルス外表面との接触にとって好適にエンベロープ中に天然に位置している。したがって、組み換えビリオンアレイへの使用のためのキメラエンベロープ蛋白質は好ましくは固有の糖蛋白質を含み得る。ｇＢ、ｇＣ、およびｇＤはそれぞれ細胞表面へのウィルスの取り付きを媒介するので、組み換えビリオンアレイへの使用のためのキメラ蛋白質は例えばｇＢ、ｇＣ、および／もしくはｇＤ、またはその断片を含み得る。

【０１０５】

異種膜結合蛋白質を含むキメラ蛋白質は他の固有ではないエレメントも同様に含み得る。例えば、異種膜結合蛋白質は、リンカーまたはスペーサーポリペプチドに取り付けられたキメラ蛋白質中に組み込まれ得る。かかるスペーサーは、例えば、総合的な蛋白質構造をあまり撹乱することなしに蛋白質に異種膜結合蛋白質が追加されることをゆるし得る。

【０１０６】

組み換えＨＳＶビリオンは異種遺伝子（つまりＨＳＶゲノム中に天然に存在するものより他の遺伝子）を持つように改変され得る。用語「異種遺伝子」は、問題の細胞または生物にとって固有でない（すなわち外来の）いずれかの遺伝子、例えばＨＳＶにとって固有でない遺伝子を言う。異種遺伝子は野生型遺伝子のいずれかのアレルバリアントであり得るか、または変異体遺伝子であり得る。同様に、「異種蛋白質」または「異種ポリペプチド」は、問題の細胞または生物にとって固有でない（すなわち外来の）いずれかの蛋白質またはポリペプチド、例えばＨＳＶにとって固有でない蛋白質またはポリペプチドであり得る。

【０１０７】

例えばＨＳＶ配列によって挟まれている異種遺伝子を持つプラスミドベクターによるＨＳＶ株の相同組み換えによって、異種遺伝子がＨＳＶゲノム中に挿入され得る。異種遺伝子は好適なプラスミドベクター中に導入されて、宿主細胞中に導入され得、宿主細胞がウィルスに感染させられて、異種膜蛋白質を含むビリオンを作り得る。異種遺伝子は当分野において周知のクローニング技術を用いてＨＳＶ配列を含む好適なプラスミドベクター中に導入され得る。異種遺伝子はＨＳＶゲノム中にいずれかの位置で挿入され得るが、ただしウィルスは尚増殖し得、そのエンベロープは異種蛋白質を含むこととする。特定の態様において、異種遺伝子は内在性遺伝子の座に挿入され得、内在性遺伝子のプロモーターのコントロール下で発現され得る（例えば、ｇＢ座にクローニングされて、ｇＢプロモーターのコントロール下で発現されるか、またはｇＣ座にクローニングされて、ｇＣプロモーターのコントロール下で発現される）。

【０１０８】

異種遺伝子の転写される配列は、好ましくは、異種遺伝子の発現をゆるすコントロール配列に作動可能に連結され得る。ただしウィルスは尚増殖し得て、そのエンベロープは異種蛋白質を含むこととする。コントロール配列は、異種遺伝子の発現を許すプロモーターと転写の終結のためのシグナルとを含む。プロモーターは、選択されたビリオンにおいて機能的であるプロモーター（例えばＨＳＶ遺伝子のプロモーター）から選択され得る。

【０１０９】

いくつかの態様において、問題のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、ＨＳＶゲノム中のヘルペスウィルスｇＢまたはｇＣ遺伝子のコード領域と置き換わり得る。いくつかの態様において、問題のＯＲＦの発現はｇＢまたはｇＣプロモーターによって厳しくコントロールされ得る。いくつかの態様において、宿主中で少なくとも１つのまたは各組み換えウィルスによって作られるヒト蛋白質の量は約同じであり得る。いくつかのウィルスは、少なくとも１つのまたは各ビリオンへとアセンブリされるべきそれらのエンベロープ蛋白質のコピー数を厳しくコントロールする。ゆえに、ウィルスによって発現される蛋白質はビリオンあたりおおよそ同じコピー数を有し得る。

【０１１０】

いくつかの態様において、アレイ上にスポットされたビリオン中に存在する蛋白質の量は、アレイ上の１つまたは２つ以上の他のビリオンの１つまたは２つ以上の他の蛋白質の量と約同等であり得る。例えば、アレイ上にスポットされたビリオン中に存在する蛋白質の量は、アレイ上の１つまたは２つ以上の他のビリオン中の１つまたは２つ以上の他の蛋白質の量の約５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％であり得る。

【０１１１】

発現カセットは当業者に公知のルーチン的なクローニング技術を用いて構築され得る（例えばSambrook et al. (1989) Molecular Cloning - a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press参照）。なおその上に、特定の組み換えＨＳＶビリオンの構築が実施例に記載されている。

【０１１２】

いくつかの態様において、複数の遺伝子の発現が有利であり得る。かかる用途のためにはＨＳＶは特有に適切である。なぜなら、他のウィルスベクターシステムの限定されたパッケージング能力を有さないからである。それゆえに、複数の異種遺伝子がそのゲノム中に収容され得る。例えば、これが達成され得る少なくとも２つのやり方がある。例えば、１つの異種遺伝子よりも多くと、結びついたコントロール配列とが特定のＨＳＶ株中に導入され得る。反対向きに面したプロモーター（同じまたは異なるプロモーター）の対を用い、これらのプロモーターがそれぞれ上に記載されている通り異種遺伝子（同じまたは異なる異種遺伝子）の発現を駆動することもまた可能であろう。その代わりに、ＨＳＶゲノム中の複数の部位に異種遺伝子が挿入され得る。

【０１１３】

ＧＰＣＲなどの多くの膜蛋白質はヘテロ二量体またはヘテロ多量体として機能する。いくつかの態様において、それらの特定の膜蛋白質を発現するウィルスによる細胞のコンビナトリアル共感染を用いて、分子のこれらの種類を提示するビリオンが用いられ得る。作られたこれらのビリオンは、細胞中での共発現中に作られ得る複合体としてＧＰＣＲなどの両方の膜蛋白質を提示し得る。

【０１１４】

いくつかの態様において、マルチパス膜結合蛋白質、例えばＧＰＣＲおよびチャネルは、「ポジティブ・インサイド」ルールに基づいてそれらのトポロジーを逆転させるように遺伝子操作され得る。例えば、かかる遺伝子操作された膜蛋白質の細胞質ドメインは組み換えビリオン表面上にエクトドメインとして提示され得る。もたらされる組み換えウィルスは、これらの膜蛋白質の細胞質ドメインと相互作用する蛋白質または他の生体分子を同定するために用いられ得る。

【０１１５】

哺乳類、酵母、昆虫、および細菌発現システムは当分野において公知である。市販のベクターおよび発現システムは種々のサプライヤーから利用可能であり、Genetics Institute（Cambridge, Mass.）、Stratagene（La Jolla, Calif）、Promega（Madison, Wis. ）、およびInvitrogen（San Diego, Calif）を含む。所望の場合には、発現を増大させて妥当な蛋白質フォールディングを容易にするために、配列のコドンの文脈およびコドン対形成は、発現ベクターが導入され得る生物中での発現にとって最適化され得る。これはHatfield, et al., 米国特許第５，０８２，７６７号によって説明されている。

【０１１６】

好ましい態様において、本開示の主題は異種膜ポリペプチドをコードする組み換えＨＳＶ－１細菌人工染色体（ＢＡＣ）クローンに関する。ゲノムＤＮＡの大きい断片（１００～３００ｋｂ）を安定に維持するためにＢＡＣクローニングシステム（Shizuya et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:8794-8797）が開発された。

【０１１７】

１つの態様においては、糖蛋白質Ｂ遺伝子のリンカー挿入変異体を遺伝子操作した後に、プラスミドｐＫΔ４Ｂ（Cai et al. (1988) J. Mol. Biol. 201:575-88）が用いられ得

、ｇＢのアミノ酸４３～７１１をコードするＤＮＡ配列は欠失し、ＢｇｌＩＩ制限部位が追加されて蛋白質リーディングフレームを維持する（Cai et al. (1988) J. Mol. Biol. 201:575-88）。ｐＫΔ４Ｂプラスミドは例えばＸｈｏＩおよびＢｇｌＩＩによって消化され、antarticホスファターゼ（NEB）によって処理され、１～４３の全てのｇＢアミノ酸を欠失するが（ｇＢΔＳＳ）ｇＢプロモーター配列を保持するｐＫΔ４Ｂ（本明細書においてはプラスミドｐＫｇＢΔＳＳと言われる）から増幅されたＸｈｏＩ－ＢｇｌＩＩのＰＣＲ断片とライゲーションされ得る。７１１～７９６にわたるｇＢアミノ酸の配列が次にカセットＰＣＲ変異導入によってｐＫｇＢΔＳＳから欠失させられ、ＰＣＲ断片はＢｇｌＩＩ－ＢａｍＨ１としてｐＫｇＢΔＳＳにクローニングされ得、もたらされるプラスミドは本明細書においてはｐＫｇＢＰＲと言われる。異種膜結合蛋白質が次にプラスミドから、例えばUltimate ORFコレクション（Life Technologies）から増幅され得る。Ｖ５エピトープをコードする配列がリバースプライマー中に含まれ得る。最終的なｇＢプロモーターによって駆動される遺伝子プラスミドの配列分析はウィルスゲノム中への導入に先立ってなされ得、プラスミドは相同組み換えのためにＢａｍＨ１によって直線状化され得る。次に、マーカーレスキューおよびマーカートランスファーアッセイ、例えばＵＬ２８のマーカーレスキューおよび異種膜結合蛋白質が作動可能に連結されたｇＢプロモーター配列のマーカートランスファーが、Desaiら（Desai et al. (1994) Virology 204:312-22）に記載されている方法を用いて実施され得る。Ａ１．１細胞単層（ＵＬ２７およびＵＬ２８によって形質転換された細胞。Tengelsen et al. (1993) J. Virol. 67:3470-80）が、感染細胞ＤＮＡ（ＫΔ４ＢＸ）および直線状化されたプラスミドＤＮＡによって例えばリン酸カルシウム沈殿法を用いてコトランスフェクションされ得る。プラークが見え始めたときに細胞単層が採取され、任意に凍結／融解されてソニケーションされ、総計の仔ウィルスが力価測定され得る。組み換えウィルスはＤ６細胞（ＵＬ２７によって形質転換されている。Cai et al. (1987) J. Virol. 61:714-21）上のシングルプラーク精製によって単離され得、Ｄ６細胞株上での限界希釈によって追加のプラーク精製が行われ得る。

【０１１８】

別の態様においては、ＫＯＳ－ＢＡＣ３７ゲノム（Gierasch et al. (2006) J. Virol. Methods 135:197-206）がTOP10細胞（Stratagene）中にトランスファーされ得、ＨＳＶ－１エンベロープ蛋白質またはその断片（例えばｇＣ）に融合した異種膜結合蛋白質を含むキメラ融合蛋白質がウィルスゲノム中に導入され得る。Gene Bridges Red-ET法および提供されたプロトコールを用いた（Zhang et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18:1314-7）。例えば、ｇＣ相同配列によって囲まれたカナマイシンカセットが増幅されて、カナマイシン遺伝子がＫＯＳ－ＢＡＣ３７中に導入され、ｇＣ遺伝子を置き換え得る。カナマイシンプレート上で育つコロニーがストレプトマイシン感受性についてスクリーニングされ得、ｇＣ融合遺伝子はオーバーラップＰＣＲ法（例えば、表１に列挙されているプライマーを用いる）を用いてつくられ得、ｇＣ融合ポリヌクレオチドはRedETプライマー（例えば表１に列挙されている）を用いて増幅されて、カナマイシン遺伝子を置き換えるために用いられ得る。正しい融合ポリヌクレオチドを持つ成功した分離株はＰＣＲアッセによって同定され得、ＢＡＣゲノム中の挿入された遺伝子は感染性ウィルスの再構成に先立ってシーケンシングされ得る。糖蛋白質Ｃキメラ遺伝子融合物を持つＫＯＳバクミドはPureLink核酸精製キット（Life Technologies）を用いて調製され、バクミドＤＮＡはLipofectamine 2000試薬（Life Technologies）を用いてベロ細胞にトランスフェクションされ得る。プラーク形成によって、ｇＣ融合ポリペプチドを含む組み換えＨＳＶ－１ウィルスのワーキングストックを増幅および調製するために感染細胞ライセートが用いられる。

【０１１９】

したがって、異種遺伝子を発現する精製された組み換えＨＳＶビリオン（例えば組み換えＨＳＶ－１ビリオン）が宿主細胞を感染させるために用いられ、宿主細胞から放出された組み換えＨＳＶビリオンは、次に、本明細書において他所に記載される本開示のアレイの作製への使用のために（例えば、FASTスライド上への印刷のために）精製される。用語「精製される」は、他の化合物の存在を排除して絶対的な純度を見せる形態で材料が存在

することは要求しない。少なくとも約１桁、好ましくは２または３桁、より好ましくは４または５桁までの出発材料または天然の材料の精製が明白に考えられる。一例として、０．１％濃度から１０％濃度への精製は２桁である。

【０１２０】

１つの態様において、宿主細胞はベロ細胞、形質転換ベロ細胞株、またはヒト包皮線維芽細胞（ＨＦＴ）細胞である。しかしながら、ＨＳＶビリオン（例えばＨＳＶ－１ビリオン）の増殖の能力があるいずれかの宿主細胞が用いられ得る（例えば、シリアンハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ－２１）、ヒト胚性肺細胞（ＨＥＬ）、ヒト咽頭癌上皮細胞（Ｈｅｐ－２）、および同様のもの）。

【０１２１】

組み換えＨＳＶビリオン、例えば組み換えＨＳＶ－１ビリオンが好ましくあり得るが、他の有エンベロープウィルスもまた組み換えビリオンアレイに用いられ得る。本明細書において用いられる場合、有エンベロープウィルスはそれらの蛋白質カプシドを覆うウィルスエンベロープを有し、典型的にはリン脂質および蛋白質からなり、ウィルス糖蛋白質を含む。ＨＳＶ－１およびＨＳＶ－２に加えて、組み換えビリオンアレイへの使用のための追加の例示的な有エンベロープウィルスは以下のウィルスファミリーおよびウィルスを含み得るが、これに限定されない。レトロウィルス科（すなわちレンチウィルス亜科）、例えばヒト免疫不全ウィルス（ＨＩＶ）、フラビウィルス科、例えば黄熱ウィルス（ＹＦＶ）およびデングウィルスのようなフラビウィルス、Ｃ型肝炎ウィルス（ＨＣＶ）のようなヘパシウィルス、およびウシウィルス性下痢ウィルス（ＢＶＤＶ）のようなペスティウィルス、痘帯状疱疹ウィルス（ＶＺＶ）、サイトメガロウィルス（ＣＭＶ）、またはヒトヘルペスウィルス６型（ＨＨＶ－６）、ポックスウィルス科、例えばワクシニア、ヘパドナウィルス科、例えばＢ型肝炎ウィルス（ＨＢＶ）、コロナウィルス科、例えばＳＡＲＳ－ＣｏＶ、オルソミクソウィルス科、例えばインフルエンザウィルスＡ、Ｂ、およびＣ、トガウィルス科、アレナウィルス科、例えばアレナウィルス、ブニヤウィルス科、例えばプンタトロ、パラミクソウィルス科、例えばＲＳウィルス（ＲＳＶ）またはパラインフルエンザ－３ウィルス、ならびにラブドウィルス科。

【０１２２】

基板

アレイの基板は、組み換えビリオンマイクロスポットのパターンが存在し得る少なくとも１つの表面（すなわち、基板の表面と安定に結びついた複数個の組み換えビリオンマイクロスポット）を含み得る。１つの態様において、基板はガラス、例えばニトロセルロースによってコーティングされたガラス、例えばニトロセルロースコーティングスライド(すなわちFASTスライド)であり得る。

【０１２３】

他の態様において、基板はセラミック物質、ガラス、金属、結晶質材料、プラスチック、ポリマーまたはコポリマー、およびその組み合わせからなる群から選択される物質を含む。かかる基板は、例えば（準）貴金属、例えば金もしくは銀、ガラス材料、例えばソーダ石灰ガラス、パイレックス（登録商標）ガラス、ｖｙｃｏｒガラス、石英ガラス、金属もしくは非金属酸化物、ケイ素、リン酸一アンモウム、および他のかかる結晶質材料、遷移金属、プラスチックもしくはポリマー（樹状ポリマー、例えばポリ（塩化ビニル）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（ビニルアセテート－マレイン酸無水物）、ポリ（ジメチルシロキサン）モノメタクリレート、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンイミン、コポリマー、例えばポリ（ビニルアセテート－コ－マレイン酸無水物）、ポリ（スチレン－コ－マレイン酸無水物）、ポリ（エチレン－コ－アクリル酸）、もしくはこれらの誘導体を含む）、または同様のものを含むが、これに限定されない。

【０１２４】

基板は、アレイの意図される使用に依存して単純～複雑の範囲の種々の構成をとり得る。それゆえに、基板は総合的なスライドまたはプレート構成、例えば長方形状またはディ

スク状の構成を有し得る。標準的なマイクロプレート構成が用いられ得る。ある態様において、基板は長方形状の断面形状を有し得、約１０ｍｍ～２００ｍｍ、通常は約４０～１５０ｍｍ、より通常は約７５～１２５ｍｍの長さと、約１０ｍｍ～２００ｍｍ、通常は約２０ｍｍ～１２０ｍｍ、より通常は約２５～８０ｍｍの幅と、約０．０１ｍｍ～５．０ｍｍ、通常は約０．１ｍｍ～２ｍｍ、より通常は約０．２～１ｍｍの厚さとを有する。

【０１２５】

いくつかの態様において、表面は平滑または実質的に平面状であり得るか、または凸凹（例えば窪みもしくは隆起）を有し得る。さらに、マイクロスポットのパターンが存在し得る表面は、望ましく表面の特性を改変するために働く１つまたは２つ以上の異なる化合物層またはコーティングによって改変され得る。

【０１２６】

したがって、アレイは、組み換えビリオンマイクロスポットを含む基板の表面の全体または部分の上にコーティング材料をさらに含み得る。好ましくは、コーティング材料は、基板に対する組み換えビリオンマイクロスポットの親和性を増大させる。

【０１２７】

１つの態様において、コーティング材料はニトロセルロースであり得る。他の態様において、コーティング材料はシラン、チオール、ジスルフィド、またはポリマーであり得る。材料がチオールであり得るときには、基板は金コーティング表面を含み得、ならびに／またはチオールは疎水性および親水性部分を含む。コーティング材料がシランであり得るときには、基板はガラスを含み、シランは、例えばヒドロキシル、カルボキシル、リン酸、グリシドキシ、スルホン酸、イソシアネート、チオール、またはアミノ基を含む末端部分を示し得る。

【０１２８】

代替的な態様において、コーティング材料は共有結合したリンカー部分を有する誘導体化された単層または多層であり得る。単層コーティング（例えば長鎖炭化水素部分を含む）はチオール（例えばチオアルキル）、ジスルフィド、またはシラン基を有し得、これらが基板への化学的または物理化学的結合を作る。基板への単層の取り付けは非共有結合的な相互作用によってまたは共有結合的な反応によって達成され得る。

【０１２９】

１つの態様において、チオールはチオアルキル化合物であり得、チオアルキル酸、チオアルキルアルコール、チオアルキルアミン、および水素含有チオアルキル化合物からなる群から選択される。例えば、チオアルキル化合物はチオアルキル酸、例えば１６－メルカプトヘキサデカン酸であり得る。

【０１３０】

基板への取り付け後に、単層は少なくとも１つの反応性の官能基を含み得る。単層コーティング上の反応性の官能基の例は、カルボキシル、イソシアネート、ハロゲン、アミン、またはヒドロキシル基を含むが、これに限定されない。１つの態様において、単層コーティング上のこれらの反応性の官能基は標準的な化学技術によって活性化させられて、単層コーティング上で対応する活性化された官能基になり得る（例えば、カルボキシル基から酸無水物または酸ハロゲン化物などへの変換）。基板上の単層コーティングの活性化された官能基は酸無水物、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、または他の普通の活性化されたエステルもしくは酸ハロゲン化物（リンカー化合物の末端アミノ基への共有結合的なカップリングのため）であり得るが、これに限定されない。別の態様において、単層コーティング上の活性化された官能基は、リンカー化合物の末端ヒドロキシル基とのカップリングのための酸無水物誘導体、リンカー化合物の酸化糖残基上でのカップリングのためのヒドラジン誘導体、またはリンカー化合物のチオール基への共有結合的な取り付けのためのマレイミド誘導体であり得るが、これに限定されない。誘導体化された単層コーティングを作るためには、単層コーティング上の少なくとも１つの末端カルボキシル基が第１に活性化されて酸無水物基になり、次にリンカー化合物と反応させられ得る。その代わりに、単層コーティング上の反応性のアミノ基との共有結合的なカップリングのための活

性化された官能基（例えば、これに限定されないが、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、酸ハロゲン化物、酸無水物、およびイソシアネート）を有するリンカー化合物と、単層コーティング上の反応性の官能基が反応させられ得る。

【０１３１】

１つの態様において、リンカー化合物は１つの末端官能基、スペーサー領域、および膜結合蛋白質接着領域を有する。活性化された単層コーティング上の活性化された官能基を反応するための末端官能基は例えばハロゲン、アミノ、ヒドロキシル、またはチオール基であるが、これに限定されない。ある態様において、末端官能基はカルボン酸、ハロゲン、アミン、チオール、アルケン、アクリレート、酸無水物、エステル、酸ハロゲン化物、イソシアネート、ヒドラジン、マレイミド、およびヒドロキシル基からなる群から選択される。

【０１３２】

スペーサー領域はオリゴ／ポリエーテル、オリゴ／ポリペプチド、オリゴ／ポリアミド、オリゴ／ポリアミン、オリゴ／ポリエステル、オリゴ／多糖、ポリオール、複数の荷電種、またはいずれかの他のその組み合わせを含み得るが、これに限定されない。例は、エチレングリコールのオリゴマー、ペプチド、グリセロール、エタノールアミン、セリン、イノシトールなどを含むが、これに限定されず、膜結合蛋白質がリンカー部分の接着領域に自由に接着するようなものである。スペーサー領域は天然に親水性であり得る。１つの態様において、スペーサーはｎ個のオキシエチレン基を有し、ｎは２～２５であり得る。他の態様において、リンカー化合物の膜接着領域または「疎水性尾部」は疎水性または両親媒性であり得、直鎖または分岐鎖アルキル、アルキニル、アルケニル、アリール、アラルキル（araalkyl）、ヘテロアルキル、ヘテロアルキニル、ヘテロアルケニル、ヘテロアリール、またはヘテロアリールアルキルを有する。別の態様において、膜結合蛋白質接着領域はC_{10}～C_{25}直鎖または分岐鎖アルキルまたはヘテロアルキル疎水性尾部を含む。最も好ましい態様において、疎水性尾部はC_{10}～C_{20}直鎖または分岐鎖アルキル断片を含む。

【０１３３】

別の態様において、リンカー化合物は、末端官能基を１つの末端に、スペーサー、リンカー／膜結合蛋白質接着領域、および親水性基を別の末端に有する。リンカー化合物の１つの末端の親水基は単一の基または複数の親水基の直鎖もしくは分岐鎖であり得、単一のヒドロキシル基または複数のエチレングリコール単位の鎖を含むが、これに限定されない。

【０１３４】

いくつかの態様において、本発明は、膜結合蛋白質抗体のライブラリーと基板とを含むアレイ(またはマイクロアレイ)を提供する。いくつかの態様において本発明は、膜結合蛋白質を発現または含有するビリオンのライブラリーと基板とを含むアレイ(またはマイクロアレイ)を提供する。いくつかの態様において、少なくとも１つのまたは各膜結合蛋白質抗体またはビリオンは基板上に固定化され得る。膜結合蛋白質抗体またはビリオンは基板上に可逆的または不可逆的に固定化され得る。基板は平面状または粒子であり得、固体または多孔質材料を含み得る。基板は有機もしくは無機、生体もしくは非生体、またはこれらの材料のいずれかの組み合わせであり得る。

【０１３５】

１つの態様において、基板は透明または半透明であり得る。パッチがある基板の表面の部分は好ましくは平板で強固または半強固であり得る。多数の材料が基板としての使用にとって好適である。基板はケイ素、シリカ、ガラス、またはポリマーを含み得る。たとえば、基板はケイ素、シリカ、石英、ガラス、ＣＰＧ、カーボン、アルミナ、二酸化チタン、ゲルマニウム、窒化ケイ素、ゼオライト、およびヒ化ガリウムからなる群から選択される材料を含み得る。多くの金属、例えば金、白金、アルミニウム、銅、チタン、およびそれらの合金もまたアレイの基板の選択肢である。加えて、多くのセラミックおよびポリマーもまた基板として用いられ得る。基板として用いられ得るポリマーは以下を含むが、こ

れに限定されない。ポリスチレン、ポリ（テトラ）フルオロエチレン（fluorethylene）、（ポリ）ビニリデンジフルオリド、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、ポリビニルエチレン、ポリエチレンイミン、ポリ（エーテルエーテル）ケトン、ポリオキシメチレン（ＰＯＭ）、ポリビニルフェノール、ポリラクチド、ポリメタクリルイミド（ＰＭＩ）、ポリアルケンスルホン（ＰＡＳ）、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリジメチルシロキサン、ポリアクリルアミド、ポリイミド、ブロックコポリマー、およびEupergit（登録商標）。フォトレジスト、重合Langmuir-Blodgettフィルム、およびＬＩＧＡ構造もまた本発明において基板として働き得る。

【０１３６】

１つの態様においては、ポリカチオン性ポリマーによってコーティングされたガラススライド上に別々の抗体またはビリオンのマイクロアレイが結合され得る。基板は本発明の別の側面に従って形成されて、１つまたは２つ以上の別々の膜結合蛋白質抗体への標的膜貫通分子の結合を検出することへの使用を意図され得る。１つの態様において、基板は、ポリカチオン性ポリマー（好ましくはカチオン性ポリペプチド、例えばポリリシンまたはポリアルギニン）のコーティングがその表面に形成されたガラス基板を含む。ポリカチオン性コーティング上には、領域などの既知の選択されたアレイ領域にそれぞれ局在する別々のバイオポリマーのマイクロアレイが形成され得る。

【０１３７】

スライドは、スライドの表面にポリカチオン性ポリマー（例えばポリ－ｌ－リシン）の均一厚フィルムを置き、フィルムを乾燥して乾燥コーティングを形成することによってコーティングされ得る。追加されるポリカチオン性ポリマーの量は、ガラス表面上にポリマーの少なくとも単層を形成するのに十分であり得る。ポリマーフィルムは表面の負のシリル－ＯＨ基とポリマー中の荷電アミン基との間の静電結合を介して表面に結合され得る。ポリ－ｌ－リシンコーティングガラススライドは例えばSigma Chemical Co.（St. Louis, Mo.）から商業的に得られる。

【０１３８】

好適なマイクロアレイ基板はガラスの化学的誘導体化によってもまたつくられ得る。末端Ｓｉ上に適切な脱離基を有するシラン化合物はガラス表面に共有結合するであろう。誘導体化分子は、ガラス基板の表面に所望の化学的性質を付与するように設計され得る。かかる二官能性試薬の例はアミノプロピルトリ（エトキシ）シランであり得、これは分子のトリ（エトキシ）シラン部分においてガラス表面と反応する一方で、脱離分子のアミノ部分は自由なままにする。末端アミノ基を有する表面はポリリシンコーティングスライドと同じくバイオポリマーの吸着にとって好適である。末端表面基のアイデンティティはさらなる化学反応によって改変され得る。例えば、グルタルアルデヒドとの上の例の末端アミンの反応は末端アルデヒド基をもたらす。マイクロアレイをスポットする前に、例えばシリル化（silynated）ガラスへのプロテインＡまたはプロテインＧ溶液の塗布によって、改変のさらなる何層もが適用されて所望の反応性を達成し得る。ビリオンおよび／またはポリペプチドに結合する追加の表面はニトロセルロースコーティングガラススライド（Schleicher and Schuellから市販）およびビリオン／蛋白質結合プラスチック、例えばポリスチレンである。

【０１３９】

スポットされた抗体またはビリオンは非共有結合または共有結合によって取り付けられ得る。吸着は、スポットされたポリペプチドとアレイ基板との間の静電、疎水性、ファンデルワールス、または水素結合相互作用によって起こる。水系環境での表面へのポリペプチドまたはビリオン溶液の単純な塗布は、ポリペプチドまたはビリオンを吸着するのに十分であり得る。共有結合的な取り付けは、化学的に活性化された表面とのポリペプチドまたはビリオン上の官能基の反応によって達成され得る。例えば、アルデヒドまたはスクシンイミド基などの高度に反応性の求電子基によって表面が活性化されている場合には、ビリオンの未修飾のポリペプチドまたはポリペプチドはアミン基において（リシン残基または末端アミンにおいて）反応して、共有結合を形成する。

【０１４０】
エポキシ（expoy）およびアルデヒドグラフト表面などの共有結合的な表面が用いられるときには、ビリオンは表面糖蛋白質の第１級アミン（例えばリシン残基）を介して表面に共有結合的にクロスリンクされ得る。ニトロセルロースコーティング表面（例えばFASTスライド）が用いられ得るときには、ビリオンは多孔質表面に吸着または取り込みされ得る。ＨＳＶ－１ビリオンはいずれかのプラスチックまたはコーティング表面に効率的に吸着し得る。
【０１４１】
いくつかの態様においては、共有結合的な表面取り付けが厳しい条件下での結合にとって有用であり得る。いくつかの態様において、共有結合的な表面取り付けは、厳しい条件での結合にとって非共有結合的な表面取り付けよりも有用であり得る。いくつかの態様において、アレイ上のスポットあたり非共有結合的に固定化されたビリオンの量と比較して、アレイ上のスポットあたりビリオンの減少した量が共有結合的に固定化される。いくつかの態様において、アレイ上のスポットあたり共有結合的に固定化されたビリオンの量と比較して、アレイ上のスポットあたりビリオンの増大した量が非共有結合的に固定化される。いくつかの態様において、共有結合的な表面が用いられて、低いバックグラウンドシグナルを維持し得る（例えば、Ｃｙ３およびより短い波長の他のチャネル）。いくつかの態様においては、リン酸化などのアッセイのある種類のために共有結合的な表面取り付けが使用される。いくつかの態様において、非共有結合的な表面、例えばFASTスライドは、共有結合的な表面上のスポットあたり吸着されるビリオン数よりもスポットあたり多くのビリオンを吸着し得る。いくつかの態様において、非共有結合的な表面は、低い親和性の結合イベントを検出するためには共有結合的な表面よりも良好な表面である。
【０１４２】
マイクロアレイを形成するためには、別々のバイオポリマーの画定された体積が、当分野において公知のいずれかの好適な方法によってポリマーコーティングスライド上に堆積する。基板の重要な特徴に従えば、基板アレイ中の対応する結合パートナーとの試料中の標識されたリガンドの結合を許す条件下で基板に水系試料が塗布され得るときに、堆積した抗体またはビリオンは非共有結合的にコーティングスライド表面に結合したままである。
【０１４３】
いくつかの態様において、少なくとも１つのまたは各マイクロアレイは、少なくとも約５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、または１０００個の別々の抗体を約１ｃｍ^{2}未満の表面積あたり含有する。いくつかの態様において、少なくとも１つのまたは各マイクロアレイは、少なくとも約５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、または１０００個の別々のビリオンを約１ｃｍ^{2}未満の表面積あたり含有する。１つの態様において、マイクロアレイは５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、または４００個の領域を約１６ｍｍ^{2}の面積中に、または２．５×１０^{3}個の領域／ｃｍ^{2}を含有する。好ましい態様において、少なくとも１つのまたは各マイクロアレイ領域中の抗体は約０．１フェムトモル～１００ナノモルの画定された量でもまた存在する。好ましい態様において、少なくとも１つのまたは各マイクロアレイ領域中のビリオンは約０．１フェムトモル～１００ナノモルの画定された量でもまた存在する。
【０１４４】
好ましい態様においては、バイオポリマーは少なくとも約約５０単位（例えばアミノ酸、ヌクレオチドなど）の長さをもまた有し、すなわち様々なインサイチュ合成スキームによって高密度アレイに形成され得るポリマーよりも実質的に長い。
【０１４５】
作製方法

本開示の主題は、少なくとも部分的に、本明細書に開示される通り、基板の表面と安定に結びついた複数個の組み換えビリオンマイクロスポットを含むアレイを作製する方法にもまた関する。アレイは当分野において周知のマイクロパターニング技術を用いて調製され得る。かかる技術は例えばマイクロスタンプ（米国特許第５，７３１，１５２号）、PDMSスタンプを用いるマイクロコンタクト印刷（Hovis et al. (2000) Langmuir 16:894-897）、キャピラリー分注デバイス（米国特許第５，８０７，５２２号）、およびマイクロピペッティングデバイス（米国特許第５，６０１，９８０号）を含み得る。

【０１４６】

１つの態様において、プローブの先端（「ピン」ともまた言われる）は組み換えビリオンの溶液中に浸漬され得る。先端が溶液から除かれて、先端に接着した組み換えビリオンを含む溶液を提供し得る。組み換えビリオンを含む溶液が基板の表面と接触させられて、それによって基板の表面に先端から組み換えビリオンを含む溶液をトランスファーし得る。

【０１４７】

本開示の主題中に用いられる「ピン」は、いずれかの形状、サイズ、および次元であり得る。例えば、ピンプリントプロセスはリング形状ピン、スクエアピン、またはポイントピン、および同様のものを含み得る。別の態様において、ダイレクトコンタクト印刷はシングルピン印刷またはマルチピン印刷（すなわち、ソースプレートを含むシングルピン印刷法、またはいずれかのフォーマットにパターニングされた複数のピンのレイアウトアレイを用いるマルチピン印刷）を含み得る。

【０１４８】

印刷装置は、プリントヘッド、プレート、基板操作ユニット、ＸＹまたはＸＹＺ移動ステージ、環境コントロール、機器コントロールソフトウェア、試料トラッキングソフトウェアなどを含み得る。かかる装置は例えばCartesian Technologies, Inc.によって販売されているquill pinプリンタを含む。

【０１４９】

高密度アレイのためには、複数個の組み換えビリオンを含む組み換えビリオンマイクロスポットのマトリックスを有する組み換えビリオンマイクロスポット印刷アレイが用いられて、対応するソースウェル（例えばマイクロタイタープレートのウェル）にマトリックスからの少なくとも１つのまたは各組み換えビリオンマイクロスポットをアラインメントおよびフィッティングし得る。

【０１５０】

ＩＩ．使用の方法

本開示の主題は、基板の表面と安定に結びついた複数個の組み換えビリオンマイクロスポットを含むアレイのための使用の方法にもまた関し、組み換えビリオンマイクロスポットは複数個の組み換えビリオンを含み、組み換えビリオンは、それらの固有の立体配座および／または相互作用を保持する複数個の異種膜結合蛋白質（例えばヒト膜結合蛋白質）を含むエンベロープを含む。使用のこれらの方法は、膜結合蛋白質、例えばヒト膜結合蛋白質に結合するリガンドおよび／または薬物をスクリーニングするためのハイコンテント・ハイスループットアッセイを含むが、これに限定されない。使用の追加の方法は医学的診断、プロテオーム、およびバイオセンサーアッセイを含む。

【０１５１】

方法への使用のためには、試料は典型的にはアレイに送達され得、試料は典型的には流体試料、例えば、アレイの組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質によって結合されるべき蛋白質、ポリペプチド、その断片、もしくは問題のいずれかの他のアナライト（または「標的」）を含む溶液であり得る。ある態様において、試料は下にさらに記載される通り生体試料を含み得る。

【０１５２】

アレイに用いられるアッセイは直接的な非競合アッセイまたは間接的な競合アッセイであり得る。非競合法において、組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質

上の結合部位に対する親和性は直接的に特定され得る。この方法において、組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質はアナライト（または「標的」）に直接的に暴露される。アナライトは標識されるかまたは未標識であり得る。アナライトが標識され得る場合には、検出の方法は蛍光、冷光、放射能、および同様のものを含み得る。アナライトが未標識である場合には、結合の検出は、組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質の表面におけるいくつかの物理的特性の変化に基づくであろう。かかる物理的特性は例えば屈折率または電気インピーダンスを含み得る。未標識標的の結合の検出は例えば質量分析を含み得る。競合法においては、結合部位の占有は間接的に特定され得る。この方法においては、アレイの組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質は、未標識標的とアレイの組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質の対応する標識された標的またはリガンドとを含有する溶液に暴露される。標識された対応するリガンドおよび未標識標的は、アレイの組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質上の結合部位について競合する。組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質に対する標的の親和性が、対応するリガンドと相対的に、標識されたリガンドの結合の量の低下によって特定され得る。標的の結合の検出はサンドイッチアッセイを用いて行われ得、最初の結合後に、結合した標的に対する親和性を有する標識抗体などの分子を含有する第２の溶液と一緒にアレイがインキュベーションされ得、異種膜結合蛋白質－標的複合体との標識抗体の結合の量に基づいて標的の結合の量が特定され得る。標的の結合の検出は置換（displacement）アッセイを用いて行われ得、標識リガンドの最初の結合後に、問題の化合物を含有する第２の溶液と一緒にアレイがインキュベーションされ得る。標的の結合能力および結合の量は、アレイの組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質中の予め結合した標識リガンドの数の低下に基づいて特定される。

【０１５３】

１つの態様において、アレイはリガンドおよび／または薬物をスクリーニングするための方法に用いられ得、アレイ上の複数個の異種膜結合蛋白質と結合または別様に相互作用するその能力について、可能性のあるリガンドおよび／または薬物の候補が直接的にスクリーニングされ得る。その代わりに、アレイ上の異種膜結合蛋白質の１つまたは２つ以上の種類と結合または別様に相互作用するそれらの能力について、複数個の可能性のあるリガンドおよび／または薬物の候補が並行してスクリーニングされ得る。リガンドおよび／または薬物スクリーニングプロセスは、可能性のあるリガンドおよび／または薬物の候補の存在下および非存在下の両方で、アレイ上の１つまたは２つ以上の異種膜結合蛋白質との少なくとも１つのアナライトまたは試料の成分の相互作用（例えば結合）についてアッセイすることを任意に含み得る。これは、元々アッセイされようとしていた相互作用（単数または複数）の阻害剤として作用するその能力について、可能性のあるリガンドおよび／または薬物の候補が試験されることを許す。

【０１５４】

別の態様において、アレイは、標的試料の特定の成分に結合するそれらの能力について複数個の蛋白質をスクリーニングするための方法に用いられ得る。この方法は、組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質を含むアレイに試料を送達することと、少なくとも１つのまたは各マイクロスポットに保持された特定の成分の存在または量について直接的または間接的に検出することとを含む。好ましい態様において、方法は、検出ステップ前にアレイから試料のいずれかの結合していないまたは非特異的に結合した成分を除くために、アレイを洗浄する中間ステップをさらに含む。別の態様において、方法は、少なくとも１つのマイクロスポット上に保持された特定の成分をさらにキャラクタリゼーションする追加のステップをさらに含む。

【０１５５】

別の態様において、蛋白質－蛋白質結合相互作用をアッセイする方法が提供され、以下のステップを含む。第１に、結合についてアッセイされるべき少なくとも１つの蛋白質を含む試料を組み換えビリオンアレイに送達することと、次に、少なくとも１つのまたは各

マイクロスポットに保持され得る試料から蛋白質の存在または量について直接的または間接的に検出すること。

【０１５６】

別の態様は、組み換えビリオンアレイ上の異種膜結合蛋白質の１つまたは２つ以上と反応し得る試料中の複数個のアナライトの存在について、並行してアッセイする方法を提供する。この方法は、アレイに試料を送達することと、少なくとも１つのまたは各組み換えビリオンマイクロスポットにおける異種膜結合蛋白質とのアナライトの相互作用を検出することとを含む。

【０１５７】

まだ別の態様において、組み換えビリオンアレイ上の異種膜結合蛋白質の１つまたは２つ以上に結合し得る試料中の複数個のアナライトの存在について並行してアッセイする方法が、アレイに流体試料を送達することと、少なくとも１つのまたは各マイクロスポットに保持されたアナライトの存在または量について直接的または間接的に検出することとを含む。好ましい態様において、方法は、アレイから試料のいずれかの結合していないまたは非特異的に結合した成分を除くためにアレイを洗浄するステップをさらに含む。

【０１５８】

別の態様において、組み換えビリオンアレイは診断的に用いられ得、アッセイされようとする複数個のアナライトが生物中の病原体の存在または病態のしるしである。かかる態様において、次に、アレイに送達され得る試料は典型的には生体試料を含むであろう。本明細書において用いられる場合、表現「生体試料」は、手順に有用な、対象から得られる種々の試料種類を包含する。１つの態様において、生体試料は全血、血球、血清、または血漿を含む。生体試料が固体組織試料を含むところでは、当分野において公知の様々な手段（ホモジナイズ、消化、および／または抽出を含む）によって液体試料が固体組織に由来し得る。したがって、生体組織試料は固体組織試料、液体組織試料、生体液、吸引液、細胞、および細胞断片を含み得る。生体試料の具体的な例は、外科切除、病理検体、保存試料、またはバイオプシー検体によって得られた固体組織試料、組織培養物またはそれに由来する細胞およびその子孫、ならびにこれらのソースのいずれかから調製された切片またはスメアを含むが、これに限定されない。生体試料の限定しない例は、乳部組織、リンパ節、および乳部腫瘍から得られた試料を含む。生体試料は脊椎動物の体に由来するいずれかの材料をもまた含み、血液、脳脊髄液、血清、血漿、尿、乳頭吸引液、穿刺吸引液、組織洗浄液、例えば乳管洗浄液、唾液、痰、腹水、肝臓、腎臓、乳部、骨、骨髄、精巣、脳、卵巣、皮膚、肺、前立腺、甲状腺、膵臓、子宮頸部、胃、腸、大腸、脳、膀胱、結腸、鼻孔、子宮、精液、リンパ液、膣内貯留液、滑液、脊髄液、頭部および頸部、上咽頭腫瘍、羊水、母乳、肺痰またはサーファクタント、尿、糞便、および生物起源の他の液体試料を含むが、これに限定されない。

【０１５９】

それらの多くの態様において本開示の方法によって診断される対象は望ましくはヒト対象であり得るが、本明細書に記載される方法が全ての脊椎動物種に関して有効であるということは理解されるはずであり、それらは用語「対象」を含むことが意図される。したがって、「対象」は、ヒト対象を医学的目的のために（例えば、既存の疾患、障害、もしくは状態の診断もしくは処置、または疾患、障害、もしくは状態の初期を予防するための予防診断もしくは処置のために）、または動物対象を医学的、獣医学的目的、もしくは開発目的のために含み得る。好適な動物対象は哺乳動物を含み、霊長類、例えばヒト、猿、類人猿、テナガザル、チンパンジー、オランウータン、マカクザル、および同様のもの、ウシ属、例えばウシ、オックス、および同様のもの、ヒツジ属、例えばヒツジおよび同様のもの、ヤギ類、例えばヤギおよび同様のもの、ブタ類、例えば子豚、親豚、および同様のもの、ウマ科、例えば馬、ロバ、シマウマ、および同様のもの、ネコ科（野生および飼い猫を含む）、イヌ科（犬を含む）、ウサギ目（ウサギ、野うさぎ、および同様のものを含む）、ならびにげっ歯類（マウス、ラット、モルモット、および同様のものを含む）を含むが、これに限定されない。動物はトランスジェニック動物であり得る。いくつかの態様

において、対象はヒトであり得、胎児、新生児、小児、若年者、および成人対象を含むが、これに限定されない。さらに、「対象」は、疾患、障害、または状態に罹患しているかまたは罹患していると疑われる患者を含み得る。それゆえに、用語「対象」および「患者」は本明細書において交換可能に用いられる。対象は動物疾患モデル(例えば、実験に用いられるラットまたはマウス、および同様のもの)をもまた含む。

【０１６０】

一般的に、アレイの組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質によって結合されるべき蛋白質を含有する溶液を試料が含む試料の送達は、任意にブロッキング溶液の送達によって先行され得る、後続され得る、または伴われ得る。ブロッキング溶液は、アレイ上の非特異的な結合の部位に接着するであろう蛋白質または別の部分を含有する。例えば、ウシ血清アルブミン、粉乳、ポリグルタミン酸、ＤＮＡ分子、またはレクチンの溶液がブロッキング剤として用いられ得る。

【０１６１】

広範な検出方法が方法に適用可能である。検出は定量的、半定量的、または定性的のいずれかであり得る。本開示のアレイは光学的検出法、例えば可視または赤外範囲の吸収、化学発光、および蛍光（寿命、偏光、蛍光相関分光法（ＦＣＳ）、および蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）を含む）と接続され得る。なおその上に、検出の他のモード、例えば光導波路（ＰＣＴ公開ＷＯ９６／２６４３２および米国特許第５，６７７，１９６号）、表面プラズモン共鳴、表面電荷センサー、および表面力センサーに基づくものが多くの態様と適合性である。

【０１６２】

別の態様において、本開示の主題は、アレイの組み換えビリオンマイクロスポット中の異種膜結合蛋白質に特異的に結合する抗体を検出する方法を対象とする。用語「特異的に結合する」は、いずれかの非標的と比較して少なくとも約５倍の親和性（例えば少なくとも約１０、２０、５０、または１００倍の親和性）で標的（例えば蛋白質）に結合する分子または化合物を言う。組み換えビリオンアレイは、可溶性抗体のライブラリーからまたはファージディスプレイもしくはリボソームディスプレイライブラリーから抗体を選択するために用いられ得る。組み換えビリオンアレイは、感染中または自己免疫状態などの患者血清の小量中の抗体を分析するためにもまた用いられ得る。

【０１６３】

本明細書において用いられる場合、用語「抗体」は、少なくとも１つの結合ドメインからなるポリペプチドまたはポリペプチドの群を言い、抗体の結合ドメインは抗体分子の可変ドメインのフォールディングから形成されて、抗原の抗原性決定基の特徴に相補的な内部表面形状および電荷分布を有する３次元結合空間を形成し得、これが抗原との免疫反応を許す。抗体は組み換え蛋白質を含み、結合ドメイン、さらには断片を含む（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）$_2$、およびＦ（ａｂ’）$_2$断片を含む）。本明細書において用いられる場合、「抗原性決定基」は抗原分子の部分、この場合には抗原－抗体反応の特異性を特定する異種膜結合ポリペプチドであり得る。「エピトープ」はポリペプチドの抗原性決定基を言う。エピトープは、エピトープに特有な空間立体配座中の少なくは３アミノ酸を含み得る。一般的に、エピトープは少なくとも約６つのかかるアミノ酸、より通常は少なくとも約８～１０個のかかるアミノ酸からなる。エピトープをつくっているアミノ酸を特定するための方法は、ｘ線結晶解析、２次元核磁気共鳴、およびエピトープマッピング（例えば、H. Mario Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:3998-4002、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ８４／０３５６４号、およびＰＣＴ特許公開第ＷＯ８４／０３５０６号によって記載されているPepscan法）を含む。

【０１６４】

膜蛋白質に対する抗体および抗体ライブラリー

本発明は膜蛋白質に対する抗体のライブラリーにもまた関し、抗体を作る、生成する、キャラクタリゼーションする、および利用するための方法およびシステムを含む。抗体は膜蛋白質に高度に特異的であり得る。ライブラリーは膜蛋白質に対する複数個の異なる抗

体を含み得、抗体が同じプラットフォームによって作られる。ライブラリーは複数個の異なる抗体を含み得、複数個または複数個の部分集合のうち、各抗体は膜蛋白質に対する単一特異的抗体であり得るか、その標的膜蛋白質の固有の形態に結合するか、膜蛋白質に対するモノクローナル抗体であり得るか、膜蛋白質免疫沈降抗体であり得るか、膜蛋白質に対するＩｇＧ抗体または膜蛋白質に対するＩｇＧアイソタイプ抗体の抗体であり得るか、複数個の抗体の別の抗体のものと類似であり得るその標的膜蛋白質に対する結合親和性を有するか、その標的膜蛋白質に対して少なくとも10^{-7}Ｍ（K_D）の結合親和性を有するか、あるいはそのいずれかの組み合わせである。

【０１６５】

プラットフォーム

抗体のライブラリーは、同じプラットフォームによって作られた膜蛋白質に対する複数個の異なる抗体を含み得る。１つの態様において、抗体のライブラリーは膜蛋白質に対する複数個の異なる抗体を含み、複数個の少なくとも約１０％が同じプラットフォームによって作られ得る。例えば、ライブラリーは膜蛋白質に対する複数個の異なる抗体を含み得、複数個の少なくとも約２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または１００％が、同じプラットフォームによって作られた膜蛋白質に対する抗体である。

【０１６６】

第１の抗体および第２の抗体が同じプロトコールから作られ得るときには、抗体同士は同じプラットフォームによって作られると見なされる。例えば、膜蛋白質に対する複数個の抗体がプラットフォームによって作られ得る。１つの態様において、本明細書に記載される異なる膜蛋白質を発現する複数個のビリオンによって動物が免疫され得る。動物は非ヒト動物、例えばウシ属、鳥類、イヌ科、ウマ科、ネコ科、ヒツジ属、ブタ類、または霊長類動物であり得る。動物は哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、猫、犬、猿、またはヤギであり得る。

【０１６７】

異なる膜蛋白質を発現する複数個のビリオンは単離または非単離ビリオンまたはその断片、例えば１つまたは２つ以上の異種膜結合蛋白質を発現または含有する単離ビリオンを含み得る。別の態様において、複数個のビリオンは非単離ビリオンを含み得る。

【０１６８】

複数個のビリオンは生体試料を含み得る。例えば、複数個のビリオンは、本明細書に記載される方法によってまたは生物もしくは細胞から作られた単一のビリオンまたは複数のビリオンを含み得る。生物または細胞はヒトまたは非ヒトであり得る。非ヒト生物または細胞は哺乳動物または哺乳類、例えばマウス、ラット、ウサギ、猫、犬、猿、またはヤギであり得る。生体試料は組織、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液（ＣＳＦ）、痰、唾液、骨髄、滑液、房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞（broncheoalveolar）洗浄液、精液、前立腺液、カウパー液、尿道球腺液、潮、汗、涙、嚢胞液、胸膜液、腹腔液、心嚢液、リンパ液、キームス、乳糜、胆汁、間質液、経血、膿、皮脂、膣分泌物、粘膜分泌物、水様便、膵液、鼻腔洗浄液、気管支肺吸引液、卵割腔（blastocyl cavity）液、またはビリオンを含有する臍帯血であり得る。１つの態様において、生体試料は普通の血清蛋白質（例えば、これに限定されないがアルブミンまたはＩｇＧ）を実質的に除去され得る。除去は濾過、分画、またはアフィニティー精製を含み得る。

【０１６９】

生体試料は、異種膜蛋白質を含有するビリオンまたはウィルス、例えば有エンベロープウィルス、例えば免疫不全ウィルス、例えばヒト免疫不全ウィルス（ＨＩＶ）、Ｔリンパ好性ウィルス、例えばヒトＴリンパ好性ウィルス（ＨＴＬＶ）、サル免疫不全ウィルス（ＳＩＶ）、ヘルペスウィルス、例えば単純ヘルペスウィルス（ＨＳＶ）、麻疹ウィルス、パピローマウィルス（ＨＰＶ）、アデノウィルス、ワクシニアウィルス、レトロウィルス科（例えばヒト免疫不全ウィルス、例えばＨＩＶ－１（ＨＴＬＶ－ＩＩＩ、ＬＡＶもしくはＨＴＬＶ－ＩＩＩ／ＬＡＶ、またはＨＴＶ－ＩＩＩともまた言われる）、および他の分

離株、例えばＨＩＶ－ＬＰ）、ピコルナウィルス科（例えばポリオウィルス、Ａ型肝炎ウィルス、エンテロウィルス、ヒトコクサッキーウィルス、ライノウィルス、エコーウィルス）、カリシ（Calci）ウィルス科（例えば胃腸炎を引き起こす株）、トガウィルス科（例えばウマ脳炎ウィルス、風疹ウィルス）、フラビ（Fla）ウィルス科（例えばデングウィルス、脳炎ウィルス、黄熱ウィルス）、コロナ（Corono）ウィルス科（例えばコロナウィルス）、ラブドウィルス科（viradae）（例えば水疱性口内炎ウィルス、狂犬病ウィルス）、フィロウィルス科（例えばエボラウィルス）、パラミクソウィルス科（例えばパラインフルエンザウィルス、ムンプスウィルス、麻疹ウィルス、ＲＳウィルス）、オルソミクソウィルス科（例えばインフルエンザウィルス）、ブニヤ（Bunga）ウィルス科（例えばハンタウィルス、ブニヤ（Bunga）ウィルス、フレボウィルスおよびナイロウィルス）、アレナウィルス科（出血熱ウィルス）、レオウィルス科（例えばレオウィルス、オルビウィルス、およびロタウィルス）、ビルナウィルス科、ヘパドナウィルス科（Ｂ型肝炎ウィルス）、パルボウィルス科（パルボウィルス）、パポーバウィルス科（パピローマウィルス、ポリオーマウィルス）、アデノウィルス科（大部分のアデノウィルス）、ヘルペスウィルス科（単純ヘルペスウィルス（ＨＳＶ）１および２、痘帯状疱疹ウィルス、サイトメガロウィルス（ＣＭＶ）、ヘルペスウィルス）、ポックスウィルス科（天然痘ウィルス、ワクシニアウィルス、ポックスウィルス）、ならびにイリドウィルス科、ならびに未分類ウィルス（例えば海綿状脳症の病因性因子、デルタ肝炎の因子、ノーウォークおよび関連するウィルス、アストロウィルス、またはインフルエンザウィルスを含み得る。

【０１７０】

好ましい態様においては、本明細書に記載される組み換えビリオンを作るためにＨＳＶ－１が利用され得る。しかしながら、他のヘルペスウィルスもまた用いられ得る。ＨＳＶ－１は正常時には宿主細胞にトランスフェクションされたときに潜伏をせず、それをビリオン生産にとって便利にしている。ＨＳＶ－１の遺伝学はヒト遺伝子を遺伝子操作することについて他のウィルスよりも優れている。他のシステム、例えばバキュロウィルスおよびレトロウィルスに基づくものは、アレイをつくるためには非理想的なビリオン構造（ＨＳＶ－１は印刷にとって理想的な球形ビリオンを作る）、間違った翻訳後修飾、宿主由来の膜蛋白質を組み込むより低い効率または不能、および組み込まれた分子のより少数を含む欠点を有する。

【０１７１】

予測されるαヘリックス膜貫通領域（単数または複数）を有する膜蛋白質をコードするヒト遺伝子の数は５，６００個くらいと見積もられ、ヒトの蛋白質コード遺伝子のおよそ２６％に対応する。これらの蛋白質の最も大きい画分は１つの予測される膜貫通領域のみを有するが、７つの予測される膜貫通領域を有する多くの蛋白質もまたあり、Ｇ蛋白質共役受容体を含む。複数個のビリオンは膜貫通ドメインを有する複数個の膜結合蛋白質を含み得る。例えば、膜貫通蛋白質は少なくとも約１００個の膜貫通ドメインを有する膜結合蛋白質、例えば少なくとも約２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、５，６００、または５，６０１個以上の膜貫通ドメインを有する異なる膜結合蛋白質を含み得る。

【０１７２】

ビリオンのライブラリーは膜貫通ドメインを有する複数個の膜結合蛋白質を含み得る。例えば、ビリオンのライブラリーは少なくとも約１００個の膜貫通ドメインを有する膜結合蛋白質、例えば少なくとも約２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、５，６００、または５，６０１個以上の膜貫通ドメインを有する異なる膜結合蛋白質を含み得る。ビリオンのライブラリーは生物のプロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、または６０％に相当し得る。ビリオンのライブラリーは生

物の膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、または６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％に相当し得る。ビリオンのライブラリーは、かなりの部分または全体の生物の膜結合プロテオーム（例えば細菌、ウィルス、または真菌プロテオーム）に相当する複数個の膜結合蛋白質を含み得る。ビリオンのライブラリーは、昆虫または哺乳動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、猫、犬、猿、ヤギ、またはヒト）のかなりの部分または全体のプロテオームに相当する複数個の膜結合蛋白質を含み得る。未精製の形態の生物の膜結合プロテオームに相当する融合蛋白質ライブラリー（例えば過剰発現ビリオンのコレクション）をもまた含み得る、ライブラリーまたは複数個の膜結合蛋白質。

【０１７３】

プロービングは、融合蛋白質などの異種膜結合蛋白質を過剰発現または含有するビリオンをアレイ化することと、アレイ化されたビリオンに対して抗体またはハイブリドーマ上清を試験することとによって実施され得る。プロービングは蛍光フローサイトメトリーによってもまた実施され得、膜結合蛋白質標的はビリオン中の組み換えＤＮＡのＰＣＲまたは配列分析によって同定され得る。

【０１７４】

抗体は選択され得、選択された抗体は、１つの膜貫通標的のみを認識しかつ生物のプロテオームライブラリー中の他の膜貫通もしくは非膜蛋白質標的と交差反応しない高度に特異的なモノクローナル抗体であり得る。これらのモノクローナル抗体を分泌する作られた細胞株は増殖させられ得る。同じプラットフォームまたはプロトコールによって作られる膜結合蛋白質抗体は、膜結合蛋白質抗体のライブラリーを作るかまたは形成するために用いられ得る。

【０１７５】

膜結合蛋白質抗体は、抗体が同じ方法またはプロトコール（例えば、ライブラリーを作る方法において下にさらに記載される）によって作られるときにもまた、同じプラットフォームから作られ得る。

【０１７６】

単一特異性（monospecificity）

膜結合蛋白質抗体のライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み得、少なくとも１つのまたは各抗体が、その膜結合蛋白質標的に対して特定の結合特異性を有する。例えば、膜結合蛋白質抗体のライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み得、膜結合蛋白質抗体が単一特異的である。１つの態様において、膜結合蛋白質抗体のライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み、複数個の膜結合蛋白質抗体の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または１００％が単一特異的であり得る。

【０１７７】

膜結合蛋白質抗体は、複数個の膜結合蛋白質を含むアレイ上でインキュベーションされたときに、膜結合蛋白質抗体が６超のＡ値および３超のＳ値を膜結合蛋白質に対して有する場合に単一特異的であり得る。膜結合蛋白質抗体は、複数個の非膜結合蛋白質を含むアレイ上でインキュベーションされたときに、膜結合蛋白質抗体が６超のＡ値および３超のＳ値を膜結合蛋白質に対して有する場合に単一特異的であり得る。膜結合蛋白質抗体は、複数個の膜貫通および非膜結合蛋白質を含むアレイ上でインキュベーションされたときに、膜結合蛋白質抗体が６超のＡ値および３超のＳ値を膜結合蛋白質に対して有する場合に単一特異的であり得る。膜結合蛋白質抗体についてアレイ全体の平均シグナル強度を超える標準偏差の数は、Ａと呼称される値であり得る。アレイ全体に対して膜結合蛋白質抗体についてシグナル強度が順位づけされたときのアレイ上の最高のシグナルと２番目に高いシグナルとの間の違いが、Ｓ値であり得る。例えば、ＡおよびＳ値は、１２×１２の２次元プールのセットに膜結合蛋白質抗体産生細胞またはハイブリドーマからの個々の上清を

組み合わせることによって計算され得、これらのプールはアレイ（例えばヒト膜結合プロテオームマイクロアレイ）上でインキュベーションされ、膜結合蛋白質抗体は（例えば、Ｃｙ５カップリング抗ＩｇＧ２次抗体、または抗体を検出するいずれかの他の方法によって）標識される。洗浄およびスキャン後に、少なくとも１つのまたは各スポットのシグナル強度（アレイ上の蛋白質または抗原との膜結合蛋白質抗体結合に相当する）を、フォアグラウンド対バックグラウンドシグナルの比として。アレイ全体の平均シグナル強度を超える標準偏差の数がＡと呼称される値であり得る。Ａ＞３の二重スポット（蛋白質または抗原の各二重対）にフラグが立てられ、結果がデコンボリューションされて、単一の水平方向および単一の垂直方向プールの交点に存在し、それゆえに個々のモノクローナル抗体によって認識される蛋白質または抗原を同定する。各候補の高度に特異的なモノクローナル膜結合蛋白質抗体（すなわちＡ＞３）はアレイ全体に対して個々に試験され得、Ａが各スポット蛋白質について測定され得る。シグナル強度は次に順位づけされ、アレイ上の最高のシグナルと２番目に高いシグナルとの間の違いが計算されて、Ｓ値を与え得る。Ａ＞６およびＳ＞３の膜結合蛋白質モノクローナル抗体が単一特異的膜結合蛋白質モノクローナル抗体（ｍＭＡｂ）として同定される。二特異的な膜結合蛋白質モノクローナル抗体（ｄＭＡｂ）はアレイ上の２つの異なる蛋白質に強度に結合し、Ａ＞６およびＳ＜３を有する。

【０１７８】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質ｍＭＡｂは６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、もしくは１００超のＡ値および／または３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、もしくは１００超のＳ値を有し得る。

【０１７９】

１つの態様において、膜結合蛋白質抗体の単一特異性を特定するためのアレイは、生物のプロテオームライブラリー、例えば生物のプロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含む。１つの態様において、膜結合蛋白質抗体の単一特異性を特定するためのアレイは、生物の膜結合プロテオームライブラリー、例えば生物の膜貫通プロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含む。抗原のライブラリーは、かなりの部分または全体の生物のプロテオームまたは膜貫通プロテオーム、例えば細菌、ウィルス、真菌プロテオームに相当し得る。抗原のライブラリーは、昆虫または哺乳動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、猫、犬、猿、ヤギ、またはヒト）のかなりの部分または全体のプロテオームまたは膜貫通プロテオームに相当し得る。例えば、生物のプロテオームライブラリーは少なくとも約１１，０００、１２，０００、１３，０００、１４，０００、１５，０００、１６，０００、１７，０００、１８，０００、１９，０００、または２０，０００個の異なる抗原を含み得る。例えば、生物の膜結合プロテオームライブラリーは少なくとも約少なくとも約１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、５，６００、または５，６０１個以上の膜貫通ドメインを有する異なる膜蛋白質を含み得る。

【０１８０】

結合親和性

膜結合蛋白質抗体のライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み得、特定の結合親和性その膜結合蛋白質標的を有する。例えば、ライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み得、複数個の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または１００％が特定の結合親和

性を有する。例えば、複数個の膜結合蛋白質抗体は、その標的膜結合蛋白質に対して少なくとも約10^{-7}M（例えば、少なくとも約10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M、10^{-12}M、10^{-13}M、10^{-14}M、10^{-15}M、または10^{-16}M）のその解離定数（K_D）によって特定される結合親和性を有し得る。

【０１８１】

複数個の膜結合蛋白質抗体はその会合速度定数（k_{on}）によって測定される結合親和性を有し得、複数個の抗体が少なくとも約$10^{4}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$5\times10^{4}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$10^{5}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$5\times10^{5}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$10^{6}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$5\times10^{6}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$10^{7}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$5\times10^{7}M^{-1}s^{-1}$、または少なくとも約$10^{8}M^{-1}s^{-1}$の結合親和性を有する。複数個の抗体はその解離速度定数（k_{off}）によって測定される結合親和性を有し得、複数個の抗体が$10^{3}M^{-1}s^{-1}$未満、$5\times10^{3}M^{-1}s^{-1}$未満、$10^{4}M^{-1}s^{-1}$未満、$5\times10^{4}M^{-1}s^{-1}$未満、$10^{5}M^{-1}s^{-1}$未満、$5\times10^{5}M^{-1}s^{-1}$未満、$10^{6}M^{-1}s^{-1}$未満、$5\times10^{6}M^{-1}s^{-1}$未満、$10^{7}M^{-1}s^{-1}$未満、$5\times10^{7}M^{-1}s^{-1}$未満、または$10^{8}M^{-1}s^{-1}$未満、$5\times10^{7}M^{-1}s^{-1}$未満、$10^{8}M^{-1}s^{-1}$未満、$5\times10^{8}M^{-1}s^{-1}$未満、$10^{9}M^{-1}s^{-1}$未満、$5\times10^{9}M^{-1}s^{-1}$未満、または$10^{10}M^{-1}s^{-1}$未満の結合親和性を有する。

【０１８２】

結合親和性は、表面プラズモン共鳴、クロマトグラフィー、または当分野において公知のいずれかの他の方法によって特定され得る。結合親和性は、例えば生体分子相互作用を検出するリアルタイムおよび／または無標識法を用いることによって、光学的にもまた特定され得る。１つの態様において、斜め入射反射率差（different）（ＯＩＲＤ）が用いられ得る。

【０１８３】

膜結合蛋白質抗体のライブラリーは、その標的膜結合蛋白質の固有の形態に結合する複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み得る。例えば、ライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み得、複数個の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または１００％がその標的膜結合蛋白質の固有の形態に結合する。１つの態様において、その標的膜結合蛋白質の固有の形態に結合する複数個の膜結合蛋白質抗体は、同じ結合条件下でその標的膜結合蛋白質の変性した形態には結合しない。

【０１８４】

膜結合蛋白質抗体のライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み得、ライブラリーの１つまたは２つ以上の抗体は、複数個の別の膜結合蛋白質抗体の結合親和性に類似であり得るその標的膜結合蛋白質に対する結合親和性を有する。例えば、膜結合蛋白質抗体のライブラリーは第１の膜結合蛋白質抗体および第２の膜結合蛋白質抗体を含み得、第１の膜結合蛋白質抗体は、第２の膜結合蛋白質に対する第２の膜結合蛋白質抗体の結合親和性に類似の第１の膜結合蛋白質に対する結合親和性を有する。ライブラリーの１つの膜結合蛋白質抗体は、ライブラリーの１つまたは２つ以上の他の膜結合蛋白質抗体の結合親和性の少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、または２０％以内であり得るその標的膜結合蛋白質に対する結合親和性を有し得る。ライブラリーの第１の膜結合蛋白質抗体は、ライブラリーの１つまたは２つ以上の他の膜結合蛋白質抗体の結合親和性の少なくとも約２０％以内であり得るその標的膜結合蛋白質に対する結合親和性を有し得る。１つの態様において、膜結合蛋白質抗体のライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み得、異なる膜結合蛋白質抗体の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または１００％は、それらのそれぞれの標的膜結合蛋白質に対する複数個の異なる膜結合蛋白質抗体の残りの結合親和性の少なくとも約２０％以内であり得るその標的膜結合蛋白質に対する結合親和性を有する。

【０１８５】
プロテオーム
本明細書においては、生物の膜結合プロテオームの部分に結合する複数個の異なる抗体を含み得る膜結合蛋白質抗体のライブラリーもまた提供される。複数個の異なる膜結合蛋白質抗体は生物の膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％に結合し得る。例えば、複数個の異なる膜結合蛋白質抗体は生物の少なくとも約１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、５，６００、または５，６０１個以上の膜結合蛋白質に結合し得る。膜結合プロテオームは細菌、ウィルス、真菌プロテオームのものであり得る。膜結合プロテオームは昆虫または哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、猫、犬、猿、ヤギ、またはヒトのものであり得る。いくつかの態様において、膜結合プロテオームはヒト膜結合プロテオームであり得る。

【０１８６】
例えば、複数個の異なる膜結合蛋白質抗体はヒト膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％に結合し得る。１つの態様において、複数個の異なる膜結合蛋白質抗体はヒト膜結合プロテオームの少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％に結合し得る。

【０１８７】
他の抗体の特質
膜結合蛋白質抗体のライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体をもまた含み得、膜結合蛋白質抗体がＩｇＧ抗体（例えば、ＩｇＧアイソタイプの膜結合蛋白質抗体）である。例えば、膜結合蛋白質抗体のライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み得、膜結合蛋白質抗体の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または１００％がＩｇＧ膜結合蛋白質抗体またはＩｇＧアイソタイプの膜結合蛋白質抗体であり得る。

【０１８８】
膜結合蛋白質抗体のライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体をもまた含み得、膜結合蛋白質抗体が免疫沈降膜結合蛋白質抗体である。例えば、膜結合蛋白質抗体のライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み得、抗体の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または１００％は膜結合蛋白質免疫沈降抗体であり得る。免疫沈降膜結合蛋白質膜結合蛋白質抗体は、抗体なしのネガティブコントロールおよび抗Ｖ５抗体ポジティブコントロールと比較して、細胞ホモジネートから標的膜結合蛋白質を免疫沈降し得る膜結合蛋白質抗体であり得る。免疫沈降された標的膜結合蛋白質の検出はウェスタンブロットによってであり得る。免疫沈降は清澄化細胞ライセートと膜結合蛋白質抗体のおよそ２μｇとによって行われ得、その後に４℃で２時間インキュベーションし、次にいずれかの膜結合蛋白質抗体－蛋白質複合体を結合するための基板の追加（例えばプロテインＧのDynabead）を行い、次に４℃で追加の２時間インキュベーションする。インキュベーション後に、基板は例えば氷冷ＴＢＳＴによって２回洗浄され得、基板は新たな反応容器にトランスファーされ、氷冷ＴＢＳＴによって再び洗浄された後に、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウェスタンブロット分析に供され得る。

【０１８９】
膜結合蛋白質のクラス
１つの側面において、本発明は、膜結合蛋白質の特定のクラスの膜結合蛋白質に特異的である複数個の膜結合蛋白質抗体を含む膜結合蛋白質抗体のライブラリーに関する。膜結

合蛋白質同士は、構造上またはトポロジー上の特徴の１つまたは２つ以上の属性をそれらが共通に共有するときに、膜結合蛋白質の１つのクラスに属する。これは、構造上またはトポロジー上の特徴のセットに画定された特質をアサインメントするコレクションである。膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、１つまたは２つ以上の構造上またはトポロジー上の特徴を共有する遺伝子を探索することによって同定され得る。共通の属性は例えば共通の構造的特徴、膜貫通スパンドメインの特定の数、共通のトポロジー、共通の生体プロセス、または共通の分子機能であり得る。

【０１９０】

ヒト膜結合蛋白質遺伝子および膜貫通蛋白質の機能に係る公刊された査読済み文献中に存在する豊富な情報が体系化および管理されている。ヒトゲノム中のおよそ４０，０００個の転写単位のうち、それらのおよそ５，６００個がアノテーションされた膜結合蛋白質をコードしている。

【０１９１】

いくつかの態様において、蛋白質のクラスに属する蛋白質は、膜結合蛋白質である。

【０１９２】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、膜貫通スパンドメインの特定の数を含有する膜結合蛋白質である。

【０１９３】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、単一の膜貫通スパンドメインを含有する膜結合蛋白質である。

【０１９４】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、２つまたは３つ以上の膜貫通スパンドメインを含有する膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、３つまたは４つ以上の膜貫通スパンドメインを含有する膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、４つまたは５つ以上の膜貫通スパンドメインを含有する膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、５つまたは６つ以上の膜貫通スパンドメインを含有する膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、６つまたは７つ以上の膜貫通スパンドメインを含有する膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、７つまたは８つ以上の膜貫通スパンドメインを含有する膜結合蛋白質である。

【０１９５】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、機能的な膜結合蛋白質をつくっているサブユニットの特定の数を含有する膜結合蛋白質である。

【０１９６】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、機能的な膜結合蛋白質をつくっている単一のサブユニットを含有する膜結合蛋白質である。

【０１９７】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、機能的な膜結合蛋白質をつくっている２つまたは３つ以上のサブユニットを含有する膜結合蛋白質である。

【０１９８】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、機能的な膜結合蛋白質をつくっている３つまたは４つ以上のサブユニットを含有する膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、機能的な膜結合蛋白質をつくっている４つまたは５つ以上のサブユニットを含有する膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、機能的な膜結合蛋白質をつくっている５つまたは６つ以上のサブユニットを含有する膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は

、機能的な膜結合蛋白質をつくっている６つまたは７つ以上のサブユニットを含有する膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、機能的な膜結合蛋白質をつくっている７つまたは８つ以上のサブユニットを含有する膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、機能的な膜結合蛋白質をつくっている８つまたは９つ以上のサブユニットを含有する膜結合蛋白質である。

【０１９９】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、疎水性残基の単一のＴＭストレッチを有し、ＴＭドメインのNH_2末端側のポリペプチドの部分が膜の外側に露出し、ＣＯＯＨ末端部分が細胞質側に露出している膜結合蛋白質、例えばＩ型膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質はＩａ型（切断可能なシグナル配列）およびＩｂ型（切断可能なシグナル配列なし）にさらに分けられる。

【０２００】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、疎水性残基の単一のＴＭストレッチを有し、ＴＭドメインのＣＯＯＨ末端側のポリペプチドの部分が膜の外側に露出し、NH_2末端部分が細胞質側に露出している膜結合蛋白質、例えばＩ型膜結合蛋白質である。

【０２０１】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、単一のポリペプチド鎖中に複数の膜貫通ドメインを有する膜結合蛋白質、例えばＩＩＩ型膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質はａおよびｂにさらに分けられる。ＩＩａ型分子が切断可能なシグナル配列を有し得る一方で、ＩＩＩｂ型は膜の外表面に露出されたそれらのアミノ末端を有し得るが、切断可能なシグナル配列を有さない。

【０２０２】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、膜に複数回跨がる（スパンする）アセンブリをつくっている複数の相同ドメインを有する膜結合蛋白質、例えばＩＶ型膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、ドメインは単一のポリペプチド鎖上にある。いくつかの態様において、ドメインは１つの個々の鎖よりも多くの上にある。

【０２０３】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はαヘリックス膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はβバレル膜結合蛋白質である。

【０２０４】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は、吸光駆動型輸送体、例えばバクテリオロドプシン様蛋白質（ロドプシンを含む）、細菌光合成反応中心と光化学系ＩおよびＩＩ、ならびに細菌および葉緑体からの集光性複合体である。

【０２０５】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は酸化還元駆動型輸送体、例えば膜貫通シトクロムｂ様蛋白質：補酵素Ｑ－シトクロムｃレダクターゼ（シトクロムｂｃ１）、シトクロムｂ６ｆ複合体、ギ酸デヒドロゲナーゼ、呼吸系硝酸レダクターゼ、コハク酸－補酵素Ｑレダクターゼ（フマル酸レダクターゼ）、およびコハク酸デヒドロゲナーゼ、または細菌およびミトコンドリアからのシトクロムｃオキシダーゼである。

【０２０６】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は電気化学ポテンシャル駆動型輸送体、例えばプロトンまたはナトリウムトランスロケーションＦ型およびＶ型ＡＴＰアーゼである。

【０２０７】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はＰ－Ｐ結合加

水分解駆動輸送体、例えばＰ型カルシウムＡＴＰアーゼ、カルシウムＡＴＰアーゼ制御因子ホスホランバンおよびサルコリピン、ＡＢＣ輸送体（ＢｔｕＣＤ、多剤輸送体、およびモリブデン酸取り込み輸送体）、ならびに一般的な分泌経路のトランスロカーゼである。

【０２０８】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は輸送体（単輸送体、共輸送体、対向輸送体）、例えばミトコンドリアキャリア蛋白質、メジャーファシリテータースーパーファミリー（グリセロール－３－リン酸輸送体、ラクトースパーミアーゼ、および多剤輸送体ＥｍｒＤ）、耐性－根粒形成－細胞分裂（多剤排出輸送体ＡｃｒＢ）、ジカルボン酸／アミノ酸：カチオン共輸送体（プロトングルタミン酸共輸送体）、一価カチオン／プロトン対向輸送体（ナトリウム／プロトン対向輸送体１、ＮｈａＡ）、神経伝達物質ナトリウム共輸送体、アンモニア輸送体、および薬物／代謝物質輸送体（小型多剤耐性輸送体ＥｍｒＥ）である。

【０２０９】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はαヘリックスチャネルであり、イオンチャネル、例えば電位開口型イオンチャネル様（カリウムチャネルＫｃｓＡおよびＫｖＡＰならびに内向き整流性カリウムイオンチャネルＫｉｒｂａｃを含む）、大コンダクタンス機械受容チャネルＭｓｃＬ、小コンダクタンス機械受容イオンチャネル（ＭｓｃＳ）、ｃｏｒＡ金属イオン輸送体、神経伝達物質受容体のリガンド開口型イオンチャネル（アセチルコリン受容体）、アクアポリン、塩化物チャネル、および外膜補助蛋白質（多糖輸送体）および細菌外膜からのαヘリックス膜結合蛋白質を含む。

【０２１０】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は酵素、例えばメタンモノオキシゲナーゼ、ｒｈｏｍｂｏｉｄプロテアーゼ、およびジスルフィド結合形成蛋白質（ＤｓｂＡ－ＤｓｂＢ複合体）である。

【０２１１】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はαヘリックス膜貫通アンカーを有する蛋白質、例えばＴ細胞受容体膜貫通二量体化ドメイン、シトクロムｃ亜硝酸レダクターゼ複合体、ステリル硫酸スルホヒドロラーゼ、ｓｔａｎｎｉｎ、グリコホリンＡ二量体、イノウィルス（繊維状ファージ）主要コート蛋白質、ピリン、肺サーファクタント関連蛋白質、モノアミンオキシダーゼＡおよびＢ、脂肪酸アミドヒドロラーゼ、シトクロムＰ４５０オキシダーゼ、コルチコステロイド１１β－デヒドロゲナーゼ、シグナルペプチドペプチダーゼ、ならびにストマチンホモログに特異的な膜プロテアーゼである。

【０２１２】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は単一のポリペプチド鎖から構成されるβバレル、例えば１０というずれ数（shear number）を有する８つのβストランドのβバレル、ｏｍｐＡ様膜貫通ドメイン（ＯｍｐＡ）、病原性関連外膜蛋白質ファミリー（ＯｍｐＸ）、外膜蛋白質Ｗファミリー（ＯｍｐＷ）、抗微生物ペプチド耐性および脂質Ａアシル化蛋白質ファミリー（ＰａｇＰ）、脂質ＡデアシラーゼＰａｇＬ、およびｏｐａｃｉｔｙファミリーポリン（ＮｓｐＡ）、オートトランスポーターードメイン、ｆａｄＬ外膜蛋白質輸送ファミリー（脂肪酸輸送体ＦａｄＬを含む）、一般的な細菌ポリンファミリー（三量体ポリンとして公知）、マルトポリン、または糖ポリン、ヌクレオシド特異的ポリン、外膜ホスホリパーゼＡ１、ＴｏｎＢ依存型受容体、ならびにそれらのプラグドメインである。これらはリガンド開口型外膜チャネル、外膜蛋白質ＯｐｃＡファミリー、および外膜蛋白質Ｇポリンファミリーである。

【０２１３】

いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はいくつかのポリペプチド鎖から構成されるβバレル、例えば三量体オートトランスポーター、外膜排出蛋白質（ＴｏｌＣおよび多剤耐性蛋白質を含み、三量体外膜因子としてもまた公知）およびｍｓｐＡポリン、ならびにα－ヘモリシンである。

【０２１４】
いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は内在性膜蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は脂質（ipid）に連結された蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は表在性膜蛋白質である。
【０２１５】
いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は開いた立体配座（confirmation）にある。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は閉じた立体配座（confirmation）にある。
【０２１６】
いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は原形質膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は核膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は核外膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は核内膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はミトコンドリア膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はミトコンドリア外膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はミトコンドリア内膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質は小胞体膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はゴルジ複合体膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はエンドソーム膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はペルオキシソーム膜結合蛋白質である。いくつかの態様において、膜結合蛋白質のクラスに属する膜結合蛋白質はリソソーム膜結合蛋白質である。
【０２１７】
本発明は、複数個の膜結合蛋白質に特異的な複数個の膜結合蛋白質抗体を含むライブラリーをもまた提供し、そのうち膜結合蛋白質の少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９％、または１００％は、上に記載されているもののいずれかなどの特定のクラスである。
【０２１８】
抗体のライブラリーを作る方法
本明細書においては、抗体のライブラリーを作る方法もまた提供される。１つの態様において、方法は、（ａ）１つまたは２つ以上の膜結合蛋白質を発現または含有するビリオンまたは複数個のビリオンによって動物を免疫することと、（ｂ）動物から膜結合蛋白質抗体生成細胞を単離することと、（ｃ）膜結合蛋白質抗体生成細胞から１つまたは複数個の膜結合蛋白質抗体を単離することと、（ｄ）蛋白質アレイ（例えばヒトプロテオームアレイまたはヒト膜結合プロテオームアレイ）によってステップｃ）の１つまたは複数個の膜結合蛋白質抗体をスクリーニングすることと、（ｅ）プロテオームアレイ上の単一の標的に単一特異的であり得る膜結合蛋白質抗体を選択することと、を含む。１つの態様において、方法は、ステップｃ）に先立って膜結合蛋白質抗体生成細胞からの１つまたは複数個の膜結合蛋白質抗体をプレスクリーニングすることをさらに含み得る。
【０２１９】
動物は非ヒト動物、例えばウシ属、鳥類、イヌ科、ウマ科、ネコ科、ヒツジ属、ブタ類、または霊長類動物であり得る。動物は哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、猫、犬、猿、またはヤギであり得る。
【０２２０】
動物は１つまたは複数個の膜結合蛋白質によって免疫され得、膜結合蛋白質はビリオン内に含有され、例えばビリオンのエンベロープ内に含有される。
【０２２１】

抗体のライブラリーは複数個の抗体を含み得、複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体は複数個の膜結合蛋白質に特異的に結合し得る。いくつかの態様において、複数個の抗体の少なくとも約１％～１００％は、本明細書に記載される方法のいずれかによって作られたかまたは検証された抗体であり得る。いくつかの態様において、複数個の抗体の少なくとも約１％～１００％は本明細書に記載される方法よりも他の方法によって作られた抗体である。本明細書に記載されるライブラリーまたは複数の抗体のいずれかの中の１つもしくは２つ以上の抗体または抗体の少なくとも約１％～１００％を検証する方法は、免疫沈降（ＩＰ）、免疫組織化学（ＩＨＣ）、ウェスタンブロット（ＷＢ）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、免疫蛍光（ＩＦ）、免疫細胞化学（ＩＣＣ）、ｓｉＲＮＡノックダウン、またはそのいずれかの組み合わせを含む群から選択される方法によって１つまたは２つ以上の抗体を分析することを含み得る。

【０２２２】

いくつかの態様において、複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体は単一特異的であり得る。いくつかの態様において、複数個の抗体の少なくとも約１％～１００％は単一特異的であり得る。ライブラリー中の抗体の少なくとも１つは単一特異的であり得る。ライブラリー中の抗体の少なくとも約１％は単一特異的であり得る。例えば、ライブラリー中の抗体の少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％が単一特異的であり得る。１つの態様において、ライブラリー中の抗体または複数個の抗体の少なくとも１つまたはそれぞれが単一特異的であり得る。アレイ中の抗体の少なくとも約１つが単一特異的であり得る。例えば、アレイ中の抗体の少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、７００、７２５、７５０、７７５、８００、８２５、８５０、８７５、９００、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、５，６００、または５，６０１個以上が単一特異的であり得る。

【０２２３】

いくつかの態様において、複数個の抗体の少なくとも１つのまたは各抗体は膜結合蛋白質に対して少なくとも約10^{-7}Ｍ（K_D）の結合親和性を有し得る。いくつかの態様において、複数個の抗体の少なくとも約１％～１００％は膜結合蛋白質に対して少なくとも約10^{-7}Ｍ（K_D）の結合親和性を有し得る。ライブラリー中の抗体の少なくとも約１つは少なくとも約10^{-7}Ｍ（K_D）、例えば少なくとも約10^{-8}Ｍ、10^{-9}Ｍ、10^{-10}Ｍ、10^{-11}Ｍ、10^{-12}Ｍ、10^{-13}Ｍ、10^{-14}Ｍ、10^{-15}Ｍ、または10^{-16}Ｍの結合親和性をその標的に対して有し得る。ライブラリー中の抗体の少なくとも約１％は単一特異的であり得、ライブラリー中の抗体の少なくとも約１つは少なくとも約10^{-7}Ｍ（K_D）の結合親和性を有し得る。例えば、ライブラリー中の抗体の少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％は単一特異的であり得、ライブラリー中の抗体の少なくとも約１つは少なくとも約少なくとも約10^{-8}Ｍ、10^{-9}Ｍ、10^{-10}Ｍ、10^{-11}Ｍ、10^{-12}Ｍ、10^{-13}Ｍ、10^{-14}Ｍ、10^{-15}Ｍ、または10^{-16}Ｍの結合親和性を有し得る。

【０２２４】

複数個の抗体は少なくとも約５０個の異なる抗体を含み得る。例えば、複数個の抗体は少なくとも約１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９０

０、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、５，６００、または５，６０１個以上の異なる抗体を含み得る。例えば、抗体のライブラリーは少なくとも約７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、７００、７２５、７５０、７７５、８００、８２５、８５０、８７５、９００、または１０００個の抗体を含み得る。

【０２２５】

いくつかの態様において、抗体のライブラリーは同じ１つまたは２つ以上の抗体の少なくとも約２つを含み得る。例えば、抗体のライブラリーは同じ１つまたは２つ以上の抗体の少なくとも約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、７００、７２５、７５０、７７５、８００、８２５、８５０、８７５、９００、または１０００個を含み得る。

【０２２６】

１つまたは２つ以上の膜結合蛋白質を含有するビリオンのライブラリー。例えば、ビリオンのライブラリーは少なくとも約１００個の膜貫通ドメインを有する膜蛋白質、例えば少なくとも約２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、５，６００、または５，６０１個以上の膜貫通ドメインを有する異なる膜蛋白質を含み得る。ビリオンのライブラリーは生物のプロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、または６０％に相当し得る。ビリオンのライブラリーは生物の膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、または６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％に相当し得る。ビリオンのライブラリーは、かなりの部分または全体の生物の膜結合プロテオーム、例えば細菌、ウィルス、または真菌プロテオームに相当する複数個の膜結合蛋白質を含み得る。ビリオンのライブラリーは、昆虫または哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、猫、犬、猿、ヤギ、またはヒトのかなりの部分または全体のプロテオームに相当する複数個の膜結合蛋白質を含み得る。未精製形態の生物の膜結合プロテオームに相当する融合蛋白質ライブラリー（例えば過剰発現ビリオンのコレクション）をもまた含み得る、複数個の膜結合蛋白質を含有または発現するビリオンのライブラリー。

【０２２７】

動物からの膜結合蛋白質抗体生成細胞はリンパ球細胞、例えばＢ細胞であり得る。膜結合蛋白質抗体生成細胞はハイブリドーマを生成するために用いられ得、例えばミエローマ細胞などの不死細胞と融合されて、ハイブリドーマを作出し得る。

【０２２８】

１つの態様においてはプレスクリーニングステップが実施され得、膜結合蛋白質抗体生成細胞からの複数個の膜結合蛋白質抗体が膜結合蛋白質抗体生成細胞から複数個の膜結合蛋白質抗体を単離することに先立ってスクリーニングされる。１つまたは２つ以上の標的膜結合蛋白質（例えば固有の膜結合蛋白質）を含む混合物との膜結合蛋白質抗体生成細胞からの膜結合蛋白質抗体の結合を特定するために、血清または膜結合蛋白質抗体産生細胞の上清を用いてプレスクリーニングが実施され得る。プレスクリーニングは、免疫組織化学、免疫細胞化学、ＥＬＩＳＡ、クロマトグラフィー、または結合を特定するための当分野において公知のいずれかの他の好適な方法を用いて実施され得る。プレスクリーニングが用いられて、膜結合蛋白質抗体生成細胞（これは、不死化細胞と融合した膜結合蛋白質

抗体分泌細胞、例えばハイブリドーマを含み得る）を、例えば本明細書に記載されるプロテオームアレイまたは膜結合プロテオームアレイによるさらなるスクリーニングのために選択し得る。

【０２２９】

膜結合蛋白質抗体生成細胞からの複数個の膜結合蛋白質抗体は以前のプレスクリーニングステップありまたはなしに単離された後に、生物のプロテオームまたは膜結合プロテオームの全体または部分によるスクリーニングに供され得る。例えば、単離された膜結合蛋白質抗体は生物のプロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％によってスクリーニングされ得る。例えば、単離された膜結合蛋白質抗体は生物の膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％によってスクリーニングされ得る。例えば、単離された抗体は生物の少なくとも約１１，０００、１２，０００、１３，０００、１４，０００、１５，０００、１６，０００、１７，０００、１８，０００、１９，０００、または２０，０００個の蛋白質によってスクリーニングされ得る。例えば、単離された抗体は生物の少なくとも約１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、または５，６００個の膜結合蛋白質によってスクリーニングされ得る。プロテオームまたは膜結合プロテオームは細菌、ウィルス、真菌プロテオームであり得る。プロテオームまたは膜結合プロテオームは、昆虫または哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、猫、犬、猿、ヤギ、またはヒトのものであり得る。いくつかの態様において、プロテオームまたは膜結合プロテオームはヒトのものであり得る

【０２３０】

例えば、単離された膜結合蛋白質抗体はヒトプロテオームの少なくとも約０．５％によってスクリーニングされ得る。１つの態様において、単離された抗体はヒトプロテオームの少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％によってスクリーニングされ得る。例えば、単離された膜結合蛋白質抗体はヒト膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％によってスクリーニングされ得る。１つの態様において、単離された抗体はヒト膜結合プロテオームの少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％によってスクリーニングされ得る。プロテオーム、膜結合プロテオーム、またはその部分は、膜結合蛋白質抗体をスクリーニングするために用いられ得、アレイ上に存在し得る。

【０２３１】

スクリーニング後に、膜結合蛋白質抗体はその結合プロファイルに基づいて選択され得る。例えば、膜結合蛋白質抗体は、それがプロテオームまたは膜結合プロテオームの単一の標的に（例えば、ヒトプロテオームアレイの単一の標的に）結合する場合に、本明細書に記載されるライブラリーに選択され得る。

【０２３２】

方法は、膜結合蛋白質抗体のハイスループット生産を実施するために用いられ得る。例えば、マウスを免疫するためのビリオンがハイスループット的に作られ得る。これは１）遺伝子発現ライブラリーからの異種膜結合蛋白質を含有するビリオンの指向型生産によってなされ得、問題の膜結合蛋白質は必要に応じてビリオン中に発現され得る。注射のため

の膜結合蛋白質を含有するビリオンは細胞成分、例えば細胞および細胞内膜、オルガネラ、粒子、または蛋白質複合体を含み得、差別的な遠心分離または他の周知の方法を用いて調製され得る。脂質二重層中の膜結合蛋白質の複雑な混合物によるこれらの免疫は、最も高度に免疫原性の膜結合蛋白質に対する膜結合蛋白質抗体を最終的に作り得る。この場合には、ビリオンのソースは以前に単離された抗体を用いて免疫除去されて、いずれかのとりわけ抗原性の膜結合蛋白質を除き得る。加えて、膜蛋白質はそれらの固有のまたは変性した状態（単数または複数）で、サイズ排除、イオン交換、疎水性もしくはアフィニティークロマトグラフィーによって、または個々に集められた小画分を用いることによってクロマトグラフィーされて、膜結合蛋白質の数十～数千ではなく数百によって免疫し得る。膜結合蛋白質の具体的なクラスを標的とするための具体的な技術が用いられ得る。例えば、ＳＮＯシグナル伝達に関与する膜結合蛋白質を含有するビリオンは固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）によって精製され得、膜結合蛋白質を含有する溶出された金属不含ビリオンが次に抗原として免疫のために用いられ得るか、または膜貫通リン酸化蛋白質を含有するビリオンがTiO_2アフィニティーマトリックスに結合させられて、それによって大いに濃縮され得る。生体のまたは固定されたビリオンから直接的に単離または得られた固有の蛋白質は、免疫原の好ましいソースであり得る。

【０２３３】

ハイスループット法は、膜結合蛋白質抗体を分泌するリンパ球細胞を作るための短いタイムスケールの免疫をもまた含み得る。例えば、動物は複数の膜結合蛋白質を含有する複数のビリオンとアジュバント調製物とによって後足蹠に免疫され得る。膝窩リンパ節が免疫後の７～２１日に集められる。免疫された動物のリンパ節は足蹠へのエバンスブルーの注射によって直接的に明らかにされる。

【０２３４】

ハイスループット法は、融合タグ寛容マウス中で膜結合蛋白質抗体を生成することをもまた含み得る。多くの膜結合蛋白質はタグづけ融合物として発現されるので、融合タグ発現マウス（融合タグを活発に発現するマウス）のラインが用いられて、融合膜結合蛋白質の非融合タグ成分に対して生ずる特異的な膜結合蛋白質抗体の収率を増大させ、抗融合タグ抗体の生成を排除し得る。

【０２３５】

膜結合蛋白質抗体を作るためのハイスループット法は、膜結合蛋白質抗体生産のための細胞融合物/ハイブリドーマの作出をもまた含み得る。プライミングしたリンパ球細胞およびミエローマ細胞は融合され、融合産物は、免疫グロブリン分子の所望のサブクラスを認識する蛍光タグづけ膜結合蛋白質抗体を含有する半固形培地(メチルセルロース)上に、または所望の膜結合蛋白質抗体を分泌する細胞をマーキングするであろう異種膜結合蛋白質を含有する蛍光タグづけビリオンを含有する半固形培地にプレーティングされる。上の方法の組み合わせもまた用いられ得る。蛍光マーキングされたコロニーは、ドラモンド毛細管およびドラモンドWireTrolデバイスを用いるハンドピッキングと組み合わせて倒立蛍光顕微鏡を用いて半固形培地から液体培地にレスキューされ、その後に個々のクローンのアウトグロースを行う。

【０２３６】

本明細書に開示される抗体を生成するためにはいずれかの好適な方法が用いられ得る。例えば、異種膜結合蛋白質または複数個の異種膜結合蛋白質を含むビリオンが、例えば当分野において公知のいずれかの組み換え方法によってインビトロで作られ得る。ビリオン組成物は好適な担体または希釈剤をさらに含み得、抗体の生産をゆるす条件下で動物に投与され得る。動物の抗体生産能力を増大させるために、完全または不完全フロイントアジュバントもまた投与され得る。ビリオン組成物は、１日１回または週に１もしくは２回以上、例えば週に１、週に２回、週に３回、週に４回、週に５回、週に６回、もしくは週に７回、または２～４週毎、例えば２週、３週、４週、５週、６週、７週、８週、または９週以上毎に投与され得る。ビリオン組成物は１回または総計約２回～約１０回投与され得る。ビリオン組成物は２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１１回以上の回数

で投与され得る。投与は当分野において公知のいずれかの方法（例えば、これに限定されないが、皮下、腹腔内（intraperitonealy）、静脈内、足蹠、および同様のものの投与）によってであり得る。

【０２３７】

モノクローナル抗体産生細胞を調製するためには、抗体力価が確認された個々の動物が選択され得、最終免疫の後（例えば2～5日後）、その脾臓またはリンパ節が採取され得、それに含有される抗体産生細胞がミエローマ細胞と融合されて、所望のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製し得る。

【０２３８】

ハイブリドーマは２つの細胞型、例えば免疫Ｂ細胞および培養安定なミエローマ細胞株を融合することによって生成され得る。これはＰＥＧなどの融合活性化合物の存在下で行われ得る。所望のハイブリッド細胞産物は、ピリミジン／プリン合成、デノボおよびスカベンジング経路という２つの代謝経路の存在を利することによって未融合細胞の中から選択され得る。８－アザグアニンおよび６－チオグアニンに対する耐性によって選択されて来た通り、普通に用いられるミエローマ細胞株はサルベージ経路が欠損しており、それゆえにヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴ）が欠損している。生存能のためのサルベージ経路を有さないので、これらの細胞はデノボ経路を要求するが、しかしながらこれはアミノプテリンによってブロッキングされ得る。Ｂ細胞ミエローマハイブリッドはアミノプテリンの存在下で育ち得る。なぜなら、免疫Ｂ細胞は野生型ＨＰＲＴ酵素を供与し、これはスカベンジングされたヒポキサンチン（Ｈ）およびチミジン（Ｔ）のプロセシングを支持するからである。融合反応はそれゆえにＨＡＴ培地にプレーティングされて未融合の免疫細胞およびミエローマ細胞を排除し得るが、ハイブリドーマのアウトグロースを許容し得る。最も有用なミエローマ細胞株は、Ｘ６３－Ａｇ８．６５３、ＮＳＷ、およびＳｐ２／０－Ａｇ－１４などであり、これらはＢ細胞によって寄与された産物をコンタミネーションさせるであろうそれら自身の免疫グロブリン重または軽鎖を分子しない。ミエローマ細胞の例はＮＳ－１、Ｐ３Ｕ１、ＳＰ２／０、ＡＰ－１、および同様の細胞を含むが、これに限定されない。細胞融合は公知の方法に従って行われ得る。

【０２３９】

抗血清中の抗体力価の測定は、例えば標識蛋白質および抗血清を反応させ、次に抗体に結合した標識因子の活性を測定することによって行われ得る。用いられるべき抗体産生細胞（脾細胞）の数およびミエローマ細胞の数の割合は当分野において公知の方法によって最適化および実施され得る。用いられるべき抗体産生細胞（脾細胞）の数およびミエローマ細胞の数の割合は約１：１～約２０：１であり得、例えば約２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、または２０：１の比が用いられ得る。ＰＥＧ１０００～ＰＥＧ６０００などのＰＥＧが約１０％～約８０％、例えば１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、または８０％の濃度で追加され得る。細胞融合は、両方の細胞の混合物を約２０℃～約４０℃、例えば約３０℃～約３７℃で約１分～１０分間インキュベーションすることによって効率的に行われ得る。例えば、両方の細胞の混合物は約２０℃、２０℃、２１℃、２２℃、２３℃、２４℃、２５℃、２６℃、２７℃、２８℃、２９℃、３０℃、３１℃、３２℃、３３℃、３４℃、３５℃、３６℃、３７℃、３８℃、３９℃、または４０℃で約１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０分間インキュベーションされ得る。

【０２４０】

当分野において公知の通り、異種蛋白質（例えばビリオンの異種膜結合蛋白質）に対する抗体を作るハイブリドーマをスクリーニングするためには、様々な方法が用いられ得る。例えば、ハイブリドーマの上清が固相（例えばマイクロプレート）に追加され得、これに抗体が直接的にまたは担体と一緒に吸着され得、次に、放射性物質または酵素によって

標識された抗免疫グロブリン抗体（例えば、マウス細胞が細胞融合に用いられる場合には、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられ得る）またはプロテインＡもしくはプロテインＧが、固相に結合したビリオンの膜結合蛋白質に対するモノクローナル抗体を検出するために追加され得る。それに代わって、ハイブリドーマの上清が固相に追加され得、これに抗免疫グロブリン抗体またはプロテインＡが吸着され得、次に、放射性物質または酵素によって標識された蛋白質が、固相に結合したビリオンの膜結合蛋白質に対するモノクローナル抗体を検出するために追加され得る。

【０２４１】

モノクローナル抗体の選択はいずれかの公知の方法またはその改変に従って行われ得る。ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン）が追加される動物細胞のための培地が使用され得る。いずれかの選択および増殖培地は、ハイブリドーマが育ち得るのであれば使用され得る。例えば、約１％～２０％、例えば１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、または２０％のＦＢＳまたはＦＣＳを含有するＲＰＭＩ１６４０培地またはＧＩＴ培地、ハイブリドーマの培養のための血清不含培地（SFM-101, Nisei Seiyaku）、および同様のものが用いられ得る。培養は２０℃～４０℃、例えば約２０℃、２０℃、２１℃、２２℃、２３℃、２４℃、２５℃、２６℃、２７℃、２８℃、２９℃、３０℃、３１℃、３２℃、３３℃、３４℃、３５℃、３６℃、３７℃、３８℃、３９℃、または４０℃で約５日間～３週間、例えば約５日間、６日間、１週間、２週間、または３週間、約１～１０％CO_2ガス下、例えば約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、または１０％CO_2ガス下で行われ得る。ハイブリドーマ培養物の上清の抗体力価は、抗血清中の抗蛋白質の抗体力価に関して上で記載されたものと同じやり方に従って測定され得る。

【０２４２】

バイオマーカーに対するモノクローナル抗体の分離および精製は、従来のポリクローナル抗体のものと同じやり方、例えば免疫グロブリンの分離および精製（（例えば塩析、アルコール沈殿、等電点沈殿、電気泳動、イオン交換体による吸着および脱着）（例えばＤＥＡＥ））、超遠心分離、ゲル濾過、または特異的精製法に従って行われ得、抗体は抗原結合固相、プロテインＡ、またはプロテインＧなどの活性吸着剤によって集められ、結合を解離させて抗体を得られる。

【０２４３】

ポリクローナル抗体はいずれかの公知の方法またはこれらの方法の改変によって調製され得る。例えば、バイオマーカーおよび担体蛋白質を含むバイオマーカー組成物がされ得、動物は記載される通りにビリオン組成物によって免疫され得る。ビリオンの膜結合蛋白質に対する抗体を含有する材料が免疫された動物から回収され得、抗体が分離および精製され得る。

【０２４４】

本明細書に記載されるビリオンを用いてハイスループット法で生成したモノクローナル膜結合蛋白質抗体については、蛋白質マイクロアレイデコンボリューションによって原因の膜結合蛋白質抗原が同定され得る。シングルステップデコンボリューションが実施され得る。

【０２４５】

例えば、ハイブリドーマを生成するために複数の膜結合蛋白質を含有する複数のビリオンが用いられ、少なくとも１つのまたは各モノクローナル膜結合蛋白質抗体が認識するであろう膜結合蛋白質抗原のアイデンティティを明らかにするために２次元プール化戦略が使用され得る。ハイブリドーマの上清が２次元グリッドにアレイ化され、３×３～１００×１００プールサイズで水平方向および垂直方向の両方でプール化される。３次元プール化戦略もまた実施され得、ハイブリドーマがプレートセットにアレイ化されて、プレートプールならびに水平方向および垂直方向プールを３×３×３～１００×１００×１００フォーマットで生成する。もたらされるプールは蛋白質マイクロアレイに対して個々にハイ

ブリダイゼーションされ、マイクロアレイ分析ソフトウェアを用いてスコアリングされる。各水平方向および垂直方向対の共有されるポジティブ（ヒット）、またはプレート、水平方向および垂直方向プールの各３方向（トリオと呼ばれる）の交点のものが、それぞれ２および３次元設計において、同じ対またはトリオの交点のモノクローナル膜結合蛋白質抗体によって認識される膜結合蛋白質抗原として同定される。必要であるときには、同定された膜結合蛋白質抗原は、対応する膜結合蛋白質抗体によってマイクロアレイをプロービングすることによって検証される。プール化戦略は、膜結合蛋白質抗体をキャラクタリゼーションするまたは作るコストを減少させ得る。なぜならアレイのコストは高くあり得、例えば１０×１０プールの使用は１００クローンを分析するために必要とされるアレイ数を１００から２０に減少させ、２０×２０プールでは必要とされるアレイ数を４００から４０に減少させるからである。３次元プールは例えば４０９６個のハイブリドーマのプールをスクリーニングし得る一方で、１６×１６×１６の３Ｄ戦略は４８個のアレイのみを要求する。１０×１０戦略を用いて、８２０アレイが用いられ得る。

【０２４６】

ハイスループット法で生成したモノクローナル膜結合蛋白質抗体のキャラクタリゼーションは、全プロテオームまたは全膜結合プロテオームマイクロアレイを用いて実施され得る。マイクロアレイは、所与のモノクローナル膜結合蛋白質抗体が結合する特異的な膜結合蛋白質抗原を特定するために用いられ得る。モノクローナル膜結合蛋白質抗体の親和性、可能性のある交差反応性、または他の抗原もしくは膜結合蛋白質抗原との交差反応性の欠如についての決定的な品質の情報は、全てアレイ分析によって提供される。

【０２４７】

ハイスループット法におけるモノクローナル膜結合蛋白質抗体の生産は融合クローンからであり得る。モノクローナル膜結合蛋白質抗体はインビトロまたはインビボで所望の量作られる。これらは様々な良く確立された方法を用いて精製され得る。

【０２４８】

蛋白質マイクロアレイを用いるモノクローナル膜結合蛋白質抗体のキャラクタリゼーションに基づいて、高品質（例えば、高い親和性および低い交差反応性）のモノクローナル膜結合蛋白質抗体が選択されて、抗体アレイを作るために用いられ得る。膜結合蛋白質抗体が選択され、それらの濃度は類似の力価に対して正規化される。それらはマルチウェルフォーマット（例えば９６、３８４、または１５６２ウェル）中に妥当なポジティブ（例えば希釈ヒトＩｇＧ）およびネガティブ（例えばヒトＧｉｍｐおよびＢＳＡ）コントロールと一緒にアレイ化されて、マイクロアレイロボット（例えばNan print, Array It, Inc.）を用いて抗体マイクロアレイを作製し得る。異なるマイクロアレイ構成中のモノクローナル膜結合蛋白質抗体の配置は、広範なプロテオームワイドまたは膜結合プロテオームワイド研究を容易にするためにカスタマイズされ得る。

【０２４９】

膜蛋白質抗体のライブラリーを用いる方法

本明細書においては、膜結合蛋白質標的に対する膜結合蛋白質抗体を同定する方法もまた提供され、抗体のライブラリーと膜結合蛋白質標的を含有するビリオンを接触させることと、複数個の膜結合蛋白質抗体とビリオン中の膜結合蛋白質標的との間の結合を特定することと、ビリオンの膜結合蛋白質がライブラリーの膜結合蛋白質抗体に結合するときに、ビリオンの膜結合蛋白質に対する膜結合蛋白質抗体を同定することとを含む。膜結合蛋白質標的を同定する方法もまた提供され、膜結合蛋白質抗体のライブラリーと膜結合蛋白質標的を含有するビリオンを接触させることと、複数個の膜結合蛋白質抗体とビリオンの膜結合蛋白質標的との間の結合を特定することと、ビリオンの膜結合蛋白質標的がライブラリーの膜結合蛋白質抗体に結合するときに膜結合蛋白質標的抗体を同定することと、を含む。膜結合蛋白質抗体のライブラリーは基板に取り付けされ得、その結果、膜結合蛋白質抗体のライブラリーを含むアレイと膜結合蛋白質標的が接触させられ得る。

【０２５０】

ライブラリーは例えば上に記載された複数個の異なる膜結合蛋白質抗体からなり得る。

例えば、膜結合蛋白質抗体のライブラリーは、同じプラットフォームによって作られる膜結合蛋白質抗体を含み得る。ライブラリーは複数個の異なる膜結合蛋白質抗体を含み得、複数個または複数個の部分集合のうち（例えば、複数個の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または１００％）、膜結合蛋白質抗体は同じプラットフォームによって作られるか、単一特異的であるか、その標的膜結合蛋白質の固有の形態に結合するか、モノクローナルであるか、免疫沈降膜結合蛋白質抗体であるか、ＩｇＧ膜結合蛋白質抗体（例えばＩｇＧアイソタイプの膜結合蛋白質抗体）であるか、複数個の膜結合蛋白質抗体の別の膜結合蛋白質抗体のものに類似（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０％以内）であり得るその膜結合蛋白質標的に対する結合親和性を有するか、少なくとも１つのまたは各膜結合蛋白質抗体が少なくとも約10^{-7}Ｍ（K_D）の結合親和性（例えば、少なくとも約10^{-8}Ｍ、10^{-9}Ｍ、10^{-10}Ｍ、10^{-11}Ｍ、10^{-12}Ｍ、10^{-13}Ｍ、10^{-14}Ｍ、10^{-15}Ｍ、または10^{-16}Ｍなどの）をその膜結合蛋白質標的に対して有するか、またはそのいずれかの組み合わせである。ライブラリーは少なくとも約５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、７００、７２５、７５０、７７５、８００、８２５、８５０、８７５、９００、もしくは１０００個の異なるモノクローナル膜結合蛋白質抗体を含み得るか、生物のプロテオーム（例えばヒトプロテオーム）の少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくは１００％に結合し得るか、生物の膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくは１００％に結合し得るか、またはそのいずれかの組み合わせである。

【０２５１】

本明細書においては、ヒト膜結合蛋白質などの膜結合蛋白質に単一特異的な膜結合蛋白質抗体を同定する方法もまた提供され、複数個の膜結合蛋白質抗体をプロテオームまたは膜結合プロテオームアレイ、例えばヒトプロテオームまたは膜結合プロテオームアレイと接触させることと、プロテオームアレイ上に存在する標的と複数個の膜結合蛋白質抗体との間の結合を特定することと、膜結合蛋白質抗体を単一特異的として同定することとを含む。アレイは、生物のプロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含む複数個の蛋白質を含み得る。例えば、プロテオームアレイは生物の少なくとも約１１，０００、１２，０００、１３，０００、１４，０００、１５，０００、１６，０００、１７，０００、１８，０００、１９，０００、または２０，０００個の蛋白質を含み得る。アレイは、生物の膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含む複数個の膜結合蛋白質抗原または膜結合蛋白質を含み得る。例えば、プロテオームアレイは生物の少なくとも約２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、または５，６００個の膜結合蛋白質を含み得る。生物は細菌、ウィルス、または真菌であり得る。生物は昆虫または哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、猫、犬、猿、ヤギ、またはヒトであり得る。例えば、プロテオームはヒ

トプロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含み得る。例えば、膜結合プロテオームはヒト膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含み得る。

【０２５２】

結合は、当分野において公知の技術、例えば放射性免疫アッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫放射定量アッセイ、ゲル拡散沈殿反応、免疫拡散アッセイ、インサイチュ免疫アッセイ（例えば、例えば金コロイド、酵素、または放射性同位体標識を用いる）、ウェスタンブロット、沈殿反応、凝集アッセイ（例えば、ゲル凝集アッセイ、赤血球凝集アッセイなど）、補体固定アッセイ、免疫光アッセイ、プロテインＡアッセイ、および免疫電気泳動アッセイによって検出され得る。

【０２５３】

抗体結合は、１次抗体上の標識を検出することによって検出され得る。その代わりに、１次抗体への２次抗体または試薬の結合を検出することによって１次抗体が検出され得る。例えば２次抗体は標識され得る。いくつかの態様においては、自動検出アッセイまたはハイスループットシステムが利用され得る。例えば、キャプチャーマイクロ酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）において、抗体/抗原反応は、抗体の固定化と、結合した標識抗原の爾後の直接的または間接的な比色分析、蛍光、冷光、または放射性検出とによって測定可能となされ得る。例えば、抗原がビオチンまたは他の標識によって標識され得、これが下流の検出を許すであろう。

【０２５４】

固定化された膜結合蛋白質抗体は、存在する単一の抗原性決定基に一般的に結合するであろう。抗原性決定基は、例えば抗原性決定基を含むバイオマーカーの標識によって標識され得る。この反応の特異性はＥＬＩＳＡ測定での定量をゆるすであろう。ＥＬＩＳＡ反応は、以下のステップによって全てのハイブリドーマ上清をスクリーニングするためのハイスループットフォーマットに用いられ得る。ＥＬＩＳＡよりも他の原理を基礎とするスクリーニングアッセイが活用され得る（例えば、抗体マイクロアレイ、ＭＡＬＤＩ／ＭＳに基づくハイスループットスクリーニング、および／またはマルチチャネルキャピラリー電気泳動）。ＥＬＩＳＡまたはマイクロアレイデータは例えば公開された方法によって評価され得る。データ分析プロセスの目標は、重要な臨床パラメータの最良のコレクションを示し、かつアナライト群の１つに特異的であるハイブリドーマ上清の選択であり得る。

【０２５５】

マイクロアレイの使用

本発明のマイクロアレイは医学的診断法、創薬、分子生物学、免疫学、および毒物学に用いられ得る。

【０２５６】

本発明に従って調製された固定化された抗体またはビリオンのマイクロアレイは、多数の診断およびスクリーニング用途において大スケール結合アッセイのために用いられ得る。大量の標的（例えば膜結合蛋白質）のレベルの定量的バリエーションの多重測定は、いくつか～多くの異なる標的（例えば膜結合蛋白質）によって定義されるパターンの認識を許す。多くの生理学的パラメータおよび疾患特異的パターンを同時に評価し得る。

【０２５７】

固定化されたビリオンのアレイは、受容体蛋白質、例えばＧＰＣＲ、チャネル、受容体チロシンキナーゼ、および輸送体のリガンド、例えばペプチド、脂質、脂肪酸、低分子などを同定するためにもまた用いられ得る。蛍光色素および／または放射性同位体が用いら

れて、リガンドの結合活性および特異性を検出するためにそれらのリガンドを標識し得る。それらのリガンドを特異的に認識する抗体は、固定化されたビリオンのアレイ上においてリガンド－受容体結合活性を特定するための検出試薬としてもまた用いられ得る。レポーター分子、例えば蛍光色素（例えばＦｌｕｏ８、ＤｉＢＡＣ４、およびＡＮＧ－２）とカップリングされて、固定化されたビリオンのアレイは、膜蛋白質、例えばチャネル蛋白質に対する薬物スクリーンをスクリーニングするためにもまた用いられ得る。たとえば、少なくとも１つまたはそれぞれが特定のヒトイオンチャネルを提示する複数のビリオン種が９６、３８４、１５３６ウェルフォーマットディッシュ中にアレイ化され得、その結果、１つの薬物が複数の（例えば２～２００個の）チャネル蛋白質に対して同時にアッセイされ得る。例えば、固定化されたビリオンのアレイ上で公知のリガンドがプレインキュベーションされ得、その後に抗体結合アッセイを行う。このやり方で、そのリガンドへの結合を原因とする膜蛋白質の特定の立体配座を特異的に認識する抗体が直ちに同定され得る。

【０２５８】

固定化されたビリオンのアレイは、膜結合蛋白質のエクトドメインを特異的に認識し得る抗体をスクリーニングするためにもまた用いられ得る。例えば、組み換えビリオンによってマウスを免疫することによって生成されたモノクローナル抗体は、固定化されたビリオンのアレイ上でインキュベーションされ得、その後に標識２次抗体による検出ステップを行う。

【０２５９】

固定化されたビリオンのアレイは、膜結合蛋白質の細胞内ドメインを特異的に認識またはそれと相互作用し得る抗体、リガンド、および結合パートナーをスクリーニングするためにもまた用いられ得る。例えば、組み換えビリオンによってマウスを免疫することによって生成したモノクローナル抗体が固定化されたビリオンのアレイ上でインキュベーションされ得（ビリオンは異種膜結合蛋白質の細胞内ドメインの１つまたは２つ以上を提示する）、その後に標識２次抗体による検出ステップを行う。例えば、Ｎ$_{out}$－Ｃ$_{in}$トポロジーの所与のマルチパス膜結合蛋白質が遺伝子操作されてその細胞質ループから正電荷を除き得、正常時には細胞の外側に提示されるそのＮ末端ループ領域に１つまたは２つ以上の正荷電残基（例えばリシンおよびアルギニン）が追加され得る。例えば、かかる例示的な遺伝子操作されたマルチパス膜結合蛋白質がＥＲにおいて翻訳されるときには、正荷電Ｎ末端ループは細胞質基質に面したままにされ、Ｎ$_{in}$－Ｃ$_{out}$トポロジーをもたらすであろう。ゆえに、遺伝子操作されたマルチパス蛋白質のエンドドメインはビリオンの外側に提示され得る。

【０２６０】

１つの態様は、生体試料中に存在する膜結合蛋白質の分離、同定、およびキャラクタリゼーションを含む。例えば、疾患およびコントロール試料の比較によって、「疾患特異的膜結合蛋白質」を同定することが可能であり得る。これらの膜結合蛋白質は薬物開発の標的としてまたは疾患の分子マーカーとして用いられ得る。

【０２６１】

抗体アレイは試料中の膜結合蛋白質の発現レベルをモニタリングするために用いられ得、かかる試料は問題の組織のバイオプシー、培養細胞、微生物細胞集団、生体液（血液、血漿、リンパ液、滑液、脳脊髄液、細胞ライセート、培養上清、羊水などを含む）、およびその誘導体を含み得る。生体液の臨床試料は特に重要であり、血液およびその誘導体、脳脊髄液、尿、唾液、リンパ液、滑液などを含む。かかる測定は定量的、半定量的、または定性的であり得る。アッセイが定量的または半定量的であるところでは、好ましくは例えば標識および未標識試料の間または差別的に標識された試料の間の競合型フォーマットを含むであろう。

【０２６２】

固定化された膜貫通ポリペプチドにとっての標的分子の存在を検出するためのアッセイは以下の通り実施され得るが、方法は本明細書において示されるものに限定される必要は

なく、当分野において公知のいずれかの好適な方法を含む。

【０２６３】

試料、画分、またはそのアリコートが、抗体を含むマイクロアレイに追加される。試料は上に記載されている実にいろいろな生体液または抽出物を含み得る。好ましくは、コントロールリガンド（単数または複数）の既知の濃度を含有する標準のシリーズが試料またはそのアリコートと並行してアッセイされて、コントロールとして働き得る。インキュベーション時間は標的分子がポリペプチドに結合するのに十分であるべきであり、一般的に約０．１～３ｈｒ、通常は１ｈｒ、しかし長くは１日または２日以上であり得る。

【０２６４】

インキュベーション後に、不溶性支持体は結合していない成分を一般的に洗浄され得る。一般的に、適切なｐＨ（一般的に７～８）での希釈非イオン性界面活性剤媒質が洗浄媒質として用いられ得る。試料中に存在する非特異的に結合した蛋白質を徹底的に洗浄するのに十分な体積で、１～６回の洗浄が使用され得る。

【０２６５】

結合した標的の存在を検出するためには、種々の方法が用いられ得る。これらは３つの一般的な群に分けられる。標的自体は検出可能な標識によって標識され得、結合した標識の量が直接的に測定され得る。その代わりに、競合アッセイにおいては差別的に標識されたまたは未標識の試料と標識試料が混合され得る。まだ別の態様において、試料自体は未標識であり得るが、存在するリガンドの量を定量するために第２ステージ標識試薬が追加され得る。

【０２６６】

リガンド結合の直接的測定をゆるす標識の例は、放射性標識、例えば^{3}Ｈまたは^{125}Ｉ、蛍光物質（fluorescer）、色素、ビーズ、化学発光物質（chemilumninescer）、コロイド粒子、および同様のものを含む。好適な蛍光色素は当分野において公知であり、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、ローダミンおよびローダミン誘導体、テキサスレッド、フィコエリトリン、アロフィコシアニン、６－カルボキシフルオレセイン（６－ＦＡＭ）、２’，７’－ジメトキシ－４’，５’－ジクロロ－６－カルボキシフルオレセイン（ＪＯＥ）、６－カルボキシ－Ｘ－ローダミン（ＲＯＸ）、６－カルボキシ－２’，４’，７’，４，７－ヘキサクロロフルオレセイン（ＨＥＸ）、５－カルボキシフルオレセイン（５－ＦＡＭ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－６－カルボキシローダミン（ＴＡＭＲＡ）、スルホン化ローダミン、Ｃｙ３、Ｃｙ５などを含む。好ましくは、標識されるべき化合物は、リガンド上に存在する基（例えばアミン基、チオール基、アルデヒド基など）と反応する活性化された色素と組み合わされ得る。

【０２６７】

例えば膜貫通標的を認識する標識膜貫通抗体の追加によって第２ステージ検出が実施され得るところでは、標識は、好適な基質の追加後に検出可能な産物シグナルを提供する能力がある共有結合した酵素であり得る。コンジュゲートへの使用のための好適な酵素の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、および同様のものを含む。市販でないところでは、かかる抗体－酵素コンジュゲートは当業者に公知の技術によって直ちに作られ得る。第２ステージ結合試薬は、存在する他の成分から見分けられ得るような十分な特異性で膜貫通標的分子に結合するいずれかの化合物であり得る。好ましい態様において、第２ステージ結合試薬はリガンドに特異的な抗体、モノクローナルまたはポリクローナル血清、例えばマウス抗ヒト抗体などである。

【０２６８】

シグナルの増幅のためには、リガンドはビオチン、ジゴキシゲニンなどの因子によって標識され得、第２ステージ試薬はアビジン、ストレプトアビジン、抗ジゴキシゲニン抗体などを標識にとって適切に含む。

【０２６９】

例えば走査レーザー顕微鏡を用いることによって、蛍光分光、改良ＥＬＩＳＡプレートリーダーなどによって、リガンドの結合を検出するためにマイクロアレイがスキャンされ

得る。例えば、走査レーザー顕微鏡は、用いられるフルオロフォアのそれぞれについて適切な励起ラインを用いてセパレートスキャン（separate scan）を実施し得る。スキャンから生成したデジタルイメージは次に爾後の分析のために組み合わされる。いずれかの特定のアレイエレメントについて、１つの標識の蛍光シグナルの比がもう片方の標識ＤＮＡからの蛍光シグナルと比較され得、相対的な存在量が特定され得る。

【０２７０】

マイクロアレイおよび標的膜貫通分子を検出する方法はいくつものスクリーニング、研究、および診断アッセイのために用いられ得る。１つの用途において、膜貫通抗体のアレイは、研究または診断目的のために膜結合蛋白質発現をモニタリングするために生物からの総蛋白質に結合させられ得る。１つの有色フルオロフォアによって正常細胞からの総蛋白質を、別の有色フルオロフォアによって疾患細胞からの総蛋白質を標識して、同じアレイに２つの試料を同時に結合させることは、差別的な膜結合蛋白質発現が２つのフルオロフォア強度の比として測定されることを許す。この２色実験は、異なる組織型における発現、疾患状態、薬物に対する応答、または環境因子に対する応答をモニタリングするために用いられ得る。

【０２７１】

スクリーニングアッセイにおいて、例えば膜結合蛋白質（単数または複数）が疾患経路に関係または疾患特異的表現型と相関しているかどうかを特定するために、培養細胞から測定がなされ得る。かかる細胞は、問題の標的または経路に作用する薬理活性因子の追加によって実験操作され得る。この用途は生体機能の解明または治療標的の発見にとって重要であり得る。

【０２７２】

多くの診断および研究目的のためには、血液または血清中の標的膜貫通分子（例えば膜結合蛋白質）の測定レベルに有用であり得る。この用途は、特定の診断または予後と相関する臨床的に有用な膜貫通マーカーの発見および診断にとって重要であり得る。例えば、広範な抗体またはＴ細胞受容体特異性を並行してモニタリングすることによって、膜貫通抗体のレベルおよび動態を自己免疫疾患の経過中、感染中、移植片拒絶中などに特定し得る。その代わりに、問題の疾患と結びついた新規の膜結合蛋白質マーカーが正常および疾患血液試料の比較によってまたは疾患の異なるステージの臨床試料の比較によって開発され得る。

【０２７３】

生物のゲノム中の膜結合蛋白質発現の情報は実にいろいろな用途を有し得、表現型との結びつきによる個別化的な疾患（例えば疾患の初期、進行、疾患耐性、易罹患性、または薬物応答）の診断および処置（「個別化医療」としてもまた公知）を含むが、これに限定されない。細胞または組織特異性の点で生物のゲノム中の生体経路にとって意義のある膜結合蛋白質の同定およびキャラクタリゼーションは、増大した治療有効性および減少した副作用を有する治療法のためのトランスジェニック発現構築物の設計にもまた役立ち得る。細胞または組織特異性の点での膜結合蛋白質発現の同定およびキャラクタリゼーションは、疾患の診断、予防、および処置のための機能マーカーの開発にもまた役立ち得る。「疾患」は、変化させることが望ましくあり得る生物のいずれかの状態、形質、または特質を含むが、これに限定されない。例えば、状態は物理的、生理学的、または精神的であり得、有症状または無症状であり得る。

【０２７４】

本発明の別の態様において、抗体アレイは膜結合蛋白質中の翻訳後修飾を検出するために用いられ、これはシグナル伝達経路および細胞制御を研究する際に重要であり得る。翻訳後修飾は蛋白質の特定の状態（例えば、リン酸化されている、グリコシル化されている、ファルネシル化されているなど）に特異的な抗体を用いて検出され得る。

【０２７５】

リガンドと膜貫通ポリペプチドとの間のこれらの相互作用の検出は医学的診断につながり得る。例えば、病原性微生物のアイデンティティは、公知の病原性膜貫通抗原に特異的

な膜貫通抗体の多くの種類を含有するアレイとの不明な病原体の試料の結合によって一義的に確立され得る。

【０２７６】

キット

１つの態様において、膜貫通抗体のライブラリーを含むキットが提供される。１つの態様において、膜結合蛋白質を含有または発現するビリオンのライブラリーを含むキットが提供される。いくつかの態様において、膜貫通抗体またはビリオンのライブラリーは支持体（例えば９６または３８４ウェル）中にアレイ化され得る。１つの態様において、キットは膜貫通抗体のマイクロアレイを含む。１つの態様において、キットは膜結合蛋白質を含有または発現するビリオンのマイクロアレイを含む。キットは、レポーターアッセイ基質、特定の生体経路の誘導または抑制のための試薬（サイトカインまたは他の精製蛋白質、低分子、ｃＤＮＡ、ｓｉＲＮＡなど）、および／またはデータ分析ソフトウェアをさらに含み得る。

【０２７７】

加えて、本発明の方法を実施するための、あるいは本発明の組成物、ライブラリー、アレイ、もしくは物品のアセンブリのいずれかを利用する試験またはアッセイを実施するための試薬および取扱説明書を含むキットが提供される。キットは、緩衝液、酵素、アダプター、標識、２次抗体、およびキットの使用に必要な取扱説明書をさらに含み得、任意にトラブルシューティング情報を含む。

【０２７８】

まだ別の態様において、キットは、例えば本明細書に記載される膜貫通抗体のライブラリーと、生物のプロテオームまたは膜結合プロテオームなどの膜結合蛋白質を含有または発現するビリオンのライブラリーとを含み得る。キットは、生物のプロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含み得る。キットは生物の膜結合プロテオームの少なくとも約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を含み得る。膜結合蛋白質を含有または発現するビリオンのライブラリーは、かなりの部分または全体の生物のプロテオーム、例えば細菌、ウィルス、真菌プロテオームに相当し得る。膜結合蛋白質を含有または発現するビリオンのライブラリーは、昆虫または哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、猫、犬、猿、ヤギ、またはヒトのかなりの部分または全体のプロテオームまたは膜結合プロテオームに相当し得る。例えば、生物のプロテオームライブラリーは少なくとも約１１，０００、１２，０００、１３，０００、１４，０００、１５，０００、１６，０００、１７，０００、１８，０００、１９，０００、または２０，０００個の異なる抗原を含み得る。例えば、生物のプロテオームライブラリーは少なくとも約１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、５，５００、または５，６００個の膜結合蛋白質を含み得る。

【０２７９】

本明細書においては、本明細書に開示されている方法および組成物に用いられ得る、それと併せて用いられ得る、その調製に用いられ得る、またはその産物である分子、材料、組成物、および成分が開示されている。これらの材料の組み合わせ、部分集合、相互作用、群などが開示されるときに、これらの分子および化合物の各様々な個々のおよび集合的な組み合わせおよび並べ替えの具体的な参照は明示的に開示され得ない一方で、それぞれは本明細書において具体的に考えられて記載されているということは理解される。例えば、ヌクレオチドまたは核酸が開示されて論じられて、ヌクレオチドまたは核酸を含むいくつもの分子になされ得るいくつもの改変が論じられる場合には、具体的にそれに反して表

されていない限り、ヌクレオチドまたは核酸および可能な改変のどの組み合わせおよび並べ替えもそれぞれが具体的に考えられる。この考え方は本明細書の全ての側面（開示されている方法および組成物をつくり用いる方法のステップを含むが、これに限定されない）に当てはまる。それゆえに、実施され得る種々の追加のステップがある場合には、それらの追加のステップのそれぞれは開示される方法のいずれかの具体的な態様または態様の組み合わせによって実施され得るということ、各かかる組み合わせは具体的に考えられ、開示されたと見なされるべきであるということは理解される。

【０２８０】

本明細書に記載されるいくつかの態様が本明細書において示され記載された一方で、かかる態様は例としてのみ提供されている。多数のバリエーション、変化、および置換は、本明細書において提供される開示から逸脱することなしにここで当業者には思い浮かぶであろう。本明細書に記載される態様の様々な代替が本明細書に記載される方法を実行する際に使用され得るということは理解されるはずである。

【０２８１】

別様に説明されない限り、本明細書において用いられる全ての技術および科学用語は、本開示が属する分野の業者によって普通に理解されるのと同じ意味を有する。以下の参照は本明細書において用いられ得る方法および組成物の態様を含む。The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-9119102) 、Benjamin Lewin, Genes IX, published by Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13: 9780763740634)、Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Mol. Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)、およびRobert A. Meyers (ed.), Mol. Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

【０２８２】

本開示の標準的な手順は例えばManiatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (1982) 、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (1989)、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986)、またはMethods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol. 152, S. L. Berger and A. R. Kimmerl (eds.), Academic Press Inc., San Diego, USA (1987))、 Current Protocols in Molecular Biology (CPMB) (Fred M. Ausubel, et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.)、Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.)、Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, et. al., ed. John Wiley and Sons, Inc.)、Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.)、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005)、およびAnimal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998) に記載されている。

【０２８３】

以下の例は本明細書に記載される特定の方法論、プロトコール、および組成物などに対して限定するものとして解釈されるべきではなく、そのため、変わり得るということが理解されるはずである。本明細書において用いられる以下の用語は特定の態様を記載する目的のみのためであり、本明細書において開示される態様の範囲を限定することは意図されていない。

【０２８４】

実施例

以下の例は、代表的な態様を実行するための当業者の手引きを提供するために含まれている。本開示および当分野の技術の一般的なレベルに照らして、以下の例が例示的である

ことのみを意図されているということと、多数の変化、改変、および修正が本開示の主題の範囲から逸脱することなしに使用され得るということとを当業者は認め得る。以下の総合的な記載および具体例は例示の目的のためのみを意図されており、他の方法によって開示の化合物をつくるいかなるやり方においても限定するものとして解釈されるべきではない。

【０２８５】

例１

それらの固有の立体配座にあるヒト膜蛋白質を提示する新たなハイスループットプラットフォームを開発するために、ビリオンディスプレイマイクロアレイ（ＶｉｒＤアレイと名付ける）を作製するためのビヒクルとしてヘルペスウィルスビリオンを利用した。ヘルペスウィルス、例えば単純ヘルペスウィルス１型（ＨＳＶ－１）は大きい有膜エンベロープビリオンを作り、これはウィルス糖蛋白質、例えば３つの主要糖蛋白質ｇＢ、ｇＣ、およびｇＤの高コピーを含有し、それらは環状ビリオン構造中に規則的に分布する。加えて、このウィルスＤＮＡゲノムが遺伝子操作されて、外来蛋白質をそれらの固有の構成でまたはウィルス蛋白質との融合物として発現し得る。ＶｉｒＤアレイのためには２つの戦略を探った。１）全長ヒトオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）をｇＢ座にクローニングし、強いｇＢプロモーターのコントロール下で遺伝子を発現する。２）ｇＣの膜貫通（ＴＭ）および細胞質ドメインにヒトＯＲＦを融合し、ｇＣプロモーターのコントロール下のｇＣ座においてこのキメラ遺伝子を発現する（図１ａ）。以前の研究もまたｇＣキメラ手法（Ｃ型肝炎ウィルス糖蛋白質Ｅ２）さらにはｇＣ座からの発現（ＣＤ４）を利用して、ＨＳＶ－１ビリオン中に外来蛋白質を組み込んでいる（Dolter et al. (1993) J. Virol. 67:189-95、Kouvatsis et al. (2007) Virus Res. 123:40-9）。ｇＢまたはｇＣの不在は、感染細胞中で成熟有エンベロープビリオンをアセンブリするウィルスの能力に影響しない（Cai et al. (1987) J. Virol. 61:714-21、Holland et al. (1984) J. Virol. 52:566-74、Homa et al. (1986) J. Virol. 58:281-9）。２つの手法の実現可能性を試験するために、単一のＴＭドメインを有する古典的なＩ型膜蛋白質としてＣＤ４、マルチスパンＧ蛋白質共役受容体膜蛋白質の代表としてＧＰＲ７７を選んだ。ＣＤ４はＴリンパ球の良くキャラクタリゼーションされた膜糖蛋白質であり、主要組織適合性複合体クラスＩＩ抗原と相互作用し、ヒト免疫不全ウィルスの受容体でもまたある（Carr et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:21286-95）。ＧＰＲ７７は自然免疫応答の補体システムに関与しており、カノニカルなリガンドが同定されている（すなわち補体成分Ｃ５ａ）（Cain & Monk (2002) J. Biol. Chem. 277:7165-9）。ＨＳＶ－１ビリオン中にこれらの２つのヒト膜蛋白質を発現および提示するために両方の戦略を使用した。１つの目標は、ＨＳＶ－１ビリオン中へのこれらのヒト膜蛋白質の発現および組み込みを検討することであり、高密度でガラス表面上に固定化された精製ビリオン中において、それらの固有の形態でこれらのヒト膜蛋白質が維持されるかどうかを特定することであった。

【０２８６】

組み換え法を用いて４つのウィルスを生成した（詳細は下の補足の材料および方法参照）。組み換えウィルスｇＢ：ＣＤ４およびｇＢ：ＧＰＲ７７は、固有のｇＢプロモーターのコントロール下でｇＢ座において全長ヒト膜蛋白質を発現する。生化学的検出目的のために、両方の蛋白質のＣ末端にＶ５エピトープタグをもまた組み込んだ。ウィルスはＣＤ４－ｇＣおよびＧＰＲ７７－ｇＣとラベリングされ、ウィルステグメントへのアンカリングのために要求されるＴＭおよび短い細胞質ドメインを含有するｇＣのＣ末端ドメイン（すなわち４９７～５１１ａａ）に融合したヒト膜蛋白質を発現する。ｇＢ座にクローニングされたヒト遺伝子のように、固有のｇＣプロモーターのコントロール下のｇＣ座にｇＣキメラをクローニングした。

【０２８７】

ＣＤ４およびＧＰＲ７７が発現されて分泌経路中で正しくプロセシングされたかどうかを検討するために、組み換えおよび親ウィルスに感染したヒト線維芽細胞を、ＨＳＶ－１のｇＤ、ＧＰＲ７７、およびＣＤ４のエクトドメインに対する抗体によって細胞表面局在

について染色した（図１ｂ）。ｇＤは感染細胞の表面に検出された（図１ｂ、差込図）。ｇＢプロモーターからまたはｇＣキメラ蛋白質として発現されたＣＤ４は、細胞表面に類似の強いシグナルを示した。ＧＰＲ７７は細胞表面に検出されたが、ｇＢプロモーターから発現されたかまたはｇＣキメラとして発現されたかに依存して異なる分布を有した。これらの結果は、ＣＤ４およびＧＰＲ７７がｇＤのようにＨＳＶ－１ゲノムから発現され、カノニカルな分泌経路を介して原形質膜の表面に送達されたということを示している。ＣＤ４およびＧＰＲ７７は、Ｖ５抗体による染色によって判定される予想される細胞内分布をもまた提示する（図１ｂ、右パネル）。ＣＤ４の細胞内分布は抗ＣＤ４または抗Ｖ５抗体によって染色されたときに類似であった（図３）。

【０２８８】

少なくともＶ５タグづけヒト蛋白質の発現のさらなる生化学的証拠は、感染細胞の総ライセートのイミュノブロット分析を用いて得られた（図１ｃ、左パネル）。これらのヒト膜蛋白質のビリオン組み込みもまた検討した。野生型およびｇＢヌル（Ｋ０８２）ビリオン（Cai et al. (1987) J. Virol. 61:714-21）、さらにはｇＢ：ＣＤ４、ｇＢ：ＧＰＲ７７ビリオンを精製し、抗Ｖ５抗体による同じイミュノブロット分析に供した。ｇＢ：ＣＤ４およびｇＢ：ＧＰＲ７７ビリオンは両方ともＣＤ４およびＧＰＲ７７の予想分子量の強い抗Ｖ５反応性を示した一方で、他のビリオンにおいては検出可能なシグナルは観察されなかった（図１ｃ、右パネル）。抗ｇＤ抗体はローディングコントロールとして用いた。一緒にすると、これらのデータからは、ＣＤ４およびＧＰＲ７７が両方とも合成されて、感染ヒト細胞中で作られたビリオン中に組み込まれたということが確認された。

【０２８９】

ヒト蛋白質がビリオン組み込み後に正しい向きで提示され得るということを実証するために、ＣＤ４のエクトドメインを認識するＰＥ標識抗体によって染色された精製ビリオンのフローサイトメトリー分析を実施した（図１ｄ）。カプシド中にＶｅｎｕｓ蛍光蛋白質を組み込んでいるＨＳＶ－１組み換えウィルスを用いて、精製ビリオンを同定およびゲーティングした（下の補足の材料および方法参照）。Ｋ０８２ビリオンは抗体結合特異性のネガティブコントロールとして用いた。ゲーティングされたビリオン集団中に検出されたＰＥ蛍光の量から判定して、ｇＢ：ＣＤ４ビリオンの８５．５％がＰＥ抗体によって標識されており、やや多くＣＤ４－ｇＣビリオンの９６．１％がＰＥ抗体に結合していた。これらの結果は、類似の実験条件を用いる異なるビリオン調製物からのデータと矛盾しなかった。この観察は、検出のために化学発光基質を用いる標準的なＥＬＩＳＡ分析を用いてさらに確認された（図４）。全てのビリオン調製物は予想される通り抗ｇＤ抗体によって染色された。ＣＤ４またはＧＰＲ７７を発現するビリオンをそれぞれの抗体によって染色した。ＫＯＳまたはＫ０８２ビリオンではＣＤ４およびＧＰＲ７７抗体の反応性はほとなどまたは全くなかった。その抗原に対するこのモノクローナル抗体のより高い親和性ゆえに、抗ｇＤ抗体によって観察されたシグナルは著しくより高かった。まとめると、これらの結果からは、これらの蛋白質の細胞外ドメインを認識する抗体によって認識され得る正しい向きでヒト膜蛋白質が組み込まれたということが実証され、それらの固有の立体配座でビリオンエンベロープ中に埋め込まれたということを示した。

【０２９０】

これらの組み換えビリオンがそれらの機能的インテグリティを維持する一方で、高密度でマイクロアレイフォーマットで固定化され得るかどうかを試験するために、組み換えビリオンを様々な力価で異なるガラス表面上にスポットした。抗ｇＤ抗体を用いて、スポットあたり５０，０００ビリオン（ＫＯＳプラーク形成単位）ほども低い最適な検出がニトロセルロースコーティングスライド（すなわちFAST）によって提供され、力価が＞４００，０００ビリオンまで増大した後に抗ｇＤシグナルが飽和に達し始めるということが特定された（図５）。ゆえに、４×４フォーマットでスポットあたり８００，０００ビリオン（ＫＯＳプラーク形成単位）の力価で７つの異なるウィルス調製物によってＶｉｒＤアレイを構築することを決定した。

【０２９１】

ガラス上の固定化されたビリオンのインテグリティを可視化および検討するために、これらのアレイを抗ｇＤエクトドメインおよび抗ＶＰ５抗体によって染色した。これらの後者は主要カプシド蛋白質ＶＰ５を認識する。全ての７つのビリオンは強い抗ｇＤシグナルを示したが、よりずっと低い抗ＶＰ５シグナルを示し、固定化されたビリオンの大多数がインタクトであるということを表した（図２ａ、左パネル）。この結論は、ＮＰ４０を用いる軽い界面活性剤処理によってビリオンエンベロープをストリッピングした後にＶｉｒＤアレイ上の抗ｇＤシグナルが大いに減少したという観察によってさらに支持された（図２ａ、右パネル）。対照的に、強い抗ＶＰ５シグナルがこの処理後の全ての７つのビリオンにおいて見られた。その上、抗ｇＢおよびｇＣ抗体によってＶｉｒＤアレイを染色することによって、それぞれｇＢ：ＣＤ４／ＧＰＲ７７およびＣＤ４／ＧＰＲ７７－ｇＣにおいてｇＢおよびｇＣ蛋白質の不在が確認された（図６）。

【０２９２】

グリコシル化はヒト膜蛋白質活性にとって重要であるので、ＶｉｒＤアレイ上でグリカン構造をプロファイリングするために蛍光標識レクチンを使用した（すなわち、ＳＮＡ－ＩＩ、ＰＨＡ－Ｌ、ＣＡ、およびＷＧＡ）（Tao et al. (2008) Glycobiology 18:761-9、Kung et al. (2009) Mol. Syst. Biol. 5:308）。野生型、ｇＢ－ＫＯ（Ｋ０８２）、およびｇＣ－ＫＯ（ｇＣΔ３９）（Homa et al. (1986) J. Virol. 58:281-9）ビリオンの間のレクチン染色パターンの比較から、ｇＣがｇＢよりも重度にグリコシル化されていることが示された。なぜなら、すべての４つのレクチンはよりずっと弱い結合シグナルをｇＣ－ＫＯビリオンに対して示したからである（図２ｂ）。レクチンＣＡ染色パターンのより入念な分析（Ｇａｌβ（１－４）ＧｌｃＮＡｃ、ＧａｌＮＡｃβ（１－４）ＧｌｃＮＡｃ、またはＮｅｕＡｃα（２－６）Ｇａｌβ（１－４）ＧｌｃＮＡｃを認識する）から、ＣＤ４が非常に高い可能性でグリコシル化されているということが明らかにされた。これは、ＣＤ４－ｇＣ（すなわちｇＣ－）ビリオンがｇＣ－ＫＯおよびＧＰＲ７７－ｇＣ（すなわちｇＣ－）ビリオン両方よりも著しく高いシグナルを示したからである。この観察は、同じＳＮＡ－ＩＩ（末端Ｇａｌβ、ＧａｌＮＡｃβ、またはＮｅｕＡｃα（２－６）Ｇａｌβ（１－４）ＧｌｃＮＡｃを認識する）染色パターンによってさらに支持された。なぜなら、Consortium for Functional Glycomics（CFG）ゲートウェイのレクチン特異性のデータベース（ＩＳＳＮ：１７５２－１８４Ｘ）に基づくと、ＳＮＡ－ＩＩはＣＡと同じグリカン構造または部分的なグリカン構造を認識するはずだということが公知だからである（図２ｂ）。興味深いことに、非常に類似のグリカン構造ＮｅｕＡｃα（２－３）Ｇａｌβ（１－４）ＧｌｃＮＡｃが質量分析手法を用いてＣＨＯ細胞内で発現されたマウスＣＤ４上に以前に同定されており、本観察が間接的に支持される（Carr et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:21286-95）。ゆえに、ヒトＣＤ４はＮｅｕＡｃα（２－６）Ｇａｌβ（１－４）ＧｌｃＮＡｃによってグリコシル化されている可能性が非常に高い。しかしながら、ＧＰＲ７７と結びついた具体的なグリカン構造は、恐らくこの研究において用いられたレクチンの限定された数を原因としてはっきりとは特定され得なかった。それにもかかわらず、上の結果からは、ビリオンディスプレイされたヒト膜蛋白質が予想されるグリコシル化を示したということが示唆される。

【０２９３】

ガラス表面に固定化されたビリオンの表面に提示されたヒトＣＤ４およびＧＰＲ７７蛋白質が正しい向きにあるかどうかを特定するために、ＣＤ４またはＧＰＲ７７のエクトドメインをそれぞれ認識する抗体によってＶｉｒＤアレイを染色した（図２ｃおよび２ｄ）。強い特異的な染色シグナルがそれぞれｇＢ：ＣＤ４およびＣＤ４－ｇＣ、ｇＢ：ＧＰＲ７７およびＧＰＲ７７－ｇＣビリオン中に観察された。これは、これらの蛋白質が正しい向きにあり、両方の膜蛋白質提示戦略が成功したことを表している。

【０２９４】

最後に、ビリオンディスプレイされたヒト膜蛋白質が活性立体配座にあるということを実証するために、ＶｉｒＤアレイをＧＰＲ７７の蛍光標識されたカノニカルなリガンド（補体アナフィラトキシンＣ５ａ）によってプロービングした（より詳細は下の補足の材料

および方法参照）。図２ｄの右パネルに示されている通り、Ｃｙ５標識Ｃ５ａは、ｇＢ：ＧＰＲ７７ビリオンに対してはより弱い結合シグナルだが、アレイ上のＧＰＲ７７－ｇＣビリオンに対しては強い結合活性を示した。検出可能なシグナルは他のビリオンでは観察されず、ＶｉｒＤアレイ上のＧＰＲ７７とＣ５ａとの間の相互作用が高度に特異的であるということが示唆された。まとめると、これらの結果から、ＧＰＲ７７がビリオン上に正しく提示されており、ＶｉｒＤアレイ上でその機能的な立体配座を維持しているということが実証された。

【０２９５】

異なる担体システムを用いて、様々なフォーマットでの可溶性ペプチドまたは蛋白質の提示が有効であった（Li (2000) Nat. Biotechnol. 18:1251-6）。この研究においては、固体ガラス表面に高密度に固定化された遺伝子操作されたＨＳＶ－１ビリオンのエンベロープ上にヒト膜蛋白質を提示するＶｉｒＤアレイの作製を実証した。抗体およびレクチンを用いて、２つのヒト膜蛋白質ＣＤ４およびＧＰＲ７７が正しい向きにあり、可能性としてグリコシル化されているということが示された。ビリオンによって提示されたＧＰＲ７７がその活性立体配座にあるということが、その対応するリガンドＣ５ａとの結合アッセイによってさらに実証された。ＶｉｒＤアレイ手法は、以下を含むがこれに限定されない利点を有する。１）提示されたヒト膜蛋白質はヒト細胞膜（それらの固有の立体配座を維持することを助け得るより生理学的に意義のある環境）中に埋め込まれており、２）ＧＰＲ７７で実証された通り、複数のＴＭドメインを有する膜蛋白質はビリオンエンベロープ中で正しくフォールディングする可能性が高く、３）ウィルスはヒト分泌経路を使うので、提示されたヒト蛋白質は分泌経路を輸送されることでそれらのカノニカルな翻訳後修飾（ＰＴＭ）を維持する可能性が高く、これはレクチン結合アッセイによって実証されており、４）ＶｉｒＤアレイは直ちにハイコンテントプラットフォームへと変形されると予想され、これは単一のガラススライド上においてそれらの固有の立体配座に近いヒト膜蛋白質のほぼ全てを提示し得る。ひとたびかかるハイスループットプラットフォームが確立されると、膜蛋白質に対する新規の薬物標的同定のためのハイスループットスクリーニングの性能によって、受容体の様々な種類のリガンドを同定することと、膜蛋白質のＰＴＭをプロファイリングすることとが許されるであろう。

【０２９６】

補足の材料および方法

細胞およびウィルス．ベロ細胞、形質転換ベロ細胞株、およびヒト包皮線維芽細胞（ＨＦＴ）は１０％ＦＣＳを補ったα培地（Gibco-Invitrogen）の最小必須培地で育て、Desaiら（Desai et al. (1998) Virology 247:115-24）によって記載されている通り継代した。ＨＦＴは不死化細胞株であり、ヒトテロメラーゼを発現するレトロウィルスによってトランスダクションされている（Hahn et al. (1999) Nature 400:464-8）。Ｄ６（ＵＬ２７形質転換）を、ｇＢ座から遺伝子を発現する組み換えウィルスの増殖のための宿主細胞として用いた（Cai et al. (1987) J. Virol. 61:714-21）。Ａ１．１（ＵＬ２７およびＵＬ２８形質転換）細胞株（Tengelsen et al. (1993) J. Virol. 67:3470-80）をマーカーレスキュー／マーカートランスファー法に用いて、クローニングされたヒト遺伝子をｇＢ座に導入し（Desai et al. (1994) Virology 204:312-22）、ピッツバーグ大のFred Homaからの厚意によるギフトであった。野生型親ウィルス株ＫＯＳ（ＨＳＶ－１）ならびに変異体および組み換えウィルスのストックは以前に記載されている通り調製した（Desai et al. (1998) Virology 247:115-24）。

【０２９７】

抗体．ヒトＣＤ４およびＧＰＲ７７に対して反応性の抗体はSanta Cruz BiotechnologyおよびSigma-Aldrichから購入した。フローサイトメトリー分析に用いたＰＥコンジュゲーション抗ＣＤ４抗体はBD Biosciencesから得た。Ｖ５モノクローナル抗体はInvitrogen Life Technologiesから購入した。抗ＨＳＶ－１－ｇＢ抗体クローンＢ６および抗ｇＣ抗体はJoseph Glorioso（ピッツバーグ大）からの厚意によるギフトであった。抗ＨＳＶ－１－ｇＤ抗体ＤＬ６はDavid Johnson（OHSC）ならびにGary CohenおよびRoz Eisenberg（

ペンシルベニア大）からの寛大なギフトであった。ＶＰ５抗体ＬＰ１２はTony Minson（ケンブリッジ大，UK）によって厚意により提供された。

【０２９８】

プラスミド．プラスミドｐＫΔ４ＢはCaiら（Cai et al．(1988) J．Mol．Biol．201:575-88）に由来し、その後に糖蛋白質Ｂ遺伝子のリンカー挿入変異体の遺伝子操作を行った。ｇＢのアミノ酸４３～７１１をコードするＤＮＡ配列を欠失させ、蛋白質リーディングフレームを維持するようにＢｇｌＩＩ制限部位を追加した（Cai et al．(1988) J．Mol．Biol．201:575-88）。ｐＫΔ４ＢをＸｈｏＩおよびＢｇｌＩＩによって消化し、antarticホスファターゼ（ＮＥＢ）によって処理し、１～４３の全てのｇＢアミノ酸を欠失する（ｇＢΔＳＳ）がｇＢプロモーター配列を保持するｐＫΔ４Ｂから増幅したＸｈｏＩ－ＢｇｌＩＩのＰＣＲ断片とライゲーションした（表１）。このプラスミドはｐＫｇＢΔＳＳと名づけた。７１１～７９６にわたるｇＢアミノ酸の配列をカセットＰＣＲ変異導入によってｐＫｇＢΔＳＳから欠失させた。ＰＣＲ断片をＢｇｌＩＩ－ＢａｍＨＩとしてｐＫｇＢΔＳＳにクローニングし、もたらされたプラスミドはｐＫｇＢＰＲとラベリングした。ヒトＣＤ４およびＧＰＲ７７配列をUltimate ORFコレクション（Life Technologies）からのプラスミドから増幅した。Ｖ５エピトープをコードする配列はリバースプライマー中に含まれた（表１）。最終的なｇＢプロモーターによって駆動される遺伝子プラスミドはｐＫｇＢ：ＣＤ４およびｐＫｇＢ：ＧＰＣＲ７７とラベリングした。ウィルスゲノム中への導入に先立って異なるプラスミドの配列分析を行った。プラスミドを相同組み換えのためにＢａｍＨＩによって直線状化した。

【０２９９】

【表１－１】

表１．プライマー配列

プライマー	配列（5′-3′）
UL28-Xho1-F	CTTTGCCTCGGTCTACCGGTGCGGGG （配列番号１）
gBΔSS-Bglll-R	GGGAGATCTGAGGCGGGACTACGGGGGCCCGTCG （配列番号２）
gB-797-Bglll-F	GGGAGATCTGGGTGGAGGTGGAGGTTACGTCATGCGGCTGCAGAGCAAC （配列番号３）
gB-nc-BamH1-R	GGGATCCCAACCGGAGGCATCCAAC （配列番号４）
gB-CD4-Bglll-F	GGCAGATCTACCATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGG （配列番号５）
gB-CD4V5-Bglll-R	CCCAGATCTCTACGTAGAATCTAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCAATGGGGCTACATGTCTTCTGAAA（配列番号６）
gB-GPR77-Bglll-F	GGCAGATCTACCATGGGGAACGATTCTGTCAGCTAC （配列番号７）
gB-GPR77V5-Bglll-R	CCCAGATCTCTACGTAGAATCTAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCAATGGGGCTACATGTCTTCTGAAA（配列番号８）
gC-KAN-F	GGGGGGACCAAACTATATAGATATTAAAAAGGTAACGGGGG

【表１－２】

	GGTCTTGCGTTACCGCCGATGACGCTGCCGCGA（配列番号9）
gC-KAN-R	GGGGGGACCAAACTATATAGATATTAAAAAGGTAACGGGGGG GTCTTGCGTTACCGCCGATGACGCTGCCGCGA（配列番号10）
CD4-F	GGAATTCAACATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGG（配列番号11）
CD4-R-Overlap	CCCGATTCCAATTGGCTGCACCGGGGTGGACCATGT（配列番号12）
gC-F-Overlap	CCGGTGCAGCCAATTGGAATCGGGGTTCTCGCGGCG（配列番号13）
gC-R	GGGGATCCTTACCGCCGATGACGCTGCCGCGA（配列番号14）
GPR77-F	GGAATTCACCATGGGGAACGATTCTGTCAGCTAC（配列番号15）
GPR77-R-Overlap	CCCGATTCCAATGGGTTCAGCCCGCAGGGCCCTGGC（配列番号16）
gC-F-Overlap	CGGGCTGAACCCATTGGAATCGGGGTTCTCGCGGCG（配列番号17）
gC-RedET(CD4)-F	CGCTTTGCCGGGAACGCTAGCCGATCCCTCGCGAGGGGGA GGCGTCGGGCACCATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGG（配列番号18）
gC-RedET(GPR77)-F	CGCTTTGCCGGGAACGCTAGCCGATCCCTCGCGAGGGGGA GGCGTCGGGCACCATGGGGAACGATTCTGTCAGCTAC（配列番号19）
gC-RedET-R	GGGGGGACCAAACTATATAGATATTAAAAAGGTAACGGGGGG GTCTTGCGTTACCGCCGATGACGCTGCCGCGA（配列番号20）

【０３００】

マーカーレスキュー／マーカートランスファーアッセイ．ＵＬ２８のマーカーレスキューおよびｇＢ：ヒトＯＲＦ遺伝子のマーカートランスファーは、Desaiら（Desai et al. (1994) Virology 204:312-22）に記載された方法を用いて達成した。６０ｍｍペトリ皿のＡ１．１細胞単層（１×１０^{6}）を、２５μｌの感染細胞ＤＮＡ（ＫΔ４ＢＸ）および０．１～０．０５μｇの直線状化されたプラスミドＤＮＡによってリン酸カルシウム沈殿法を用いてコトランスフェクションした。プラークが見え始めたときに（トランスフェクションの７２ｈ後）、細胞単層を採取し、１回凍結／融解し、ソニケーションし、総計の仔

ウィルスを力価測定した。Ｄ６細胞上でのシングルプラーク精製によって組み換えウィルスを単離した。追加のプラーク精製はＤ６細胞株上での限界希釈によって行った。

【０３０１】

Red-ET組み換え．ＫＯＳ－ＢＡＣ３７ゲノム（Gierasch et al. (2006) J. Virol. Methods 135:197-206）をこの方法のためにTOP10細胞（Stratagene）にトランスファーした。ＫＯＳ－ＢＡＣ３７はDavid Leib（ダートマス大，NH）によって厚意により提供された。ｇＣキメラ融合物を遺伝子操作してウィルスゲノム中に入れる手順は、Gene Bridges Red-ET法および提供されたプロトコールを用いた（Zhang et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18:1314-7）。ｇＣ相同配列によって囲まれたカナマイシンカセットを、gC-Kan-FおよびgC-Kan-Rプライマーならびにに pRPSL-neoを鋳型として用いて増幅した。このカナマイシン遺伝子をＫＯＳ－ＢＡＣ３７中に導入し、ｇＣ遺伝子を置き換えた。カナマイシンプレート上で育ったコロニーを、次ステップの前にストレプトマイシン感受性についてスクリーニングした。ＣＤ４－ｇＣおよびＧＰＲ７７－ｇＣ融合遺伝子は表１に列挙されたプライマーを用いてオーバーラップＰＣＲ法を用いてつくられた。ＣＤ４－ｇＣおよびＧＰＲ７７－ｇＣキメラ融合物は表１に列挙されたRedETプライマーを用いて増幅し、カナマイシン遺伝子を置き換えるために用いた。正しいキメラ遺伝子を持つ成功した分離株をＰＣＲアッセイによって同定し、感染性ウィルスの再構成に先立ってＢＡＣゲノム中の挿入遺伝子をシーケンシングした。

【０３０２】

感染性ウィルスを再構成するためのバクミドＤＮＡのトランスフェクション．糖蛋白質Ｃキメラ遺伝子融合物を持つＫＯＳバクミドを、PureLink核酸精製キット（Life Technologies）を用いて調製した。Lipofectamine 2000試薬（Life Technologies）を用いて１２ウェルトレイ中のベロ細胞（５×１０^{5}）にバクミドＤＮＡをトランスフェクションした。プラークは一般的に３日後に見え始め、この感染細胞ライセートを用いて、ｇＣキメラウィルスのそれぞれのワーキングストックを増幅および調製した。

【０３０３】

ウェスタンブロット分析．感染細胞抽出物をＳＤＳ－ＰＡＧＥによってＭＥＳ緩衝液中で分解し、メーカーのプロトコールに従ってiBlot装置（Life Technologies）を用いてiBlot膜（Life Technologies）にトランスファーした。トランスファーした膜を穏やかな振とうをしながら１時間室温でブロッキング緩衝液（５％無脂肪乳を含むＴＢＳ）によってブロッキングし、次に、穏やかな振とうをしながら１時間室温で１次抗体（ブロッキング緩衝液中の１：５０００希釈物）と一緒にインキュベーションした。振とうしながら３回ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ２０（ＴＢＳＴ）緩衝液によって５ｍｉｎ膜を洗浄した。穏やかな振とうをしながら１時間、ブロッキング緩衝液中において５，０００倍希釈で、膜と一緒にＨＲＰコンジュゲーション抗マウス抗体（GEヘルスケア）をインキュベーションした。振とうしながら３回、ＴＢＳＴ緩衝液によって５ｍｉｎ膜を洗浄し、ECL Plusウェスタンブロット検出試薬（GEヘルスケア）と一緒に５ｍｉｎインキュベーションした後に、ImageQuant LAS 4000イメージングシステム（GEヘルスケア）によってシグナルを可視化した。

【０３０４】

免疫蛍光および共焦点分析．LabTek（＃１ホウケイ酸ガラス）４ウェルチャンバースライド中のＨＦＴ細胞（６×１０^{5}細胞）を、細胞あたり１０プラーク形成単位（ＰＦＵ）の多重感染度（ＭＯＩ）で感染させた。感染細胞をＤＰＢＳ（ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水）によって２×洗浄し、ＤＰＢＳ中の４％パラホルムアルデヒドによって２５ｍｉｎ固定し、ＤＰＢＳによって２×洗浄して、ＤＰＢＳ中の０．２５％トリトンＸ－１００によって３０ｍｉｎ透過処理した。透過処理後に、細胞をＤＰＢＳ中の３％ＢＳＡによって２×洗浄し、非特異的な反応性を同じ緩衝液中で３０ｍｉｎブロッキングした。細胞表面標識のためには、界面活性剤透過処理ステップを省略し、細胞をブロッキング緩衝液と一緒にインキュベーションした。１次抗体を３％ＢＳＡ／ＤＰＢＳ中で希釈し、２５０μｌを各チャンバーウェルに６０ｍｉｎ追加した（室温）。続いて、細胞を３％ＢＳＡ／Ｄ

ＰＢＳによって３×洗浄し、次にＣｙ３標識２次抗体（Jackson Laboratories）と一緒に４５ｍｉｎインキュベーションした（室温）。細胞を３％ＢＳＡ／ＤＰＢＳによって３×洗浄し、次にイメージングに先立ってFluormount G（EMS）中でインキュベーションした。染色された感染細胞をZeiss LSM510共焦点顕微鏡で分析した。大部分のイメージは１エアリー単位に設定されたピンホールによって集められた。

【０３０５】

ビリオン調製．細胞外ビリオンはＨＦＴ細胞から調製した。一般的に、１００ｍｍペトリ皿中の８．６×10^6細胞を１０ＰＦＵ／細胞のＭＯＩで感染させた。培養培地を感染後７２ｈに採取し、遠心分離によって３５００ｒｐｍで３０ｍｉｎ、４℃で清澄化した。上清を２０％ショ糖クッション（Ｗ／Ｖ、増殖培地中）上に積層し、Beckman SW41（３９Ｋ、３０ｍｉｎ）またはSW32（２４Ｋ、６０ｍｉｎ）によって遠心分離した。ビリオンペレットをＰＢＳ中に４℃で一晩再懸濁し、次に爾後の分析のために用いた。ＶｉｒＤアレイ印刷のために、ビリオン調製物をＰＢＳ＋３５％グリセロール中に再懸濁した。

【０３０６】

フローサイトメトリー．細胞外ビリオン（１５０μｌの体積）をＰＥコンジュゲーションｆｌｏｗ抗体（２０μｌ）と一緒にインキュベーションし、暗所で１時間、室温（チューブ振とう機）でインキュベーションした。ビリオン（ＰＢＳによって体積を５００μｌに調整）を、次に６０ｍｉｎ、１６０００ｇでエッペンドルフチューブ中の２０％ショ糖クッション（２５０μｌ）中を沈降させた。上清を捨て、ウィルスペレットを２００μｌのＰＢＳ中に再懸濁した。標識されたビリオンを、DIVAソフトウェア（バージョン６．１．３）を用いてBD FACSARIA II機で分析した。

【０３０７】

酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）．ビリオンの段階希釈物をNunc MaxiSorp平底９６ウェル白色プレート中でインキュベーションした。シールしたプレートを４℃で２日間インキュベーションした。ウェルを各回プラットフォームシェイカー上で５ｍｉｎ、３×、ＰＢＳ＋０．０２％Ｔｗｅｅｎ－２０（ＰＢＳ＋Ｔ２０）によって洗浄し、次に室温で６０ｍｉｎ、ＰＢＳ＋Ｔ２０中の２％ＢＳＡによってブロッキングした。１次抗体希釈物をブロッキング緩衝液中で一般的に１：２０００～１：２５０につくり、６０ｍｉｎインキュベーションした。２次ＨＲＰコンジュゲーションマウス抗体は１：１０００濃度で用いた。プレートは、１次および２次抗体結合両方の後に各洗浄５ｍｉｎでＰＢＳ＋Ｔ２０によって３×洗浄した。反応をSuperSignal ELISA Pico（Pierce）化学発光基質を用いてメーカーの手順に従って定量し、プレートをGlomaxルミノメータによって読み取り、ＲＬＵ（４２５ｎｍ）を特定した。

【０３０８】

ＶｉｒＤアレイ作製．精製ビリオンを３８４ウェルプレートにアレイ化し、ネガティブコントロールとしてのＢＳＡと並べて４×４パターンでFASTスライド（Whatman）上にスポットした。印刷したアレイは-８０℃で保管した。

【０３０９】

ＶｉｒＤアレイ上での抗体アッセイ．ＶｉｒＤアレイをブロッキング緩衝液（３％ＢＳＡを含むＴＢＳ）によって室温で１時間穏やかな振とうをしながらブロッキングし、次に、穏やかな振とうをしながら１時間、室温で１次抗体（１：１０００希釈、ブロッキング緩衝液中）と一緒にインキュベーションした。アレイを振とうしながら３回、ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ２０（ＴＢＳＴ）緩衝液によって５ｍｉｎ洗浄した。ヒトまたはウィルス蛋白質の存在を可視化するために、Ｃｙ５標識抗マウス抗体（The Jackson Laboratory）をブロッキング緩衝液中において１，０００倍希釈でアレイ上でインキュベーションした。アレイを振とうしながら３回ＴＢＳＴ緩衝液によって５ｍｉｎ洗浄し、水で手短かに濯ぎ、遠心によって乾燥した。スライドをGenePix 4000Bスキャナ（MDS Analytical Technologies）によって最後にスキャンした。

【０３１０】

ＶｉｒＤアレイ上でのリガンド結合アッセイ．ＶｉｒＤアレイを穏やかな振とうをしな

がら室温で１ｈ、１％ＢＳＡを含むＴＢＳＴ中でブロッキングした。Ｃ５ａ（Abcam）をCy5 NHS Easter（GEヘルスケア）によって標識し、穏やかな振とうをしながら１ｈ、室温のリガンド結合緩衝液（１ｍＭの$MgCl_2$、２ｍＭの$CalCl_2$、０．２％ＢＳＡ、および２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４）中において１μＭでＶｉｒＤアレイ上でインキュベーションした。アレイを振とうしながら３回、氷冷洗浄緩衝液（０．５ＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ中、ｐＨ７．４）中で５ｍｉｎ洗浄し、遠心によって乾燥し、上に記載されている通りスキャンした。

【０３１１】

ＶｉｒＤアレイ上でのレクチン結合アッセイ．ＶｉｒＤアレイを穏やかな振とうをしながら１ｈ、１％ＢＳＡを含むＰＢＳ中でブロッキングした。レクチン（EY Laboratories）をCy5 NHS Easter（GEヘルスケア）によって標識し、穏やかな振とうをしながら１ｈ、室温の０．５ｍＭの$CaCl_2$および１％ＢＳＡを含むＰＢＳ中において１μｇ／ｍｌでＶｉｒＤアレイ上でインキュベーションした。アレイを振とうしながら３回ＰＢＳＴ中で５ｍｉｎ洗浄し、遠心によって乾燥し、上に記載されている通りスキャンした。

【０３１２】

例２

発現ベクターに膜結合蛋白質をコードするヒトＯＲＦをサブクローニングすること．

膜結合蛋白質をコードするヒトＯＲＦのライブラリーの実にいろいろなデスティネーションベクターへの高度に効率的なサブクローニング（全てイン・フレーム、制限酵素の使用なし）のためには、ファージλインテグレーション蛋白質に基づくGATEWAY（商標）テクノロジーが利用される（図２０）。膜結合蛋白質をコードするヒトＯＲＦに相当するコレクションをGateway（商標）エントリーベクターにクローニングする。これは様々なGateway（商標）デスティネーションベクターへのインサートの便利なサブクローニングを許し、種々の宿主（ビリオン、Ｅ．ｃｏｌｉ（図２４）、酵母、バキュロウィルス、ＣＨＯ細胞、および哺乳類細胞株を含む）、さらには無細胞転写および翻訳共役システムにおける標的蛋白質の発現および機能分析のために用いられる。ライブラリーを入手した後に、ヒト膜結合蛋白質発現ライブラリーをビリオンにサブクローニングし、ほとんど完全なヒト膜結合プロテオームマイクロアレイ（Ｈｕ－ＭＢＰＭ）の構築を可能にする。

【０３１３】

続いて、膜結合蛋白質をコードする全てのヒトＯＲＦ（約５，６００）をサブクローニングし、成功率を制限消化によって確認する。蛋白質を発現する発現ベクターまたはビリオンを生成するために用いられる全ての出発クローンは、それらのＯＲＦを完全にシーケンシングする。２００個のランダムに選択されたビリオンクローンのスポットシーケンシングは、ウェルの１００％正しいアサインメントを示しており、すなわちコレクションの品質の非常に高い信頼性が提供される。そのコレクション全体の５’ジャンクションを検証ステップとしてシーケンシングする。コレクションの３つのレプリケートを調製し、その１つからエントリープラスミドＤＮＡを抽出し、このプラスミドＤＮＡの品質をアガロースゲル上で特定する。もたらされる組み換え体を次に細菌に形質転換し、シングルコロニーをＡｍｐ含有ＬＢ寒天プレート上で選択する。各組み換えについて、４つのシングルコロニーをピッキングしてグリセロールストックを生成し、その２つをさらにプロセシングして９６ウェルフォーマットでプラスミドＤＮＡを抽出する。抽出したプラスミドＤＮＡを制限酵素によって消化し、インサートを放出し、アガロースゲルに流して、成功したサブクローニングの指標としてベクターおよびインサートのサイズを検討する。各制限消化は予想されるインサートサイズに基づいてスコアリングし、成功率を特定する。検証は２００個のランダムに選択されたＬＲクローンに対してシーケンシングによって実施される。確認したＬＲ構築物を再アレイ化して、ビリオンのための発現クローンのマスターセットを生成する。類似の大スケールクローニングが細菌発現ベクターにおいて完了している。この実験は、ヒト膜結合蛋白質発現ライブラリー全体の５’ジャンクションシーケンシングを完了したヒト発現ベクターによって反復される。

【図１ａ】

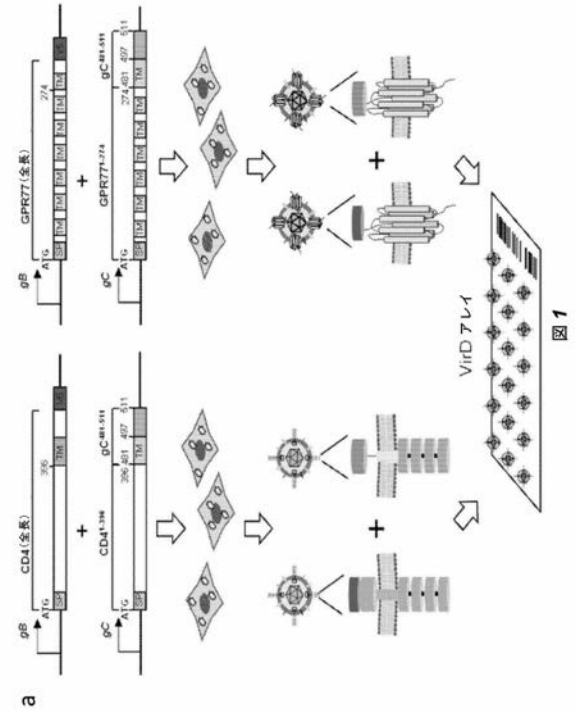


図 1

【図１ｂ】

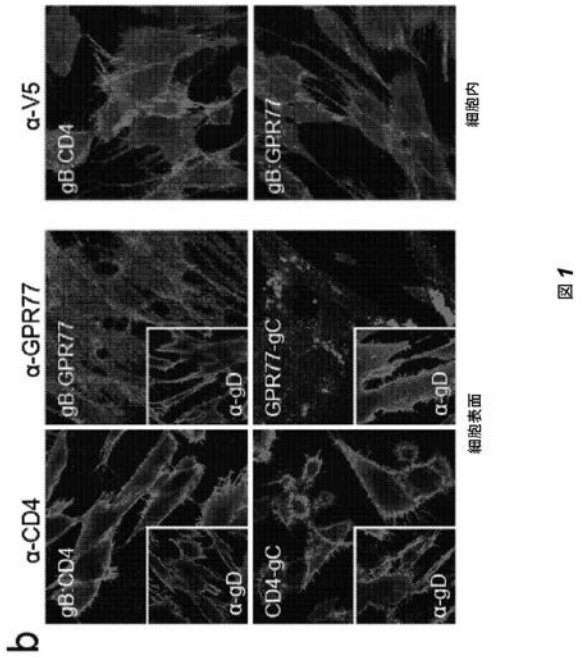


図 1

【図１ｃ】

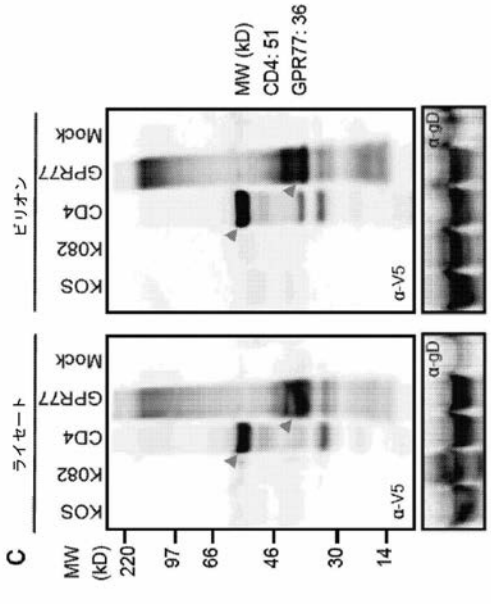


図 1

【図１ｄ】

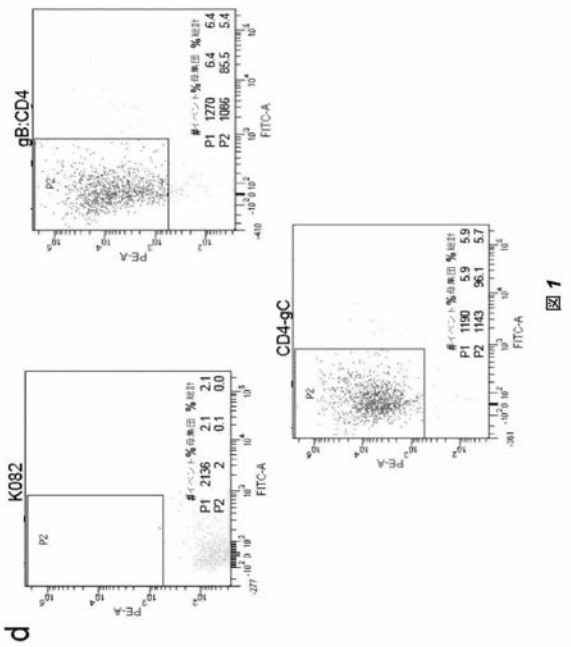


図 1

【図２ａ】

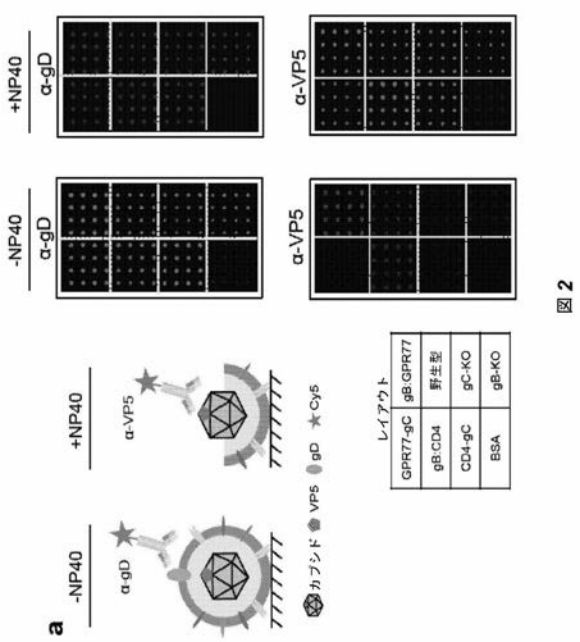


図２

【図２ｂ】

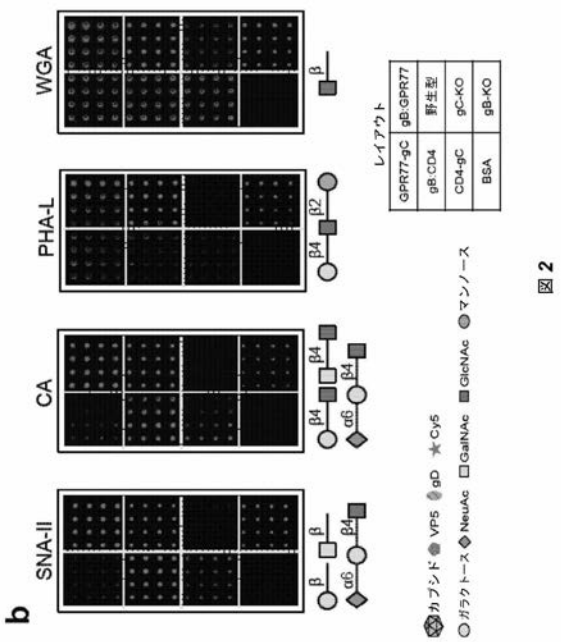


図２

【図２ｃ】

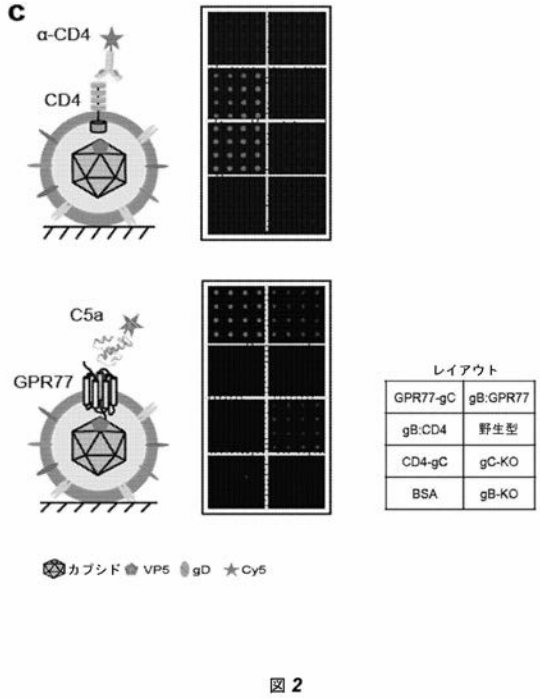


図２

【図２ｄ】

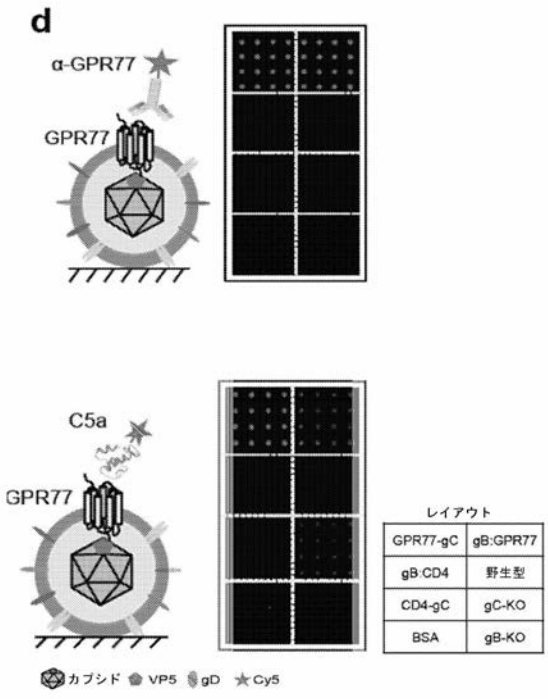


図２

【図３】

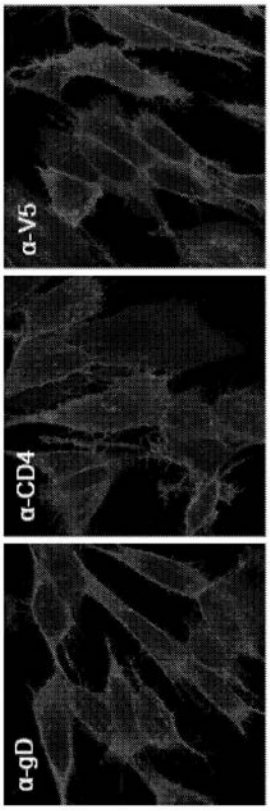


図 3

【図４】

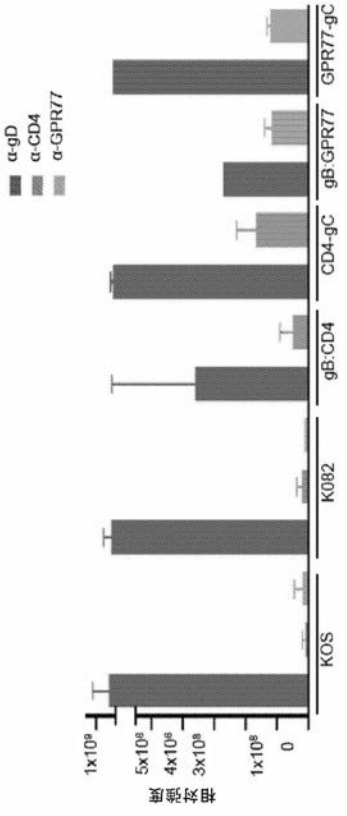


図 4

【図５】

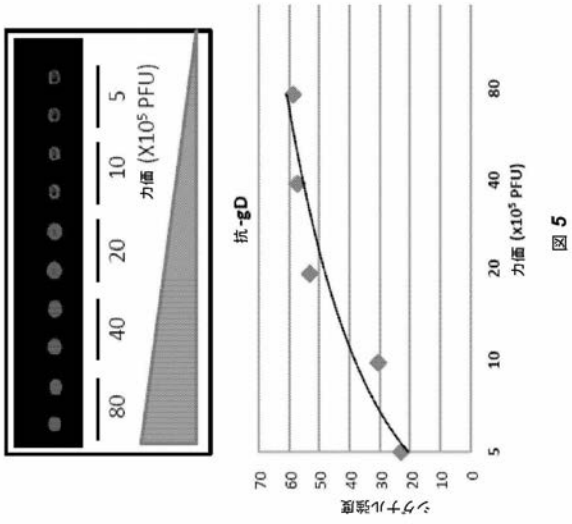


図 5

【図６】

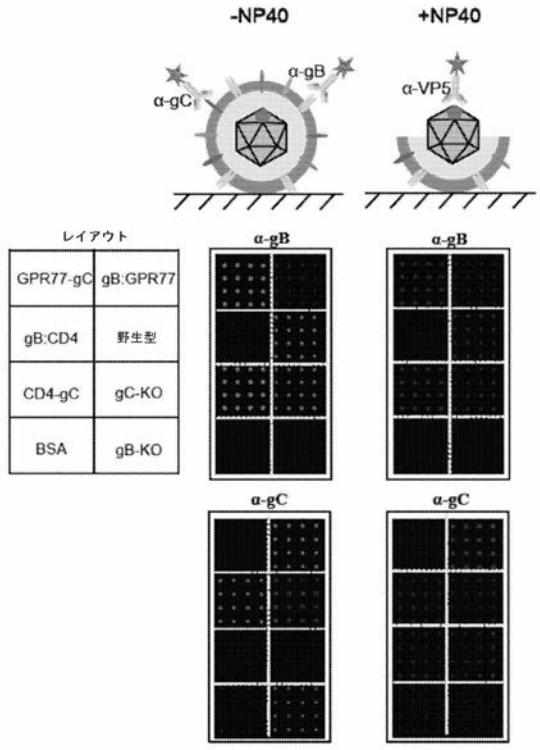


図 6

【図７】

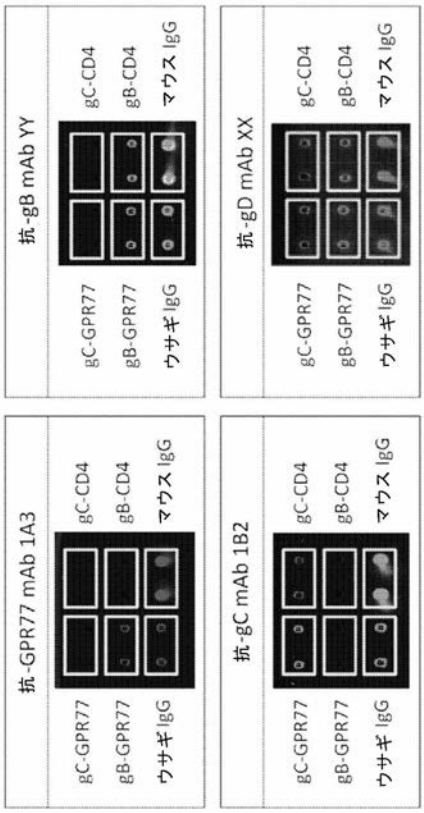


図７

【配列表】

2016528486000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/043404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12Q 1/70 (2014.01)
CPC - A61K 2039/5258 (2014.12)
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(8) - A61K 39/12; C12N 15/88; C12Q 1/70 (2014.01)
USPC - 424/204.1; 435/458; 506/9

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - A61K 39/12, 39/245, 2039/5258 (2014.12) (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Orbit, Google Patents, Google Scholar, PubMed

Search terms used: virion; array; substrate; HSV-1; HSV1; membrane protein; envelope; GPR77

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2005/0123563 A1 (DORANZ et al) 09 June 2005 (09.06.2005) entire document	1-7, 9-15, 17-24, 26-35, 37-43, 45-56, 80-86, 88 --- 8, 16, 36, 44, 87
Y	WOODRUFF et al. "Inhibiting the C5–C5a receptor axis," Molecular Immunology, 01 August 2011 (01.08.2011), Vol. 48, No. 14, Pg. 1631–1642. entire document	8, 36, 87
Y	ESPINA et al. "Protein microarrays: Molecular profiling technologies for clinical specimens," Proteomics, 01 November 2003 (01.11.2003), Vol. 3, No. 11, Pg. 2091-2100. entire document	16, 44
A	US 2003/0124572 A1 (UMEK et al) 03 July 2003 (03.07.2003), entire document	1, 29, 80
A	US 2008/0274988 A1 (BRANDON et al) 06 November 2008 (06.11.2008), entire document	1, 29, 80
P; X	HU et al. "VirD: A Virion Display Array for Profiling Functional Membrane Proteins," Analytical Chemistry, 13 August 2013 (13.08.2013), Vol. 85, Pg. 8046-8054. entire document	1-24, 26-52, 54-56, 80-86

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 December 2014	02 JAN 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/043404

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)
   - ☒ on paper
   - ☒ in electronic form

   b. (time)
   - ☒ in the international application as filed
   - ☐ together with the international application in electronic form
   - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-6 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/043404

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 25, 53, 57-79, 99-139, 141-146, 148-161
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See Extra Sheet(s).

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-24, 26-52, 54-56, and 80-88

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/043404

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I: claims 1-24, 26-52, 54-56, and 80-88 are drawn to an array or a method of producing an array comprising contacting a solution comprising recombinant virions comprising a plurality of recombinant virions to a surface of a substrate to thereby transfer the solution to the surface, wherein the recombinant virions comprise envelopes comprising a plurality of heterologous membrane bound proteins that retain their native conformations and/or interactions.

Group II: claims 89-95 are drawn to a recombinant HSV-1 bacterial artificial chromosome (BAC) clone encoding a heterologous membrane polypeptide.

Group III: claims 96-98, 140, and 147 are drawn to a library of antibodies or a method for identifying a ligand for a target membrane bound protein by contacting a target membrane bound protein comprising an envelope of a virion with a ligand.

The inventions listed in Groups I-III 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 special technical features of Group I, an array or a method of producing an array comprising contacting a solution comprising recombinant virions comprising a plurality of recombinant virions to a surface of a substrate to thereby transfer the solution to the surface, wherein the recombinant virions comprise envelopes comprising a plurality of heterologous membrane bound proteins that retain their native conformations and/or interactions, are not present in Groups II and III, the special technical features of Group II, a recombinant HSV-1 bacterial artificial chromosome (BAC) clone encoding a heterologous membrane polypeptide, are not present in groups I and III; the special technical features of Group III, a library of antibodies or a method for identifying a ligand for a target membrane bound protein by contacting a target membrane bound protein comprising an envelope of a virion with a ligand, are not present in Groups I and II.

Additionally, Groups I-III share the technical features of a plurality of recombinant virions comprising envelopes comprising a plurality of heterologous membrane bound proteins and an array or a proteome array. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art. Specifically, US 2008/0274988 A1 to Brandon et al. discloses a plurality of recombinant virions comprising envelopes comprising a plurality of heterologous membrane bound proteins and an array or a proteome array ("biologically active portion" includes deletion mutants and peptides, Portions of this type may be obtained through the application of standard recombinant nucleic acid techniques, Para.[0110]; several protein subunit vaccines based on HSV-2 envelope glycoproteins, Para. [0038]; The antigen-binding molecules of such arrays may recognize at least a subset of proteins expressed by a cell or population of cells, illustrative examples of which include...DNA recombination factors, cell-surface antigens, Para. [0266]; the antigen binding molecule forms part of a spatial array of antigen binding molecule, Para. [0076]).

The inventions listed in Groups I-III therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
G01N	*33/50*	*(2006.01)*	G01N	33/50	Z	4H045
G01N	*33/15*	*(2006.01)*	G01N	33/15	Z	
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	C12N	15/00	F	
C12N	*7/00*	*(2006.01)*	C12N	7/00		
C07K	*14/035*	*(2006.01)*	C07K	14/035		
C12Q	*1/70*	*(2006.01)*	C12Q	1/70		
C07K	*16/08*	*(2006.01)*	C12N	15/00	A	
C40B	*40/10*	*(2006.01)*	C07K	16/08		
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C40B	40/10		
C12N	*9/12*	*(2006.01)*	C12P	21/08		
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C12N	9/12		
			C07K	19/00		

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

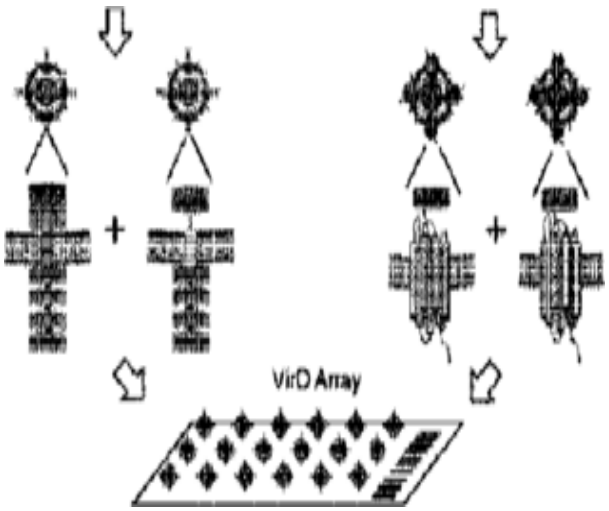
(72)発明者 デサイ，パラシャント
アメリカ合衆国 メリーランド州 ２１１１７、オーウィングス ミルズ、ミドル ミル ドライブ ９９０４
(72)発明者 リ，ミン
アメリカ合衆国 メリーランド州 ２１０９３、ルーザービル、ノースフィールズ サークル ８６１０
(72)発明者 フ，シャオフイ
アメリカ合衆国 メリーランド州 ２１２１０、ボルティモア、リンクウッド ロード ４０００、アパートメント ディー

Ｆターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA25 AA40 BA13 BB24 CA25 CA26 CB03 CB04
CB07 CB08 CB09 CB13 CB14 CB15 CB17 CB21 CB26 DA20
DA30 DA36 DA37 DA60 FA11 FB01 FB02 FB03 FB05 FB12
FB13 FB16 GC12 GC15
4B050 CC03 DD11 GG07 KK18 LL03
4B063 QA01 QA18 QQ10 QQ13 QQ27 QQ42 QQ52 QR48 QR54 QR79
QR80 QS15 QS33 QS36 QS38 QS39 QX02
4B064 AG20 AG26 AG27 AG32 BJ12 CA12 CA19 CA21 CA32 CC24
CE09 CE20 DA15
4B065 AA95X AA95Y AB01 BA01 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 AA40 BA41 BA60 CA03 DA50 DA75 DA76
DA86 DA89 EA53 FA74 FA81 FA82 GA20

专利名称(译)	用于分析功能和人膜蛋白相互作用的病毒体显示阵列		
公开(公告)号	JP2016528486A	公开(公告)日	2016-09-15
申请号	JP2016521843	申请日	2014-06-20
[标]申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学		
申请(专利权)人(译)	约翰·霍普金斯大学		
[标]发明人	チューヘン デサイパラシャント リミン フシャオフイ		
发明人	チュー,ヘン デサイ,パラシャント リ,ミン フ,シャオフイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 G01N33/543 G01N33/566 G01N37/00 G01N33/50 G01N33/15 C12N15/09 C12N7/00 C07K14/035 C12Q1/70 C07K16/08 C40B40/10 C12P21/08 C12N9/12 C07K19/00		
CPC分类号	C07K2319/03 C07K2319/735 C12N15/1093 C12N2710/16645 C12N2810/855 C40B40/02 G01N33/6854 A61B17/3478 A61B18/02 A61B18/0218 A61B2018/0038 A61B2018/0212 A61B2018/0275 A61B2217/005		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/569.L G01N33/543.501.A G01N33/566 G01N37/00.102 G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12N15/00.F C12N7/00 C07K14/035 C12Q1/70 C12N15/00.A C07K16/08 C40B40/10 C12P21/08 C12N9/12 C07K19/00		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045/CB09 2G045/CB13 2G045/CB14 2G045/CB15 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/CB26 2G045/DA20 2G045/DA30 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA60 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB16 2G045/GC12 2G045/GC15 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/GG07 4B050/KK18 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ10 4B063/QQ13 4B063/QQ27 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR48 4B063/QR54 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QS15 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QS39 4B063/QX02 4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/AG32 4B064/BJ12 4B064/CA12 4B064/CA19 4B064/CA21 4B064/CA32 4B064/CC24 4B064/CE09 4B064/CE20 4B064/DA15 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/BA41 4H045/BA60 4H045/CA03 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA53 4H045/FA74 4H045/FA81 4H045/FA82 4H045/GA20		
优先权	61/837929 2013-06-21 US		
其他公开文献	JP2016528486A5 JP6715766B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供了包含保留其独特构象和/或相互作用的人膜结合蛋白的重组病毒体阵列，重组HSV-1病毒体及其使用方法，包括人膜结合蛋白。 包括用于筛选结合配体和/或药物的高含量，高通量测定，诊断测定，蛋白质组测定和生物传感器测定。 含有包膜的重组HSV-1病毒体，该包膜包含多种保留了其天然构象和/或相互作用的异源膜结合蛋白，以及编码异源膜多肽的重组HSV-1细菌人工染色体（ 还提供了BAC ）克隆。


VirD Array