

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 156497

(P2003 - 156497A)

(43)公開日 平成15年5月30日(2003.5.30)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/566	4 H 0 4 5
C 0 7 K 1/22		C 0 7 K 1/22	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D
33/543	525	33/543	525 Z

審査請求 未請求 請求項の数 29 O L (全 73数)

(21)出願番号 特願2002 - 228716(P2002 - 228716)

(22)出願日 平成14年8月6日(2002.8.6)

(31)優先権主張番号 0110542

(32)優先日 平成13年8月7日(2001.8.7)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 391011308

ワーナー - ランバート・カンパニー、リミ
テッド、ライアピリティ、カンパニー
WARNER - L A M B E R T C O M
P A N Y L L C

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0795
0, モーリス・ブレインズ, テーパー・ロード
201

(72)発明者 カティ・ドレクスレー

フランス国、75007 パリ、リュ・サン - ド
ミニク 54

(74)代理人 100078662

弁理士 津国 肇 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規支持膜、その調製及び使用

(57)【要約】 (修正有)

【課題】人工的な支持された膜、並びにそのような膜の調製の方法、又はそれらの構成要素タンパク質及び脂質からの細胞膜の再構築の方法を提供する。

【解決手段】二重層と支持体との間に間隙を作出するリン脂質テザー (P) により支持体と接着した脂質二重層を含み、かつ支持体と共有結合し該間隙に露呈された、あるタンパク質に特異的な 1 個以上のリガンド (L) を含む。

【効果】膜タンパク質の精製及び / もしくは可逆的捕捉、又はこれらのタンパク質のうちのいくつかと相互作用する化合物のスクリーニングを可能にする。さらに、試験化合物の毒性、又は治療効果を評価するために有益でありうる。膜内のタンパク質 - タンパク質相互作用を分析するのに特に有用であり、医薬品開発の候補となりうる、かつ / 又は医薬組成物へと組み込まれうる分子の毒性又は有効性のプロフィールの分析のため利用されうる。より効果的な医用材料の製造においても使用されうる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 官能化された表面を、該官能化された表面と結合することができる特異的リガンド(L)とリン脂質テザー(P)との混合物の存在下に置く工程、及び

b) リン脂質テザーにより支持された脂質二重層の会合を可能にするため、a)で形成された表面を、脂質の存在下に置く工程を含む、人工的な支持された膜の調製方法。

【請求項2】 官能化された表面が、リン脂質テザー(P)及び/又は特異的リガンド(L)との共有結合を可能にする官能基を保持している分子と、非官能基を保持している分子とを含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】 官能化された表面が、リン脂質テザー(P)と特異的に結合する官能基を保持している分子と、特異的リガンド(L)と特異的に結合する官能基を保持している他の分子とを含む、請求項2記載の方法。

【請求項4】 官能化された表面が、特異的リガンド(L)及びリン脂質テザー(P)と結合する、活性化されてもよい官能基Xを保持している分子と、非官能基Zを保持している分子とを含む、請求項2記載の方法。

【請求項5】 官能化された表面が、特異的リガンド(L)と選択的に結合する官能基Xを保持している分子と、テザー(P)と選択的に結合する官能基Yを保持している分子との混合物を含む、請求項3記載の方法。

【請求項6】 官能基又は非官能基を保持している分子が、式 $HS-(CH_2)_n-X$ 、 $HS-(CH_2)_m-Y$ 、又は $HS-(CH_2)_n-Z$ 〔式中、n及びmは、同一であるか又は異なっており、2~15の整数を表す〕により表されるチオール誘導体である、請求項4又は5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 a) 式 $HS-(CH_2)_n-X$ 及び $HS-(CH_2)_m-Z$ 〔式中、Xは、特異的リガンド(L)又はリン脂質テザー(P)と結合することができる予め活性化された官能基であり、Zは、該リガンド(L)又はテザー(P)と反応することができない非官能基であり、かつn及びmは、2~15である〕により表される分子を用いて表面を被覆する工程、

b) a)で得られた官能化された表面を、特異的リガンド(L)とリン脂質テザー(P)とを含有する混合物の存在下に置く工程、

c) 次いで、リン脂質テザー(P)により支持された脂質二重層の会合を可能にするため、b)で得られた表面を、脂質の存在下に置く工程を含む、支持された膜の調製方法。

【請求項8】 a) 式 $HS-(CH_2)_n-X$ 、 $HS-(CH_2)_m-Y$ 、及び $HS-(CH_2)_m-Z$ 〔式中、X及びYは、リン脂質テザー(P)及び特異的リガンド(L)とそれぞれ結合することができる予め活性化された官能基であり、Zは、該リガンド(L)又はテザー

(P)と反応することができない非官能基であり、かつn及びmは、2~15である〕により表される分子の混合物を用いて表面を被覆する工程、

b) a)で得られた官能化された表面を、特異的リガンド(L)とリン脂質テザー(P)とを含有する混合物の存在下に置く工程、

c) 次いで、リン脂質テザー(P)により支持された脂質二重層の会合を可能にするため、b)で得られた表面を、脂質の存在下に置く工程を含む、支持された膜の調製の方法。

【請求項9】 工程(b)において、得られた表面を、第一工程においてリン脂質テザー(P)と接触させ、第二工程において特異的リガンド(L)と接触させる、請求項7又は8に記載の方法。

【請求項10】 工程(a)の後、リガンド(L)又はテザー(P)と反応しなかったX基又はY基を不活化する工程をさらに含む、請求項7~9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 支持された膜に1個以上のタンパク質を挿入する、さらなる工程を含む、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】 工程(c)において使用される脂質が、単独の又は混合された、細胞抽出物、膜断片、ミセル、脂質の単層もしくは二重層、脂質小胞、及び/又は脂質、リン脂質、リポペプチド、もしくはピオチル化脂質である、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】 使用される表面が、金、ガラス、ダイヤモンド、シリコン、二酸化ケイ素(SiO_2)、亜硝酸ケイ素、五酸化タンタル(Ta_2O_5)、二酸化チタン(TiO_2)、亜硝酸チタン、炭化チタン、プラチナ、タングステン、アルミニウム、又は酸化インジウム-スズの表面、又はこれらの材料に基づく表面である、請求項1~12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】 表面が、金属表面、好ましくは金に基づくか又は金からなる表面である、請求項13記載の方法。

【請求項15】 数字n及びmが、10又は11に等しい、請求項6~14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】 官能基X及びYが、COOH基、CHO基、OH基、NH₂基、マレイミド、及びピオチンの中から選択される、請求項2~15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】 官能基X及びYと非官能基とのモル比が、0.05~2.0、好ましくは0.1~5、さらに好ましくは0.2~0.3である、請求項2~16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】 特異的リガンド(L)が、目的分子に対する特異的親和性を有する基と、官能化された表面との固定点と、好ましくは3~500の長さを有するス

ペーサーとを含む、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】 特異的リガンド(L)が、タンパク質、基質、抗原、ハプテン、レクチン、バイオレセプター、オリゴヌクレオチド、又は免疫グロブリン、又はそれらの領域の中から選択される目的分子、好ましくはタンパク質に対する特異的親和性を有する基を含む、請求項18記載の方法。

【請求項20】 リガンド(L)の特異的親和性を有する基が、膜タンパク質に特異的な抗体又は抗体断片である、請求項19記載の方法。

【請求項21】 リン脂質テザー(P)が、表面との固定点と、スペーサーと、リン脂質とを含む、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】 リン脂質テザー(P)が、500未満、好ましくは3～500の長さを有するスペーサーを含む、請求項21記載の方法。

【請求項23】 二重層と支持体との間に間隙を作出するリン脂質テザー(P)により支持体と接着した脂質二重層を含み、かつ支持体と共有結合し該間隙に露出されている、目的分子に特異的な1個以上のリガンド(L)を含む、人工的な支持された膜。

【請求項24】 請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により作製されうる、人工的な支持された膜。

【請求項25】 膜タンパク質の精製のための、請求項23もしくは24に記載の、又は請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により得られた支持された膜の使用。

【請求項26】 膜タンパク質又は膜タンパク質複合体の可逆的な捕捉のための、請求項23もしくは24に記載の、又は請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により得られた支持された膜の使用。

【請求項27】 膜タンパク質と相互作用する化合物のスクリーニングのための、請求項23もしくは24に記載の、又は請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により得られた支持された膜の使用。

【請求項28】 膜内のタンパク質-タンパク質相互作用の分析のための、請求項23もしくは24に記載の、又は請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により得られた支持された膜の使用。

【請求項29】 請求項23もしくは24に記載の、又は請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により得られた支持された膜を、精製すべきタンパク質を含む膜調製物の存在下に、該タンパク質の該支持された膜への導入を可能にする条件の下で、置くこと、及び脂質の流れを適用することを含む、膜タンパク質の精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、新規な人工的な支持された膜、並びにそのような膜の調製の方法、又はそれらの構成要素タンパク質及び脂質からの細胞膜の再構築の方法を記

載する。そのような膜は、二重層と支持体との間に間隙を作出するリン脂質テザー(tethers)(P)により支持体と接着した脂質二重層を含み、かつ支持体と共有結合し該間隙に露呈された、あるタンパク質に特異的な1個以上のリガンド(L)を含む。本発明は、膜タンパク質の精製及び/もしくは捕捉(おそらくは可逆的)、又はこれらのタンパク質のうちのいくつかと相互作用する化合物のスクリーニングを可能にするそのような膜の使用も記載する。本発明に係る膜は、さらに、試験化合物の毒性、又は反対に治療効果を評価するために有益でありうる。本発明は、膜内のタンパク質-タンパク質相互作用を分析するのに特に有用であり、したがって、医薬品開発の候補となりうる、かつ/又は医薬組成物へと組み込まれうる分子の毒性又は有効性のプロフィールの分析のため、医薬品産業において利用されうる。バイオテクノロジー分野又は医学分野において、そのような支持された膜は、より効果的な医用材料の製造においても使用されうる。

【0002】細胞膜は、一般に、成分が分子間力により適所に保持されている脂質二重層から構成されている。疎水性結合が、特に、二重層の凝集を維持している。脂質とは、一般に、疎水性炭化水素鎖と親水性極性頭部とを含む分子と定義される。そのような膜は、細胞コンパートメントを隔てており、したがって、細胞の内部コンパートメント及び外部コンパートメントの両方に露呈されている。

【0003】細胞膜は、細胞の生命にとって必須のシグナル伝達過程の部位である。専門化された膜受容体は、リガンドの特異的結合部位であり、それにより膜を介した細胞外シグナルの伝達、それらの増幅、及びそれらの統合を可能にする。したがって、支持された脂質二重層は、細胞膜の表面において起こっているリガンド-受容体相互作用を研究するための優れたモデルである。

【0004】先行技術において記載されている支持された膜は、膜受容体分子が挿入されうる水性間隙が作出されるよう、近位の脂質層が、表面からある程度離れて位置している、金属表面に固定化されたリン脂質二重層を含む(WO96/38726参照)。したがって、膜固定タンパク質の機能及び膜流動性の維持に必須のこの水性間隙を維持するため、親水性スペーサー分子が使用されている。金属表面は、ヘテロ原子が介在している場合もある、一般的には10個超の多数の炭素原子を含有する長鎖、好ましくは炭化水素を含む分子から構成されたSAM(自己会合単層(Self-Assemble Monolayer))でコーティングされうる。そのような鎖は、支持体への膜の固定を可能にする官能基を保持している。

【0005】既知の人工膜の主な欠点は、人工膜内に該膜タンパク質を濃縮する目的のために精製しようとしている、膜タンパク質の保持又は捕捉を可能にしない限り、いかなる型の精製においても使用に適していないと

いう点である。ある分子種（例えば、膜タンパク質）が濃縮された人工膜を得ることは、選択的かつ特異的なその天然環境における該分子種の研究にとって、極めて重要であることが判明している。選択性及び特異性は、膜タンパク質のスクリーニングテスト、特にハイスループット型スクリーニングテスト（HTS）における人工膜の使用にとって不可欠な特性である。本発明は、特に、テザー（tethers）、及び目的分子種をその天然の形態もしくはコンフォメーションで保持又は捕捉することができる分子の存在によって、該分子種が濃縮された支持された膜、特に該分子種のみを含む支持された膜を得ることを可能にする。

【0006】さらに、既知の膜（WO96/38726）には、膜タンパク質を受容することができる間隙のサイズ及び配置に関して制約がある。本発明は、膜を支持するテザーの配置及び密度を変動させることにより、膜タンパク質を受容することができる間隙の構造を調製することを可能にする。これは、支持された膜全体の膜の安定性及び流動性のより確実な制御をもたらす。

【0007】したがって、本発明は、二重層と支持体との間に（水性）間隙を作出するリン脂質（P）テザーにより支持体に固定された脂質二重層を含み、かつ支持体と共有結合し該間隙に露呈された、タンパク質（又は、目的分子）に特異的な1個以上のリガンド（L）を含む人工膜の調製のための方法を初めて提唱する。そのようなリガンドは、1個又は数個の特異的な型の目的タンパク質との結合の特異性を大きく増強するという特定の特質を有する。

【0008】したがって、本発明は、機能的な形状での目的タンパク質の特異的結合を可能にする支持された膜に関して記載する。この特徴は、特に膜調製物からのタンパク質の精製のための膜の使用を含む、多数の利点を与える。《膜調製物からのタンパク質の精製》とは、特に、膜調製物の目的分子種の濃縮をさすことが理解される。

【0009】本願は、精製、スクリーニング等のような適用のための、膜のより高い安定性及びより高い流動性を与える、人工的な支持された膜の調製の条件も記載する。

【0010】これに関して、本発明の一つの方法は、特に、

a) 官能化された表面を、該官能化された表面と結合することができる特異的リガンド（L）とリン脂質テザー（P）との混合物の存在下に置く工程、及び

b) リン脂質テザー（P）により支持された脂質二重層の会合を可能にするため、a) で形成された表面を、脂質の存在下に置く工程：を含む。

【0011】官能化された表面は、一般的に、リン脂質テザー（P）及び/又は特異的リガンド（L）との間に共有結合が形成されることを可能にする官能基を保持し

ている分子と、非官能基を保持している分子とを含む。本発明は、前記定義の支持された膜の使用、それらを含むキット、及びそれらを実行する化合物の精製又はスクリーニングの方法にも関する。

【0012】本発明の特質をよりよく理解するため、人工的な支持された膜を作製するための好ましい方法を記載する前に、まず、そのような膜の成分の性質を説明することとする。

【0013】表面の性質

使用される表面は、人工的な表面である。使用可能な材料は、特に、単独の、又は混合された、金、ガラス、ダイヤモンド、シリコン、二酸化ケイ素（ SiO_2 ）、亜硝酸ケイ素、五酸化タンタル（ Ta_2O_5 ）、二酸化チタン（ TiO_2 ）、亜硝酸チタン、炭化チタン、プラチナ、タングステン、アルミニウム、又は酸化インジウム-スズ（indium-tin oxide）のような材料から構成された、又はそれらに基づく表面を含む。特に、金から構成された、又は金に基づく表面のような、金属支持体が好ましい。

【0014】使用可能な支持体の例は、Sia Kit Au (Biacore) 型の商業的に入手可能な金表面である。この支持体は、表面プラズモン共鳴（SPR）により分析可能であり、BIAcore装置との適合性を有している。

【0015】分析又は使用される表面は、任意の有用な機能的な形態をとることができ、例えば、正方形、方形、もしくは円形の二次元空間、好ましくは平面であってもよいし、又は立方形、平行六面形、もしくは球形の三次元空間であってもよい。それらの面積は、 $1\text{mm}^2 \sim 100\text{cm}^2$ の範囲である。好ましくは、面積は $1 \sim 5\text{cm}^2$ である。さらに好ましくは、面積は $1 \sim 2.4\text{cm}^2$ である。

【0016】官能化された表面の説明

支持体として機能する表面は、官能基を保持している分子と非官能基を保持している分子との混合物で官能化される、即ち、好ましくはコーティングされる。好ましくは、表面は、SAM（自己会合単層）の形態で官能化される。表面は、（P）基及び/又は（L）基と、好ましくは共有結合的に、相互作用することができる数個の型の官能基で官能化されうる。いくつかの官能基は、テザー（P）及び/又はリガンド（L）と相互作用するようさらに活性化されうる。利用される官能基の中には、リン脂質テザー（P）と特異的に結合することができるものと、特異的リガンド（L）と特異的に結合するものがある。この実行様式は、膜内の（P）/（L）比の確実な調節を許容する。これに関して、（P）/（L）比は、好ましくは $0 \sim 10$ 、より好ましくは $0 \sim 4$ 、さらに好ましくは $0.01 \sim 1$ である。官能基の型は、テザー（P）及び特異的リガンド（L）を固定するために使用される結合反応に応じて選択され

る。そのような基は、例えば、COOH基、CHO基、OH基、NH₂基、マレイミド基、又はビオチン基に相当する。活性化後、これらの基は、(P)基もしくは(L)基がNH₂官能を保持している場合には、アミド型(-NHCO-)もしくはイミド型(-CHNH-)の共有結合を形成し、(P)基もしくは(L)基が-SH結合を保持している場合には、ジスルフィド架橋(-S-S-)もしくはチオエーテル(-C-S-)を形成し、又は(P)基もしくは(L)基がストレプトアビジンもしくはアビジンで官能化されている場合には、安定なビオチン-ストレプトアビジン/アビジン複合体を形成する。本発明に係る好ましい官能基の一つは、COOH基である。COOH基は、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)の存在下での水性溶媒中でのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)との反応により、活性化され、それによりエステルを形成することができる。

【0017】本発明の第一の特定の実施態様において、官能化された表面は、特異的リガンド(L)及びリン脂質テザー(P)を固定することができる、活性化されてもよい官能基Xと、非官能基Zとを含む。

【0018】非官能基という用語は、(P)分子又は(L)分子と反応(即ち、共有結合的かつ特異的に結合)することができない任意の分子をさす。それは、任意の非反応性分子であってもよいし、又は予め活性化されていない前述のような基であってもよい。

【0019】第二の特定の実施態様において、表面は、リン脂質テザー(P)及び/又は特異的リガンド(L)と共有結合的かつ特異的に結合することができる、活性化されてもよい官能基X及びYを保持している分子の分子混合物でコーティングされる。

【0020】本発明のもう一つの特定の実施態様において、官能化された表面は、特異的リガンド(L)と選択的に結合する官能基Xを保持している分子と、テザー(P)と選択的に結合する官能基Yを保持している分子との混合物を含む。

【0021】本発明において開示された膜の調製において、官能基X及びYと非官能基Zとのモル比は、一般的には、0.05~20、好ましくは0.1~5である。特に有利には、この比は1未満であり、より好ましくは0.1~0.3である。実施された研究は、これらの好ましい比が、重要なタンパク質又はタンパク質複合体の膜への挿入を可能にしつつ、十分な安定性を与えることを示している。

【0022】表面をコーティングするために使用される分子は、式HS-(CH₂)_n-X、HS-(CH₂)_m-Y、又はHS-(CH₂)_p-Zにより表されるチオール誘導体でありうる。少なくとも2個のチオール誘導体の混合物を使用することの利点は、表面に存在する官能基の密度を調節し、それによりサイズの異なる膜タンパク質の捕捉、膜の安定性、及びその流動性に対応すること

が可能である点である。

【0023】チオール誘導体は、鎖の性質により、そして前述のように官能基の型により異なってもよい。したがって、炭素鎖の長さは、数字n、m、及びpの関数として変動する。一般的には、n、m、及びpは、2~15、より好ましくは8~15であり、好ましい別実施態様において、それらは10又は11に等しい。鎖の長さは、当業者により調整される。

【0024】均質な表面を得るためには、官能基を保持している全ての分子が、ほぼ同等の長さを有することが望ましい。この理由から、数字n、m、及びpは、好ましくは、本質的に同一であるか又は類似しているべきであり、特に、それらの差は2以下であるべきである。特に好ましいのは、n、m、及びpが同一の整数であるような前記定義の分子の使用である。

【0025】支持体表面と結合する求核基は、前記のようなチオールであってもよいが、直接的に、又はスペーサー(その長さは、必ずリン脂質テザーのスペーサー(これについては、後により詳細に説明する)の長さより短い)によって結合した第一級、第二級、又は第三級のアミンであってもよい。アミンに加え、それらは、ヒドラジド基又はカルボキシラート基であってもよい。これらの場合、この表面と接触させられる脂質は、ホスファチジルエステル、ハライドエステル、もしくは酸、又はさらにはカルボニル基、エポキシド基、もしくはビニル基のような求電子基により修飾された極性の頭部を保有していなければならない。チオール基、ピリジルジスルフィド基、マレイミド基、又はハロアセテート基の利点は、それらが選択的な反応を与える点である。そのような官能は、したがって、本発明の範囲において好ましい。

【0026】リン脂質テザー(P)の説明
本発明において開示されたテザーは、好ましくは、3つの部分、即ち官能化された表面への固定点、スペーサー、及びリン脂質を含む。実際、テザーは、(この効果のため活性化された)前記の官能基を介してSAMへと結合する。前述のように、固定点は、官能化された表面の上にある官能基と反応することができる反応基を含む。そのような官能基は、例えば、COOH基、CHO基、OH基、NH₂基、マレイミド基、又はビオチン基でありうる。

【0027】したがって、本発明の一つの目的は、リン脂質テザー(P)が、官能化された表面への固定点と、固定点とリン脂質の極性頭部との間に位置するスペーサーと、リン脂質とを含む、特に有利な方法に関する。スペーサーは、通常、2~200個の炭素原子を含む親水性鎖に相当し、スペーサーの長さは500未満、好ましくは3~500である。およそ3.5~5、11~14、又は170~220の長さを有するスペーサーが、例として挙げられる。

【0028】平面的な表面を得るためには、テザーはほぼ同一の長さを有していなければならない。

【0029】リン脂質テザーは、いくつかの形態で使用される。 - リン脂質が十分な水溶性を有する場合、リン脂質の水溶性溶液であってもよく、 - リン脂質が水性溶媒に不溶性である場合、ミセル溶液（脂質/界面活性剤混合物）又はリポソームであってもよい。

【0030】テザーのリン脂質頭部は、二重層の接着点として機能する。それは、哺乳動物細胞又は植物もしくは細菌の細胞等の膜に存在するリン脂質のような異なるリン脂質に相当してもよい。例えば、それは、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルイノシトール（PI）、ホスファチジルグリセロール（PG）等でありうる。

【0031】スペーサーの長さ（L）及びリン脂質脂肪酸鎖の構造に関して相互に異なっている、様々な商業的に入手可能なリン脂質テザーが、本発明において利用される。本発明の範囲において使用される商業的に入手可能なリン脂質テザーのうち、具体例には、3~5の範囲の長さを有するスペーサーを含むPE、11~14の範囲の長さを有するスペーサーを含むDOPE-C、176~214の範囲の長さを有するスペーサーを含むPEG-DPPEが含まれる（図2）。

【0032】特異的リガンド（L）の説明

特異的リガンド（L）は、特定の分子に対する特異的親和性を有する基と、官能化された表面との固定点とを含む。特定の実施態様において、リガンドはさらにスペーサーを含む。リガンドのスペーサーは、2~200個の原子を含む親水性鎖に相当することができ、好ましくは、特異的リガンドの長さが、リン脂質テザーの長さよりも短くなるよう選択される。

【0033】リガンド（L）の親和性基は、それぞれのリガンドと特異的に結合することができる目的分子、例えば、特にタンパク質、より具体的には膜タンパク質、膜受容体（インヒビターリガンド又はエフェクターリガンドと結合することができる）、免疫グロブリン、レクチン、抗原、ハプテン、又は基質等に対する親和性を示す、天然、合成、又は化学的な生成物であり得る。本発明の好ましい実施態様において、特異的リガンドLは、タンパク質構成要素に対する特異的親和性を有するリガンドに相当する。有利には、それは、タンパク質又はタンパク質複合体、特にタンパク質又はタンパク質複合体の少なくとも1個の膜外部分、の特異的抗体又は抗体断片（例えば、Fab、Fab₂、CRD、ScFv等）である。

【0034】リガンドは、レクチン、ストレプトアビジン、Aタンパク質、Gタンパク質、又はより広範に多重タンパク質複合体の一部であるタンパク質のような分子クラスに対する特異的親和性を有することが既知のタン

パク質であってもよい。もう一つの好ましい別実施態様によると、Lは、結合する目的タンパク質に対する親和性を示す低分子量の化学分子に相当する。そのような化学分子は、そのようなタンパク質の阻害剤、活性化剤、アゴニスト、アンタゴニスト、エフェクター、又はコファクターでありうる。したがって、天然小胞又は膜断片に存在する膜タンパク質は、特異的リガンドとの反応により、特に有利な方法により支持体と結合させられ得る。結合した膜タンパク質は、未結合のタンパク質が溶出又は掃除されるよう、膜表面にリン脂質の流れを導入することにより精製される。

【0035】さらに、本発明に係る膜の構築において、異なる目的分子に対する親和性を有する数個のリガンド（L）を使用することが可能である。これらは、2個の膜受容体、受容体と補助受容体、受容体とGタンパク質、数個の受容体サブユニット等でありうる。

【0036】特異的リガンド（L）は、前記の官能基を介してSAMに固定される。前述のように、固定点は、官能化された表面の上にある官能基と反応することができる反応基を含む。官能基が、COOH基、CHO基、OH基、NH₂基、マレイミド基、又はビオチン基である場合、反応基は、例えばSH、NH₂基、アビジン、又はストレプトアビジンでありうる。

【0037】特異的リガンド（L）のスペーサーも、親水性鎖に相当しうる。スペーサーの長さは、特異的リガンド（L）の長さが、テザー（P）の長さよりも短くなるよう選択される。好ましくは、スペーサーは、2~50個の原子を含む。スペーサーの長さは、有利には、500未満、好ましくは3~500、さらに好ましくは3~400である。3~5、10~20、又は150~220の長さを有するスペーサーが、例として挙げられる。リガンド（L）のスペーサーの長さは、好ましくは、テザー（P）のスペーサーの長さよりも短い。

【0038】結合反応の原理

結合は、一般的に以下の工程を含む、自体既知の方法により達成される。

- 第一に、官能化された表面を活性化する、場合により含まれる工程、
- 官能基をテザー（P）及び特異的リガンド（L）と結合させる工程、並びに - 未反応の官能基を不活化する、場合により含まれる工程。

【0039】官能化された表面の上にあるX基及び/又はY基は、テザー及びリガンドの固着の前に、活性化されてもよい。官能基の活性化は、必ずしも必要ではなく、その性質による。COOH基を例にとると、活性化は、水性溶媒中で、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）の存在下で、この官能基をN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）と反応させ、エステルを形成させることからなる。この場合、Xが、L又はPと同等に

反応することができる。この場合、Y基は、結合反応に参与しない非官能性の水酸基(OH)に相当しうる。

【0040】本発明において開示されるもう一つの可能性は、X基及びY基の両方を活性化すること、並びに選択的かつ共有結合的に(L)分子又は(P)分子と結合することができない非官能基Zを保持している分子を混合物へと導入することからなる。非官能基を保持している分子を導入することの目的は、目的タンパク質が、特異的リガンド(L)との結合により挿入されうよう、自由な間隙をリン脂質テザー間に保存することである。

【0041】結合反応は、1工程又は2工程で実施される。P及びLは、共結合、即ち同時に結合させられてもよいし、又はP及びLは2つの連続的な工程において各々の官能基を介して結合させられてもよい。支持体表面に固定されるL分子又はP分子の数は、使用される

(P)及び(L)の量(結合が特定の官能基を介して起こる場合)、又は混合物中に存在する(L)及び(P)のモル比、又は(L)及び(P)と特異的に反応することができる官能基の濃度のいずれかに依存する。- Xが官能基に相当し、Zが非官能基に相当する状況は、下記式により表されう。

$aX + bZ \rightarrow aX^* + bZ \quad (a - c)P + cL + bZ$
〔式中、a = X基の数、X* = 活性化されたX基、b = Z基の数、c = リガンドの数、(a - c) = テザー(P)の数、かつa + b = 100〕

- 官能基Xが活性化され、次いで連続的にテザー(P)及び特異的リガンド(L)の存在下に置かれる場合は、SAMの表面へ固定されるテザーの密度のより確実な調節を可能にし、下記式により表されう。

$aX + bZ \rightarrow aX^* + bZ \quad (a - c)P + cX^* + bZ$
 $(a - c)P + cL + bZ$

- 官能基Xが活性化され、テザー(P)と反応し、未反応のX基が、特異的リガンド(L)と結合することができる分子により不活化される状況は、下記式により表されう。

$aX + bZ \rightarrow aX^* + bZ \quad (a - x)P + xX^* + bZ$
 $(a - x)P + xX^* + bZ \quad (a - x)P + xX + bZ$
 $(a - x)P + xL + bZ$

- X基及びY基が、活性化後、それぞれテザー(P)及びリガンド(L)と反応する場合は、下記式により表されう。

$aX + bY \rightarrow aX^* + bY \quad aP + bY \rightarrow aP + bY^*$
 $aP + bL$

【0042】反応しなかった活性化された基は、不活化反応を受ける。カルボキシラート基の場合、エタノールアミン(Biacore)が不活化手段として使用されう。

【0043】脂質二重層の起源及び成分

本発明において開示される膜の脂質二重層は、多様な性質及び起源の脂質を含みう。そのような脂質は、細胞

抽出物、膜断片、脂質の単層もしくは二重層、リボソーム、又は脂質小胞に由来することができ、かつ/又は脂質、リン脂質、リポペプチド、ピオチニル化脂質、及びそれらの混合物に由来することができる。二重層は、テザー(P)の脂質による脂質の会合により形成される。使用される脂質の量は、それらの型に関わらず、当業者により適合化される。

【0044】本発明により調製された平面的かつ連続的な膜は、膜表面における溶媒及び/又は溶質及び/又は脂質小胞の一定の流れを維持するためのBiacoreのような装置において作製されう。この原理は、コンタミネーション及び膜の変性又は破壊のリスクを低下させる。好ましい方法において、膜の構築は、ミセルの希釈又は小胞の融合からなる2つの方法に従い構想される。

【0045】支持された膜を得る方法

本発明は、支持された膜を作製するための、いくつかの方法を記載する。一般的に述べると、それらは、

a) 官能化された表面を、該官能化された表面と結合することができる特異的リガンド(L)とリン脂質テザー(P)との混合物の存在下に置く工程、及び

b) リン脂質テザー(P)により支持された脂質二重層の会合を可能にするため、a)で得られた表面を、脂質の存在下に置く工程：を含む。

【0046】この方法は、官能基のうち、特異的リガンド(L)及び/又はリン脂質テザー(P)と結合することができる活性化されてもよいX基と、非官能基Zとを区別する。

【0047】本発明のもう一つの別実施態様によると、官能基X及びYの両方が、特異的リガンド(L)及び/又はリン脂質テザー(P)と特異的に結合する(固定される)よう活性化されう。

【0048】特定の方法において、表面は、特異的リガンド(L)と選択的に結合する官能基Xを保持している分子と、テザー(P)と選択的に結合する官能基Yを保持している分子との混合物を含む。

【0049】既に説明したように、官能基を保持している分子は、式 $HS - (CH_2)_n - X$ 、 $HS - (CH_2)_m - Y$ (n及びmは、2~15である)により表されるチオール誘導体でありう。

【0050】本発明に係るもう一つの方法は、支持された膜を与える。それは、

b) 式 $HS - (CH_2)_n - X$ 及び $HS - (CH_2)_m - Z$ 〔Xは、特異的リガンド(L)又はリン脂質テザー(P)と結合することができる予め活性化された官能基であり、Zは非官能基であり、n及びmは2~15の整数である〕により表される分子を表面に被覆する工程、

c) a)で得られた官能化された表面を、特異的リガンド(L)とリン脂質テザー(P)とを含有する混合物の存在下に置く工程、

d) 次いで、リン脂質テザー(P)により支持された脂

質二重層の会合を可能にするため、b) で得られた表面を、脂質の存在下に置く工程：を含む。

【0051】本発明の、さらなる方法に従い、以下の工程：

a) 式 $HS - (CH_2)_n - X$ 及び $HS - (CH_2)_m - Z$ 〔Xは、特異的リガンド(L)又はリン脂質テザー(P)と結合することができる予め活性化された官能基であり、Zは非官能基であり、n及びmは2～15の整数である〕により表される官能基を保持している分子を表面にコーティングする工程、

b) a) で得られた表面を、リン脂質テザー(P)の存在下に置く工程、

c) 次いで、b) で得られた表面を、特異的リガンド(L)の存在下に置く工程、並びに

d) リン脂質テザー(P)により支持された脂質二重層の会合を可能にするため、c) で得られた表面を、脂質の存在下に置く工程：を含む、支持された膜を作製することが可能である。

【0052】もう一つの方法は、以下の工程：

a) 式 $HS - (CH_2)_n - X$ 、 $HS - (CH_2)_m - Y$ 、及び $HS - (CH_2)_n - Z$ 〔Xは、特異的リガンド(L)と結合することができる予め活性化された官能基であり、Yは、リン脂質テザー(P)と結合することができる予め活性化された官能基であり、Zは非官能基であり、n及びmは2～15の整数である〕により表される、非官能基を保持している分子と官能基を保持している分子とを表面に被覆する工程、

b) a) で得られた表面を、特異的リガンド(L)とリン脂質テザー(P)との混合物の存在下に置く工程、

c) 次いで、リン脂質テザー(P)により支持された脂質二重層の会合を可能にするため、b) で得られた表面を、脂質の存在下に置く工程：を含む。

【0053】前記の方法は、工程a)の後、リガンド(L)又はテザー(P)と反応しなかったX基又はY基を不活化する工程をさらに含んでいてもよい。そのような不活化は、X基又はY基の性質に応じた任意の既知の方法、例えばX基又はY基と結合することができる分子により実施されうる。

【0054】さらに、特定の実施態様において、方法は、目的分子を膜へと挿入する工程をさらに含んでいてもよい。この工程は、二重層の会合と同時に実施されてもよいし、又はその後実施されてもよい。この工程を二重層の会合の後に実施する場合には、それは、好ましくは、目的タンパク質を含有する天然小胞と、予め会合させた二重層との融合により実行される。

【0055】本発明は、前記開示の方法のうちのいずれかに従い得られた任意の人工膜を包含する。

【0056】支持された膜の適用

したがって、本発明に係る膜は、動物実験を必要としな

いが、*in vivo*の状況に近似している、細胞間交換を研究するための理想的なモデルとなる。特に、それらは、生理学的条件下での、精製されたタンパク質を使用することによる膜内のタンパク質-タンパク質相互作用の分析を可能にする。SPR分析は、偏光解析法、エバネッセント波分光法(EWS)、プリュースター角屈折率測定、臨界角屈折率測定、フラストレイティッドトータルリフレクション(Frustrated Total Reflection)(FTTR)、エバネッセント波偏光解析法、スキャッタードトータルインターナルリフレクション(Scattered Total Internal Reflection)(STIR)等と同様に、表面濃度又は回折率の測定を可能にする最適な方法である。これらのパラメータは、実際、膜組成と関係して変動し、したがって、それらの研究を許容する。

【0057】本発明の支持された膜は、有利には、複合体であっても又は複合体でなくてもよい膜タンパク質の、特異的リガンドによる可逆的な捕捉に使用されうる。

【0058】これに関して、本発明に係る人工膜の特定の特質は、(a)前記のような、かつ/又は本発明の方法のうちのいずれかにより得られた支持された膜を、精製すべきタンパク質を含む膜調製物と、該精製すべきタンパク質の該膜への挿入を許容する条件下で、接触させること、並びに(b)脂質の流れを適用すること、を含む、タンパク質の精製法を開発することを可能にした。この方法は、当然、膜抽出物に含まれる他の任意の分子を精製するために使用されうる。そのような方法は、特に、該分子の特異的リガンド(L)を含む本発明に係る膜の使用に基づく。

【0059】膜貫通タンパク質は、特異的リガンド(L)を構成する特異的分子(抗体、相互作用タンパク質、基質、阻害剤等)により、脂質二重層に直接的又は間接的に固定化される。結合しなかったタンパク質は、ミセル又はリボソームの形態のリン脂質の流れにより溶出させられうる。この方法は、穏和な、非変性条件下で膜貫通タンパク質を精製するための効果的な手段である。

【0060】次いで、このようにして精製された膜貫通タンパク質は、膜受容体に基づく活性分子のスクリーニングテストを開発するために使用されうる。したがって、本発明は、該支持された膜に挿入された天然型膜タンパク質と相互作用する化合物をスクリーニングするための、本発明の方法のうちのいずれかに従い得られた支持された膜の使用を含む。

【0061】1個以上の特異的な型のタンパク質が濃縮された、本発明に係る支持された膜は、特に、定量可能シグナルへと生物学的活性を変換することができるバイオセンサーの製造において使用されうる。このように使用されうる医用材料は、体液及び組織と接触させられるものであり、したがって、適合性基準を満たしていな

ればならない。実際、人工材料を、血液又はその他の生物学的液体と接触させた場合、タンパク質及び細胞が人工材料の表面へと吸着し、望ましくない効果をもたらすことが、知られている。この特定の生理学的環境に適合する膜の存在は、そのような望ましくない効果を回避するか、又は最小限に抑えることを可能にするであろう。

【0062】本発明による再構築された組織の研究の方法の特定の実行様式において、再構築された組織は、そのような(1個以上の)試験分子に対する膜の反応を特徴決定するため、1個以上の試験分子で処理されうる。

【0063】試験分子は、その性質において極めて多様であってよい。例えば、それは、個々の分子又は物質の混合物であってもよい。化合物の性質は、化学的であってもよいし、又は生物学的であってもよい。特に、それは、ペプチド、ポリペプチド、核酸、脂質、炭水化物、化学分子、植物抽出物、コンビナトリアルライブラリー等でありうる。本発明の方法を実行するため、試験化合物は、使用者により選択された様々な濃度で適用されうる。

【0064】したがって、本発明は、試験化合物、特に治療剤又は化粧品等において使用するための分子の生物学的特性及び/又は毒性の評価のための、前記定義のような再構築された膜の使用を提供する。再構築された膜のこの研究方法は、さらに、電気生理学的方法又はパッチクランプ技術による、異なる細胞型の転写物の分析、並びに電気的活性の分析、交換に關与するイオンチャンネル及び/又は受容体の研究を可能にする。

【0065】本発明の可能性、実行、及びその他の利点を、以下の実施例においてさらに詳細に例示するが、実施例は、制限のためではなく、例示目的のために与えられている。

【0066】材料及び方法

この実施例では、商業的に入手可能な金表面 S i a K i t A u (Biacore) を使用した。金表面によって異なるモル比で使用された2個の商業的に入手可能なチオール誘導体の混合物を含有する1mMエタノール溶液の自発的反応により、6個の異なる支持体 (S i a - 1 0 0、- 7 0、- 3 3、- 2 0、- 1 1、- 0 1) を調製した(図1)。關与したチオール誘導体は、以下の通りである。

- 1 1 - メルカプトウンデカン酸 (H S - (C H 2)₁₀ - C O O H)
- 1 1 - メルカプト - 1 - ウンデカノール (H S - (C H 2)₁₁ - O H)

【0067】前記チオール誘導体を選択した理由：- C O O H 官能基はテザーを固定するよう機能する。S A M 表面に露呈された - C O O H 基の濃度を変動させることにより、テザーの密度が調節されうる。

【0068】S A M の手段によって官能化された支持体へ分子を共有結合させる方法は、アフィニティクロマト

グラフィマトリックスの調製に一般的に利用されているものと類似している。結合反応は、Biacore装置の内部又は外部で実施されうる。ここでは、装置内で - C O O H 基をテザーと反応させ、R U シグナル強度 (Biacore 単位) による結合反応効率のモニタリングを可能にした。

【0069】テザーは、共有アミド結合を介して固定される。

【0070】a) 水性溶媒中で、ジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C) の存在下で、N - ヒドロキシクシンイミド (N H S) と反応させることにより、- C O O H 基をエステルへと活性化する。

【0071】b) 活性化されたエステルと反応するリン脂質テザーは、いくつかの形態で使用されうる：

- 水溶性が充分である場合には、リン脂質の水性溶液、そして、リン脂質が水性溶媒に不溶性である場合には、
- ミセル溶液 (脂質 / 界面活性剤混合物) の形態、
- リポソームの形態。

【0072】ミセルの調製は、界面活性剤の使用を必要とする。本発明者らは、水での洗浄により容易に除去されうる、活性化されたエステルと非反応性の - O H 基を含有している構造を有する、非イオン性界面活性剤オクチルグルコシド (O G) を選択した。異なるリン脂質の構造が、図2に示されている。これらのリン脂質は、商業的に入手可能である。それらは、スパーサーの存在の有無、及び脂肪族鎖の性質 (長さ、不飽和度) に関して異なっている。リン脂質のスパーサーと極性頭部との接合部は、アミド型である。スパーサーは、アミン結合を介した連続的な断片の付加により伸長されうる (図3) 。

【0073】c) リン脂質と反応しなかったカルボキシラート基を、エタノールアミンの存在下で不活化する。前記の脂質を使用した異なる支持体における膜の形成を図5に示す。

【0074】実施例1 (図6及び7)

リン脂質結合工程を最適化するため、異なるpH条件を試験した。完全に自動的に、下記の操作を実行した。

- 1 . 緩衝液 X 中の 5 0 m M O G 界面活性剤 (1 0 0 μ l ; 1 0 分)
- 2 . 5 0 m M N a O H (1 0 μ l ; 1 分)
- 3 . 5 0 m M N a O H (1 0 μ l ; 1 分)
- 4 . E D C / N H S (1 0 0 μ l ; 1 0 分)
- 5 . 脂質 (5 0 m M O G を含む緩衝液 X 中 2 m g / m l) (1 0 0 μ l ; 2 0 分)
- 6 . 脂質 (5 0 m M O G を含む緩衝液 X 中 2 m g / m l) (1 0 0 μ l ; 2 0 分)
- 7 . 緩衝液 X 中の 5 0 m M O G 界面活性剤 (1 0 μ l ; 1 分)
- 8 . エタノールアミン (6 0 μ l ; 6 分)

4. ミセル

- 5.0mM OGを含むHBS-N 1ml当たり脂質2mg (100μl; 20分)
- 2.5mM OGを含むHBS-N 1ml当たり1mg (50μl; 10分)
- 5.20mM NaOH (10μl; 1分)
- 6.20mM NaOH (10μl; 1分)
- 7.BSA(0.1mg/ml) (50μl; 10分)
- 8.HBS-N緩衝液中の50mM OG (100μl; 10分)
- 9.BSA(0.1mg/ml) (50μl; 10分)
- 10.HBS-N緩衝液中の50mM OG (100μl; 10分)

【0088】希釈工程は、連続的に、POPC脂質のミセル溶液(50mM OGを含むHBS-N緩衝液中2mg/ml)をインジェクトし、続いて溶液をHBS-N緩衝液で1/2に希釈することからなる。BSAインジェクションは二重層会合の指標として機能する。実際、BSAは、疎水性表面(例えば、膜を提示しない表面)、即ち、POPCインジェクションの前、又は表面の再生の後の表面と優先的に結合する。膜の存在下では、100RU未満のシグナルが観察されるはずである。

【0089】図4の表は、各表面について得られた結果を与える。(I)は試薬のインジェクション前、(F)はインジェクション後のRUシグナル強度である。シグナルの変動(Δ)は、差(F-I)に相当する。強度は、膜会合前のBSAのインジェクション(インジェクション2)、POPCミセル(インジェクション4)、NaOH(インジェクション5及び6)、POPC膜会合後のBSA(インジェクション7)、表面再生後のBSA(インジェクション9)について報告されている。

【0090】POPC膜会合に対応するシグナルは、20mM NaOHで表面を洗浄し(インジェクション5及び6)、続いて安定なシグナルへと戻した後、即ちBSA(7)のカラム(I)で得られる。POPC膜会合に対応するシグナルの強度は、各表面について、異なるチャンネルでの固定されたDOPE-Cテザーのレベル毎に、与えられている。

*

支持体	予測DOPE-Cテザー密度		観察DOPE-Cテザー密度		収率 (%)
	(RU)	(pmol/mm ²)	(RU)	(pmol/mm ²)	
Sia-100	1820	2.07	1956	2.22	107
Sia-70	1274	1.45	796	0.91	62
Sia-33	1208	1.37	394	0.45	33
Sia-20	728	0.83	512	0.58	70
Sia-11	400	0.45	417	0.47	104

* 2回の実験から計算された平均値

【0098】結合反応の収率が70~100%の範囲であり得ることのみならず、予測値の概算を考慮すると、

*【0091】示されているように、BSA(7)は100RU未満である。BSA(2)及び(9)はBSA(7)よりも大きい。

【0092】Sia-100及び0%:膜会合後のシグナル強度は、リン脂質テザーの存在下又は非存在下で類似している。平均シグナルは、それぞれ700RU及び1200RUである。

【0093】Sia-11、-20、-33、及び-70%:POPC膜会合後のシグナルの増加は、DOPE-C(P)テザーの存在下の方が、その不存在下よりも大きい。テザーの存在下で、POPC膜会合に対応するシグナルの増加は、テザー密度に無関係である。平均変動は、+1000~1200RUである。

【0094】実施例5:膜タンパク質固定試験

Rampタンパク質と結合したR-CGRP受容体が過剰発現されているCHO細胞に由来する膜断片を、Sia-11%表面に適用した。BIAcore装置においてin situで反応を実施した。

【0095】実施例6:テザー密度

炭素鎖が0.40nm²の面積を有し、チオール誘導体分子HS-(CH₂)₁₁-OH又はHS-(CH₂)₁₀-COOHが0.40nm²の面積を有し、DOPE-Cリン脂質分子が0.80nm²の面積を有すると考慮することにより、SAM表面上のDOPE-Cテザーの密度(RU)を、計算した。この例においては、COOH基がリン脂質のNH₂基と反応し、100%の収率でアミド結合を形成することも仮定した。さらに、COOH基の分布が均一であること、及びSAM表面におけるCOOH基の割合が、支持体の調製に使用された溶液のものと同じであることを仮定した。-COOH基が占める真の面積が0.80nm²未満である場合には、SAMの許容量を二分した。1000RUは、1mm²当たり1ngのリン脂質に等しい。DOPE-CのMW:879g/mol。

【0096】結果を以下の表に与える。

【0097】

【表1】

実験的に観察されたDOPE-Cテザー密度は、予測値と近い(Sia-33で見られた低い値を除く)。

【0099】安定性

*【0100】

以下の表は、各インジェクション前後のRUの変動を示す。

【表2】

支持体	POPC 膜	NaOH 20mM 100 μl/分	NaOH 100 mM 10 μl/分	HCl 100 mM 10 μl/分	表面
sia-100	866	-150	-55	-55	fc1=0 (テザーなし)
sia-100	799	-92	-39	40	fc4=1956 RU (テザーあり)
sia-70	961	-139	-33	-28	fc1=0 (テザーなし)
sia-70	1271	-129	-33	3	fc2=951 RU (テザーあり)
sia-70	1641	-107	-45	71	fc3=504 RU (テザーあり)
sia-70	1127	-79	-43	28	fc4=642 RU (テザーあり)
sia-33	906	-248	-46	-28	fc1=0 (テザーなし)
sia-33	1263	-114	-42	3	fc2=402 RU (テザーあり)
sia-33	1979	-171	-57	138	fc3=386 RU (テザーあり)
sia-33	1041	-107	-54	87	fc4=0 (テザーなし)
sia-0	1653	-155	-48	-4	fc1=0 (テザーなし)
sia-0	1157	-108	-55	125	fc4=0 (テザーなし)

【0101】HBS-N排除緩衝液の長時間のインジェクション、20mM NaOH(100 μg/分、1分)、NaOH、及び100mM HCl(10 μl/分 10ul、1分)のインジェクションという実験条件の下で、POPC脂質から形成された支持された膜の安定性は、試験された全ての表面について類似している。各支持体について、テザーなしの表面は、テザーありの表面よりも安定性が低い。

【図面の簡単な説明】

【図1】チオール誘導体の結合の方法(1mMで4で1406時間のエタノール溶液中でのインキュベーション、エタノール溶液中での洗浄、1分間2回の超音波処理、Biacore支持体の金表面への結合)を示す図である。

【図2】リン脂質テザーの構造を示す図である。

【図3】リン脂質テザーの例(POPC)を示す図である。50mM オクチル-D-グルコシド(OG)溶液及びHBS-N緩衝液媒(0.01M HEPES、0.15M NaCl(pH7.4))1ml当たり2mgのPOPCを含有するミセル溶液が、官能化された表面の存在下に置かれる。

【図4】試薬の存在下に置かれた、使用された各試薬について得られた結果を示す図である。(I)は試薬のインジェクションの前、(F)はインジェクションの後のシグナル強度(RU)である。シグナルの変動()は、差(F-I)に相当する。強度は、膜形成前のBSAのインジェクション(インジェクション2)、POPCミセル(インジェクション4)、NaOH(インジェクション5及び6)、POPC膜形成後のBSA(インジェクション7)、表面再生後のBSA(インジェクション9)について与えられている。

【図5a】Sia-0におけるPOPC膜の形成を示す図である。

【図5b】Sia-11におけるPOPC膜の形成を示す図である。

【図5c】Sia-20におけるPOPC膜の形成を示す図である。

【図5d】Sia-33におけるPOPC膜の形成を示す図である。

【図5e】Sia-70におけるPOPC膜の形成を示す図である。

【図5f】Sia-100におけるPOPC膜の形成を示す図である。

【図6】固定工程におけるpHの効果を示す図である。

【図7】固定工程におけるpHの効果を示す図である。

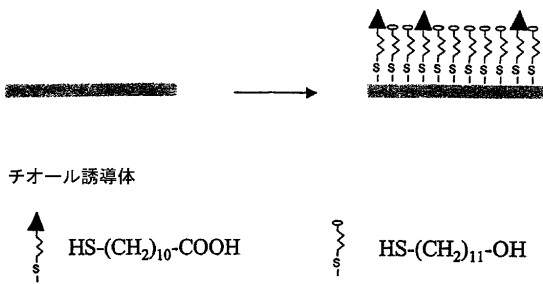
【図8】異なる表面におけるDOPE-C脂質の固定を*

*示す図である。

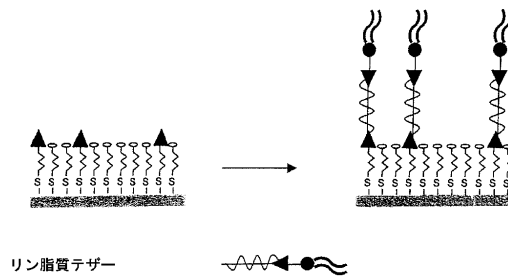
【図9】異なる表面におけるPEG-PE脂質の固定を示す図である。

【図10】支持された膜の形成に関する工程のRUモニタリングを示す図である。

【図1】

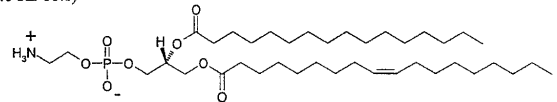


【図2】

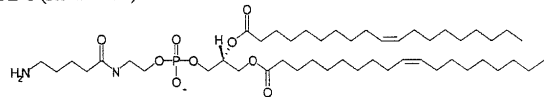


支持体		HS-(CH ₂) ₁₀ -COOH (モル%)
SIA-C ₁₁ OOH	Sia-100	100
SIA-C ₁₁ OOH / C ₁₁ OH-7/3	Sia-70	70
SIA-C ₁₁ OOH / C ₁₁ OH-1/2	Sia-33	33
SIA-C ₁₁ OOH / C ₁₁ OH-1/4	Sia-20	20
SIA-C ₁₁ OOH / C ₁₁ OH-1/8	Sia-11	11
SIA-C ₁₁ OH	Sia-0	0

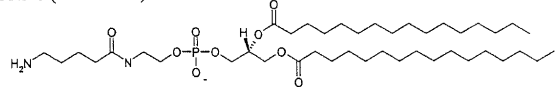
PE (R₁ 16:0 R₂ 18:1)



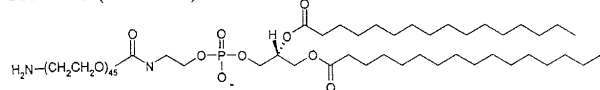
DOPE-C (R₁=R₂ 18:1)



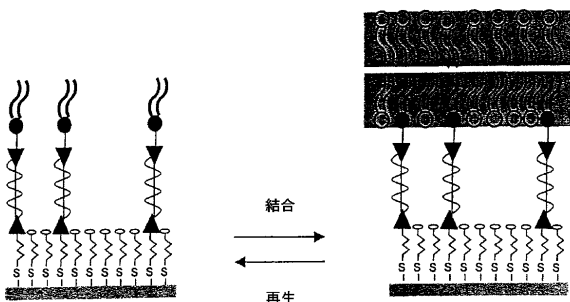
DPPE-C (R₁=R₂ 16:0)



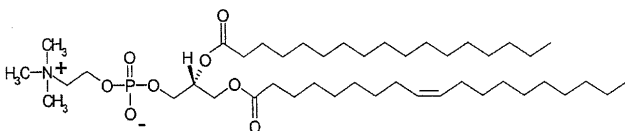
DPPE-PEG (R₁=R₂ 16:0)



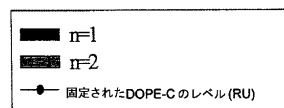
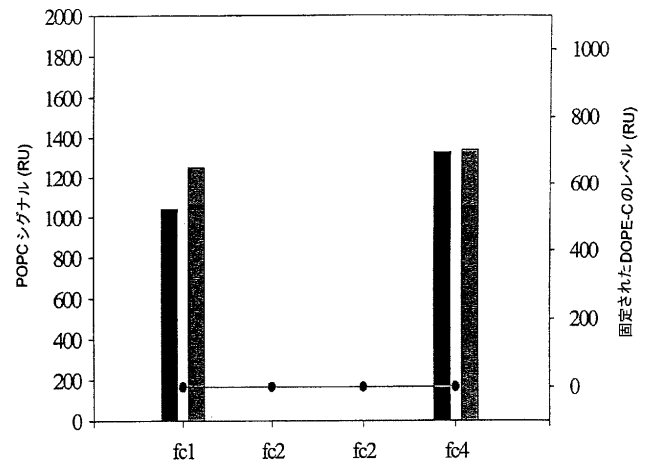
【図3】



POPC (R₁ 16:0 R₂ 18:1):



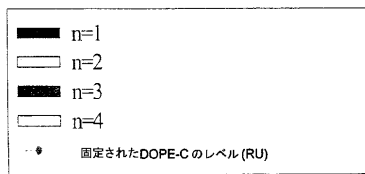
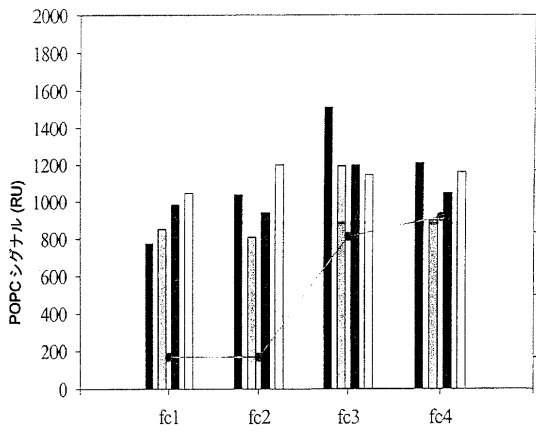
【図5a】



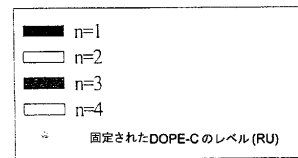
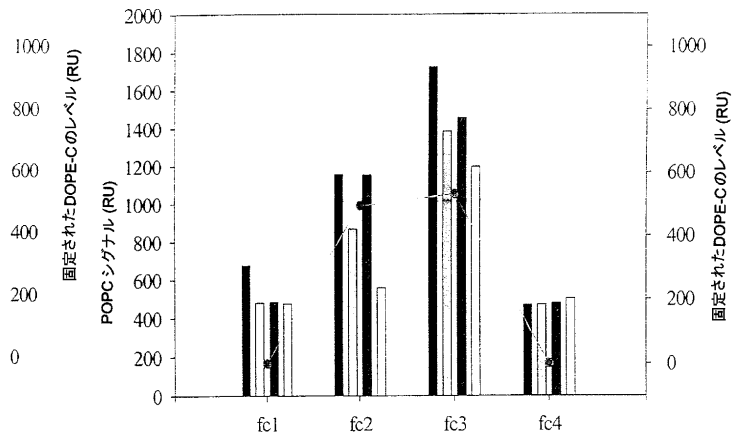
【図4】

支持体	BSA (2)			ミセル (4)			NaOH (5) & (6)			BSA (7)			BSA (9)			n	チャンネル
	I	F	Δ F-I	I	F	Δ F-I	I	F	Δ F-I	I	F	Δ F-I	I	F	Δ F-I		
sia-100	-79	192	271	0	672	818	588	-230	789	789	167	-13	203	216	1	fc3=0(テザーなし) fc4=1956	
sia-100	-46	54	100	0	424	759	694	-65	728	608	-120	-325	-238	87	2	fc3=0(テザーなし) fc4=1956	
sia-100	-60	119	180	0	705	829	659	-170	798	123	-28	158	186	2	fc3=0(テザーなし) fc4=1956		
sia-100	-51	51	101	0	717	1028	965	-63	991	893	-98	-45	80	125	3	fc3=0(テザーなし) fc4=1956	
sia-100	-60	163	223	0	790	918	656	-262	905	232	-172	35	207	3	fc3=0(テザーなし) fc4=1956		
sia-100	-41	235	276	0	638	904	766	-138	797	806	9	-420	-114	306	4	fc3=0(テザーなし) fc4=1956	
sia-100	-43	129	172	0	969	1091	876	-215	1064	173	-33	127	160	4	fc3=0(テザーなし) fc4=1956		
sia-100	-45	227	272	0	1032	1279	1122	-157	1147	1159	12	-38	240	278	1	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642	
sia-70	-85	-31	54	0	580	721	481	-240	494	-12	-6	8	14	1	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642		
sia-70	-50	112	162	0	1059	1286	1139	-147	1185	1096	-89	44	200	156	2	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642	
sia-70	-67	23	90	0	1590	1821	1662	-159	1710	1579	-131	-34	61	95	3	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642	
sia-70	-44	37	81	0	1136	1304	1174	-130	1221	1166	-55	90	177	87	4	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642	
sia-70	-134	146	280	0	547	738	520	-218	681	135	-133	55	188	2	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642		
sia-70	-130	317	447	0	845	917	837	-80	862	923	61	-162	169	331	3	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642	
sia-70	-119	300	419	0	1757	1850	1746	-104	1774	1800	26	-85	437	522	4	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642	
sia-70	-75	261	336	0	1152	1230	1145	-85	1177	1249	72	-119	256	375	1	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642	
sia-70				0	643	773	525	-248	531	-8				3	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642		
sia-70				0	1370	1553	1441	-112	1469	1404	-65			4	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642		
sia-70				0	1381	1574	1418	-156	1435	1393	-42			1	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642		
sia-70				0	1279	1480	1341	-139	1368	1315	-53			2	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642		
sia-70				0	821	913	797	-116	798	-8				3	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642		
sia-70				0	1606	1730	1687	-43	1685	1666	-19			4	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642		
sia-70				0	1140	1231	1178	-53	1182	1186	4			1	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642		
sia-70				0	1130	1228	1168	-60	1165	1167	2			2	fc1=0(テザーなし) fc2=951 fc3=504 fc4=642		
sia33	-26	-20	6	0	503	661	542	-119	472	-96	-124	-102	22	1	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0		
sia33	-50	-29	21	0	670	852	763	-89	798	699	-99	-103	-81	22	2	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0	
sia33	-39	16	55	0	1462	1674	1590	-84	1621	1505	-116	-200	-132	68	3	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0	
sia33	-64	46	110	0	689	876	767	-109	740	-70	-201	-85	116	4	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0		
sia33	-35	26	61	0	698	855	695	-160	663	-59	-146	-71	75	2	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0		
sia33	-52	50	102	0	855	1034	901	-133	941	894	-47	-58	41	99	3	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0	
sia33	-41	77	118	0	1384	1599	1467	-132	1516	1429	-87	-205	-74	131	4	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0	
sia33	-60	83	143	0	497	690	549	-141	571	-35	-273	-136	137	1	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0		
sia33	-41	451	492	0	504	637	533	-104	537	-13	-37	32	69	3	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0		
sia33	-43	-115	-72	0	829	976	843	-133	869	863	-6	-16	77	93	4	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0	
sia33	-45	-262	-217	0	1166	1323	1194	-129	1225	1202	-23	-52	68	120	1	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0	
sia33	-61	230	291	0	662	808	682	-126	713	-9	-97	20	117	2	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0		
sia33				0	681	828	687	-141	679	-45				3	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0		
sia33				0	1209	1363	1241	-122	1280	1213	-67			4	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0		
sia33				0	1336	1473	1365	-108	1404	1362	-42			1	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0		
sia33				0	797	952	846	-106	849	-26				2	fc1=0(テザーなし) fc2=402 fc3=386 fc4=0		
sia-20	-35	144	179	0	653	795	655	-140	749	74	-23	159	182	1	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)		
sia-20	-33	108	141	0	1031	1220	1130	-90	1158	1163	5	15	152	137	2	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)	
sia-20	-1	96	97	0	1602	1798	1702	-96	1726	1668	-58	-2	96	98	3	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)	
sia-20	-40	-39	1	0	393	541	422	-119	379	-91	30	-18	-48	4	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)		
sia-20	-84	157	241	0	431	593	470	-123	588	105	-105	92	197	2	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)		
sia-20	-84	219	303	0	1031	1256	1123	-133	1153	1219	66	-74	188	262	3	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)	
sia-20	-87	201	288	0	1354	1554	1424	-130	1457	1497	40	-80	172	252	4	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)	
sia-20	-81	136	217	0	406	557	438	-119	584	106	-78	111	189	1	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)		
sia-20	-158	201	359	0	419	627	458	-169	658	177	-384	-113	271	3	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)		
sia-20	-82	279	361	0	713	970	833	-137	869	1003	134	-313	13	326	4	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)	
sia-20	-71	276	347	0	1227	1483	1351	-132	1386	1446	60	-298	11	309	1	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)	
sia-20	-152	183	335	0	375	579	428	-151	622	150	-316	-62	254	2	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)		
sia-20				0	432	592	447	-145	489	13				3	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)		
sia-20				0	479	638	522	-116	560	613	53			4	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)		
sia-20				0	1093	1259	1163	-96	1197	1196	-1			1	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)		
sia-20				0	418	558	478	-80	529	25				2	fc1=0(テザーなし) fc2=494 fc3=531 fc4=0(テザーなし)		
sia-11	-108	88	196	0	705	893	754	-139	836	63	-46	102	148	1	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449		
sia-11	-104	83	187	0	866	1128	1009	-119	1055	18	-71	86	157	2	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449		
sia-11	-123	-7	116	0	1329	1603	1478	-125	1511	1451	-60	-102	-11	91	3	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449	
sia-11	-121	-66	55	0	1040	1280	1159	-121	1208	1058	-150	-37	-55	-18	4	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449	
sia-11	-56	32	88	0	772	983	814	-169	794	-58	-350	-272	78	1	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449		
sia-11	-79	73	152	0	627	894	763	-131	770	-39	-289	-146	143	2	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449		
sia-11	-85	53	138	0	969	1273	1146	-127	1193	1108	-85	-303	-179	128	3	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449	
sia-11	-67	115	182	0	727	972	847	-125	897	862	-35	-356	-185	167	4	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449	
sia-11	-53	58	111	0	906	1081	956	-123	974	-7	-48	54	102	3	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449		
sia-11	-80	82	162	0	802	1027	911	-116	930	-10	-53	82	135	4	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449		
sia-11	-82	56	138	0	1034	1281	1167	-114	1198	1155	-43	-97	27	124	1	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449	
sia-11	-86	90	176	0	932	1120	1009	-111	1046	1045	-1	-121	33	154	2	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=386 fc4=449	
sia-11				0	932	1122	1022	-100	993	-51				3	fc1=0(テザーなし) fc2=0(テザーなし) fc3=3		

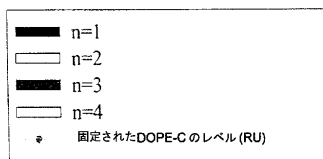
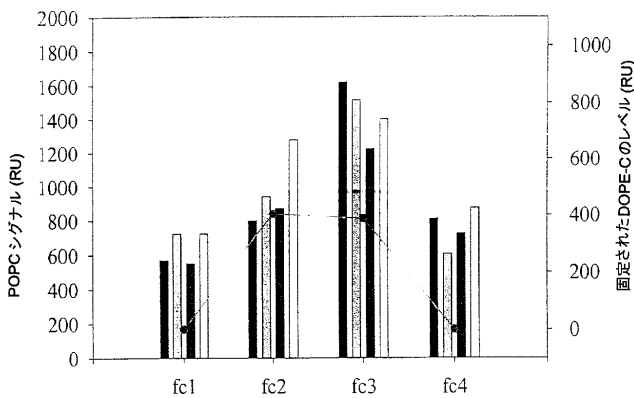
【図5 b】



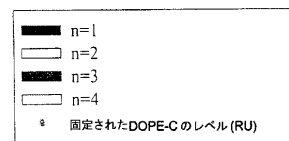
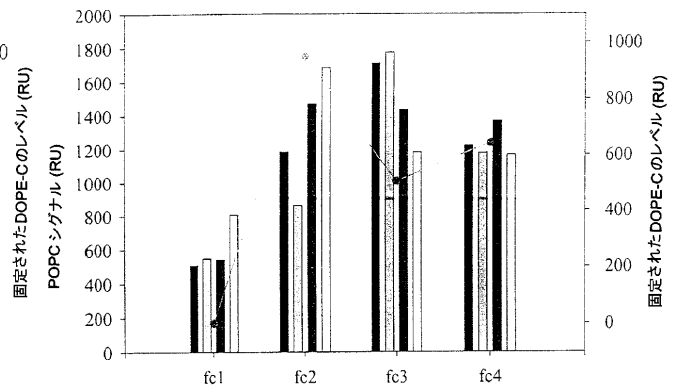
【図5 c】



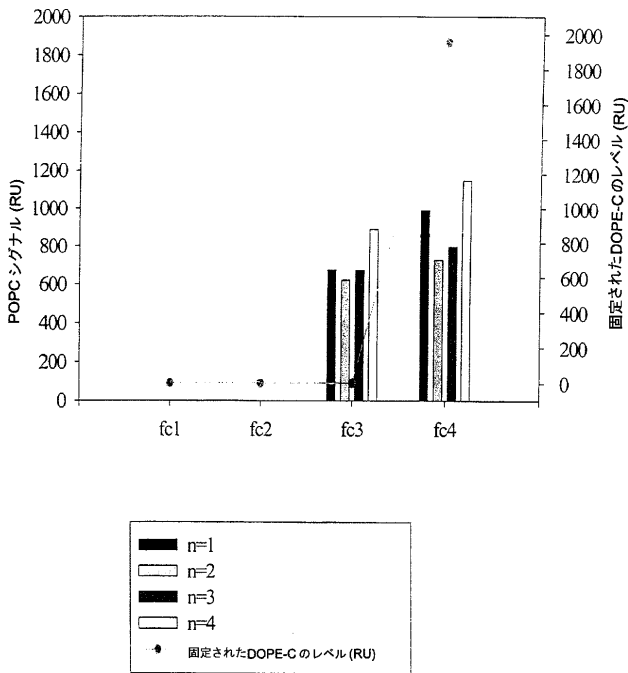
【図5 d】



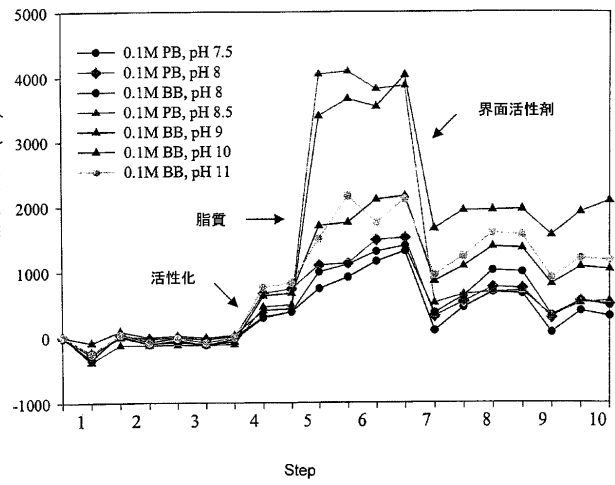
【図5 e】



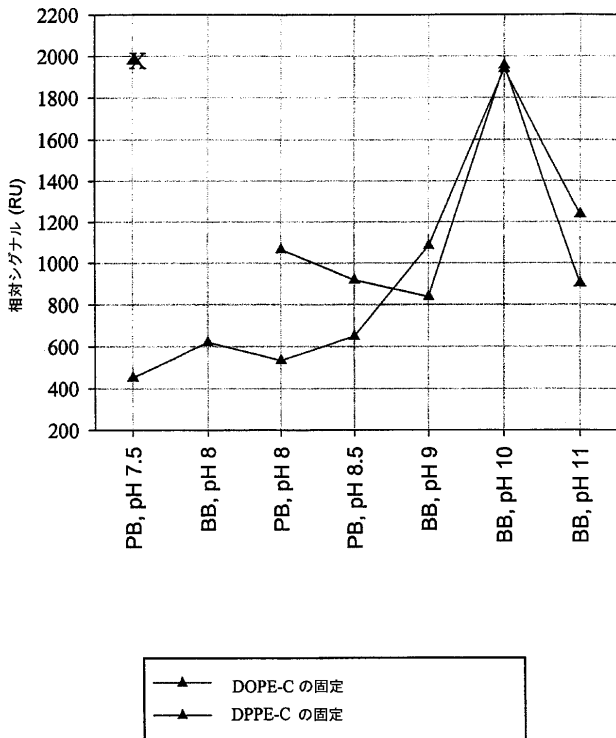
【図5f】



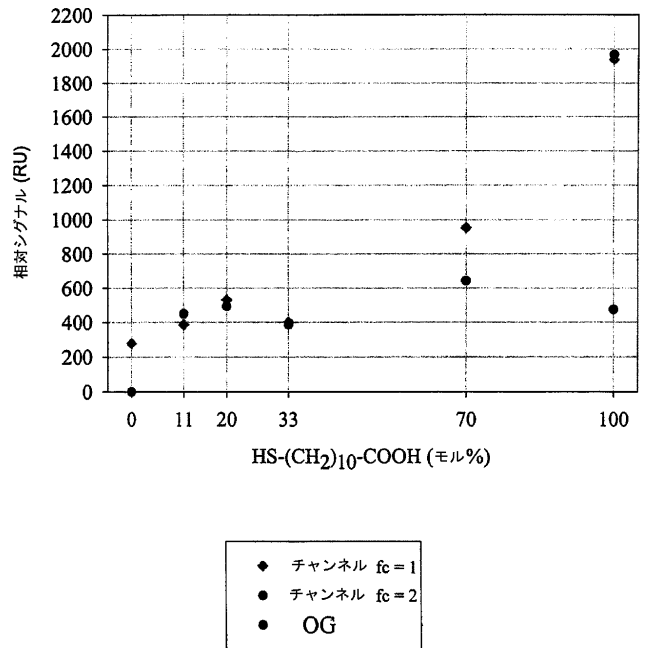
【図6】



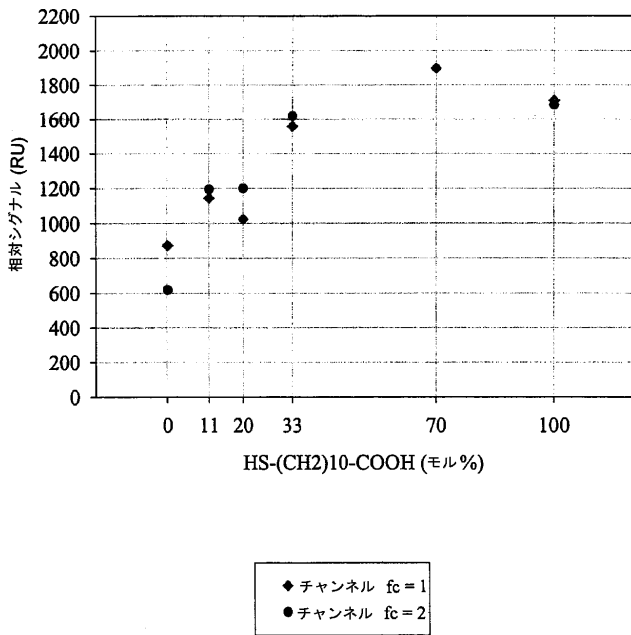
【図7】



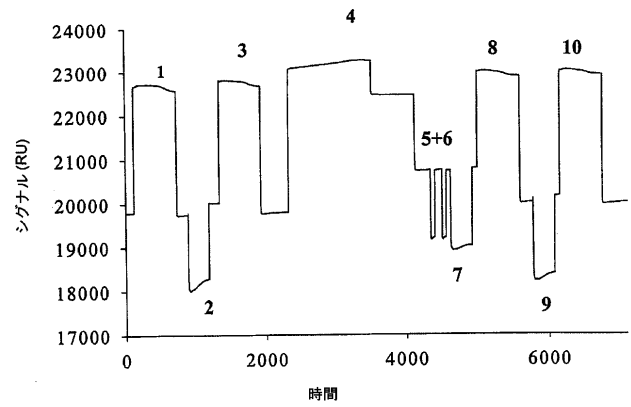
【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(72)発明者 カティ・ドレクスレー
 フランス国、75007 パリ、リュ・サン -
 ドミニク 54

(72)発明者 パトリック・ベルナ
 フランス国、91120 プレゾー、アヴニ
 ュ・ジャン・ジョーレ 66
 Fターム(参考) 4H045 AA20 DA50 GA20

【外国語明細書】

1. Title of Invention

NEW SUPPORTED MEMBRANE, PREPARATION AND USES

2. Claims

1. Method of preparation of an artificial supported membrane comprising the following steps:
 - a) placing a functionalized surface in the presence of a mixture of specific ligands (L) and phospholipid tethers (P) able to bind to said functionalized surface, and
 - b) placing the surface formed in a) in the presence of lipids so as to allow the assembly of a lipid bilayer supported by the phospholipid tethers (P).
2. Method according to claim 1, wherein the functionalized surface comprises molecules bearing functional groups allowing covalent binding to the phospholipid tethers (P) and/or specific ligands (L), and molecules bearing non-functional groups.
3. Method according to claim 2, wherein the functionalized surface comprises molecules bearing functional groups binding specifically to the phospholipid tethers (P) and other molecules bearing functional groups binding specifically to the specific ligands (L).
4. Method according to claim 2, wherein the functionalized surface comprises molecules bearing functional groups X, that can possibly be activated, binding to the specific ligands (L) and the phospholipid tethers (P), and molecules bearing non-functional groups Z.
5. Method according to claim 3, wherein the functionalized surface comprises a mixture of molecules bearing functional groups X and Y, the X and Y groups binding selectively to the specific ligands (L) and tethers (P), respectively.

6. Method according to one of claims 4 or 5, wherein the molecules bearing functional or non-functional groups are thiol derivatives represented by the formula $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_m\text{-Y}$ or $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-Z}$ in which n and m , which are the same or different, represent a whole number comprised between 2 and 15.

7. Method of preparation of a supported membrane, comprising the following steps :

- a) coating a surface with molecules represented by the formula $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$ and $\text{HS}-(\text{CH}_2)_m\text{-Z}$, X being a previously activated functional group capable of coupling with a specific ligand (L) or phospholipid tether (P), Z being a non-functional group incapable of reacting with said ligand (L) or tether (P) and n and m being comprised between 2 and 15,
- b) placing the functionalized surface obtained in a) in the presence of a mixture containing specific ligands (L) and phospholipid tethers (P), then
- c) placing the surface obtained in b) in the presence of lipids so as to allow the assembly of a lipid bilayer supported by the phospholipid tethers (P).

8. Method of preparation of a supported membrane, comprising the following steps:

- a) coating a surface with a mixture of molecules represented by the formula $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_m\text{-Y}$ and $\text{HS}-(\text{CH}_2)_m\text{-Z}$, X and Y being previously activated functional groups capable of coupling with a phospholipid tether (P) and a specific ligand (L), respectively, Z being a non-functional group incapable of reacting with said ligand (L) or tether (P) and n and m being comprised between 2 and 15,
- b) placing the functionalized surface obtained in a) in the presence of a mixture containing specific ligands (L) and phospholipid tethers (P), then

c) placing the surface obtained in b) in the presence of lipids so as to allow the assembly of a lipid bilayer supported by the phospholipid tethers (P).

9. Method according to claim 7 or 8, wherein, in step b), the surface obtained is placed in contact with the phospholipid tethers (P) in a first step, and with the specific ligands (L) in a second step.

10. Method according to one of claims 7 to 9, wherein it comprises an additional step, after step a), to inactivate X or Y groups that did not react with the ligands (L) or tethers (P).

11. Method according to any of the previous claims, wherein it comprises an additional step to insert one or more proteins in the supported membrane.

12. Method according to any of the previous claims, wherein the lipids used in step c) are cell extracts, membrane fragments, micelles, lipid monolayers or bilayers, lipid vesicles and/or lipids, phospholipids, lipopeptides or biotinylated lipids, alone or in mixtures.

13. Method according to any of the previous claims, wherein the surface used is a surface of gold, glass, diamond, silicon, silicon dioxide (SiO_2), silicone nitrite, tantalum pentoxide (Ta_2O_5), titanium dioxide (TiO_2), titanium nitrite, titanium carbide, platinum, tungsten, aluminium or indium-tin oxide, or based on these materials.

14. Method according to claim 13, wherein the surface is a metallic surface, preferably based on or made of gold.

15. Method according to any one of claims 6 to 14, wherein the numbers n and m are equal to 10 or 11.
16. Method according to one of claims 2 to 15, wherein the functional groups X and Y are chosen from among COOH, CHO, OH, NH₂ groups, maleimide and biotin.
17. Method according to one of claims 2 to 16, wherein the molar ratio of the functional groups X and Y to the non-functional groups is comprised between 0.05 and 20, preferably between 0.1 and 5 and even more preferably between 0.2 and 0.3.
18. Method according to any one of the previous claims, wherein the specific ligand (L) comprises a group with specific affinity for a molecule of interest, a point of anchorage to the functionalized surface and a spacer, the length of which is preferably comprised between 3 and 500 Å.
19. Method according to claim 18, wherein the specific ligand (L) comprises a group with specific affinity for a molecule of interest chosen from among a protein, a substrate, an antigen, a hapten, a lectin, a bioreceptor, an oligonucleotide or an immunoglobulin or a region thereof, preferably a protein.
20. Method according to claim 19, wherein the group with specific affinity of ligand (L) is an antibody or antibody fragment specific of a membrane protein.
21. Method according to any one of the previous claims, wherein the phospholipid tether (P) comprises a point of anchorage to the surface, a spacer and a phospholipid.

22. Method according to claim 21, wherein the phospholipid tether (P) comprises a spacer whose length is less than 500 Å, preferably comprised between 3 and 500 Å.

23. Artificial supported membrane wherein it comprises a lipid bilayer attached to a support by phospholipid tethers (P) creating a space between the bilayer and the support, and wherein it comprises one or more ligands (L) specific of a molecule of interest covalently bound to the support and exposed in said space.

24. Artificial supported membrane wherein it may be produced by a method according to one of claims 1 to 22.

25. Use of a supported membrane according to claim 23 or 24, or obtained by a method according to any one of claims 1 to 22, for the purification of membrane proteins.

26. Use of a supported membrane according to claim 23 or 24, or obtained by a method according to any one of claims 1 to 22, for the reversible capture of membrane proteins or membrane protein complexes.

27. Use of a supported membrane according to claim 23 or 24, or obtained by a method according to any one of claims 1 to 22, for the screening of compounds interacting with membrane proteins.

28. Use of a supported membrane according to claim 23 or 24, or obtained by a method according to any one of claims 1 to 22, for the analysis of protein-protein interactions within a membrane.

29. Method of purification of a membrane protein, comprising placing a supported membrane according to claim 23 or 24, or obtained by a method according to any one of claims 1 to 22, in the presence of a membrane preparation comprising the protein to be purified, under conditions allowing introduction of said protein into said supported membrane, and applying a flow of lipids.

3. Detailed Description of Invention

The present invention describes a new artificial supported membrane, as well as methods of preparation of such membrane or of reconstitution of cell membranes from their constituent proteins and lipids. Such membrane comprises a lipid bilayer attached to a support by phospholipid tethers (P) creating a space between the bilayer and the support, as well as one or more ligands (L) specific of a protein, covalently bound to the support and exposed in said space. The invention equally describes the uses of such membranes which allow the purification and/or capture (possibly in a reversible manner) of membrane proteins or yet the screening of compounds that interact with some of these proteins. A membrane according to the invention may further serve to evaluate the toxicity or, conversely, the therapeutic effect of test compounds. The invention is particularly useful for analyzing protein-protein interactions within membranes and may thus be employed in the pharmaceutical industry for analysis of the toxic or beneficial profile of molecules that may be candidates for pharmaceutical development and/or enter into pharmaceutical compositions. In the field of biotechnology or in the field of medicine, such supported membranes may also be used in the manufacture of more efficient biomaterials.

Cell membranes are generally composed of a lipid bilayer whose components are held in place through intermolecular forces. Hydrophobic bonds in particular maintain the cohesion of the bilayer. A lipid is generally defined as a molecule comprising a hydrophobic hydrocarbon chain and a hydrophilic polar headgroup. Such membranes separate cellular compartments and are therefore exposed both to the inner compartment and the outer compartment of the cell.

Cell membranes are sites of signal transduction processes essential for cellular life. Specialized membrane receptors are specific binding sites of ligands thereby allowing transmission of extracellular signals through the

membrane, their amplification and their integration. Supported lipid bilayers are therefore excellent models to study ligand-receptor interactions occurring at the surface of cell membranes.

The supported membranes described in the prior art comprise phospholipid bilayers immobilized on metallic surfaces, the proximal lipid layer located at some distance from said surface in such a way as to create an aqueous space within which membrane receptor molecules can be inserted (cf : WO 96/38726). Hydrophilic spacer molecules are thus used to maintain this aqueous space essential for the function of membrane-anchored proteins and for maintenance of membrane fluidity. The metallic surface may be coated with a SAM (Self-Assembled Monolayer), composed of molecules comprising long chains, preferably hydrocarbons and containing a number of carbon atoms that is generally greater than 10, which are sometimes interrupted by heteroatoms. Such chains carry a functional group allowing the membrane to be anchored to the support.

One of the main drawbacks of the known artificial membranes is that they are not suited for use in any type of purification, in so far as they do not allow retention or capture of the membrane proteins which one is seeking to purify for the purpose of enriching the artificial membrane in said membrane proteins. Obtaining artificial membranes enriched in a molecular species (e.g., a membrane protein) has proved decisive for the study of said molecular species in its natural environment in a selective and specific manner. Selectivity and specificity are critical properties for the use of artificial membranes in screening tests of membrane proteins, *a fortiori* and in particular for screening tests of the high throughput type (HTS).

The present invention makes it possible, in particular thanks to the presence of tethers and molecules capable of retaining or capturing the molecular

species of interest in its natural form or conformation, to obtain supported membranes enriched in said molecular species and in particular supported membranes comprising only said molecular species.

Furthermore, known membranes (WO 96/38726) present a constraint in terms of the size and arrangement of the spaces able to accept membrane proteins. The present invention makes it possible to modulate the architecture of the spaces able to accept membrane proteins by varying the arrangement and density of the tethers that support the membrane. This results in better control of membrane stability and fluidity over the entire supported membrane.

The present invention therefore proposes for the first time methods for the preparation of artificial membranes comprising a lipid bilayer anchored to a support by phospholipid (P) tethers that create an (aqueous) space between the bilayer and the support, and one or more ligands (L) specific of a protein (or a molecule of interest) covalently bound to the support and exposed in said space. Such ligands have the particular feature of considerably enhancing the specificity of binding to one or several specific types of proteins of interest.

The invention thus describes for supported membranes allowing specific binding of proteins of interest, in a functional configuration. This characteristic offers numerous advantages, including notably the use of the membranes for the purification of proteins from membrane preparations.

It is understood that « purification of proteins from membrane preparations » refers in particular to the enrichment in a molecular species of interest of a membrane preparation.

The present application equally describes the conditions of preparation of artificial supported membranes, conferring better stability and better fluidity of the membrane, for applications such as purification, screening, etc.

In this regard, one method of the invention comprises notably the following steps :

- a) placing a functionalized surface in the presence of a mixture of specific ligands (L) and phospholipid tethers (P) able to bind to said functionalized surface, and
- b) placing the surface obtained in a) in the presence of lipids so as to allow the assembly of a lipid bilayer supported by the phospholipid tethers (P).

The functionalized surface generally comprises molecules bearing functional groups allowing a covalent bond to be formed between the phospholipid tethers (P) and/or specific ligands (L), and molecules bearing non-functional groups.

The invention equally relates to the use of the supported membranes defined hereinabove, kits comprising them and methods of purification or screening of compounds implementing them.

To better understand the features of the invention and before describing the preferred methods by which to produce an artificial supported membrane, the nature of the components of such membrane shall first be described.

Nature of the surfaces

The surfaces used are artificial surfaces. Usable materials include in particular surfaces composed of or based on materials such as gold, glass, diamond, silicon, silicon dioxide (SiO₂), silicon nitrite, tantalum pentoxide

(Ta₂O₅), titanium dioxide (TiO₂), titanium nitride, titanium carbide, platinum, tungsten, aluminium or indium-tin oxide, alone or in mixtures. Metallic supports, such as notably surfaces composed of or based on gold, are preferred.

An example of a usable support is a commercially available gold surface of the type Sia Kit Au (Biacore). This support can be analyzed by Surface Plasmon Resonance (SPR) and is compatible with the BIACore apparatus.

The surfaces analyzed or used may adopt any useful functional forms and may, for example, be two-dimensional spaces, in the form of a square, rectangle or circle, preferably planar, or three-dimensional spaces, in the form of a cube, parallelepiped or sphere. Their areas range from 1 mm² to 100 cm². In a preferable manner, the area is comprised between 1 and 5 cm². Even more preferably, the area is comprised between 1 and 2.4 cm².

Description of the functionalized surface

The surface serving as the support is functionalized, i.e. preferably coated with a mixture of molecules bearing functional and non-functional groups. In a preferred manner, the surface is functionalized in the form of a SAM (Self-Assembled Monolayer). The surface may be functionalized with several types of functional groups able to interact, preferably in a covalent manner, with the (P) and/or (L) groups.

Some functional groups may further be activated so as to interact with the tether (P) and/or ligand (L).

Among the functional groups utilized, some can specifically bind the phospholipid tethers (P) while others specifically bind the specific ligands (L). This mode of implementation permits good control of the (P)/(L) ratios in the

membrane. In this respect, the (P)/(L) ratio is preferably comprised between 0 and 10, more preferably between 0 and 4, and even more preferably between 0.01 and 1.

The type of functional group is chosen according to the coupling reaction used to anchor the tether (P) and the specific ligand (L). Such groups may correspond to a COOH, CHO, OH, NH₂, maleimide, or biotin group, for example. Following activation, these groups form a covalent bond of the amide (-NHCO-) or imide (-CHNH-) type if the (P) or (L) group bears an NH₂ function, a disulfide bridge (-S-S-) or thioether (-C-S-) if the (P) or (L) group bears an -SH bond or yet a stable biotin-streptavidin/avidin complex when the (P) or (L) group is functionalized with streptavidin or avidin.

One of the preferred functional groups according to the invention is the COOH group. The latter may be activated and thereby give rise to formation of an ester by reaction in aqueous medium with N-hydroxysuccinimide (NHS) and in the presence of dicyclohexylcarbodiimide (DCC).

In a first specific embodiment of the invention, the functionalized surface comprises functional groups X that can possibly be activated, capable of anchoring the specific ligands (L) and phospholipid tethers (P), and non-functional groups Z.

The term non-functional group refers to any molecule incapable of reacting (i.e., covalently and specifically binding) with a (P) or (L) molecule. It may be any nonreactive molecule or groups such as noted hereinabove, but which are not previously activated.

In a second specific embodiment, the surface is coated with a mixture of molecules comprising molecules bearing functional groups X and Y, that can

possibly be activated, capable of covalently and specifically binding the phospholipid tethers (P) and/or the specific ligands (L).

In another specific embodiment of the invention, the functionalized surface comprises a mixture of molecules bearing functional groups X and Y, the groups X and Y selectively binding the specific ligands (L) and the tethers (P), respectively.

In the preparation of the membranes disclosed in the invention, the molar ratio of functional groups X and Y to non-functional groups Z is generally comprised between 0.05 and 20, preferably between 0.1 and 5. In an especially advantageous manner, this ratio is less than 1 and, more preferably, comprised between 0.1 and 0.3. The studies carried out indicate that these preferred ratios confer sufficient stability all while allowing the insertion, in the membranes, of important proteins or protein complexes.

The molecules used to coat the surface may be thiol derivatives represented by the formula $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_m\text{-Y}$ or $\text{HS}-(\text{CH}_2)_p\text{-Z}$.

The advantage of using a mixture of at least two thiol derivatives is to be able to control the density of functional groups present at the surface and thereby to favor the capture of a membrane protein which is more or less large in size, the stability of the membrane and its fluidity.

The thiol derivatives may differ by the nature of their chain and, as indicated hereinabove, by the type of functional group. Thus, the length of the carbon chain varies as a function of the numbers n, m and p. Generally, n, m and p are comprised between 2 and 15, more preferably between 8 and 15 and, in a preferred variant, they are equal to 10 or 11. The length of the chain may be adjusted by those skilled in the art.

It is desirable that all molecules bearing functional groups are more or less equal in length, so as to obtain a homogeneous surface. For this reason, the numbers n , m and p should preferably be essentially the same or similar, particularly not differing by more than ± 2 . Especially preferred is the use of the molecules defined hereinabove, wherein n , m and p are the same whole numbers.

The nucleophilic groups that bind to the support surface may be thiols as described hereinabove but they may also be primary, secondary or tertiary amines bound directly or by means of a spacer whose length is necessarily shorter than that of the spacer of the phospholipid tether (the latter shall be described in more detail below). In addition to amines, they may also be hydrazide or carboxylate groups. In these latter cases, the lipids placed in contact with this surface must bear polar headgroups modified by electrophilic groups such as phosphatidyl esters, halide esters or acids or even carbonyl, epoxide or vinyl groups. The advantage of thiol, pyridyl disulfides, maleimides or haloacetate functions is that they give rise to selective reactions. Such functions are therefore preferred in the scope of the invention.

Description of the phospholipid tethers (P)

The tethers disclosed in the invention preferably comprise three parts, namely, an anchorage point to the functionalized surface, a spacer and a phospholipid.

In fact the tethers bind to the SAM through the functional groups (activated to this effect), described hereinabove. As noted, the anchorage point comprises a reactive group that can react with a functional group on the

functionalized surface. Such functional group may be a COOH, CHO, OH, NH₂, maleimide or biotin group, for example.

One object of the present invention therefore relates to particularly advantageous methods in which the phospholipid tether (P) comprises a point of anchorage to a functionalized surface, a spacer - situated between the anchorage point and the polar headgroup of the phospholipid - and a phospholipid. The spacer usually corresponds to a hydrophilic chain comprising from 2 to 200 carbon atoms, the length of the spacer being less than 500 Å, preferably comprised between 3 and 500 Å. Spacers having a length of approximately 3.5-5 Å, 11-14 Å or 170-220 Å, may be cited as examples.

So as to obtain a planar surface, the tethers must have more or less the same length.

The phospholipid tether may be used in several forms :

- it may be an aqueous solution of the phospholipid in the case where the latter has sufficient water solubility
- it may also be a micelle solution (lipid/detergent mixture) or liposomes when the phospholipid is insoluble in aqueous medium.

The phospholipid head of the tether serves as the point of attachment of the bilayer. It may correspond to different phospholipids, such as the phospholipids present in the membranes of mammalian cells or of plant or bacterial cells, etc. For example, it may be phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylglycerol (PG), etc.

Different commercially available phospholipid tethers may be utilized in the invention, which differ from each other in terms of the length (l) of the spacer and the structure of the phospholipid fatty acid chain. Among the commercially available phospholipid tethers that may be used in the scope of the invention, specific examples include PE, comprising a spacer whose length varies between 3 and 5 Å, DOPE-C comprising a spacer whose length varies between 11 and 14 Å, PEG-DPPE comprising a spacer whose length varies between 176 and 214 Å (Figure 2).

Description of the specific ligands (L)

The specific ligand (L) comprises a group with specific affinity for a specific molecule and an anchorage point to the functionalized surface. In a particular embodiment, the ligand further comprises a spacer. The spacer of the ligand may correspond to a hydrophilic chain comprising from 2 to 200 atoms and is preferably chosen so that the length of the specific ligand is less than that of the phospholipid tether.

The affinity group of the ligand (L) may be a natural, synthetic or chemical product displaying affinity for a molecule of interest, such as notably a protein and more specifically a membrane protein, a membrane receptor (able to bind to an inhibitor or effector ligand), an immunoglobulin, a lectin, an antigen, a hapten or a substrate, etc., such molecules being able to specifically bind to a respective ligand. In a preferred embodiment of the invention, the specific ligand L corresponds to a ligand with specific affinity for a protein constituent. Advantageously it is a specific antibody or antibody fragment (e.g., Fab, Fab'2, CRD, ScFv, etc.) of a protein or protein complex, particularly of at least one extramembrane part of a protein or protein complex.

The ligand may also be a protein known to have specific affinity for a class of molecules such as a lectin, streptavidin, A protein, G protein or more broadly for a protein that is part of a multiprotein complex. According to another preferred variant, L corresponds to a chemical molecule of low molecular mass displaying affinity for the protein of interest to be bound. Such chemical molecule may be an inhibitor, activator, agonist, antagonist, effector or cofactor of such protein.

A membrane protein present in a natural vesicle or in membrane fragments may thus be bound to the support, according to an especially advantageous method, by reaction with the specific ligand. The bound membrane protein may be purified by introducing a flow of phospholipid at the surface of the membrane so that unbound proteins are eluted or swept away.

Moreover, in the construction of a membrane according to the invention, it is possible to use several ligands (L) having affinity for different molecules of interest. These may be two membrane receptors, a receptor and a co-receptor, a receptor and a G protein, several receptor subunits, etc.

The specific ligands (L) are anchored to the SAM through the functional groups described hereinabove. As noted, the point of anchorage comprises a reactive group that can react with a functional group on the functionalized surface. When the functional group is a COOH, CHO, OH, NH₂, maleimide or biotin group, the reactive group may be an SH, NH₂ group, avidin or streptavidin, for example.

The spacer of the specific ligand (L) may equally correspond to a hydrophilic chain. The spacer length is chosen so that the length of the specific ligand (L) is less than that of the tether (P). Preferably, the spacer comprises from 2 to 50 atoms. The spacer length is advantageously less than 500 Å and is

preferably between 3 and 500 Å and even more preferably between 3 and 400 Å. Spacers with lengths comprised between 3 and 5 Å, between 10 and 20 Å or between 150 and 220 Å may be given as examples. The length of the spacer of the ligand (L) is preferably less than the length of the spacer of the tether (P).

Principle of the coupling reaction

Coupling may be accomplished by means of methods known in themselves, generally comprising the following steps :

- A first, optional step to activate the functionalized surface,
- A step to couple the functional groups to tethers (P) and to specific ligands (L), and
- An optional step to inactivate unreacted functional groups.

The X and/or Y groups on the functionalized surface are possibly activated before the fixation of the tethers and ligands. Activation of the functional group is not always necessary and depends on the nature thereof. Taking the COOH group as an example, activation consists in reacting this functional group in aqueous medium and in the presence of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) with N-hydroxysuccinimide (NHS), so as to form an ester. X is then able to react with L or P indifferently.

The Y group may then correspond to a non-functional hydroxyl group (OH) which does not take part in the coupling reaction.

Another possibility disclosed in the invention consists in activating both X and Y groups and introducing in the mixture a molecule bearing a non-functional group Z, incapable of binding selectively and covalently with an (L) or (P) molecule. The interest of introducing a molecule bearing a non-functional

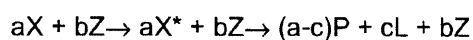
group is to preserve free spaces between the phospholipid tethers, wherein proteins of interest will be able to insert themselves by binding to the specific ligands (L).

The coupling reaction is carried out in one or two steps :

P and L may be co-coupled , i.e. simultaneously coupled, or P and L may be coupled in two successive steps via the functional groups of each.

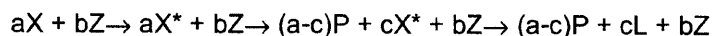
The number of L or P molecules anchored to the surface of the support depends either on the amounts of (P) and (L) used, when coupling occurs via specific functional groups, or on the molar ratio of (L) and (P) present in the mixture, or on the concentration of the functional groups that can react specifically with (L) and (P).

- The situation where X corresponds to the functional group and Z to the non-functional group may be represented by the following formula :

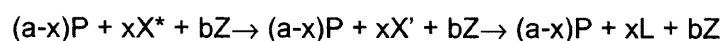
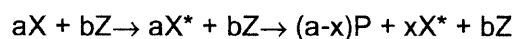


wherein a= number of X groups, X*= activated X group, b= number of Z groups, c= number of ligands, (a-c)= number of tethers (P) and a+b=100.

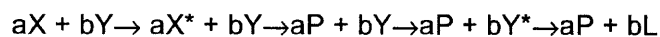
- The case where the functional groups X are activated then successively placed in the presence of the tether (P) and the specific ligand (L) allows better control of the density of the tethers anchored to the surface of the SAM and may be represented by the following formula :



- The situation where the functional groups X are activated and react with the tether (P) may be represented by the following formula, unreacted X groups being inactivated by means of a molecule capable of binding with a specific ligand (L). :



- The case where the X and Y groups after activation react with the tether (P) and the ligand (L), respectively, may be represented by the following formula :



Activated groups which did not react undergo an inactivation reaction. In the case of carboxylate groups, ethanolamine (Biacore) may be used as an inactivation mean.

Source and components of the lipid bilayer

The lipid bilayer of the membranes disclosed in the invention may comprise lipids of diverse nature and origin. Such lipids may come from cell extracts, membrane fragments, lipid monolayers or bilayers, liposomes or lipid vesicles and/or lipids, phospholipids, lipopeptides, biotinylated lipids and their mixtures. The bilayer is formed by assembly of the lipids with the lipids of the tether (P). The amount of lipids used, regardless of their form, is adapted by those skilled in the art.

The planar and continuous membranes prepared according to the invention may be produced in an apparatus such as the Biacore so as to maintain a constant flow of solvent and/or solute and/or lipid vesicles at the membrane surface. This principle lowers the risks of contamination and of membrane denaturation or destruction.

In a preferred manner, the construction of the membrane is envisioned according to two methods which consist in a dilution of micelles or a fusion of vesicles.

Methods yielding a supported membrane

The present invention describes several methods by which to produce a supported membrane. Generally speaking, they comprise the following steps :

- a) placing a functionalized surface in the presence of a mixture of specific ligands (L) and phospholipid tethers (P), able to bind to said functionalized surface, and
- b) placing the surface obtained in a) in the presence of lipids so as to allow the assembly of a lipid bilayer supported by the phospholipid tethers (P).

This method distinguishes among the functional groups the X groups that can possibly be activated, capable of coupling with the specific ligands (L) and/or the phospholipid tethers (P), as well as the non-functional groups Z.

According to another variant of the invention, the functional groups X and Y may both be activated so as to specifically bind (anchor) the specific ligands (L) and/or phospholipid tethers (P).

In a particular method, the surface comprises a mixture of molecules bearing functional groups X and Y, the X and Y groups selectively binding the specific ligands (L) and tethers (P), respectively.

As explained hereinabove, the molecules bearing functional groups may be thiol derivatives represented by the formula $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$ or $\text{HS}-(\text{CH}_2)_m\text{-Y}$, n and m being comprised between 2 and 15.

Another method according to the invention yields a supported membrane. It comprises the following steps :

- b) coating a surface with molecules represented by the formula $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$ and $\text{HS}-(\text{CH}_2)_m\text{-Z}$, X being a previously activated functional group capable of coupling with a specific ligand (L) or a phospholipid tether (P), Z being a non-functional group, n and m being an integer comprised between 2 and 15,
- c) placing the surface obtained in a) in the presence of a mixture containing the specific ligands (L) and the phospholipid tethers (P), then
- d) placing the surface obtained in b) in the presence of lipids so as to allow the assembly of a lipid bilayer supported by the phospholipid tethers (P).

According to a further method of the invention, it is possible to produce a supported membrane comprising the following steps :

- a) coating a surface with molecules bearing functional groups represented by the formula $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$ and $\text{HS}-(\text{CH}_2)_m\text{-Z}$, X being a previously activated functional group capable of coupling with a specific ligand (L) or a phospholipid tether (P), Z being a non-

- functional group, n and m being an integer comprised between 2 and 15,
- b) placing the surface obtained in a) in the presence of phospholipid tethers (P), then
 - c) placing the surface obtained in b) in the presence of specific ligands (L), and
 - d) placing the surface obtained in c) in the presence of lipids so as to allow the assembly of a lipid bilayer supported by the phospholipid tethers (P).

Another method comprises the following steps :

- a) coating a surface with molecules bearing non-functional groups and molecules bearing functional groups represented by the formula HS-(CH₂)_n-X, HS-(CH₂)_m-Y and HS-(CH₂)_n-Z, X and Y being previously activated functional groups capable of coupling with a specific ligand (L) and a phospholipid tether (P), respectively, Z being a non-functional group, n and m being an integer comprised between 2 and 15,
- b) placing the surface obtained in a) in the presence of a mixture containing specific ligands (L) and phospholipid tethers (P), then
- c) placing the surface obtained in b) in the presence of lipids so as to allow the assembly of a lipid bilayer supported by the phospholipid tethers (P).

The methods described hereinabove may comprise an additional step after step a) to inactivate X and Y groups that did not react with the ligands (L) or tethers (P). Such inactivation may be performed by any known method, according to the nature of the X or Y group, and for example by molecules capable of binding to the X or Y groups.

Moreover, in a particular embodiment, the method comprises an additional step to insert a molecule of interest into the membrane. This step may be carried out at the same time as the assembly of the bilayer, or thereafter. When this step is carried out after assembly of the bilayer, it is preferably executed by fusion of a natural vesicle containing the protein of interest, with the previously assembled bilayer.

The invention encompasses any artificial membrane obtained according to any of the methods disclosed hereinabove.

Applications of supported membranes

The membranes according to the invention therefore represent an ideal model to study exchanges across cells, without having to resort to animal experimentation but remaining close to the *in vivo* situation. In particular, they enable analysis of protein-protein interactions within the membrane, by using purified proteins, under physiological conditions.

SPR analysis is an optical method which, like ellipsometry and evanescent wave spectroscopy (EWS), Brewster angle refractometry, critical angle refractometry, Frustrated Total Reflexion (FTR), evanescent wave ellipsometry, Scattered Total Internal Reflexion (STIR), etc., allows measurement of surface concentrations or refractive index. These parameters indeed vary in relation to membrane composition and thus permit the study thereof.

The supported membranes of the invention may advantageously be used for the reversible capture of membrane proteins, complexed or not, by means of their specific ligands.

In this context, the specific features of the artificial membranes according to the invention have made it possible to develop a method of purification of proteins comprising (a) the placing in contact of a supported membrane as described hereinabove and/or obtained by any of the methods of the invention, with a membrane preparation comprising a protein to be purified, under conditions permitting insertion of said protein to be purified into said membrane, and (b) applying a flow of lipids. This method can of course be used to purify any other molecule contained in a membrane extract. Such method is based in particular on the use of a membrane according to the invention comprising a specific ligand (L) of said molecule.

The transmembrane proteins are immobilized directly or indirectly in a lipid bilayer by means of the specific molecule (antibody, interaction protein, substrates, inhibitors, etc.) which constitutes the specific ligand (L). Proteins that did not bind may be eluted by a flow of phospholipids in the form of micelles or liposomes. This method is an effective means to purify transmembrane proteins under gentle, non-denaturing conditions.

The transmembrane proteins thus purified may then be used to develop screening tests for active molecules based on membrane receptors. The present invention therefore comprises the use of a supported membrane obtained by any one of the methods of the invention, to screen compounds interacting with native membrane proteins inserted in said supported membrane.

The supported membranes according to the invention which are enriched in one or more specific types of protein may be used notably in the manufacture of biosensors capable of converting a biological activity into a quantifiable

signal. The biomaterials used in this manner are intended to be placed in contact with body fluids and tissues and must therefore comply with compatibility criteria. In fact, proteins and cells are known to adsorb to the surface of artificial materials when the latter are placed in contact with blood or other biological fluids, leading to undesirable effects. The existence of a membrane fitting into this particular physiological context would make it possible to avoid or to minimize such undesirable effects.

In a specific mode of implementation of the methods of study of reconstituted tissues according to the invention, the latter may be treated with one or more test molecules so as to characterize the membrane reactions towards such test molecule(s).

The test molecule may be quite varied in nature. For instance, it may be an individual molecule or a mixture of substances. The compound may be chemical or biological in nature. In particular it may be a peptide, polypeptide, nucleic acid, lipid, carbohydrate, chemical molecule, plant extracts, combinatorial libraries, etc.

To implement the method of the invention, the test compound may be applied at different concentrations, chosen by the user.

The present invention therefore provides for the use of a reconstituted membrane such as defined hereinabove, for the evaluation of the biological and/or toxic properties of a test molecule, particularly a molecule intended for therapeutic or cosmetic use, etc.

This method of study of reconstituted membranes may further allow analysis of the transcripts of different cell types as well as analysis of electrical activity, study of ion channels involved in exchanges and/or that of receptors, by electrophysiological methods or patch-clamp techniques.

The feasibility, execution and other advantages of the invention are illustrated in greater detail in the following examples, which are given for purposes of illustration and not by way of limitation.

Materials and Methods

In this example a commercially available gold surface Sia Kit Au (Biacore) was used.

Six different supports (Sia-100, -70, -33, -20, -11, -01) were prepared by spontaneous reaction of a 1 mM solution of ethanol containing the mixture of two commercially available thiol derivatives used at different molar ratios with respect to the gold surface (Figure 1).

The thiol derivatives concerned are as follows :

- 11-mercaptoundecanoic acid (HS-(CH₂)₁₀-COOH)
- 11-mercapto-1-undecanol (HS-(CH₂)₁₁-OH)

Rationale for choosing the above thiol derivatives : the -COOH functional groups serve to anchor the tether. By varying the concentration of -COOH groups exposed at the SAM surface, the density of the tethers can be controlled.

The methods of covalent binding of molecules to the functionalized support by means of a SAM are similar to those generally employed for preparation of an affinity chromatography matrix. The coupling reaction may be carried out inside or outside the Biacore apparatus.

In our case, the -COOH group was reacted with the tether inside the apparatus it allows the efficiency of the coupling reaction to be monitored by RU signal intensity (Biacore unit).

The tether is anchored through a covalent amide bond :

a) The –COOH group is activated to an ester by reaction in aqueous medium with N-hydroxysuccinimide (NHS) and in the presence of dicyclohexylcarbodiimide (DCC).

b) The phospholipid tether reacting with the activated ester may be used in several forms :

-an aqueous solution of the phospholipid when its water solubility is sufficient, and for phospholipids insoluble in aqueous media :

-in the form of a micelle solution (lipid/detergent mixture),

-in the form of liposomes.

The preparation of micelles requires the use of detergent. We chose octyl glucoside (OG), a nonionic detergent easily removed by washing with water (high cmc), and whose structure contains –OH groups unreactive towards the activated ester.

The structures of the different phospholipids are depicted in Figure 2. These phospholipids are commercially available. They differ in terms of the presence or not of a spacer and the nature of the aliphatic chain (length, degree of unsaturation). The junction between the spacer and the polar headgroup of the phospholipid is of the amide type. The spacer may be elongated by successive addition of fragments via an amine bond (Figure 3).

c) Carboxylate groups that did not react with the phospholipid are inactivated in the presence of ethanolamine. Formation of membrane on different supports using the hereinabove lipids is depicted in Figure 5.

Example 1 (Figures 6 and 7)

Different pH conditions were tested so as to optimize the phospholipid coupling step (Figure 6).

The procedure described below was implemented in an entirely automated manner :

- | | |
|---|------------------------|
| 1. 50 mM OG detergent in buffer X | (100 μ l ; 10 min) |
| 2. 50mM NaOH | (10 μ l ; 1 min) |
| 3. 50mM NaOH | (10 μ l ; 1 min) |
| 4. EDC/NHS | (100 μ l ; 10 min) |
| 5. Lipids (2 mg/ml of 50 mM OG in buffer X) | (100 μ l ; 20 min) |
| 6. Lipids (2 mg/ml of 50 mM OG in buffer X) | (100 μ l ; 20 min) |
| 7. 50 mM OG detergent in buffer X | (10 μ l ; 1 min) |
| 8. Ethanolamine | (60 μ l ; 6 min) |
| 9. 50 mM OG detergent in buffer X | (10 μ l ; 10 min) |
| 10. 50 mM NaOH | (10 μ l ; 1 min) |

The surface is conditioned (injections 1-3), activated (4), the lipid is anchored (injection 5 and 6), unreacted lipid is removed by injection of detergent (7), then the carboxylate groups are inactivated (8). Another injection of OG removes adsorbed ethanolamine.

The pH was tested over a range from 7.5 to 11 using 0.1 M phosphate buffer (PB) or borate-NaOH buffer (BB). The phospholipid DOPE-C is injected as a micellar solution (2 mg/ml of 50 mM OG) in the different buffers on the Sia-100 surface (100% -COOH groups). Plot 1 shows the RU signal intensity before and after each injection of reagent. The intensities are relative because signals 1 and 4 obtained before injection are taken arbitrarily as reference and are therefore equal to 0. The level of coupling gradually

increases to reach a maximum at pH 10. Similar results were obtained with the lipid DPPE-C (Figure 7).

Example 2

In a second example, the lipid DOPE is anchored at pH 10 on six surfaces having different concentrations of -COOH groups, according to the method described in example 1. The results are given in Figure 8.

Figure 8 gives the RU signal intensity observed before the inactivation step (injection 8) for all the surfaces Sia-0, -11, -20, -33, -70, -100%. The coupling reaction is carried out on two different channels ($fc=1$, $fc=2$) for a given surface.

For $fc=1$ and $fc=2$ the amount of DOPE-C anchored to the surface is similar for all the surfaces except Sia-70%. Coupling is greatest for Sia-100% then decreases by half for Sia-70% to reach a minimum for Sia-33, -20, -11 and Sia-0 %.

Control experiments :

In the presence of DOPE-C, the signal observed for Sia-0% which has no COOH groups that can be activated may be due to intercalation of the phospholipid. In fact, no signal is observed when only OG detergent is injected. In the case of Sia-100%, the signal may be due to baseline stray during the experiment. In the case of partial binding of the detergent, the method consisting in injection of a liposome solution containing the lipid to be bound overcomes the problem.

Example 3

The same experiment as in example 2 was conducted with PEG-PE phospholipid (MW 2739.37 g/mol) according to the following procedure :

50 mM NaOH	10 μ l (1 min)
50 mM NaOH	10 μ l (1 min)
EDC/NHS	100 μ l (10 min)
PEG-PE (5 mg/ml in BB buffer, pH 10)	50 μ l (10 min) x 3
Ethanolamine	60 μ l (6 min)
50 mM NaOH	10 μ l (1 min)
50 mM NaOH	10 μ l (1 min)

It was not necessary to use OG detergent because the PEG-PE phospholipid is soluble in water. Non-covalently bound PEG-PE was chased with HBS-N buffer.

Figure 9 shows the amount of PEG-PE anchored, i.e the RU signal intensity observed before the inactivation step (step 8) for all surfaces Sia-0, -11, -20, -33, -70, -100%. The coupling reaction is carried out on two different channels ($fc=1$, $fc=2$) for a given surface.

For $fc=1$ and $fc=2$, the amount of PEG-PE anchored was again found to be similar for all the surfaces. The level of coupling decreased in proportion to the percentage of $-COOH$ functional groups exposed at the surface. The overall decrease is small (maximum \cong 1800 RU, minimum \cong 1200 RU). The most significant variations were found for the surfaces Sia-33, Sia-20, Sia-11%.

When the experiment is carried out on the surface functionalized only with –OH hydroxyl groups that cannot be activated, the mean level of anchoring of PEG-PE is equal to 718 RU. When the activator EDC/NHS (injection 3) is replaced by a simple injection of HBS-N buffer, the signal is equal to 570 RU. As the –OH groups do not in principle react with the activator, the observed signal may therefore correspond to intercalation of the phospholipid at the SAM and/or baseline stray during the experiment.

Example 4 : Formation of a bilayer membrane

Construction of the membrane may be envisioned according to two methods :

- that involving dilution of micelles
- that involving fusion of vesicles

The vesicle dilution method is addressed in this example.

The surface is regenerated by simple injection of OG detergent.

The lipid POPC, a membrane constituent, is injected as a micelle solution (2 mg/ml of 50 mM OG in HBS-N buffer).

The procedure developed for membrane assembly is fully automated :

- | | |
|--|------------------------|
| 1. 50 mM OG detergent in HBS-N buffer | (100 μ l ; 10 min) |
| 2. BSA (0.1 mg/ml) | (50 μ l ; 10 min) |
| 3. 50 mM OG detergent in HBS-N buffer | (100 μ l ; 10 min) |
| 4. Micelles | |
| 2 mg of lipids/ml from 50 mM OG in HBS-N | (100 μ l ; 20 min) |
| 1 mg/ml from 25 mM OG in HBS-N | (50 μ l ; 10 min) |
| 5. 20 mM NaOH | (10 μ l ; 1 min) |

6. 20 mM NaOH	(10 μ l ; 1 min)
7. BSA (0.1 mg/ml)	(50 μ l ; 10 min)
8. 50 mM OG detergent in HBS-N buffer	(100 μ l ; 10 min)
9. BSA (0.1 mg/ml)	(50 μ l ; 10 min)
10. 50 mM OG detergent in HBS-N buffer	(100 μ l ; 10 min)

The dilution step consists in successively injecting a micellar solution of POPC lipid (2 mg/ml of 50 mM OG in HBS-N buffer) followed by a $\frac{1}{2}$ dilution of the solution in HBS-N buffer.

The BSA injection serves as an indicator of bilayer assembly. Indeed, BSA preferentially binds to hydrophobic surfaces (e.g., surface not presenting a membrane), i.e. before the POPC injection or after regeneration of the surface. A signal < 100 RU should be observed in the presence of membrane.

The table in Figure 4 gives the results obtained for each surface. (I) is the RU signal intensity before injection of a reagent and (F) after injection; the variation (Δ) in the signal corresponds to the difference (F-I). Intensities are reported for injection of BSA before membrane assembly (injection 2), POPC micelles (injection 4), NaOH (injection 5 and 6), BSA after POPC membrane assembly (injection 7) and BSA after regeneration of the surface (injection 9).

The signal corresponding to POPC membrane assembly is obtained after washing the surface with 20 mM NaOH (injection 5 and 6) followed by a return to a stable signal, i.e. column (I) in BSA (7). The intensities of signals corresponding to POPC membrane assembly are given for each surface according to the level of anchored DOPE-C tethers on the different channels.

It can be seen that BSA (7) is < 100 RU. BSA (2) and (9) are greater than BSA (7).

Sia-100 and -0% : signal intensity after membrane assembly is similar in the presence or absence of the phospholipid tether. The mean signal is 700 and 1200 RU, respectively.

Sia-11, -20, -33 and -70 % : the increase in the signal after assembly of the POPC membrane is greater in the presence of the DOPE-C (P) tether than in its absence. In the presence of the tether, the increase in the signal corresponding to assembly of the POPC membrane is independent of tether density. The mean variation is from + 1000 to 1200 RU.

Example 5 : test of anchoring of membrane protein

Membrane fragments from CHO cells in which the R-CGRP receptor coupled to the Ramp protein is overexpressed, were applied on the Sia-11% surface. The reaction was conducted *in situ* in the BIAcore apparatus.

Example 6 : tether density

The density of DOPE-C tethers (in RU) on the SAM surface is calculated by considering that a carbon chain has an area of 0.40 nm^2 , that a thiol derivative molecule $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-OH}$ or $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{10}\text{-COOH}$ has an area of 0.40 nm^2 and that a DOPE-C phospholipid molecule has an area of 0.80 nm^2 . In this example, a COOH group is also presumed to react with the NH_2 group of the phospholipid to form an amide bond with a yield of 100%.

It is further presumed that the distribution of COOH groups is homogeneous and that the percentage of COOH groups at the SAM surface is identical to that of the solutions used for preparation of the supports.

If the true area occupied by the -COOH group is less than 0.80 nm^2 , the capacity of the SAM is divided in half.

1000 RU is equivalent to 1 ng of phospholipid/mm²

MW of DOPE-C : 879 g/mol

The results are given in the following table.

Support	Predicted density of DOPE-C tethers		Found density of DOPE-C tethers		Yield (%)
	(RU)	(pmol / mm ²)	(RU)	(pmol / mm ²)	
Sia-100	1820	2.07	1956	2.22	107
Sia-70	1274	1.45	796	0.91	62
Sia-33	1208	1.37	394	0.45	33
Sia-20	728	0.83	512	0.58	70
Sia-11	400	0.45	417	0.47	104

* mean calculated from two experiments

Considering that the yield of the coupling reaction can range from 70 to 100% but also the approximations in the predicted value, the experimentally observed density of the DOPE-C tethers is close to the predicted value (except for the low value seen with Sia-33)

Stability

The following table shows the variations in RU before and after each injection :

Support	POPC Membrane	NaOH 20mM 100 µl/min	NaOH 100 mM 10 µl/min	HCl 100 mM 10 µl/min	Surface
sia-100	866	-150	-55	-55	fc1=0 (without tether)
sia-100	799	-92	-39	40	fc4=1956 RU (with tether)
sia-70	961	-139	-33	-28	fc1=0 (without tether)
sia-70	1271	-129	-33	3	fc2=951 RU (with tether)
sia-70	1641	-107	-45	71	fc3=504 RU (with tether)
sia-70	1127	-79	-43	28	fc4=642 RU (with tether)
sia-33	906	-248	-46	-28	fc1=0 (without tether)
sia-33	1263	-114	-42	3	fc2=402 RU (with tether)
sia-33	1979	-171	-57	138	fc3=386 RU (with tether)
sia-33	1041	-107	-54	87	fc4=0 (without tether)
sia-0	1653	-155	-48	-4	fc1=0 (without tether)
sia-0	1157	-108	-55	125	fc4=0 (without tether)

The stability of the supported membranes formed from POPC lipid are similar for all the surfaces tested under the experimental conditions, i.e : prolonged injection of HBS-N chase buffer, injection of 20 mM NaOH (100 μ l/min, 1 min), of NaOH and 100 mM HCl (10 μ l/min 10ul, 1 min).

For a given support, surfaces without tethers are less stable than those with tethers.

4. Brief Description of Drawings

Figure 1 : Method of binding of thiol derivatives (incubation in ethanol solution at 1 mM at 4°C for 16 hours, wash with ethanol solution, sonicate two times for 1 minute, binding to the gold surface of Biacore support).

Figure 2 : Structure of phospholipid tethers.

Figure 3 : Example of a phospholipid tether (POPC). A micelle solution containing 2 mg of POPC in 1 ml of a 50 mM octyl- β -D-glucoside (OG) solution and in HBS-N buffered medium (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH 7.4) is placed in the presence of the functionalized surface.

Figure 4 : Results obtained for each surface used placed in the presence of a reagent.

(I) is signal intensity in RU before injection of a reagent and (F) after injection; the variation (Δ) of the signal corresponds to the difference (F-I). Intensities are given for injection of BSA before membrane formation (injection 2), POPC micelles (injection 4), NaOH (injection 5 and 6), BSA after formation of the POPC membrane (injection 7) and BSA after regeneration of the surface (injection 9).

Figure 5 :

- a) Formation of POPC membrane on Sia-0.
- b) Formation of POPC membrane on Sia-11.
- c) Formation of POPC membrane on Sia-20.
- d) Formation of POPC membrane on Sia-33.
- e) Formation of POPC membrane on Sia-70.
- f) Formation of POPC membrane on Sia-100.

Figure 6 : Effect of pH on the anchoring step.

Figure 7 : Effect of pH on the anchoring step.

Figure 8 : Anchoring of DOPE-C lipid on different surfaces.

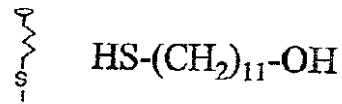
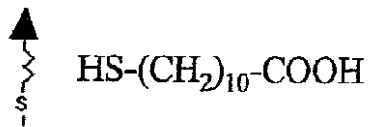
Figure 9 : Anchoring of PEG-PE lipid on different surfaces.

Figure 10 : RU monitoring of the steps involved in formation of a supported membrane.

Fig. 1

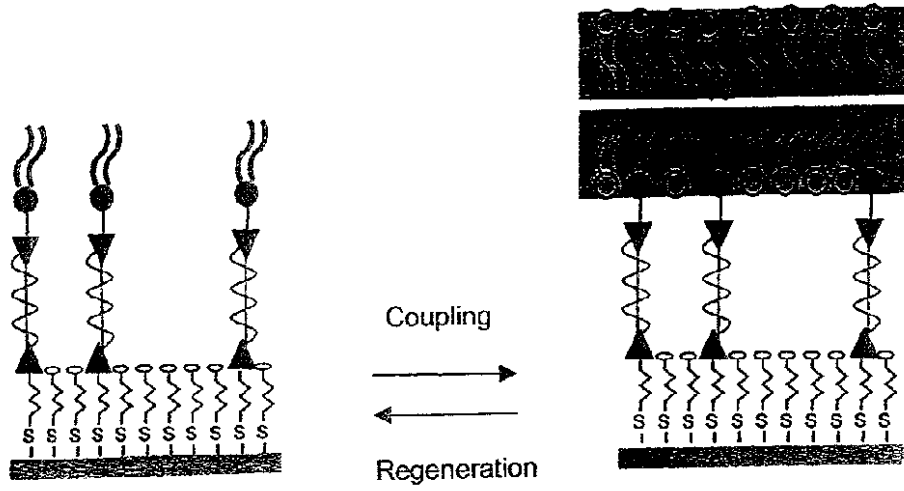


Thiol derivatives



Support		HS-(CH ₂) ₁₀ -COOH (mol %)
SIA-C ₁₁ OOH	Sia-100	100
SIA-C ₁₁ OOH / C ₁₁ OH-7/3	Sia-70	70
SIA-C ₁₁ OOH / C ₁₁ OH-1/2	Sia-33	33
SIA-C ₁₁ OOH / C ₁₁ OH-1/4	Sia-20	20
SIA-C ₁₁ OOH / C ₁₁ OH-1/8	Sia-11	11
SIA-C ₁₁ OH	Sia-0	0

Fig. 3



POPC (R_1 16:0 R_2 18:1):

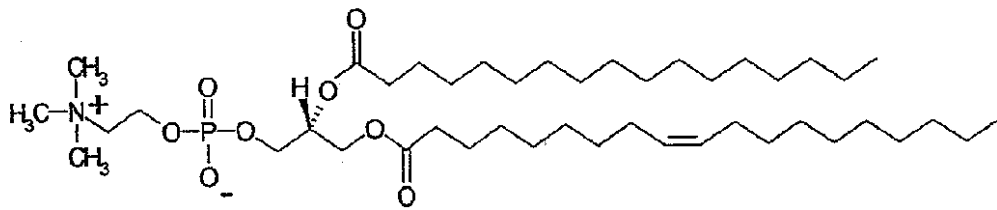


Fig. 4-1

Support	BSA (2)			Micelles-4			NaOH (5) et (6)			BSA (7)			BSA (9)			π	Channel
	I	F	Δ F-I	I	F	Δ F-I	I	F	Δ F-I	I	F	Δ F-I	I	F	Δ F-I		
sia-100	-78	192	271	0	672	818	588	-230	789	167	789	167	-13	203	216	1	fc3=0 (without tether) fc4=1956
sia-100	-46	54	100	0	424	759	694	-65	728	608	-120	728	608	-325	-238	87	
sia-100	-61	119	180	0	705	829	659	-170	788	123	788	123	-28	158	186	2	fc3=0 (without tether) fc4=1956
sia-100	-50	51	101	0	717	1028	965	-63	891	893	-98	891	893	-45	80	125	
sia-100	-60	163	223	0	790	918	656	-262	905	232	905	232	-172	35	207	3	fc3=0 (without tether) fc4=1956
sia-100	-41	235	276	0	638	904	766	-138	787	606	9	787	606	-420	-114	306	
sia-100	-43	129	172	0	969	1091	876	-215	1064	173	1064	173	-33	127	160	4	fc3=0 (without tether) fc4=1956
sia-100	-45	227	272	0	1032	1279	1122	-157	1147	1159	12	1147	1159	-38	240	278	
sia-70	-85	-31	54	0	580	721	481	-240	494	-12	494	-12	-6	8	14	1	fc1=0 (without tether) fc2=951
sia-70	-50	112	162	0	1059	1286	1139	-147	1186	1096	-89	1186	1096	44	200	156	
sia-70	-67	23	90	0	1590	1821	1662	-159	1710	1579	-131	1710	1579	-34	61	95	fc3=504
sia-70	-44	37	81	0	1136	1304	1174	-130	1221	1166	-55	1221	1166	90	177	87	fc4=642
sia-70	-134	146	280	0	547	738	520	-218	681	135	681	135	-133	55	188	2	fc1=0 (without tether) fc2=951
sia-70	-130	317	447	0	845	917	837	-80	862	923	61	862	923	-162	169	331	
sia-70	-119	300	419	0	1757	1850	1746	-104	1774	1600	26	1774	1600	-85	437	522	fc3=504
sia-70	-75	261	336	0	1152	1230	1145	-85	1177	1249	72	1177	1249	-119	256	375	fc4=642
sia-70				0	643	773	525	-248	531	-8	531	-8				3	fc1=0 (sans pilier) fc2=951
sia-70				0	1370	1553	1441	-112	1469	1404	-65	1469	1404				
sia-70				0	1381	1574	1418	-156	1435	1393	42	1435	1393				
sia-70				0	1279	1480	1341	-139	1368	1315	-53	1368	1315				
sia-70				0	821	913	797	-116	798	-8	798	-8					
sia-70				0	1606	1730	1667	-43	1685	1666	-19	1685	1666				
sia-70				0	1140	1231	1178	-53	1182	1186	4	1182	1186				
sia-70				0	1130	1228	1168	-60	1165	1167	2	1165	1167				
sia33	-26	-20	6	0	503	661	542	-119	472	-96	472	-96	-124	-102	22	1	fc1=0 (without tether) fc2=402
sia33	-50	-29	21	0	670	852	763	-89	798	699	-99	798	699	-103	-81	22	
sia33	-39	16	55	0	1462	1674	1590	-84	1621	1505	-116	1621	1505	-200	-132	68	fc3=386
sia33	-64	46	110	0	689	876	767	-109	740	-70	740	-70	-201	-85	116		fc4=0

Fig. 4-2

sia33	-35	26	61	0	698	855	695	-160		663	-59	-146	-71	75	2	fc1=0 (without tether) fc2=402 fc3=386 fc4=0
	-52	50	102	0	856	1034	901	-133	941	894	-47	-58	41	99		
	-41	77	118	0	1384	1599	1467	-132	1516	1429	-87	-205	-74	131		
	-60	83	143	0	497	690	549	-141		571	-35	-273	-136	137		
sia33	-41	451	492	0	504	637	533	-104		537	-13	-37	32	89	3	fc1=0 (without tether) fc2=402 fc3=386 fc4=0
	-43	-115	-72	0	829	976	843	-133	889	863	-6	-16	77	93		
	-45	-262	-217	0	1166	1323	1194	-129	1225	1202	-23	-62	68	120		
	-61	230	291	0	882	808	882	-126		713	-9	-97	20	117		
sia33				0	661	828	667	-141		679	-45				4	fc1=0 (without tether) fc2=402 fc3=386 fc4=0
				0	1209	1363	1241	-122	1280	1213	-67					
				0	1336	1473	1365	-108	1404	1382	-42					
				0	797	952	846	-106		849	-26					
sia-20	-35	144	179	0	653	795	655	-140		749	74	-23	159	182	1	fc1=0 (without tether) fc2=494 fc3=531 fc4=0
	-33	108	141	0	1031	1220	1130	-90	1158	1163	5	15	152	137		
	-1	96	97	0	1602	1798	1702	-96	1726	1668	-68	-2	96	98		
	-40	-39	1	0	393	541	422	-119		379	-91	30	-18	-48		
sia-20	-84	157	241	0	431	593	470	-123		588	105	-105	92	197	2	fc1=0 (without tether) fc2=494 fc3=531 fc4=0
	-84	219	303	0	1031	1256	1123	-133	1153	1219	66	-74	188	262		
	-87	201	288	0	1364	1554	1424	-130	1457	1497	40	-80	172	252		
	-81	136	217	0	406	557	438	-119		584	106	-78	111	189		
sia-20	-158	201	359	0	419	627	483	-169		658	177	-384	-113	271	3	fc1=0 (without tether) fc2=494 fc3=531 fc4=0
	-82	279	361	0	713	970	833	-137	869	1003	134	-313	13	326		
	-71	276	347	0	1227	1483	1351	-132	1386	1446	60	-298	11	309		
	-152	183	335	0	375	579	428	-151		622	150	-318	-62	254		
sia-20				0	432	592	447	-145		489	13				4	fc1=0 (without tether) fc2=494 fc3=531 fc4=0
				0	479	638	522	-116	560	613	53					
				0	1093	1259	1163	-96	1197	1196	-1					
				0	418	558	478	-80		529	25					
sia-11	-108	88	196	0	705	893	754	-139		836	63	-46	102	148	1	fc1=0 (without tether) fc2=0 (without tether) fc3=386 fc4=449
	-104	83	187	0	868	1128	1009	-119		1055	18	-71	86	157		
	-123	-7	116	0	1329	1603	1478	-125	1511	1451	-60	-102	-11	91		
	-121	-66	55	0	1040	1280	1159	-121	1208	1058	-150	-37	-55	-18		
sia-11	-58	32	88	0	772	983	814	-169		794	-58	-350	-272	78	2	fc1=0 (without tether) fc2=0 (without tether) fc3=386 fc4=449
	-79	73	152	0	627	894	763	-131		770	-39	-289	-146	143		
	-85	53	138	0	969	1273	1146	-127	1193	1108	-85	-303	-175	128		
	-67	115	182	0	727	972	847	-125	897	862	-35	-356	-189	167		

Fig. 4-3

sia-11	-53	58	111	0	906	1081	956	-123		874	-7	-48	54	102	fc1=0 (without tether) fc2=0 (without tether) fc3=386 fc4=449
	-80	82	162	0	802	1027	911	-116		930	-10	-53	82	135	
	-82	56	136	0	1034	1281	1167	-114	1198	1155	-43	-97	27	124	
	-86	90	176	0	932	1120	1009	-111	1046	1045	-1	-121	33	154	
sia-11				0	932	1122	1022	-100		993	-51				fc1=0 (without tether) fc2=0 (without tether) fc3=386 fc4=449
				0	1065	1267	1179	-88		1167	-33				
				0	1026	1221	1134	-87	1146	1122	-24				
				0	1083	1305	1143	-162	1161	1128	-33				
sia-0	-98	17	115	0	916	1109	980	-119		980	-60	-280	-166	114	fc1=0 (without tether) fc4=0 (without tether)
	-151	-12	139	0	1160	1402	1237	-165		1252	-73	-82	36	118	
sia-0	-77	56	133	0	1048	1304	1199	-105		22	-1227	-107	22	129	fc1=0 (without tether) fc4=0 (without tether)
	-96	42	138	0	1140	1381	1269	-112		-143	-1479	-295	-143	122	

Fig. 5a

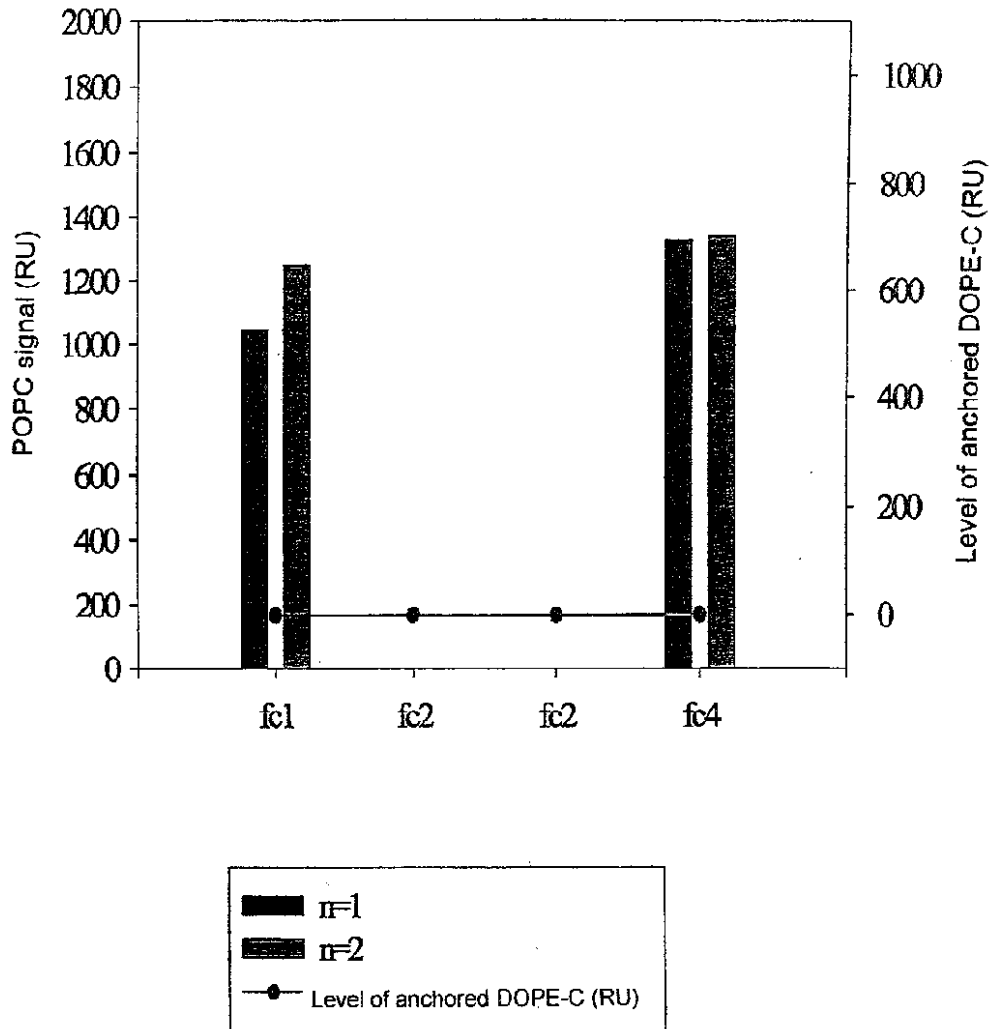


Fig. 5b

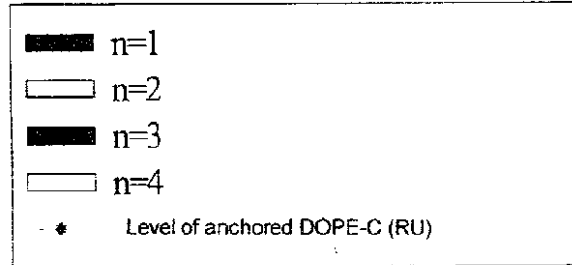
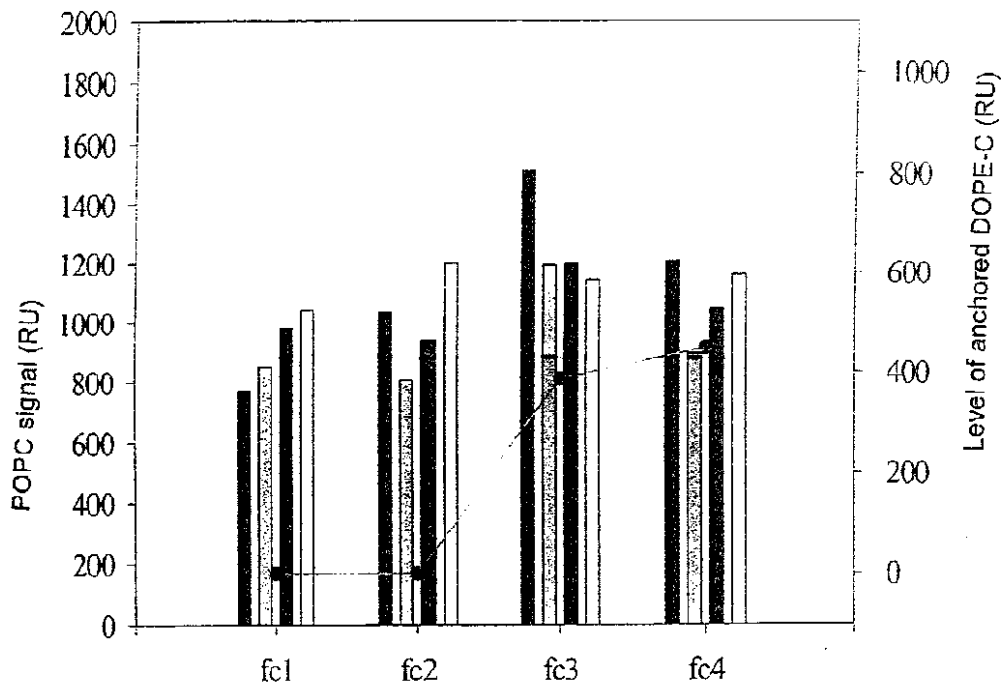


Fig. 5c

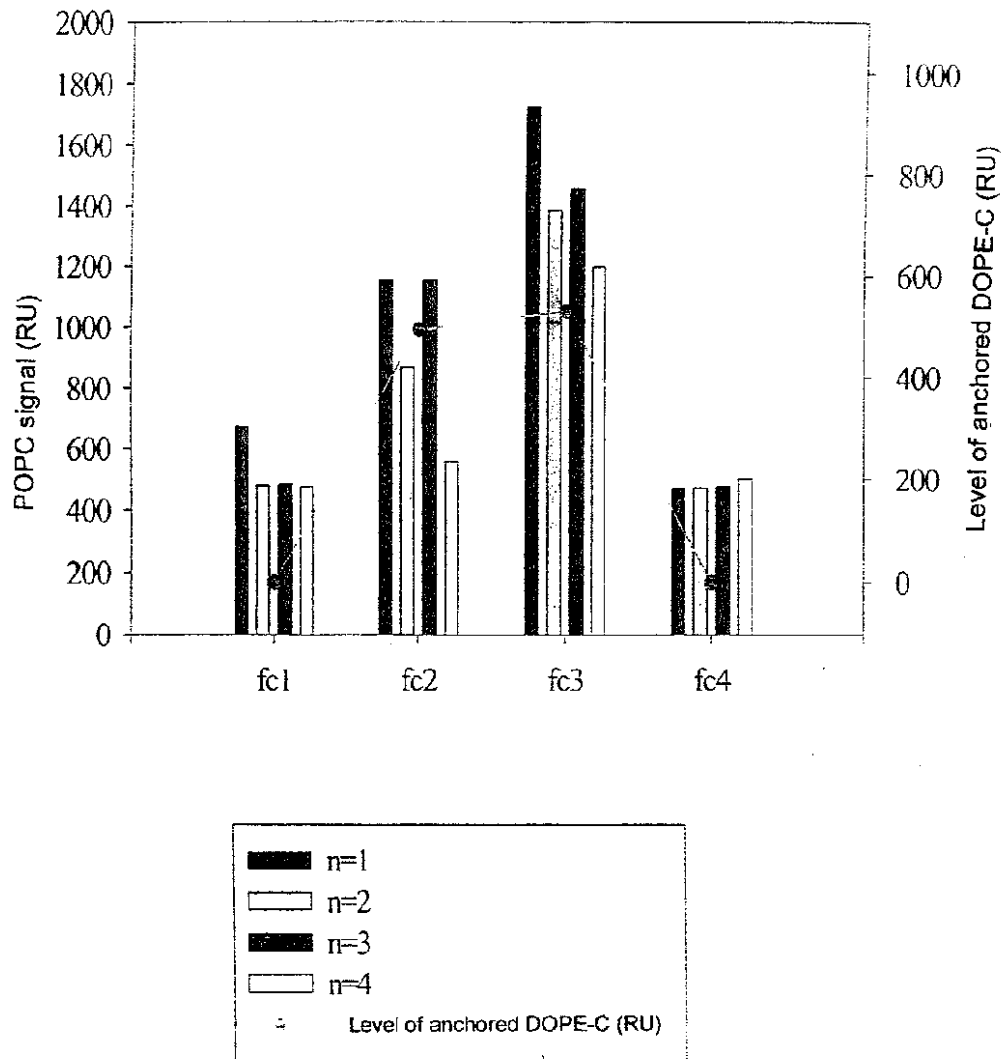


Fig. 5d

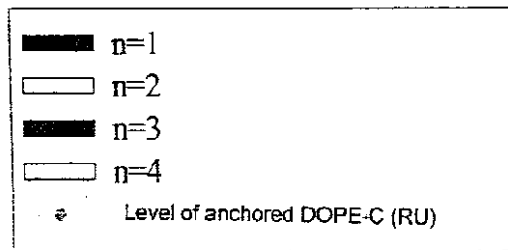
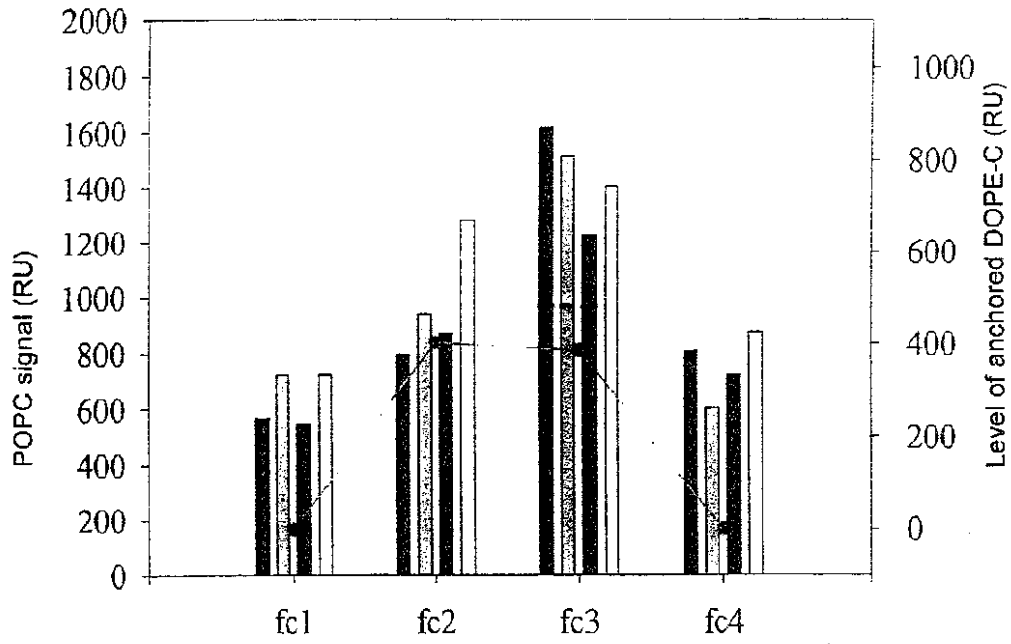


Fig. 5e

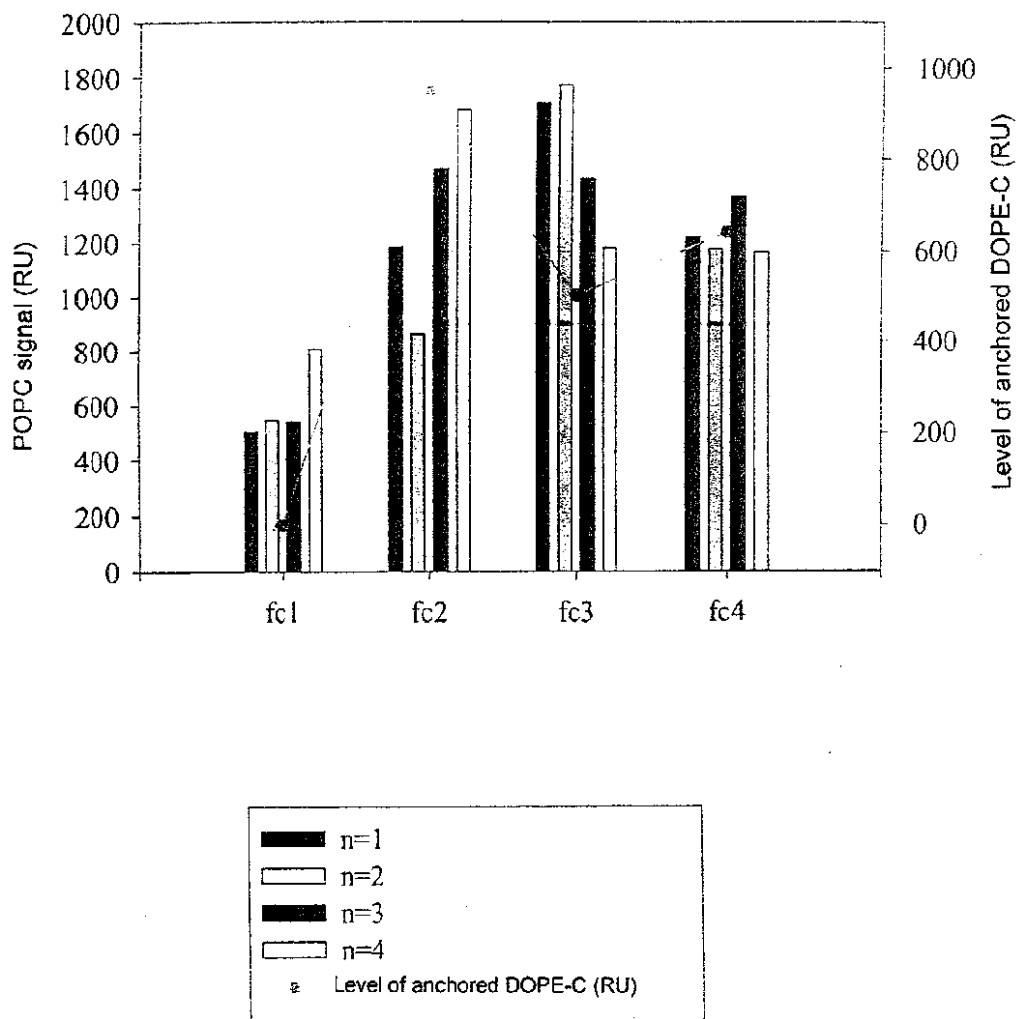


Fig. 5f

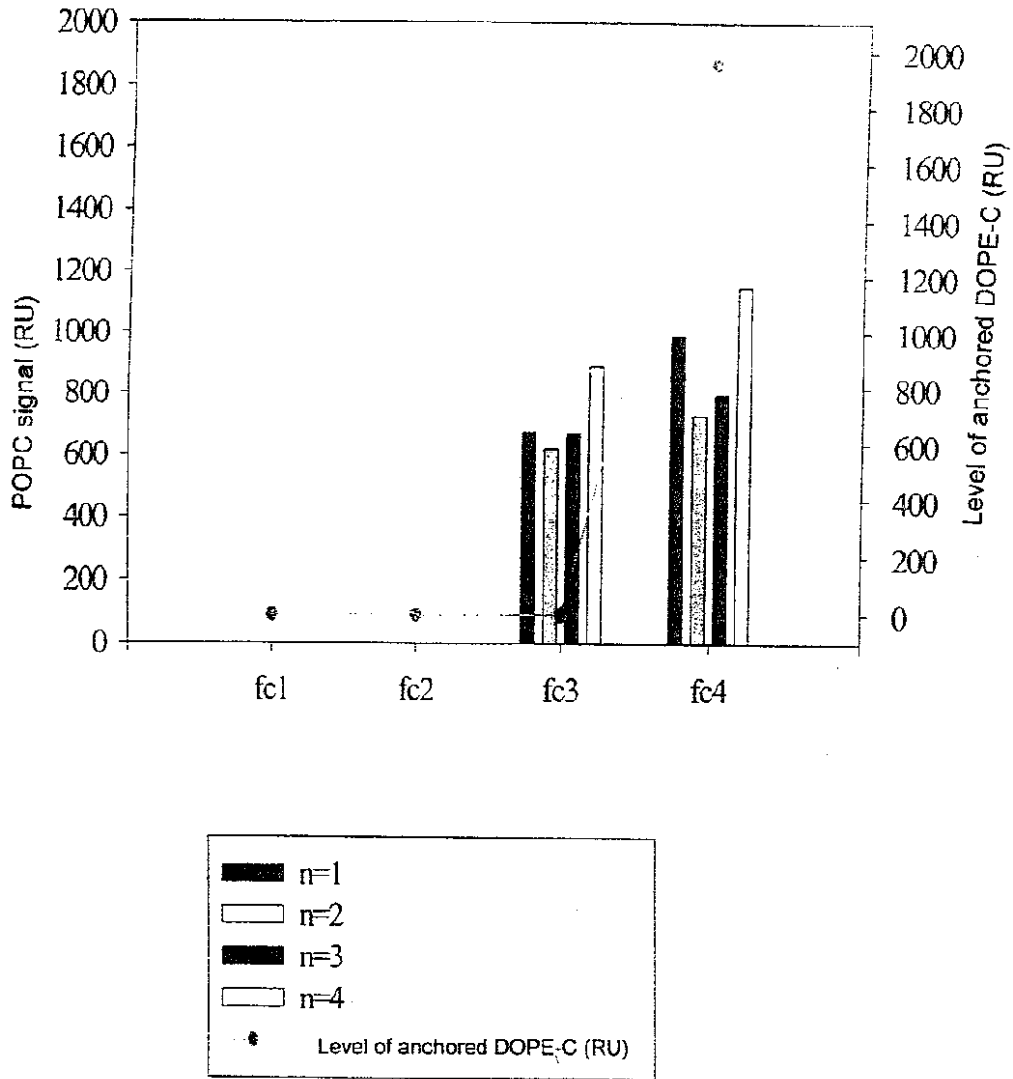


Fig. 6

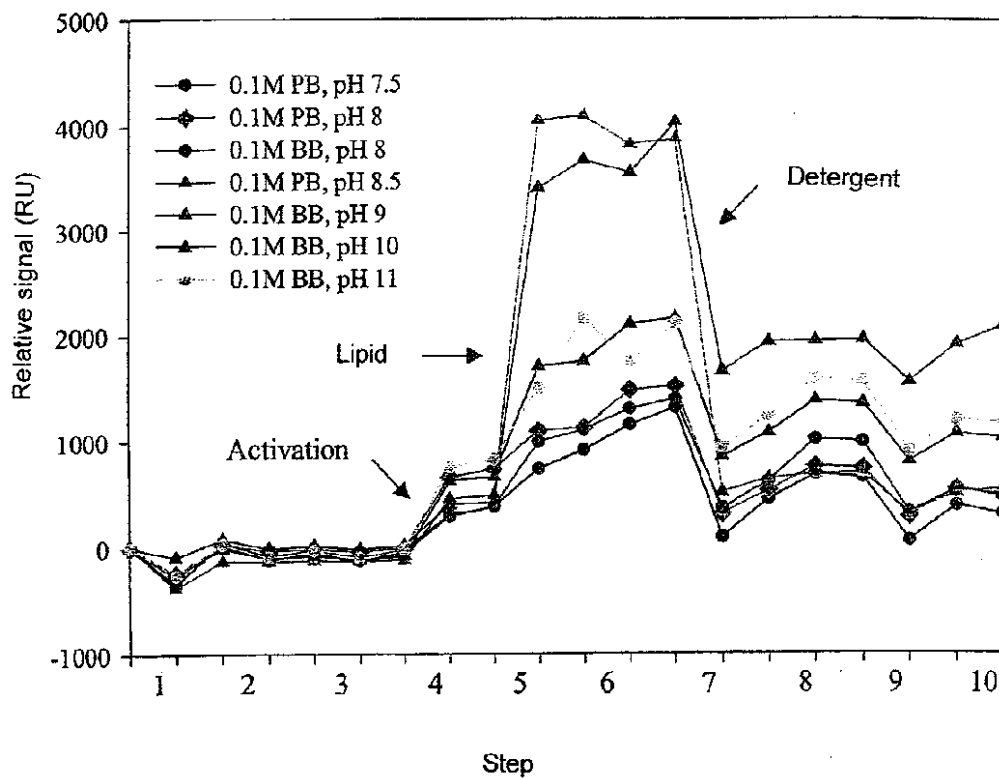


Fig. 7

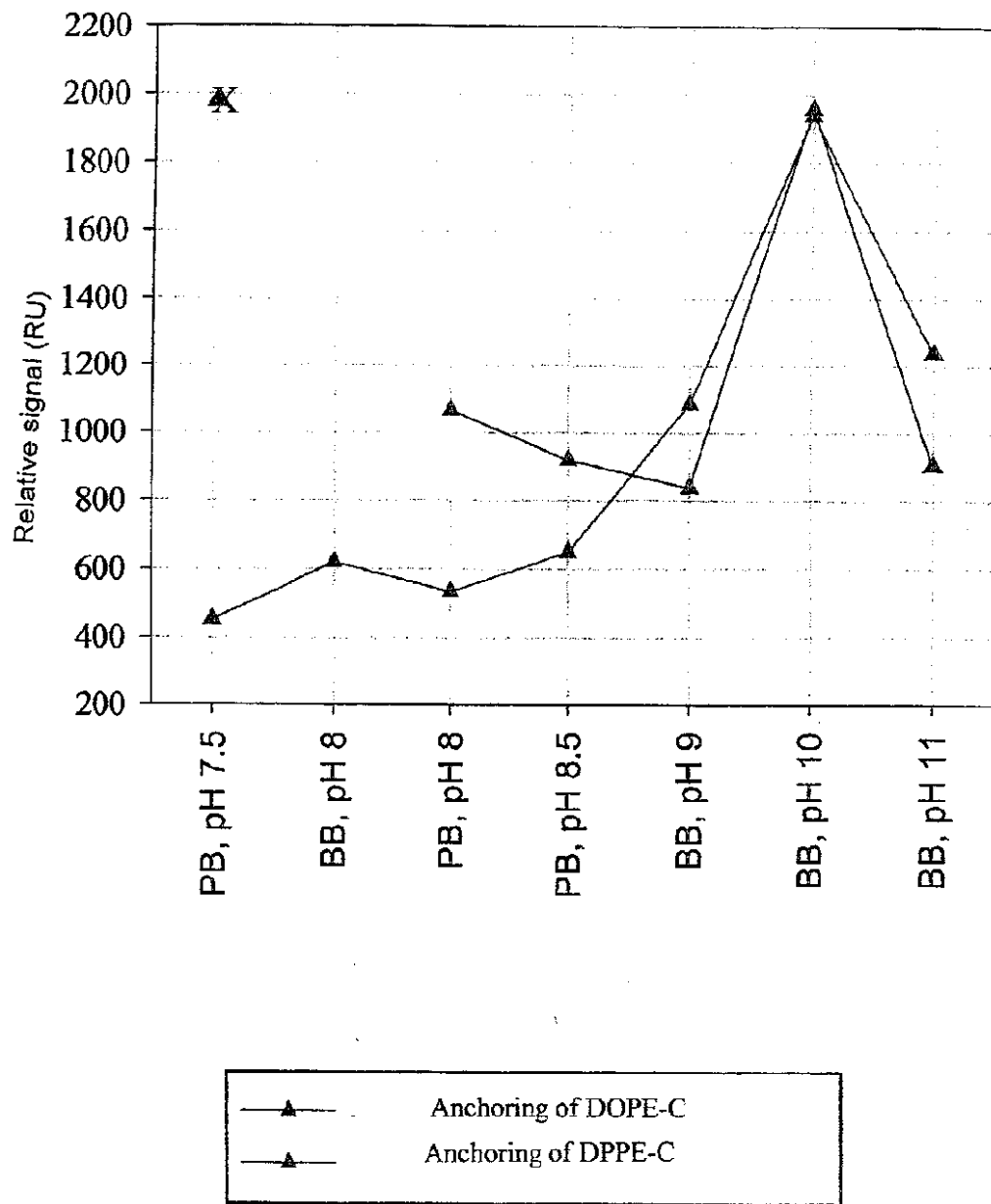


Fig. 8

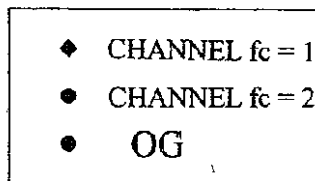
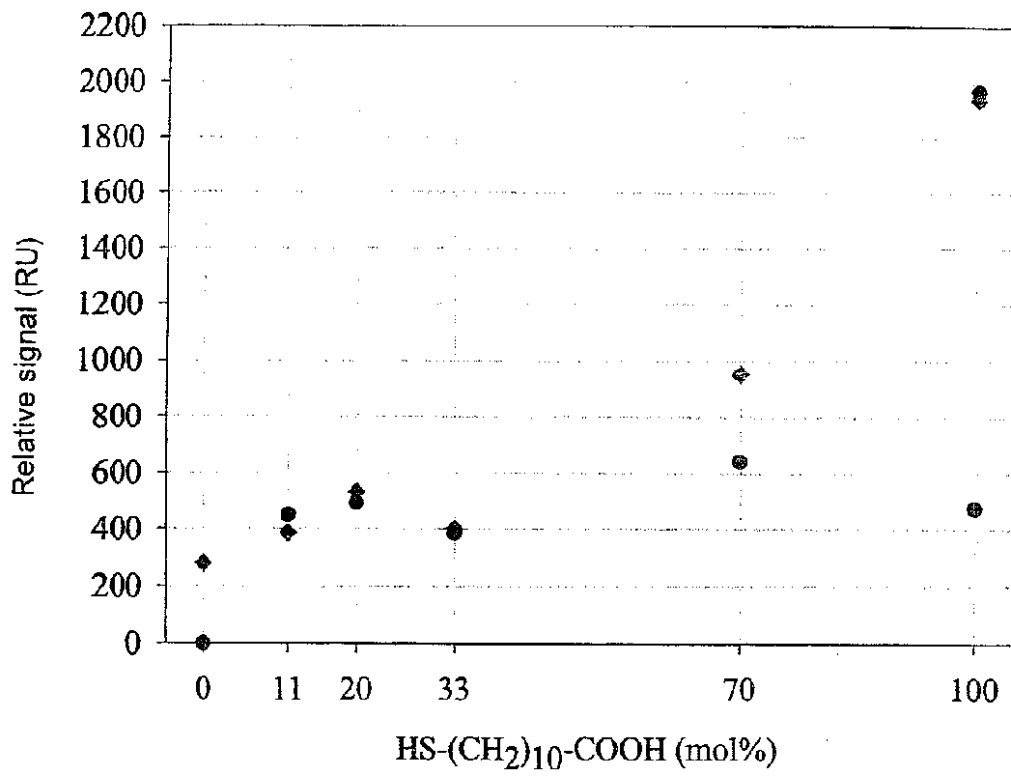


Fig. 9

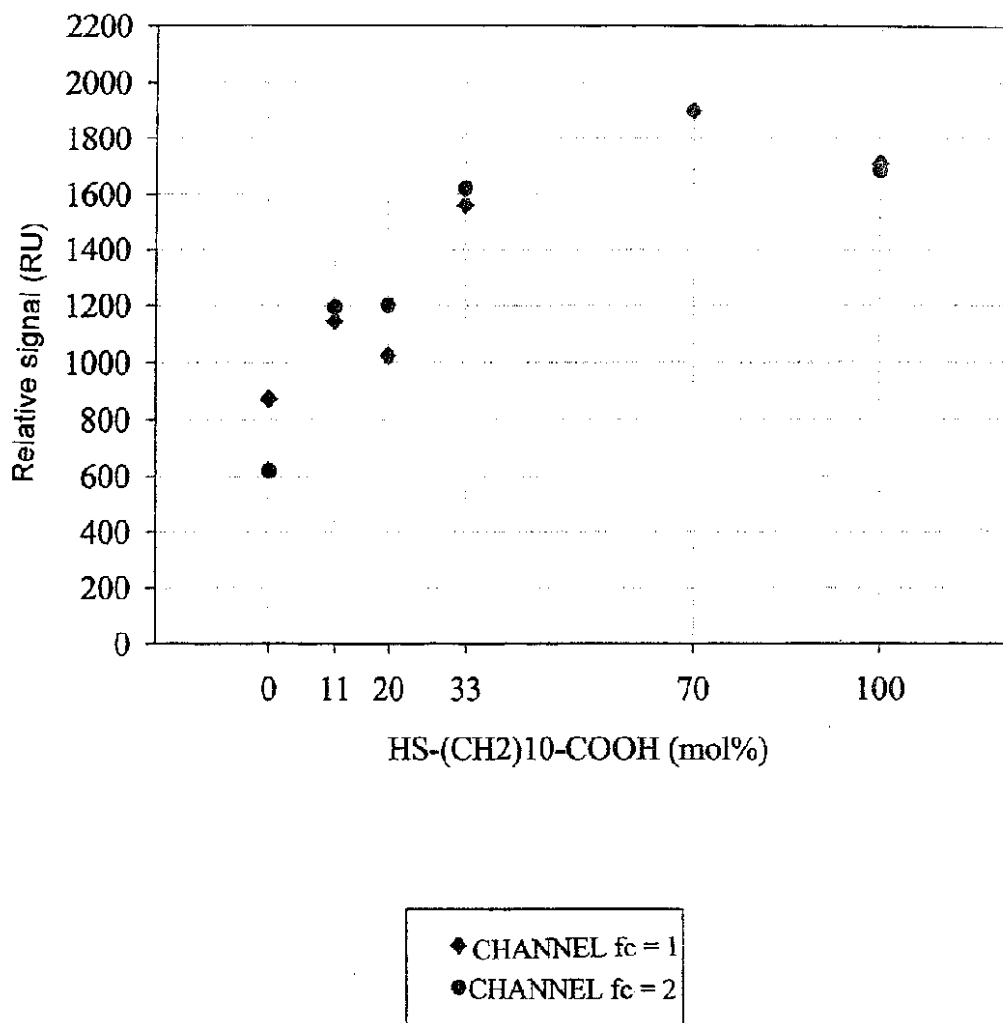
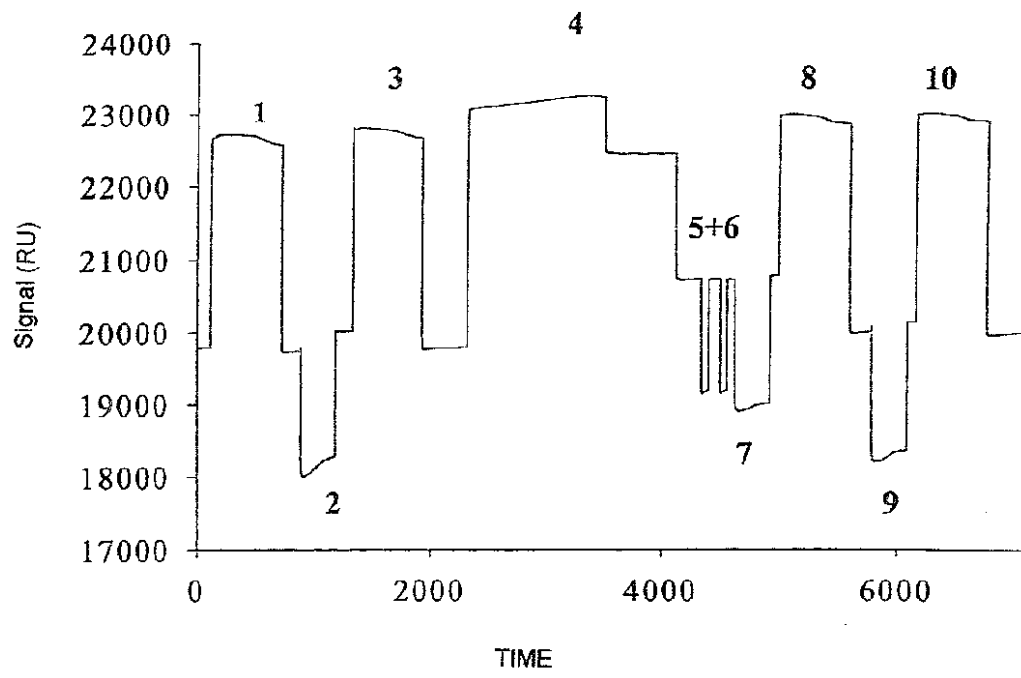


Fig. 10



1. Abstract

The present invention describes a new artificial supported membrane, as well as methods of preparation of such membrane or of reconstitution of cell membranes from their constituent proteins and lipids. Such membrane comprises a lipid bilayer attached to a support by phospholipid tethers (P) creating a space between the bilayer and the support, as well as one or more ligands (L) specific of a protein, covalently bound to the support and exposed in said space. The invention equally describes the uses of such membranes which allow the purification and/or reversible capture of membrane proteins or yet the screening of compounds that interact with some of these proteins. A membrane according to the invention may further serve to evaluate the toxicity or, conversely, the therapeutic effect of test compounds. The invention is particularly useful for analyzing protein-protein interactions within membranes and may thus be employed in the pharmaceutical industry for analysis of the toxic or beneficial profile of molecules that may be candidates for pharmaceutical development and/or enter into pharmaceutical compositions. In the field of biotechnology or in the field of medicine, such supported membranes may also be used in the manufacture of more efficient biomaterials.

2. Representative Drawing

None

专利名称(译)	新型支撑膜，其制备和使用		
公开(公告)号	JP2003156497A	公开(公告)日	2003-05-30
申请号	JP2002228716	申请日	2002-08-06
[标]申请(专利权)人(译)	华纳兰茂公司		
申请(专利权)人(译)	华纳 - 兰伯特公司，有限公司，责任，公司		
[标]发明人	カティドレクスレー パトリックベルナ		
发明人	カティドレクスレー パトリックベルナ		
IPC分类号	B01D67/00 B01D69/10 B01D69/14 C07K1/22 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	B01D67/0093 B01D69/10 B01D69/141 G01N33/54353 G01N33/54393 G01N33/566 G01N33/6872 G01N2500/04		
FI分类号	G01N33/566 C07K1/22 G01N33/53.D G01N33/543.525.Z		
F-TERM分类号	4H045/AA20 4H045/DA50 4H045/GA20		
优先权	2001010542 2001-08-07 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 解决的问题: 提供一种人工支撑的膜, 以及制备这种膜的方法, 或由它们的组成蛋白和脂质重建细胞膜的方法。脂质双层通过磷脂束缚物 (P) 连接到载体上, 该磷脂束缚物在双层和载体之间产生间隙并且共价结合到载体上并暴露在间隙中。它包含一种或多种对该蛋白质具有特异性的配体 (L)。[效果]它可以纯化和/或可逆地捕获膜蛋白, 或筛选与其中一些蛋白相互作用的化合物。另外, 它对于评估测试化合物的毒性或治疗效果可能是有用的。它对于分析膜中蛋白质之间的相互作用特别有用, 并用于分析可能是药物开发候选者和/或可以掺入药物组合物中的分子的毒性或功效特征。ru 它也可以用于生产更有效的医疗材料。

支持体	*				收率 (%)
	予測DOPE-Cテザ-密度		観察DOPE-Cテザ-密度		
	(RU)	(pmol / mm ²)	(RU)	(pmol / mm ²)	
Sia-100	1820	2.07	1956	2.22	107
Sia-70	1274	1.45	796	0.91	62
Sia-33	1208	1.37	394	0.45	33
Sia-20	728	0.83	512	0.58	70
Sia-11	400	0.45	417	0.47	104