

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532024

(P2004-532024A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 7/08	C O 7 K 7/08		4 H O 4 5
C O 7 K 19/00	C O 7 K 19/00		
G O 1 N 27/62	G O 1 N 27/62	V	
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	D	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 170 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-580046 (P2002-580046)	(71) 出願人	503367022
(86) (22) 出願日	平成14年4月4日 (2002.4.4)		ネクストジェン サイエンスズ リミテ ド
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月6日 (2003.10.6)		イギリス国, ケンブリッジシャー ピーイ ー28 4ディーイー, ハンティンドン, アルコンベリー, アルコンベリー ノース エアフィールド, ビッグルス ハウス (
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/001623		ビルディング 56)
(87) 国際公開番号	W02002/081683	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成14年10月17日 (2002.10.17)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	0108521.6	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成13年4月5日 (2001.4.5)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100087413
(31) 優先権主張番号	0131025.9		弁理士 古賀 哲次
(32) 優先日	平成13年12月28日 (2001.12.28)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	0203448.6		
(32) 優先日	平成14年2月14日 (2002.2.14)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質解析

(57) 【要約】

抗原又は抗体から選択されるタンパク質のアレイの作製方法であって、(i) (a) 抗原又は (b) 抗体結合性タンパク質のいずれかを50個以下のアミノ酸を有するペプチドと融合させて含む融合タンパク質を組換え細胞中で発現させるステップであって、該ペプチドがSEQ ID NO.1のアミノ酸配列LX₁X₂IX₃X₄X₅X₆KX₇X₈X₉X₁₀ (SEQ ID NO. 1) (ただしX₁は天然アミノ酸であり、X₂はロイシン、バリン、イソロイシン、トリプトファン、フェニルアラニン又はチロシンを除いた天然アミノ酸であり、X₃はフェニルアラニン又はロイシンであり、X₄はグルタミン又はアスパラギンであり、X₅はアラニン、グリシン、セリン又はトレオニンであり、X₆はグリシン又はメチオニンであり、X₇はイソロイシン、メチオニン又はバリンであり、X₈はグルタミン、ロイシン、バリン、チロシン又はイソロイシンであり、X₉はトリプトファン、チロシン、バリン、フェニルアラニン、ロイシン又はイソロイシンであり、X₁₀はアスパラギン又はグルタミンを除いた任意の天然アミノ酸である; また該ペプチドはX₆に隣接するリシン残基においてビオチンリガーゼによりビオチン化することができる。)を含むことを特徴とするステップ; (ii) 融合タンパク質の該ペプチドをX₆に隣接するリシン残基においてビオチン化するステップ; (iii) ビオチン化融合タンパク質を単離するステップ; (iv) アビジン又はストレプトアビジンをコートした非多孔質基板にビオチン化融合タンパク質を付着させるステップ; (v) (a) 融合タンパク質が抗原を含む場合には、抗原アレイの作製を目的にステップ(i)~(iv)を所望回数実行することにより、又は(b) 融合タンパク質が抗体結合性タンパク質を含む場合には、ステップ(iv)の前又は後に複数種の抗体又はその結合性断片を該タンパク質に結合させることにより、基板上

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原又は抗体から選択されるタンパク質のアレイの作製方法であって、

(i) (a)抗原又は(b)抗体結合性タンパク質のいずれかを50個以下のアミノ酸を有するペプチドと融合させて含む融合タンパク質を組換え細胞中で発現させるステップであって、該ペプチドがSEQ ID NO.1のアミノ酸配列

$LX_1X_2IX_3X_4X_5X_6KX_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO. 1)

(式中、 X_1 は天然アミノ酸であり、 X_2 はロイシン、バリン、イソロイシン、トリプトファン、フェニルアラニン又はチロシンを除いた天然アミノ酸であり、 X_3 はフェニルアラニン又はロイシンであり、 X_4 はグルタミン又はアスパラギンであり、 X_5 はアラニン、グリシン、セリン又はトレオニンであり、 X_6 はグリシン又はメチオニンであり、 X_7 はイソロイシン、メチオニン又はバリンであり、 X_8 はグルタミン、ロイシン、バリン、チロシン又はイソロイシンであり、 X_9 はトリプトファン、チロシン、バリン、フェニルアラニン、ロイシン又はイソロイシンであり、 X_{10} はアスパラギン又はグルタミンを除いた任意の天然アミノ酸である；また該ペプチドは X_6 に隣接するリシン残基においてビオチンリガーゼによりビオチン化することができる。)

10

を含むことを特徴とするステップ；

(ii) 該融合タンパク質の該ペプチドを X_6 に隣接するリシン残基においてビオチン化するステップ；

(iii) このビオチン化融合タンパク質を単離するステップ；

20

(iv) アビジン又はストレプトアビジンをコートした非多孔質基板に該ビオチン化融合タンパク質を付着させるステップ；

(v) (a)該融合タンパク質が抗原を含む場合には、抗原アレイの作製を目的にステップ(i)~(iv)を所望回数実行することにより、又は

(b)該融合タンパク質が抗体結合性タンパク質を含む場合には、ステップ(iv)の前又は後に複数種の抗体又はその結合性断片を該タンパク質に結合させることにより

基板上に少なくとも3種類のタンパク質からなるアレイを形成させるステップ；

を含む作製方法。

【請求項2】

融合タンパク質がさらに、該融合タンパク質に対するアフィニティー又は検出タグ配列としての機能を果たしうる第2ペプチド配列を含み、該配列は1~30アミノ酸を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

30

【請求項3】

ペプチド配列タグをSEQ ID NO. 1アミノ酸配列の末端に融合させる請求項2に記載の方法。

【請求項4】

ペプチド配列タグを、抗原又は抗体結合性タンパク質のSEQ ID NO.1融合側の反対側に融合させる請求項2に記載の方法。

【請求項5】

ペプチド配列タグの少なくとも1個のアミノ酸がヒスチジンである請求項2ないし4のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項6】

ペプチド配列タグが式His-Xで示され、式中Xは-Gly-、-His-、-Tyr-、-Gly-、-Trp-、-Val-、-Leu-、-Ser-、-Lys-、-Phe-、-Met-、-Ala-、-Glu-、-Ile-、-Thr-、-Asp-、-Asn-、-Gln-、-Arg-、-Cys-及び-Pro-からなる群より選択される請求項5に記載の方法。

【請求項7】

ペプチド配列タグが式Y-Hisで示される請求項5に記載の方法。

【請求項8】

Yが-Gly-、-Ala-、-His-及び-Tyr-より選択される請求項7に記載の方法。

【請求項9】

50

組換え細胞がビオチンリガーゼを発現し、かつステップ(ii)がビオチンの存在下に、ビオチン化を該細胞中 *in vivo* で起こすように、実行されることを特徴とする先行請求項の任意の1項に記載の方法。

【請求項10】

組換え細胞がビオチンを発現する請求項9に記載の方法。

【請求項11】

ステップ(iii)がSEQ ID NO.1のペプチドに対して特異的であるさらなる抗体又はその結合性断片を使用して実行される先行請求項の任意の1項に記載の方法。

【請求項12】

ステップ(iii)が請求項2ないし8のいずれか1項に記載のペプチド配列タグに対して特異的であるさらなる抗体又はその結合性断片を使用して実行される請求項1ないし10の任意の1項に記載の方法。

10

【請求項13】

さらなる抗体又はその結合性断片がカラム又は磁気ビーズ上に固定化されるかもしくはピペットチップ内に装入される請求項11又は12に記載の方法。

【請求項14】

結合した融合タンパク質をその後でpH値を高めることにより溶離する請求項13に記載の方法。

【請求項15】

ステップ(iii)で、解離可能にビオチンに結合する分離材を使用して融合タンパク質を溶離する請求項1ないし10のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項16】

分離材は、ビオチンに対するアフィニティーが天然アビジン又はストレプトアビジンよりも低い改良アビジン又はストレプトアビジンである請求項15に記載の方法。

【請求項17】

分離材を磁気ビーズ又はピペットチップに付着させる請求項15又は16に記載の方法。

【請求項18】

pH条件を変化させて融合タンパク質を分離材から溶離する請求項15ないし17に記載の方法。

【請求項19】

ステップ(iv)で使用するコート基板の一部の領域をブロッキング処理して融合タンパク質が該領域に結合するのを防ぐようにする先行請求項の任意の1項に記載の方法。

30

【請求項20】

SEQ ID NO.1のペプチドが次のリストから選択される先行請求項の任意の1項に記載の方法。

【化1】

Leu Glu Glu Val Asp Ser Thr Ser Ser Ala Ile Phe Asp Ala Met Lys Met Val Trp Ile Ser

Pro Thr Glu Phe Arg (SEQ ID NO:14);

40

【化 2】

Gln Gly Asp Arg Asp Glu Thr Leu Pro Met Ile Leu Arg Ala Met Lys Met Glu Val Tyr
Asn Pro Gly Gly His Glu Lys (SEQ ID NO:15);

Ser Lys Cys Ser Tyr Ser His Asp Leu Lys Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Leu Val His Ser
Tyr Leu Arg Val Met Tyr Asn Tyr (SEQ ID NO:16);

10

Met Ala Ser Ser Asp Asp Gly Leu Leu Thr Ile Phe Asp Ala Thr Lys Met Met Phe Ile
Arg Thr (SEQ ID NO:17);

Ser Tyr Met Asp Arg Thr Asp Val Pro Thr Ile Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Leu His
Thr Thr Pro Trp Ala Cys Arg (SEQ ID NO:18);

Ser Phe Pro Pro Ser Leu Pro Asp Lys Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Val Ile Thr
(SEQ ID NO:19);

20

Ser Val Val Pro Glu Pro Gly Trp Asp Gly Pro Phe Glu Ser Met Lys Met Val Tyr His Ser
Gly Ala Gln Ser Gly Gln (SEQ ID NO:20);

Val Arg His Leu Pro Pro Pro Leu Pro Ala Leu Phe Asp Ala Met Lys Met Glu Phe Val
Thr Ser Val Gln Phe (SEQ ID NO:21);

30

Asp Met Thr Met Pro Thr Gly Met Thr Lys Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Val Ser
Thr (SEQ ID NO:22);

Ala Thr Ala Gly Pro Leu His Glu Pro Asp Ile Phe Leu Ala Met Lys Met Glu Val Val
Asp Val Thr Asn Lys Ala Gly Gln (SEQ ID NO:23);

Ser Met Trp Glu Thr Leu Asn Ala Gln Lys Thr Val Leu Leu (SEQ ID NO:24);

40

Ser His Pro Ser Gln Leu Met Thr Asn Asp Ile Phe Glu Gly Met Lys Met Leu Tyr His
(SEQ ID NO:25);

【化3】

Thr Ser Glu Leu Ser Lys Leu Asp Ala Thr Ile Phe Ala Ala Met Lys Met Gln Trp Trp
Asn Pro Gly (SEQ ID NO:27);

Val Met Glu Thr Gly Leu Asp Leu Arg Pro Ile Leu Thr Gly Met Lys Met Asp Trp Ile
Pro Lys (SEQ ID NO:28);

Leu His His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Met Val Trp Asn His Arg (SEQ ID NO:30);

10

Pro Gln Gly Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Leu Trp Arg Ser (SEQ ID NO:31);

Leu Ala Gly Thr Phe Glu Ala Leu Lys Met Ala Trp His Glu His (SEQ ID NO:32);

Leu Asn Ala Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Gly (SEQ ID NO:33);

20

Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Leu Arg Asp (SEQ ID NO:34);

Leu Leu Arg Thr Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Asn Gly (SEQ ID NO:35);

Leu Ser Thr Ile Met Glu Gly Met Lys Met Tyr Ile Gln Arg Ser (SEQ ID NO:36);

Leu Ser Asp Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Cys (SEQ ID NO:37);

30

Leu Glu Ser Met Leu Glu Ala Met Lys Met Gln Trp Asn Pro Gln (SEQ ID NO:38);

Leu Ser Asp Ile Phe Asp Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Gln (SEQ ID NO:39);

Leu Ala Pro Phe Phe Glu Ser Met Lys Met Val Trp Arg Glu His (SEQ ID NO:40);

Leu Lys Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Thr Ala Met (SEQ ID NO:41);

40

Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Asn Ser (SEQ ID NO:42);

Leu Leu Gln Thr Phe Asp Ala Met Lys Met Glu Trp Leu Pro Lys (SEQ ID NO:43);

【 化 4 】

Val Phe Asp Ile Leu Glu Ala Gln Lys Val Val Thr Leu Arg Phe (SEQ ID NO:44);

Leu Val Ser Met Phe Asp Gly Met Lys Met Glu Trp Lys Thr Leu (SEQ ID NO:45);

Leu Glu Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Leu Glu (SEQ ID NO:46);

Leu Lys Glu Ile Phe Glu Gly Met Lys Met Glu Phe Val Lys Pro (SEQ ID NO:47);

10

Leu Gly Gly Ile Glu Ala Gln Lys Met Leu Leu Tyr Arg Gly Asn (SEQ ID NO:48);

Arg Pro Val Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Val Trp Lys Pro (SEQ ID NO:50);

Arg Ser Pro Ile Ala Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Arg Glu Thr (SEQ ID NO:51);

20

Gln Asp Ser Ile Met Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ser Trp His Val Asn (SEQ ID NO:52);

Asp Gly Val Leu Phe Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Arg Leu Glu Thr (SEQ ID NO:53);

30

Val Ser Arg Thr Met Thr Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Tyr His Asp Leu (SEQ ID NO:54);

Asp Val Leu Leu Pro Thr Val Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Ile Thr Lys (SEQ ID NO:55);

Pro Asn Asp Leu Glu Arg Ile Phe Asp Ala Met Lys Ile Val Thr Val His Ser (SEQ ID NO:56);

40

Thr Arg Ala Leu Leu Glu Ile Phe Asp Ala Gln Lys Met Leu Tyr Gln His Leu (SEQ ID NO:57);

【 化 5 】

Arg Asp Val His Val Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Thr Val Glu Thr (SEQ ID NO:58);

Gly AspLys Leu Thr Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Ile Gln Trp Thr Ser Gly (SEQ ID NO:59);

Leu Glu Gly Leu Arg Ala Val Phe Glu Ser Met Lys Met Glu Leu Ala Asp Glu (SEQ ID NO:60);

Val Ala Asp Ser His Asp Thr Phe Ala Ala Met Lys Met Val Trp Leu Asp Thr (SEQ ID NO:61);

Gly Leu Pro Leu Gln Asp Ile Leu Glu Ser Met Lys Ile Val Met Thr Ser Gly (SEQ ID NO:62);

Arg Val Pro Leu Glu Ala Ile Phe Glu Gly Ala Lys Met Ile Trp Val Pro Asn Asn (SEQ ID NO:63);

Pro Met Ile Ser His Lys Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Lys Phe Val Pro Glu (SEQ ID NO:64);

Lys Leu Gly Leu Pro Ala Met Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp His Pro Ser (SEQ ID NO:65);

Gln Pro Ser Leu Leu Ser Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Gln Ala Ser Leu Met (SEQ ID NO:66);

Leu Leu Glu Leu Arg Ser Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp Gln Ile Ser (SEQ ID NO:67);

Asp Glu Glu Leu Asn Gln Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Pro Leu Val His Val Thr Lys (SEQ ID NO:68);

10

20

30

40

【 化 6 】

Ser Asn Leu Val Ser Leu Leu His Ser Gln Lys Ile Leu Trp Thr Asp Pro Gln Ser Phe Gly
(SEQ ID NO:70);

Leu Phe Leu His Asp Phe Leu Asn Ala Gln Lys Val Glu Leu Tyr Pro Val Thr Ser Ser
Gly (SEQ ID NO:71);

10

Ser Asp Ile Asn Ala Leu Leu Ser Thr Gln Lys Ile Tyr Trp Ala His (SEQ ID NO:72);

Met Ala Ser Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ser Gln Lys Met Glu Trp Arg Ser Asn Ala
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:73);

Met Ala His Ser Leu Val Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Asp Pro Phe Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:75);

20

Met Gly Pro Asp Leu Val Asn Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Pro Leu Thr Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:76);

Met Ala Phe Ser Leu Arg Ser Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Leu Arg Asn Thr Pro
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:77);

Met Ala Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp Thr
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:78);

30

Met Ser Ser Tyr Leu Ala Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Ser Ala Tyr Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:79);

Met Ala Lys Ala Leu Gln Lys Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp Arg Ser His Pro
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:80);

40

Met Ala Phe Gln Leu Cys Lys Ile Phe Tyr Ala Gln Lys Met Glu Trp His Gly Val Gly
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:81);

【化7】

Met Ala Gly Ser Leu Ser Thr Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Val Gly Lys Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:82);

Met Ala Gln Gln Leu Pro Asp Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Ile Ala Gly Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:83);

10

Met Ala Gln Arg Leu Phe His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Gly Pro Lys Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:84);

Met Ala Gly Cys Leu Gly Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp Arg His Phe Val
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:85);

Met Ala Trp Ser Leu Lys Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Ser Pro Gly Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:86);

20

Met Ala Leu Gly Leu Thr Arg Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Arg Asp Ser
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:87);

Met Ala Gly Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Arg Pro Leu
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:88), 及び

30

Met Ala Asp Arg Leu Ala Tyr Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp His Pro His Lys
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:89).

【請求項21】

ペプチドが鎖長15アミノ酸のペプチドである先行請求項の任意の1項に記載の方法。

【請求項22】

ペプチドがSEQ ID NO.2

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
(SEQ ID NO.2)

40

のペプチドである請求項21に記載の方法。

【請求項23】

融合タンパク質が抗原を含む先行請求項の任意の1項に記載の方法。

【請求項24】

抗原ライブラリーを使用してアレイを作製する請求項23に記載の方法。

【請求項25】

融合タンパク質が抗体結合性タンパク質を含む請求項1ないし22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

50

抗体結合性タンパク質が1つ又は複数のプロテインA、プロテインG及びプロテインLである請求項25に記載の方法。

【請求項27】

抗体結合性タンパク質がプロテインA、プロテインG及びプロテインLの混合物である請求項26に記載の方法。

【請求項28】

抗体結合性タンパク質をそのN末端でペプチドと融合するか、又はそのC末端で該ペプチドと融合することを特徴とする請求項25ないし27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

ステップ(iv)に先立って発現融合タンパク質の同一性を確認する先行請求項のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項30】

同一性の確認に質量分析法を使用する請求項29に記載の方法。

【請求項31】

内部対照としての機能を果たす融合タンパク質中のSEQ ID NO.1ペプチドを検出することによりタンパク質の正規化を行う先行請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

内部対照としての機能を果たす融合タンパク質中の請求項1ないし8のいずれか1項に記載のペプチド配列タグを検出することによりタンパク質の正規化を行う先行請求項のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項33】

ペプチドの検出を、該ペプチドに対して高アフィニティを有する抗体によって行う請求項31又は32に記載の方法。

【請求項34】

免疫検定法を後続のアレイの使用による生物試料解析と同時に実行することによりタンパク質の正規化を行う請求項31ないし33に記載の方法。

【請求項35】

ステップ(iv)で使用するアビジン又はストレプトアビジンをコートした非多孔質基板がガラス又はプラスチック素材である先行請求項の任意の1項に記載の方法。

【請求項36】

基板上のストレプトアビジン層を基層としてその上にさらなるアクセプター層を設ける先行請求項の任意の1項に記載の方法。 30

【請求項37】

アレイが3~10,000種類の融合タンパク質を含む先行請求項の任意の1項に記載の方法。

【請求項38】

各タンパク質が、SEQ ID NO.1を含むペプチドをN末端に融合させた形とSEQ ID NO.1を含むペプチドをC末端に融合させた形の両方の形で存在する請求項37に記載の方法。

【請求項39】

先行請求項の任意の1項に記載の方法によって得られるタンパク質アレイ。

【請求項40】

抗原-抗体結合を検出する方法であって

(vi) 請求項39に記載のアレイに、ステップ(v)(a)のアレイの場合には抗体を含む又は含むと推測される試料を、またステップ(v)(b)のアレイの場合には抗原を含む又は含むと推測される試料を、それぞれ付着させるステップ; 及び

(vii) 基板上の結合抗体又は結合抗原を検出するステップを含む方法。

【請求項41】

ステップ(vii)をELISA法によって行う請求項40に記載の方法。

【請求項42】

ステップ(vi)及び/又はステップ(vii)の最中に融合タンパク質アレイのタンパク質の品質 50

及び/又は密度を監視し続ける請求項40及び41の方法。

【請求項43】

SEQ ID NO.1を含むペプチドの検出によって監視を行う請求項42に記載の方法。

【請求項44】

アレイが第2ペプチド配列をさらに含む融合タンパク質を含み、かつ該第2ペプチド配列を検出することによって監視を行う請求項42に記載の方法であって、該第2ペプチド配列が1~30アミノ酸を含むことを特徴とする方法。

【請求項45】

少なくともいくつかのステップを自動化する請求項1ないし38又は請求項40ないし44のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項46】

すべてのステップを自動化する請求項45に記載の方法。

【請求項47】

抗体結合性タンパク質をN末端又はC末端でSEQ ID NO.1を含む13~50アミノ酸のペプチドと融合させて含む融合タンパク質。

【請求項48】

SEQ ID NO.1のペプチドがSEQ ID NO.2のペプチドである請求項47に記載の方法。

【請求項49】

融合タンパク質に対するタグ配列としての機能を果たす1~20アミノ酸の第2ペプチド配列をさらに含む請求項47又は48に記載の融合タンパク質。

20

【請求項50】

抗体結合性タンパク質がプロテインA、プロテインG又はプロテインL、もしくはそれらの混合物である請求項47ないし49のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項51】

請求項47ないし50のいずれか1項に記載の融合タンパク質をコードする核酸配列。

【請求項52】

ペプチドをコードする配列がSEQ ID NO.9

GGC CTG AAC GAC ATC TTC GAG GCT CAG AAA ATC GAA TGG CAC GAA (SEQ ID NO.9)

の配列である請求項51に記載の核酸。

【請求項53】

添付図面に関連して上文で詳述したとおりの方法、融合タンパク質又は核酸。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はタンパク質解析を行うためのアレイの、特に抗体、抗原又は抗体結合性タンパク質のアレイの作製方法に、作製されたタンパク質アレイ、該アレイを使用して解析を行う方法及び該アレイに組み込まれる新規物質に、それぞれ関連する。特に、アレイ作製方法はタンパク質解析又は結合解析用の一連の抗原及び/又は抗体を作製しアレイに固定化する方法に関連する。

【背景技術】

40

【0002】

異なる多数のタンパク質を表面基板に付着させてタンパク質「アレイ」を作製するという考え方は文献でも広く開示されている(たとえばEP0063810、W084/03151、US5143854の各明細書を参照)。

【0003】

最近、多様な種類のきわめて多数のタンパク質を種々のタイプの固体基板上に配列したチップを作製するという構想への関心が富に高まってきた。たとえば抗原、抗体、タンパク質(タンパク質-タンパク質相互作用)及び機能酵素などのアレイである。

【0004】

その技術的背景やそうしたチップの潜在用途は文献に網羅されており(Joos et al. Elect 50

rophoresis 2000, 21, 2641-2650; Haab et al. Genome Biology 2000 1(6); Borrebaeck, Immunology Today, August 2000)、潜在的効用の例は最近の多数の特許出願(たとえばW 0 00/07024、W 0 99/40434、W 0 99/39210及びW 0 00/54046)に見ることができる。

【0005】

抗原アレイ作製構想はEP 0063810明細書(1982)で開示されている。それによれば、抗原及び抗体を多孔質固体基板に結合させることで無限数の抗原-抗体相互作用を同時に行わせることができる。抗原アレイの作製はごく少量の抗原をニトロセルロース膜又は類似基板上に分注し吸着させるだけであり、後は対応する抗体でプローブすればよい。溶液中又はプラスチックプレート中で行う固相酵素免疫検定(ELISA)法の場合と同様に、非特異的相互作用はウシ血清アルブミン(BSA)でブロックするが、これは今日では標準技法となっている。またアレイのエレメント(又はスポット)は拡散せず、膜上にしっかりと吸着したという。

10

【0006】

しかし、これらのエレメントはマイクロアレイ・チップ系で実現されるエレメントよりもサイズがずっと大きい。EP0063810明細書は手作業で、「荷電液滴」法又はリソグラフィ法を含む機械的方法で、タンパク質を分注してタンパク質アレイを作製する方法を開示している。この方法では径500ミクロン未満のエレメントが得られた(ちなみに現在の自動アレイ作製システムでは100ミクロン径が実現可能である)。

【0007】

しかし、非多孔質表面ではなく膜を使用した場合の大きな難点の1つは結合が即座に行われられない限り、エレメントが基板材料中に拡散しやすいことである。

20

【0008】

この問題を克服するための試みもなされてきた。US4496654明細書は、ストレプトアビジンで処理し(それを表面に吸着させ)た円板紙などのような多孔質表面を使用してビオチン化抗体を任意所望のパターンに配列しうるようにする方法を開示している。円板紙はBSAブロッキング処理の後、抗原(たとえばヒト絨毛性ゴナドトロピン)でプローブし、次いで酵素検定法で検出することができる。ビオチン化抗体は即座に円板紙表面にしっかりと結合するので、スポットの拡散も少なくなる。

【0009】

アビジン又はストレプトアビジンでコートした表面などの「アクセプター」表面を使用してこの方法を実現するには、アレイに固定する各抗体及び抗原をビオチン化した後にアレイに付着させなければならないが、この手順がそのアビディティー(又は抗原を使用する場合にはその抗原性)を、天然タンパク質と比較して、損ねないとの保証はない。

30

【0010】

非多孔質表面の難点は、多様なタイプのガラス又はプラスチックなどの固体表面ほど堅牢ではない、従ってそれらと同じようにストリンジェントな条件での洗浄又は処理はできないなどである。

【0011】

しかし抗原及び抗体アレイでは、タンパク質を固体表面に付着させると一般に抗原の抗原性及び抗体のアビディティーが自由溶液中での観測値よりも低下する結果になりやすいと判明している。

40

【0012】

抗原及び抗体を固定化しようとする従来の試み(W084/03151明細書及び前掲Haab et al. 2000を参照)は概してあまり成功しなかった。W 0 84/03151明細書は、抗体を顕微鏡用カバースリップなどのようなガラス表面に直接付着させ乾燥させることが可能だと説明している。ブロッキング処理後に、この場合は全細胞という形の抗原に接触させると抗原はアレイに固定化した。しかしW084/03151明細書はさらに、これらの抗体は溶液中で行う同等のELISA法と比較して、より高濃度の抗原を付着させる必要があるとも説明している。また抗体を「高度に濃縮しないと、所望の細胞接着を起こすに足る高密度の抗体コートを実現することができない」とも指摘している。また、抗体をガラス表面に吸着させるにはかな

50

りの時間がかかった。

【0013】

他の抗原及び抗体直接固定化法も報告されてきた。その1つはUS5827669明細書で開示されているような、ヒドロキシアパタイトの形でリン酸カルシウムをろ紙に吸着させ、その上にタンパク質をイオン作用により結合させる方法である。発明者の報告によればこれは酸性タンパク質には無効であり、また抗原がリン酸カルシウム層上で「配向性不良」になる。しかし、この方法はストレプトアビジンの固定化に使用すると成功したという。

【0014】

非多孔質固体表面にタンパク質を固定化する別の方法は、筋肉から単離した接着性のポリフェノール性タンパク質を使用してタンパク質を付着させるものである (US5817470明細書)。固体表面たとえばポリスチレン製マルチウェルプレートをポリフェノール性タンパク質でコートすると、この処理した基板に多様な抗原を結合させ、一次抗体とそれに続く酵素標識二次抗体とを使用するサンドイッチELISA法で検出することができる。

10

【0015】

しかし発明者も認めているように、この方法は固体表面への抗原結合又は吸着量により制約を受ける。最終的にプレート表面に強く結合する抗原の量は多数の因子たとえば抗原の分子特性、固体基板の性質、溶液中の抗原濃度、固体表面のコーティング又は活性化に使用する抗原溶解用緩衝液の特性などにより異なる。一般に固体表面に吸着するのはコーティング液中に存在する抗原のうちごく一部である。

【0016】

非多孔質表面への抗体及び抗原の直接付着もまた試みられ、113種の抗体と対応する抗原が使用された [Haab et al. *Genome Biology* 1(6), 2000]。DNAマイクロアレイ向けに開発された技術により、ポリ-s-リシンをコートしたガラススライドを使用して抗原と抗体を固定化する実験が別々に行われた。結果は、アレイ抗原の50%及びアレイ抗体の20%がそれぞれ1.6 µg/ml、0.34 µg/ml濃度以下で対応リガンドの特異的かつ正確な測定を可能にしたにすぎない。

20

【0017】

固体表面への抗体結合のこうした高失敗率は大規模抗体アレイ製造計画では許されないであろう。これは、タンパク質アレイの可能性を実現するに足る抗体/抗原機能の維持という点で抗原及び抗体の直接付着方式は不向きであるとの見解を支持する。

30

【0018】

ビオチン標識タンパク質用のバインダーとしての、たとえばアビジン及びストレプトアビジンなどのコーティングの使用は数多くのタンパク質に通用することがよく知られている。この場合は一般にタンパク質をまず単離し、次いでビオチン化する。ビオチンとタンパク質の結合はタンパク質中の任意の又はすべての活性リシン部位で可能である。

【0019】

従って抗原又は抗体をこうした方法でビオチン化すると、それらのN末端基にもそれらの表面の任意数の潜在活性リシン残基にもビオチン基が存在することになる。これは抗原及び抗体がひとたびストレプトアビジン層に結合したら任意数の異なる配向をとることを、従って、結合特性が多様になることを意味する。さらに、ストレプトアビジンを介して固定化された抗原又は抗体への接近が立体障害により限定されるため、概して不十分な検定感度となる。

40

【0020】

立体障害を緩和し、免疫検定の感度を高めるために、抗原/抗体とビオチン化部位の間にリンカーを入れることが可能であると判明している。

【0021】

US5811246明細書は、免疫検定用又は抗血清産生用の小さな合成ペプチドを「担体」タンパク質たとえばアビジン又はストレプトアビジンにリンカーたとえば多様なブラジキニン誘導体を介して結合する方法を開示している。これにはいくつかの利点がある。第1に該ペプチド上の遊離N末端基とリンカーの間の縮合反応では抗体による認識(免疫検定法)又

50

は免疫応答の誘発(免疫法)に必須の荷電残基が保持される。第2にブラジキニンリンカーはその後、該小ペプチド上の遊離荷電基が保持されるようにビオチン化することができる。いずれの場合も、リンカーの存在は免疫検定法の感度向上に、また免疫物質として使用した場合には免疫応答の改善に資するよう見受けられる。

【0022】

しかし、ブラジキニン誘導体のこうした使用はアレイ作製方法にさらなるステップと厄介な問題を持ち込むことになる。

【0023】

US5723584、US5874239、US5932433の各明細書及びBeckett et al. Protein Sci. (1999) 8(4) 921-9は目的のペプチド又はタンパク質に融合したビオチン化ペプチドを開示している。これらのビオチン化ペプチドは組換えタンパク質をビオチン化して、その迅速な精製、固定化、標識又は検出を可能にするために使用される。これらのペプチドを特に抗原又は抗体結合性タンパク質と共に使用する又はアレイ作製に使用するといった提案はなされていない。

10

【0024】

本出願人は、これらの特許で使用されているペプチドがきわめて優れた抗原又は抗体アレイの作製を可能にし、そうしたアレイは非多孔質基板を使用して効率的に、かつこれらのタンパク質の結合アビディティを実質的に保持しながら作製しうることを発見した。

【発明の開示】

【0025】

本発明の第1態様では、抗原又は抗体から選択されるタンパク質のアレイの作製方法が提供されるが、該方法は以下のステップを含む：

20

(i) (a)抗原又は(b)抗体結合性タンパク質のいずれかを50個以下のアミノ酸を有するペプチドと融合させて含む融合タンパク質を組換え細胞中で発現させるステップであって、該ペプチドがSEQ ID NO.1のアミノ酸配列

$LX_1X_2IX_3X_4X_5X_6KX_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO. 1)

(式、 X_1 は天然アミノ酸であり、 X_2 はロイシン、バリン、イソロイシン、トリプトファン、フェニルアラニン又はチロシンを除いた天然アミノ酸であり、 X_3 はフェニルアラニン又はロイシンであり、 X_4 はグルタミン又はアスパラギンであり、 X_5 はアラニン、グリシン、セリン又はトレオニンであり、 X_6 はグリシン又はメチオニンであり、 X_7 はイソロイシン、メチオニン又はバリンであり、 X_8 はグルタミン、ロイシン、バリン、チロシン又はイソロイシンであり、 X_9 はトリプトファン、チロシン、バリン、フェニルアラニン、ロイシン又はイソロイシンであり、 X_{10} はアスパラギン又はグルタミンを除いた任意の天然アミノ酸である；また該ペプチドは X_6 に隣接するリシン残基においてビオチンリガーゼによりビオチン化することができる。)

30

を含むことを特徴とするステップ；

(ii) 融合タンパク質の該ペプチドを X_6 に隣接するリシン残基においてビオチン化するステップ；

(iii) ビオチン化融合タンパク質を単離するステップ；

(iv) アビジン又はストレプトアビジンをコートした非多孔質基板にビオチン化融合タンパク質を付着させるステップ；

40

(v) (a)融合タンパク質が抗原を含む場合には、抗原アレイの作製を目的にステップ(i)~(iv)を所望回数実行することにより、又は

(b)融合タンパク質が抗体結合性タンパク質を含む場合には、ステップ(iv)の前又は後に複数種の抗体又はその結合性断片を該タンパク質に結合させることにより基板上に少なくとも3種類のタンパク質からなるアレイを形成させるステップ。

【0026】

本出願人は、抗原又は抗体結合性タンパク質をSEQ ID NO. 1ペプチドと融合させて用いれば、これらのタンパク質を、タンパク質の抗原性又は抗体結合性タンパク質の結合能を実質的に維持しながら、固体表面に固定化しうることを発見した。

50

【0027】

これは、タンパク質それ自体ではなく融合ペプチドをビオチン化するのでタンパク質を基板表面に付着させてもその抗原性が破壊される度合いは少ないためであろう。さらに、SEQ ID NO. 1を含むペプチドは立体障害を緩和し抗原-抗体相互作用を可能にするように見受けられる。このペプチドリンカーが確実にタンパク質の末端領域に付着し、また確実にビオチン化部位を含むようにすると、機能に必須であるタンパク質上の部位はほとんど影響を受けないように見受けられる。こうした融合体は抗原又は抗体アレイを使用する解析方法との関連では特に有利である。

【0028】

非多孔質表面へのタンパク質付着態様(ステップiv)、細胞溶解物からのタンパク質単離態様(ステップiii)及びビオチン化の方法(ステップii)に一貫して同じ融合ペプチドを使用するのは、本書で開示する方法が初めてである。

10

【0029】

本書で使用する技術及び学術用語は特に明記しない限りすべて当業者が一般に理解しているとおりの意味とする。

【0030】

「抗体結合性タンパク質」は本書では、抗体領域に結合することが知られているタンパク質又はその混合物をいう。そうしたタンパク質の例はプロテインA、プロテインL及びプロテインGである。

【0031】

抗体結合性タンパク質は本発明では抗体アレイの作製に使用される。抗体は抗体結合性タンパク質たとえばプロテインA、G及び/又はL又は1つ又は複数のそうしたタンパク質を含む混合物などに結合するが、抗体結合性タンパク質自体はリンカーを介して基板表面のステレプトアビジン・コート層に固定化される。天然プロテインA、G及びLはビオチン化処理した市販品があり、そうした市販品は基板表面のステレプトアビジン・コート層に付着させることができるものの、本出願人はこれらのタンパク質を本発明のようにC及びN末端でビオチン化タグと融合させると、多様なタイプの抗体をきわめて効果的に結合させることを発見した。これもまた立体因子が緩和される結果であるか、又はタンパク質上の結合部位がすべて容易に利用できるようになるためであろう。

20

【0032】

加えて、本発明の方法を使用すれば、ビオチン化融合タンパク質はステップ(iv)で、アビジン又はストレプトアビジンをコートした基板に付着させるとすぐに捕捉されるため、観測可能な拡散がごくわずかな、きわめて離散的なスポットが基板上に形成される。

30

【0033】

50個以下のアミノ酸を有し、SEQ ID NO. 1のアミノ酸配列を含むペプチドの具体例はUS5723584、US5874239及びUS5932433の各明細書に記載されており、それらの明細書の内容は参照指示により本書に組み込まれる。前記参考文献に記載のペプチド例を以下に掲げる：

【0034】

【化1】

Leu Glu Glu Val Asp Ser Thr Ser Ser Ala Ile Phe Asp Ala Met Lys Met Val Trp Ile Ser
Pro Thr Glu Phe Arg (SEQ ID NO:14);

Gln Gly Asp Arg Asp Glu Thr Leu Pro Met Ile Leu Arg Ala Met Lys Met Glu Val Tyr
Asn Pro Gly Gly His Glu Lys (SEQ ID NO:15);

Ser Lys Cys Ser Tyr Ser His Asp Leu Lys Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Leu Val His Ser
Tyr Leu Arg Val Met Tyr Asn Tyr (SEQ ID NO:16);

10

Met Ala Ser Ser Asp Asp Gly Leu Leu Thr Ile Phe Asp Ala Thr Lys Met Met Phe Ile
Arg Thr (SEQ ID NO:17);

Ser Tyr Met Asp Arg Thr Asp Val Pro Thr Ile Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Leu His
Thr Thr Pro Trp Ala Cys Arg (SEQ ID NO:18);

20

Ser Phe Pro Pro Ser Leu Pro Asp Lys Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Val Ile Thr
(SEQ ID NO:19);

Ser Val Val Pro Glu Pro Gly Trp Asp Gly Pro Phe Glu Ser Met Lys Met Val Tyr His Ser
Gly Ala Gln Ser Gly Gln (SEQ ID NO:20);

Val Arg His Leu Pro Pro Pro Leu Pro Ala Leu Phe Asp Ala Met Lys Met Glu Phe Val
Thr Ser Val Gln Phe (SEQ ID NO:21);

30

Asp Met Thr Met Pro Thr Gly Met Thr Lys Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Val Ser
Thr (SEQ ID NO:22);

【 0 0 3 5 】

【 化 2 】

40

Ala Thr Ala Gly Pro Leu His Glu Pro Asp Ile Phe Leu Ala Met Lys Met Glu Val Val
Asp Val Thr Asn Lys Ala Gly Gln (SEQ ID NO:23);

Ser Met Trp Glu Thr Leu Asn Ala Gln Lys Thr Val Leu Leu (SEQ ID NO:24);
Ser His Pro Ser Gln Leu Met Thr Asn Asp Ile Phe Glu Gly Met Lys Met Leu Tyr His
(SEQ ID NO:25);

10

Thr Ser Glu Leu Ser Lys Leu Asp Ala Thr Ile Phe Ala Ala Met Lys Met Gln Trp Trp
Asn Pro Gly (SEQ ID NO:27);

Val Met Glu Thr Gly Leu Asp Leu Arg Pro Ile Leu Thr Gly Met Lys Met Asp Trp Ile
Pro Lys (SEQ ID NO:28);

Leu His His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Met Val Trp Asn His Arg (SEQ ID NO:30);

20

Pro Gln Gly Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Leu Trp Arg Ser (SEQ ID NO:31);

Leu Ala Gly Thr Phe Glu Ala Leu Lys Met Ala Trp His Glu His (SEQ ID NO:32);

Leu Asn Ala Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Gly (SEQ ID NO:33);

Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Leu Arg Asp (SEQ ID NO:34);

30

Leu Leu Arg Thr Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Asn Gly (SEQ ID NO:35);

Leu Ser Thr Ile Met Glu Gly Met Lys Met Tyr Ile Gln Arg Ser (SEQ ID NO:36);

Leu Ser Asp Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Cys (SEQ ID NO:37);

Leu Glu Ser Met Leu Glu Ala Met Lys Met Gln Trp Asn Pro Gln (SEQ ID NO:38);

40

Leu Ser Asp Ile Phe Asp Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Gln (SEQ ID NO:39);

【 0 0 3 6 】

【 化 3 】

Leu Ala Pro Phe Phe Glu Ser Met Lys Met Val Trp Arg Glu His (SEQ ID NO:40);

Leu Lys Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Thr Ala Met (SEQ ID NO:41);

Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Asn Ser (SEQ ID NO:42);

Leu Leu Gln Thr Phe Asp Ala Met Lys Met Glu Trp Leu Pro Lys (SEQ ID NO:43);

10

Val Phe Asp Ile Leu Glu Ala Gln Lys Val Val Thr Leu Arg Phe (SEQ ID NO:44);

Leu Val Ser Met Phe Asp Gly Met Lys Met Glu Trp Lys Thr Leu (SEQ ID NO:45);

Leu Glu Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Leu Glu (SEQ ID NO:46);

Leu Lys Glu Ile Phe Glu Gly Met Lys Met Glu Phe Val Lys Pro (SEQ ID NO:47);

20

Leu Gly Gly Ile Glu Ala Gln Lys Met Leu Leu Tyr Arg Gly Asn (SEQ ID NO:48);

Arg Pro Val Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Val Trp Lys Pro (SEQ ID NO:50);

Arg Ser Pro Ile Ala Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Arg Glu Thr (SEQ ID NO:51);

30

Gln Asp Ser Ile Met Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ser Trp His Val Asn (SEQ ID NO:52);

Asp Gly Val Leu Phe Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Arg Leu Glu Thr (SEQ ID NO:53);

40

Val Ser Arg Thr Met Thr Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Tyr His Asp Leu (SEQ ID NO:54);

【 0 0 3 7 】

【 化 4 】

Asp Val Leu Leu Pro Thr Val Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Ile Thr Lys (SEQ ID NO:55);

Pro Asn Asp Leu Glu Arg Ile Phe Asp Ala Met Lys Ile Val Thr Val His Ser (SEQ ID NO:56);

Thr Arg Ala Leu Leu Glu Ile Phe Asp Ala Gln Lys Met Leu Tyr Gln His Leu (SEQ ID NO:57);

10

Arg Asp Val His Val Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Thr Val Glu Thr (SEQ ID NO:58);

Gly Asp Lys Leu Thr Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Ile Gln Trp Thr Ser Gly (SEQ ID NO:59);

20

Leu Glu Gly Leu Arg Ala Val Phe Glu Ser Met Lys Met Glu Leu Ala Asp Glu (SEQ ID NO:60);

Val Ala Asp Ser His Asp Thr Phe Ala Ala Met Lys Met Val Trp Leu Asp Thr (SEQ ID NO:61);

Gly Leu Pro Leu Gln Asp Ile Leu Glu Ser Met Lys Ile Val Met Thr Ser Gly (SEQ ID NO:62);

30

Arg Val Pro Leu Glu Ala Ile Phe Glu Gly Ala Lys Met Ile Trp Val Pro Asn Asn (SEQ ID NO:63);

Pro Met Ile Ser His Lys Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Lys Phe Val Pro Glu (SEQ ID NO:64);

Lys Leu Gly Leu Pro Ala Met Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp His Pro Ser (SEQ ID NO:65);

40

【 0 0 3 8 】

【 化 5 】

Gln Pro Ser Leu Leu Ser Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Gln Ala Ser Leu Met (SEQ ID NO:66);

Leu Leu Glu Leu Arg Ser Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp Gln Ile Ser (SEQ ID NO:67);

Asp Glu Glu Leu Asn Gln Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Pro Leu Val His Val Thr Lys (SEQ ID NO:68);

10

Ser Asn Leu Val Ser Leu Leu His Ser Gln Lys Ile Leu Trp Thr Asp Pro Gln Ser Phe Gly (SEQ ID NO:70);

Leu Phe Leu His Asp Phe Leu Asn Ala Gln Lys Val Glu Leu Tyr Pro Val Thr Ser Ser Gly (SEQ ID NO:71);

20

Ser Asp Ile Asn Ala Leu Leu Ser Thr Gln Lys Ile Tyr Trp Ala His (SEQ ID NO:72);

Met Ala Ser Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ser Gln Lys Met Glu Trp Arg Ser Asn Ala Gly Gly Ser (SEQ ID NO:73);

Met Ala His Ser Leu Val Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Asp Pro Phe Gly Gly Ser (SEQ ID NO:75);

30

Met Gly Pro Asp Leu Val Asn Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Pro Leu Thr Gly Gly Ser (SEQ ID NO:76);

Met Ala Phe Ser Leu Arg Ser Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Leu Arg Asn Thr Pro Gly Gly Ser (SEQ ID NO:77);

Met Ala Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp Thr Gly Gly Ser (SEQ ID NO:78);

40

【 0 0 3 9 】

【 化 6 】

Met Ser Ser Tyr Leu Ala Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Ser Ala Tyr Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:79);

Met Ala Lys Ala Leu Gln Lys Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp Arg Ser His Pro
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:80);

Met Ala Phe Gln Leu Cys Lys Ile Phe Tyr Ala Gln Lys Met Glu Trp His Gly Val Gly
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:81);

10

Met Ala Gly Ser Leu Ser Thr Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Val Gly Lys Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:82);

Met Ala Gln Gln Leu Pro Asp Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Ile Ala Gly Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:83);

20

Met Ala Gln Arg Leu Phe His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Gly Pro Lys Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:84);

Met Ala Gly Cys Leu Gly Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp Arg His Phe Val
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:85);

Met Ala Trp Ser Leu Lys Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Ser Pro Gly Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:86);

30

Met Ala Leu Gly Leu Thr Arg Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Arg Asp Ser
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:87);

Met Ala Gly Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Arg Pro Leu
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:88), 及び

40

Met Ala Asp Arg Leu Ala Tyr Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp His Pro His Lys
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:89).

【 0 0 4 0 】

SEQ ID NO.1を含むこれらのペプチド又はその断片はステップ(i)の融合タンパク質産生用のペプチドの好例である。

【 0 0 4 1 】

特に、本発明の融合タンパク質産生方法に使用されるペプチドは13~20アミノ酸好ましく

50

は約15アミノ酸を有する。

【0042】

本発明の融合タンパク質産生への使用が特に好ましいペプチドは前掲SEQ ID NO. 78に示す15アミノ酸のペプチド断片である。特に好ましいのはSEQ ID NO. 2のアミノ酸配列 Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu (SEQ ID NO. 2) のペプチドである。

【0043】

このペプチドはAviTag(商標)と称し、またこの配列をコードするDNAベクターはAvidity Inc.から商品名pAN-4、pAN-5及びpAN-6(タンパク質のN末端にSEQ ID NO. 2のペプチドを付着させた融合タンパク質の産生に好適)、それにpAC-4、pAC-5及びpAC-6(タンパク質のC末端にSEQ ID NO. 2のペプチドを付着させた融合タンパク質の産生に好適)で市販されている。これらのベクターの配列は以下それぞれSEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7及びSEQ ID NO.8として示す(図7~12)。これらのベクターはさらに、クローニング補助用のアンピシリン耐性遺伝子blaを含む。ただし、AviTag(商標)配列は他のベクター系に導入することもできる。

10

【0044】

ビオチン化には色々なin vivo又はin vitro方法がある。たとえば発現宿主中でのビオチンリガーゼの同時発現、細胞溶解物へのビオチンリガーゼの添加又は精製タンパク質へのビオチンリガーゼの添加などである。本発明の方法の特に好ましい実施態様では、発現宿主中でビオチンリガーゼを同時発現させれば、細胞溶解物からタンパク質を単離する前にin vivoで融合ペプチドのリシン残基を酵素的にビオチン化するという原理を利用する。通常in vitro法を用いる場合には、発現タンパク質をまず細胞溶解物から単離し、次いで周知の手段によりin vitroで化学的にビオチン化しなければならない。これは資源の無駄とランダム・ビオチン化が生じる結果となる。多数のビオチン化部位をもつタンパク質は捕捉表面への結合の配向も度合いも予測不能である。本発明の方法の利点は、諸々の発現タンパク質が同じリンカー上の同じ残基を介してアレイに均一に付着することである。

20

【0045】

従って、本発明のステップ(i)で使用する組換え細胞は、ビオチンリガーゼをも発現するように、またビオチンをも含むように組み換えて、後の図1で図解するようにステップ(ii)が該細胞内でin vivoで行われるようにするのがふさわしい。図1のDNA(1)は抗原又は抗体結合タンパク質をコードするクローン遺伝子であるのがふさわしいが、これをSEQ ID NO.1のペプチドをコードする配列(3)を含むベクター(2)(pAN-4、pAN-5、pAN-6又はpAC-4、pAC-5、pAC-6など)中にサブクローニングする。次いでサブクローン遺伝子を、該ベクターを導入した発現系たとえばE. coli中で、抗原又は抗体結合性タンパク質(5)をSEQ ID NO.1のペプチド(6)と融合させて含む融合タンパク質(4)として発現させる。構成的に発現したビオチンリガーゼの存在下にin vivoで発現させると、融合ペプチド(6)上のリシン残基は酵素的にビオチン化される。

30

【0046】

細胞がビオチンを産生しない場合には、細胞を培地に加えて所望の結果をうむようにしてもよい。これは本発明の方法に要するステップ数を減らす。

40

【0047】

本発明の方法への使用に特に好適な宿主細胞はAvidity Inc.(米国カリフォルニア州デンバー)の市販E. coli株AVB100、AVB101及びAVB99である。これらの菌株はどれも染色体中にbirA遺伝子を安定的に組み込んであるためビオチンリガーゼを発現する。AVB100の場合には、L-アラビノースによる誘導でBirAタンパク質の過剰発現が実現されよう。AVB101 E. coli B株はビオチンリガーゼを過剰発現するpACYC184 ColE1和合性プラスミドを含み、細胞中のビオチンリガーゼ濃度が高まると融合タンパク質のin vivo完全ビオチン化が実現する。代替宿主細胞は、ビオチンリガーゼ(pBirAcm)を過剰発現するIPTG-誘導性birA遺伝子を有するプラスミドpACYC184を収めたAVB99(Avidity Inc.) E. coli菌株(XL1-Blue)

50

である。

【0048】

ステップ(i)で産生される融合タンパク質は常法で単離しin vitroでビオチン化してもよい。SEQ ID NO.1ペプチドの構造からして、ビオチン化はSEQ ID NO.1内のX₆に隣接するリシンで確実に起こるのであろう。

【0049】

本発明の好ましい実施態様では、SEQ ID NO.1のアミノ酸配列を含むペプチドは本発明の方法のステップ(iii)で融合タンパク質を単離する手段としても使用される。組換えDNA技術を用いるタンパク質発現技術は周知である。しかし、発現する各タンパク質はアミノ酸配列が異なるし、少なからぬ配列は選択宿主中での発現が困難であり、あるいは疎水性であるため不溶性であり、又は宿主にとって有害である。最も単純な細菌発現系にあってさえ、目的タンパク質を天然活性状態に保ったままでは破壊しにくい封入体がしばしば形成される。

10

【0050】

今日では目的タンパク質を別のタンパク質/ペプチド配列(タグ)と融合して、発現に続く精製工程の助けにするが慣行となっている。そうした融合体発現系には今日広く使用されている例あり、またいくつかの業者がすでに商業化している例もある。その種の融合ペプチド配列はタンパク質配列のアミノ末端又はカルボキシル末端に結合させ、特異的抗体又はアフィニティー樹脂で認識させる。

【0051】

発現タンパク質は細胞残屑から可溶化しなければならないが、それは非生理的pH値又はカオトロピック試薬の使用などを含む過酷な条件を必要とする場合もあるので、アフィニティー精製工程はそうした条件にも耐えられるほど頑強でなければならない。

20

【0052】

発現融合タンパク質の単離又は精製手段としてこの配列を使用すると、追加の精製用タグは不要になる。従って、この配列は二重の目的をはたす。

【0053】

場合によっては、発現融合タンパク質の単離又は精製手段としてさらなるペプチド配列タグを使用するのが望ましいかもしれない。そうした配列は鎖長1~30アミノ酸であるのが好ましい。

30

【0054】

図13に示すように、ペプチド配列タグの配列(20)は抗原又は抗体結合性タンパク質のN末端又はC末端領域に配置してもよい。しかし、抗原又は抗体結合性タンパク質のSEQ ID NO.1融合側の反対側に配置するのが好ましい。追加のペプチド配列タグをSEQ ID NO.1と同じ末端領域に配置するときは、SEQ ID NO.1の遊離端に融合するのが好ましい。

【0055】

多数のペプチド配列タグが公知である。本発明の目的に適うペプチド配列タグの例はUS4569794A、EP0282042Bの各明細書で開示されており、これら明細書の内容は参照指示による本書に組み込まれる。

【0056】

ペプチド配列タグは少なくとも1個のアミノ酸ヒスチジンを含むのが好ましい。ペプチド配列タグは式His-Xで示されるのがなお好ましいが、式中Xは-Gly-、-His-、-Tyr-、-Gly-、-Trp-、-Val-、-Leu-、-Ser-、-Lys-、-Phe-、-Met-、-Ala-、-Glu-、-Ile-、-Thr-、-Asp-、-Asn-、-Gln-、-Arg-、-Cys-及び-Pro-からなる群より選択される。

40

【0057】

あるいは、ペプチド配列タグは式Y-Hisで示されるが、式中Yは-Gly-、-Ala-、-His-及び-Tyr-より選択される。

【0058】

特に好適なペプチド配列タグはEP0282042B明細書で開示されており、好ましい例はヘキサHisタグである。

50

【0059】

本発明の方法の一実施態様ではステップ(iii)を、SEQ ID NO.1のアミノ酸配列を含むペプチドに対して特異的であるさらなる抗体又はその結合性断片を使用して実行する。前記のさらなる抗体は、常法により、SEQ ID NO.1のアミノ酸配列を含むペプチド(7)に対して産生させることができる。この方法を図2に図解する。

【0060】

前記のさらなる抗体は抗融合体抗体(8)であり、カラム、磁気ビーズ(9)又はピペットチップに固定化することができる。固定化の方法は、抗動物種抗体(10)であるのがふさわしい二次抗体を使用する方法、又は文献記載の他の方法たとえばビーズ(9)に結合させたプロテインA、プロテインG又はプロテインLなどのような抗体結合性タンパク質を使用する方法がある。この方式は自動化に、またきわめて多数の、ただし少量の、新規融合タンパク質の同時並行的な単離に大いに適する。結合融合タンパク質(4)は細胞溶解物から分離し、次いでpHを7.0から9.0に引き上げて溶離することができる。

10

【0061】

代替実施態様では、ビオチンに対しある程度のアフィニティーをもつがビオチンをかなり容易に解離するような分離材を用いて融合タンパク質を単離する。分離材は、天然のアビジン又はストレプトアビジンよりもビオチンに対するアフィニティーを弱くした改良型のアビジン又はストレプトアビジンであるのがふさわしい。そうした分離材の具体例としてはMolecular Probes社(米国オレゴン州ユージン)からCaptAvidin(商標)として市販されている改良型アビジンがある。

20

【0062】

この実施態様では、融合タンパク質は常法により培地由来の細胞残屑、界面活性剤及び塩などから、細胞溶解混合物のpHを6.0に引き下げ、次いで(a)磁気ビーズ又は(b)ピペットチップに付着させたCaptAvidin(商標)を用いるアフィニティー精製で単離する。後は結合融合タンパク質を磁気ビーズ又はミニカラムから、pHを6.0から9.5に高めて溶離することができる。

【0063】

ステップ(iv)の前に、発現した融合タンパク質の同一性を確認するのが好ましい。ある特定の手法では、ごく少量(10 μ l)の単離融合タンパク質をマイクロタイタープレートから取り出す。この試料をトリプシンで(周知の方法により)消化する。得られたペプチド抽出物を脱塩し、ZipTip(商標)(Millipore社、米国マサチューセッツ州)又は等価物を使用して濃縮した後に質量分析計で分析する。融合タンパク質の配列は判明しているので、その同一性の確認は通常はペプチドの同定を目的としたMALDI質量分析計による同定で十分である。この手法はタンパク質研究に広く使用されており、またT. Rabilloud (Ed.) Proteome Research: 2D gel electrophoresis and identification methodsで要約されている。さらに、この手法は自動化が可能であり、Amersham Pharmacia Biotech、Bio Rad、Abi Med及びGenomic Solutions (WO 07/4852A1明細書)などを含む数社から多数の商業システムが市販されている。

30

【0064】

同様に、ステップ(iv)の前に、各発現タンパク質の濃度を可能な場合には正規化してエレメント間のばらつきを除去するのが好ましい。タンパク質濃度のばらつきが大きいとタンパク質アレイから得られたデータの解釈が困難になる[タンパク質免疫検定法やタンパク質アレイの定量面及び検定感度の定義はEkins, Clinical Chemistry (1998) 44:9 2015-2 030; US5807755明細書; 及びUS5432099明細書を参照]。タンパク質の正規化は全タンパク質濃度の決定又は内部対照の使用により行うことができる。

40

【0065】

本発明の方法の特に好ましい実施態様では、融合体タグを内部対照として使用し、融合タンパク質中のSEQ ID NO.1を含むアミノ酸配列のペプチドに対し高アフィニティーを有する抗体により検出する。あるいは、融合タンパク質をさらなるペプチド配列タグと共に発現させ、これを内部対照として使用することもできる。そうしたタグは、ビオチン化融合

50

タンパク質の一部として発現させる前記のさらなるペプチド配列タグたとえば前述のヘキサHisタグなどでもよい。このタグ付き融合タンパク質は適当な抗体たとえば抗Hisタグ抗体を使用して検出してもよい。

【0066】

これは、後続のアレイによる生物試料解析と同時に又はその最中に古典的なサンドイッチ免疫検定法を実行することにより行うことができる。

【0067】

ビオチン化融合ペプチドに対する抗体を使用すれば、融合タンパク質の含量を μ lあたりで、また全タンパク質量の比として、求めることができる。この方法はヒツジ・ポリクローナル一次抗体と蛍光色素で標識した二次抗体[たとえばヤギ抗マウス抗体+Alexa 488 (Molecular Probes社、米国ユージン)]とのサンドイッチを使用して実行されよう。この使用蛍光色素は生物試料に対する二次抗体に使用されるいずれの色素ともスペクトルが異なる。どちらの方法もすでに自動化用に最適化されている。

10

【0068】

本発明の方法のステップ(iv)で使用されるアビジン又はストレプトアビジンをコートした非多孔質基板はガラス又はプラスチック素材であるのがふさわしい。そうした基板は小さな凝縮アレイの作製に好適である。これは重要である。生物試料は一般にきわめて希少で、従ってきわめて貴重だからである。タンパク質アレイでは目的物を収める表面積を極小にする必要があるが、その一方で要求される検定感度をなお実現しうるようになるのが好ましい。加えて、アレイの抗原又は抗体が高濃度であれば、検定法に使用したときにS/N

20

【0069】

さらに、非多孔質表面は膜などを含む多孔質表面基板に比して、物理的により堅牢であり、自動化にも十分適するし、また蛍光スキャナーによる画像化に際してバックグラウンドが低くなる。

【0070】

非多孔質表面は常法によりアビジン又はストレプトアビジンでコートしてもよい。たとえば非多孔質表面たとえばポリスチレン製マルチウェルプレートへのストレプトアビジンの固定化は技術上周知である。その最も単純な形式では、ストレプトアビジン溶液を該表面に数時間接触させておく。次いで、未結合タンパク質を洗浄除去し、プラスチック表面上の残留活性部分をBSA又は等価物でブロックする。この方式は受動的かもしれないが、効果的である。ポリスチレン又はニトロセルロース表面へのストレプトアビジンの非共有結合はW098/37236明細書に記載のとおり、安定性も高温や高濃度のカオトロピック試薬に対する耐性も高いようである。

30

【0071】

アビジンはManning et al. Biochemistry 16: 1364-1370 (1977)の記載に従いアビジンのN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルを使用してガラスに化学的に付着させることができるし、またJasiewicz et al. Exp. Cell Res. 100: 213-217 (1976)の記載に従いカルボジイミド・ベースのカップリング方法によりナイロンに付着させることもできる。

【0072】

別の方法では、高分子化合物たとえばビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミド=エステル、N-ビオチニル-6-アミノカプロイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミド=エステル、スルホスクシンイミジル-2-(ビオチンアミド)エチル-1,3-ジチオプロピオナートなどをビオチン化し、好適表面のコティングに使用する。次いでEP0620438明細書で開示されている要領で、アビジン又はストレプトアビジンを第2層としてコートし、高分子化合物に付着させたビオチンリンカーとの結合を介して保持させる。

40

【0073】

基板表面のビオチン層を介してストレプトアビジンを付着させる方法はW0 98/59243明細書でさらに展開された。同明細書は化学的手段により又は365nmでの光活性化によりビオチンを表面に付着させる方法を開示している。その利点は特定表面領域のマスキングが可

50

能になることである。こうしたアプローチは、ビオチンがガラス表面に共有結合しうる一方で、処理した基板領域内だけのストレプトアビジンとは非共有結合するという意味で巧妙である。これはストレプトアビジン「アクセプター」タンパク質のパターンを基板上に必要に応じて作成しうることを意味する。

【0074】

しかし本発明の好ましい実施態様では、非多孔質基板の全表面をアビジン又はストレプトアビジンでコートし、次いで結合に不必要な領域は、たとえばウシ血清アルブミン(BSA)の添加などにより、ブロックする。従って、融合タンパク質と基板との非特異的相互作用は少なくなる。

【0075】

ガラス又はプラスチック表面に直接付着させたタンパク質は固体表面上の荷電基又は固体表面の活性部分(一般的にはガラス中のシラノール基又はポリスチレン上の荷電表面残基)との相互作用により非共有結合で固定化される。ガラス及びプラスチック表面への抗原又は抗体のそうした非特異的吸着はその抗原性又は抗原結合能をそれぞれ著しく減じる。従ってアビジン又はストレプトアビジン層は、第1にビオチン化融合タンパク質を結合させ(同時精製される非ビオチン化タンパク質は結合しないので、さらなる精製ステップを可能にする)、第2に高密度ストレプトアビジン層によりビオチン化融合タンパク質を、基板表面との望ましくない非特異的相互作用から防護するという二重の役目を果たす。

【0076】

ステップ(iv)で融合タンパク質を基板上的アビジン又はストレプトアビジンに付着させると、非常に堅固な、ただし非共有結合が起こる。好ましくは、非多孔質基板はストレプトアビジンでコートする。ストレプトアビジンへのビオチンの結合は多価であり、基板表面に直接結合した抗原に比して、きわめて強い結合力が得られる。ひとたびタンパク質を付着させてアレイを作製すると、その結合は十分に強いため、広範囲にわたる厳しい洗浄に耐えられるし融合タンパク質をそれほど失うこともない。これを図解したのが図3である。ビオチン化融合タンパク質(4)はアレイ基板(12)の表面にストレプトアビジン(14)との堅固な非共有相互作用を介して付着する。好ましい実施例では、ストレプトアビジン(14)を基板に非共有結合させる。ストレプトアビジン分子が結合していないアレイ基板上の部位はBSA又は他の表面改質剤(13)でブロックする。融合タンパク質は融合ペプチド(6)表面のビオチン標識(7)を介してストレプトアビジン(14)と結合する。

【0077】

さらに、アビジン又はストレプトアビジン層は基板表面に直接付着しているかビオチン化リンカーを介して付着しているかにかかわらず、きわめて安定であり、乾燥保存がきき、また加熱し又は攻撃的な試薬で処理しても(大部分の抗原又は抗体と違って)明白な機能喪失を伴うことがない。必要なら、ストレプトアビジン層を土台にしてその上にさらなる「アクセプター」層を設けることもできる。そうした層は他の、周知の抗体結合性タンパク質を含んでもよい。

【0078】

本発明のアレイは、ビオチン結合用の多価部位を有するストレプトアビジンの凝縮効果を利用するという利点がある。これは抗原、抗体両アレイとビオチンとの相互作用を4倍にする。従ってアレイの各エレメント内の抗原又は抗体濃度を増すことができるが、それは同じシグナルを実現しながら mm^2 あたりエレメント数を増加させること意味し(定量面の検討はUS5807755及び5432099明細書を参照)、また固体表面の利用表面積が小さくて済むことを意味する。その利点は生物試料の必要量が少なくなることである。

【0079】

アレイが顕微鏡フォーマット上に配列した抗原からなるときは、きわめて多数の抗原を、たとえば3~10,000種の融合タンパク質を含むのがふさわしい。これらのタンパク質は、アレイを使用して実行しようとする解析の内容や対象物に応じて、多様な源泉から生成させ、又は獲得することができよう。しかし、各タンパク質は2つの融合タンパク質の形で、1つはC末端に付着させたSEQ ID NO.1を含むペプチドを有し、もう1つはN末端に付着さ

10

20

30

40

50

せたSEQ ID NO.1を含むペプチドを有する融合タンパク質の形で発現させるのが好ましい。そうすれば、それぞれの融合タンパク質の相補性抗体に対する相対的な抗原性を評価することができる。

【0080】

抗体結合性タンパク質たとえばプロテインA、G及びLなどの使用は広範に報告されてきた。そうしたタンパク質は抗体への結合が十分に堅固であるため、分離及び検出法への使用が可能である。これらのタンパク質は多様な種類の抗体の保存領域に結合することが知られている。本発明の方法を抗体アレイの作製に使用するとき、抗体の結合はSEQ ID NO.1を含むペプチドと融合させた抗体結合性タンパク質の層を設けることで実現される。この層はビオチン化タグ付きプロテインA、G及びLの混合物からなるのが好ましく、またそのなかにC末端で融合したものあれば、N末端で標識したものもあるのが好ましい。抗体結合性タンパク質の混合物を創出することにより、ほぼどのような抗体(たとえばポリクローナル、モノクローナル、二本鎖断片又は単鎖抗体、及びその中にプロテインA、G又はL部位が存在するかあるいは組み込まれた抗体活性ファージなど)の付着でも可能にする汎用アクセプターが創出される。アレイには任意の抗体を、抗体の前処理又は修飾の必要もなく、組み込むことができる。

10

【0081】

そうした抗体結合性タンパク質をステップ(iv)でアビジン又はストレプトアビジン・コート表面に付着させると、きわめて高密度の結合タンパク質(多価ストレプトアビジンに結合するビオチン化タグ付きタンパク質)が得られる。この方法には、ただ1個のアミノ酸残基がビオチン化されるが、それは融合ペプチドの一部をなすため、レクチン表面の抗体結合部位は利用可能のまま残されるという利点がある。これらの抗体結合性タンパク質は固体表面上に第2層を効果的に創出する。結合融合体タグ付きプロテインA、G及びLからなるこの層は任意の抗体に対応する汎用アクセプター表面として機能し、該アクセプターは任意の抗体を、直接ビオチン化する必要もなく、受け入れる(図6)。これは時間と抗体の節約になるし、また対応する抗原に対する抗体結合の劣化という可能性を一掃する。

20

【0082】

好ましい実施態様では、モル過剰量の抗体をビオチン化ペプチド+抗体結合性タンパク質(プロテインA、G又はLなど)融合体と予混合し、最高15分間インキュベートする。次にこの抗体-抗体結合性タンパク質混合物を、ストレプトアビジンでコートしたアレイ基板に直接付着させる。あるいはストレプトアビジンでコートしたアレイ基板にビオチン化抗体結合性タンパク質融合体をまず付着させ、次いで個別抗体をコート基板表面に付着させてアレイを作製するようにしてもよい。

30

【0083】

いずれの方法で作製されるアレイも、観測可能な拡散がごくわずかな、きわめて離散的なスポットを含むため、検定目的に適った良好なアレイが得られる。

【0084】

本発明の方法を用いて得られるアレイは抗原-抗体結合を検出する方法に使用するのがふさわしい。

【0085】

従って第2態様では、本発明は抗原-抗体結合を検出する方法であって、(vi)第1態様の方法を用いて得られたアレイに、ステップ(v)(a)のアレイの場合には抗体を含む又は含むと推測される試料を、またステップ(v)(b)のアレイの場合には抗原を含む又は含むと推測される試料を、それぞれ付着させるステップ、及び(vii)基板上の結合抗体又は抗原を検出するステップを含む方法を提供する。

40

【0086】

本発明の方法のステップ(vi)及び(vii)は慣用のやり方で、周知の免疫検定法たとえば標識特に蛍光標識二次抗体を使用するサンドイッチELISA法を含む種々のELISA法などを用いて行うのがふさわしい。これを抗原アレイの場合について図解したのが図4である。ストレプトアビジン(14)を介してアレイ基板(12)に結合した抗原(4)の検出には好適な一次抗

50

体(15)を使用する。シグナルの増幅には標識(17)を結合した好適な二次抗体を用いる。好ましい実施態様では該標識はAlexa 488などのような蛍光色素であるが、任意数の他タイプの公知標識でもよい。

【0087】

タンパク質アレイはタンパク質解析装置の使用、品質特にタンパク質密度を監視し続けるのがふさわしい。これは本発明の好ましい実施態様に沿って、SEQ ID NO.1を含むペプチド又は前述のヘキサHisタグなどのようなさらなるペプチド配列タグ、もしくは内部標準としてのこの機能を前述のプレアレイ段階タンパク質正規化の場合と同様に果たす他の任意好適なタグを使用して実現する。多数のタンパク質調製物に由来する抗原を基板表面に配列し終えたら、次はそのアレイを使用して抗体品質の評価(WO 99/39210を参照)又は血清試料中の抗体力価の測定(Joos et al. Electrophoresis 2000, 21, 2641-2650)を行うことができる。これらの例では、一次試料に内部標準を加えることによりアレイ内の異なるエレメント間のタンパク質相対量を求めることができる。内部標準として好ましいのは融合ペプチドに対して生成させたヒツジ・ポリクローナル抗体である。これを一次抗体溶液(抗体又は血清)に添加して、一次試料に対する標識二次抗体とはスペクトル的に区別される好適な蛍光色素で標識した抗ヒツジ二次抗体によって検出する。市販スライドイメージャーを使用して二色画像を生成し、各エレメントに対応するシグナルを融合タンパク質由来のシグナルで正規化する。プレアレイ段階のタンパク質含量の正規化と組み合わせれば、ばらつきの少ないアレイを生成させることができる。

10

【0088】

前記方法は好ましくは少なくともいくつかのステップを、最も好ましくはすべてのステップを自動化して、スループットを高め、作業時間の短縮及びコスト低減をはかるようにする。

20

【0089】

多数の新規タンパク質を使用して抗原アレイを作製する以上は、作製方法を実行可能にするには最小限のステップでタンパク質を固定化しなければならない。ビオチン化が容易かつ特異的に行えて、しかも検定目的の結合性タンパク質としてだけでなく精製手段や品質監視用の内部対照としての役目も果たすようなペプチドの使用こそがそうした方法をもたらす。

【0090】

本発明の方法は多様なタンパク質コレクションを固定化する際に汎用手順、最小限のステップ及び最大限の配向予測性の実現を可能にする。本発明の方法は大規模な、たとえばハイスループット・スクリーニングの実行などに好適である。

30

【0091】

本発明は第3態様では第1態様の方法を使用して得られる非多孔質基板のタンパク質アレイを提供する。

【0092】

前記の方法に使用されるいくつかの要素は新規であり、従って本発明のさらなる態様を構成する。本発明は特に第4態様で、抗体結合性タンパク質をN又はC末端でSEQ ID NO.1を含む13~50アミノ酸のペプチドたとえばSEQ ID NO.2のペプチドと融合させた融合タンパク質を提供する。抗体結合性タンパク質は特にプロテインA、G又はLであり、それらの混合物であるのが好ましい。該融合タンパク質は前述のようにさらなるペプチド配列タグたとえばヘキサHisタグ又は周知の別の好適な配列タグを追加的に含んでもよい。そうした配列タグは抗原又は抗体結合性タンパク質のN又はC末端に配置してもよいが、抗原又は抗体結合性タンパク質の、SEQ ID NO.1のアミノ酸配列を融合する側とは反対側に配置するのが好ましい。配列タグは、SEQ ID NO.1と同じ末端領域に配置する場合にはSEQ ID NO.1の遊離端に融合する。

40

【0093】

本発明の第5態様は、第4態様の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む。特にこの場合には、該ペプチドをコードする配列は次のSEQ ID NO.9の配列であるのがふさわしい。

50

【 0 0 9 4 】

GGC CTG AAC GAC ATC TTC GAG GCT CAG AAA ATC GAA TGG CAC GAA (SEQ ID NO.9)

発明の詳細な説明

ステップ1: クローニング

すべての発現遺伝子をcDNA調製物から各pAN及びpACシリーズ・ベクター(米国Avidity Inc.)に直接クローニングした。これらのベクターはそれぞれN末端及びC末端融合タンパク質の発現に使用した。使用融合ペプチド配列は前記SEQ ID NO.2であった。インサート配列はDNA配列解析により確認したが、解析は377 (PE Corporation Inc.)及びMagaBase (Amersham Pharmacia Biotech)装置により、メーカーの説明書に従って行った。

【 0 0 9 5 】

ステップ2: 発現

融合タンパク質はすべて、嚴重に抑制したTrcプロモーターの制御下に発現させたが、IPTG誘導性である。タンパク質はすべて、birA遺伝子を染色体に安定的に組み込んだ菌株AVB100(Avidity Inc.; 米国コロラド州)すなわちE. coli K12株[MC1061 araD139 delta(ara-leu)7696 delta(lac)174 galU galK hsdR2(r_K.m_K+) mcrB1 rpsL(Str^r)]で発現させた。

【 0 0 9 6 】

L-アラビノースによる誘導でBirAタンパク質の過剰発現を実現した。安定的に組み込まれたbirA遺伝子は抗生物質の維持を必要としなかったし、またAVB100とIPTG誘導性ベクターたとえばpAC及びpAC (Avidity Inc.)との併用は目的の発現遺伝子とBirAレベルを別々に制御することを可能にした。

【 0 0 9 7 】

菌株AVB99 (avidity Inc.)もまた使用したが、これはビオチンリガーゼ(pBirAcm)を過剰発現させるためにIPTG誘導性birA遺伝子を組み込んだプラスミドpACYC184を導入したE. coli株(XL1-Blue)である。

【 0 0 9 8 】

菌株AVB101 (avidity Inc.)もまた使用したが、これはビオチンリガーゼ(pBirAcm)を過剰発現させるためにIPTG誘導性birA遺伝子を組み込んだプラスミドpACYC184を導入したE. coli B株(hsdR, lon11, sulA1)である。

【 0 0 9 9 】

ビオチンリガーゼ、融合タンパク質両方の発現はIPTG(1mM)で誘導した。ビオチンは誘導時に濃度50 μMとなるように加えた。

【 0 1 0 0 】

ステップ3: 精製

ビオチン化融合タンパク質を2つの別々の方法で単離した。これらの方法は択一的に使用するか、又は超高純度調製品が必要とされる場合には2段階法として併用した。

【 0 1 0 1 】

a) 抗融合ペプチド抗体を使用する精製

C末端融合ペプチドに対する部分精製マウス・モノクローナル抗体を入手し、C及びN末端融合タンパク質に対するポリクローナル抗体をウサギで産生させた。

【 0 1 0 2 】

i) 第1の方法では、抗C末端マウス・モノクローナル抗体を、表面をトシル化で活性化した2.4ミクロン径磁気ビーズ(Dynal Biotech ASA; ノルウェー)に、次の要領で直接付着させた:

コーティング手順。Dynabeads M-280 Tosylactivatedをピペティングと約1分間のボルテックスにより再懸濁し直ちにピペットで反応チューブに注入した。ビーズと溶液を分離するためにマグネット(Dynal MPC)でビーズを集め上清を除いた。上清はビーズをかき乱さないように除いた。ビーズを十分な容量の0.1M磷酸Na緩衝液pH7.4に再懸濁し2分間穏やかに混ぜた。再びマグネットを使用して上清をピペットで除き、洗浄ビーズを同容量の0.1M磷酸Na緩衝液pH7.4に再懸濁し所望の濃度とした。

【 0 1 0 3 】

10

20

30

40

50

好適な抗体を0.1M燐酸Na緩衝液pH7.4中に透析した。抗体の量は $3\mu\text{g}$ -抗体/ 10^7 Dynabeads (約 $20\mu\text{g}/\text{mg}$)であり、ビーズを1分間ボルテックスして再懸濁した。混合物を 37°C で16~24時間、ゆっくりとチルト回転させながらインキュベートした。インキュベーション後、1~4分間マグネットを使用して磁気ビーズを集め、上清を除いた。コートしたビーズを4回洗浄した。内訳は $\times 1$ PBS(燐酸緩衝生理食塩水)pH7.4+0.1%(w/v) BSAにより4で5分間を2回、0.2M Tris-HCl pH8.5+0.1(w/v) BSAにより20で24時間又は 37°C で4時間を1回(Trisは遊離トシル基をブロックする)、最後に $\times 1$ PBS pH7.4+0.1%(w/v) BSAにより4で5分間を1回である。Dynabeads M-280 Tosylactivatedの抗体コーティング手順は以上である。

【0104】

目的の融合タンパク質を発現する細胞を氷冷 $\times 1$ PBS pH7.4 + 1% NP-40+プロテアーゼインヒビターで15分間溶解した後、溶解物を $2,000\times g$ で3分間遠心にかけて。溶解物をプレクリアした。これには(1.5ml Eppendorfチューブ中で)氷冷溶解物を、好適な抗体をプレコートしたDynabeadsと2時間インキュベートする(0.5mg Dynabeads/ 1×10^6 細胞の溶解物)という方法を用いた。Dynabeadsを1.5ml氷冷PBS+1%NP-40で3回洗浄した。洗浄は、各洗浄ステップが終わるたびにDynaL MPC (Magnetic Particle Concentrator)を使用してビーズを内壁に集めながら実行した。pHを9.0以上に調整して融合タンパク質-抗体-磁気ビーズ複合体を破壊した。MPCで上清をビーズから分離し、検定で全タンパク質濃度、融合ペプチド濃度を求め、またタンパク質をPerSeptive Voyager MALDI(以下を参照)使用の質量分析法で同定した。

10

【0105】

ii) 第2の方法では、抗体をDynaL磁気ビーズに間接的に、あらかじめメーカーがビーズ表面に固定化しておいたプロテインAとプロテインGを介して付着させた。

20

【0106】

Dynabeads-プロテインAとDynabeads-プロテインGの混合物を1~2分間ボルテックスして再懸濁させた。前述のマグネチック・ワークステーションを使用してビーズを集め、上清を除いた。0.01%のTween 20と0.1%(w/v) BSAとを添加した0.5mlの0.1M燐酸Na緩衝液pH7.0を加え、洗浄操作を3回繰り返した。

【0107】

洗浄Dynabeadsに抗体を加え、穏やかにかき混ぜながら10~40分間インキュベートした。マグネチック・ワークステーションを使用して上清を除いた。0.01%のTween 20と0.1%(w/v) BSAとを添加した0.5mlの0.1M燐酸Na緩衝液pH7.0にビーズを2回再懸濁させてタンパク質を安定化した。上清を除き、ビーズを前記要領で調製した細胞溶解物の混合液に加えた。融合タンパク質の結合を $2\sim 8^\circ\text{C}$ で10分間~1時間行った。Dynabeads-プロテインG当初容量 μl あたり約 $25\mu\text{g}$ の目的タンパク質を使用して過剰量のタンパク質を確保するようにした。マグネチック・ワークステーションを使用して融合タンパク質-Ig Dynabeads-プロテインG複合体から界面活性剤と細胞溶解物とを含む上清を分離し、 $\times 1$ PBS (pH7.4) + 0.01% Tween 20で3回洗浄した。融合タンパク質-Ig Dynabeads-プロテインG/A複合体から結合融合タンパク質を溶離するには、pHを9.0以上に調整し、精製融合タンパク質を含むようになった上清を分離するのが最善であった。マグネチック・ワークステーションを使用して磁気ビーズから上清を分離し、検定で全タンパク質濃度、融合ペプチド濃度を求め、またタンパク質をPerSeptive Voyager MALDI(以下を参照)使用の質量分析法で同定した。

30

40

【0108】

iii) 別の実施例では、プロテインA、G及びLの混合物を、好適に調製したピペットチップに固定化した。0.01% Tween 20と0.1%(w/v)BSAとを添加した50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)中、室温で60分間、抗体をピペットチップとインキュベートした。コートしたピペットチップを次いで、3ピペット容量の0.01% Tween 20 + 0.1%(w/v)BSA添加50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)ですすいだ。200 μl の細胞溶解物をピペット底から手作業で、又はロボット・ワークステーションを用いて数回吸引し、ビオチン化融合タンパク質が確実に抽出されるようにした。細胞溶解物を捨てた。ピペットチップを3倍容量の0.01% Tween 20 + 0.1%(w/v)BSA添加10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)ですすいだ。結合融合タンパク質を1/2ピペッ

50

ト容量の0.01% Tween 20添加50mM炭酸水素ナトリウムHCl緩衝液(pH10.0)中に、この溶離液をピペット底まで穏やかに吸い上げることにより、溶離した。融合タンパク質を含む溶出液は後述の要領で検定した。

【0109】

iv) 別の好ましい方法ではヘキサHisタグを加えて代替ビオチン化融合タンパク質を構築した。このヘキサHis融合ペプチドはしばしば標準精製方法に使用されており、当業者には周知である。一般に細胞は細胞湿量グラムあたり5mlの緩衝液に溶解した。溶解緩衝液組成: ×1 NBB (20mM Tris CL、100mM NaCl、5mMイミダゾール、pH8.0)、1/100容量の10mg/mlリゾチーム、1/100容量のプロテアーゼインヒビターカクテル(Calbiochemプロテアーゼインヒビターカクテルセット3)、10mMベータメルカプトエタノール、+ ×1界面活性剤カクテル(Novagen; 米国マジソン)。細胞は30~37 で15分間溶解した。

10

【0110】

細胞タンパク質は、尿素を加えて最終濃度6M及び2Mのチオ尿素とすることで変性させた。この溶液を0.22ミクロンのフィルターに通して清澄化し、ついでニッケルアガロースマトリックス(ドイツQiagen社のNTA)に直接付着させた。タンパク質をこのニッケルアガロースビーズと15分間インキュベートし、非結合性タンパク質を遠心で除去した。6M尿素及び2M尿素を添加した10倍容量の溶解緩衝液でビーズを3回洗浄した。最終洗浄後、洗浄緩衝液を50%取り除き、次いで10mMベータメルカプトエタノールを添加した20mM Tris HCl、100mM NaCl (pH8.0)緩衝液で希釈した。このステップを3回繰り返した。最後に、ビーズを10倍容量の緩衝液すなわち20mM Tris HCl、100mM NaCl (pH8.0)(尿素/チオ尿素無添加)で

20

【0111】

タンパク質を、種々の濃度のイミダゾールを加えた緩衝液[20mM Tris HCl、100mM NaCl (pH8.0)]で数回溶離した。結合タンパク質の溶離に使用したイミダゾールの一般的な濃度範囲は20mM~500mMであった。溶離タンパク質を含む画分を合せた。

【0112】

b) CaptAvidin(商標)(Molecular Probes社、米国オレゴン州)を使用する精製別の実験では、好適表面に固定化された新種のストレプトアビジン商品CaptAvidin(商標)を使用してビオチン化融合タンパク質を単離した。この改良型ストレプトアビジンでは、ビオチン結合部位のチロシン残基がニトロ化されているために $10^{15}M^{-1} \sim 10^9M^{-1}$ のKaとの

30

きわめて強力な非共有結合を弱める。従ってビオチンとCaptAvidin(商標)との会合は後述のようにpHを9~10へと高めることにより破壊することができる:

i) 好ましい実施態様では、CaptAvidin(商標)タンパク質をトシル化磁気ビーズ(Dynal Biotech ASA; ノルウェー)に付着させ、前述の要領で洗浄し調製した。CaptAvidin(商標)をコートしたビーズを0.01% Tween 20と0.1%(w/v) BSAとを添加した50mMクエン酸リン酸緩衝液pH4.0で3回洗浄し、上清を捨てた。細胞溶解混合物を前述の要領で調製し、pHを5.0に調整した。CaptAvidin(商標)コート・ビーズを、0.5mg Dynabeads/ 1×10^6 細胞溶解物の割合で加えた。この溶液を10~60分間穏やかに攪拌しながらインキュベートした。マグネチック・ワークステーション(Dynal Biotech ASA; ノルウェー)により磁気ビーズを集めて上清を除き、0.01% Tween 20添加10mM Tris-HCl緩衝液pH8.0で3回洗い、上清を捨てた

40

【0113】

0.01% Tween 20添加50mM炭酸水素ナトリウムHCl緩衝液pH10.0を加え、懸濁液を室温で15分間穏やかにかき混ぜることにより、ビオチン化融合タンパク質をCaptAvidin(商標)コート・ビーズから脱離させた。マグネチック・ワークステーションにより磁気ビーズを除き、ビオチン化融合タンパク質を含む上清を残した。

【0114】

ii) 別の実施例では磁気ビーズの代用としてアガロースビーズ結合CaptAvidin(商標)(Molecular Probes Inc.; 米国オレゴン州)と等容量のSepharose(登録商標)CL-4Bアガロース(Amersham Pharmacia Biotech Ltd.; 英国)との混合物のミニカラムを作製し、カラム

50

床体積を大きくするようにした。ミニカラムは前記混合物を0.01% Tween 20添加50mMクエン酸リン酸緩衝液pH4.0に懸濁させ、その懸濁液をピペットチップに注入して作製した。細胞溶解混合物からのビオチン化融合タンパク質の分離はアフィニティークロマトグラフィーで行った。非結合物質は10カラム容量の0.01% Tween 20添加10mM Tris-HCl緩衝液pH8.0でカラムから溶離し、またビオチン化融合タンパク質は2カラム容量の0.01% Tween 20添加50mM炭酸水素ナトリウムHCl緩衝液pH10.0でカラムから溶離した。

【0115】

iii) さらに別の実験では、CaptAvidin(商標)アガロースビーズをピペットチップ内に固定化し、融合タンパク質の結合と溶離を前述の要領で行った。

【0116】

ステップ4: タンパク質の同定

発現させ、精製した融合タンパク質をペプチド・フィンガープリント法で同定した。Rabilloud (Ed.), Proteome Researchで概説されている方法を用いて、融合タンパク質をトリプシンで消化し、得られたペプチド溶液をZipTip(商標)(Millipore社; 米国マサチューセッツ州)逆相カラムで脱塩濃縮し、マトリックス溶液で希釈し、ターゲットプレートに付着させ、PerSeptive Boyager(商標) MALDI質量分析計で解析した。得られたペプチド質量スペクトルを、Expasy検索アルゴリズム(スイスGeneBio社)をウェブサイト(www.expasy.com)経由で使用して、前記タンパク質の予想ペプチドフィンガープリントと比較した。

【0117】

ステップ5: タンパク質アッセイ(正規化)

精製融合タンパク質3~5 μ lをストック液から分取して全タンパク質含量を検定したが、検定には、タンパク質試料中に界面活性剤が存在するため、Bradford検定法ではなくBCA法を使用した。ビオチン化融合タンパク質の濃度は免疫検定法により次の要領で求めた: 精製融合タンパク質3~5 μ lをストック液から分取し、ストレプトアビジンをコートした黒色のマイクロタイタープレート(米国Beckton Dickson社)に入れてインキュベートした。ウェルを0.01% Tween 20添加50mM Tris-HCl緩衝液pH8.0で3回洗浄した。同じ緩衝液+1%(w/v) BSAでウェルを30分間ブロッキング処理し、次いで0.01% Tween 20添加50mM Tris-HCl緩衝液pH8.0で3回すすいだ。こうした固定化したビオチン化融合タンパク質を、ウサギで産生させ0.01% Tween 20+0.1%(w/v) BSA添加50mM Tris-HCl緩衝液pH8.0で希釈した抗N末端又は抗C末端ポリクローナル抗体とインキュベートした。ウェルを緩衝液で3回すすぎ、次いでAlexa 488 (Molecular Probes Inc.; 米国オレゴン州)で標識したマウス抗ウサギモノクローナル抗体でプローブし、シグナルをPerkinElmer Flight蛍光プレートリーダーで測定した。US 5723584、US5874239及びUS5932433に記載の発現系を使用して発現させた既知量のグルタチオンS-トランスフェラーゼによる標準曲線を使用して、ウェルあたり0.1~500 μ g-融合タンパク質の範囲内で校正を行った。

【0118】

ステップ6: タンパク質アレイの作製

a) ストレプトアビジンをコートした顕微鏡スライドの創出

ストレプトアビジンをコートした顕微鏡スライドをまず、多様な市販スライドリーダーにより、480nmの励起波長と520nmの放射波長を使用して画像化し、コーティングの均一性を評価した。

【0119】

b) 抗原アレイの作製

ストレプトアビジンをコートしたスライドを $\times 1$ リン酸緩衝生理食塩水pH7.3で再水和した。先端径100~150ミクロンのソリッドピン(Biorobotics社; 英国ケンブリッジ)を使用して手作業及びロボットシステムで濃度約1 μ g/ μ lの精製ビオチン化融合タンパク質をスライド表面にスポットした。スライドを湿度制御環境中、室温で30分間インキュベートした。次いでスライドを一般には0.01% (v/v) Tween 20添加 $\times 1$ PBS (pH7.3)で洗浄し、次いでスライドを1% (w/v) BSAと10分間インキュベートしてブロッキング処理した。スライドを0.01% (w/v) Tween 20添加 $\times 1$ PBS (pH7.3)ですすぎ、次いで選択一次抗体を0.01%(w/v)

10

20

30

40

50

) Tween 20 + 0.1% (w/v) BSA 添加 × 1 PBS (pH7.3) で、又は生物試料由来の免疫グロブリンを含む複合タンパク質混合物たとえば希釈血清試料で、1:400 希釈した。次いでスライドを 0.01% (w/v) Tween + 0.1% (w/v) BSA 添加 × 1 PBS (pH7.3) ですすぎ、適当な二次抗体 [たとえば血清中の免疫グロブリンを検出するための Alexa 488 (Molecular Probes 社) 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体] とインキュベートした。次いでスライドの Alexa 488 を 480/520nm の励起/放射波長で画像化した。数多くのそうした二次抗体には他にも多様な標識 (比色、代替蛍光、放射性同位体又は化学発光などの標識) を使用できることは当業者には自明である。得られた結果の一例を図 5 に示す。

【 0 1 2 0 】

c) 抗体アレイの作製

10

汎用抗体アクセプター層の創出

Streptococcus aureus 由来のプロテイン A、G 及び L を前述のように発現ベクター (pAN-4、pAN-5、pAN-6、pAC-4、pAC-5 及び pAC-6) 中にクローニングし、発現させ、精製して、やはり前述のように *in vivo* ビオチン化 C- 及び N- 末端融合タンパク質を共に得た。ストレプトアビジン・コート顕微鏡スライドをプロテイン A、G 及び L の融合タンパク質 (C- 末端、N- 末端両融合体) 混合物の × 1 PBS (pH7.3) 溶液 (濃度 1mg/ml) でコートした。スライドを湿度制御環境中、室温で 30 分間インキュベートした。スライドを 2mM アジ化ナトリウム添加 × 1 PBS (pH7.3) で洗浄した後、密閉容器に入れて (乾燥を防ぐため) 湿り空気中 4 で用時まで保存した。

【 0 1 2 1 】

20

抗体アレイの印刷

汎用抗体アクセプター層を使用して、多様な種類の抗体及びプロテイン A、G 又は L 結合部位を含むよう遺伝子組換えで産生したファージ分子を付着させるようにした。抗体調製品を 0.01% (w/v) Tween 添加 × 1 PBS (pH7.3) で濃度 0.2 ~ 10mg/ml に希釈する。この抗体溶液を汎用抗体アクセプター層へと、先端径 100 ~ 150 ミクロンのソリッドピン (Biorobotics 社; 英国ケンブリッジ) を使用して手作業及びロボットシステムで付着させた。次いでスライドを 0.01% (w/v) Tween 添加 × 1 PBS (pH7.3) に溶解した 1% BSA でブロックした。スライドを 0.01% (w/v) Tween と 2mM アジ化ナトリウムとを添加した × 1 PBS (pH7.3) ですすいだ後、密閉容器に入れて (乾燥を防ぐため) 湿り空気中 4 で用時まで保存した。

【 0 1 2 2 】

30

抗原アレイの場合と同様のスキヤニングにより、図 6 に示すような結果が得られた。

【 0 1 2 3 】

ステップ 7: 複合タンパク質混合物の蛍光色素による標識

一般に、タンパク質試料は生物試料に応じて多様な緩衝液及び界面活性剤中で可溶化して調製した。2D 電気泳動ゲルの第 1 次元向けタンパク質の調製に使用されるのと同じような非イオン系界面活性剤や 8M 尿素の使用を必要とするような攻撃的な可溶化手順が求められる試料も多かった。可溶化ではたとえば 7M 尿素 + 2M チオ尿素か又は 8M 尿素を添加した 4% CHAPS、50mM PBS (pH7.6) を含む溶液に試料を混ぜてホモジナイズする必要があった。第一級アミノ基たとえば TRIS 及びグリシンを含む緩衝液は結合反応を阻害するので、使用を避けた。低濃度 (<2%) の殺生剤たとえばアジ化物又はチメロサルなどの存在はタンパク質の標識付けに影響しなかった。可溶化タンパク質を 10,000 × g で遠心にかけて細胞残屑や非可溶化物質を除去し、ただちに混合物を標識した。

40

【 0 1 2 4 】

生物試料由来の複合タンパク質混合物を蛍光色素で標識してから前述の要領で抗体アレイとインキュベートした。当業者には自明であろうが、この方法には他の標識たとえば放射性標識、化学発光色素及び可視色素なども応用できる。さらに、他の蛍光色素もまた応用可能である。

【 0 1 2 5 】

好ましい実施態様では、英国 Amersham Pharmacia Biotech Ltd. の Cy3 及び Cy5 一官能基色素を使用する。複合タンパク質混合物の色素標識は結果が予測できないため、生物試料の

50

タイプごとに最適化しなければならなかった。特に色素分子がアミン基をもつ残基を介してタンパク質に結合すると、しばしばある種のタンパク質では抗原性が弱まり機能抗体による認識が無理になる。

【0126】

メーカー推奨の方法は1mgのタンパク質を色素/タンパク質(D/P)最終モル比1~4まで標識するよう工夫されている。その前提となる平均タンパク質分子量は155,000 Daである。本発明では、平均D/P比が2~3を超えると多くの研究対象タンパク質で抗原抗体反応が妨げられると判明した。D/P比はタンパク質濃度と緩衝液pH値を変更するだけで調節しうることも判明した。

【0127】

タンパク質濃度と反応pH値を変更すると、反応系の標識効率が著しく変化した。標識効率はpH 9で最大となり、pH値を7.6に下げるとD/P比は1~3に低下した。タンパク質濃度を高めると標識効率が高まったので、タンパク質濃度の調節もまた重要であると判明した。単一タンパク質種の10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 濃度以下の溶液ではD/P比は10~14であるので、よりふさわしい濃度は0.1~1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ であると判明した。代表的な方法は次のとおりであった：前述の要領で調製した複合タンパク質混合物を0.2% CHAPS添加×1 PBS緩衝液でいくつか濃度に希釈し、平均タンパク質種濃度が1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようにした(全タンパク質濃度は50~100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の範囲であった)。タンパク質溶液を室温で30分間、たえず穏やかにかき混ぜながらインキュベートした。標識タンパク質は抗体アレイとのインキュベーションの前に過剰な未結合色素から分離しなければならない。メーカーは未結合タンパク質からの分離にゲル透過法を推奨している。しかし、難溶性の膜結合タンパク質が存在するため、このステップは単に過剰量のグリシンを溶液に加えて反応を停止させるという方法で代用した。標識タンパク質溶液をさらに15分間インキュベートして残留遊離色素を確実に除去するようにした。標識タンパク質はさらなる操作を加えずに2~8 で保存した。遊離色素の除去には、SM-2ビーズ(Bio-Rad社；米国カリフォルニア州)と一晚インキュベートするというUnlu et al. (1997)の方法も用いた。

【0128】

最終色素/タンパク質(D/P)比は次のようにして推定した：標識タンパク質溶液の一部を希釈して最大吸光度が0.5~1.5AUとなるようにした。色素とタンパク質のモル濃度を計算した。吸光係数はタンパク質の種類ごとに異なるが、複合混合物に用いる妥当な平均値である。各タンパク質に対する平均結合色素分子数の比は次のようにして計算した：

Cy5/タンパク質比はCy5、タンパク質混合物それぞれの650nm、280nmでのモル吸光係数を250,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、170,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として計算した。計算では、メーカーの製品データシートに従ってCy5色素の280nmでの吸光度(650nmでの吸光度の約5%)について補正を行った。[Cy5色素]=[A650]/250000、[タンパク質]=[A280-(0.05 x A650)]/170000、最終(D/P)=[色素]/[タンパク質]、最終(D/P)=[0.68 x (A650)]/[A280-(0.05 x A650)]。

【0129】

Cy3/タンパク質比はCy3、タンパク質混合物それぞれの552nm、280nmでのモル吸光係数を150,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、170,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として計算した。計算では、メーカーの製品データシートに従ってCy5色素の280nmでの吸光度(552nmでの吸光度の約8%)について補正を行った。[Cy3色素]=[A552]/150000、[抗体]=[A280-(0.08 x A552)]/170000、最終(D/P)=[色素]/[抗体]、最終(D/P)=[1.13 x (A552)]/[A280-(0.08 x A552)]。

【0130】

ステップ8：抗体アレイの使用によるタンパク質発現の判定

Cy3標識タンパク質とCy5標識タンパク質を、前記のようにして求めた色素/タンパク質比を基にして等モル量混合した。この混合物100 μl を、あらかじめ数スライド容量の0.01% Tween添加×1 PBS (pH7.6)ですすいでおいた抗体アレイとインキュベートした。標識タンパク質混合物を英国特許出願GB0028647.6明細書(未公開)に従った自動スライドプロセッサにより30 で1時間インキュベートした。次いでスライドを10スライド容量の0.01% Tween添加×1 PBS (pH7.6)ですすいだ。スライドを遠心で乾燥させ、ただちに市販スライ

10

20

30

40

50

ドイメージャーによりメーカーの操作手順に従って画像化した。Cy3及びCys5標識タンパク質の比を解析し、多数のマーカータンパク質たとえばアクチン及びGAPDHで正規化した。この正規化方式はほぼ同じ要領で調製した組織試料又は他生物試料には好適であるが、異なる組織タイプと他生物試料の間での適用には注意を要する。というのは、全細胞中の各タンパク質含量は組織により大きく異なるからである。

【0131】

タンパク質アレイはその可能性が長年検討されてきたし、また大いに必要とされるツールであることも明らかである。タンパク質の発現、精製、検定、そして特に非多孔質固体表面への付着といった課題はいずれも解決が困難な課題となっている。本発明はUS5723584、US5874239及びUS5932433の各特許明細書で開示されているベクター技術の新規活用により、研究者がこれらの技法を上首尾に適用することを可能にするような抗体アレイ、抗原アレイを共に提供する。

10

【0132】

以上言及した諸々の参考文献は参照指示により本明細書に組み込まれる。当業者には自明であろうが、本発明はその範囲と精神から逸脱することなく他の変更態様が可能である。明細書では本発明を好ましい個別実施態様との関連で説明したが、当然ながら請求の範囲に記載の本発明はそうした個別実施態様に不当に限定されるものではない。実際、以下の請求項の範囲には、当業者には自明である本発明の多様な変更態様が包含されるものとする。

【図面の簡単な説明】

20

【0133】

【図1】抗原であるか又は抗体結合性タンパク質たとえばプロテインA、G又はLであるタンパク質の、本発明の方法に使用できるような形での発現の図解である。

【図2】本発明の実施態様に基づく、抗タグ抗体の使用による細胞残屑からの融合タンパク質の単離を図解している。

【図3】本発明の実施態様に基づく、ストレプトアビジンをコートした基板表面への発現融合タンパク質の付着を図解している。

【図4】本発明の実施態様に基づく、Alexa 488など蛍光マーカーで標識した二次抗体を使用する古典的サンドイッチELISA法による結合抗原の検出を図解している。

【図5】融合ペプチドをGSTと融合して含む融合タンパク質をいくつかの濃度で、ストレプトアビジンをコートした顕微鏡スライド上に配列するという一連の実験の結果であり、実験に使用した最低濃度は500pg/スポットに相当する。図のパネル(a)は485nmの励起波長と520nmの放射波長を使用する市販スキャナーで生成した画像である。この例では本文記載のとおり二次抗体をAlexa 488で標識している。パネル(b)は(a)の反転画像であり、見やすくしている。パネル(c)は濃度500pg/スポットの融合タンパク質アレイ基板の拡大図である。これらのスポットのS/N比は、検出限界(S/N比3:1)が10~50 pg-タンパク質/スポットとなることを示している。

30

【図6】パネル(a)は、C及びN末端融合タンパク質として発現したプロテインA、G及びL(18)の溶液を、ストレプトアビジンをコートしたスライド(12)とインキュベートする方法の図解である。(a) C及びN末端融合タンパク質として発現したプロテインA、G及びL(18)の溶液を、ストレプトアビジンをコートしたスライド(12)とインキュベートした。抗体(19)はソリッドピン装置などを使用して配列すれば、きわめて離散的なスポットとしてスライドに付着させることができる。抗体は二価のタンパク質結合性タンパク質(プロテインA、G又はL)に高密度で結合する。これはAlexa 488で標識したヤギ抗マウス抗体の結合により例証されたし、また画像はスライドを放射波長485nm、励起波長520nmでスキャンした得た[挿入パネル(b)]。

40

【図7】Avidity Inc.から入手可能なpAN-4 DNAベクターの構造であり、S-Dボックス(ASGGA)は太字で、開始メチオニンコドンは斜体+下線で、SEQ ID NO.2ペプチドをコードする配列は下線で、アンピシリン耐性遺伝子blaは太字で、またlacI^qは太字+下線で、それぞれ示す。

50

【図8】Avidity Inc.から入手可能なpAN-5 DNAベクターの構造であり、注釈は図7の場合とほぼ同じである。

【図9】Avidity Inc.から入手可能なpAN-6 DNAベクターの構造であり、注釈は図7の場合とほぼ同じである。

【図10】Avidity Inc.から入手可能なpAC-4 DNAベクターの構造であり、注釈は図7の場合とほぼ同じである。

【図11】Avidity Inc.から入手可能なpAC-5 DNAベクターの構造であり、注釈は図7の場合とほぼ同じである。

【図12】Avidity Inc.から入手可能なpAC-6 DNAベクターの構造であり、注釈は図7の場合とほぼ同じである。

【図13】抗原であるか又は抗体結合性タンパク質たとえばプロテインA、G又はLであるタンパク質の、本発明の方法に使用できるような形での発現の図解であり、第2ペプチド配列タグの2つの代替位置を示している。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/081683 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/10, 15/62, G01N 33/533, C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/GB02/01623
- (22) International Filing Date: 4 April 2002 (04.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0108521.6 5 April 2001 (05.04.2001) GB
0131025.9 28 December 2001 (28.12.2001) GB
0203448.6 14 February 2002 (14.02.2002) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): NEXTGEN SCIENCES LTD. [(GB/GB); Biggles House (Building 56), Alconbury N. Airfield, Alconbury, Huntingdon, Cambridgeshire PE28 4DA (GB).
- (72) Inventor: and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): AUTON, Kevin, Andrew [(GB/GB); 42 Croftfield Road, Godmanchester, Cambridgeshire PE12 2JD (GB).
- (74) Agents: GREAVES, Carol, Pauline et al.; Greaves Brewster, 24A Woodborough Road, Winscombe, North Somerset BS25 1AD (GB).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PROTEIN ANALYSIS

WO 02/081683 A2

(57) Abstract: A method of forming an array of proteins selected from antigens or antibodies, said method comprising the steps of (i) expressing in a recombinant cell, a fusion protein which comprises either (a) an antigen or (b) an antibody binding protein, fused to a peptide having up to 50 amino acids, which peptide comprises amino acid sequence of SEQ ID NO 1 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO 1) where X_1 is a naturally occurring amino acid, X_2 is any naturally occurring amino acid other than leucine, valine, isoleucine, tryptophan, phenylalanine or tyrosine, X_3 is phenylalanine or leucine, X_4 is glutamine or asparagine, X_5 is alanine, glycine, serine or threonine, X_6 is glycine or methionine, X_7 is isoleucine, methionine or valine, X_8 is glutamine, leucine, valine, tyrosine or isoleucine, X_9 is tryptophan, tyrosine, valine, phenylalanine, leucine or isoleucine and X_{10} is any naturally occurring amino acid other than asparagine or glutamine, where said peptide is capable of being biotinylated by a biotin ligase at the lysine residue adjacent to X_6 ; (ii) biotinylating said peptide of the fusion protein at the lysine residue adjacent X_6 ; (iii) isolating the biotinylated fusion protein; (iv) applying the biotinylated fusion protein to an avidin or streptavidin coated non-porous support; (v) forming an array of at least three different proteins on the support by either (a) where the fusion protein comprises an antigen, carrying out steps (i) to (iv) the desired number of times to form an antigen array; or (b) where the fusion protein comprises an antibody binding protein, applying to said protein, either prior to or after step (iv) a plurality of different antibodies or binding fragments thereof.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

1

Protein Analysis**Field of the Invention**

The present invention relates to a method of producing arrays for conducting protein analysis, in particular of antibodies, antigens or antibody binding proteins, to protein arrays produced, methods of conducting analysis using them and novel entities incorporated in them. More specifically, the process relates to a method of producing a range of antibodies and/or antigens and immobilising these in an array, for use in protein or binding analysis.

10

Background

The concept of attaching a number of different proteins to surface supports to form an "array" of proteins has been widely described in the literature (see for example EP0063810, WO84/03151, US5143854).

15

Recently, there has been a growing interest in the concept of manufacturing devices whereby large numbers of proteins of various classes are arrayed onto different types of solid supports. Examples include antigen, antibody, protein (protein-protein interaction) and functional enzymes arrays.

20

The background to the technology, and the potential uses for such devices, are thoroughly catalogued in the literature (Joos *et al* Electrophoresis 2000, 21, 2641-2650, Haab *et al* Genome Biology 2000 1(6), Borrebaeck Immunology Today, August 2000) and examples of potential utility can be found in a number of recent patent applications including WO 00/07024, WO 99/40434, WO 99/39210 and WO00/54046.

25

The concept of creating antigen arrays was described in EP 0063810 in 1982. It was reported that antigens and antibodies could be bound to a porous solid support enabling an unlimited number of antibody-antigen interactions to be conducted simultaneously.

30

To make antigen arrays, antigens were simply aliquoted in very small volumes onto nitrocellulose membranes or similar supports, allowed to adsorb and then probed with the corresponding antibodies. As with Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) protocols performed in solution or in plastic plates, non-specific interactions were

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

2

blocked with Bovine Serum Albumin (BSA), and this is now standard practise. It was also reported that the elements (or spots) of the array did not diffuse and were adsorbed tightly onto the membrane.

- 5 It should be noted, however, that the dimensions for these elements were considerably larger than those obtained in micro array device systems. EP 0063810 describes how the protein arrays could be made by aliquoting proteins by hand, using mechanical procedures including a "charged drop" or lithographic process. In this manner elements with a diameter of less than 500 microns (compared with 100 microns that can be
10 achieved with current automated array systems) were produced.

However, one of the main disadvantages associated with the use of membranes as opposed to non-porous surfaces is that the elements tend to diffuse through the support material unless there is immediate binding.

- 15 Attempts were made to overcome this problem. USP4496654 describes use of porous surfaces such as paper disks which were treated with streptavidin (which is adsorbed onto the surface) enabling arrays of biotinylated antibodies to be arranged in any desired pattern. Following blocking with BSA, the paper discs could be probed with the antigen
20 (exemplified with human chorionic gonadotropin) which could then be detected with an enzyme assay. The biotinylated antibody immediately bound very tightly to the surface of the paper reducing diffusion of the spots.

- To achieve this using an "acceptor" surface such as an avidin or streptavidin coated
25 surface, requires that each antibody and antigen, which is attached to the array, must be biotinylated prior to attachment to the array with no guarantee that this process will not impair its avidity (or antigenicity if an antigen is used) compared with the native protein.

- Non-porous surfaces also have the disadvantage that they are not as robust as solid
30 surfaces, including various types of glass or plastics, and so cannot be washed or treated as stringently.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

3

For antigen and antibody arrays, it has been found however that attaching a protein to a solid surface generally leads to a reduction in antigenicity of the antigen and avidity of the antibody compared with that observed when the antigen or antibody is in free solution.

5

Previous attempts (see WO84/03151 and Haab *et al* 2000 supra.) to immobilise antigens and antibodies were not greatly successful. WO84/03151 describes that antibodies can be applied directly onto glass surfaces such as a microscope cover slip and dried. When blocked and then exposed to antigens, in this case in the form of whole cells, the antigens were captured by the array. However, WO84/03151 further describes that these antigens needed to be added at a higher concentration compared with the equivalent ELISA performed in solution. It was also noted that the antibodies had to be "highly enriched in order to achieve a sufficiently dense antibody coat for the desired cell adherence". It also took considerable time for the antibodies to be adsorbed onto the glass surface.

10
15

Other approaches for the direct immobilisation of antigens and antibodies have been reported. One approach was to first adsorb calcium phosphate in the form of hydroxyapatite onto filter papers onto which proteins were bound by ionic interaction as described in US5827669. These inventors reported that this was not effective for acidic proteins and that the antibodies suffered from "bad orientation" onto the Ca / phosphate layer. Success was, however, reported when this method was used in immobilising streptavidin.

20

Another method for immobilising proteins to solid, non-porous surfaces included attaching them using an adhesive polyphenolic protein isolated from muscles as described in US5817470. By coating solid surfaces, such as a polystyrene multi-well plate with polyphenolic protein, various antigens could be bound to the treated support and detected in an ELISA sandwich comprising of a primary antibody followed by a secondary antibody conjugated to an enzyme.

25
30

However, the inventors conceded that the procedure was limited by the amount of antigen bound or adsorbed to the solid surface. The final amount of antigen strongly

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

4

bound to the surface of the plate varied depending on a number of factors such as the molecular characteristics of the antigens, the properties of the solid support, the concentration of the antigen in the solution as well as the characteristics of the buffer used to dissolve the antigen used to coat or to activate the surface. In general, only a
5 small fraction of the antigen present in the coating solution was adsorbed to the surface.

Direct attachment of antibodies and antigens to non-porous surfaces was also been attempted with a collection of 113 antibodies and their corresponding antigens (Haab *et al*, 2000 Genome Biology 1(6)). By exploiting technology developed for DNA
10 microarrays, glass slides coated with poly-s-lysine were used to immobilise both antigens in one experiment and antibodies in another. The results reported showed that only 50% of the arrayed antigens and 20% of the arrayed antibodies, provided specific and accurate measurements of their cognate ligands at or below concentrations of
1.6µl/ml and 0.34µg/ml respectively.

15

The high failure rate in binding antibodies to solid surfaces would not be acceptable for a large-scale antibody array manufacturing programme. This supports the view that direct attachment of antigens and antibodies is an unsuitable technique to retain antibody/antigen functionality if protein arrays are to fulfil their potential.

20

The use of coatings such as avidin and streptavidin as binders for biotin labelled proteins is well known for use in conjunction with many proteins. The proteins are generally isolated first, and then biotinylated. Biotin can be conjugated to the protein at any or all active lysine sites contained within it.

25

Thus, when antigens or antibodies are biotinylated in this way, biotin groups may be present at their N-terminal groups and at any number of potential active lysine residues over their surface. This means that they will adopt any number of different orientations once bound to the streptavidin layer and so the binding properties will be diverse.

30

Furthermore, access to the antigen or antibody immobilised via streptavidin will be reduced by steric hindrance, leading to generally inadequate assay.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

5

It has been found that it is possible to reduce the steric hindrance and increase the sensitivity of the immunoassay by including a linker between the antigen/antibody and the biotinylated site.

5 US5811246 describes how small synthetic peptides used in either immunoassays or for raising antisera can be linked to a "carrier" protein such as avidin or streptavidin via a linker such as various bradykinin derivatives. This has several advantages. Firstly, the condensation reaction between the free *N*-terminal group on the peptide and the linker preserves the charged residues essential for recognition by an antibody (immunoassay) or to elicit an immune response (immunisation). Secondly, the bradykinin linker can
10 then be biotinylated in such a way as to preserve the free charged groups on the small peptide. In each case, the presence of the linker appears to promote a more sensitive immunoassay and an improved immune response when used as an immunising agent.

15 This use of a bradykinin derivative in this way however introduces further steps and complications into the process.

Biotinylated peptides fused to peptides or proteins of interest are described in US Patent Nos. 5,723,584, 5,874,239 and 5,932,433, and further in Beckett et al. Protein Sci.
20 (1999) 8(4) 921-9. These peptides are used in order to biotinylate recombinant proteins, so as to allow rapid purification, immobilization, labelling and detection thereof. It is not suggested that these peptides should be used in particular with antigens or antibody binding proteins, or that they should be formulated in arrays.

25 The present applicants have found that the peptides used in these patents allow the production of very good antigen or antibody arrays, which can be efficiently produced on non-porous supports whilst substantially retaining the binding avidity of these proteins.

30 **Summary of the Invention**

According to a first aspect of the present invention there is provided a method of forming an array of proteins selected from antigens or antibodies; said method comprising the steps of

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

6

(i) expressing in a recombinant cell, a fusion protein which comprises either (a) an antigen or (b) an antibody binding protein, fused to a peptide having up to 50 amino acids, which peptide comprised amino acid sequence of SEQ ID NO 1

5 LX₁X₂IX₃X₄X₅X₆KX₇X₈X₉X₁₀ (SEQ ID NO 1)

where X₁ is a naturally occurring amino acid, X₂ is any naturally occurring amino acid other than leucine, valine, isoleucine, tryptophan, phenylalanine or tyrosine, X₃ is phenylalanine or leucine, X₄ is glutamine or asparagine, X₅ is alanine, glycine, serine or threonine, X₆ is glycine or methionine, X₇ is isoleucine, methionine or valine, X₈ is glutamine, leucine, valine, tyrosine or isoleucine, X₉ is tryptophan, tyrosine, valine, phenylalanine, leucine or isoleucine and X₁₀ is any naturally occurring amino acid other than asparagine or glutamine; where said peptide is capable of being biotinylated by a biotin ligase at the lysine residue adjacent to X₆.

- 15 (ii) biotinylating said peptide of the fusion protein at the lysine residue adjacent X₆;
(iii) isolating the biotinylated fusion protein;
(iv) applying the biotinylated fusion protein to an avidin or streptavidin coated non-porous support;
(v) forming an array of at least three different proteins on the support by either
- 20 (a) where the fusion protein comprises an antigen, carrying out steps (i) to (iv) the desired number of times to form an antigen array; or
(b) where the fusion protein comprises an antibody binding protein, applying to said protein, either prior to or after step (iv) a plurality of different antibodies or binding fragments thereof.

25

The applicants have found that by using a fusion of the antigen or antibody binding protein to a peptide of SEQ ID NO 1, these proteins may be immobilised onto solid surfaces, whilst substantially maintaining the antigenicity of proteins, or the binding capabilities of the antibody binding proteins.

30

This may be because the fusion peptide is biotinylated rather than the protein itself, and so there is less disruption of the protein's antigenicity when attached to the support surface. In addition, the peptide including SEQ ID NO 1 appears to reduce steric

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

7

hindrance to enable interaction between antigen and antibody. By ensuring that the peptide linker is attached at a terminal region of the protein, and contains the biotinylation site, sites on the protein which are essential for function appear to be largely unaffected. This combination is particularly advantageous in the context of methods of analysis using antigens or antibody arrays.

The method described herein represents the first time that the mode of attachment of proteins to non-porous surfaces (step vi), the mode of protein isolation from cell lysate (step iii) and the method of biotinylation (step ii) utilise the same fusion peptide.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art.

As used herein the expression "antibody binding protein" refers to proteins which are known to bind to regions of antibodies, or to mixtures of these. Examples of such proteins include Protein A, Protein L and Protein G

Antibody binding proteins are used in accordance with the invention in the production of antibody arrays. The antibodies are bound by antibody binding proteins, such as Proteins A, G and/or L or a mixture of one or more of these, which are themselves anchored via the linker to the streptavidin coating on the support surface. While biotinylated versions of native Protein A, G and L are commercially available and can be attached to the streptavidin coating on the support surface, the applicants have found that by fusing these proteins to biotinylated tags in accordance with the present invention at the C and/or N-terminals, highly effective binding of antibodies of various types was achieved. This may also be the result of reduced steric factors, or that the binding sites on the proteins are all readily available.

In addition, by using the method of the invention, the biotinylated fusion protein is immediately captured on application to the avidin or streptavidin coated support in step (iv) leading to very discrete spots of protein on the support, with minimal observable diffusion.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

8

Particular examples of peptides having up to 50 amino acids, which peptide comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO 1 are listed in US Patent Nos 5,723,584, US Patent No 5,874,239 and US Patent No. 5,932,433, the content of which are incorporated herein by reference. Examples of peptides provided in these references are listed below:

5

Leu Glu Glu Val Asp Ser Thr Ser Ser Ala Ile Phe Asp Ala Met Lys Met Val Trp Ile Ser Pro Thr Glu Phe Arg (SEQ ID NO:14);

10 Gln Gly Asp Arg Asp Glu Thr Leu Pro Met Ile Leu Arg Ala Met Lys Met Glu Val Tyr Asn Pro Gly Gly His Glu Lys (SEQ ID NO:15);

Ser Lys Cys Ser Tyr Ser His Asp Leu Lys Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Leu Val His Ser Tyr Leu Arg Val Met Tyr Asn Tyr (SEQ ID NO:16);

15 Met Ala Ser Ser Asp Asp Gly Leu Leu Thr Ile Phe Asp Ala Thr Lys Met Met Phe Ile Arg Thr (SEQ ID NO:17);

Ser Tyr Met Asp Arg Thr Asp Val Pro Thr Ile Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Leu His Thr Thr Pro Trp Ala Cys Arg (SEQ ID NO:18);

20

Ser Phe Pro Pro Ser Leu Pro Asp Lys Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Val Ile Thr (SEQ ID NO:19);

25 Ser Val Val Pro Glu Pro Gly Trp Asp Gly Pro Phe Glu Ser Met Lys Met Val Tyr His Ser Gly Ala Gln Ser Gly Gln (SEQ ID NO:20);

Val Arg His Leu Pro Pro Pro Leu Pro Ala Leu Phe Asp Ala Met Lys Met Glu Phe Val Thr Ser Val Gln Phe (SEQ ID NO:21);

30 Asp Met Thr Met Pro Thr Gly Met Thr Lys Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Val Ser Thr (SEQ ID NO:22);

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

9

Ala Thr Ala Gly Pro Leu His Glu Pro Asp Ile Phe Leu Ala Met Lys Met Glu Val Val
Asp Val Thr Asn Lys Ala Gly Gln (SEQ ID NO:23);

Ser Met Trp Glu Thr Leu Asn Ala Gln Lys Thr Val Leu Leu (SEQ ID NO:24);

5 Ser His Pro Ser Gln Leu Met Thr Asn Asp Ile Phe Glu Gly Met Lys Met Leu Tyr His
(SEQ ID NO:25);

Thr Ser Glu Leu Ser Lys Leu Asp Ala Thr Ile Phe Ala Ala Met Lys Met Gln Trp Trp
Asn Pro Gly (SEQ ID NO:27);

10

Val Met Glu Thr Gly Leu Asp Leu Arg Pro Ile Leu Thr Gly Met Lys Met Asp Trp Ile
Pro Lys (SEQ ID NO:28);

Leu His His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Met Val Trp Asn His Arg (SEQ ID NO:30);

15

Pro Gln Gly Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Leu Trp Arg Ser (SEQ ID NO:31);

Leu Ala Gly Thr Phe Glu Ala Leu Lys Met Ala Trp His Glu His (SEQ ID NO:32);

20

Leu Asn Ala Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Gly (SEQ ID NO:33);

Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Leu Arg Asp (SEQ ID NO:34);

Leu Leu Arg Thr Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Asn Gly (SEQ ID NO:35);

25

Leu Ser Thr Ile Met Glu Gly Met Lys Met Tyr Ile Gln Arg Ser (SEQ ID NO:36);

Leu Ser Asp Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Cys (SEQ ID NO:37);

30

Leu Glu Ser Met Leu Glu Ala Met Lys Met Gln Trp Asn Pro Gln (SEQ ID NO:38);

Leu Ser Asp Ile Phe Asp Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Gln (SEQ ID NO:39);

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

10

- Leu Ala Pro Phe Phe Glu Ser Met Lys Met Val Trp Arg Glu His (SEQ ID NO:40);
- Leu Lys Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Thr Ala Met (SEQ ID NO:41);
- 5 Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Asn Ser (SEQ ID NO:42);
- Leu Leu Gln Thr Phe Asp Ala Met Lys Met Glu Trp Leu Pro Lys (SEQ ID NO:43);
- Val Phe Asp Ile Leu Glu Ala Gln Lys Val Val Thr Leu Arg Phe (SEQ ID NO:44);
- 10 Leu Val Ser Met Phe Asp Gly Met Lys Met Glu Trp Lys Thr Leu (SEQ ID NO:45);
- Leu Glu Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Leu Glu (SEQ ID NO:46);
- 15 Leu Lys Glu Ile Phe Glu Gly Met Lys Met Glu Phe Val Lys Pro (SEQ ID NO:47);
- Leu Gly Gly Ile Glu Ala Gln Lys Met Leu Leu Tyr Arg Gly Asn (SEQ ID NO:48);
- Arg Pro Val Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Val Trp Lys Pro (SEQ ID NO:50);
- 20 NO:50);
- Arg Ser Pro Ile Ala Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Arg Glu Thr (SEQ ID NO:51);
- 25 Gln Asp Ser Ile Met Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ser Trp His Val Asn (SEQ ID NO:52);
- Asp Gly Val Leu Phe Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Arg Leu Glu Thr (SEQ ID NO:53);
- 30 Val Ser Arg Thr Met Thr Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Tyr His Asp Leu (SEQ ID NO:54);

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

11

- Asp Val Leu Leu Pro Thr Val Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Ile Thr Lys (SEQ ID NO:55);
- 5 Pro Asn Asp Leu Glu Arg Ile Phe Asp Ala Met Lys Ile Val Thr Val His Ser (SEQ ID NO:56);
- Thr Arg Ala Leu Leu Glu Ile Phe Asp Ala Gln Lys Met Leu Tyr Gln His Leu (SEQ ID NO:57);
- 10 Arg Asp Val His Val Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Thr Val Glu Thr (SEQ ID NO:58);
- Gly AspLys Leu Thr Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Ile Gln Trp Thr Ser Gly (SEQ ID NO:59);
- 15 Leu Glu Gly Leu Arg Ala Val Phe Glu Ser Met Lys Met Glu Leu Ala Asp Glu (SEQ ID NO:60);
- Val Ala Asp Ser His Asp Thr Phe Ala Ala Met Lys Met Val Trp Leu Asp Thr (SEQ ID NO:61);
- 20 Gly Leu Pro Leu Gln Asp Ile Leu Glu Ser Met Lys Ile Val Met Thr Ser Gly (SEQ ID NO:62);
- 25 Arg Val Pro Leu Glu Ala Ile Phe Glu Gly Ala Lys Met Ile Trp Val Pro Asn Asn (SEQ ID NO:63);
- Pro Met Ile Ser His Lys Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Lys Phe Val Pro Glu (SEQ ID NO:64);
- 30 Lys Leu Gly Leu Pro Ala Met Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp His Pro Ser (SEQ ID NO:65);

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

12

Gln Pro Ser Leu Leu Ser Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Gln Ala Ser Leu Met (SEQ ID NO:66);

5 Leu Leu Glu Leu Arg Ser Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp Gln Ile Ser (SEQ ID NO:67);

Asp Glu Glu Leu Asn Gln Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Pro Leu Val His Val Thr Lys (SEQ ID NO:68);

10 Ser Asn Leu Val Ser Leu Leu His Ser Gln Lys Ile Leu Trp Thr Asp Pro Gln Ser Phe Gly (SEQ ID NO:70);

Leu Phe Leu His Asp Phe Leu Asn Ala Gln Lys Val Glu Leu Tyr Pro Val Thr Ser Ser Gly (SEQ ID NO:71);

15 Ser Asp Ile Asn Ala Leu Leu Ser Thr Gln Lys Ile Tyr Trp Ala His (SEQ ID NO:72);

Met Ala Ser Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ser Gln Lys Met Glu Trp Arg Ser Asn Ala Gly Gly Ser (SEQ ID NO:73);

20 Met Ala His Ser Leu Val Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Asp Pro Phe Gly Gly Ser (SEQ ID NO:75);

25 Met Gly Pro Asp Leu Val Asn Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Pro Leu Thr Gly Gly Ser (SEQ ID NO:76);

Met Ala Phe Ser Leu Arg Ser Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Leu Arg Asn Thr Pro Gly Gly Ser (SEQ ID NO:77);

30 Met Ala Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp Thr Gly Gly Ser (SEQ ID NO:78);

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

13

Met Ser Ser Tyr Leu Ala Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Ser Ala Tyr Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:79);

5 Met Ala Lys Ala Leu Gln Lys Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp Arg Ser His Pro
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:80);

Met Ala Phe Gln Leu Cys Lys Ile Phe Tyr Ala Gln Lys Met Glu Trp His Gly Val Gly
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:81);

10 Met Ala Gly Ser Leu Ser Thr Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Val Gly Lys Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:82);

Met Ala Gln Gln Leu Pro Asp Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Ile Ala Gly Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:83);

15 Met Ala Gln Arg Leu Phe His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Gly Pro Lys Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:84);

20 Met Ala Gly Cys Leu Gly Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp Arg His Phe Val
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:85);

Met Ala Trp Ser Leu Lys Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Ser Pro Gly Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:86);

25 Met Ala Leu Gly Leu Thr Arg Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Arg Asp Ser
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:87);

Met Ala Gly Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Arg Pro Leu
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:88), and;

30 Met Ala Asp Arg Leu Ala Tyr Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp His Pro His Lys
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:89).

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

14

These peptides, or fragments thereof which include SEQ ID NO 1 are suitable examples of peptides for use in producing fusion proteins in step (i).

In particular, the peptides used in the method of the invention to form the fusion protein have from 13 to 20 amino acids, and preferably about 15 amino acids.

A particularly preferred peptide for use in the fusion protein of the invention is a 15 amino acid peptide fragment of SEQ ID NO 78 shown above. Specifically, a preferred peptide is of amino acid sequence SEQ ID NO 2:

10

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu (SEQ ID NO 2).

This peptide is known as AviTag™ and DNA vectors encoding this sequence are available from Avidity Inc., sold under the trade names pAN-4, pAN-5 and pAN-6 (which are suitable for producing fusion proteins in which the peptide of SEQ ID NO 2 is attached at the N terminus of the protein) and pAC-4, pAC-5 and pAC-6 (which are suitable for producing fusion proteins in which the peptide of SEQ ID NO 2 is attached at the C terminus of the protein). The sequence of these vectors are shown hereinafter as SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 and SEQ ID NO 8 in Figures 7-12 respectively. These vectors further include the ampicillin resistance gene *bla* to assist in cloning. However the AviTag™ sequence can also be transferred into other vector systems.

Biotinylation can be effected in various ways, either *in vivo* or *in vitro*, for example by by co-expressing biotin ligase in the expression host, by adding biotin ligase to the cell lysate or by adding the biotin ligase to the purified protein. In a particularly preferred embodiment, the method utilises the ability to enzymatically biotinylate a lysine residue in the fusion peptide *in vivo* prior to protein isolation from the cell lysate, by co-expressing biotin ligase in the expression host. Usually when *in vitro* techniques are used, the expressed protein must first be isolated from the cell lysate and then chemically biotinylated *in vitro* by means well known in the art. This results in loss of material and random biotinylation. Proteins with multiple biotinylated sites have an unpredictable orientation and degree of binding onto the capture surface. The advantage

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

15

of the method of the invention is that all expressed proteins will be uniformly attached via the same residue on the same linker to the array

Thus, suitably, the recombinant cell used in step (i) of the invention is engineered such that it also expresses a biotinylating enzyme and also contains biotin, such that step (ii) is effected *in vivo* in said cell as illustrated diagrammatically hereinafter in Figure 1. DNA (1), which is suitably a cloned gene encoding an antigen or an antibody binding protein is sub-cloned into a vector (2) (such as pAN-4, pAN-5, pAN-6 or pAC-4, pAC-5 or pAC-6) which includes a sequence (3) encoding a peptide of SEQ ID NO. 1. The subcloned gene is then expressed in an expression system such as *E. coli*, which has been transformed with the vector as a fusion protein (4) comprising the antigen or antibody binding protein (5) fused to a peptide (6) of SEQ ID NO. 1. When expressed *in-vivo* in the presence of constitutively expressed biotin ligase, the lysine residue on the fusion peptide (6) is enzymatically biotinylated.

15

If the cell does not produce biotin, then it may be added to the culture medium in order to produce the desired result. This reduces the number of steps involved in the process.

A particularly suitable host cell for use in the method of the invention are the AVB100, AVB 101 and AVB99 *E. coli* strains available from Avidity Inc., Denver, Colorado, USA. These strains all have the *birA* gene stably integrated into the chromosome so that they express biotin ligase. In the case of AVB 100, overexpression of of BirA protein may be achieved by induction with L-arabinose. The AVB101 *E. coli* B strain contains the pACYC184 ColE1 compatible plasmid that over-expresses biotin ligase, the elevated levels of Biotin Ligase in the cells result in complete biotinylation of fusion proteins *in vivo*. An alternative host cell is strain AVB99 (Avidity Inc) which is an *E. coli* strain (XL1-Blue) containing a pACYC184 plasmid with an IPTG-inducible *birA* gene to overexpress biotin ligase (pBirAcm).

Fusion proteins produced in step (i) may also be isolated and biotinylated *in vitro* in the usual way. The structure of the peptide of SEQ ID NO 1 is such that biotinylation will occur reliably at lysine adjacent X₆ within SEQ ID NO 1.

30

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

16

In a preferred embodiment of the invention, the peptide comprising the amino acid of SEQ ID NO 1 is also used as a means of isolating the fusion protein in step (iii) of the method. The technology for protein expression using recombinant DNA technology is well known in the art. However, each protein that is expressed has a different amino acid sequence and many sequences are either difficult to express in the host of choice or their sequence is hydrophobic, and therefore insoluble, or is toxic to the host. Even in the simplest bacterial expression systems, inclusion bodies are often formed that are difficult to disrupt while leaving the target protein in its native active state.

10 It is now common practise to fuse the target protein with another protein/ peptide sequence (tag) to aid the purification process subsequent to expression. Examples of such fusion expression systems are now widely used and have been commercialised by several suppliers. Such fusion peptide sequences are attached to the amino or carboxyl terminal end of a protein sequence and are recognised by specific antibodies or affinity
15 resins.

The expressed proteins must be solubilised from the cellular debris sometimes requiring harsh conditions including unphysiological pH values or use of chaotropic reagents and therefore the affinity purification process must be robust enough to function under such
20 conditions.

By using this sequence as a means of isolating or purifying the expressed fusion protein, the need for additional purification tags is eliminated. Thus this sequence has a dual
25 purpose.

In some cases it may be desirable to use a further peptide sequence tag as a means of isolating or purifying the expressed fusion protein. The sequence is preferably between 1 and 30 amino acids in length.

30 The peptide sequence tag sequence (20) may be located at the N-terminal or C-terminal region of the antigen or antibody binding protein as shown in Figure 13. It is, however, preferably located at the opposite end of the antigen or antibody binding protein to which SEQ ID NO 1 is fused. Where the additional peptide sequence tag is located on

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

17

the same terminal region as SEQ ID NO 1, it is preferably fused to the free end of SEQ ID NO 1.

Many peptide sequence tags are known in the art. Examples of suitable peptide
5 sequence tags for the purposes of the present invention are described in US 4 569 794A, and EP0 282 042B, the contents of which are herein incorporated by reference.

Preferably, the peptide sequence tag comprises at least one histidine amino acid. Even
10 more preferably the peptide sequence tag has the formula His-X in which X is selected from the group consisting of -Gly-, -His-, -Tyr-, -Gly-, -Trp-, -Val-, -Leu-, -Ser-, -Lys-, -Phe-, -Met-, -Ala-, -Glu-, -Ile-, -Thr-, -Asp-, -Asn-, -Gln-, -Arg-, -Cys- and -Pro-.

Alternatively the peptide sequence tag has the formula Y-His wherein Y is selected from
15 -Gly-, -Ala-, -His- and -Tyr-.

Particularly suitable peptide sequence tags are described in EP 0 282 042B, and a
preferred example is a hexa His tag.

In one embodiment of the method of the invention, step (iii) is effected using a further
20 antibody or a binding fragment thereof, which is specific for the peptide of amino acid sequence including SEQ ID NO 1. The said further antibody may be raised using conventional techniques to the peptide (7) which includes an amino acid of SEQ ID NO 1. This method is illustrated diagrammatically in Figure 2.

25 The said further antibody is an anti-fusion antibody (8), which may be immobilised on a column, magnetic bead (9) or pipette tip, for example using a secondary antibody which is suitably an anti-species antibody (10) or other methods described in the literature, such as using an antibody binding protein such as Protein A, Protein G or Protein L, bound to the bead (9). This approach is highly suited to automation and to the isolation
30 of large numbers, but small quantities, of novel fusion proteins in parallel. After separation from the cell lysate residue, the bound fusion protein (4) can subsequently be eluted by increasing the pH from 7.0 to 9.0.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

18

In an alternative embodiment, the fusion protein is isolated using a separation material which has some affinity for biotin but which releases the biotin fairly readily. Suitably the separation material is a modified version of avidin or streptavidin, which has lower affinity for biotin than native avidin or streptavidin. A particular example of such a material is a modified version of avidin marketed as CaptAvidin™ by Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA).

In this embodiment, the fusion protein is isolated from the cellular debris, detergents and salts etc from the culture medium, by lowering the pH of the cell lysis mixture to pH 6.0 followed by affinity purification with CaptAvidin™ attached to (a) magnetic beads or (b) pipette tips using conventional methods. Bound fusion protein may then be eluted from the magnetic beads or mini columns by subsequently increasing the pH from 6.0 to 9.5.

Prior to the step (iv), it is preferable to confirm the identity of the expressed fusion protein. In one particular technique, a very low volume (10µl) of the isolated fusion protein is removed from the microtitre plate. The sample is digested by trypsin (using methods well known in the art). The resultant peptide extract is desalted and concentrated using a ZipTip™ (Millipore, MA, USA) or equivalent, before analysis via mass spectrometry. Since the sequence of the fusion protein is known, identification by MALDI spectrometry to identify the peptides is usually sufficient to confirm the identity of the fusion protein. This technique is widely used in protein research and is summarised by T. Rabilloud (Editor) Proteome Research: 2D gel electrophoresis and identification methods. Furthermore, this technique can be automated and there are a number of commercially available systems from companies including Amersham Pharmacia Biotech, Bio Rad, AbiMed and Genomic Solutions (WO074852A1) that will perform this function.

Similarly, prior to step (iv), it is preferable that the concentration of each expressed protein should be normalised where possible to eliminate variation between elements. Large variations in protein density cause difficulties in interpreting the data derived from such arrays (see Ekins, Clinical Chemistry (1998) 44:9 2015-2030, US Patent No 5807755 and US Patent No. 5432099 for a detailed discussion on the quantitative

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

19

aspects of protein immunoassays and protein arrays and definitions of assay sensitivity). Protein normalisation can be achieved by either determining the total protein concentration and or by including internal controls in the protocols.

5 In a particularly preferred embodiment of the method of the invention, the fusion tag is used as an internal control and is detected by an antibody with a high affinity for the peptide of amino acid sequence which includes SEQ ID NO 1 within the fusion protein. Alternatively, the fusion protein can be expressed with a further peptide sequence tag and this can be used as an internal control. Such a tag may be the said further peptide
10 sequence tag such as a hexa His tag as discussed above, which is expressed as part of the biotinylated fusion protein. The tagged version of this fusion protein may be detected through the use of an appropriate antibody such as an anti His tag antibody.

This can be done by performing a classic immunoassay sandwich simultaneously with,
15 or during, a subsequent analysis of a biological sample using the array.

Using the antibody to the biotinylated fusion peptide, it is possible to determine the content of the fusion protein per μl and as a ratio of total protein present. The methodology may be performed using a sheep polyclonal primary antibody and
20 secondary antibody sandwich in which the secondary antibody is conjugated with fluorescent dye (e.g. goat anti-mouse antibody conjugated to Alexa 488, Molecular Probes, Eugene, USA). The fluorescent dye used is spectrally distinct from any used with the secondary antibody for the biological sample. Both processes have been optimised for automation.

25 The avidin or streptavidin coated non-porous support used in step (iv) of the method of the invention is suitably a glass or plastics material. Such supports are well suited to the production of small concentrated arrays. This is important, since biological samples are generally very limited in volume, and thus very valuable. A minimal surface area
30 containing the targets is required for protein arrays, while still enabling the ability to achieve the required sensitivity of the assay is desirable. In addition, high density of either antigen or antibody in the array produces better signal to noise ratios when used in an assay.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

20

Furthermore, as compared to supports with porous surfaces including membranes, non-porous supports are more physically robust, are well suited to automation and have a lower background when imaged on fluorescent scanners.

- 5 These may be coated with avidin or streptavidin using conventional methods. For example, the immobilisation of streptavidin to non-porous surfaces such as polystyrene multi-well plates is well known in the art. In its most basic form, a solution of streptavidin is left in contact with the surface for some hours. Un-bound protein is then removed by washing and the residual active moieties on the plastic surface blocked with
- 10 BSA or an equivalent. Although this approach may be passive, it is effective. The non-covalent binding of streptavidin to polystyrene or nitrocellulose surfaces appears to be highly stable and resistant to elevated temperatures and high concentrations of chaotropic reagents, as described in WO98/37236.
- 15 Avidin can be chemically attached to glass using the *N*-hydroxysuccinamide active ester of avidin as described by Manning, et al. *Biochemistry* 16: 1364-1370 (1977) and can be attached to nylon via carbodiimide based coupling methods as described by Jasiewicz, et al. *Exp. Cell Res.* 100: 213-217 (1976).
- 20 In another method, high molecular weight compounds such as biotin-*N*-hydroxy-succinimide ester, *N*-biotinyl-6-aminocaproyl-*N*-hydroxysulfosuccinimide ester, sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate were biotinylated and used to coat a suitable surface. Avidin or streptavidin was then coated in a second layer and was retained through binding the biotin linker attached to the high molecular weight
- 25 compound as described in EP0620438.

- Attachment of streptavidin via a layer of biotin on the support surface was further developed in WO98/59243, which describes how biotin can be attached to a surface by chemical means or by light activation at 365nm. The benefit that this provides is that
- 30 regions of the surface can be masked. The elegance of these approaches is that biotin can be covalently bound to glass surfaces and will, in turn, non-covalently bind streptavidin only in those areas of the support that have been treated. This enables patterns of streptavidin "acceptor" protein on the support to be manufactured if required.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

21

In a preferred embodiment of the invention however, the entire surface of the non-porous support is coated with avidin or streptavidin, and then areas which are not required for binding are blocked, for example by addition of bovine serum albumin (BSA). In this way, any non-specific interaction of fusion protein with the support is reduced.

Proteins that have been applied directly onto glass or plastic surfaces become non-covalently bound through interactions with charged groups on the solid surface the active moieties of the solid surface (typically silanol groups in glass or charged surface residues on polystyrene). Such non-specific adsorption of antigens or antibodies onto the surfaces of glass and plastic significantly reduces their antigenicity and antigen binding capacity respectively. The avidin or streptavidin layer therefore fulfills a dual role of firstly attaching the biotinylated fusion protein (non-biotinylated proteins that co-purify do not bind enabling a further purification step) and secondly, the dense layer of streptavidin shields the biotinylated fusion protein from undesirable non-specific interactions with the support surface.

When the fusion protein is applied to the avidin or streptavidin coating on the support in step (iv), very tight but non-covalent bonding occurs. Preferably, the non-porous support is coated with streptavidin. Biotin attachment to streptavidin is multivalent, providing a binding of very high capacity when compared to that of the antigen bound directly to the support surface. Once the proteins have been applied to form the array, the bonding is strong enough to withstand extensive and stringent washing without appreciable loss of fusion protein. This is illustrated in Figure 3. Biotinylated fusion protein (4) is attached to the surface of the array support (12) via tight, non-covalent interaction with streptavidin (14). In the preferred example, streptavidin (14) is covalently bound to the support material. Sites on the array support material to which no streptavidin molecules are bound, are blocked by BSA or other surface modifiers (13). Fusion proteins bind the streptavidin (14) via the biotin label (7) on the fusion peptide (6).

Furthermore, the avidin or streptavidin layer, whether attached directly to the surface of the support or via a biotinylated linker, is highly stable, is capable of being stored dry

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

22

and can be heated and or treated with aggressive reagents without apparent loss of function (unlike most antigens and antibodies). Further "acceptor" layers can be constructed on top of the foundation of the streptavidin layer if required. These may comprise other antibody binding proteins known in the art.

5

The array will have the advantage of using the concentrating effect of the streptavidin, which has multivalent sites for biotin attachment. This enables four times the biotin interaction with both antigen arrays and antibody arrays. This allows higher densities of either antigen or antibody in each element of the array which in turn means that more elements can be assembled per mm² while achieving the same signal (see US Patent Nos 5807755 and US Patent No. 5432099 for a discussion of the quantitative aspects) and less surface area of the solid support is utilised. The advantage is that less biological sample is thus required.

15

Where the array is to consist of antigens arrayed on a microscope format, it suitably contains a large number of these, for example from 3 – 10,000 different fusion proteins. These may be generated or obtained from various sources, depending upon the intended nature and target for the analysis to be conducted using the array. Preferably, however, each protein will be expressed in the form of two fusion proteins, one with the peptide including SEQ ID NO 1 attached to the C-terminal, and one with the peptide including SEQ ID NO 1 attached to the N-terminal. In this way, the relative antigenicities of each version of the fusion protein to a complementary antibody can be assessed.

20

25

The uses of antibody binding proteins such as Proteins A, G and L have been extensively reported. The binding of such proteins to antibodies is sufficiently tight to enable use in separation and detection techniques. These proteins are known to bind to the conserved regions of various classes of antibody. When the method of the invention is used to produce antibody arrays, antibody attachment is achieved by capture of the antibody via use of a layer of antibody binding proteins fused to a peptide which comprises SEQ ID NO 1. This layer preferably comprises of a mixture of biotinylated tagged Proteins A, G and L, and more preferably, some of which are fused at the C-terminal end, and some of which are labelled at the N-terminal end. By creating a mixture of antibody-binding proteins, a universal acceptor is created enabling the attachment of virtually any

30

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

23

antibody, polyclonal, monoclonal, full-chain fragments, single chain antibodies and phage with antibody activity into which a Protein A, G or L site is present or has been engineered. Any antibody can be incorporated into the array without the need to pre-process or modify the antibody.

5

When such antibody binding proteins are applied to an avidin or streptavidin coated surface in step (iv) a very high density of bound protein (biotinylated tagged protein binding to multivalent streptavidin) results. This method has the advantage that only one amino acid residue is biotinylated, and this is part of the fusion peptide, leaving the antibody binding sites on the lectins available. These antibody binding proteins effectively create a second layer on the solid surface. This layer comprising of bound fusion tagged Proteins A, G and L, acts as a universal acceptor surface for any antibody (Figure 6) without the need for direct biotinylation of the antibody. This saves time, antibody and eliminates the possible degradation of the antibody's binding to its

10
15

In a preferred embodiment, a molar excess of antibodies is pre-mixed with biotinylated peptide antibody-binding protein (e.g. Proteins A, G or L) fusion and incubated for up to 15 minutes. This antibody-antibody binding protein mixture is then applied directly to the streptavidin covered array support. Alternatively, the biotinylated antibody binding protein fusion may first be applied to the streptavidin covered array support. Individual antibodies are then applied to the surface of the coated support to form an array.

20

The array produced by either method comprises very discrete spots with minimal observable diffusion, leading to a good array for assay purposes.

25

The array obtained using the method of the invention is suitably used in methods for detecting binding between antigens and antibodies.

Thus in a second aspect, the invention provides a method of detecting binding between an antibody and an antigen, said method comprising the steps of (vi) applying to the array obtained using a method of the first aspect a sample which contains or is suspected

30

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

24

of containing an antibody in the case of an array of step (v)(a), or an antigen in the case of the array of step (v)(b); and (vii) detecting bound antibody or antigen on the support.

Steps (vi) and (vii) of the method of the invention are suitably carried out in a conventional manner, using well known immunological techniques such as ELISAs, including sandwich ELISAs using labelled and in particular fluorescently labelled antibodies. This is illustrated in the case of an antigen array in Figure 4. Antigens (4) bound to the array substrate (12) via streptavidin (14) are detected with a suitable primary antibody (15). The signal is amplified using a suitable secondary antibody (16) conjugated to a label (17). The label in the preferred embodiment is a fluorescent dye, such as Alexa 488, but may be any number of other types of label that are known in the art.

Suitably the protein array continues to be monitored for quality and in particular the density of the protein during use of protein analysis devices. This is achieved in accordance with a preferred embodiment of the invention by using the peptide which comprises SEQ ID NO 1 or the further peptide sequence tag such as the hexa His Tag mentioned above, or any other suitable tag which performs this function as an internal standard, in a manner similar to that described above for pre-array protein normalisation. Once the antigens from numerous protein preparations have been arrayed onto the support surface, the array can then be used to assess antibody quality (see WO 99/39210) or can be used to determine antibody titre in serum samples (Joos *et al* Electrophoresis 2000, 21, 2641-2650). In these instances, the relative amounts of protein between the different elements in an array can be determined by adding an internal standard to the primary sample. The internal standard that is preferred is a sheep polyclonal antibody raised against the fusion peptide. This is spiked into the primary antibody solution (either antibody or serum) and is detected by an anti-sheep secondary antibody conjugated with a suitable fluorescent dye that is spectrally distinct from the labelled secondary antibody to the primary sample. A two-colour image is generated using a commercially available slide imager and the signal for each element is normalised to the signal resulting from the fusion protein. Combined with pre-array protein content normalisation, arrays of considerable consistency can be generated.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

25

Preferably at least some and most preferably all of the steps of the process described above are operated automatically to increase throughput and reduce labour time and costs.

5 Creating antigen arrays with many novel proteins means proteins must be attached with the minimum number of steps if the process is to be viable. The use of a peptide which is readily and specifically biotinylated and which can act not only as a binding protein for assay purposes, but also as a purification means and an internal control for monitoring quality, provides just such a method.

10 The method of the invention allows diverse collections of proteins to be attached with universal procedures, a minimum number of steps and maximum predictability of orientation. The method is suitable for operation on a large-scale, for example in high-throughput screening.

15 In a third aspect the invention provides a protein array on a non-porous support, obtained using the method of the first aspect of the invention.

Some elements used in the above-described methods are novel and therefore form
20 further aspects of the invention. In particular, in a fourth aspect, the invention provides a fusion protein comprising an antibody binding protein fused at the N- or C- terminus to a peptide of 13 to 50 amino acids which comprises SEQ ID NO 1, such as a peptide of SEQ ID NO 2. In particular, the antibody binding protein is Protein A, G or L and preferably a mixture thereof. The fusion protein may additionally comprise a further
25 peptide sequence tag such as the hexa His tag or another suitable sequence tag, which are known to those skilled in the art as discussed above. Such sequence tag may be located at the N or the C- terminus of the antigen or antibody binding protein. It is, however, preferably located at the opposite end of the antigen or antibody binding protein to which the amino acid sequence of SEQ ID NO 1 is fused. Where it is located
30 at the same terminal region as SEQ ID NO 1, the sequence tag is fused to the free end of SEQ ID NO 1.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

26

A fifth aspect of the invention comprises a nucleic acid sequence which encodes the fusion protein of the fourth aspects. In particular in this case, the sequence which encodes the peptide is suitably of SEQ ID NO 9.

5 GGCCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGGCACGAA
(SEQ ID NO 9)

Description of the Figures

Figure 1 illustrates diagrammatically the expression of a protein which is either an antigen or an antibody binding protein such as Protein A, G or L, in a form in which it can be used in the method of the invention.

Figure 2 illustrates diagrammatically the isolation of fusion protein from cellular debris using an anti-tag antibody in accordance with an embodiment of the invention.

15 Figure 3 illustrates diagrammatically the attachment of expressed fusion protein to a support surface coated with streptavidin in accordance with an embodiment of the invention.

Figure 4 illustrates diagrammatically the detection of bound antigen with classic ELISA sandwich with the secondary conjugated to a fluorescent marker such as Alexa 488 in accordance with an embodiment of the invention.

Figure 5 shows the results of a series of experiments in which a fusion protein comprising of GST fused to the fusion peptide was arrayed onto a streptavidin-coated microscope slide at several concentrations, the lowest in the above example being equivalent to 500pg / spot. Panel (a) shows the image produced by a commercially available scanner using an excitation wavelength of 485nm and an emission wavelength of 520nm. In this example, the secondary antibody was conjugated to Alexa 488 as described in the text. Panel (b) shows an inverted image of (a) for ease of viewing.

25
30 Panel (c) shows an enlarged area of the array support with fusion protein at 500 pg / spot. The signal: noise ratio for these spots indicates that detection limits (signal:noise ratios of 3:1) would give a detection limit in the order of 10-50 pg protein per feature.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

27

Figure 6 (a) illustrates diagrammatically how solutions of Protein A, G and L (18) expressed as both C- and N-terminal fusion proteins were incubated with the streptavidin-coated slide (12). (a) Solutions of Proteins A, G and L (18) expressed as both C- and N-terminal fusion proteins were incubated with the streptavidin-coated slide (12). Antibodies (19) can be attached to the slide in highly discrete spots by arraying with a solid pin device or similar. The antibodies bind to the divalent protein binding proteins (Proteins A, G or L) at high densities. This was exemplified by binding a goat anti-mouse Ab conjugated to Alexa 488 and the image was acquired by scanning the slide with an emission wavelength of 485 nm and an excitation wavelength of 520 nm (inset panel (b))

Figure 7 shows the structure of the pAN-4 DNA vector obtainable from Avidity Inc. in which the S-D box (ASGGA) is shown in bold type, the start methionine codon is shown in italics and underlined, the sequence encoding the peptide of SEQ ID NO 2 is underlined, the ampicillin resistance bla is shown in bold type and the lacI^q is shown bold and underlined;

Figure 8 shows the structure of the pAN-5 DNA vector obtainable from Avidity Inc. with annotations similar to those used in Figure 7;

20

Figure 9 shows the structure of the pAN-6 DNA vector obtainable from Avidity Inc. with annotations similar to those used in Figure 7;

Figure 10 shows the structure of the pAC-4 DNA vector obtainable from Avidity Inc. with annotations similar to those used in Figure 7;

25

Figure 11 shows the structure of the pAC-5 DNA vector obtainable from Avidity Inc. with annotations similar to those used in Figure 7;

Figure 12 shows the structure of the pAC-6 DNA vector obtainable from Avidity Inc. with annotations similar to those used in Figure 7.

30

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

28

Figure 13 illustrates diagrammatically the expression of a protein, which is either an antigen, or an antibody binding protein such as Protein A, G or L, in a form in which it can be used in the method of the invention wherein the two alternative positions of the second peptide sequence tag are shown.

5

Detailed description of the Invention

Step 1: Cloning

All genes expressed were cloned from cDNA preparations directly into each of the pAN and pAC series of vectors (Avidity Inc, USA). These were used to express N-terminal and C-terminal fusion proteins respectively. The fusion peptide sequence used was SEQ ID NO 2 shown above. The insert sequences were confirmed by DNA sequencing performed on 377 (PE Corporation Inc) and MagaBase (Amersham Pharmacia Biotech) instruments using the manufacturer's methodologies.

Step 2: Expression

All fusion proteins were expressed under the control of the tightly repressed Trc promoter and is IPTG-inducible. All proteins were expressed in strain AVB100 (Avidity Inc, Colorado, USA), an *E. coli* K12 strain [MC1061 *araD139* delta(*ara-leu*)7696 delta(*lac*)174 *galU galK hsdR2*(r_K^+ m_K^+) *mcrB1 rpsL*(Str^r)] with a *birA* gene stably integrated into the chromosome.

20

Over expression of the BirA protein was accomplished by induction with L-arabinose. The stably integrated *birA* gene does not require antibiotics to be maintained, and use of AVB100 with IPTG-inducible vectors such as pAC and pAN, vectors (Avidity Inc, USA) allowed independent control over the expressed gene of interest and the BirA levels.

25

Strain AVB99 (Avidity Inc) was also used and is an *E. coli* strain (XL1-Blue) containing a pACYC184 plasmid with an IPTG-inducible *birA* gene to overexpress biotin ligase (pBirAcm).

30

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

29

Strain AVB101 (Avidity Inc) was also used and is an *E. coli* B strain (hsdR, lon11, su1A1), containing a pACYC184 plasmid with an IPTG-inducible *birA* gene to overexpress biotin ligase (pBirAcm).

- 5 Expression of both biotin ligase and the fusion protein was induced with IPTG (1 mM). Biotin was added at the time of induction to a concentration of 50 μ M.

Step 3: Purification

- 10 Biotinylated fusion proteins were isolated by two separate methods. These methods can either be used as alternates or were combined as a two-stage process where ultra-pure preparations were required.

a) Purification using anti-fusion peptide antibodies

- 15 A partially purified mouse monoclonal antibody to the C-terminus fusion peptide was available and polyclonal antibodies to the C- and N- terminal fusion proteins were raised in rabbit.

- 20 i) In one of the methodologies, the anti C-terminal mouse monoclonal was attached directly to magnetic beads using 2.4 micron magnetic beads with a tosylated activated surface (DynaL Biotech ASA, Norway) as follows:

- 25 *Coating procedure.* Dynabeads M-280 Tosylactivated were resuspended by pipetting and vortexing for approximately 1 min and were immediately pipetted into the reaction tube. Supernatant was removed from the beads using a magnet (DynaL MPC) to separate the beads from solution. The supernatant was removed, leaving beads undisturbed. The beads were resuspended in an ample volume of 0.1 M Na-phosphate buffer pH 7.4 and mixed gently for 2 min. After using the magnet again and pipetting off the supernatant, the washed beads were resuspended in the same volume of 0.1 M Na-phosphate buffer pH 7.4 to the required concentration.

- 30 The appropriate antibody was dialysed into 0.1 M Na-phosphate buffer pH 7.4. The amount of antibody was approximately 3 μ g antibody per 10^7 Dynabeads (approximately 20 μ g/mg) and the beads were resuspended by vortexing for 1 min. The mixture was

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

30

incubated for 16-24 h at 37°C with slow tilt rotation. After incubation, the magnet was used to separate the magnetic beads for 1 - 4 minutes and the supernatant was removed. The coated beads were washed four times (twice in x1 PBS pH 7.4 [phosphate buffered saline] with 0.1% [w/v] BSA for 5 minutes at 4°C) once with 0.2 M Tris-HCl pH 8.5 with 0.1% (w/v) BSA for 24 hours at 20°C or for 4 hours at 37°C (Tris blocks free tosyl- groups) and finally once in x1 PBS, pH 7.4 with 0.1% [w/v] BSA for 5 minutes at 4°C. The Dynabeads M-280 Tosylactivated are thereby coated with the antibody.

The cells expressing the fusion protein of interest were lysed for 15 minutes in ice-cold x1 PBS, pH 7.4 with 1% NP-40 and protease inhibitors, after which the lysate was centrifuged at 2,000 x g for 3 minutes. The lysate was pre-cleared by incubation of the ice-cold lysate (in 1.5 ml Eppendorf tubes) for 2 hours with Dynabeads pre-coated with the appropriate antibody (0.5mg Dynabeads pr. lysate from 1×10^6 cells). The Dynabeads were washed 3 times in 1.5 ml ice-cold PBS/1% NP-40 by using a Dynal Magnetic Particle Concentrator to collect the beads at the wall after each washing step. The fusion protein-antibody magnetic bead complex was disrupted by adjusting the pH to above 9.0. Supernatant was separated from the magnetic beads with the Magnetic Particle Concentrator and assayed for total protein concentration, concentration of fusion peptide and the protein was identified by mass spectrometry using a PerSeptive Voyager MADLI (see below).

ii) In the second methodology, the antibody was attached indirectly to Dynal magnetic beads via Protein A and Protein G previously immobilised onto the surface of the bead by the manufacturer.

A mixture of Dynabeads-Protein G and Dynabeads-Protein A were resuspended by vortexing for 1-2 minutes. The supernatant was removed from the beads using a magnetic workstation as described above. 0.5 ml 0.1 M Na-phosphate buffer pH 7.0 containing 0.01% Tween 20 and 0.1% (w/v) BSA were added and the wash procedure repeated three times.

The antibody was added to the washed Dynabeads and incubated with gentle mixing for 10 - 40 minutes. The supernatant was removed using the magnetic workstation. The

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

31

beads were twice resuspended in 0.5 ml 0.1 M Na-phosphate buffer pH 7.0 containing 0.01% Tween 20 and 0.1% (w/v) BSA for protein stability. Supernatant was removed and the beads added to the lysate mixture as prepared above. Binding of the fusion protein was performed at 2-8°C for 10 minutes to 1 hour. Approximately 25 µg target protein per µl of the initial Dynabeads Protein G volume was used to assure an excess of protein. Incubation was performed while tilting and rotating the tube with incubation times as low as 10 minutes. Supernatant containing detergents and cell lysate was removed from the fusion-protein-Ig Dynabeads-Protein G complex using the magnetic workstation and washed 3 times using x1 PBS, pH 7.4 with 0.01% Tween 20.

Bound fusion protein was best eluted from the fusion-protein-Ig Dynabeads-Protein G/A complexes by adjusting the pH to above 9.0 and removing the supernatant containing the now purified fusion protein. Supernatant was separated from the magnetic beads with the Magnetic Particle Concentrator and assayed for total protein concentration, concentration of fusion peptide and the protein was identified by mass spectrometry using a PerSeptive Voyager MADLI (see below).

iii) In another example, Proteins A, G and L mixtures were immobilised on to suitably prepared pipette tips. The antibody was incubated with the pipette tips in 50mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.01% Tween 20 and 0.1% (w/v) BSA for 60 minutes at room temperature. The coated pipette tips were then rinsed with 3 pipette volumes of 50mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.01% Tween 20 and 0.1% (w/v) BSA. 200µl cell lysate was aspirated from the bottom of the tip either by hand or with a robotic workstation several times to ensure the extraction of the biotinylated fusion protein. The cell lysate was discarded. The pipette tips were rinsed with three volumes of 10mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.01% Tween 20 and 0.1% (w/v) BSA. Bound fusion protein was eluted in half a pipette volume of 50mM sodium bicarbonate-HCl buffer, pH 10.0 containing 0.01% Tween 20 by gently aspirating this aliquot up through the bottom of the pipette tip. The resulting solution containing the fusion protein was assayed as described below.

iv) In another preferred methodology an alternative version of the biotinylated fusion protein was constructed with the addition of a hexa His tag. The hexa His fusion peptide is often used as a standard purification procedure and is well known to those

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

32

skilled in the art. Typically, cells were lysed in 5ml buffer per gram wet weight of cells. The lysis buffer comprised: x1 NBB (20mM Tris CL, 100mM NaCl, 5mM Imidazol, pH 8.0) with 1 in 100 volume of 10mg/ml lysozyme, 1 in 100 volume protease inhibitor cocktail (Calbiochem protease inhibitor cocktail set 3), 10mM beta mercaptoethanol, 5 supplemented with a x1 detergent cocktail supplied by Novagen (Madison, USA). The cells were lysed for 15 minutes at 30-37°C.

Cellular proteins were denatured by adding Urea to a final concentration of 6M and 2M thiourea. The solution was clarified by passing through a 0.22 micron filter, and then 10 applied directly onto nickel agarose matrix (NTA supplied by Qiagen, Germany). Proteins were incubated with the nickel agarose beads for 15 minutes and the non-binding protein removed by centrifugation. The beads were washed three times in 10 volumes of the lysis buffer supplemented with 6M Urea and 2M Urea. After the final wash, 50% of the wash buffer was removed and then diluted with a 20mM Tris HCl, 15 100mM NaCl, pH 8.0 buffer containing 10mM beta mercaptoethanol. This step was repeated three times. Finally the beads were washed with 10 volumes of buffer, the composition of which was 20mM Tris HCl, 100mM NaCl, pH 8.0 buffer (without urea/thiourea).

20 The proteins were eluted several aliquots of buffer (20mM Tris HCl, 100mM NaCl, pH 8.0 buffer), supplemented with various concentrations of imidazole. The typical concentration range of imidazole used to eluted the bound protein was between 20mM to 500mM. The fractions containing the eluted protein were pooled.

25 b) Purification using CaptAvidin™ (Molecular Probes Inc, Oregon, USA)

In another experiment, the biotinylated fusion protein was isolated using a novel form of streptavidin marketed as CaptAvidin™ (Molecular Probes, Oregon, USA) immobilised to a suitable surface. In this modified form of streptavidin, the tyrosine residue in the biotin binding sites is nitrated, thereby reducing the very strong non-covalent bond with 30 a K_a of $10^{15}M^{-1}$ to a K_a of 10^9M^{-1} . The association between biotin and CaptAvidin™ can therefore be disrupted by raising the pH to between 9-10 as described below:

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

33

i) In one preferred embodiment, CaptAvidin™ protein was attached to tosylated magnetic beads (DynaL Biotech ASA, Norway) and was washed and prepared as described above. The CaptAvidin™ coated beads were washed three times in 50mM citrate phosphate buffer, pH 4.0 containing 0.01% Tween 20 and 0.1% (w/v) BSA and the supernatant was discarded. The cell lysate mixture was prepared as described above and the pH adjusted to 5.0. CaptAvidin™ coated beads were added at a ratio of 0.5 mg Dynabeads per lysate from 1×10^8 cells. The solution was incubated with gentle agitation for 10-60 minutes. The supernatant was removed from the magnetic beads using a magnetic workstation (DynaL Biotech ASA, Norway) and washed with three aliquots of 10mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.01% Tween 20, discarding the supernatant.

The biotinylated fusion protein is detached from the CaptAvidin™ coated magnetic beads by adding an aliquot of 50mM sodium bicarbonate-HCl buffer, pH 10.0 containing 0.01% Tween 20 and gently agitating the slurry for 15 minutes at room temperature. The magnetic beads were removed using the magnetic workstation and the supernatant containing the biotinylated fusion protein was retained.

ii) In another example, the magnetic beads were replaced by creating mini columns of CaptAvidin™ conjugated to agarose beads (Molecular Probes Inc, Oregon, USA) mixed with an equal volume of Sepharose® CL-4B agarose (Amersham Pharmacia Biotech Ltd, UK) to increase the bed volume with mini columns made by pouring the slurry into pipette tips in 50mM citrate phosphate buffer, pH 4.0 containing 0.01% Tween 20. Biotinylated fusion protein was separated from cell lysate mixture by affinity chromatography. Unbound material is eluted from the column with 10 column volumes of 10mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.01% Tween 20. Biotinylated fusion protein was eluted from the column in two column volumes of 50mM sodium bicarbonate-HCl buffer, pH 10.0 containing 0.01% Tween 20.

iii) In yet another experiment, the CaptAvidin™ agarose beads were immobilised into a pipette tip and fusion protein binding and elution was performed as described above.

Step 4: Protein Identification

Expressed and purified fusion proteins were identified by peptide finger printing. Using methods as reviewed in *Proteome Research* (Edited by Rabilloud), the fusion protein was digested with trypsin, the resulting peptide solution was desalted and concentrated using a ZipTip™ (Millipore, MA, USA) reverse phase column, diluted into matrix solution and applied to a target plated from a PerSeptive Voyager™ mass spectrometer and analysed by MADLI. The resulting spectra of peptide masses were compared with the anticipated peptide finger print for the protein using the Expasy search algorithms (GeneBio AG, Switzerland) via their website (www.expasy.com).

10

Step 5: Protein assay (normalisation)

A 3-5 µl aliquot of the purified fusion protein was removed from the stock solution and assayed for total protein content using the BCA method in preference to Bradford assay due to the presence of detergents in the protein samples. The concentration of biotinylated fusion protein was determined by immunoassay as follows; A 3-5 µl aliquot of the purified fusion protein was removed from the stock solution and incubated in a black, streptavidin-coated microtitre plate (Beckton Dickenson, USA). The well was washed three times with 50mM Tris-HCL buffer, pH 8.0 containing 0.01% Tween 20. The well was blocked using 1% (w/v) BSA in the same buffer for 30 minutes and then rinsed three times with 50mM Tris-HCL buffer, pH 8.0 containing 0.01% Tween 20. The immobilised biotinylated fusion protein was incubated with either an anti N-terminal or anti C-terminal polyclonal antibody raised in rabbit diluted into 50mM Tris-HCL buffer, pH 8.0 containing 0.01% Tween 20 and 0.1% (w/v) BSA. The well was rinsed three times with buffer and then probed with a anti-rabbit, mouse monoclonal conjugated to Alexa 488 (Molecular Probes Inc, Oregon, USA) and the signal measured with a PerkinElmer Fluorescence plate reader. A standard curve with known amounts of Glutathione S-transferase expressed using the expression system described in US5723584, US5874239 and US5932433 was used for calibration in the range of 0.1 – 500 µg of fusion protein per well.

30

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

35

Step 6: Manufacture of protein arraysa) Creation of Streptavidin coated microscope slides

Microscope slides coated with streptavidin were first imaged on a variety of commercially available slide readers using an excitation wavelength of 480nm and an emission wavelength of 520nm to assess the evenness of the coating.

b) Manufacture of antigen arrays

The streptavidin coated slides were rehydrated with x1 phosphate buffered saline at pH 7.3. Purified biotinylated fusion proteins at a concentration of approximately $1\mu\text{g} / \mu\text{l}$ were spotted onto the surface of the slide using a solid pin with a tip diameter of 100-150 microns (Biorobotics, Cambridge, UK) by hand and with a robotic system. The slide was incubated at room temperature in a humidity-controlled environment for 30 minutes. The slide was then typically washed with x1 PBS, pH 7.3 containing 0.01% (v/v) Tween and then blocked by incubating the slide with 1% (w/v) BSA for 10 minutes. The slide was rinsed with x1 PBS, pH 7.3 containing 0.01% (w/v) Tween 20 and then incubated with the primary antibody of choice diluted 1:400 in x1 PBS, pH 7.3 containing 0.01% (w/v) Tween 20 and 0.1% (w/v) BSA, or a complex biological mixture of proteins containing immunoglobulins, e.g. diluted serum samples. The slide was then rinsed in x1 PBS, pH 7.3 containing 0.01% (w/v) Tween and 0.1% (w/v) BSA and incubated with an appropriate secondary (for example mouse anti-human IgG monoclonal conjugated to Alexa 488 (Molecular Probes Inc) for the detection of immunoglobulins in serum, for example). The slides were then imaged at excitation/emission wavelengths of 480/520nm, for the Alexa 488 conjugate, although one skilled in the art can appreciate that many such secondary Abs with a variety of labels (colorimetric, alternative fluorescent, radiolabelled or chemiluminescent) could be used in its place. An example of the results obtained is illustrated in Figure 5 hereinafter.

c) Manufacture of antibody arrays30 Creation of a universal antibody acceptor layer

Proteins A, G and L from *Streptococcus aureus* were cloned into the expression vectors pAN-4, pAN-5 or pAN-6, pAC-4, pAC-5 and pAC-6) and were expressed and purified as described above, resulting in both C- and N-terminal fusion proteins which were

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

36

biotinylated *in vivo*, again as described above. Streptavidin coated microscope slides were coated with a mixture of fusion proteins (both C- and N- terminal fusions) of Proteins A, G and L in x1 PBS, pH 7.3 at a concentration of 1mg / ml. The slides were incubated at room temperature for a minimum of 30 minutes in a humidity-controlled environment. The slides were washed with x1 PBS, pH 7.3 containing 2mM Sodium Azide and were stored in sealed containers in a moist atmosphere (to prevent drying) at 4°C until required.

Printing antibody arrays

The universal antibody acceptor layer was used to attach a variety of different classes of antibodies and those phage molecules engineered to include a Protein A, G or L binding site. Antibody preparations are diluted in 1x PBS, pH 7.3 containing 0.01% Tween to a concentration of 0.2 – 10 mg /ml. The antibody solutions were applied to the universal antibody acceptor layer with solid pins with a tip diameter of between 100-150 microns (Biorobotics, Cambridge, UK) by hand or with a robotic system. The slides were then blocked with 1% BSA in x1 PBS, pH 7.3 containing 0.01% Tween. Slides were rinsed with the x1 PBS, pH 7.3 containing 0.01% Tween and 2mM Sodium Azide and were stored in sealed containers in a moist atmosphere (to prevent drying) at 4°C until required.

Scanning as described above for antigen arrays produced the sort of results which are illustrated in Figure 6.

Step 7: Labelling complex mixtures of proteins with fluorescent dyes

Typically, protein samples were prepared by solubilising them in a variety of buffers and detergents, depending on the biological sample. Many samples required aggressive solubilisation procedures requiring the use of non-ionic detergents and 8M urea, similar to those used in the preparation of proteins for the first dimension of 2D electrophoresis gels. For example, the solubilization methodology involved homogenization of the sample into solution containing 4% CHAPS, 50mM PBS, pH 7.6 with either 7 M urea and 2 M thiourea or 8 M urea. Buffers containing primary amino groups such as TRIS and glycine inhibit the conjugation reaction and were therefore avoided. The presence of low concentrations (<2%) of biocides such as azide or thimerosal did not affect

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

37

protein labelling. The solubilised protein was centrifuged at 10,000g to remove cellular debris and non-solubilised material and the mixture was immediately labeled.

5 Complex mixtures of proteins from biological samples were labelled with a fluorescent tag prior to incubation with the antibody array as prepared above. Clearly, those skilled in the art will recognise that other forms of labels can be applied to the technique such as radiolabelling, chemiluminescent and visual dyes. Further, other fluorescent dyes can also be applied to the process.

10 One preferred embodiment is the use of Cy3 and Cy5 mono reactive dyes (Amersham Pharmacia Biotech Ltd, UK). Dye labelling of complex protein mixtures was unpredictable and had to be optimised for each type of biological sample. Specifically, the binding of dye molecules to proteins via residues with amine groups often reduced the antigenicity of certain proteins such that they were no longer recognised by a
15 functional antibody.

The manufacturer's recommended procedure is designed to label 1mg protein to a final molar dye/protein (D/P) ratio between 4 and 12. This assumes an average protein molecular weight of 155,000 daltons. In the present invention, an average dye / protein
20 ratio above 2-3 was found to interfere with the antibody-antigen reaction for many of the proteins studied. It was determined that the D/P ratios could be simply controlled by using different concentrations of protein and different buffer pH values.

Altering the protein concentration and reaction pH changed the labelling efficiency of
25 the reaction significantly. Optimal labelling occurred at pH 9 and by reducing the pH to 7.6 reduced the dye / protein ratio to between 1-3. Higher protein concentrations increased labeling and so the control of protein concentration was also found to be critical. Solutions of up to 10 µg/µl of a single protein species gave dye / protein ratios of 10-14, so more appropriate concentrations were found to be 0.1 – 1.0 µg/µl. A
30 typical method was as follows: complex protein mixtures prepared as described above, were diluted to several concentrations in x1 PBS buffer, pH 7.6 containing 0.2% CHAPS to achieve an average protein species concentration of 1.0 µg/µl (total protein

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

38

concentration was in the range of 50-100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) The protein solution was incubated at room temperature for 30 minutes with constant gentle agitation. Labeled protein must be separated from the excess, unconjugated dye prior to incubation with the antibody arrays. The manufacturer recommends separation from unbound protein by gel permeation, however, due to the presence of membrane-bound proteins with poor solubility this step was replaced by simply adding an excess of glycine to the solution to halt the reaction. The labeled protein solution was incubated for a further 15 minutes to ensure the removal of residual free dye. Labeled proteins were stored at 2-8°C without further manipulation. Free dye was also removed using the method of Ūnitĭ *et al* (1997) in which free dye was removed by overnight incubation with SM-2 beads (Bio-Rad, CA, USA).

The final dye/protein (D/P) ratio was estimated as follows: a portion of the labeled protein solution was diluted so that the maximum absorbance was 0.5 to 1.5AU. Molar concentrations of dye and protein were calculated. The extinction coefficient will vary for different proteins but is a reasonable average to use for complex mixtures. The ratio of the average number of dye molecules coupled to each protein molecule was calculated as follows:

Cy5 / Protein ratios were calculated using molar extinction coefficients of 250,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 650nm for Cy5, and 170,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 280nm for the protein mixture. The calculation was corrected for the absorbance of the Cy5 dye at 280nm (approximately 5% of the absorbance at 650nm) as per the manufacturer's product data sheets. [Cy5 dye]=[A650]/250000, [protein]=[A280- (0.05 x A650)] / 170000, (D/P) final = [dye]/[protein], (D/P) final =[0.68 x (A650)] / [A 280- (0.05 x A650)].

Cy3 / Protein ratios were calculated using molar extinction coefficients of 150,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 552nm for the Cy3 dye and 170000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 280nm for the protein are used in this example. The calculation was corrected for the absorbance of the dye at 280nm (approximately 8% of the absorbance at 552nm). [Cy3 dye]=[A 552]/150000, [antibody]=[A 280- (0.08 x A552)] / 170000, (D/P) final =[dye]/[antibody], (D/P) final =[1.13 x (A552)] / [A280- (0.08 x A552)].

Step 8: Determination of protein expression using antibody arrays

Cy3-labelled and Cy5-labelled proteins were mixed in equimolar amounts based on the Dye / protein ratios determined above. 100µl of the mixture was incubated with an antibody array that had previously been rinsed with several slide volumes of x1 PBS, pH 7.6 containing 0.01% Tween. The labelled protein mixture was incubated at 30°C for one hour in an automated slide processor subject to UK Patent Application GB 0028647.6 (unpublished). The slide was then rinsed with 10 slide volumes of x1 PBS, pH 7.6 containing 0.01% Tween. The slides were dried by centrifugation and imaged immediately on a commercially available slide imager using the manufacturer's operating procedures. The Cy3 and Cy5 labelled protein ratios were analysed and normalised to a number of marker proteins such as actin and GAPDH. While this approach is suitable for similarly prepared tissues or other biological samples, care must be taken on the applicability of this normalisation strategy between different tissue types and other biological samples, since the total cell content of all proteins vary considerably from tissue to tissue.

The potential of protein arrays has been discussed for many years and clearly is a much needed tool. The problems with expressing, purifying, assaying and in particular, attaching proteins to solid, non-porous surfaces have all proved difficult problems to solve. Through the novel exploitation of the vector technology described in patents US5723584, US5874239 and US5932433, the present invention provides a method for the preparation of both antigen and antibody arrays that allow researchers to now apply these techniques with greater success.

All references mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Other modifications of the present invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with the specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention, which are obvious to those skilled in the art, are intended to be within the scope of the following claims.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

40

Claims

1. A method of forming an array of proteins selected from antigens or antibodies; said method comprising the steps of
- 5 (i) expressing in a recombinant cell, a fusion protein which comprises either (a) an antigen or (b) an antibody binding protein, fused to a peptide having up to 50 amino acids, which peptide comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO 1
- LX₁X₂IX₃X₄X₅X₆KX₇X₈X₉X₁₀ (SEQ ID NO 1)
- 10 where X₁ is a naturally occurring amino acid, X₂ is any naturally occurring amino acid other than leucine, valine, isoleucine, tryptophan, phenylalanine or tyrosine, X₃ is phenylalanine or leucine, X₄ is glutamine or asparagine, X₅ is alanine, glycine, serine or threonine, X₆ is glycine or methionine, X₇ is isoleucine, methionine or valine, X₈ is
- 15 glutamine, leucine, valine, tyrosine or isoleucine, X₉ is tryptophan, tyrosine, valine, phenylalanine, leucine or isoleucine and X₁₀ is any naturally occurring amino acid other than asparagine or glutamine; where said peptide is capable of being biotinylated by a biotin ligase at the lysine residue adjacent to X₆;
- (ii) biotinylating said peptide of the fusion protein at the lysine residue adjacent X₆;
- 20 (iii) isolating the biotinylated fusion protein;
- (iv) applying the biotinylated fusion protein to an avidin or streptavidin coated non-porous support;
- (v) forming an array of at least three different proteins on the support by either
- (a) where the fusion protein comprises an antigen, carrying out steps (i) to (iv) the
- 25 desired number of times to form an antigen array; or
- (b) where the fusion protein comprises an antibody binding protein, applying to said protein, either prior to or after step (iv), a plurality of different antibodies or binding fragments thereof.
- 30 2. A method according to claim 1 wherein the fusion protein further comprises a second peptide sequence capable of acting as an affinity or detection tag sequence to the fusion protein wherein the sequence comprises between 1 and 30 amino acids.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

41

3. A method according to claim 2 wherein the peptide sequence tag is fused to the end of the amino acid sequence of SEQ ID NO 1.
4. A method according to claim 2 wherein the peptide sequence tag is fused to the opposite end of the antigen or antibody binding protein to which the amino acid sequence of SEQ ID NO 1 is fused.
5. A method according to any one of claims 2 to 4 wherein at least one amino acid of the peptide sequence tag is histidine.
- 10 6. A method according to claim 5 wherein the peptide sequence tag has the formula His-X in which X is selected from -Gly-, -His-, -Tyr-, -Gly-, -Trp-, -Val-, -Leu-, -Ser-, -Lys-, -Phe-, -Met-, -Ala-, -Glu-, -Ile-, -Thr-, -Asp-, -Asn-, -Gln-, -Arg-, -Cys- and -Pro-.
- 15 7. A method according to claim 5 wherein the peptide sequence tag has the formula Y-His.
8. A method according to claim 7 wherein Y is selected from -Gly-, -Ala-, -His-, and -Tyr-.
- 20 9. A method according to any one of the preceding claims wherein the recombinant cell expresses biotin ligase and step (ii) is effected in the presence of biotin such that biotinylation occurs *in vivo* in said cell.
- 25 10. A method according to claim 9 wherein recombinant cell expresses biotin.
11. A method according to any one of the preceding claims wherein step (ii) is effected using a further antibody or a binding fragment thereof, which is specific for the peptide of SEQ ID NO 1.
- 30 12. A method according to any one of claim 1 to 10 wherein step (iii) is effected using a further antibody or a binding fragment thereof, which is specific for the peptide

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

42

sequence tag of any one of claims 2 to 8.

13. A method according to claim 11 or claim 12 wherein said further antibody or binding fragment thereof is immobilised on a column, magnetic bead or loaded into a pipette tip.
14. A method according to claim 13 wherein bound fusion protein is subsequently eluted by increasing the pH conditions.
15. A method according to claim any one of claims 1 to 10 wherein in step (iii) the fusion protein is isolated using a separation material which releasably binds biotin.
16. A method according to claim 15 wherein the separation material is a modified version of avidin or streptavidin, which has lower affinity for biotin than native avidin or streptavidin.
17. A method according to claim 15 or claim 16 wherein the separation material is attached to magnetic beads or pipette tips.
18. A method according to any one of claims 15 to 17 wherein the fusion protein is eluted from the separation material by changing the pH conditions.
19. A method according to any one of the preceding claims wherein some areas of the coated support used in step (iv) are blocked to prevent binding of the fusion protein thereto.
20. A method according to any one of the preceding claims wherein the peptide of SEQ ID NO 1 is selected from
- Leu Glu Glu Val Asp Ser Thr Ser Ser Ala Ile Phe Asp Ala Met Lys Met Val Trp Ile Ser Pro Thr Glu Phe Arg (SEQ ID NO:14);

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

43

Gln Gly Asp Arg Asp Glu Thr Leu Pro Met Ile Leu Arg Ala Met Lys Met Glu Val Tyr
Asn Pro Gly Gly His Glu Lys (SEQ ID NO:15);

Ser Lys Cys Ser Tyr Ser His Asp Leu Lys Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Leu Val His Ser
5 Tyr Leu Arg Val Met Tyr Asn Tyr (SEQ ID NO:16);

Met Ala Ser Ser Asp Asp Gly Leu Leu Thr Ile Phe Asp Ala Thr Lys Met Met Phe Ile
Arg Thr (SEQ ID NO:17);

10 Ser Tyr Met Asp Arg Thr Asp Val Pro Thr Ile Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Leu His
Thr Thr Pro Trp Ala Cys Arg (SEQ ID NO:18);

Ser Phe Pro Pro Ser Leu Pro Asp Lys Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Val Ile Thr
(SEQ ID NO:19);

15 Ser Val Val Pro Glu Pro Gly Trp Asp Gly Pro Phe Glu Ser Met Lys Met Val Tyr His Ser
Gly Ala Gln Ser Gly Gln (SEQ ID NO:20);

Val Arg His Leu Pro Pro Leu Pro Ala Leu Phe Asp Ala Met Lys Met Glu Phe Val
20 Thr Ser Val Gln Phe (SEQ ID NO:21);

Asp Met Thr Met Pro Thr Gly Met Thr Lys Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Val Ser
Thr (SEQ ID NO:22);

25 Ala Thr Ala Gly Pro Leu His Glu Pro Asp Ile Phe Leu Ala Met Lys Met Glu Val Val
Asp Val Thr Asn Lys Ala Gly Gln (SEQ ID NO:23);

Ser Met Trp Glu Thr Leu Asn Ala Gln Lys Thr Val Leu Leu (SEQ ID NO:24);

30 Ser His Pro Ser Gln Leu Met Thr Asn Asp Ile Phe Glu Gly Met Lys Met Leu Tyr His
(SEQ ID NO:25);

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

44

Thr Ser Glu Leu Ser Lys Leu Asp Ala Thr Ile Phe Ala Ala Met Lys Met Gln Trp Trp
Asn Pro Gly (SEQ ID NO:27);

Val Met Glu Thr Gly Leu Asp Leu Arg Pro Ile Leu Thr Gly Met Lys Met Asp Trp Ile
5 Pro Lys (SEQ ID NO:28);

Leu His His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Met Val Trp Asn His Arg (SEQ ID NO:30);

Pro Gln Gly Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Leu Trp Arg Ser (SEQ ID NO:31);
10

Leu Ala Gly Thr Phe Glu Ala Leu Lys Met Ala Trp His Glu His (SEQ ID NO:32);

Leu Asn Ala Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Gly (SEQ ID NO:33);

15 Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Leu Arg Asp (SEQ ID NO:34);

Leu Leu Arg Thr Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Asn Gly (SEQ ID NO:35);

Leu Ser Thr Ile Met Glu Gly Met Lys Met Tyr Ile Gln Arg Ser (SEQ ID NO:36);
20

Leu Ser Asp Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Cys (SEQ ID NO:37);

Leu Glu Ser Met Leu Glu Ala Met Lys Met Gln Trp Asn Pro Gln (SEQ ID NO:38);

25 Leu Ser Asp Ile Phe Asp Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Gln (SEQ ID NO:39);

Leu Ala Pro Phe Phe Glu Ser Met Lys Met Val Trp Arg Glu His (SEQ ID NO:40);

Leu Lys Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Thr Ala Met (SEQ ID NO:41);
30

Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Asn Ser (SEQ ID NO:42);

Leu Leu Gln Thr Phe Asp Ala Met Lys Met Glu Trp Leu Pro Lys (SEQ ID NO:43);

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

45

- Val Phe Asp Ile Leu Glu Ala Gln Lys Val Val Thr Leu Arg Phe (SEQ ID NO:44);
- Leu Val Ser Met Phe Asp Gly Met Lys Met Glu Trp Lys Thr Leu (SEQ ID NO:45);
- 5 Leu Glu Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Leu Glu (SEQ ID NO:46);
- Leu Lys Glu Ile Phe Glu Gly Met Lys Met Glu Phe Val Lys Pro (SEQ ID NO:47);
- Leu Gly Gly Ile Glu Ala Gln Lys Met Leu Leu Tyr Arg Gly Asn (SEQ ID NO:48);
- 10 Arg Pro Val Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Val Trp Lys Pro (SEQ ID NO:50);
- Arg Ser Pro Ile Ala Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Arg Glu Thr (SEQ ID NO:51);
- 15 Gln Asp Ser Ile Met Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ser Trp His Val Asn (SEQ ID NO:52);
- 20 Asp Gly Val Leu Phe Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Arg Leu Glu Thr (SEQ ID NO:53);
- Val Ser Arg Thr Met Thr Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Tyr His Asp Leu (SEQ ID NO:54);
- 25 Asp Val Leu Leu Pro Thr Val Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Ile Thr Lys (SEQ ID NO:55);
- Pro Asn Asp Leu Glu Arg Ile Phe Asp Ala Met Lys Ile Val Thr Val His Ser (SEQ ID NO:56);
- 30 Thr Arg Ala Leu Leu Glu Ile Phe Asp Ala Gln Lys Met Leu Tyr Gln His Leu (SEQ ID NO:57);

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

46

- Arg Asp Val His Val Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Thr Val Glu Thr (SEQ ID NO:58);
- 5 Gly Asp Lys Leu Thr Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Ile Gln Trp Thr Ser Gly (SEQ ID NO:59);
- Leu Glu Gly Leu Arg Ala Val Phe Glu Ser Met Lys Met Glu Leu Ala Asp Glu (SEQ ID NO:60);
- 10 Val Ala Asp Ser His Asp Thr Phe Ala Ala Met Lys Met Val Trp Leu Asp Thr (SEQ ID NO:61);
- Gly Leu Pro Leu Gln Asp Ile Leu Glu Ser Met Lys Ile Val Met Thr Ser Gly (SEQ ID NO:62);
- 15 Arg Val Pro Leu Glu Ala Ile Phe Glu Gly Ala Lys Met Ile Trp Val Pro Asn Asn (SEQ ID NO:63);
- Pro Met Ile Ser His Lys Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Lys Phe Val Pro Glu (SEQ ID NO:64);
- 20 Lys Leu Gly Leu Pro Ala Met Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp His Pro Ser (SEQ ID NO:65);
- Gln Pro Ser Leu Leu Ser Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Gln Ala Ser Leu Met (SEQ ID NO:66);
- Leu Leu Glu Leu Arg Ser Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp Gln Ile Ser (SEQ ID NO:67);
- 30 Asp Glu Glu Leu Asn Gln Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Pro Leu Val His Val Thr Lys (SEQ ID NO:68);

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

47

Ser Asn Leu Val Ser Leu Leu His Ser Gln Lys Ile Leu Trp Thr Asp Pro Gln Ser Phe Gly
(SEQ ID NO:70);

5 Leu Phe Leu His Asp Phe Leu Asn Ala Gln Lys Val Glu Leu Tyr Pro Val Thr Ser Ser
Gly (SEQ ID NO:71);

Ser Asp Ile Asn Ala Leu Leu Ser Thr Gln Lys Ile Tyr Trp Ala His (SEQ ID NO:72);

10 Met Ala Ser Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ser Gln Lys Met Glu Trp Arg Ser Asn Ala
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:73);

Met Ala His Ser Leu Val Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Asp Pro Phe Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:75);

15 Met Gly Pro Asp Leu Val Asn Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Pro Leu Thr Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:76);

20 Met Ala Phe Ser Leu Arg Ser Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Leu Arg Asn Thr Pro
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:77);

Met Ala Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp Thr
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:78);

25 Met Ser Ser Tyr Leu Ala Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Ser Ala Tyr Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:79);

Met Ala Lys Ala Leu Gln Lys Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp Arg Ser His Pro
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:80);

30 Met Ala Phe Gln Leu Cys Lys Ile Phe Tyr Ala Gln Lys Met Glu Trp His Gly Val Gly
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:81);

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

48

Met Ala Gly Ser Leu Ser Thr Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Val Gly Lys Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:82);

5 Met Ala Gln Gln Leu Pro Asp Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Ile Ala Gly Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:83);

Met Ala Gln Arg Leu Phe His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Gly Pro Lys Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:84);

10 Met Ala Gly Cys Leu Gly Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp Arg His Phe Val
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:85);

Met Ala Trp Ser Leu Lys Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Ser Pro Gly Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:86);

15

Met Ala Leu Gly Leu Thr Arg Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Arg Asp Ser
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:87);

20 Met Ala Gly Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Arg Pro Leu
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:88), and;

Met Ala Asp Arg Leu Ala Tyr Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp His Pro His Lys
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:89).

25 21. A method according to any one of the preceding claims wherein the peptide is a
peptide of 15 amino acids in length.

22. A method according to claim 21 wherein the peptide is of SEQ ID NO 2

30 Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu (SEQ ID NO 2).

23. A method according to any one of the preceding claims wherein the fusion
protein comprises an antigen.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

49

24. A method according to claim 23 wherein an antigen library is used to create the array.
25. A method according to any one of claims 1 to 22 wherein the fusion protein
5 comprises an antibody binding protein.
26. A method according to claim 25 wherein the antibody binding protein is one or more of Protein A, Protein G and Protein L.
- 10 27. A method according to claim 26 wherein the antibody binding protein comprises a mixture of Protein A, Protein G and Protein L.
28. A method according to any one of claims 25 to 27 wherein the antibody binding protein may be fused to the said peptide at the N-terminus thereof or it may be fused to
15 said peptide at the C-terminus thereof.
29. A method according to any one of the preceding claims wherein prior to step (iv), the identity of the expressed fusion protein is confirmed.
- 20 30. A method according to claim 29 wherein the identity is confirmed using mass spectrometry.
31. A method according to any one of the preceding claims wherein protein normalisation is carried out by detecting the peptide of SEQ ID NO 1 in the fusion
25 protein which acts as an internal control.
32. A method according to any one of the preceding claims wherein protein normalisation is carried out by detecting the peptide sequence tag of any one of claims 1 to 8 in the fusion protein which acts as an internal control.
30
33. A method according to claim 31 or claim 32 wherein the peptide is detected by an antibody with a high affinity for the said peptide.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

50

34. A method according to any one of claims 31 to 33 wherein the protein normalisation is effected by performing an immunoassay simultaneously with subsequent analysis of a biological sample using the array.
- 5 35. A method according to any one of the preceding claims wherein the avidin or streptavidin coated non-porous support used in step (iv) is a glass or plastics material.
36. A method according to any one of the preceding claims wherein a further acceptor layer is provided on top of the foundation of the streptavidin layer on the
10 support.
37. A method according to any one of the preceding claims wherein the array comprises from 3 – 10,000 different fusion proteins.
- 15 38. A method according to claim 37 wherein each protein is present in a form in which the peptide including SEQ ID NO 1 is fused to the C-terminus, and also in a form in which the peptide including SEQ ID NO 1 is fused to the N-terminus.
39. A protein array obtained by a method according to any one of the preceding
20 claims.
40. A method of detecting binding between an antibody and an antigen, said method comprising the steps of:
(vi) applying to the array according to claim 39 a sample which contains or is suspected
25 of containing an antibody in the case of an array of step (v)(a), or an antigen in the case of the array of step (v) (b); and
(vii) detecting bound antibody or antigen on the support.
41. A method according to claim 40 wherein step (vii) is carried out by ELISA
30 methods.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

51

42. A method according to claim 40 and claim 41 wherein the fusion protein array continues to be monitored for quality and /or the density of the protein during step (vi) and/or step (vii).
- 5 43. A method according to claim 42 wherein the monitoring is effected by detecting the peptide which comprises SEQ ID NO 1.
44. A method according to claim 42 wherein array comprises fusion proteins which further comprise a second peptide sequence, and monitoring is effected by detecting the presence of the second peptide sequence, wherein the second peptide sequence
10 comprises between 1 and 30 amino acids.
45. A method according to any one of claims 1 to 38 or claims 40 to 44 wherein at least some of the steps are operated automatically.
- 15 46. A method according to claim 45 wherein all the steps of the method are operated automatically.
47. A fusion protein comprising an antibody binding protein fused at the N- or C-
20 terminus to a peptide of 13 to 50 amino acids, which comprises SEQ ID NO 1.
48. A fusion protein according to claim 47 wherein the peptide of SEQ ID NO 1 is a peptide of SEQ ID NO 2.
- 25 49. A fusion protein according to claim 47 or claim 48 further comprising a second peptide sequence which acts as a tag sequence to the fusion protein wherein the sequence comprises between 1 and 20 amino acids.
50. A fusion protein according to any one of claims 47 to 49 wherein the antibody
30 binding protein is Protein A, G or L or a mixture thereof.
51. A nucleic acid sequence, which encodes the fusion protein according to any one of claims 47 to 50.

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

52

52. A nucleic acid according to claim 51 wherein the sequence which encodes the peptide is of SEQ ID NO 9:

GGCCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGGCAGAA

5 (SEQ ID NO 9).

53. A method, fusion protein or nucleic acid sequence substantially as hereinbefore described with reference to the accompanying figures.

10

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

1/15

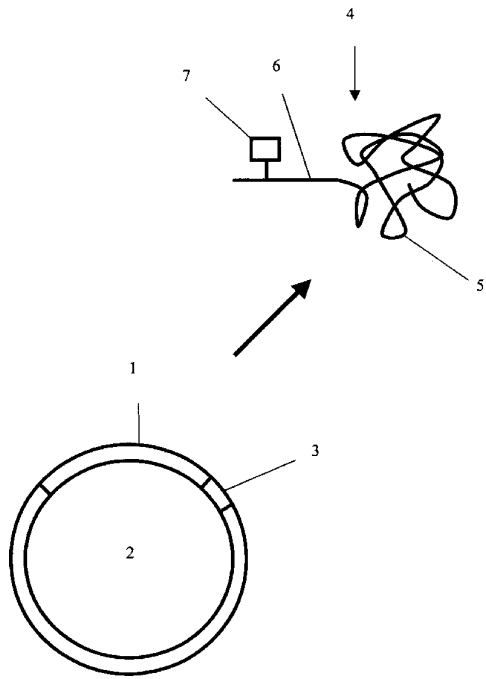


Figure 1

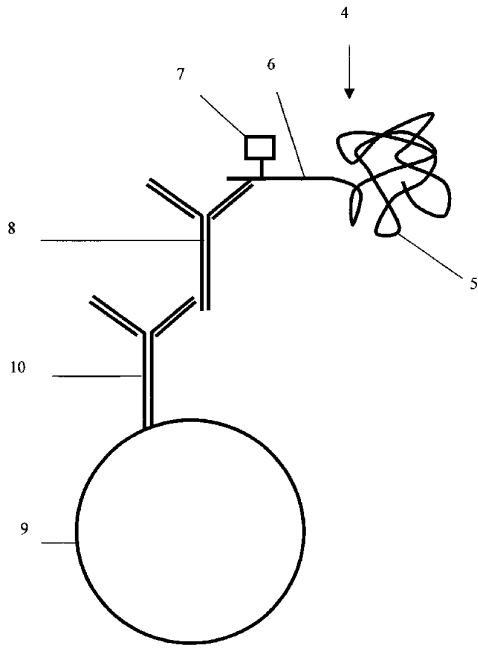


Figure 2

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

3/15

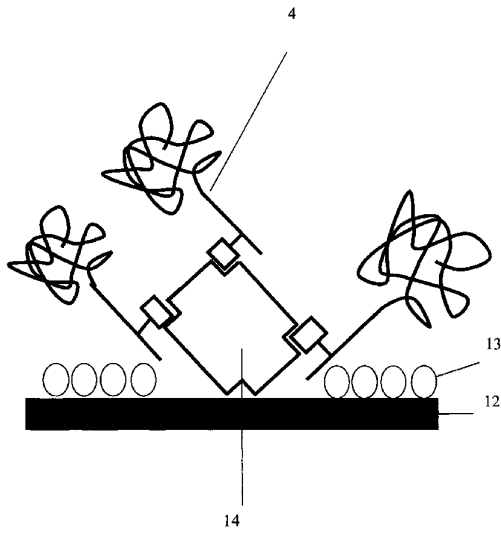


Figure 3

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

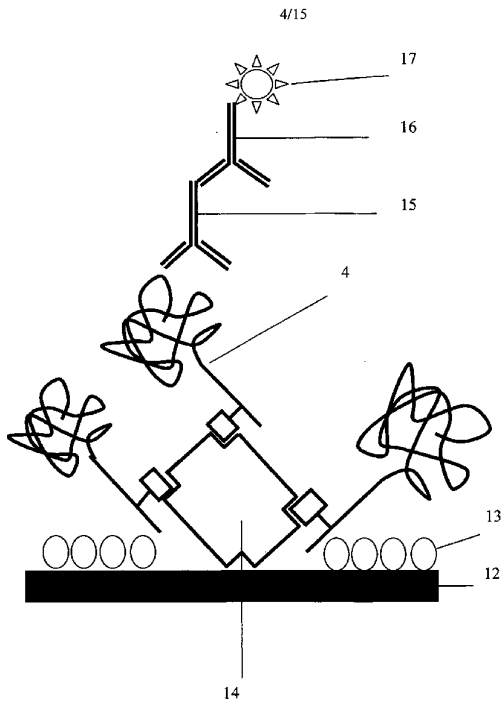


Figure 4

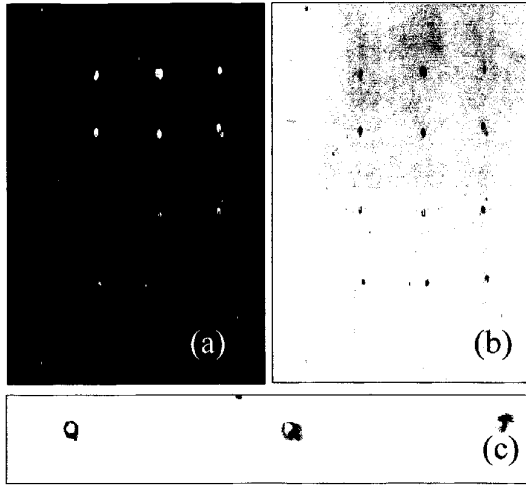


Figure 5

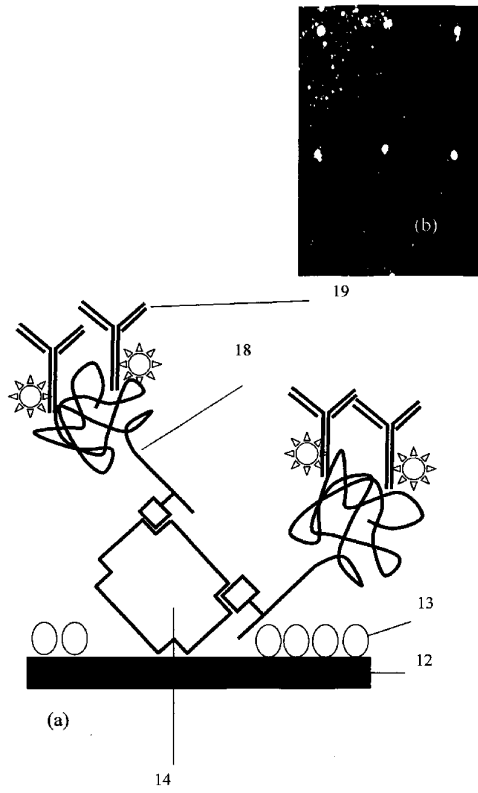


Figure 6

Figure 7

pAN-4

GTTTGACAGCTTATCATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCAT
 CGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGTCTGTAATCACTGCATAATCGTGTCCGCTCAAG
 GCGCACTCCCGTCTGGATAATGTTTTTGGCCGCAATCATACCGTCTGGCAAATA
 TTCTGAAATGAGCTGTGACAAATTAATCATCCGGCTGATATAATGTGGAAATGTGAG
 CGGATAACAATTTACACAGGAACAGACCATGTCGGCCCTGAACGCATCTTCAGGGC
 TCAGAAAAATCGAATGGCAGAAAGCGCCGCGAGCTCGAGGATCCCGGGTACCAAGCTTG
 GCTGTTTTGGCGGATGAGAGAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAATCAGAACCGCAGA
 AGCGCTGTGATAAACAGAAATTTGCCTGGCCGAGTAGCCGGTGTGCCACCTGACCC
 CATGCCAACTCAGAACTGAAACGCCGTAGCCCGGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATG
 CGAGAGTAGGGAAGCTCCAGGCATCAATATAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGCC
 CTTTCGTTTTATCTGTGTTTGTGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCGG
 GAGCGGATTTGAACCTTGGCAAGCAACGGCCGGAGGGTGGCGGGCAGGAGCCCGCCA
 TAARCTGCCAGGCATCAAAATTAAGCAGAAGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTGGCGTT
 TCTACAACTCTTTTGTGTTATTTTCTAAATACATCAAAATATGATCCGCTCATGAG
 ACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATGAAAAGGCAAGACTATGAGTATTCAC
 AATTCGCTGTGGCCCTTATTCCTTTTTTGGGCCAATTTGCTCTCTGTTTTGCTCAC
 CCAGAAACCTGGTGAAGTAAAGTAAAGATGCTGAAGTACAGTTGGGTGCAGGATGGGTTA
 CATCGAACTGGATCTCAACAGGGGTAAAGTCTTGGAGGTTTTGCCCCGAAAGACGTTT
 TTCCAAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTTGGCCGGTATAATCCCGTGTGAC
 GCCTGCAAGAGCAACTCGCTCCCGCAATACATAATCTCAGAAATGACTTTGGTGAATG
 CTCACAGTCAAGAAAGCACTTACGGATGCACTGACACTAAAGAGATTTGCAATG
 CTGCCAATACGATGATTAACACTGCGCACTACTCTGCAAGCATCCGAGGA
 CGAAGGAGCTAACCTTTTTTGCACACATGGGGATCACTGAACTCGCTTGATCG
 TTGGAAACGGAGCTGAATGAAGCAATACCAAAACAGCAGGCTGACACCACTGCTTA
 ACGCAATGGCAACAGCTTGGCAAACTATAAATGGGAACTACTACTCTAGCTTCC
 CGCAACAATTAATAGACTGGAGGGGATTAAGTTGACAGCACTCTCTGGCTC
 GCGCTTCGGCTGGCTGTTTTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGGCTGGCTC
 GCGTATCATGACCACTGGGCGCAGTGGTAAACCCCTCCCGTATCGTATGATCTAC
 ACGCGGGAGTCAAGCACTATGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGTAGGCTAC
 CTCAGTAAATGCAATTTGCTACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTAGATG
 ATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGTGAAGTCCCTTTTTGATAATCTC
 ATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCCTCCACTGAGGCTGACAGCCCGTAGAAAA
 GATCAACAGATCTTCTGAGATCCCTTTTTCTCGCGTAACTGTGCTTGCAGACAA
 AAAAACCCAGCTACAGCGGTGGTTTTGTTGGCGGATCAAGAGCTACCACTCTTTT
 CGAAGTAACTGGCTTACAGAGAGCGAGATACCAATACCTGCTTCTAGTGTAGCC
 GTAGTTAGCCACCCTTACAGAACTCTGTAGCAGCCCTACATACCTCGCTCTGCTAA
 TCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCAAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGTTGGACTCA
 AGACGATAGTTACCGGATAAGCGCGAGCGGCTGGGCTGAACGGGGGTTCTGACACCA
 CCCCAGCTTGGAGCGAACGACTACACCGAATGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAG
 AAGCGCCACCCTTCCGAAAGGAGAAAGGGGAGGATACCGGTAAGCGGAGGGTCC
 GNAACGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGATCTTTATAGTCC
 TGTCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAAGCTGATTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGG
 GGAGCTATGGAAAACGCCAGCAACCGGGCTTTTTACGGTTCTGGCTTTTTGCTGG
 CCTTTGCTCAGATGCTTCTCTGCTTATCCCTGATCTGTGGATAACCGTATTTAC
 CGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGAGCCGAAACGACGAGCGCAGGAGTCAAG
 TGAGCGAGGAGCGGAGAGCGGCTGATCGGGTATTTCTCCTTACGCTCTGTGCGGT
 ATTTACACCCGATATGTTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAG
 CCAGTATACACTCCGCTATCGCTAGTACTGGTCACTGGCTGGCCCGCACCCCGCC
 AACCCCGCTGACCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCGGCATCCGCTTACAGACAAG
 CTGTGACCGCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGTTTTCACCTCATACCCGAAACCC
 CGGAGGCGAGCATCAATTCGGCGGAGAGGCGAAGCGGCATGCATTTACGTTGACACC
 ATCGAATGGTGAAAACCTTTCCGGGTATGGCATGATAGCCGCCGGAAGAGAGTCAAT
 CAGGTTGGTGAATGTGAAACAGTAACTTATACGATGTCGACAGATATGCCGTTCT
 CTTATCAGACCGTTTTCCCGGTGGTGAACAGGCCAGCCAGTTTTCTGGAAAACGGGG

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

8/15

GAAAAAGTGGAAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAA
 ACTGGCGGGCAAAACAGTCGTGTGCTGATTTGGCGTTGCCACCTCCAGCTCTGGCCCTGGCAG
 CGCGCTCGCAAAATTTGGCGGCGATTAAATCTCGCGCGATCAACTGGGTGCCAGCCTG
 GTGGTTCGATGGTAGAACGAAGCGGCGTGAAGCCTTAAGACCGGCGGTGCCAATCT
 TCTCGCGCAACCGGTCAGTGGGCTGATCATTAACCTAATCCGCTGGATGACAGGATGCCA
 TTGCTCTGGAAGCTGCTGCACTAATGTTCCGGCGTATTTCTTGATGCTCTGACCAG
 ACACCCATCAACAGTATTTTCTCCCATGAGACCGGTACCGCACTGGCGGTGAAGCA
 TCTGTCCCATTTGGTCAACAGCAATCCGCGTGTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGCTG
 CGCGCGCTCTGGCTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAAATTCAGCG
 ATAGCGAAACGGGAAGGCACTGGATGCCATGTCGGGTTTTTCAACAAACATGCAAAAT
 GCTGAATGAGGGCATCGTCCCACTGGGATGCTGTTGGTCCAAAGATCAGATGGCGCTGG
 GCGCAATGGCGCCATTAGCGAGTCCGGGCTGGCGTTGGTGGGATATCTCGGTAGTG
 GGATACGCGATACCGAAGACAGCTCATGTATATCCCGCGTTAAACCAATCAAAAC
 GGATTTCCGCTGCTGGGCAACAGCGTGGACCGCTTCTGCAACTCTCTCAGGGCC
 AGGCGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGCTGAAAGAAAACCAACCTG
 GCGCCAAATACGCAACCGCTCTCCCGCGGCTGGCGGATTCATTAATGACGCTGGC
 ACGACAGCTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAG
 CGGCAATTGATCTG

Figure 8

pAN-5

GTTTGACAGCTTATCATGACTGCAGGTCACCAATGCTTCTGGGTCAGGCAGCCAT
 CGGAAGCTGTGGTGGCTGTGACAGCTCGTAAATCACTGCATAATTCGTGCGCTCAAG
 GCGCACTCCCTTCTGGATAATGTTTTTTGGCCGACATCATAACGGTCTGGCAAAATA
 TTCTGAATGAGCTGTGCAAAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGAATTTGTGAG
 CGGATAACAATTTACACAGGAACAGACCATGTCGGCTGAAACGACATCTTCGAGGC
 TCAGAAATCGAATGGCAGGAAGGCGCGCGGAGCTCGAGGATCCCGGTTACAGCTT
 GGCTGTTTTGGCGATGAGAGAGATTTCAGCCTGATACAGATTAATCAGAACGACAG
 AAGCGCTGTGATAAACAAGAAATTTGCCCTGGCGGAGTAGCGCGGTGCTCCCACTGACC
 COATGCCAACTCAGAAGTGAACCGCCTAGCGCGATGGTAGTGTGGGTCTCCCAT
 GCGAGAGTAGGCACTGCCAGGCAATCAATAAACGAAAGGCTCAGTGCAGAACTGGG
 CCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGGTGAACGCTCTCCTGACTAGGACAAATCCGCGG
 GGAGCGGATTTGAACGTTCCGAAGCAACCGCGGAGGTTGGCGGCGAGGACCGCGCC
 ATAACTGCCAGGCAATCAAAATTAAGCAGAAGGCCATCCGACGGATGGCTTTTGGGT
 TTCTAAACTCTTTTGTATTATTTCTAAATACATCAAAATATGATCCGCTCATGA
 GACCAATAACCTGATAAATGCTCAATAATATTGAANAAGGAAGATATGAGTATTCAA
 CATTTCGGTGTCCCTTATCCCTTTTTGGGCAATTTGCTCTCTGTTTTGCTCA
 CCGAAGAACGCTGGTGAAGATAAAGATGCTGAAGATCAAGTTGGGTGCAAGATGGGTT
 ACATCGAACTGGATCTCAACACCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTGGCCCGAAGAACTG
 TTTCCAAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGATTAATCCCGTGTGA
 CGCGGGCAAGGAACTCGGTCGCGCATACACTATCTCAGAAATGACTGGTGTGAGT
 ACTACCACTCAGAGAAAGCATCTTAGGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATATGCACT
 GCTGCCATAACCATGATGATTAACACTGGGCGCAACTTACTTCTGACAAAGATCGGAG
 ACGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGATCATGTAATCGGCTGATC
 GTTGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAGGAGGATGACAGCAACGATGGCT
 ACAGCAATGGCAACAAGCTTGGCAACTATAAAGTGGGAACTACTTACTCTAGCTTC
 CGGCAACAAATTAAGACTGGATGGAGGGGATAAAGTTGACAGGACCTTCTGCGCT
 CGGCTTCCGGCTGGCTGTTTTATGCTGATAAATCTGGAGCGGTGAGCGTGGSTCT
 CGGCTATCATTTGACGACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTATTAATCTA
 CAGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGG
 CCTCATGATTAAGCAATGGTAACTGTGACAGCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATT
 GATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCAGGTGAGATCCTTTTGTATAATCT
 CATGACCAAAATCCCTTACGCTGACTTTGGTTCCACTGAGCCTCGAGCCCGTAGAA
 AGATCAAGGATCTTTGAGATCCTTTTTTTCGGCTAATCTGCTGCTTGCARCA
 AAAAAACCGCTACAGCGCTGGTTTTTTCGGCATCAAGACTACCAACTCTTT
 TCGAAGTACTGCTTCAGCAGGCGGATACCAAAATACGCTCTTCTAGTGTAGC
 CTTAGTTAGGCCACCCTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTA

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

9/15

ATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTFCGTCTTACC0GGTTGGACTC
 AAGACGATAGTTACCGGATAAGGGGAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTCACAC
 AGCCGAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGA
 GAAGCGCCACGCTTCCGAGGGAGAAAGGGCGACAGTATCCGGTAAGCGCGAGGGT
 CGAACAGGAGCGGCACAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCT
 CTGTCGGGTTTCGCCACTCTGACTTGAAGCTCGATTTTGTGATGCTGTCAGGGGGG
 CGGAGCCATGGAAAACGCCAGCAACCGGGCTTTTACGGTCTCTGGCTTTTGGCTG
 GCCTTTTGTCCACATGCTTTCCTGGTATCCCTGATTCGTGGATAACCGTATTA
 CGCCCTTGTAGTGGTATACCGCTCGCCGAGCGGAAACCGAGCGAGCGAGTCA
 GTAGCGAGGAAAGCGAGAGCGCTGATCGGATTTTCTCTTACCGATCTGTGGG
 TATTTACACCGCATATGTTGCACTCTCAGTACATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAA
 GCCAGTATACCTCCGATTCGCTAGCTGACTGGGTCATGGCTGGCCCGGACACCCG
 CAACACCGCTGACCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCGGGATCCGCTTACAGACAA
 GCTGTGACCTCTCCGGGAGCTGCACTGTGTCAGAGGTTTTCACCGTATCACCAGAAACG
 CCGAGGACAGCAGTCAATTCGGCGGGAAGCGAAGCGGATGCAATTTACGTTGACAC
 CATCGAATGGTCAAACCTTTCGGGATGGCATGATAGCGCCGGAGAGAGTCAAT
 TCAGGGTGGTGAATGTGAAACGATTAACGTTATACGATCTCGCAGAGTATGCCGGTGT
 TCTTATCAGACCGTTTCCCGGCTGGTAAACAGGCGACGACGTTTCTGGAAAACCGG
 GGAAAAGTGGAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTAATTCACATTCACCGGCTGGCACAAC
 AACTGGCGGGCAACAGCTGCTGCTGATTTGGGCTTGGCACTCCAGTCTGGCCCTGCAC
 CGCGCTCGCAATTTGTGGCGGATTAATTCGCGCGGATCACTGGGTGGCAGCGT
 GGTGGTTCGATGGTAGACGAAAGCGGCTTGAAGCTGTAAAGCGGGGTCGACATTC
 TTTCCGGCAACCGCTCAGTGGGCTGATCAATTAACATTCGCTGATGACGACAGGATGCC
 ATTGCTGGGAAGTGGCGCACTAATGTTCCGGCTTATTTCTGATGCTCTCGACCA
 GACCCCATCAACGATATATTTTCCCGATGAGAGCGGTACCGGATTCGGCGGAGG
 ATCTGGTCCGATTTGGTCACTCAAAATCCGCTGTAGCGGGCCATTAAGTCTCTGTC
 TCGGCGCTCTGGCTCGCTGGCTGGCAAAATTCAGCTCGCAATCAAAATTCAGCC
 GATAGCGAAGCGGAGCGGACTGGAGTCCCATTCGCGGTTTCAACAAACATSCAAA
 TCGTAATCAGGGCATCGTCCCACTGCGATCTGGTTGCCAAGCATCAGATGGCGCTG
 GCGCAATCGCGCATTAACGACTCCGGCTCGCGTGGTGGGATATCTCGGTAGT
 GCGATACGAGATCCGAGACAGCTCACTTATATCCCGCGTTAAACCGATCAAAAC
 AGAATTTCCGCTGCGGCAACCAACCGCTGGAGCGCTTGTGCAACTCTCTCAGGGC
 CAGCGGTTGAGGGCAATCAGCTCTTCCCGCTCTCAGCTGTAAGAAAGAAAACCCCT
 GCGGCCAATACGCAACCCCTCTCCCGCGGTTGGCGGATTCATTAATGCACTGG
 CACGACAGGTTCCCGACTGGAAGCGGCGAGTGGCGCAACGCAATTAATGTAGTTA
 GCGCAATTTGATCTG

Figure 9

pAN-6

GTTTGACAGCTTATCATCGACTGCAGGCTGCACCAATGCTCTGGCTCAGCGAGCCAT
 GGGAGCTGSGTATGCGCTGCGAGTGGTAATCACTGATTAATTTGTTGCTCCCTCAAG
 GCGACTCCCTTCTGATTAATGTTTTTTCGCGGACATATAACGCTTCTGGCAATA
 TTTCTGAATGAGCTGTTGACAATTAATCTCCGGCTCGTATAATCTTGGAAATTTGAG
 CGGTAACAATTTACACAGCAACAGACCAATGTCGGGCTGAACGACATCTTCGAGGC
 TCAAAAATCCGATGGCAGGAGGGCGGGGAGCTCGAGGATCCCGGTACCGAGCT
 TGGCTGTTTTGGGGATGAGAGAAGATTTTACGCTGATACAGATTAATCAGAACGCA
 GAAGCGCTGATAAACAAGAAATTTCCCTGGCGGAGTAGCGGTTGGTCCCACTGAC
 CCGATGCCAAGTCAAGANGTAAACCGCTTAGCGCGATGAGTGTGGGGTCTCCCGCA
 TCGAGAGTAGGAACTCCGAGGATCAAAATAAAGCAAAAGGCTCAGTCGAAGACTGG
 GCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTGGTGAACGCTCTCTGAGTAGGCAAAATCCGCG
 GGGAGCGGATTTGACGTTGCGAAGCAAGCGCGGAGGCTGGCGGAGGACCGCGC
 CATAAACTGCCAGGATCAAAATTAAGCAGAAGGCGATCTGACGGATGGCTTTTGGG
 TTTCTACAACTCTTTTGTATTTTCTAAATACATTCAAATATGATCCGCTCATG
 AGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATTTGAAAAGGAAAGATGAGTATTCA
 ACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGGTC
 ACCAGAAAACCGTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTGGGTGACAGAGTGGT

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

10/15

TACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGTCTTGAGAGTTTTGGCCCGAAGAACG
TTTCCAAATGATGAGCACTTTAAAGTCTGTATGTTGGCGCGGTATTTCCCGTGTG
ACGCCGGCAAGGCAACTCGGTCCGCCATACACTATTCICAGAAATGACTGGTTGAG
TACTCACCAGTCAAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATATGGAG
TGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGGCCCAACTTACTCTGACACAGATCGGAG
GACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCACAAACATGGGGGATCATTAACCTCGCTTGAT
CGTTGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACACGAGCGTGACACCAGATGCC
TACAGCAATGGCAACAGCTGGCAAACTATTAACCTGGCGAATCTTACTCTAGCTT
CCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGGCC
TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC
TCGGGTATCATTTGACCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGATCGTAGTTATCT
ACACGACGGGAGCTCAGGCAACTATGGATGACAGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGT
GCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATCTTAGAT
TGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGTGAAGATCTTTTGATAAATC
TCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTGTTCGTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAA
AAGATCAAAAGATCTCTTGAATCTTTTTCGCGGTAACTGCTGCTTGCACAAAC
AAAAAACACCCTGACCAGCGGTGGTTTCTTTCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTT
TTCGAAAGTAACTGGCTTCCAGAGAGCCAGATACCAAACTCTCTTCTAGTGTAG
CGTAGTTAGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTTCGCT
AATCTGTTACCAAGTGGCTCTGCGAGTGGCGATAAGTCTGCTTACCAGGTGGGCT
CAAGACGATAGTTACCGGATTAAGCCGACCGGTCCGGCTGAACGGGGGTCTGTGCACA
CAGCCAGCTTGGAGGACGACCTACACCGAATGAGATACCTACAGCGTAGCTATG
AGAAAGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGCGGACGATCTCCGTAAAGGCGAAGG
TCGAAACCGGAGGCGCACCGGACCTTCCAGGGGAACCGCTGATCTTTAATAGT
CCTGTCCGTTTCCGACCTCTGACTGAGCGCTGATTTTCTGATGCTGCTCAGAGGG
GGGAGCCTATGAAACCGGACGACCGGCTTTTACGGTTCCTGGCTTTTGTCT
GGCTTTTCTCAGATGTTCTTCCGCTTATCCCTGATCTCTGTAACCGTAT
ACCGCTTTGAGTGAAGTGAATACCGCTCCCGACCGAAGCAAGCGCAGCGAGT
AGTAGGAGGACGAGCGAAGCGCTGATGCGGTATTTCTCTTACGATCTGTGCG
GTATTTCAACCGCATATGGTCACTCTCAGTCAATCTGCTGATGCGCATAGTTA
AGCAGTATACACTCCGCTATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CCAAACCCGCTGACGCGCCCTGACGGCTTGTCTGCTCCGGCATCCGTTACAGACA
AGCTGTGACGCTCTCCGGAGTGCATGCTCAGAGTTTCCACCGTCAACCCGAAC
GCGGAGGACGAGATCAATTCGGGGCAAGGCGAAGCGGATGCATTTACGTTGACA
CCATCGAATGGTCAAAACCTTTCGGGATGGCATGATAGCGCCGGAAAGAGTCAA
TTCAGGGTGGTGAATGTGAAACAGTAACTTATAAGATGTCGAGAGTATGCGGCT
CTCTATCAGCCGTTCCCGGTGGTGAACGAGCCGACCGTTTCTCGAAAACG
GGAAAAGTGGAAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTAACATCCCAACCGGTTGGCACAA
CAACTGGCGGCAACAGCTCGTGGTGGGTTGCCACCTCCAGCTCTGGCCCTGCA
CGCGCCCTCGCAATTTGCGCGGCAATTAATCTCGCGCGATCAACTGGGTGCGCAGCG
TGGTGGTCTCGATGGTGAACGAGCGGCTCGAAGCGCTGAAGCGCGGTTGCACAAT
CTTCTCGCGCAACCGCTCAGTGGCTGATCAATTAACATTCGCGTGGATGACAGGATGC
CATCTGTGGAGCTGCTGCACTAATCTCCCGGTTATTTCTTGTGATCTCTGACC
AGACCCCAACAAGTATTTTCTCCATGAAGACGCTACCGGACTGGGCGTGGAG
CATCTGGTCCATGGTCAACAGCAATCGCGCTGTAGCGGGCCATTAAGTTCTGT
CTCGCGGCTCTGCTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGC
CGATAGCGGAACGGGAGGGAGCTGGAGTCCATGCTCCGGTTTCAACAACCATGCAA
ATGCTGAATGAGGGCATCTGTTCCCACTGGGATGCTGGTGGCAAGATCAGATGGGCT
GGGCAATCGCGGCAATACCGACTCCGGGCTGCGCTGGTGGGATATCTCGGTAG
TGGGATACGAGGATACCGAAGACAGCTCATTTATATCCCGCGTTAACCCATCAA
CAGGATTTTCCGCTGCTGGGGCAACGAGCGTGGACCGCTTGCCTGCACTCTCTCAGGG
CCAGCGGTGAAGGCAATCAGCTGTGGCCGCTCACTGGTGAAGAAAACCCACC
TGGCCCAATACGCAACCGCTCTCCCGCGCTGGCGGATTCATTAATGAGCAGCTG
GCACGACAGGTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTT
AGCGCAATGATCTG

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

11/15

Figure 10

pAC-4

GTTTGACAGCTTATCATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCAT
 CGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTGGTAAATCACTGCATAATTCGTGTCGCTCAAG
 GCGCACTCCCGTCTGGATAATGTTTTTGGCCGACATCATAACGGTCTTGGCAATA
 TCTGAAATGAGCTGTGACAAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAAATGTGAG
 CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGGAGCTCGAGGATCCCGGCAAGCTTG
 CTTGGTGGCGGTCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAATCGAATGGCCGAAATAAT
 AATTAGAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAGATTTCAGCCTGATACAGATTAA
 ATCAGAACCCAGAACGGTCTGATAAAACAGAAATTCCTGGCGGCACTAGCGCGGTGG
 TCCACCTGACCCCATGCGAACTCAGAACTGAAACGCGGTAGCGCCGATGGTAGTGTG
 GGGTCCCCATCGAGAGTAGGAACTGCCAGGCATCAATAAAGCAAGGCTCAGT
 CGAAAGACTGGGCTTTTCGTTTTATCTGTGTTTTGTGCGTGAACGCTCTCCTGAGTAGG
 ACAAATCCCGCGGAGCGGATTTGAACTGTGAAACGCAAGCGCCGAGCGTGGCGGSC
 AGGACGCGCCGAAACAGTGGCCAGGCATCAAAATAGACAGAGGCCCATCTGACGGATG
 GCCTTTTGGCTTTCTACAACTCTTTTTGTTTTATTTCTAATAACATTCAAATATGT
 ATCCCTCATGACAAATACCTGTAATGCTTCAATAATTTGAAAGGAGAGAT
 ATGAGTATCAACATTCGGTGTGGCTTATTCCTTTTTTGGCGCAATTTGGCTTCC
 TGTFTTGTCTCACCAAGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTG
 CAGGATGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGGGTAGATCCTTGAGAGTTTTCCG
 CCGAAGAACGTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCGTGATGTGGCGGGTAT
 ATCCCGTGTGAGCGCGGGAAGGCAACTCGGTCCCGCATACACTATCTCAGATG
 ACTTGGTGTGACTCCACAGTCAACAGAAAGCATCTTACGATGGCATGACAGTAA
 GAAATATGCACTGTGCCATAACCAAGAGTAACTGCGGCAACTTACTTCTGAC
 AACGATCGGAGCGGAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAATGGGGATCATGTA
 CCGCTTGTATCGTGGGAAACGGAGCTGAATGAAGCATAACAAACGAGCGGTGAC
 ACCAGATGCTACAGCAATGGCAACAACGTTGGCACAATATTAACCTGGCAACTACT
 TACTCTAGCTTCCCGCAACAAATAATAGACTGGATGAGGGGATAAAGTTGACAGGAC
 CACTTCTGGCTCGGCTTCCCGCTGGCTGGTTTTATGCTGATAAATCGGACCGGT
 GAGCTGGCTCGGGTATCAATGACGACTGGGCAAGATGGTAAAGCCTCCCGTAT
 CGTAGTATCTACAGCGGGGAGTCAAGCAACTGAGTGAACGAAATAGACAGATCG
 CTGAGTAGGTGCTCACTGATTAAGCACTGGTAACTGTAGACCAAGTTTACTCATAT
 ATACTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGARGATCCT
 TTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTGTTTCCACTGAGCGTCA
 ACCCGTAGAAAAGATCAAGGATCTCTTGTAGATCCTTTTTTCTGGCGTATCTGTC
 TGCTTCAAAACAAAACACCGCTACCAGCGGTGTTTTGTTTGGCGGATCAAGAGCT
 ACCAATCTTTTTCCGAAAGTAACTGGCTCAGCAGCGCGAGATACCAAAATCTGCTC
 TTCTAGTGTAGCGTAGTGTAGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCAGCGCTACATAC
 CTCGCTCTGTAATCCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGCTTAC
 CGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGGACGCGCTCGGCTGACGGGG
 GTTCGTGACACAGCCAGCTTGGAGGCAAGCCTACACCGAACTGAGTACCTACAG
 CTTGAGCTATGAGAAAGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGT
 AAGCGGCAAGTGGAAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGT
 ATCTTTATAGTCTGTGGGTTTTGCGCACTCTGACTGAGCGTGGATTTTTGTGATGC
 TCGTACGGGGGGGAGCTTATGAAAACCGCAGCAAGCGCGCTTTTTACGGTTCCT
 GGCCTTTGCTGGCTTTTGTACAGATGTTTTTCTGCGTATCCCTGATTCGCTG
 ATAAAGCTATACCGCTTTGAGTGAAGTGTATCCGCTCGCGCAGCGGACAGCGGAG
 CGCAGCGAGTCACTGAGCGGAGGAGCGGAAAGCGCTGATGCGGATTTTCTCTTAC
 GCATCTGTGCGTATTTACACCGCATATGCTGCACTCTCAGTCAATCTGCTCTGATG
 CCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTAGTGAAGTGGTCAAGGCTGCG
 CCGACACCCGCAACACCGCTGACGCGCCCTGACGGCTTGTCTGCTCCCGCATCC
 GCTTACAGAACTGTGACCGCTCTCCGAGCTGCAATGCTGCAAGGTTTTCACTGTC
 ATCACGAAACCGCGAGCGAGATCAATTCGCGCGGAGCGGAGCGGATGATGAT
 TTACGTTGACACCTCGATGCTGCAAACTTTCCGCGTATGGCATGATGCGCCCG
 AAGAGCTCAATCAGGCTGCTCAATGCAACCGTAAAGCTTATACGATCTGCGAGAG
 TATGCGGTTCTCTTATCAGACCGTTTTCCCGCTGGTAAACCGGACGCGCTTTC
 TCGAAAACCGGGAAAAGTGGAAAGCGGATGGCGGAGCTGAATTACATTTCCCAACC

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

13/15

CTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATA
 CCTCGCTCTGCTAACTCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAGTGTGCTCTTA
 CCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGAGCGGTTCGGGCTGAACGGGG
 GGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA
 GCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACCCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGCGACAGGTATCCGG
 TAGCGCGCAGGGTCGGAAACAGGAGAGCGCACAGGAGGACCTCCAGGGGGAAACCGCTGG
 TATCTTTATAGTCCCTGTCGGGTTTCCGCCCTCTGACTTGAAGCTGATTTTGTGATG
 CTCTCAGGGGGGGAGCCTATGGAATAAACGCCAGCAACCGCCCTTTTACGGTTC
 TGGCCTTTTGGCTGGCCTTTTGTACATGTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCGTG
 GATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTGCGCGGACCGCAACGACCGA
 CCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTA
 CGCATCTGTGGGTATTACACCGCATATGGTGCACCTCCTAGTACAATCTGCTCTGAT
 GCGCATCTTAAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGSGTCAATGGCTGG
 CCGCAGACCCCGCAACCCGCTGACCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATC
 CGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTTCCGGAGCTGCATGTGTACAGAGTTTTCACCGT
 CATCACCGAAACCGCGAGGCGAGCAGTCAATTCGGCGCGAAGGCGAAGCGGCATGCA
 FTTACGTTGACACCATCGAATGGTGCAAACTTTCCGGGTATGGCATGATGCGCCG
 GAAGAGAGTCAATCAGGGTGGTGAATGTGAACCACTAACGTTATACGATGTCGCGAG
 GTAGCCCGGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGGCTGTGAACCAAGCCACCGCAGCTTT
 CTGCGAARACCGCGAARATGTGAAAGCCCGAAGCGGAGCTGAATTTACATTCGCCAAC
 CCGTGGCCACAACAACGTGGCGGCAAACTCCTTGTGATTTGGCCTTGGCACCACG
 TCTGCGCTTCCACCGCCCTCCCAAAATGTGCGCGCATTTAAATCTCCCGCGATCAAC
 TGGTTCAGCGCTGCTGCTGATCTGATAGCAAGCGCCCTGCAAGCTCTAAAGCC
 CGGTGCAATCTCTTCCGCAACCGCTCACTGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGA
 TGACAGGATCCCATCTCTGTGAGCTGCTGCACTAATTTCCGGCTTATTCTTG
 ATGCTCTGACCAACACCCATCAACAGTATATTTTCCCATGAAGACCGTACGGGA
 CTGGCGCTGGAGCATCTGGTCCGATTTGGCTCACCAAAATCCGCGTGTAGCGGGCC
 ATTAAGTTCTGCTCCGGCGCTCTGCGCTGCTGGCTGGCTGGCTGATATAATCTCACCTGCA
 ATCAATTCAGCGATAGCGGAACGGGAAGCGGATGAGTGCATATGTCGGTTTTCA
 CAACCATGCAAAATGCTGAATGAGGGCATCTTCCCATGCGATCTGGTTGCCAAGCA
 TCGATGGCGCTGGCGCAATGCGCGCATTACCGAGTCCGGCTCCCGCTTGGTGGG
 ATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCGTTA
 ACCACCATCAAAACAGGATTTTCCGCTTCCGGGCAACCGAGCTGGAACCGCTTCTGCA
 ACTCTTCAGGGCCAGCGGTAAGGGCAATCAGCTGTTCGCCGCTCACCTGCTGA
 GAAAACCCACCTGGCGCCAAATAGCAAAACCGCTTCCCGCGCTTGGCGGATTC
 TTAATGCACTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGCACTGACCGCAACGCA
 TTAATGTAGTTAGCGCAATGATCTG

Figure 12.

pAC-6

GTTTGACAGCTTATCATCGACTGCACCGTGCACCAATGCTTCTGGCCTCAGGCACCAT
 CGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGTCTGTAATCACTGCATAATTCGTGTCGCTCAAG
 GCGCACTCCCGTCTGGATAATGTTTTCGCGCCGACATCAACGGTCTCTGGCAATA
 TTCTGAAATGAGCTGTGACAAATTAATCATCCGGCTGATATAATGTGGAAATGTGAG
 CGGATAACAATTTACACAGGAACAGACATGGAGCTCGAGGATCCDGGCAAGCTTC
 CGCGGGTGGCGCTGAAAGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGGCAGGATAA
 TTAATTAAGGCTTGGCTGTTTGGCGGATGAGAGAAATTTACGCTGATACAGATT
 AAATCAGAACGCAGAGCGGTGTGATAAARACAGAAATTCGCTGGCGCAGTAGCGCGGT
 GGTCCCACTGACCCATGCCAACTCAGAACTGAAAGCTGAAAGCCCGTACCCCGATGGTAGTG
 TGGGCTCCCGCATGAGAGTAGGGAACTGCCAGCATCAAAATAAAGCAAGGCTCA
 GTCGAAGACTGGGCTTCTTTTATCTTCTTGTGCTGAGAGCTCTCTCAGTA
 GCAAAATCCCGGAGCGGATTTGAACCTTGGAAAGCAACGCCCGGAGGCTGGCGG
 GAGGACGCCCGCATAACTGCCAGGCATCAATTAAGCAGAAGGCCATCTGACGGA
 TGGCTTTTGGCTTCTACAACTCTTTTGTATTTTCTAAATCATTAATAT
 GTATCCGCTCATGACAAATACCTCATTAATGCTTCAATAATTTGAAAAGGAGA
 GTATGAGTATCAACAATTTCCGCTGCGCCCTTATCCCTTTTTCGGGCAATTTCCCT
 CCTGTTTTCCTACCCGAAACCGTGGTAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGG

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

14/15

TGCAAGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGA TCCTTGAGAGTTTTC
 GCCCGAAGAACGTTTTC CAATGATGACCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTA
 TATCCCGTGTGAAGCGGGCAAAGCAACTCGGTGCGGCATACACTATTCTCAGAA
 TGACTGGTTGAGTACTCACCAGTCAACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA
 GAGAAATTAAGCAGTGTGCCATAACCA TGAAGTAAACATGCGGCCAACTTACTTCTG
 ACAACGATCGGAGGACGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCGCAACAATGGGGGATCATGT
 AACCGCTTGA TCGTTGGAAACCGGAGCTGAA TGAAGCCATA CCAACAGCAGCGGTG
 ACAACCGATGCTTACAGCAATGGCAACAACGTTGGCCAAACTA TTAAC TGGGAACTA
 CTTACTCTAGCTTCCGGCAACAA TTAATAGACTGGATGGAGGGGATAAAGTTGCAAG
 ACCACTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATGCTGATAAATCGGAGCGG
 GTGAGCGTGGGTCTCGGGTATCATTTGCA GCACTGGGGCAAGATGGTAAGCCCTCCGCT
 ATCGTATTA TCA CACGAGGGGAGCTAGGCACTATGGATGAACGAAATAGACAGAT
 CGCTGAGATAGGTGGCTCACGTATTAAGCATGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCAT
 ATATACTTTAGATTGATTTAAATCTCATT TTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATC
 CTTTTGATATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTCTGCTCCACTGAGCGTC
 AGACCCGTTAGAAAAGATCAAAGGATCTCTT GAGATCCTTTTTTCTCGCGCTAACTC
 GCTGCTTTCGAAAACAAAACACCGCTACAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAG
 CTACCACCTCTTTTCGAAAGGTAACTGGCTCAGCAGCAGCGGATACCAAACTACTGT
 CCTCTAGTGTAGCGGTAGTTAGGCCACCAC TCAAGAACTCTGTAGCACCCTTACAT
 ACCTCGCTCTGCTAATCCTGTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAGTCTGTGTCTT
 ACCGGTTGGACTCAAGCAGATAGTTACCGGATAGGGCAGCGCTCGGGTGAAGGG
 GGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGACCGAAGCTTACACCGAATGAGTACTCTAC
 AGCTGAGCTTATGAGAAAGCCACCTTCCGAAAGGAGAAAGCGGACAGTATCCG
 GTAACGSCAGCTCGACACAGGAGCGCCAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTG
 GTACTTTATAGTCTCTGGGTTTCGCCACTCTGACTTGAGCTCGATTTTGTGAT
 GCTGCTCAGGGGCGGAGCCTATGCAAAAACCGCAGCAACCGGCTTTTACGGTTC
 CTGGCTTTGCTGGCTTTTGTCTACATGTTCTTTCCTGCTTATCCCTGATCTCTGT
 GATACCCATATACCGCTTTGAGTGAAGTGA TCCGCTCGCCGACGCAAGCAGCG
 AGCGAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAAGCGGAGCGCTGATGGGCTATTTCTCTT
 AGCATCTGCGGATTTACACCGCATATGGTGC ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGA
 TGCCGATAGTTAAGCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGACTGGTGGTCAAGCTGCG
 GCCCGACACCCGCAACCCGCTGAGCGGCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGCATC
 CGCTTACAGCAAGCTGTGACGCTTCCCGGAGCTGATGTCTCAGGTTTTCACCG
 TCATCAGCAACCGCGGAGGAGCAGATCAATTCGCGCGAAGGGCAAGCGCATGC
 ATTTACGTTGACACCATCGAATGGTCAAAAACCTTTCGCGGATGGCATGATAGCGCC
 GGAAGAGTCAATTCAGGTTGGTGAATGTGAAACAGTAACTTATACGATGTCGAG
 AGTATGCGGTTCTTATCAGACCGTTTCCCGGCTGGTGAACAGCGCAGCCAGCTT
 TCTGCGAAAACCGGGAAAAGTGGAAAGCGGATGGCCGAGCTGAATTACATCCCAA
 CGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAACAGTCTGCTGATTTGGCTTCCACCTCCA
 GTCTGGCCCTGACCGCGCTCGCAAA TGTGCGGGGATTAATCTCGCCCGATCAA
 CTGGTGGCAGCGTGGTGTGATGATGATGAAAGGCGCTGAAAGCTTAAAG
 GGCGTGCACAACTTCTCGCGCAACGGCTCAGTGGCTGATCATTAACATCCGCTGC
 ATGACCAAGATGCCATTTGCTGGAAGTGCCTGCCTAAATGTTCCGGCTTATTTCTT
 GATGTCCTGACACAGACCCATCAACAGTATTATTTCTCCATGAAGACGGTACCGG
 ACTGGCGTGGAGCATCTGGTCCATTTGGTCAACAGCAAACTCGGCTTACGGGGCC
 CATTAAAGTCTGCTCGCGGCTCTGGCTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTGG
 AATCAAAATCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGGACTGGAGTCCATGCTCCGTTTCA
 ACAACCAATGCCAATGCTGAATGAGGGCACTGTTCCACTCGGAGTGGTGGTGGCAAAG
 ATCAGATGGCTGGCGCAATGCGGGCAATTAACGATCGGGCTCGCGTGGTGGG
 GATATCTCGGTAGTGGGATACGAGTACCGAAGCAGCTCATGTTATATCCCGGCTT
 AACCACTCAAAAGGATTTTCGCTGCTGGGGCAACAGGCTGGACCGCTTGGCTG
 AACTCTCTCAGGGCAGCGGTGAAAGGCAATCAGCTGTTGCCGCTCTCACTGGTGA
 AGAAAACCCCTGCGCCCAATAGCCAAACCGCTCTCCCGGGGCTTGGCGGATTC
 ATTAATGACGCTGGCAGCAGCTTTCCCGACTGGAAGCGGCACTGAGCGCAAGCA
 ATTAATGTGATGAGCGCAATGATCTG

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

15/15

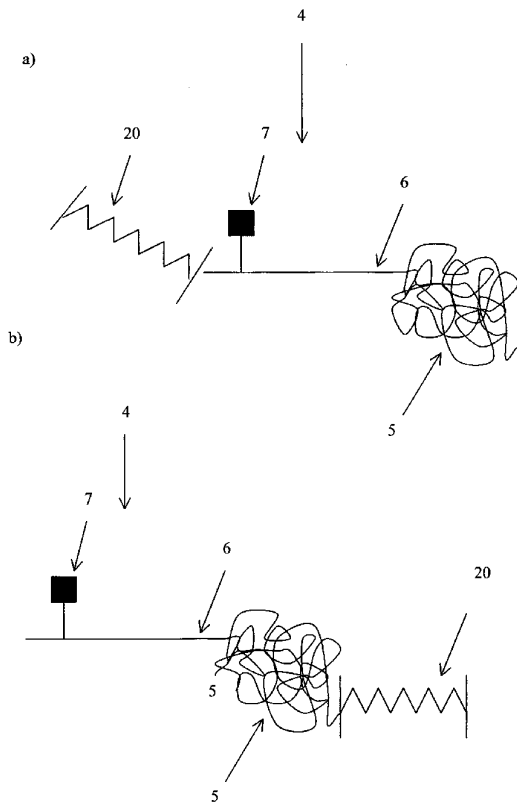


Figure 13

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

1

SEQUENCE LISTING

<110> NextGen Sciences Ltd
Auton, Kevin A

<120> Protein Analysis

<130> LRK/P/130/WOD

<140>

<141>

<150> GB 0108521.6

<151> 2001-04-05

<150> GB 0131025.9

<151> 2001-12-28

<160> 89

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> SITE

<222> (2)

<223> Xaa is a naturally occurring amino acid

<220>

<221> SITE

<222> (3)

<223> Xaa is any naturally occurring amino acid other
than Leu, Val, Ile, Trp, Phe or Tyr

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

2

<220>

<221> SITE

<222> (5)

<223> Xaa is Phe or Leu

<220>

<221> SITE

<222> (6)

<223> Xaa is Gln or Asn

<220>

<221> SITE

<222> (7)

<223> Xaa is Ala, Gly, Ser or Thr

<220>

<221> SITE

<222> (8)

<223> Xaa is Gly or Met

<220>

<221> SITE

<222> (10)

<223> Xaa is Ile, Met or Val

<220>

<221> SITE

<222> (11)

<223> Xaa is Gln, Leu, Val, Tyr or Ile

<220>

<221> SITE

<222> (12)

<223> Xaa is Trp, Tyr, Val, Phe, Leu or Ile

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

3

<220>

<221> SITE

<222> (13)

<223> Xaa is any naturally occurring amino acid other than Asn or Gln

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for use in producing fusion protein

<400> 1

Leu Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for use in producing fusion protein

<400> 2

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

<210> 3

<211> 4203

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Vector pAN-4

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

4

<400> 3
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatget totggcgca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgtg aatcaactgca taattcgtgt cgtcaaggc 120
gcaactccgt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcggg 240
taacaatttc acacagggaa cagaccatgt ccggcctgaa cgacatcttc gaggtcaga 300
aaatcgaatg gcacgaaggc gcgcccagct cgaggatccc gggaccacaag cttggctgtt 360
ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga tacagattaa atcagaagcg agaagcggtc 420
tgataaaaca gaatttgccct ggcggcagta gcgcggtggt cccacctgac cccatgccga 480
actcagaagt gaaacgcccgt agcggcagtg gtagtgtggg gtctcccatc gcgagagtag 540
ggaactgcca ggcacaaat aaaacgaaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt 600
atctgttgtt tgcggtgaa cgetctcctg agtaggacaa atccgcccgg agcggatttg 660
aacgttgcca agcaacggcc cggagggtgg cgggcaggac gccccccata aactgccagg 720
catcaaatg agcagaagge catcctgacg gatggccttt ttgcttttct acaaaactctt 780
ttgttttatt tttctaata cattcaata tgtatccgct catgagacaa taacctgat 840
aaatgctta ataatttga aaaaggaaga gtatgagat tcaacatttc cgtgtcggcc 900
ttattccctt ttttgcgca ttttgccctc ctgtttttgc tcaccagaa acgctgggga 960
aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggt ttacatcgaa ctggatctca 1020
acagcgtgaa gatccttgag agttttcggc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt 1080
ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga gcgcccggca gagcaactcg 1140
gtcgcgcgat acactattct cagaatgact tggttgagta ctccaccagt acagaaaagc 1200
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc actagtgata 1260
aactgcgc caactactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 1320
tgcaacaat gggggatcat gtaactcggc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaaatgaa 1380
ccataccaaa cgcagagcgt gacaccacga tgccacagc aatggcaaca acgctgcgca 1440
aactattaac tggcgaacta ctactcttag ctcccccggc acaattaata gactggatgg 1500
aggcggataa agttgcagga ccactctgct gctcggcctt tccggctggc tggtttatty 1560
ctgataaatc tggagccggt gacgctgggt ctccggtat cattgcagca ctggggccag 1620
atggtaaagc ctcccytatc gtatgtatct acacgacggg gactcaggca actatggatg 1680
aacgaaatag acagatcgtc gagataggtg cctcactgat taagcalttg taactgtcag 1740
accaagttaa ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 1800
tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt gagttttcgt 1860
tcoactgagc gtcagacccc gtgaaaaga tcaaggatc ttcttgagat ccttttttcc 1920
tgccgtaat ctgctgcttg caaacaaaa aaccaccgct accagcggty gtttgtttgc 1980
cggatcaaga gtaaccaact ctttttcgga aggttaactgg cttcagcaga gcgagatac 2040
caataactgt ccttctagt tagccgtagt taggcccaca cttcaagaac tctgtagcac 2100
cgctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtgcc tgctgccagt ggcgataagt 2160
cgtgtcttac cgggttgga ccaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggctgggct 2220

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

5

gaacggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaaac gacctacacc gaactgagat 2280
 acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccoga agggagaaaag gcggacaggt 2340
 atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaacg 2400
 cctggatctc ttatagtcct gtcgggttcc gccacototg acttgagcgt cgattttgt 2460
 gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacgg 2520
 tcttgccctt ttgctggcct tttgtcaca tgtttttcc tgcgttatcc cctgattctg 2580
 tggataaccg tattaccgcc tttagtgag ctgataaccg tcgcccgcgc ggaacgaccg 2640
 agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccct gatgcggtat tttctccta 2700
 ccatctctgt cggattttca caccgcatat ggtgcaactc cagtacaac tgctctgatg 2760
 ccgatagat aagccagtat acactccgct atcgtaactg gactgggtca tggctgcgcc 2820
 ccgacaccg ccaacaccgc ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgtccc cggcatccc 2880
 ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcctc 2940
 accgaaacgc gcgagcgagc agatcaatc gcgcgcgaag gcgaagcggc atgcatctac 3000
 gttgacacca tcgaatgggt caaaaacctt cgcggatgag catgatagcg cccggaagag 3060
 agtcaattca ggggtgtgaa tgtgaaacca gtaacgttat acgatgtcgc agagtatgcc 3120
 ggtgtctctt atcagaccgt tccccgctg gtgaaccagg ccagccactt ttctgcgaaa 3180
 acgcgggaaa aagtggaagc ggcgatggcg gagctgaatt acattcccaa ccgctgggca 3240
 caacaactcg cgggcaaaaca gtcgttgctg attgcccgtt ccacctccag tctggccctg 3300
 cacgcgccg ccaaatgtt cgcggcgatt aaatctgcgc ccgatcaact ggggtcccgc 3360
 gtgggtggtg cgtatgtaga acgaagcggc gtcgaagcct gtaaagcggc ggtgcacaat 3420
 cttctcgcgc aacgcgtcag tgggctgac attaactatc cgtggatgca ccaggatgcc 3480
 attgctgtgg aagctgcctg cactaatgtt ccggcgttat ttcttgatgt ctctgaccag 3540
 acaccatca acagtattat tttctccat gaagacggta ccgactggg cgtggagcat 3600
 ctggtcgcct tgggtcacca gcaaatcgcg ctgttagcgg gccattaaag ttctgtctcg 3660
 gcgcgtctcg gctgtgctgg ctggcataaa tctctcactc gcaatcaaat tcagccgata 3720
 gcggaacggg aaggcagctg gagtgccatg tccggttttc aacaaacct gcaaatgctg 3780
 aatgagggca tcgttccac tgcgatctg gttgccaacg atcagatggc gctgggcgca 3840
 atgcgcgcca ttacogagtc cgggctgcgc gttggtgagg atatctcggg agtgggatac 3900
 gacgataacc aagacagctc atgttatatc ccgccgttaa ccaccatcaa acaggatttt 3960
 cgcctgctgg ggcaaacccg cgtggaccgc ttgctgcaac tctctcaggg ccaggcgggtg 4020
 aagggcaatc agctgttgc cgtctcactg gtgaaaagaa aaaccacct ggcgccaat 4080
 acgcaaacgc cctctccccg cgcgttgccc gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt 4140
 tcccactgcg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc gcgaattgat 4200
 ctg 4203

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

6

<210> 4

<211> 4204

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Vector pAN-5

<400> 4

```
gtttgacagc ttatcatcga etgcacggcg caccaatgct tctggcgcca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gcatggctgt gcaggctgta aatcaactgca taatcgtgt cgctcaaggc 120
gcaactccgt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240
taacaatttc acacaggaaa cagaccatgt ccggcctgaa cgacatcttc gaggctcaga 300
aaatcgaatg gcaagaaagg gcgcgggagc tctgaggatcc cgggtaccaa gcttggctgt 360
tttggcggat gagagaagat tttcagcctg atacagatta aatcagaacg cagaagcggg 420
ctgataaaac agaatttgcc tggcggcagt agcgcgggtg tcccacctga ccccatgccg 480
aactcagaag tgaacgcggc tagcgcgat ggtagtgtgg ggtctccca tgcgagagta 540
gggaactgcc aggcataaaa taaaacgaaa ggtcagtcg aaagactggg cctttcgttt 600
tatctgtgtt ttgtcgggta acgctctcct gactaggaca aatcgcggg gagcggattt 660
gaacgttgcg aagcaacggc ccggagggtg gcgggcagga cgcccgccat aaactgccag 720
gcatcaaat aagcagaagg ccactctgac ggtatggcctt tttgcgttc tacaactct 780
ttttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga 840
taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaaatctt ccgtgtcggc 900
cttatccctt tttttcggc attttgctt cctgtttttg ctcaaccaga aacgctgggtg 960
aaagtaaaag atgctgaaga tcaagtgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc 1020
aacagcggta agatccttga gagttttcgc ccgaagaac gttttccaat gatgagcaat 1080
tttaagttc tgctatgtgg cgggtatta tcccgtgtt acgcccggca agagcaactc 1140
ggtcggcgca tacactatc tcaaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag 1200
catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagt ctgccataac catgagtgat 1260
aacactgcyg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt 1320
ttgcacaaca tgggggatca tgtaactgc cttgatcgtt ggaaccgga gctgaatgaa 1380
gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgectacag caatggcaac aacgttgcgc 1440
aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttccggc aacaattaat agactggatg 1500
gagggcgata aagttgcagg accactctg cgtcggccc ttccggctg ctggtttatt 1560
gctgataaat ctggagcggg tgagcgtggg tctcgggta tcattgcagc actggggcca 1620
gatgtaagc cctcccgat cytagttatc tacacgacgg yagtcaggg aactatggat 1680
gaacgaata gacagatcgc tgagataggt gctcactga ttaagcattg gtaactgtca 1740
```

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

7

gaccaagttt actcatatat accttagatt gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg 1800
atctaggtga agatccetttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg 1860
ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaaag atcaaaaggat ctctctgaga tccttttttt 1920
ctgcgcgtaa tctgctgctt goaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg 1980
ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaaactg gcttcagcag agcgcagata 2040
ccaaataactg tocttctagt gttagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca 2100
ccgcatacat acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgcoag tggcgataag 2160
tcgtgtotta ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca goggtggggc 2220
tgaacggggg gtcctgtcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctaac cgaactgaga 2280
taoctacagc gtgagctatg agaaaagcgc acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg 2340
tatcccgtaa gcgagagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttc agggggaac 2400
gcctggtatc tttatagtc tgctgggttt cggccactct gacttgagcg tcgattttt 2460
tgatgctcgt cagggggcg gagcctatgg aaaaaagcca gcaacgcggc ctttttacgg 2520
ttcctggcct tttgctggcc ttttctcacc atgtctcttc ctgcttacc cctgattct 2580
gtgataaacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataacc ctgcccagc cgaacagacc 2640
gagcgcagcg agtcagtgg cgaaggaagc gaagagcggc tgatgoggtt ttttctcct 2700
acgcatctgt gcggtatctt acaccgcata tgggtcactc tcagtacaat ctgctctgat 2760
gocgcatagt taagccagta tacactccgc tatcgtacg tgactgggtc atggctggc 2820
ccgcacacc gccaacacc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgct ccggcatccg 2880
cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggtt tcaccgtcat 2940
caccgaaacg cgcgaggcag cagatcaatt cgcgcgcgaa ggcgaagcgg catgcattt 3000
cgttgacacc atcgaatggt gcaaaacctt tccggtatg gcatgatag ccccgaaga 3060
gagtcaatc aggtgggtga atgtgaaacc agtaacgtta tacgatgtcg cagagtatg 3120
cgggtctctc tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag gccagccacg tttctgcgaa 3180
aacgcgggaa aaagtgggag cgcgcatggc ggagctgaat tacattcca acccgtggc 3240
acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgcg gattggcgtt gccacctcca gcttggcoct 3300
gcacgcgcgc tcgcaaatg tcgcgccgat taaatctcgc gccgatcaac tgggtgccag 3360
cgtggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc tgtaaagcgg cgggtgcaca 3420
tctctcgcg caacgcgtca gtggctgat cattaactat ccgctggatg accaggatgc 3480
cattgctgtg gaagctgcct gcaactaatg tccggggtta tttcttgatg tctctgacca 3540
gacacccatc aacagtatta tttctccca tgaagacggt acgcgactgg gcgtggagca 3600
tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc gctgttagcg ggcaccattaa gttctgtctc 3660
ggcgcgtctg cgtctggctg gctggcataa atatctcaact cgcacataaa ttcagccgat 3720
agcggaaacg gaaggcgact gtagtgccat gtcgggtttt caacaaacca tgcaaatgct 3780
gaatgagggc atctgtccca ctgcgatgct ggttcccaac gatcagatgg cgtggggcgc 3840
aatgcgcgcc attaccagat ccgggtgcg cgttggtgag gatatctcg tagtgggata 3900
cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgcggtta accaccatca aacaggatgt 3960
tcgcctgctg gggcaaaaca gcgtggaccg cttgctgcaa ctctctcagg gccaggcgg 4020

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

8

```
gaagggaat cagctgttgc cegtctcact ggtgaaaaga aaaaaccacc tggcgcccaa 4080
tacgcaaacc gccctctccc gcgcttggc cgattcatta atgcagctgg cagacaggt 4140
ttcccagctg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag cgcgaattga 4200
tctg 4204
```

<210> 5

<211> 4205

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Vector pAN-6

<400> 5

```
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacgggt caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggctgta aatcactgca taattcgtgt cgtcaaggc 120
gcaactccgt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatatc 180
tgaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240
taacaatttc acacaggaaa cagaccatgt ccggcctgaa cgacatcttc gaggctcaga 300
aaatcgaatg gcacgaaggc gcgcccggag ctcgaggatc ccgggtacca agcttggctg 360
ttttggcggg tgagagaaga ttttcagcct gatcacagatt aaatcagaac gcagaagcgg 420
tctgataaaa cagaatttgc ctggcggcag tagcgcggtg gtccaccctg accccatgcc 480
gaactcagaa gtgaaacgcc gtagegccga tggtagtggt gggctctccc atgcgagagt 540
agggaactgc caggcatcaa ataaaacgaa aggtcagtc gaaagactgg gcccttctgt 600
ttatctgttg tttgtcgggt aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccg ggagcggatt 660
tgaacgttgc gaagcaacgg ccgggaggtt ggcgggcagc acgcccacca taaactgcca 720
ggcatcaaat taagcagaag gccatcctga cggatggcct ttttgcgttt ctacaaactc 780
ttttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg 840
ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc 900
ccttattccc tttttgcgg cattttgect tctgttttt gctcaaccag aaacgctggt 960
gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcaacgagt ggttacatcg aactggatct 1020
caacagcgtg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac 1080
ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcygtatt atcccgtgtt gacgcgggac aagagcaact 1140
cggctgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa 1200
gcactttaag gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga 1260
taacactcgc gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt 1320
tttgacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga 1380
```

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

9

agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctaca gcaatggcaa caacgttgcg 1440
caaaactatta actggcgaac tacttactct agcttccogg caacaattaa tagactggat 1500
ggaggcggat aaagtgcag gaccacttct gcgctcggcc ctccoggctg gctggtttat 1560
tgctgataaa tctggagcgg gtgagcgtgg gtctcgcggc atcattgcag cactggggcc 1620
agatggttaag cctcccgta cgttagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 1680
tgaacgaaat agacagatog ctgagatagg tgcctcaatg attaagcatt ggtaaactgtc 1740
agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa ctccattttt aatttaaaag 1800
gatctaggty aagatccttt ttgataatct catgaocaaa atcccttaac gtgagttttc 1860
gttccactga gcgtcagacc cgttagaaaa gatcaaaagg tcttcttgag atcctttttt 1920
tctgcgcgta atctgtgtct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt 1980
gcccgaatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaaact ggcttcagca gagcgcagat 2040
accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 2100
accgcctaca tacctcgtct tgctaatcct gttaccagty gctgctgcca gtggcgataa 2160
gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg atagtaccg gataaggccg agcggtcggg 2220
ctgaacgggg ggtcgtgca cacagccag cttggagcga acgacctaca ccgaaactgag 2280
atacctacag cgtgagctat gagaagcgc cacgcttccc gaaggagaa agggcgacag 2340
gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcagc agggagcttc caggggaaa 2400
gcctcggat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgactgagc gtcgattttt 2460
gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgogg cctttttacg 2520
gttcctggcc ttttgotggc cttttgctca catgttcttt cctgcttat ccctgatc 2580
tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcggcca gccgaacgac 2640
cgagcgcagc gagtcatgta gcgaggaagc ggaagagcgc ctgatcgggt attttctct 2700
taacgatctg tgcggtatct cacaccgcat atggtgcact ctcaatcaa tctgctctga 2760
tgccgatag ttaagccagt atacctccg ctatcgtac gtgactgggt catggctgag 2820
ccccgacacc gcccaacacc cgtgacgcg cctgacggg cttgtctgt cccggcatcc 2880
gcttacagac aagctgtgac cgtctcggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgta 2940
tcaccgaaac gcgcgagcca gcagatcaat tcgcgcgcga aggcgaagcg gcatgattt 3000
acgttgacac catcgaatgg tgcaaacct ttccgggtat ggcagatag cggccggaag 3060
agagtcaatt cagggtggtg aatgtgaaac cagtaacggt atacgatgct gcagagtatg 3120
ccggtgtctc tbatcagacc gtttccgcg tggtaaacca ggcagaccac gtttctgca 3180
aaacgcggga aaaagtggaa gcggcgatgg cggagctgaa ttacattccc aaccgctgg 3240
cacaacaact ggccggcaca cagctgttgc tgattggcgt tgccacctcc agtctggccc 3300
tgcaacgccc gtcgcaaat gtcgcgcgca ttaaatctcg cgcgatcaa ctgggtgcca 3360
gcgtggtggt gtcgatggtg gaacgaagcg gcgtcgaagc ctgtaaacgg cgggtgcaca 3420
atctctcgc gcaacgcgct agtgggctga tcattaacta tccgctggat gaccaggatg 3480
ccattgctgt ggaagctgac tgcaactaat ttccggcgtt atttcttgat gctctgacc 3540
agacacccat caacagtatt attttctccc atgaagcgg tacgcgactg ggcgtggagc 3600
atctggtcgc attgggtcac cagcaaatcg cgtctgttag gggccatta agttctgtct 3660

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

10

```
cggcgcgtct gcgtctggct ggctggcata aatatctcac tcgcaatcaa attcagccga 3720
tagcggaaag ggaaggcggac tggagtgcca tgtccggttt tcaacaaacc atgcaaatgc 3780
tgaatgaggg catcgttccc actgcgatgc tggttgcoaa cgatcagatg gcgctggggc 3840
caatgcgcgc cattaaccgag tccgggctgc gcgttggtgc ggatatctcg gtagtgggat 3900
acgacgatac cgaagacagc tcatgttata tcccggcgtt aaccaccatc aaacaggatt 3960
ttcgctgct ggggcaaaac agcgtggacc gcttgctgca actctctcag ggccaggcgg 4020
tgaagggcaa tcagctgttg cccgtctcac tggtgaaaag aaaaaccacc ctggcgccca 4080
atacgcnaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 4140
tttcccgaat gaaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gcgcgaattg 4200
atctg 4205
```

<210> 6

<211> 4216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Vector pAC-4

<400> 6

```
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtea ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgtg aatcaactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120
gcaactccgt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatatcc 180
tgaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcggg 240
taacaatttc acacaggaaa cagaccatgg agctcagaga tcccgggcaa gcttgcttgg 300
tggcggctcg aacgacatct tcgaggtctca gaaaatcgaa tggcacgaaat aattaattaa 360
gagcttgctt gttttggcgg atgagagaag attttcagcc tgatacagat taaatcagaa 420
cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcgcca gtagcgcggt ggtcccacct 480
gaccccatgc cgaactcaga agtgaacgc cgtagcgcgg atggtatgt ggggtctccc 540
catgcgagag tagggaactg ccagcatca aataaaacga aaggctcagt cgaagactg 600
ggccttctgt tttatctgtt gtttgcggt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc 660
gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccgaggg tggcgggag gaeccccgcc 720
ataaactgcc aggcataaaa ttaagcagaa gcccactcct acggatggcc tttttgcgtt 780
tctacaaact cttttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcagaga 840
caataacctt gataaatgct tcaataatat tgaanaagga agagtatgag tattcaacat 900
ttcctgtcgc ccottattcc cttttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca 960
gaaacgctg tgaagtataa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc 1020
```

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

11

gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca 1080
atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatccogtgt tgacgccggg 1140
caagagcaac toggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca 1200
gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata 1260
accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa egatcggagg accgaaggag 1320
ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg 1380
gagotgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca egatgcctac agcaatgga 1440
acaacgttgc gcaaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta 1500
atagactgga tggaggcggg taaagttgca ggaccacttc tgcctcggc ccttccggct 1560
ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtotcggg tatcattgca 1620
gaactggatg cagatggtaa gccctccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag 1680
gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat 1740
tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgattaaa acttcatttt 1800
taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa 1860
cgtcgtgttt cgttccactg agcgtcagac ccgtagaaa agatcaaag atctcttga 1920
gatccttttt tctcgcgctg aatctgctgc ttgcaaaaa aaaaaccacc gctaccagcg 1980
gtggttctgt tgcggatca agagctacca actcttttcc cgaaggtaac tggcttcagc 2040
agagccgaga taccaaaatac tctccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccactcaag 2100
aaactctgag caccgcctac atacctcgtc ctgctaacc tggtaccagt ggtcgtgcc 2160
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagtacc ggataaggcg 2220
cagcggctcg gctgaacggg ggttctgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 2280
accgaaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaaagc ccacgcttcc cgaagggaga 2340
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagc gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 2400
ccagggggaa acgocctgga tctttatagt cctgtcgggt ttgcaccct ctgacttgag 2460
cgtcgtatct tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaaagc cagcaacgcg 2520
gcctttttac ggttctcggc cttttgctgg ccttttgcct acatgttctt tctgcggtta 2580
tcccctgatt ctgtggataa cgtatttacc gcccttgagt gagctgatac cgtcgcgcgc 2640
agccgaacga ccgagcgcag cagtcagtg agcaggaag cggaaagagc cctgatgcgg 2700
tattttctcc ttacgcatct gtccggtatt tcaacccgca tatggtgcac tctcagtaca 2760
atctgctctg atgcgcgata gtttaagccag tatacactcc gctatcgtc cgtgactggg 2820
tcattgctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc 2880
tcccggcatc cgttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt 2940
ttcaccgctc atcaaccgaaa ccgcgagggc agcagatcaa ttccgcgpg aaggcgaagc 3000
ggcatgcatt taegttagaa ccatcgaatg gtgcaaaacc tttcgcggta tggcatgata 3060
gccccggaa gagcgtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa ccagtaactg tatacagatg 3120
cgcagagtat gccggtgtct cttatcagac cgtttccgc gtgggtaacc aggccagcca 3180
cgtttctgcg aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgtg cgggagctga attacattcc 3240
caaccgcgtg gcacaacaac tggcgggcaa acagtctgtg ctgattggcg ttgccacctc 3300

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

12

```
cagtctggcc ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgcgcggcg attaaatctc gcgcgatca 3360
actgggtgcc agcgtggtgg tgcgatggt agaacgaage ggcgtcgaag cctgtaaagc 3420
ggcgggtgac aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg atcattaact atccgctgga 3480
tgaccaggat gccattgctg tggaaagtgc ctgcaactat gttccggcgt tatttcttga 3540
tgtctctgac cagacacca tcaacagtat tattttctcc catgaagacg gtacgcgact 3600
ggcgctggag catctggctg cattgggtca ccagcaaatc gcgctgttag cgggcccatt 3660
aagttctgtc teggcgcgtc tgcgtctggtc tggctggcat aaatatctca ctgcfaatca 3720
aattcagccg atagcggaac gggaaaggcga ctggagtgc atgtccggtt ttcaacaaac 3780
catgcaaatg ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg ctggttgcca acgatcagat 3840
ggcgctgggc gcaatgcgcg ccattaccga gtcgggctg cgcgttggg cggatatctc 3900
ggtagtggga tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat atccgcgct taaccacctc 3960
caaacaggat tttcgcctgc tggggcaaac cagcgtggac cgttctgctc aactctctca 4020
gggccaggcg gtgaaggcca atcagctgtt gcccgcttca ctggtgaaaa gaaaaaccac 4080
cctggcgccc aatacgcgaa ccgcctctcc ccgcgcttg gccgattcat taatgcagct 4140
ggcaacgacg gtttccgac tggaaagcgg gcagtgcgca caacgcgaatt aatgtgagtt 4200
agcgcgaatt gatctg 4216
```

<210> 7

<211> 4217

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Vector pAC-5

<400> 7

```
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgtc aatcaetgca taatctgtgt cgtcaagge 120
gcactccctg tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatatc 180
tgaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgg 240
taacaatttc acacaggaaa cagaccatgg agctcgagga tccccggcaa gcttgcttgg 300
gtggcgtctc gaacgacatc ttcgaggtc agaaaaatcga atggcacgaa taattaatta 360
agagcttggc tgttttggcg gatgagagaa gattttcagc ctgatacaga taaatcaga 420
acgcagaagc ggtctgataa aacagaattt gccctggcggc agtagcggg tggctccacc 480
tgaccccatg ccgaactcag aagtgaacgc ccgtagcggc gatggtagtg tggggtctcc 540
ccatgcgaga gtagggaact gccaggtatc aaataaacg aaaggctcag tcgaaagact 600
gggcctttcg ttttatctgt tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc 660
```

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

13

cgggagcggg tttgaacggt gcgaagcaac ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc 720
cataaactgc caggcatcaa attaaagcaga aggccatocct gacggatggo ctttttgctg 780
ttctacaaac totttttggt tatttttcta aatacattca aatatgtato cgctcatgag 840
acaataaccc tgataaatgc ttoataata ttgaaaaag aagagtatga gtattoaca 900
tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc cttcctggtt ttgctcacc 960
agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat 1020
cgaaactggt ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgcccgaag aacgttttcc 1080
aatgatgagc acttttaag ttctgctatg tggcgggta ttatccctg ttgacgcccg 1140
gcaagagcaa ctccgtcgcc gcatacaacta ttctcagaat gacttggtt agtactcacc 1200
agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat 1260
aaccatgagt gataacactg cgccaactt actcttgaca acgatcggag gaccgaagga 1320
gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc 1380
ggagctgaat gaagccatcc caaacgacga gcgtgacacc acgatgccta cagcaatggc 1440
aacaacgctg cgcaaatat taactggcga actacttact ctatcttccc ggcaacaatt 1500
aatagactg atgagggcg ataaagtgc aggaaccact ctgcctcgg ccctccggc 1560
tggctggtt attgctgata aatctggagc cgggagcgt gggctcgcg gtatcattg 1620
agcaactggg ccagatggta agccctccc tatctgagtt atctacacga cggggagta 1680
ggcaactatg gatgaagaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac gtattaaga 1740
ttgtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgattaa aactcattt 1800
ttaatttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta 1860
acgtgagttt tegtccact gagegtcaga cccctagaa aagatcaaag gatcttctt 1920
agatccttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaa aaaaaaccac cgctaccagc 1980
ggtggttgtg ttgcggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggttcag 2040
cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agttagcgc tagttaggcc accacttcaa 2100
gaactctgta gcaccgcta catacctgc tctgtaatc ctgttaccag tggctgctg 2160
cagtggcgat aagctgtgct ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc 2220
gcagcgtcgc ggtgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agctgggagc gaacgacct 2280
caccgaaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgctc ccgaaggag 2340
aaagcgggac aggtatcccg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca cgaggagct 2400
tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttcgccacc tctgacttga 2460
gcctcgattt ttgtgatgct cgtcagggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacg 2520
ggcctttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttct cacatgttct tctctgctt 2580
atccctgat tctgtgata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcggc 2640
cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gacgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg 2700
gtatttctc cttacgctc tgtcgggtat ttcacaccg atatggtgca ctctcagtac 2760
aatctgctct gatccgcat agttaagcca gtatacactc cgotatcgtc acgtgactgg 2820
gtcatggctg cgcgccgaca cccccaaca cccgtgacg cgcctgacg ggcttgtctg 2880
ctccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctcgg ggagctgcat gtgcaagag 2940

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

14

```

tttcaaccgt catcaccgaa acgcgcgagg cagcagatca attcgcgcgc gaaggcgaag 3000
eggcatgcat ttacgttgac accatcgaat ggtgcaaaac ctttcgcggt atggcatgat 3060
agcgcctggg agagagtcaa ttcagggtgg tgaatgtgaa accagtaacg ttatacgatg 3120
tcgcagagta tgcgggtgtc tcttatcaga ccgtttcccg cgtggtgaa caggccagcc 3180
acgtttctgc gaaaacgcgg gaaaaagtgg aagcggcgat ggcggagctg aattacattc 3240
ccaaccgcgt ggcacaacaa ctggcgggca aacagtcgtt gctgattggc gttgccacct 3300
ccagtctggc cctgcacgcg ccgtcgcgaa ttgtcgcggc gattaaatct cgcgccgac 3360
aactgggtgc cagcgtgggt gtgtcgtatg tagaacgaag cggcgtcga gctgtaaag 3420
cggcgtgca caatctctc gcgcaacgcg tcagtgggct gatcattaac tatccgctgg 3480
atgaccagga tgccattgct gtggaagctg cctgcactaa tgttcggcg ttattcttg 3540
atgtctctgc ccagacacc atcaacagta ttatctctc ccatgaagac ggtacgcgac 3600
tggcgtgga gcatctggtc gcattgggtc accagcaat cgcgctgta gcgggccat 3660
taagtctgtc ctggcgcgt ctgcgtctgg ctggctggca taaatctc actcgcaatc 3720
aaattcagcc gatagcgaa cgggaaggcg actggagtgc catgtccggt tttcaacaaa 3780
ccatgcaaat gctgaatgag ggcacgttc ccactgcgat gctggtgccc aacgatcaga 3840
tggcgtggg cgcaatgccc gccattaccg agtccgggct gcgcttggg gcggatatct 3900
cggtagtggg atacgcgat accgaagaca gctcatgta tatccgcgcg ttaaccacca 3960
tcaaacagga ttttcgctg ctggggcaaa ccagcgtgga ccgcttctg caactctctc 4020
agggccagcc ggtgaaggcc aatcagctgt tgcccgtctc actggtgaaa agaaaaacca 4080
ccctggcgc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc 4140
tggcagcaca ggtttccgca ctggaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt 4200
tagcgcgaat tgatctg 4217

```

<210> 8

<211> 4218

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Vector pAC-6

<400> 8

```

gtttgacagc ttatcatcga ctgcacgggt caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggctgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120
gcactccgtg tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcaccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcggg 240
taacaatttc acacaggaaa cagaccatgg agctcgagga tcccgggcaa gcttccggcg 300

```

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

15

ggtggcggtc tgaacgarat cttcgaggct cagaaaaatcg aatggcacga ataattaatt 360
aagagcttgg ctgttttggc ggatgagaga agattttcag cctgatacag attaaatcag 420
aacgcagaag cgtctcgata aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtggtccacc 480
ctgaccccat gccgaactca gaagtgaac gccgtagcgc cगतgtagt gtgggtctc 540
cccatcgag agtagggaac tgccaggcat caataaaac gaaaggctca gtcgaaagac 600
tgggcttct gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tctgagtag gacaaatccg 660
cgggagcgg atttgaacgt tgegaagcaa cggcccgag ggtggcgggc aggacgcccg 720
ccataaaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cctttttcgc 780
ttctacaaa ctctttttgt ttatttttct aaatacatto aaatatgtat ccgctcatga 840
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 900
atttccgtgt cgccttatt ccttttttg cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc 960
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggcgcacga gtgggttaca 1020
tcgaaactga tctcaacagc ggtgaagatcc ttgagagttt tgcgccgaa gaaccttttc 1080
caatgatgag cactttttaa gtctgtctat gtggcgggtt attatccgtt gttgacccg 1140
gcggaagcga actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac 1200
cagtcacaga aaagcatctt ccggatggca tgacagtaag agaattatgc agtctgcca 1260
taaccatcag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcggg ggcgcaagg 1320
agctaacccg ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tgccttcat cgttgggaa 1380
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cagatgctt acagcaatgg 1440
caacaacgct gcgcaaaact ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 1500
taatagactg gatggaggcg gataaagtgg caggaccact tctgcgctcg gccctccgg 1560
ctggctggtt tattgtctat aaactggag ccggtagcgc tgggtctcgc ggtatcattg 1620
cagcaactgg gccagatgtt aagccctccc gtatcgtagt tatctacac acggggagtc 1680
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tgcctgagat aggtgcctca ctgattaagc 1740
attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 1800
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 1860
aacgtgagtt ttctgtccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggtacttctt 1920
gagatccttt tttctgccc gtaactctgt gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 1980
cgggtggttg ttgcccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggttca 2040
gcagagcga gataccaaat actgtccttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca 2100
agaactctgt agcaccgctt acatacctcg ctctgtaaat cctgttaacca gtagctgctg 2160
ccagtggcga taagtctgtt ettaccgggt tggactcaag acgatagtt cgggataagg 2220
cgcagcggtc gggctgaacg ggggttctgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 2280
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cggccagcctt cccgaaggga 2340
gaaaggcga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 2400
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgactg 2460
agcgtcgatt tttgtgatc tctcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 2520
cggccttttt acggttctcg gccttttctg ggccttttgc tcaatgttc tttctcgct 2580

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

16

```
tatccctga ttctgtgat aacogtatta ccgctttga gtgagctgat acogctgcc 2640
gcagccgaac gaccgagcgc agcaggtcag tgagcgagga agcgaagag cgocctgatc 2700
ggatattttct cettaacgat ctgtgctgta tttcacacog catatggtgc actctcagta 2760
caatctgctc tgatgocgca tagttaagoc agtatacact ccgctatcgc taogtgactg 2820
ggtcatggct ggcgccgac acccgccaac acccogtgac gcgccctgac gggttgtct 2880
getcccggca tocgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2940
gttttcaccg tcataccga aacgcgcgag gcagcagatc aattcgcgog cgaaggcgaa 3000
gocgcatgca tttacgttga caccatcgaa tggcgcaaaa cctttcgcgg tatggcatga 3060
tagcgcctgg aagagagtea attcaggggtg gtgaatgtga aaccagtaac gttatacgat 3120
gtcgcagagt atgcgggtgt ctcttaccag accgtttccc gcgtggtgaa ccaggccagc 3180
cacgtttctg cgaaaaacgcg ggaaaaagtg gaagcggcga tggcggagct gaattacatt 3240
cccaaccgog tggcacaaca actggcgggc aaacagctgt tgctgattgg cgttgccacc 3300
tccagtctgg cctcgcacgc gccgtcgcaa attgtcgcgg cgattaatc tcgcgccgat 3360
caactgggtg ccagcgtggt ggtgtcagtg tgaacgaa gcggcgtcga agcctgtaaa 3420
gcggcggctg acaatcttct cgcgcaacgc gtcagtggtc tgatcattaa ctatccctg 3480
gatgaccagg atgccattgc tgtggaagct gcctgcaact atgttccggc gttattttct 3540
gatgtctctg accagacaoc catcaacagt attattttct cccatgaaga cggtagcaga 3600
ctgggggtgg agcatctggt cgcattgggt caccagcaa tcgctgtgtt agcgggccc 3660
ttaaagttctg tctcggcggc tetgctctg gctggctggc ataatatct cactogcaat 3720
caaatcagc cgatagcggg acgggaaggc gactggagt ccatgtccgg ttttcaaaa 3780
accatgcaaa tgctaatga gggcatcgtt ccactgcga tgctggttgc caacgatcag 3840
atggcctgg gcgcaatgog cgcattacc gactcgggc tgccgcttgg tgcgatatac 3900
tcggtagtg gatacagcga taccgaagac agctcatggt atatcccgc gtaaccacc 3960
atcaaacagg attttgcct gctggggcaa accagcgtgg accgcttget gcaactctct 4020
cagggccagg cgtgaaggg caatcagctg ttgcccgtct cactggtgaa aagaaaaacc 4080
accctggcgc ccaatacga aaccgcctct ccccgccgtt tggccgattc attaatcag 4140
ctggcaocgac aggtttccc actggaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag 4200
ttagcgcgaa ttgatctg 4218
```

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Nucleic acid
sequence which encodes a fusion protein

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

17

<400> 9

ggcctgaaag acatcttcga ggctcagaaa atcgaatggc acgaa

45

<210> 10

<400> 10

000

<210> 11

<400> 11

000

<210> 12

<400> 12

000

<210> 13

<400> 13

000

<210> 14

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

18

<400> 14

Leu Glu Glu Val Asp Ser Thr Ser Ser Ala Ile Phe Asp Ala Met Lys
1 5 10 15

Met Val Trp Ile Ser Pro Thr Glu Phe Arg
20 25

<210> 15

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 15

Gln Gly Asp Arg Asp Glu Thr Leu Pro Met Ile Leu Arg Ala Met Lys
1 5 10 15

Met Glu Val Tyr Asn Pro Gly Gly His Glu Lys
20 25

<210> 16

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 16

Ser Lys Cys Ser Tyr Ser His Asp Leu Lys Ile Phe Glu Ala Gln Lys
1 5 10 15

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

19

Met Leu Val His Ser Tyr Leu Arg Val Met Tyr Asn Tyr
20 25

<210> 17

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 17

Met Ala Ser Ser Asp Asp Gly Leu Leu Thr Ile Phe Asp Ala Thr Lys
1 5 10 15

Met Met Phe Ile Arg Thr
20

<210> 18

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 18

Ser Tyr Met Asp Arg Thr Asp Val Pro Thr Ile Leu Glu Ala Met Lys
1 5 10 15

Met Glu Leu His Thr Thr Pro Trp Ala Cys Arg
20 25

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

20

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 19

Ser Phe Pro Pro Ser Leu Pro Asp Lys Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys
1 5 10 15Met Tyr Val Ile Thr
20

<210> 20

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 20

Ser Val Val Pro Glu Pro Gly Trp Asp Gly Pro Phe Glu Ser Met Lys
1 5 10 15Met Val Tyr His Ser Gly Ala Gln Ser Gly Gln
20 25

<210> 21

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

21

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 21

Val Arg His Leu Pro Pro Pro Leu Pro Ala Leu Phe Asp Ala Met Lys
1 5 10 15

Met Glu Phe Val Thr Ser Val Gln Phe
20 25

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 22

Asp Met Thr Met Pro Thr Gly Met Thr Lys Ile Phe Glu Ala Met Lys
1 5 10 15

Met Glu Val Ser Thr
20

<210> 23

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

22

<400> 23

Ala Thr Ala Gly Pro Leu His Glu Pro Asp Ile Phe Leu Ala Met Lys
1 5 10 15Met Glu Val Val Asp Val Thr Asn Lys Ala Gly Gln
20 25

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 24

Ser Met Trp Glu Thr Leu Asn Ala Gln Lys Thr Val Leu Leu
1 5 10

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 25

Ser His Pro Ser Gln Leu Met Thr Asn Asp Ile Phe Glu Gly Met Lys
1 5 10 15

Met Leu Tyr His

20

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

23

<210> 26

<400> 26
000

<210> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 27

Thr Ser Glu Leu Ser Lys Leu Asp Ala Thr Ile Phe Ala Ala Met Lys
1 5 10 15Met Gln Trp Trp Asn Pro Gly
20

<210> 28

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 28

Val Met Glu Thr Gly Leu Asp Leu Arg Pro Ile Leu Thr Gly Met Lys
1 5 10 15Met Asp Trp Ile Pro Lys
20

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

24

<210> 29

<400> 29
000

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 30

Leu His His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Met Val Trp Asn His Arg
1 5 10 15

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 31

Pro Gln Gly Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Leu Trp Arg Ser
1 5 10

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

25

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 32

Leu Ala Gly Thr Phe Glu Ala Leu Lys Met Ala Trp His Glu His
1 5 10 15

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 33

Leu Asn Ala Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Gly
1 5 10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 34

Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Leu Arg Asp
1 5 10

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

26

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 35

Leu Leu Arg Thr Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Asn Gly
1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 36

Leu Ser Thr Ile Met Glu Gly Met Lys Met Tyr Ile Gln Arg Ser
1 5 10 15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

27

<400> 37

Leu Ser Asp Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Cys
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 38

Leu Glu Ser Met Leu Glu Ala Met Lys Met Gln Trp Asn Pro Gln
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 39

Leu Ser Asp Ile Phe Asp Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Gln
1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

28

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 40

Leu Ala Pro Phe Phe Glu Ser Met Lys Met Val Trp Arg Glu His
1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 41

Leu Lys Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Thr Ala Met
1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 42

Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Asn Ser
1 5 10 15

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

29

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 43

Leu Leu Gln Thr Phe Asp Ala Met Lys Met Glu Trp Leu Pro Lys
1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 44

Val Phe Asp Ile Leu Glu Ala Gln Lys Val Val Thr Leu Arg Phe
1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

30

<400> 45

Leu Val Ser Met Phe Asp Gly Met Lys Met Glu Trp Lys Thr Leu
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 46

Leu Glu Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Leu Glu
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 47

Leu Lys Glu Ile Phe Glu Gly Met Lys Met Glu Phe Val Lys Pro
1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

31

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 48

Leu Gly Gly Ile Glu Ala Gln Lys Met Leu Leu Tyr Arg Gly Asn
1 5 10 15

<210> 49

<400> 49
000

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 50

Arg Pro Val Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Val Trp
1 5 10 15

Lys Pro

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

32

<210> 51

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 51

Arg Ser Pro Ile Ala Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Arg
1 5 10 15

Glu Thr

<210> 52

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 52

Gln Asp Ser Ile Met Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ser Trp His
1 5 10 15

Val Asn

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

33

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 53

Asp Gly Val Leu Phe Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Arg Leu
1 5 10 15

Glu Thr

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 54

Val Ser Arg Thr Met Thr Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Tyr His
1 5 10 15

Asp Leu

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

34

<400> 55

Asp Val Leu Leu Pro Thr Val Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Ile Thr
1 5 10 15

Lys

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 56

Pro Asn Asp Leu Glu Arg Ile Phe Asp Ala Met Lys Ile Val Thr Val
1 5 10 15

His Ser

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 57

Thr Arg Ala Leu Leu Glu Ile Phe Asp Ala Gln Lys Met Leu Tyr Gln
1 5 10 15

His Leu

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

35

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 58

Arg Asp Val His Val Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Thr Val
1 5 10 15

Glu Thr

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 59

Gly Asp Lys Leu Thr Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Ile Gln Trp Thr
1 5 10 15

Ser Gly

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

36

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 60

Leu Glu Gly Leu Arg Ala Val Phe Glu Ser Met Lys Met Glu Leu Ala
1 5 10 15

Asp Glu

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 61

Val Ala Asp Ser His Asp Thr Phe Ala Ala Met Lys Met Val Trp Leu
1 5 10 15

Asp Thr

<210> 62

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

37

<400> 62

Gly Leu Pro Leu Gln Asp Ile Leu Glu Ser Met Lys Ile Val Met Thr
1 5 10 15

Ser Gly

<210> 63

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 63

Arg Val Pro Leu Glu Ala Ile Phe Glu Gly Ala Lys Met Ile Trp Val
1 5 10 15

Pro Asn Asn

<210> 64

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 64

Pro Met Ile Ser His Lys Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Lys Phe Val
1 5 10 15

Pro Glu

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

38

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 65

Lys Leu Gly Leu Pro Ala Met Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp His
1 5 10 15

Pro Ser

<210> 66

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 66

Gln Pro Ser Leu Leu Ser Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Gln Ala Ser
1 5 10 15

Leu Met

<210> 67

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

39

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 67

Leu Leu Glu Leu Arg Ser Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp Gln
1 5 10 15

Ile Ser

<210> 68

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 68

Asp Glu Glu Leu Asn Gln Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Pro Leu
1 5 10 15

Val His Val Thr Lys

20

<210> 69

<400> 69

000

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

40

<210> 70

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 70

Ser Asn Leu Val Ser Leu Leu His Ser Gln Lys Ile Leu Trp Thr Asp
1 5 10 15

Pro Gln Ser Phe Gly

20

<210> 71

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 71

Leu Phe Leu His Asp Phe Leu Asn Ala Gln Lys Val Glu Leu Tyr Pro
1 5 10 15

Val Thr Ser Ser Gly

20

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

41

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 72

Ser Asp Ile Asn Ala Leu Leu Ser Thr Gln Lys Ile Tyr Trp Ala His
1 5 10 15

<210> 73

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 73

Met Ala Ser Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ser Gln Lys Met Glu Trp
1 5 10 15

Arg Ser Asn Ala Gly Gly Ser

20

<210> 74

<400> 74

000

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

42

<210> 75

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for use in producing fusion protein

<400> 75

Met Ala His Ser Leu Val Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp
1 5 10 15

Arg Asp Pro Phe Gly Gly Ser
20

<210> 76

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for use in producing fusion protein

<400> 76

Met Gly Pro Asp Leu Val Asn Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
1 5 10 15

His Pro Leu Thr Gly Gly Ser
20

<210> 77

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

43

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 77

Met Ala Phe Ser Leu Arg Ser Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Leu
1 5 10 15

Arg Asn Thr Pro Gly Gly Ser
20

<210> 78

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 78

Met Ala Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
1 5 10 15

His Glu Asp Thr Gly Gly Ser
20

<210> 79

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

44

<400> 79

Met Ser Ser Tyr Leu Ala Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
1 5 10 15

His Ser Ala Tyr Gly Gly Ser
20

<210> 80

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 80

Met Ala Lys Ala Leu Gln Lys Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp
1 5 10 15

Arg Ser His Pro Gly Gly Ser
20

<210> 81

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 81

Met Ala Phe Gln Leu Cys Lys Ile Phe Tyr Ala Gln Lys Met Glu Trp
1 5 10 15

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

45

His Gly Val Gly Gly Gly Ser
20

<210> 82

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 82

Met Ala Gly Ser Leu Ser Thr Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp
1 5 10 15

His Val Gly Lys Gly Gly Ser
20

<210> 83

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 83

Met Ala Gln Gln Leu Pro Asp Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp
1 5 10 15

Arg Ile Ala Gly Gly Gly Ser
20

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

46

<210> 84

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 84

Met Ala Gln Arg Leu Phe His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp
1 5 10 15His Gly Pro Lys Gly Gly Ser
20

<210> 85

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 85

Met Ala Gly Cys Leu Gly Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp
1 5 10 15Arg His Phe Val Gly Gly Ser
20

<210> 86

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/081683

PCT/GB02/01623

47

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 86

Met Ala Trp Ser Leu Lys Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp

1 5 10 15

His Ser Pro Gly Gly Gly Ser

20

<210> 87

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

<400> 87

Met Ala Leu Gly Leu Thr Arg Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp

1 5 10 15

His Arg Asp Ser Gly Gly Ser

20

<210> 88

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide for
use in producing fusion protein

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/081683 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/10, 15/62, G01N 33/533, C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/GB02/01623
- (22) International Filing Date: 4 April 2002 (04.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0108521.6 5 April 2001 (05.04.2001) GB
0131025.9 28 December 2001 (28.12.2001) GB
0203448.6 14 February 2002 (14.02.2002) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): NEUTGEN SCIENCES LTD. (GB/GB); Biggles House (Building 56), Alconbury N, Airfield, Alconbury, Huntingdon, Cambridgeshire PE28 4DA (GB).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): AUTON, Kevin, Andrew (GB/GB); 42 Croftfield Road, Godmanchester, Cambridgeshire PE29 2ED (GB).
- (74) Agents: GREAVES, Carol, Pauline et al.; Greaves Brewster, Indigo House, Cheddar Business Park, Wedmore Road, Cheddar, Somerset BS27 3EB (GB).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, IJ, MC, NI, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 6 March 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PROTEIN ANALYSIS BY MEANS OF IMMOBILIZED ARRAYS OF ANTIGENS OR ANTIBODIES

(57) Abstract: A method of forming an array of proteins selected from antigens or antibodies; said method comprising the steps of (i) expressing in a recombinant cell, a fusion protein which comprises either (a) an antigen or (b) an antibody binding protein, fused to a peptide having up to 50 amino acids, which peptide comprises amino acid sequence of SEQ ID NO 1 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO 1) where X_1 is a naturally occurring amino acid, X_2 is any naturally occurring amino acid other than leucine, valine, isoleucine, tryptophan, phenylalanine or tyrosine, X_3 is phenylalanine or leucine, X_4 is glutamine or asparagine, X_5 is alanine, glycine, serine or threonine, X_6 is glycine or methionine, X_7 is isoleucine, methionine or valine, X_8 is glutamine, leucine, valine, tyrosine or isoleucine, X_9 is tryptophan, tyrosine, valine, phenylalanine, leucine or isoleucine and X_{10} is any naturally occurring amino acid other than asparagine or glutamine; where said peptide is capable of being biotinylated by a biotin ligase at the lysine residue adjacent to X_6 ; (ii) biotinylating said peptide of the fusion protein at the lysine residue adjacent X_6 ; (iii) isolating the biotinylated fusion protein; (iv) applying the biotinylated fusion protein to an avidin or streptavidin coated non-porous support; (v) forming an array of at least three different proteins on the support by either (a) where the fusion protein comprises an antigen, carrying out steps (i) to (iv) the desired number of times to form an antigen array; or (b) where the fusion protein comprises an antibody binding protein, applying to said protein, either prior to or after step (iv) a plurality of different antibodies or binding fragments thereof.

WO 02/081683 A3

【手続補正書】

【提出日】平成15年6月30日(2003.6.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原又は抗体から選択されるタンパク質のアレイの作製方法であって、

(i) (a)抗原又は(b)抗体結合性タンパク質のいずれかを50個以下のアミノ酸を有するペプチドと融合させて含む融合タンパク質を組換え細胞中で発現させるステップであって、該ペプチドがSEQ ID NO.1のアミノ酸配列

$LX_1X_2IX_3X_4X_5X_6KX_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO. 1)

(式中、 X_1 は天然アミノ酸であり、 X_2 はロイシン、バリン、イソロイシン、トリプトファン、フェニルアラニン又はチロシンを除いた天然アミノ酸であり、 X_3 はフェニルアラニン又はロイシンであり、 X_4 はグルタミン又はアスパラギンであり、 X_5 はアラニン、グリシン、セリン又はトレオニンであり、 X_6 はグリシン又はメチオニンであり、 X_7 はイソロイシン、メチオニン又はバリンであり、 X_8 はグルタミン、ロイシン、バリン、チロシン又はイソロイシンであり、 X_9 はトリプトファン、チロシン、バリン、フェニルアラニン、ロイシン又はイソロイシンであり、 X_{10} はアスパラギン又はグルタミンを除いた任意の天然アミノ酸である；また該ペプチドは X_6 に隣接するリシン残基においてビオチンリガーゼによりビオチン化することができる。)

を含むことを特徴とするステップ；

(ii) 該融合タンパク質の該ペプチドを X_6 に隣接するリシン残基においてビオチン化するステップ；

(iii) このビオチン化融合タンパク質を単離するステップ；

(iv) アビジン又はストレプトアビジンをコートした非多孔質基板に該ビオチン化融合タンパク質を付着させるステップ；

(v) (a)該融合タンパク質が抗原を含む場合には、抗原アレイの作製を目的にステップ(i)~(iv)を所望回数実行することにより、又は

(b)該融合タンパク質が抗体結合性タンパク質を含む場合には、ステップ(iv)の前又は後に複数種の抗体又はその結合性断片を該タンパク質に結合させることにより基板上に少なくとも3種類のタンパク質からなるアレイを形成させるステップ；

を含む作製方法。

【請求項2】

SEQ ID NO.1のペプチドが以下から選ばれる、請求項1に記載の方法：

【化1】

Leu His His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Met Val Trp Asn His Arg (SEQ ID NO:30);

【化 2】

Leu Asn Ala Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Gly (SEQ ID NO:33);

Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Leu Arg Asp (SEQ ID NO:34);

Leu Ser Asp Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Cys (SEQ ID NO:37);

Leu Ser Asp Ile Phe Asp Ala Met Lys Met Val Tyr Arg Pro Gln (SEQ ID NO:39);

Leu Lys Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Thr Ala Met (SEQ ID NO:41);

Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Ser Asn Ser (SEQ ID NO:42);

Leu Lys Glu Ile Phe Glu Gly Met Lys Met Glu Phe Val Lys Pro (SEQ ID NO:47);

Arg Pro Val Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Val Trp Lys Pro (SEQ ID NO:50);

Thr Arg Ala Leu Leu Glu Ile Phe Asp Ala Gln Lys Met Leu Tyr Gln His Leu (SEQ ID NO:57);

Met Ala Ser Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ser Gln Lys Met Glu Trp Arg Ser Asn Ala Gly Gly Ser (SEQ ID NO:73);

Met Ala His Ser Leu Val Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Asp Pro Phe Gly Gly Ser (SEQ ID NO:75);

Met Gly Pro Asp Leu Val Asn Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Pro Leu Thr Gly Gly Ser (SEQ ID NO:76);

Met Ala Phe Ser Leu Arg Ser Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Leu Arg Asn Thr Pro Gly Gly Ser (SEQ ID NO:77);

【化3】

Met Ala Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp Thr
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:78);

Met Ser Ser Tyr Leu Ala Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Ser Ala Tyr Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:79);

Met Ala Lys Ala Leu Gln Lys Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp Arg Ser His Pro
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:80);

Met Ala Gly Ser Leu Ser Thr Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Val Gly Lys Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:82);

Met Ala Gln Gln Leu Pro Asp Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Ile Ala Gly Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:83);

Met Ala Gln Arg Leu Phe His Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Gly Pro Lys Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:84);

Met Ala Gly Cys Leu Gly Pro Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp Arg His Phe Val
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:85);

Met Ala Trp Ser Leu Lys Pro Ile Phe Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Ser Pro Gly Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:86);

Met Ala Leu Gly Leu Thr Arg Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Arg Asp Ser
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:87); 及び

Met Ala gly Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg Arg Pro Leu Gly
Gly Ser (SEQ ID NO:88).

【請求項3】

抗原又は抗体から選択されるタンパク質のアレイの作製方法であって、

(i) (a)抗原又は(b)抗体結合性タンパク質のいずれかを50個以下のアミノ酸を有するペプチド又は13個以上のアミノ酸を有するその断片と融合させて含む融合タンパク質を組換え細胞中で発現させるステップであって、該ペプチドが以下から選択される配列：

【化 4】

Leu Glu Glu Val Asp Ser Thr Ser Ser Ala Ile Phe Asp Ala Met Lys Met Val Trp Ile Ser
Pro Thr Glu Phe Arg (SEQ ID NO:14);

Gln Gly Asp Arg Asp Glu Thr Leu Pro Met Ile Leu Arg Ala Met Lys Met Glu Val Tyr
Asn Pro Gly Gly His Glu Lys (SEQ ID NO:15);

Ser Lys Cys Ser Tyr Ser His Asp Leu Lys Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Leu Val His Ser
Tyr Leu Arg Val Met Tyr Asn Tyr (SEQ ID NO:16);

Met Ala Ser Ser Asp Asp Gly Leu Leu Thr Ile Phe Asp Ala Thr Lys Met Met Phe Ile
Arg Thr (SEQ ID NO:17);

Ser Tyr Met Asp Arg Thr Asp Val Pro Thr Ile Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Leu His
Thr Thr Pro Trp Ala Cys Arg (SEQ ID NO:18);

Ser Phe Pro Pro Ser Leu Pro Asp Lys Asn Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Val Ile Thr
(SEQ ID NO:19);

Ser Val Val Pro Glu Pro Gly Trp Asp Gly Pro Phe Glu Ser Met Lys Met Val Tyr His Ser
Gly Ala Gln Ser Gly Gln (SEQ ID NO:20);

Val Arg His Leu Pro Pro Pro Leu Pro Ala Leu Phe Asp Ala Met Lys Met Glu Phe Val
Thr Ser Val Gln Phe (SEQ ID NO:21);

Asp Met Thr Met Pro Thr Gly Met Thr Lys Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Val Ser
Thr (SEQ ID NO:22);

【化5】

Ala Thr Ala Gly Pro Leu His Glu Pro Asp Ile Phe Leu Ala Met Lys Met Glu Val Val
Asp Val Thr Asn Lys Ala Gly Gln (SEQ ID NO:23);

Ser Met Trp Glu Thr Leu Asn Ala Gln Lys Thr Val Leu Leu (SEQ ID NO:24);

Ser His Pro Ser Gln Leu Met Thr Asn Asp Ile Phe Glu Gly Met Lys Met Leu Tyr His
(SEQ ID NO:25);

Thr Ser Glu Leu Ser Lys Leu Asp Ala Thr Ile Phe Ala Ala Met Lys Met Gln Trp Trp
Asn Pro Gly (SEQ ID NO:27);

Val Met Glu Thr Gly Leu Asp Leu Arg Pro Ile Leu Thr Gly Met Lys Met Asp Trp Ile
Pro Lys (SEQ ID NO:28);

Pro Gln Gly Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Leu Trp Arg Ser (SEQ ID NO:31);

Leu Ala Gly Thr Phe Glu Ala Leu Lys Met Ala Trp His Glu His (SEQ ID NO:32);

Leu Leu Arg Thr Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Asn Gly (SEQ ID NO:35);

Leu Ser Thr Ile Met Glu Gly Met Lys Met Tyr Ile Gln Arg Ser (SEQ ID NO:36);

Leu Glu Ser Met Leu Glu Ala Met Lys Met Gln Trp Asn Pro Gln (SEQ ID NO:38);

Leu Ala Pro Phe Phe Glu Ser Met Lys Met Val Trp Arg Glu His (SEQ ID NO:40);

Leu Leu Gln Thr Phe Asp Ala Met Lys Met Glu Trp Leu Pro Lys (SEQ ID NO:43);

Val Phe Asp Ile Leu Glu Ala Gln Lys Val Val Thr Leu Arg Phe (SEQ ID NO:44);

Leu Val Ser Met Phe Asp Gly Met Lys Met Glu Trp Lys Thr Leu (SEQ ID NO:45);

Leu Glu Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Leu Glu (SEQ ID NO:46);

【 化 6 】

Leu Gly Gly Ile Glu Ala Gln Lys Met Leu Leu Tyr Arg Gly Asn (SEQ ID NO:48);

Arg Ser Pro Ile Ala Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Tyr Arg Glu Thr (SEQ ID NO:51);

Gln Asp Ser Ile Met Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ser Trp His Val Asn (SEQ ID NO:52);

Asp Gly Val Leu Phe Pro Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Arg Leu Glu Thr (SEQ ID NO:53);

Val Ser Arg Thr Met Thr Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Ile Tyr His Asp Leu (SEQ ID NO:54);

Asp Val Leu Leu Pro Thr Val Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Ile Thr Lys (SEQ ID NO:55);

Pro Asn Asp Leu Glu Arg Ile Phe Asp Ala Met Lys Ile Val Thr Val His Ser (SEQ ID NO:56);

Arg Asp Val His Val Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Thr Val Glu Thr (SEQ ID NO:58);

Gly Asp Lys Leu Thr Glu Ile Phe Glu Ala Met Lys Ile Cln Trp Thr Ser Gly (SEQ ID NO:59);

Leu Glu Gly Leu Arg Ala Val Phe Glu Ser Met Lys Met Glu Leu Ala Asp Glu (SEQ ID NO:60);

Val Ala Asp Ser His Asp Thr Phe Ala Ala Met Lys Met Val Trp Leu Asp Thr (SEQ ID NO:61);

【 化 7 】

Gly Leu Pro Leu Gln Asp Ile Leu Glu Ser Met Lys Ile Val Met Thr Ser Gly (SEQ ID NO:62);

Arg Val Pro Leu Glu Ala Ile Phe Glu Gly Ala Lys Met Ile Trp Val Pro Asn Asn (SEQ ID NO:63);

Pro Met Ile Ser His Lys Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Lys Phe Val Pro Glu (SEQ ID NO:64);

Lys Leu Gly Leu Pro Ala Met Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp His Pro Ser (SEQ ID NO:65);

Gln Pro Ser Leu Leu Ser Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Gln Ala Ser Leu Met (SEQ ID NO:66);

Leu Leu Glu Leu Arg Ser Asn Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Trp Gln Ile Ser (SEQ ID NO:67);

Asp Glu Glu Leu Asn Gln Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Pro Leu Val His Val Thr Lys (SEQ ID NO:68);

Ser Asn Leu Val Ser Leu Leu His Ser Gln Lys Ile Leu Trp Thr Asp Pro Gln Ser Phe Gly (SEQ ID NO:70);

Leu Phe Leu His Asp Phe Leu Asn Ala Gln Lys Val Glu Leu Try Pro Val Thr Ser Ser Gly (SEQ ID NO:71);

Ser Asp Ile Asn Ala Leu Leu Ser Thr Gln Lys Ile Tyr Trp Ala His (SEQ ID NO:72);

Met Ala Phe Gln Leu Cys Lys Ile Phe Try Ala Gln Lys Met Clu Trp His Gly Val Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO:81), 及び

【化 8】

**Met Ala Asp Arg Leu Ala Tyr Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp His Pro His Lys
Gly Gly Ser (SEQ ID NO:89)**

を含むことを特徴とするステップ;

(ii) 該融合タンパク質の該ペプチドをビオチン化するステップ;

(iii) このビオチン化融合タンパク質を単離するステップ;

(iv) アビジン又はストレプトアビジンをコートした非多孔質基板に該ビオチン化融合タンパク質を付着させるステップ;

(v) (a)該融合タンパク質が抗原を含む場合には、抗原アレイの作製を目的にステップ(i)~(iv)を所望回数実行することにより、又は

(b)該融合タンパク質が抗体結合性タンパク質を含む場合には、ステップ(iv)の前又は後に複数種の抗体又はその結合性断片を該タンパク質に結合させることにより

基板上に少なくとも3種類のタンパク質からなるアレイを形成させるステップ;

を含む作製方法。

【請求項 4】

融合タンパク質がさらに、該融合タンパク質に対するアフィニティー又は検出タグ配列としての機能を果たしうる第2ペプチド配列を含み、該配列は1~30アミノ酸を含むことを特徴とする請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

第2ペプチド配列をSEQ ID NO. 1アミノ酸配列又は請求項3のペプチドの末端に融合させる請求項3に記載の方法。

【請求項 6】

第2ペプチド配列を、抗原又は抗体結合性タンパク質のSEQ ID NO.1のアミノ酸配列又は請求項3のペプチドの融合側の反対側に融合させる請求項4に記載の方法。

【請求項 7】

ペプチド配列タグの少なくとも1個のアミノ酸がヒスチジンである請求項4ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

ペプチド配列タグが式His-Xで示され、式中Xは-Gly-、-His-、-Tyr-、-Gly-、-Trp-、-Val-、-Leu-、-Ser-、-Lys-、-Phe-、-Met-、-Ala-、-Glu-、-Ile-、-Thr-、-Asp-、-Asn-、-Gln-、-Arg-、-Cys-及び-Pro-からなる群より選択される請求項5に記載の方法。

【請求項 9】

ペプチド配列タグが式Y-Hisで示される請求項7に記載の方法。

【請求項 10】

Yが-Gly-、-Ala-、-His-及び-Tyr-より選択される請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

組換え細胞がビオチンリガーゼを発現し、かつステップ(ii)がビオチンの存在下に、ビオチン化を該細胞中in vivoで起こすように、実行されることを特徴とする請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

組換え細胞がビオチンを発現する請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

ステップ(iii)がSEQ ID NO.1のペプチド又は請求項3のペプチドに対して特異的であるさらなる抗体又はその結合性断片を使用して実行される請求項1~12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

ステップ(iii)が請求項4ないし10のいずれか1項に記載の第2ペプチド配列に対して特異的であるさらなる抗体又はその結合性断片を使用して実行される請求項4ないし10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

さらなる抗体又はその結合性断片がカラム又は磁気ビーズ上に固定化されるかもしくはピペットチップ内に装入される請求項13又は14に記載の方法。

【請求項16】

結合した融合タンパク質をその後でpH値を高めることにより溶離する請求項15に記載の方法。

【請求項17】

ステップ(iii)で、解離可能にビオチンに結合する分離材を使用して融合タンパク質を溶離する請求項1ないし12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

分離材は、ビオチンに対するアフィニティーが天然アビジン又はストレプトアビジンよりも低い改良アビジン又はストレプトアビジンである請求項17に記載の方法。

【請求項19】

分離材を磁気ビーズ又はピペットチップに付着させる請求項17又は18に記載の方法。

【請求項20】

pH条件を変化させて融合タンパク質を分離材から溶離する請求項17ないし18に記載の方法。

【請求項21】

ステップ(iv)で使用するコート基板の一部の領域をブロッキング処理して融合タンパク質が該領域に結合するのを防ぐようにする請求項1~20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

ペプチドが鎖長15アミノ酸のペプチドである請求項1~21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

ペプチドがSEQ ID NO.2

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

(SEQ ID NO.2)

のペプチドである請求項22に記載の方法。

【請求項24】

融合タンパク質が抗原を含む請求項1~23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

抗原ライブラリーを使用してアレイを作製する請求項24に記載の方法。

【請求項26】

融合タンパク質が抗体結合性タンパク質を含む請求項1ないし23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

抗体結合性タンパク質が1つ又は複数のプロテインA、プロテインG及びプロテインLである請求項26に記載の方法。

【請求項28】

抗体結合性タンパク質がプロテインA、プロテインG及びプロテインLの混合物である請求項23に記載の方法。

【請求項29】

抗体結合性タンパク質をそのN末端でペプチドと融合するか、又はそのC末端で該ペプチドと融合することを特徴とする請求項26ないし28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

ステップ(iv)に先立って発現融合タンパク質の同一性を確認する請求項1~29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 1】

同一性の確認に質量分析法を使用する請求項30に記載の方法。

【請求項 3 2】

内部対照としての機能を果たす融合タンパク質中のSEQ ID NO.1ペプチド又は請求項3のペプチドを検出することによりタンパク質の正規化を行う請求項1～31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 3】

内部対照としての機能を果たす融合タンパク質中の請求項4ないし10のいずれか1項に記載のペプチド配列タグを検出することによりタンパク質の正規化を行う請求項1～32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 4】

ペプチドの検出を、該ペプチドに対して高アフィニティーを有する抗体によって行う請求項32又は33に記載の方法。

【請求項 3 5】

免疫検定法を後続のアレイの使用による生物試料解析と同時に実行することによりタンパク質の正規化を行う請求項32ないし34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 6】

ステップ(iv)で使用するアビジン又はストレプトアビジンをコートした非多孔質基板がガラス又はプラスチック素材である請求項1～35のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 7】

基板上的のストレプトアビジン層を基層としてその上にさらなるアクセプター層を設ける請求項1～36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 8】

アレイが3～10,000種類の融合タンパク質を含む請求項1～37のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 9】

各タンパク質が、SEQ ID NO.1を含むペプチド又は、請求項3のペプチドをN末端に融合させた形とSEQ ID NO.1を含むペプチド又は請求項3のペプチドをC末端に融合させた形の両方の形で存在する請求項38に記載の方法。

【請求項 4 0】

請求項1～39のいずれか1項に記載の方法によって得られるタンパク質アレイ。

【請求項 4 1】

抗原-抗体結合を検出する方法であって

(vi) 請求項40に記載のアレイに、ステップ(v)(a)のアレイの場合には抗体を含む又は含むと推測される試料を、またステップ(v)(b)のアレイの場合には抗原を含む又は含むと推測される試料を、それぞれ付着させるステップ；及び

(vii) 基板上的の結合抗体又は結合抗原を検出するステップを含む方法。

【請求項 4 2】

ステップ(vii)をELISA法によって行う請求項41に記載の方法。

【請求項 4 3】

ステップ(vi)及び/又はステップ(vii)の最中に融合タンパク質アレイのタンパク質の品質及び/又は密度を監視し続ける請求項41及び42の方法。

【請求項 4 4】

SEQ ID NO.1を含むペプチドの検出によって監視を行う請求項43に記載の方法。

【請求項 4 5】

アレイが第2ペプチド配列をさらに含む融合タンパク質を含み、かつ該第2ペプチド配列を検出することによって監視を行う請求項43に記載の方法であって、該第2ペプチド配列が1～30アミノ酸を含むことを特徴とする方法。

【請求項 4 6】

少なくともいくつかのステップを自動化する請求項1ないし39又は請求項41ないし45のいずれか1項に記載の方法。

【請求項47】

すべてのステップを自動化する請求項46に記載の方法。

【請求項48】

抗体結合性タンパク質をN末端又はC末端でSEQ ID NO.1又は請求項3のペプチドを含む13～50アミノ酸のペプチドと融合させて含む融合タンパク質。

【請求項49】

SEQ ID NO.1のペプチド又は請求項3のペプチドがSEQ ID NO.2のペプチドである請求項48に記載の方法。

【請求項50】

融合タンパク質に対するタグ配列としての機能を果たす1～20アミノ酸の第2ペプチド配列をさらに含む請求項48又は49に記載の融合タンパク質。

【請求項51】

抗体結合性タンパク質がプロテインA、プロテインG又はプロテインL、もしくはそれらの混合物である請求項48ないし50のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項52】

請求項48ないし51のいずれか1項に記載の融合タンパク質をコードする核酸配列。

【請求項53】

ペプチドをコードする配列がSEQ ID NO.9

GGC CTG AAC GAC ATC TTC GAG GCT CAG AAA ATC GAA TGG CAC GAA (SEQ ID NO.9)

の配列である請求項52に記載の核酸。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No
PCT/GB 02/01623

C-(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 282 042 A (HOFFMANN LA ROCHE) 14 September 1988 (1988-09-14) cited in the application the whole document & US 5 932 433 A (SCHATZ PETER J) 3 August 1999 (1999-08-03) cited in the application -----	1-14, 19-52

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	Int. application No. PCT/GB 02/01623
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 53 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/BB 02 01623

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 53

Present claim 53 relates to a method, a fusion protein and a nucleic acid with reference the accompanying figures contrary to Rule 6.2 and 6.3 PCT. Furthermore, this claim does not contain any technical features which could be searchable (Article 6 PCT). Therefore, no search is possible for the subject-matter of said claim 53

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern Application No
 PCT/GB 02/01623

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5723584	A	03-03-1998	US 6265552 B1	24-07-2001
			US 5932433 A	03-08-1999
			AU 7516694 A	28-02-1995
			EP 0711303 A1	15-05-1996
			WO 9504069 A1	09-02-1995
			US 5874239 A	23-02-1999
US 5874239	A	23-02-1999	AU 7516694 A	28-02-1995
			EP 0711303 A1	15-05-1996
			WO 9504069 A1	09-02-1995
			US 5723584 A	03-03-1998
			US 6265552 B1	24-07-2001
			US 5932433 A	03-08-1999
EP 0282042	A	14-09-1988	AT 106897 T	15-06-1994
			AU 609783 B2	09-05-1991
			AU 1270988 A	15-09-1988
			DE 3889949 D1	14-07-1994
			DK 84288 A	11-09-1988
			EP 0282042 A2	14-09-1988
			IE 63991 B1	28-06-1995
			JP 2686090 B2	08-12-1997
			JP 63251095 A	18-10-1988
			NZ 223735 A	26-10-1990
			US 5310663 A	10-05-1994
			US 5284933 A	08-02-1994
			ZA 8801534 A	12-09-1988

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/53 U	
	G 0 1 N 37/00 1 0 2	

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

(74) 代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100082898
弁理士 西山 雅也

(72) 発明者 オートン, ケビン アンドリュー
イギリス国, ケンブリッジシャー ピーイー 2 9 2 イーディー, ゴッドマンチェスター, クロフトフィールド ロード 4 2

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA07 DA06
4H045 AA11 AA30 BA17 BA41 BA51 DA86 EA50

【要約の続き】

に少なくとも3種類のタンパク質からなるアレイを形成させるステップを含む作製方法。

专利名称(译)	蛋白质分析		
公开(公告)号	JP2004532024A	公开(公告)日	2004-10-21
申请号	JP2002580046	申请日	2002-04-04
申请(专利权)人(译)	NextGen的科学的Rimitido		
[标]发明人	オートンケビンアンドリユー		
发明人	オートン,ケビン アンドリユー		
IPC分类号	G01N27/62 C07K7/08 C07K14/315 C07K17/00 C07K19/00 C12N15/09 C12N15/62 C40B30/04 G01N33/53 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	C40B30/04 C07K14/315 C07K17/00 C07K2319/00 C07K2319/21 C07K2319/23 C12N15/62 G01N33/6842 G01N33/6845		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K7/08 C07K19/00 G01N27/62.V G01N33/53.D G01N33/53.U G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA06 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/BA41 4H045/BA51 4H045/DA86 4H045/EA50		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 西山雅也		
优先权	2001008521 2001-04-05 GB 2001031025 2001-12-28 GB 2002003448 2002-02-14 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种产生选自抗原或抗体的蛋白质阵列的方法，包括步骤：(i) 融合包含(a) 抗原或(b) 与具有不超过50个氨基酸的肽融合的抗体结合蛋白在重组细胞中表达蛋白质，其中肽包含SEQ ID NO. 1のミノ酸配列 LX 1 X 2 IX 3 X 4 X 5 X 6 KX 7 X 8 X 9 X 10 (SEQ ID NO.1) (其中，X <子> 1 <子>是一种天然氨基酸，X <子> 2 <子>是除了亮氨酸，缬氨酸，异亮氨酸，色氨酸，苯丙氨酸或酪氨酸天然氨基酸，X <子> 3 <子>是苯丙氨酸或亮氨酸，X <子> 4 <子>是谷氨酰胺或天冬酰胺，X <子> 5 <子>是丙氨酸，甘氨酸，丝氨酸或苏氨酸，X <子> 6 <子>是甘氨酸或甲硫氨酸和一个，X 7 是异亮氨酸，蛋氨酸或缬氨酸，X 8 是谷氨酰胺，亮氨酸，缬氨酸，酪氨酸，或异亮氨酸，X 9 色氨酸，酪氨酸，缬氨酸，苯丙氨酸，亮氨酸或异亮氨酸，X 10 是除天冬酰胺或谷氨酰胺的可选天然氨基酸；而且，肽可以在与X 6 相邻的赖氨酸残基处用生物素连接酶生物素化。步骤，其特征在于它包括：a) ;隔离 (iii) 生物素化融合蛋白；(ii) 的步骤在邻近所述融合蛋白X 6 的肽的赖氨酸残基的生物素化 (iv) 将生物素化的融合蛋白与抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白包被的无孔基质连接；(v) (a) 如果融合蛋白含有抗原，为了制备抗原阵列，进行步骤 (i) - (iv) 所需次数，或 (b) 如果融合蛋白是抗体结合蛋白该方法包括在步骤 (iv) 之前或之后通过将多种类型的抗体或其结合片段与蛋白质结合而在基底上形成至少三种类型蛋白质的阵列的步骤方法。