

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4610018号
(P4610018)

(45) 発行日 平成23年1月12日 (2011.1.12)

(24) 登録日 平成22年10月22日 (2010.10.22)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566	Z C C
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78	Z
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00	1 0 2
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 37/00	1 0 3
C 4 O B 60/12 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
請求項の数 39 (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-505108 (P2007-505108)
 (86) (22) 出願日 平成17年3月23日 (2005.3.23)
 (65) 公表番号 特表2007-530947 (P2007-530947A)
 (43) 公表日 平成19年11月1日 (2007.11.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/009539
 (87) 国際公開番号 W02005/094467
 (87) 国際公開日 平成17年10月13日 (2005.10.13)
 審査請求日 平成20年2月13日 (2008.2.13)
 (31) 優先権主張番号 04290775.8
 (32) 優先日 平成16年3月23日 (2004.3.23)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 60/559,108
 (32) 優先日 平成16年4月2日 (2004.4.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505270887
 バイオーラッド ラボラトリーズ インコーポレーティッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヘラクレス アルフレッド ノベル ドライブ 1000
 (73) 特許権者 500255007
 アメリカン ナショナル レッド クロス
 アメリカ合衆国, ワシントン ディー. シー. 20006, ノース ウェスト, イースト ストリート 2025
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料中の分析物化学種の濃度の範囲を縮小させる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の分析物を含む生物学的抽出物を分析して、所定の検出システムにより該分析物を検出するための方法であって、該分析物は特定範囲を包含する濃度で前記生物学的抽出物中に存在し、ここで高存在量分析物として規定される前記特定範囲の上端の濃度の分析物が、低存在量分析物として規定される前記特定範囲の下端の濃度の分析物を検出する前記検出システムの能力を妨害し、前記方法は、

(a) 前記生物学的抽出物の試料を、分析物に結合するのに十分な多様性で結合アフィニティーを有する結合成分のライブラリーに接触させるステップであって、前記生物学的抽出物中の前記分析物の濃度は前記範囲にわたって広がっており、

ここで、前記試料および前記ライブラリーは、前記高存在量分析物に結合する前記成分が前記高存在量分析物で飽和され該高存在量分析物の一部のみ結合するような相対量であり、そして該結合により、前記検出システムが前記結合した分析物中の前記低存在量分析物を検出する能力の、該結合した分析物中の前記高存在量分析物による妨害が実質的に削減されて前記検出システムにより検出可能な分析物の数が少なくとも1.5倍に増加するように、前記生物学的抽出物中の前記範囲に対して十分に縮められた結合した分析物の濃度の範囲を作り出すステップと、

(b) 結合しなかった前記試料の構成物から前記結合成分に結合している全ての分析物分子を単離し、そして前記検出システムにより、結合した全ての分析物を検出するステップと、

10

20

を含む方法。

【請求項 2】

前記生物学的抽出物の試料が、少なくとも100、少なくとも1,000、少なくとも10,000、少なくとも100,000、少なくとも1,000,000、または少なくとも10,000,000の分析物を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記ライブラリーが、少なくとも100、少なくとも1,000、少なくとも10,000、少なくとも100,000、少なくとも1,000,000、または少なくとも10,000,000の結合成分を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記結合成分が、ペプチド、オリゴヌクレオチド、およびオリゴ糖から選択される生体有機ポリマーである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記結合成分が固体支持体または複数の支持体に結合している、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記ライブラリーがコンビナトリアルライブラリーである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記所定の検出システムにより検出可能な分析物の数が、少なくとも 2 ~ 4 倍に増加する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

前記生物学的抽出物が、羊水、血液、脳脊髄液、関節内液、眼内液、リンパ液、乳汁、蒸散血漿、唾液、精液、精漿、血清、痰、滑液、涙、臍帯液、尿、生検ホモジネート、細胞培養液、細胞抽出物、細胞ホモジネート、条件培地、発酵ブロス、および組織ホモジネートからなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

前記分析物が、ポリペプチド、核酸、複合炭水化物、複合脂質、合成無機化合物および合成有機化合物からなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

前記単離された分析物分子を分画することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

前記単離された分析物分子を生体特異的結合成分と接触させ、それにより分析物種が捕獲されるか否かを決定することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

前記結合成分が、抗体およびアプタマーから選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

前記固体支持体または複数の支持体が、ビーズまたは粒子の集団である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 14】

前記固体支持体または複数の支持体が、繊維、モノリス、膜およびプラスチックストリップからなる群より選択される、請求項 5 記載の方法。

【請求項 15】

前記ライブラリーが、生殖系抗体ライブラリー、組換え結合タンパク質のファージディスプレイライブラリー、色素ライブラリー、膜の結合特異性が予め選択されない非コンビナトリアルライブラリー、およびコンビナトリアルライブラリーからなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

前記コンビナトリアルライブラリーが、ヘキサペプチドライブラリーである、請求項 6 記載の方法。

【請求項 17】

前記所定の検出システムが、比色分析、分光分析、磁気共鳴解析、エリブソメトリー解

10

20

30

40

50

析、質量分析、電気泳動解析分解、クロマトグラフィー分析、酵素による解析および配列解析のシステムからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項18】

クロマトグラフィー、電気泳動、濾過および沈殿からなる群より選択される分画技術により前記分析物を分画することを含む、請求項10記載の方法。

【請求項19】

各ビーズまたは粒子が、全ての他のビーズまたは粒子に結合した結合成分と異なる結合成分に結合している、請求項13記載の方法。

【請求項20】

異なる結合アフィニティーを有する複数の結合成分が、共通のビーズまたは粒子に結合している、請求項13記載の方法。

10

【請求項21】

ビーズまたは粒子が1 μ m未満の直径を有する、請求項13記載の方法。

【請求項22】

前記ビーズまたは粒子が第二の固体支持体に結合して、該第二の固体支持体上にアレイを形成する、請求項13記載の方法。

【請求項23】

前記ステップ(b)の検出が、一回の分析で行われる、請求項1記載の方法。

【請求項24】

診断用生物マーカーを同定するための方法であって、該方法が、

20

(a) 第一の表現型を有する生物の第一の組からの生体試料の第一の組、および第二の表現型を有する生物の第二の組からの生体試料の第二の組、において請求項1記載の方法を実行するステップと、

(b) 少なくとも1つの分析物種を同定し、ここで、前記生体試料の第一の組からの結合した分析物分子における該少なくとも1つの分析物種の濃度が、前記生体試料の第二の組からの結合した分析物分子における該少なくとも1つの分析物種の濃度と異なっており、そして、前記第一の表現型を前記第二の表現型と区別する前記診断用生物マーカーとして前記少なくとも1つの分析物種を規定するステップと、

を含む方法。

【請求項25】

30

ステップ(b)が、いずれの単一の生物マーカーよりも、前記第一の表現型を前記第二の表現型から区別可能である生物マーカープロファイルを同定することを含む、請求項24記載の方法。

【請求項26】

前記生物学的抽出物が血漿である、請求項1記載の方法。

【請求項27】

前記生物学的抽出物が血清である、請求項1記載の方法。

【請求項28】

前記結合成分が、充填したカラム内の固体充填材料に結合している、請求項1記載の方法。

40

【請求項29】

前記充填したカラムが重力カラムである、請求項28記載の方法。

【請求項30】

前記ライブラリーが、分裂・プールプロセスにより製造されたコンビナトリアルライブラリーである、請求項1記載の方法。

【請求項31】

ステップ(b)が、溶出緩衝液に結合した前記分析物分子を溶出することにより行われる、請求項1記載の方法。

【請求項32】

質量分析により、単離された前記分析物の少なくとも1つを同定するステップをさらに

50

含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 3】

MALDI、MALDI-TOF、ESI、または SELDI からなる群から選択される方法により、単離された前記分析物の少なくとも 1 つを同定するステップをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 4】

ゲル電気泳動により、単離された前記分析物の少なくとも 1 つを同定するステップをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 5】

二次元ゲル電気泳動により、単離された前記分析物の少なくとも 1 つを同定するステップをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3 6】

前記生物学的抽出物における前記分析物の濃度の範囲が、少なくとも 4 桁分の範囲にわたる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 7】

ステップ (a) において前記結合成分に結合している前記分析物が、前記生物学的抽出物中の分析物濃度の範囲に対して、少なくとも 2 分の 1 に減少した分析物濃度の範囲を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 8】

ステップ (a) において前記結合成分に結合している前記分析物が、前記生物学的抽出物中の分析物濃度の範囲に対して、少なくとも 10 分の 1 に減少した分析物濃度の範囲を有する、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 3 9】

ステップ (a) において前記結合成分に結合している前記分析物が、前記生物学的抽出物中の分析物濃度の範囲に対して、少なくとも 100 分の 1 に減少した分析物濃度の範囲を有する、請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

30

本発明は、コンビナトリアル化学、タンパク質化学および生化学の分野に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本願は、その開示が参照により本明細書にその全体を組み入れられる、2004年4月2日に出願された米国特許仮出願第60/559,108号、2004年6月23日に出願された米国特許仮出願第60,582,650号、2004年7月12日に出願された米国特許仮出願第60/587,585号、2005年1月12日に出願された米国特許仮出願第60/643,483号、および2004年3月23日に出願された欧州特許出願第04290775.8号の恩典を主張する一部継続出願である。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

40

プロテオミクスは、生物の全プロテオームの同一プロファイルを作製し、この情報の分析を通じて、潜在的診断および治療体を同定することを求めるものである。タンパク質混合物を分解するための現在の技術は、二次元ゲル電気泳動および多次元液体クロマトグラフィーを含む。これらの技術の双方は質量分析と結合させることができる。このアプローチの例は酵母における1,484のタンパク質の分解能および同定である (Washburn et al., Nat.Biotechnol.19(3):242-2471(2001))。タンパク質を分離し、同定する方法のもう1つの例は、Saccharomyces cerevisiaeにおける4000を超えるタンパク質-タンパク質相互作用を同定した、Uetz et al. (Uetz et al., Nature 403(6770):623-627(2000)) および Ito et al. (Ito et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98(8):4569-4574(2001

50

))によって開発された酵母2-ハイブリッドスクリーニングアッセイ法の修飾されたバージョンである。タンパク質の分離および同定のための定量的な方法は、Aebersoldおよび同僚 (Smolka et al., *Anal. Biochem.* 297 (1) : 25-312 (2001)) によって開発された同位体暗号化アフィニティータグ (ICAT) である。ICATは、タンパク質の発現のレベルを定量するための同位体的に正常または重試薬でタンパク質を部位特異的に共有結合標識することを含む。

【0004】

複合タンパク質混合物は組合せにより作製されたりガンドのライブラリーで分離することもできる。コンビナトリアルライブラリーへの実体 (entity) 分子の曝露に続き、前記実体はライブラリー中のリガンドに結合することができる。結合実体の検出は、精製された放射性標識初期実体を用いる場合に達成することができる (Mondorf et al., *J. Peptide Research* 52 : 526-536 (1998))。他の方法は実体に対する抗体による検出を含む (Buettnner et al., *International Journal of Peptide & Protein Research* 47 : 70-83 (1996) ; Furka et al., *International Journal Peptide Protein Research* 37 (6) : 487-493 (1991) ; および Lam et al., (1991) 前記)。複数実体に対するリガンドは、減算スクリーニング方法と組み合わせて、接着剤に固定化されたビーズを用いて検出することができる。これはQuASAR方法といわれ (国際 (PCT) 特許出願WO 01/40265)、ウイルスおよびプリオンタンパク質に結合したりガンドを検出するのに用いられた。

【0005】

FlONAアッセイ技術 (Hammond et al、国際 (PCT) 特許出願WO 04/007757) および他のコンビナトリアル技術はリガンド：実体相互作用を同定することができる。FlONAアッセイ技術は、単に、ライブラリー内のリガンドに結合するその能力に基づくのではなく、化学的、物理学的、生物学および/または生化学的機能に基づいて混合物からタンパク質を同定する。したがって、FlONAの目標は、所望の特性を結合するリガンド支持体を同定し、次いで、適当なビーズ上のリガンドを解読し、次いで、ビーズを適当な量で合成して、現在のプロテオミック方法を用いて所望の活性を持つ1つまたは少数のタンパク質を精製するものである。

【0006】

複雑な生物学的抽出物中の分析物の全分析は、個々の分析物間の濃度の大きな差によって妨げられる。ほとんどの生物学的混合物においては、いくつかの分析物は高濃度で存在し、他のものは痕跡量のレベルで存在するに過ぎない。その結果、分析物の濃度は所与の分析方法の動的範囲に適合させることができない。すなわち、試料中の最も豊富および最も豊富でない分析物化学種によって生じたシグナル強度の差は、一般には、検出し、正確に測定するための分析方法の能力よりも広い。例えば、高度に濃縮されたタンパク質は、最も豊富なタンパク質 (アルブミン-数10mg/ml) および最も豊富でないタンパク質 (例えば、IL-6、1pg/ml未満) の間の濃度の差が何億という高いファクターに到達しかねないヒト血清で起こるように、検出システムを飽和させることができ、非常に低い濃度は分析方法の感度未満であり得る。

【0007】

2つの方法は、現在、このギャップを扱うのに従う。第一のものはより適合した機器を設計することであり、第二のものは分析用の試料を改変するものである。

【0008】

試料を改変する1つの方法は、より豊富な化学種の試料を枯渇させ、それにより、より豊富でない化学種を検出のためにより利用できるようにすることである。この方法は、例えば、試料中の特定の化学種に向けられた、抗体または特異的色素のようなリンカー部分の使用を含む。例えば、血漿の場合には、豊富なタンパク質はアルブミン、免疫グロブリン、フィブリノーゲン、および α -1プロテイナーゼ阻害剤を含む。イムノアフィニティカラムは高価であり、その標的に対して全く特異的であるのは稀であり、標的タンパク質と会合したタンパク質を除くと考えられる。さらに、一旦最も豊富なタンパク質が除去されれば、もう1つの組が最も豊富となり、これは、次いで、さらなるアフィニティカラ

10

20

30

40

50

ムを開発する必要性を生じる。加えて、同一化学種内の異なる組織および異なる化学種からの組織からの生物学的試料は、最も豊富なタンパク質の完全に異なる組を有することができる。この方法は、いくつかの分析物化学種の排除はそれと相互作用する化学種も排除するという事実にはやはり悩んでいる。したがって、対象となり得るいくつかの化学種は排除される。かなり豊富なタンパク質の排除はいくつかの場合において役に立ち得るが、このアプローチは、その濃度が、依然として、検出するための機器の感度未満である非常に低い豊富性のタンパク質の検出をもたらさない。さらに、かなり豊富な化学種はいくつかのタンパク質（ある状況においては、数ダースさえ）によって表され、従って、多数の特異的方法は、各異なる豊富な化学種に取り込むように設計されなければならないと考えられる。従って、この方法は、残存する分析物化学種の間のある範囲の濃度を実質的に含まない。

10

【0009】

もう1つの方法は、典型的には、クロマトグラフィーによって試料を分画することである。この方法の結果、分析物のクラスの同様な生化学的特性に基づく異なる画分への区画化をもたらされる。例えば、イオン交換クロマトグラフィーは電荷に基づいてタンパク質を画分に区画化し、他方、サイズ排除クロマトグラフィーはサイズに基づいてタンパク質を区画化する。従って、これらの方法は分析物の濃度範囲を縮小させることができるが、各区画内の分析物化学種の集団の多様性を実質的に減少させるのを犠牲とする。

【発明の開示】

【0010】

20

発明の概要

本発明は、試料中の分析物化学種の集団の多様性を実質的に維持しつつ、複合試料中の異なる分析物化学種間の濃度の範囲を圧縮する方法を提供する。さらに詳しくは、前記方法は、より豊富でない化学種の濃度に対してより豊富な化学種の濃度を減少させるが、物理化学的特徴に基づいて分析物化学種を試料から実質的に排除することを含まない。

【0011】

前記のように、各分析技術は検出の動的範囲を有する。試料中の分析物の量が前記動的範囲を超える場合、そのシグナルは検出システムを飽和させ、前記量は正確には測定することができない。試料中の分析物の量が検出システムの感度範囲未満である場合、分析物はまた検出することができない。さらに、豊富な試料からのシグナルは、より豊富でない分析物が検出の動的範囲内にある場合でさえより豊富でない分析物を検出する能力に干渉し得る。本発明の方法は、試料中の分析物化学種間の濃度の範囲を圧縮する。これは、検出の感度閾値を超え、他方、同時に、豊富な分析物による検出システムのかなり低い飽和および、結果的に、感度閾値を超えてより豊富でない化学種を検出する能力との低下した相互作用となるように、検出のために提示された豊富な分析物の量を低下させるように、検出システムに対して増大した数の分析物分子を提供することを可能とする。結果は、試料中のより多くの分析物化学種を検出する能力である。この方法を用い、質量分析によって血清から少なくとも1.5倍多い化学種を検出することができる。頻繁には、この数は2倍～4倍間の多い検出可能な化学種である。

30

【0012】

40

本発明の方法は、検出のために試料を操作する他の方法とは対照的である。例えば、選択された豊富な化学種の枯渇は、試料中の広い数の化学種の濃度の範囲を有意には減少させない。分画は分析物の濃度の範囲を減少させるが、区画の集団内の化学種の多様性を実質的に減少させることによってそうする。

【0013】

本発明は、複合試料を、多くの異なる結合部分を含む選択された量のライブラリーに曝露することによってこの結果を達成する。双方の変数ライブラリー構成要素の多様性および用いるライブラリーの量は、本発明において有利なように操作することができる。試料が曝露される異なる結合部分の多様性を操作することによって、濃度の範囲、すなわち、豊富なおよび稀な双方の化学種を通じて化学種に結合することが可能である。また、用い

50

る異なる結合部分の数により大きければ、捕獲することが可能な試料集団内の化学種の数
は大きくなる。

【0014】

また、ライブラリーの量は、試料中の少なくともより豊富な化学種によって結合部分が
飽和されるように選択されなければならない。このように、捕獲される試料中の豊富なお
よび稀な化学種の相対的量は元の試料中のその相対的濃度よりもかなり近いと考えられる
。この結果、濃度範囲が圧縮され、これは、選択された検出システムの動的範囲内にある
検出の間に豊富なおよび稀な双方の化学種によって生じた非常に多数のシグナルを可能と
する。

【0015】

本発明の目的は、試料中で検出可能な化学種の数を用意に増加させること、特に、試料
内の新しい化学種の発見にある。結合部分のライブラリーのある種類はこの目的を達成す
るのに好ましい。特に、試料中の特定の分析物に結合するその能力につき予め選択された
多数の異なる結合部分のライブラリーを用いることによってこの目的を最良に達成するこ
とができる。そのようなライブラリーを本明細書において「非選択的」ライブラリーとい
う（そのようなライブラリー中のいくつかの結合部分の結合特異性はライブラリーを用い
た後に明らかとなり得るという事実は同ライブラリーを「選択的」としない）。そのよう
なライブラリーを用いると、識別なしで集団を通じて化学種を捕獲する尤度を増加させる
。したがって、例えば、各抗体が公知の結合パートナーに向けられる抗体のライブラリー
は、各抗体が向けられる化学種のみを選択し；対照的に、同一サイズの生殖系抗体ライ
ブラリーは予め選択された分析物に結合する抗体を含まない。そのようなライブラリーは、
試料中に存在することが知られていない化学種を選択するようである。コンビナトリアル
化学を使用することによって、または化学部分をランダムに組み立てることによって、非
選択的ライブラリーを作製することができる。さらに、選択的であろうと非選択的であろ
うと、ライブラリーのサイズを増加させることによって、捕獲され検出された試料中の異
なる分析物化学種の数を増加させることができる。結合部分の非選択的ライブラリーの例
は生殖系抗体ライブラリー、組換え体結合タンパク質のファージディスプレイライブラリー
、メンバーの結合特異性が予め選択されない色素ライブラリーおよび非コンビナトリアル
ライブラリー、種々の分類のコンビナトリアルライブラリー、およびそれらの一部を含む
。

【0016】

濃度圧縮の量は、結合部分の相対的量および試料中の分析物に依存するというこ
も注意すべきである。一方において、分析物に対する結合部分の相対的量は、結合部分
が試料中の分析物の全てを捕獲することができる程度に大きくすることができる。この
場合、分析物濃度範囲の圧縮はない。他方において、分析物に対する結合部分の相対
的量は、各分析物化学種が結合する結合部分の能力を飽和する程度に小さくするこ
とができる。この場合、理論的には、捕獲された各分析物化学種の量は同一であり、
分析物濃度の範囲は同等に圧縮される。その一方で、目標が可能な限り多くの化学種
を検出することにある場合に特に有用である。これらの両方の間には、より豊富な化
学種が結合部分を飽和させ、他方、より豊富でない化学種は結合部分を飽和させない
状況がある。この場合、豊富な分析物の濃度の範囲の間にはほとんど差がなく、他方
、より豊富でない化学種の濃度の差は依然として残る。この結果は、2つの異なる試
料クラスの間での分析物化学種の相対的濃度を比較するのに特に有用である。例えば
、バイオマーカー発見においては、2つの異なる表現型状態（例えば、癌対非癌）を
有する生物から採取された試料を比較して、2つの状態の間に差示的に存在する分
析物化学種を同定する。稀な化学種間の濃度の差を維持することによって、本発明
の方法はこれらの稀な分析物の間でバイオマーカーを見出すのを可能とする。1つの
状態において、試料中の分析物化学種に対する結合部分の比率はせいぜい1：500であ
って、より好ましくはせいぜい1：50またはせいぜい1：5である。

【0017】

本発明は、試料中の分析物化学種の集団の多様性を実質的に維持しつつ、複合試料中の

10

20

30

40

50

異なる分析物化学種間の濃度の範囲を縮小させる方法を提供する。本発明の好ましい態様において、(a) 第一の範囲の濃度で第一の試料に存在する複数の異なる分析物化学種を含む第一の試料を提供し；(b) 少なくとも100の異なる結合部分を含む一定量のライブラリーと第一の試料とを接触させ；(c) 異なる結合部分を持つ第一の試料からの異なる分析物化学種の一定量を捕獲し、未結合分析物化学種を除去し；ならびに、(d) 結合部分から捕獲された分析物化学種を単離して、第二の範囲の濃度で第二の試料に存在する複数の異なる分析物化学種を含む第二の試料を生じさせる工程を含む方法が提供される。ライブラリーの量は、第二の範囲の濃度が第一の範囲の濃度未満であるように、異なる分析物化学種の一定量を捕獲するように選択される。

【0018】

10

第一の試料は少なくとも100、少なくとも1,000、少なくとも10,000、少なくとも100,000、少なくとも1,000,000、または少なくとも10,000,000の異なる分析物化学種を含む。いくつかの態様において、ライブラリーは少なくとも1,000、少なくとも10,000、少なくとも100,000、少なくとも1,000,000、または少なくとも10,000,000の異なる結合部分を含む。

【0019】

好ましくは、結合部分は生体有機ポリマーを含む。好ましくは、生体有機ポリマーはペプチド、オリゴヌクレオチドおよびオリゴ糖からなる群より選択される。本発明のもう一つの態様において、結合部分は抗体およびアプタマーからなる群より選択される。

【0020】

20

本発明の好ましい態様において、結合部分は固体支持体またはその複数の支持体に結合される。好ましくは、固体支持体またはその複数の支持体はビーズまたは粒子の集団である。各ビーズまたは粒子は実質的に異なる結合部分に結合させることができる。また、複数の異なる結合部分は同一のビーズまたは粒子に結合させることができる。好ましくは、ビーズまたは粒子は1 μ m未満の直径を有する。ビーズまたは粒子は、破碎、粉碎および音波処理からなる群より選択される方法を用いて摩砕微粒子ビーズで形成することができる。この方法の好ましい態様において、粒子は第二の固体支持体に結合されて、アレイまたはディップスティックを形成する。好ましい微粒子ビーズは天然または合成ポリマーから形成されるポリマーマトリックスである。

【0021】

30

本発明のもう一つの好ましい態様において、固体支持体またはその複数の支持体は繊維、モノリス、膜およびプラスチックストリップからなる群より選択される。

【0022】

本発明の好ましい態様において、第一の試料に接触するライブラリーは非選択的ライブラリーである。多くの非選択的ライブラリーを用いて、本発明の方法を実行することができる。好ましい非選択的ライブラリーは、生殖系抗体ライブラリー、組換え体結合タンパク質のファージディスプレイライブラリー、メンバーの結合特異性が予め選択されない色素ライブラリーまたは非コンビナトリアルライブラリー、コンビナトリアルライブラリー、およびそれらの一部からなる群より選択することができる。

【0023】

40

好ましくは、異なる結合部分は完全なまたは完全でないコンビナトリアルライブラリーに含まれる。好ましいコンビナトリアルライブラリーはヘキサペプチドライブラリーである。

【0024】

本発明の1つの態様において、第二の試料は、第一の試料と実質的に同一な分析物化学種の多様性を有する。

【0025】

多くの試料を用いて、本発明の方法を実行することができる。本発明の好ましい態様において、試料は羊水、血液、脳脊髄液、関節内液、眼内液、リンパ液、乳汁、蒸散血漿、唾液・精液、精漿、血清、痰、滑液、涙、臍帯液、尿、生検ホモジネート、細胞培養液、

50

細胞抽出物、細胞ホモジネート、条件培地、発酵ブロス、組織ホモジネートおよびこれらの誘導体からなる群より選択される。

【0026】

1つの態様において、本発明の方法は、第二の試料中の分析物化学種を検出する工程を含む。好ましくは、分析物の検出は、比色分析、分光分析、磁気共鳴解析、エリブソメトリ解析、質量分析、電気泳動解析分解、クロマトグラフィー分析、酵素による解析および配列解析からなる群より選択される方法を用いることによってなされる。

【0027】

任意で、本発明の方法は、さらに、物理的または化学的特性に基づいて第二の試料中の分析物を分画する工程、または単離された分析物の少なくとも1つを同定する工程を含む。好ましくは、分析物の分画は、クロマトグラフィー、電気泳動、毛細管電気泳動、濾過および沈殿からなる群より選択される技術を用いて分析物を分離することを含む。

10

【0028】

本発明の1つの態様において、前記方法は、さらに、生体特異的結合部分を第二の試料と接触させ、次いで、生体特異的結合部分が第二の試料から分析物化学種を捕獲したか否かを判断する工程を含む。

【0029】

未結合分析物の除去は、捕獲された分析物を洗浄緩衝液で洗浄する工程を含むことができる。

【0030】

本発明の方法は異なる分析物を用いて実行することができる。本発明の好ましい態様において、分析物はポリペプチド、核酸、複合炭水化物、複合脂質、合成無機化合物および合成有機化合物からなる群より選択される。

20

【0031】

また、本発明は診断バイオマーカーを同定する方法を提供する。好ましい態様において、前記方法は(a)第一の表現型を有する生物の第一の組から生体試料の第一の組を提供し；(b)第二の表現型を有する生物の第二の組からの生体試料の第二の組を提供し；(c)生体試料の各々につき本明細書中に記載された(請求項1)試料中の異なる分析物化学種間の濃度の範囲を縮小させる方法を実行し、それにより、各々、生体試料の第三および第四の組を作製し；(d)生体試料の第三および第四の組の各々において分析物化学種を検出し；ならびに、(e)生体試料の第三および第四の組に差示的に存在する少なくとも1つの分析物化学種を同定し、それにより、少なくとも1つの分析物化学種は第二の表現型から第一の表現型を識別するためのマーカーである工程を含む。好ましい態様において、この方法の工程(e)は、バイオマーカープロファイル単独におけるバイオマーカーのいずれか1つよりも良好な予測能を提供するバイオマーカープロファイルを同定する工程を含む。

30

【0032】

本発明は、さらに、試料中の分析物の相対的量を低下させる方法を提供する。本発明の好ましい態様において、前記方法は(a)一定量の第一の分散を有する第一の複数の異なる分析物を含む第一の試料を提供し；(b)第一の試料を複数の異なる結合部分と接触させ、各結合部分は所定の量で存在し；(c)異なる結合部分を持つ第一の試料から第一の異なる分析物の一部を捕獲し、未捕獲分析物を除去し；ならびに、(d)結合部分から捕獲された分析物を単離して、所定量の第二の分散を有する第二の複数の異なる分析物を含む第二の試料を生じさせる工程を含む。複数の異なる結合部分の各々の所定量は、異なる分析物の所定量を捕獲し、それにより、所定量の第二の分散が所定量の第一の分散未満であるように選択される。

40

【0033】

また、本発明は、試料中の複数の分析物を検出するためのキットを提供する。本発明の好ましい態様において、キットは、少なくとも100の異なる結合部分のライブラリーを含む容器、および本発明の方法を実行するライブラリーを用いるための説明書を含む。好ま

50

しくは、結合部分は固体支持体またはその複数の支持体に結合される。また、ライブラリーはヘキサペプチドコンビナトリアルライブラリーまたはその一部を含むこともでき、ヘキサペプチドは粒子に付着される。

【0034】

任意で、本発明のキットは、結合部分を持つ分析物を捕獲するための結合緩衝液、または捕獲された分析物を結合部分から溶出させるための溶出緩衝液を含む。本発明のさらなるキット態様は、当業者が本明細書中に記載された方法の変形のいずれかを実施するのを可能とする任意の機能的成分を含む。

【0035】

本発明は結合部分を含むライブラリーも提供する。本発明の好ましい態様において、ライブラリーは少なくとも100の異なる結合部分を含み、複数の異なる結合部分が同一の固体支持体またはその複数の支持体に付着される。好ましくは、結合部分はコンビナトリアルヘキサペプチドライブラリーまたはその一部を含む。

【0036】

定義

他の箇所で定義しない限り、本明細書中で用いる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する当業者によって通常理解される意味を有する。以下の文献は本発明で用いられる用語の多くの一般的定義を当業者に与える：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994) ; The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988) ; The Glossary of Genetics, 5th ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991) ; および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書中で用いるように、以下の用語は他の箇所で特定されない限りそれらに帰属される意味を有する。

【0037】

「分析物」とは、本明細書中に記載されたように洗浄溶液との接触によって完全には破壊されないように本発明の結合部分に結合することができるいずれの分子部位もいう。「捕獲された分析物」は、洗浄溶液との接触後に本発明の結合部分によって結合されるいずれかの分析物である。

【0038】

「吸着剤」とは分析物（例えば、標的ポリペプチド）に結合することができるいずれの物質もいう。「クロマトグラフィー吸着剤」とは、クロマトグラフィーで典型的には用いられる物質をいう。クロマトグラフィー吸着剤は、例えば、イオン交換物質、金属キレート剤、疎水性相互作用吸着剤、親水性相互作用吸着剤、色素、および混合態様の吸着剤（例えば、疎水性引力/静電反発吸着剤）を含む。「生体特異的吸着剤」とは、生体分子、例えば、ヌクレオチド、核酸分子、アミノ酸、ポリペプチド、単糖、多糖、脂肪酸、脂質、ステロイドまたはこれらのコンジュゲート（例えば、糖タンパク質、リポタンパク質、糖脂質）を含む吸着剤をいう。ある例においては、生体特異的吸着剤は多タンパク質複合体、生物学的膜またはウイルスのようなマクロ分子構造であり得る。生体特異的吸着剤の例は抗体、受容体タンパク質、レクチンおよび核酸に結合した固体支持体である。生体特異的吸着剤は、典型的には、クロマトグラフィー吸着剤よりも標的分析物に対して高い特異性を有する。SELDIで用いられる吸着剤のさらなる例は米国特許第6,225,047号で見出すことができる (Hutchens and Yip, 「Use of retentate chromatography to generate difference maps」2001年5月1日)。

【0039】

結合部分は、気体状、水性および有機懸濁液およびエマルジョンを含む分子相互作用の形成と適合したいずれかの物理的状態、最も好ましくは液体状態の本発明を用いて検出可能な分析物と共に存在し、それと相互作用することができる。

【0040】

「固体支持体」とは、粒子（例えば、ビーズ）、繊維、モノリス、膜、フィルター、プラスチックストリップなどを含むいずれの不溶性物質もいう。

10

20

30

40

50

【0041】

「タンパク質バイオチップ」とはポリペプチドの捕獲に適合したバイオチップをいう。多くのタンパク質バイオチップは当技術分野において記載されている。これらは、例えば、CIPHERGEN Biosystems (Fremont, CA)、Packard BioScience Company (Meriden CT)、Zyomyx (Hayward, CA) およびPhylos (Lexington, MA) によって生産されるタンパク質バイオチップを含む。そのようなタンパク質バイオチップの例は以下の特許または特許出願に記載されている：米国特許第6,225,047号 (Hutchens and Yip, 「Use of retentate chromatography to generate difference maps」, 2001年5月1日)；国際公報WO 99/51773 (Kui melis and Wagner, 「Addressable protein arrays」, 1999年10月14日)；国際公報WO 00/04389 (Wagner et al., 「Arrays of protein-capture agents and methods of use there of」, 2000年7月27日) および国際公報WO 00/56934 (Englert et al., 「Continuous porous matrix arrays」, 2000年9月28日)。

10

【0042】

「表面増強された正味の脱着」または「SEND」は、プローブ表面に付着されたエネルギー吸収分子の層を含むプローブ（「SEND」プローブ）の使用を含むSELDIのバージョンである。付着は、例えば、共有または非共有化学結合によることができる。伝統的なMALDIとは異なり、SENDにおける分析物は、脱着/イオン化のためのエネルギー吸収分子の結晶性マトリックス内に捕獲されることを必要としない。「エネルギー吸収分子」（EAM）とは、レーザー脱着/イオン化源からエネルギーを吸収し、その後、それと接触する分析物分子の脱着およびイオン化に寄与することができる分子をいう。前記フレーズは、しばしば「マトリックス」といわれるMALDIで用いる分子を含み、桂皮酸誘導体、シナピン酸（「SPA」）、シアノ-ヒドロキシ-桂皮酸（「CHCA」）およびジヒドロキシ安息香酸、フェルラ酸、ヒドロキシアセトフェノン誘導体、ならびにその他を明示的に含む。それはSELDIで用いられるEAMも含む。ある態様において、エネルギー吸収分子は線状または架橋ポリマー、例えば、ポリメタクリレートに一体化される。例えば、組成物は -シアノ-4-メタクリロイルオキシ桂皮酸およびアクリレートのコポリマーであり得る。もう一つの態様において、組成物は -シアノ-4-メタクリロイルオキシ桂皮酸、アクリレートおよび3-（トリ-メトキシ）シリルプロピルメタクリレートのコポリマーである。もう一つの態様において、組成物は -シアノ-4-メタクリロイルオキシ桂皮酸およびオクタデシルメタクリレート（「C18 SEND」）を含むコポリマーである。SENDは米国特許第5,719,060号およびWO 03/64594にさらに記載されている (Kitagawa, 「Monomers And Polymers Having Energy Absorbing Moieties Of Use In Desorption/Ionization Of Analytes」, 2003年8月7日)。

20

30

【0043】

SEAC/SENDは、試料提示表面に結合部分およびエネルギー吸収分子が共に付着したSELDIのバージョンである。従って、SEAC/SENDプローブは、外部マトリックスに適用する必要性なしでアフィニティー捕獲および脱着を通じての分析物の捕獲を可能とする。C18 SENDバイオチップは、結合部分として機能するC18部分、およびエネルギー吸収部分として機能するCHCA部分を含むSEAC/SENDのバージョンである。

【0044】

CIPHERGEN Biosystemsによって製造されるタンパク質バイオチップは、アドレス可能な位置においてそれに付着したクロマトグラフィーまたは生体特異的吸着剤を有する表面を含む。CIPHERGEN ProteinChip（登録商標）アレイはNP20、H4、H50、SAX-2、Q10、WCX-2、CM10、IMAC-30、LSAX-30、LWCX-30、IMAC-40、PS-10およびPS-20を含む。これらのタンパク質バイオチップは、ストリップの形態のアルミニウム基板を含む。前記ストリップの表面は二酸化ケイ素で被覆される。

40

【0045】

NP-20バイオチップの場合には、酸化ケイ素は親水性吸着剤として機能して、親水性タンパク質を捕獲する。

【0046】

H4、H50、SAX-2、WCX-2、IMAC-3、PS-10およびPS-20バイオチップは、さらに、バイオ

50

チップの表面に物理的に付着した、またはバイオチップの表面にシランを通じて共有結合したヒドロゲルの形態の機能性化された架橋ポリマーを含む。H4バイオチップは疎水性結合に対してイソプロピル機能性を有する。H50バイオチップは、疎水性結合のためのノニルフェノキシ-ポリ(エチレングリコール)メタクリレートを含む。SAX-2バイオチップはアニオン交換のための第四級アンモニウム機能性を有する。WCX-2バイオチップはカチオン交換のためのカルボキシレート機能性を有する。IMAC-3バイオチップはニトリロトリ酢酸を通じて固定化される銅イオン、または配位共有結合のためのIDAを有する。PS-10バイオチップは、共有結合のためのタンパク質上の基に反応することができるアシル-イミダゾール官能基を有する。PS-20バイオチップはタンパク質との共有結合のためのエポキシド官能基を有する。PS-シリーズのバイオチップは、抗体、受容体、レクチン、ヘパリン、プロテインA、ビオチン/ストレプトアビジンなどのような生体特異的吸着剤をチップ表面に結合させるのに有用であり、ここでは、それは試料から分析物を特異的に捕獲するように機能する。LSAX-30(アニオン交換)、LWCX-30(カチオン交換)およびIMAC-40(金属キレート)バイオチップは、その表面の機能性化されたラテックスビーズを有する。そのようなバイオチップは、WO 00/66265(Rich et al. (「Probes for a Gas Phase Ion Spectrometer」, 2000年11月9日); WO 00/67293(Beecher et al., 「Sample Holder with Hydrophobic Coating for gas phase Mass Spectrometer」, 2000年11月9日); 米国特許出願第09/908,518号(Pohl et al., 「Latex Based Adsorbent Chip」, 2002年7月16日)および米国特許出願第60/350,110号(Um et al., 「Hydrophobic Surface Chip」, 2001年1月8日)にさらに記載されている。

10

20

【0047】

「気相イオン分光器」とは、気相イオンを検出する装置をいう。気相イオン分光器は気相イオンを供給するイオン源を含む。気相イオン分光器は、例えば、質量分析器、イオン移動度分光器、および全イオン電流測定デバイスを含む。「気相イオン分光測定」とは、気相イオンを検出するための気相イオン分光器の使用をいう。

【0048】

「質量分析器」とは、気相イオンの質量対電荷比率に翻訳することができるパラメータを測定する気相イオン分光器をいう。質量分析器は、一般には、イオン源および質量アナライザーを含む。質量分析器の例は時間飛行、磁気セクター、四極フィルター、イオントラップ、イオンサイクロトン共鳴、静電セクターアナライザーおよびこれらのハイブリッドである。「質量分析測定」とは、気相イオンを検出するための質量分析測定の使用をいう。

30

【0049】

本発明の文脈での「プローブ」または「質量分析器プローブ」とは、質量分析器のような気相イオン分光器に分析物に由来するイオンを導入するのに用いることができるデバイスをいう。「プローブ」は、一般には、分析物がイオン化エネルギーの源に提示される試料提示表面を含む固体基板(可撓性または剛性いずれか)を含む。「SELDIプローブ」とは、表面に付着された(「結合部分」ともいう)吸着剤を含むプローブをいう。「吸着剤表面」とは、吸着剤が結合する表面をいう。「化学的に選択性の表面」とは、例えば、共有または配位共有結合を形成する反応を介して、結合部分に結合することができる吸着剤または反応性部分いずれかに結合する表面をいう。

40

【0050】

「SELDI MSプローブ」とは、表面に付着された吸着剤を含むプローブをいう。

【0051】

本発明の文脈での「分散」とは、テスト試料中の分析物の濃度の数学的分散をいう。分散の縮小は、統計学的に有意な($p > 0.05$)ものである。最も単純な用語において、分散は、少なくとも1つの検出方法によって検出されるテスト試料中の全ての分析物濃度の標準偏差の二乗である。好ましい検出方法はマススペクトロスコーピーであり、ここに、検出可能な分析物の量はディテクターによって同定された質量ピーク直下の面積である。

【0052】

50

「洗浄緩衝液」とは、洗浄し、吸着剤表面から未結合物質を除去するのに用いることができる溶液をいう。洗浄緩衝液は、典型的には、特定の範囲内にpHを緩衝化しても、または緩衝化しなくてもよい塩、洗剤を含み、任意で、表面または複合体から外因的に会合した物質を除去するのに有用な他の成分を含むことができる。

【0053】

「溶出緩衝液」とは、結合部分および会合した分析物を解離させることができる溶液をいう。いくつかの状況において、溶出緩衝液は、サブユニットが複合体中で会合した場合に、サブユニット間の相互作用を破壊することができる。洗浄緩衝液に関しては、溶出緩衝液は、別々に、または混合物として用いられる洗剤、塩、有機溶媒などを含むことができる。典型的には、これらの後者の試薬は、洗浄緩衝液中よりも溶出緩衝液中でより高い濃度で存在し、溶出緩衝液を分子相互作用に対してより破壊的とする。分子相互作用を破壊するこの能力は「ストリンジェンシー」といい、溶出緩衝液は洗浄緩衝液よりも大きなストリンジェンシーを有する。

【0054】

発明の詳細な説明

本発明は、当業者が、複合混合物中に見出される対象となる分析物の濃度範囲を縮小させるのを可能とするキットおよび方法を提供する。本明細書中に記載された方法は、分析物特異的試薬を用いて先行技術の方法よりも優れた特別な利点を有する。なぜならば、それらは、未知の構成要素を有し、存在する異なる分析物の数（ 10^3 を超える）および（ 10^3 よりも大きなオーダーの）存在する濃度の動的範囲双方において複雑である試料中の分析物の濃度の範囲の縮小を可能とするからである。結果として、主張される発明を用いると、血液、血漿および血清を含む、生物学的源からの多くの流体に存在する多数の低存在量タンパク質からなる「ディーププロテオーム」の同時分析を可能とする（図5参照）。従って、本発明は、生物学的試料のような分子の複合混合物の分析的調製において用途を有する。

【0055】

分析物の濃度の範囲、または濃度の分散の縮小は、好ましくは、合成された、または不活性な支持体に結合された、規定されたサイズおよび多様性の結合部分ライブラリーを利用することによって達成される。多様な分析物を含有する溶液に導入すると、主張された発明の結合部分が溶液の分析物に結合すると考えられる。豊富な分析物は、その各結合部分の容量を飽和させるのに必要な量をはるかに超えた量で存在すると考えられる。従って、これらの豊富な分析物の合計量の高いパーセンテージは未結合のまま残ると考えられる。逆に、微量の分析物のより少ない量は、これらの分子がその利用できる結合部分の全てを飽和しないことを意味し；従って、微量分析物の出発量のより大きなパーセンテージは、豊富な分析物と比較して、その各結合部分に結合したままであると考えられる。非結合分析物は洗浄によって除去できる。結合した分析物が結合部分から溶出すると、出発物質に対して、溶出された物質中の低下した相対量の豊富な分析物がある。対照的に、微量分析物の量は出発物質に対して溶出された物質において増大する。分析物の相対的濃度のこの付随する改変の結果、溶出された物質が得られ、ここに、溶液中に存在するもし全てではないが多くの分析物は単一分析で、あるいは出発物質であてはまるよりも少数の分析工程で検出することができる。血清中において、例えば、アルブミンは豊富であり、多くの補体会合タンパク質、ホルモン-結合タンパク質が中間濃度で存在し、他方、パラクリン因子および細胞マーカーは微小濃度で存在し得る。本発明を用い、血清中で観察された一定範囲の分析物存在量は低下し、もしほとんどまたは全てではないが多くの対象となる分析物が分析されるのを可能とする。

【0056】

主張された発明を用いる試料の調製は簡単である。対象となる分析物を吸着した後、分析物は任意で洗浄されて、未結合分析物を除去する。次いで、例えば、溶出緩衝液を適用することによって、吸着された分析物を結合部分から溶出する。得られた溶液は結合部分を含まない全ての対象となる分析物を含有する。しかしながら、元の複合混合物とは異なる

10

20

30

40

50

り、得られた溶液が存在する分析物濃度の範囲は比較的小さい。高存在量分析物の濃度は減少されており、低存在量分析物の濃度は元の複合混合物に対して増加されているからである。分析物の濃度の範囲、または分析物の間の濃度範囲のこの修飾は、得られた溶液中の分析物のより大きなパーセンテージが、広く異なる濃度で存在する成分を有する複合混合物の直接的分析に必要な検出デバイスの再キャリブレーションなしで検出されるのを可能とする。

【0057】

本発明のいくつかの態様において、結合部分に結合した分析物は、質量分析器で用いるのに適したプローブまたはタンパク質チップへ直接的に溶出される。分析において助けるために、これらの態様で用いる溶出緩衝液は質量分析器で用いるのに適したマトリックス物質を含むことができる。または、マトリックス物質は、プローブまたはチップ上への分析物の沈積に引き続いて分析物に導入することができる。このタイプの好ましい態様において、バイオチップ上のマトリックス物質を含むSENDまたはSEAC/SENDバイオチップを用いる。これらの好ましい態様は、溶出緩衝液に含ませるべき、またはバイオチップ上への沈積に引き続いて適時のいくつかの時点において分析物に導入すべきマトリックス物質の必要性を軽減する。

10

【0058】

各々が複合混合物に存在する単一のまたは低パーセンテージの対象となる分析物を認識する複数の結合部分を提供することによって、本発明は、複合混合物の組成が、検出デバイスの最小の再キャリブレーションにて、または再キャリブレーション無しに検出されるのを可能とする。これは、そうでなければ検出できないと考えられる化学種の検出を含む。なぜならば、それらは高存在量分析物によってマスクされたか、または分析の方法によって検出されるあまりにも低い濃度で存在したかのいずれかだからである。これは、複数の再キャリブレーション、および/または複数のチャンネル、および/または複数の検出工程、または多くの複合混合物に存在する大きな濃度範囲の分析物によって必要とされる高価かつ無駄な分画技術に対する必要性によって検出工程がそうでなければ制限されると考えられる高スループット分析技術に対して多大な利点を提供する。さらに、低存在量分析物の相対的濃度を増加させることによって、本発明は、痕跡量にて試料に存在するに過ぎない分析物の検出を可能とする。血清を例として用い、いくつかのホルモンのようなある分析物は濃縮されていない血清中に痕跡量でのみ存在する。アルブミンのような他の分析物は豊富であり、マイクロモル濃度～ミリモル濃度の範囲の量で存在する。本発明は、高存在量分析物に対して低存在量分析物を濃縮する。従って、本発明を用いる例示的血清試料の調製においては、ホルモンの濃度は、アルブミンおよび他の高存在量分析物の濃度に対して増大される。血清からの低および高存在量分析物の濃度を一緒により近くすることによって、分析物の組成は、分析物を検出するのに用いる分析機器の1つのみまたは少数のみの感度設定を用いて定性的におよび定量的にの双方で測定することができる。

20

30

【0059】

同一のアプローチによって、本発明は、タンパク質不純物含有量における許容性が非常に制限される精製された治療タンパク質のような生物学的試料に存在する痕跡量のタンパク質を測定するのを可能とする。例えば、細胞培養上清からの精製された抗体は、抗体の発現で用いる細胞からの痕跡量の異なるタンパク質を含有し得る。これらの後者は存在すべきではなく、一般には、特異的ELISA法によって検出される。しかしながら、不純物の濃度が非常に低い場合には、免疫化学的テストは効果的ではない。もし分析すべき試料をまず本発明に従って処理すれば、痕跡量のタンパク質不純物は有意に濃縮され、従って、正規の化学的または免疫化学的方法によって検出できる。

40

【0060】

I. 試料中の相対的分析物濃度の低下

A. 適当なテスト試料

本発明のテスト試料は、本明細書中に記載するように、テスト試料に存在する分析物が本発明の結合部分と接触するのを可能とするいずれかの形態であり得る。適当なテスト試

50

料は気体、粉末、液体、懸濁液、エマルジョン、透過性または粉碎された固体などを含む。好ましくは、テスト溶液は液体である。テスト試料は、源から直接的に採取することができる。例えば、水試料は帯水層から直接的に採取し、本明細書中に記載された方法を用いて直接的に処理することができる。

【0061】

または、元の試料は種々の方法で調製して、テストのためにその安定性を増強することができる。そのような試料調製は、ある種の分析物の枯濁、濃縮、粉碎、抽出、パーコレーションなどを含む。例えば、固体試料を粉末まで粉碎し、次いで、水性または有機溶媒を用いて抽出することができる。粉末からの抽出物を、次いで、本発明の方法に供することができる。気体状試料は溶液を通気させ、または浸透させて、本発明の方法に液体を供するに先立って気体の成分を液体に溶解させおよび/または濃縮することができる。

10

【0062】

テスト試料は、好ましくは、少なくとも4つの対象となる分析物、より好ましくは少なくとも8、15、20、50、100、1,000、100,000、1,000,000、10,000,000またはそれ以上の対象となる分析物を含む。いくつかの状況においては、本発明の方法を用いる操作に適したテスト試料は何百または何千の対象となる分析物を含むことができる。好ましくは、テスト試料に存在する分析物の濃度は少なくとも大きさが1オーダー、より好ましくは、大きさが少なくとも2、3、4またはそれ以上のオーダーにわたる。一旦本発明の方法に供されれば、少なくとも1つの検出方法によって検出可能な分析物についてのこの濃度範囲は少なくとも2のファクター、より好ましくは10、20、50、100、1000またはそれ以上のファクターだけ減少すると考えられる。

20

【0063】

テスト試料はいずれかの適当な方法を用いて収集することができる。例えば、環境の試料は浸漬し、拾い、掬い、吸引し、または捕獲することによって収集することができる。生物学的試料は拭き取り、掻き落とし、外科的に摘出することによって、または皮下注射などで収集することができる。各場合における収集方法は、試料源および状況に大いに依存し、収集の多くの代替となる適当な技術が当業者に周知である。

【0064】

1. 生物学的テスト試料

テスト試料は、空気、水、土、抽出物などのような環境試料を含む対象となる分析物を潜在的に含むいずれの源からも採取することができる。本発明の好ましいテスト試料は生物学的試料、好ましくは生物学的流体である。本発明で操作することができる生物学的試料は羊水、血液、脳脊髄液、関節内液、眼内液、リンパ液、乳汁、蒸散血漿、唾液・精液、精漿、血清、痰、滑液、涙、臍帯液、尿、生検ホモジネート、細胞培養液、細胞抽出物、細胞ホモジネート、条件培地、発酵ブロス、組織ホモジネートおよびこれらの誘導体を含む。生物学的試料中の対象となる分析物はタンパク質、脂質、核酸および多糖を含む。さらに詳しくは、対象となる分析物は、動物に通常存在し、または癌、ウイルス感染、寄生虫感染、細菌感染などのような病気または感染状態に関連する細胞代謝産物である。特に対象となる分析物は、細胞ストレスに対するマーカーであるものである。動物がストレス下にあることを示す分析物は、ある種の精神病、心筋梗塞および感染を含む多数の病気状態の初期インジケーターである。

30

40

【0065】

対象となる分析物は動物にとって外来性であるが、動物組織に見出されるものも含む。この点に関して特に関心対象の分析物は、その多くが異なるエナンチオマーとして存在する抗生物質、および感染性生物によって生産され、または環境から動物に隔離され得るトキシンを含む治療薬物を含む。試料は、例えば、卵白または大腸菌 (*E. coli*) 抽出物であり得る。

【0066】

2. 環境テスト試料

50

環境試料は本発明で用いられる好ましいテスト試料のもう1つのクラスである。好ましい環境試料は土、ダスト、ふけ、天然および合成繊維、水、植物物質、動物の糞などを含む。環境試料中の好ましい分析物は天然および合成トキシン、肥料、除草剤および殺虫剤、ならびに細菌についてのマーカー、および対象となる剤に特徴的な構造タンパク質のようなウイルス剤を含む。環境テスト試料に求められる特に好ましい分析物はトキシン、特に、ポツリヌス、リシン、炭疽トキシンなどのようなトキシンである。環境テスト試料に存在する対象となる病気関連分析物は完全なビリオンならびにポツリヌス、エボラ、HIV、SARS、炭疽、ペスト、マラリア、天然痘、ウシ海綿状脳障害に関連するプリオン、スクラピー、変種CJDなどの特徴的なタンパク質および核酸を含む。

【0067】

10

例示的環境試料は、水の天然に生じるもののような天然環境を含む多数の源から得ることができる。水の天然に生じるものは、例えば、大洋、湖、海、川、沼、池、三角州、または湾であり得る。または、環境抽出物は、水処理センターからの抽出物であり得る。

【0068】

または、環境試料は建物のような人造環境から採取することができる。建物はいずれかの人造建物であり得る。好ましくは、建物は天然痘、炭疽のような一つまたは複数の生物学的病原体、あるいはサリン、ソマン、神経毒、爆発性化学物質、殺虫剤、VX、および発泡剤のような一つまたは複数の毒性剤で汚染されているものである。環境試料を得るための方法は、建物の表面の乾式拭き取り、または当業者に公知の適当な溶媒を用いての建物の表面の湿式拭き取りを含む。

20

【0069】

B. 適当な結合部分

本発明の適当な結合部分は染料およびトリアジンのような小さな有機分子、およびペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、オリゴ糖または脂質のような生体ポリマーを含む。本発明の結合部分は抗体のような100KDaまたはそれ以上の分子量を有する分子であってよいが、好ましくは、10KDa、より好ましくは1KDa程度、望ましくは1KDa未満、例えば、750Da、500Da、または250Da未満の範囲の分子量を持つより小さな分子である。理想的には、本発明の結合部分は不溶性粒状物質に結合される。各不溶性粒子は、好ましくは、同一結合部分のいくつかのコピーを運び、各粒子のタイプは異なる結合部分に結合する。

【0070】

30

本発明の結合部分は溶液、懸濁液、または固体支持体への設置を含む分析物と結合部分との接触を可能とするいずれかの他の状況におけるものであり得る。

【0071】

結合部分は「ファージディスプレイライブラリー」の一部であってよく、前記ペプチドはファージコートの一部として提示される。(例えば、Tang, Xiao-Bo, et al.; J. Biochem; 1997; pp.686-690; vol.122, No.4)。ファージ粒子の表面へのペプチドの提示は、小さなペプチドのコンビナトリアルライブラリーの迅速スループットスクリーニングを可能とし、これは、コンビナトリアル抗体ライブラリーをスクリーニングするのにやはり有利である方法である。ファージディスプレイライブラリーは、ファージタンパク質コートの一部として結合部分を発現するように組換えにより操作されているバクテリオファージから形成される。ファージディスプレイを用い、結合部分のライブラリーを容易に構築することができる。

40

【0072】

結合部分は可溶性コンビナトリアル分子であってもよい。可溶性コンビナトリアル分子は、好ましくは、結合部分が相補的固体支持体に結合されるのを可能とする捕獲部分を含む。可溶性結合部分の態様は、典型的には、試料に接触させ、結合部分を固体支持体に結合または結合させることによって得られた複合体を単離するに先立って対象となる分析物に結合される。コンビナトリアルライブラリーは、19の天然に生じるアミノ酸のようなキラル原子を含有する基本構成要素から構成されていてもよい。

【0073】

50

本発明の結合部分は、当業者に公知のいずれかの技術を用いて製造することができる。例えば、結合部分は化学的に合成し、天然源から収穫し、または生体有機ポリマーである結合部分の場合には、組換え技術を用いて製造される。この後者の理由で、15個、10個、8個、6個または4個またはそれ以下のアミノ酸を有するペプチドは特に有利である。というのは、それらは組換えまたは固相化学技術を用いて容易に製造されるからである。さらに、化学的に合成されたライブラリーは、例えば、Fodor et al., Science 251 : 767-773 (1991) および Houghten et al., Nature 354 : 84-86 (1991) に記載されている。結合部分の補充体の多様性は、結合部分の長さ（個々の結合部分におけるアミノ酸の数）の能力に対する異なるアミノ酸の数の結果であるような、分裂-カップリング-再結合 (split-couple-recombine) 固相コンビナトリアル合成、Lam et al., Nature 354, 82-84 (1991)。

10

【0074】

核酸はもう1つの好ましい生体有機ポリマー結合部分である。ペプチドに関しては、核酸は、当業者に周知の合成または組換え技術を用いて製造することができる。本発明の好ましい核酸結合部分は長さが少なくとも4個、より好ましくは6個、8個、10個、15個または20個のヌクレオチドである。核酸結合部分は、タンパク質または代謝産物のような特異的分子標的に結合する一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAの分子（例えば、アダマー）を含む。

【0075】

オリゴ糖結合部分は本発明の一部としてやはり考えられる。オリゴ糖結合部分は長さが好ましくは少なくとも5の単糖単位、より好ましくは長さが8、10、15、20、25またはそれ以上の単糖単位である。

20

【0076】

生体ポリマー結合部分は液体であり得る。本明細書中で用いるように、用語「脂質」とは、疎水性または両親培性部分をいう。従って、結合部分の脂質ライブラリーも本発明の方法およびキットでの使用が考えられる。適当な脂質はC14~C50脂肪族、アリアル、アリアルアルキル、アリアルアルケニル、またはアリアルアルキニル部分を含み、これは、窒素、硫黄、酸素およびリンからなる群より選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含むことができる。他の適当な脂質はホスホグリセリド、グリコシルグリセリド、スフィンゴ脂質、ステロール、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルプロパノールアミンを含む。結合部分の液体ライブラリーは長さが好ましくは少なくとも5の単位、長さがより好ましくは少なくとも8、10、15、20、25、50またはそれ以上の単位である。

30

【0077】

小さな有機分子も本発明の結合部分としてやはり考えられる。典型的には、そのような分子は分析物とのイオン性、疎水性または親和性相互作用を可能とする特性を有する。小さな有機結合部分はモノ-、ジ-およびトリ-メチルアミノエチル基、モノ-、ジ-およびトリ-エチルアミノエチル基、スルホニル、ホスホリル、フェニル、カルボキシメチル基などのようなクロマトグラフィープロセスで伝統的に用いられる化学基を含む。例えば、ライブラリーはベンゾジアゼピン（例えば、Bunin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712 (1994) 参照）およびペプチド（例えば、Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371 (1992)）を用いることができる。もう1つの態様において、結合部分は色素またはトリアジン誘導体である。このリストは断じて限定的なものではない。というのは、当業者であれば、本発明の結合部分として用いるのに適合したイオン性、疎水性または親和性特性を持つ何千の化学官能基を容易に認識するからである。コンビナトリアル結合部分ライブラリーの生産および使用は後により詳細に議論する。

40

【0078】

結合部分は支持体に予め結合したものを購入することができ、支持体上で合成することができ、または標準的な方法を用いて支持体上に間接的に付着、または直接的に固定化することができる（例えば、Harlow and Lane, Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988) ; Biancali et al., Letters in Peptide Science 7 (291) : 297 (2000) ; MacBeath et al., Science 289 : 1760-1763 (2000) ; Cass et a

50

I., 編, Proceedings of the Thirteenth American Peptide Symposium ; Leiden, Escom, 97 5-979 (1994) ; 米国特許第5,576,220号 ; Cook et al., Tetrahedron Letters 35 : 6777-6780 (1994) ; および Fodor et al., Science 251 (1995) : 767-773 (1991) 参照)。

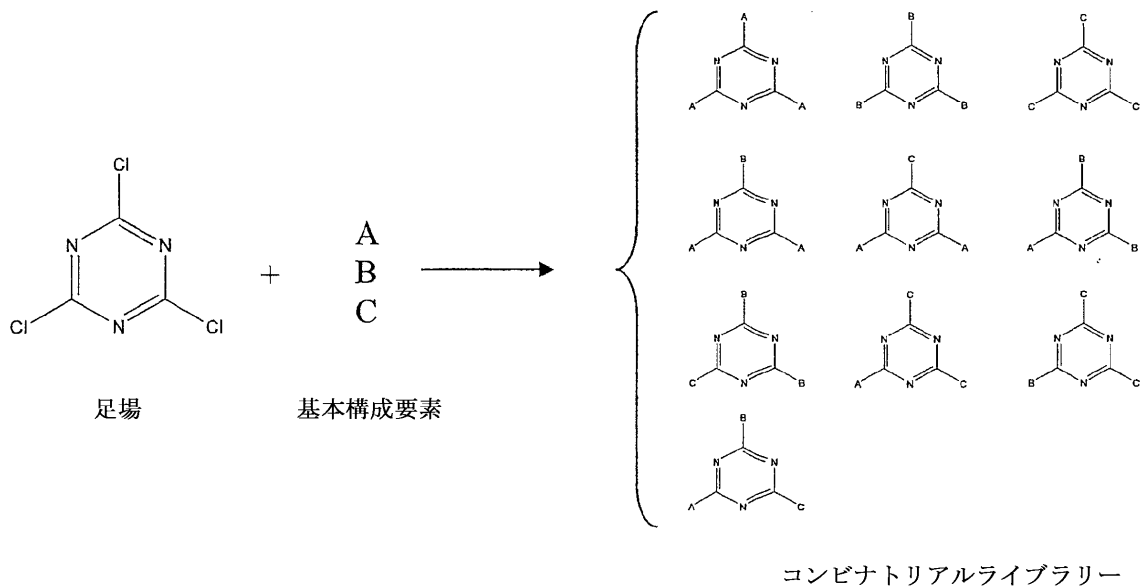
【0079】

コンビナトリアルライブラリー

本発明の1つの態様において、結合部分のライブラリーはコンビナトリアルライブラリーまたはその一部である。コンビナトリアル化学ライブラリーは、全ての可能な組合せにおいて多数の化学的(基本構成要素)を組み合わせることによって、化学合成または生物学的合成いずれかによって生じた化合物の集団である。例えば、ポリペプチドライブラリーのような完全な線状コンビナトリアル化学ライブラリーは、所与の化合物の長さ(すなわち、ポリペプチド化合物におけるアミノ酸の数)についての各可能な方法で化学的基本構成要素(アミノ酸)の組を組み合わせることによって形成される。例えば、もし基本構成要素の数が5であって、構築体が5つのメンバーから構成されるならば、可能な線状組合せの数は 5^5 または3,125のメンバーのものである。この場合、基本構成要素(A、B、C、DおよびE)は、A-A-A-A-A ; A-A-A-A-B ; A-A-A-A-C ; A-A-A-B-A ; A-A-A-B-B ; A-A-A-B-C ; ; A-A-B-A-A ; A-A-B-A-B ; A-A-B-A-C ; ; E-E-E-E-C ; E-E-E-E-D ; E-E-E-E-Eのように線状に組み立てる。

【0080】

コンビナトリアルライブラリーのもう1つの形態は足場ベースのものである。これらの構築体は、基本構成要素によって置換できる位置を含む単一中心分子またはコアに基づく。その例は、その上に数個の置換基を結合させることができるトリクロロ-トリアジン(3つの置換可能な位置)によって与えられる。もし置換基の数が3であれば、可能な組合せの数は10である。また、各置換基の相対的位置を考慮することができ;この場合、組合せの数はより大きい。



【0081】

第三のレベルとして、線状コンビナトリアルライブラリーを足場ベースのライブラリーと組み合わせることができ、この後者の置換基はコンビナトリアル線状配列である。

【0082】

何百万の化学化合物を、化学基本構成要素のそのような組合せ混合を通じて合成することができる。ペプチド結合部分については、長さは好ましくは15個、10個、8個、6個または4個のアミノ酸に限定される。本発明の核酸形成部分は少なくとも4個、より好ましくは6個、8個、10個、15個、または少なくとも20個のヌクレオチドの好ましい長さを有する。オリゴ糖は好ましくは長さが少なくとも5の単糖単位、より好ましくは8、10、15、20、25またはそれ以上の単糖単位である。

【 0 0 8 3 】

コンビナトリアルライブラリーは完全または不完全であってよい。生体ポリマーの完全なコンビナトリアルライブラリーは、所与のポリマーの長さおよび組成についてのモノマーの各可能な順列の代表を含むライブラリーである。不完全なライブラリーは、所与のポリマーの長さについてのモノマーの一つまたは複数の可能な順列を欠くライブラリーである。

【 0 0 8 4 】

ペプチド結合部分は主張される発明の好ましい態様である。主張される発明で用いるのに適したペプチド結合部分のライブラリーを作製する方法は当業者に周知である。例えば、「分裂、カップリング、および再結合」方法（例えば、Furka et al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 37: 487-493 (1991) ; Houghton et al., *Nature* 354: 84-88 (1991) ; Lam et al., *Nature*, 354: 82-84 (1991) ; 国際特許出願WO 92/00091 ; および米国特許第5,010,175号、同第5,133,866号および同第5,498,538号参照）または当技術分野において公知の他のアプローチ。ペプチドライブラリーの発現もまたDevlin et al., *Science*, 249: 404-406 (1990) に記載されている。

【 0 0 8 5 】

当技術分野において周知のコンビナトリアルおよび合成化学技術は、各々がユニークな構造を有する、何百万のメンバーを含有するライブラリーを作製することができる（Lam et al., *Nature* 354: 82-84 (1991) および国際（PCT）特許出願WO 92/00091）。例えば、天然アミノ酸のうち18で作成された線状ヘキサマーリガンドのライブラリーは 34×10^6 の異なる構造を含む。アミノ酸アナログおよび異性体もまた含まれる場合、潜在的構造の数は現実には制限されない。さらに、そのようなライブラリーの各メンバーは、異なる分子に結合する容量を潜在的に保有する。コンビナトリアルライブラリーのメンバーはビーズのような固体支持体上で合成することができるか、または固体支持体に結合させることができ、各ビーズは本質的にその表面に何百万のライブラリーメンバーのコピーを有する。異なるビーズは異なるライブラリーメンバーに結合させることができ、ライブラリーメンバーを結合させるのに用いるビーズの合計数は多いので、ビーズ結合ライブラリーメンバーに結合することができる異なる分子の潜在的数は膨大なものである。

【 0 0 8 6 】

Hammond et al. のUS 2003/0212253 (2003年11月13日) は、以下のラインに沿ったコンビナトリアルライブラリーを記載する。ペプチド結合部分ライブラリーは、天然アミノ酸に対する増大した安定性を提供するアミノ酸から合成することができる。例えば、システイン、メチオニンおよびトリプトファンはライブラリーから省略することができ、2-ナフチルアラニンおよびノルロイシンのような非天然アミノ酸は含まれる。N末端アミノ酸はD-異性体であってよく、またはアミノ-ペプチダーゼの存在下でより大きな生化学的安定性を提供するようにアセチル化することができる。結合部分の密度は、標的分子に対して十分な結合を提供するのに十分でなければならないが、結合部分が標的分子よりはむしろそれ自体と反応するようにあまり高くはならない。支持体の乾燥重量1グラム当たり0.1 μ モル ~ 500 μ モルの結合部分密度が望ましく、より好ましくは、支持体の1グラム当たり10 μ モル ~ 100 μ モルの結合部分密度が望まれる。6merのペプチドライブラリーはToyopearl-AFアミノ650M樹脂に合成された（Tosohaas, Montgomeryville, Pa）。樹脂ビーズのサイズはビーズ当たり60 ~ 130mmの範囲であった。出発樹脂の初期置換は、Fmoc-Ala-OHおよびBoc-Ala-OH（1 : 3.8のモル濃度比率）の混合物の結合によって達成された。結合の後、Boc保護基を十分に正味のTFAで除去した。次いで、得られた脱保護アミノ基をアセチル化した。ペプチド鎖を、樹脂ビーズ上の残存するFmoc-Ala-OH部位を介して組み立てた。標準的なFmoc合成戦略を使用した。1つの態様において、典型的な実験では、6グラムのFmoc-Ala-(Ac-Ala-) Toyopearl樹脂を20% ピペルジン/DMF（2 x 20分）で脱保護し、次いで、DMF（8回）で洗浄し、18の別々の反応容器に等しく分けた。各別々の容器においては、単一のFmoc-アミノ酸を4 ~ 7時間で樹脂（BOP/NMM、5 ~ 10倍過剰）に結合させた。個々の樹脂を洗浄し、「分裂/混合」ライブラリー技術を用いて組み合わせた（Furka et al., *Int. J.*

. Peptide Protein Res., 37 : 487-493 (1991) ; Lam et al., Nature, 354, 82-84 (1991) ; 国際特許出願WO 92/00091 (1992) ; 米国特許第5,010,175号 ; 米国特許第5,133,866号 ; および米国特許第5,498,538号)。脱保護および結合のサイクルは、アミノ酸配列が完了するまで反復した (ヘキサマーライブラリーについては6サイクル)。最終Fmocは、最後の結合サイクルの間に、別々の反応容器中の20%ピペリジン/DMFを用いてペプチド樹脂から除去した。側鎖保護基はTFA処理 (TFA : H.sub.2O : フェノール、90 : 5 : 5) にて2時間で除去した。樹脂を広く洗浄し、真空下で乾燥した。達成されたペプチド密度は、典型的には、0.06~0.12ミリモル/g樹脂の範囲にある。アミノ酸はLまたはD-立体異性体またはラセミ体いずれかであり得る。

【 0 0 8 7 】

ペプチドリガンド-樹脂ビーズ複合体のペプチド組成の配列決定およびペプチド組成を確認し、樹脂の置換の程度はCommonwealth Biotechnologies, Inc., Richmond, Vaにおける定量的アミノ酸分析によって計算した。配列決定は、Hewlett Packard G1005Aを用いるエドマン分解によって、Protein Technologies Laboratories, Texas A&M Universityで行った。

【 0 0 8 8 】

コンビナトリアルライブラリーの調製用のデバイスは市販されている (例えば、357 MP S, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA参照)。加えて、多数のコンビナトリアルライブラリーそれ自体は市販されている (例えば、ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MDなど参照)。

【 0 0 8 9 】

いくつかのペプチドライブラリー態様において、ペプチドは組換えバクテリオファージの表面で発現されて、大きな容易にスクリーニングされるライブラリーを生じる。「ファージ方法」 (Scott and Smith, Science 249 : 386-390, 1990 ; Cwirla, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87 : 6378-6382, 1990 ; Devlin et al., Science, 49 : 404-406, 1990) を用い、非常に大きなライブラリーを構築することができる ($10^6 \sim 10^8$ 化学実体)。第二のアプローチは主として化学的方法を用い、そのうちGeysen方法 (Geysen et al., Molecular Immunology 23 : 709-715, 1986 ; Geysen et al., J. Immunologic Method 102 : 259-274, 1987) およびFodor et al. (Science 251 : 767-773, 1991) の方法が例である。Furka et al. (Biochemistryの第14回国際会議, 第5巻, アブストラクトFR : 013, 1988 ; Furka, Int. J. Peptide Protein Res. 37 : 487-493, 1991), Houghton (1986年12月に発行された米国特許第4,631,211号) およびRutter et al. (1991年4月23日に発行された米国特許第5,010,175号) は、アゴニストまたはアンタゴニストとしてテストすることができるペプチドの混合物を産生させる方法を記載する。

【 0 0 9 0 】

化学的多様性ライブラリーを作製するための他の化学も用いることができる。そのような化学は、限定されるものではないが、ペプチド (例えば、PCT公報WO 91/19735)、コードされたペプチド (例えば、PCT公報WO 93/20242)、ランダム生体オリゴマー (例えば、PCT公報WO 92/00091)、ベンゾジアゼピン (例えば、米国特許第5,288,514号)、ヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチドのようなダイバーソーマー (Hobbs et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90 : 6909-6913 (1993))、ビニル性ポリペプチド (Hagihara et al., J. Amer. Chem. Soc. 114 : 6568 (1992))、グルコーススカフォールディングでの非ペプチドペプチドミメティックス (Hirschmann et al., J. Amer. Chem. Soc. 114 : 9217-9218 (1992))、小化合物ライブラリーの同様な有機合成 (Chen et al., J. Amer. Chem. Soc. 116 : 2661 (1994))、オリゴカルバメート (Cho et al., Science 261 : 1303 (1993))、および/またはペプチジルホスホネート (Campbell et al., J. Org. Chem. 59 : 658 (1994))、核酸ライブラリー (Ausubel, Berger and Sambrook, 全て前記)、ペプチド核酸ライブラリー (例えば、米国特許第5,539,083号参照)、抗体ライブラリー (例えば、Vaugh

10

20

30

40

50

n et al., Nature Biotechnology, 14 (3) : 309-314 (1996) およびPCT/US96/10287参照)、炭水化物ライブラリー(例えば、Liang et al., Science, 274 : 1520-1522 (1996) および米国特許第5,593,853号)、小有機分子ライブラリー(例えば、ベンゾジアゼピン、Baum C&EN,1月18日,33頁(1993); イソプレノイド,米国特許第5,569,588号; チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許第5,549,974号; ピロリジン、米国特許第5,525,735号および同第5,519,134号; モルホリノ化合物、米国特許第5,506,337号; ならびにベンゾジアゼピン、同第5,288,514号など参照)を含む。

【0091】

リンカー部分

本発明の結合部分は、任意で、固体支持体への結合部分の標的化および可逆的結合を可能とするリンカー部分を含む。例示的リンカー部分は、エピトープおよびhis-タグを含み、これは生体分子に結合されて、捕獲されて、融合タンパク質を形成する。これらの場合において、第XA因子またはエンテロキナーゼに対して特異的なもの(Invitrogen, San Diego, Calif.)のような切断可能リンカー配列を、任意で、生体分子および捕獲部分の間を含めて、融合分子の成分の単離および/または分離を容易とすることができる。デザイナーリガンドによって特異的に認識されるタンパク質ドメインもまたリンカー部分として用いることができる(例えば、Deisenhofer, J., Biochemistry 20 (1981) 2361-2370参照)。多くの他の同等なリンカー部分が当技術分野において公知である。例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Hochuli, Chemische Industrie, 12 : 69-90 (1989); Hochuli, Genetic Engineering, Principle and Methods, 12 : 87-98 (1990), Plenum Press, N.Y.; およびCrowe, et al. (1992) OIAexpress : The High Level Expression & Protein Purification System, QIAGEN, Inc. Chatsworth, Calif. 参照。吸着すべき生体分子の抗原決定基および他の特徴的特性もまた捕獲部分タグとして働くこともできる。例示的リンカー部分はポリ-ヒスチジン(ポリ-his)またはポリ-ヒスチジン-グリシン(ポリ-his-gly)タグ; flu HAタグポリペプチドおよびその抗体12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8 : 2159-2165 (1988)]; c-mycタグおよびそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B、B7および9E10抗体(Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5 : 3610-3616 (1985)); および単純疱疹ウイルス糖タンパク質D (gDタグおよびその抗体(Paborsky et al., Protein Engineering, 3 (6) : 547-553 (1990))を含む。他のタグポリペプチドはFlag-ペプチド(Hopp et al., BioTechnology, 6 : 1204-1210 (1988)); KT3エピトープペプチド(Martin et al., Science, 255 : 192-194 (1992)); -チューブリンエピトープペプチド(Skinner et al., J. Biol. Chem., 266 : 15163-15166 (1991)); およびT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ(Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 6393-6397 (1990))を含む。

【0092】

C. 結合部分を用いるテスト試料からの分析物の捕獲

テスト試料に存在する分析物は、テスト試料を、各結合部分がその対応する分析物に結合するのを可能とする条件下で結合部分と接触させることによって捕獲される。前記のように、結合部分はテスト試料と直接的に接触させることができるか、あるいは結合部分はまずディップスティック、SELDIプローブ、または不溶性ポリマービーズ、膜または粉末のような固体支持体に付着させることができる。

【0093】

結合部分がビーズライブラリーの一部である場合には、血清のような複合体試料についての試料容量に対するビーズ容量の比率は、例えば、1 : 150および1 : 1の間とすることができる。試料に対するビーズの比率がより小さくなれば、低存在量または稀な分析物化学種の相対的濃度を増加させる能力はより大きくなる。1 : 10の一定のビーズ : 試料容量において、血清で用いるビーズの容量は少なくとも0.0005mlおよび15mlのビーズの間とすることができる(0.020mlを含む)。

【0094】

1つの態様において、テスト試料に接触させるに先立って、結合部分を固体支持体に結

合させる。この代替態様において、固体支持体は、結合部分が分析物に結合するのを可能とするのに十分な時間の間テスト試料と単に接触させ、次いで、固体支持体を、分析物および結合部分の間の複合体の形成を介して分析物がそれに結合したテスト試料から取り出す。

【0095】

1つの態様において、結合部分はリンカー部分を含む。この態様において、結合部分は、テスト試料に存在する分析物が結合部分に結合するのを可能とするように、テスト試料に直接接触させる。十分な時間が経過した後、結合部分の捕獲部分に対する相補的捕獲部分を含む固体支持体をテスト試料に接触させる。これは、結合部分が、結合した分析物を残しつつ、捕獲部分を介して結合支持体と結合するのを可能とする。

10

【0096】

結合部分とテスト試料との接触は、2つを混合し、テスト試料を結合部分上へ拭い取り、テスト試料をそれに結合した結合部分を有する固体支持体へ流すことによって、および当業者に明白な他の方法によって達成することができる。結合部分および分析物は、結合部分が試料との結合平衡に到達するのを可能とするのに十分な時間の間接触して維持される。典型的な実験室条件下で、これは少なくとも10分である。

【0097】

固体支持体

本発明で用いられる許容される支持体は広く変化し得る。支持体は多孔性または非多孔性であり得る。それは連続または非連続、可撓性または非可撓性であり得る。支持体はセラミック、ガラス、金属、有機ポリマー材料を含む種々の物質、またはその組合せで作成することができる。

20

【0098】

好ましい支持体は粒状またはビーズ化支持体、(繊維ウェブのような)織布または不織布、微多孔性繊維、微多孔性膜、中空繊維またはチューブのような有機ポリマー支持体を含む。シリケートおよびカルボネート(例えば、ヒドロキシルアパタイト)のようなポリアクリルアミドおよび鉱物支持体も用いることができる。織布および不織布は規則的または不規則的物理的配置の表面を有することができる。特に好ましい態様は、球状または不規則的形状のビーズまたは粒子の形態の固体支持体を含む。

【0099】

多孔性材料が有用である。なぜならば、それらは大きな表面積を提供するからである。多孔性支持体は合成または天然、有機または無機であり得る。少なくとも約1.0ナノメートル(nm)の直径、および少なくとも約0.1立方センチメートル/グラム(cm^3/g)のポア容量のポアを有する多孔性構造を持つ適当な固体。好ましくは、ポア直径は少なくとも約30nmである。なぜならば、より大きなポアは拡散に対してより制限的でないからである。好ましくは、ポア容量は、ポアを囲うより大きな表面積のためより大きな潜在的容量につき少なくとも約 $0.5\text{cm}^3/\text{g}$ である。好ましい多孔性支持体は、アガロース、親水性ポリアクリレート、ポリスチレン、ミネラルオキサイドおよびセファロースのような粒状、またはビーズ化支持体を含み、これは、球状および不規則な形状のビーズおよび粒子を含む。

30

【0100】

かなりの利点については、結合部分に対する支持体は好ましくは親水性である。好ましくは、親水性ポリマーは水膨潤性であって、分析物のより大きな浸潤を可能とする。そのような支持体の例はセルロース、修飾されたセルロース、アガロース、架橋されたデキストラン、アミノ-修飾架橋デキストラン、グアーガム、修飾されたグアーガム、キサントラン、ローカストビーンガムおよびヒドロゲルのような天然多糖を含む。他の例はポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリビニルアルコール(PVA)および修飾されたポリエチレングリコールのような架橋合成親水性ポリマーを含む。

40

【0101】

固体支持体への結合部分の結合は、種々のメカニズムを介して達成することができる。固体支持体は、従前に調製された結合部分を固体支持体に結合させることによって、十分

50

に調製された結合部分で誘導体化することができる。または、前駆体分子を固体支持体に結合させ、引き続いて、第一の前駆体分子によって固体支持体に結合された成長する鎖にさらなる前駆体分子を加えることによって固体支持体上に形成することができる。固体支持体上での吸着剤の形成のこのメカニズムは、結合部分がポリマー、特に、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは多糖分子のような生体ポリマーである場合に特に有用である。生体ポリマー吸着剤は、順次、当技術分野において公知の方法を用いて、モノマー成分（例えば、アミノ酸、ヌクレオチドまたは単糖）を、固体支持体に結合した第一のモノマー成分に加えることによって提供することができる。例えば、米国特許第5,445,934号（Fodor et al.）参照。

【0102】

ある態様、例えば、コンビナトリアルライブラリーにおいては、各固体支持体、例えば、各ビーズはそれに結合した唯一つの結合部分を有することができる（コンビナトリアル化学の制限内）。

【0103】

しかしながら、もう一つの態様において、各固体支持体は複数の結合した異なる結合部分を有することができる。例えば、ペプチドのコンビナトリアルライブラリーは分裂・プールプロセスを用いて製造することができる。これらのペプチドはそれが結合したビーズから切断し、混合し、次いで、ビーズによるペプチドのいずれのソーティングもなしで、ビーズの新しい組に結合することができる。このようにして、各ビーズは結合した多くの異なる結合部分を有すると考えられる。従って、本発明は、コンビナトリアルライブラリーの複数の異なるメンバーが同一固体支持体に結合した結合部分のコンビナトリアルライブラリーを提供する。わずか1つ、および10、100、1000、10,000、1,000,000、1,000,000,000またはそれ以上の数の異なる結合部分を単一の固体支持体に結合させることができる。ある態様において、固体支持体はビーズの形態であり、単一の異なる結合部分タイプが各ビーズに結合している。例えば、ペプチド結合部分ライブラリーにおいては、アミノ酸の1つの可能な順列を表すペプチドは1つのビーズに結合し、もう一つの可能な順列を表すペプチドはもう一つのビーズに結合しなどなどである。

【0104】

結合部分は、可逆的または非可逆的相互作用を用いて固体支持体に結合させることができる。例えば、任意で、スペーサー基を通じて、結合部分に化学的に結合するヒドロキシル、カルボキシル、スルフヒドリルまたはアミノ基のような少なくとも一つの反応性官能基を含む支持体を用いて、非可逆的相互作用をなすことができる。適当な官能基はN-ヒドロキシスクシンイミドエステル、スルホニルエステル、ヨードアセチル基、アルデヒド、エポキシ、イミダゾリルカルバメート、および臭化シアンおよび他のハロゲン活性化支持体を含む。そのような官能基を、種々の公知の技術によって支持体に提供することができる。例えば、ガラス表面を公知の方法にてアミノプロピルトリエトキシシランで誘導体化することができる。いくつかの態様において、結合部分は、当業者に公知のように、合成の間に支持体に結合される（例えば、固相ペプチドおよび核酸合成）。

【0105】

または、固体支持体および結合部分の間の可逆的相互作用は、固体支持体および/または結合部分と会合したリンカー部位を用いてなすことができる。本発明で用いるのに適した種々のリンカー部位は公知であり、そのいくつかを先に議論した。多様な剤を結合するためのリンカー部位の使用は、この通常の技術を適用して、日常的なさらなる実験なしで、本発明で用いるように適した固体支持体/結合部分結合を形成することができる当業者に周知である。

【0106】

微粒子固体支持体

本発明の好ましい態様は直径が1000 μm未満、好ましくは100 μm未満、10 μm未満、1 μm未満または0.1 μm未満である小さなビーズ化微粒子固体支持体を利用する。そのような支持体は、典型的には、機械的な摩砕によって、またはそうでなければより大きなビーズを

10

20

30

40

50

粉末コンシステンシーまで低下させることによって形成させる。微粒子固体支持体が望ましい。なぜならば、それらはより大きなビーズと比較して増大した容量に対する表面積の比率を保有するからである。微粒子固体支持体もまた、本発明のコンビナトリアルライブラリーを含有するのに必要な支持体の容量を減少させ、それにより、より複雑かつ効果的なライブラリーを用いるのを可能とする。しかしながら、現存の機器を用いると、用いるフィルター系のフリットサイズにおける制限のため、非常に小さな (<10 μm) ビーズ上でコンビナトリアルライブラリーを合成するのは困難である。この問題を克服するために、コンビナトリアルライブラリーは、次いで、機械的粉碎、破碎、またはその音波処理によって断片化して、粉末または微粒子の集団を形成することができるビーズ上で塊状合成することができる。

10

【0107】

これらの技術を用い、異なる結合部分に結合した微粒子固体支持体を製造することができる。これらは、今度は、徹底的に混合して、より大きなまたは種々のサイズの異なるビーズを混合することに対して、より均一な組成を形成することができる。

【0108】

微粒子固体支持体は活性化された表面に共有結合させて、エポキシ基、N-ヒドロキシスクシンイミド、ジメチル3,3'-ジチオプロピオンイミデート、またはグルタルアルデヒドを介して「ディップスティック」またはチップを作成して、コンビナトリアルライブラリーのリガンドとで、またはリガンドがその上で合成されるポリマーのベースマトリックスとで化学的結合を形成することができる。これは、架橋を介してペプチドライブラリーのN末端アミノ基へ達成される。

20

【0109】

表面の非反応架橋基をメルカプト-エタノールのような小さな化学物質と反応させて、さらなる反応性を妨げることができる。加えて、表面をさらに処理して、タンパク質の非特異的接着を妨げることができる。

【0110】

微粒子固体支持体に結合した結合部分に結合した標的分子は、1または種々の方法で、例えば異なる塩濃度およびpHにおいて緩衝液で洗浄し、結合したタンパク質を低pH、低または高イオン強度、強力オトロープ、アセトニトリル/ギ酸などの溶液中で溶出させることができる。

30

【0111】

溶出した標的分子は、限定されるものではないが、例えば、質量分析測定、SDS-PAGE、毛細管電気泳動を含むいくつかの方法によって、または等電点電気泳動を介してpIによって、分子量に従ってタンパク質組成につき分析することができる。

【0112】

または、標的分子は電気泳動を介して溶出させることができる。この態様において、結合した標的分子を含有する微粒子固体支持体は、Laemmli緩衝液のような適当な溶液で浸漬させ、タンパク質をSDS-PAGE分析によって分解することができる。代替緩衝液は尿素を含み、タンパク質は電気泳動によって等電点電気泳動ゲルに分離することができる。

40

【0113】

または、微粒子固体支持体は増量剤とで調合し、圧縮して錠剤形態とすることができる。このフォーマットにおいては、それは直接的に試料溶液に加えることができるか、あるいはその代わりに、まず緩衝液に懸濁させることができる。

【0114】

微粒子固体支持体はアガロースまたはアクリルアミドのような溶液に入れ、繊維上の架橋剤との重合反応を介してゲル自体に架橋させ、または相互に架橋させて、モノリシック材料を形成することができる。

【0115】

または、微粒子固体支持体は接着剤の薄膜に固定化することができる。

【0116】

50

もう1つのアプローチは、微粒子固体支持体の多孔性マトリックスへの捕獲である。そのようなマトリックスは、おそらくは、融解ブローイング段階の間に一体化される粒子と共に不織繊維または布を含むことができる。

【0117】

所望に応じて、微粒子は膜の単一シートまたはスタックに一体化させて、適当な所望の結合容量を達成することができ、ここに、微粒子固体支持体はカレンダーかけまたは水素による絡み合い (hydroentanglement) によって層の間に捕獲される。

【0118】

膜組成物はポリエステルおよびポリプロピレン繊維およびメッシュを含む天然または合成源から選択することができる。勿論、当業者であれば、本セクションに記載された技術の多くは一般的に本発明の他の態様に適用できることに気がついていると考えられる。

【0119】

1. 未結合分析物の除去

本発明の特徴は、本明細書中に記載された方法に従う分析物の処理が、好ましくは、分析物濃度の間の分散を縮小させることに加えて、結合した分析物を濃縮し、部分的に精製する。この特徴の最大限の実行は、任意で、固体支持体上の結合部分に結合した分析物からいずれの未結合分析物も洗浄することを含む。

【0120】

未結合分析物の洗浄除去は、好ましくは、結合部分に結合した分析物を温和な洗浄溶液と接触させることによって行われる。温和な洗浄溶液は、分析物を元来含有するテスト試料で頻繁に見出される汚染物および未結合分析物を除去するように設計される。典型的には、洗浄溶液は生理学的pHおよびイオン強度であって、洗浄は温度および圧力の雰囲気条件下で実行される。

【0121】

本発明で用いるのに適した洗浄溶液の調合は、過度な実験なしで当業者によって実行され得る。低ストリンジェンシー洗浄方法を含む、汚染物を除去する方法は、例えば、Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); Ausubel, et al. (1987) および定期刊行別冊); Current Protocols in Molecular Biology; Deutscher (1990) 「Guide to Protein Purification」 Methods in Enzymology, vol.182, およびこのシリーズにおける他の巻において公表されている。

【0122】

D. 結合部分からの捕獲分析物の単離

結合した分析物は結合部分から溶出させ、種々の方法を用いて、好ましくは、結合部分および分析物の間の相互作用を破壊する水性溶出緩衝液を用いることによって単離することができる。カオトロップおよび有機溶媒のような変性剤を含めたいずれかの適当な溶出緩衝液をこの目的で用いることができる。例示的な溶出緩衝液は、非常に低いまたは高いイオン強度の水性塩溶液、洗剤溶液、および有機溶媒を含む。競合的に本発明の結合部分に結合する剤の溶液および懸濁液もまた溶出緩衝液で用いることもでき、ただし、そのような競合的結合剤は対象となる分析物の引き続いての収集または分析に干渉しないものとする。選択された溶出緩衝液は高度に適用特異的であって、周知のドメインにおいて、または日常的な実験を通じて通常に入手できる材料を介して当業者によって容易に同定され得る (例えば、Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); およびDeutscher (1990) 「Guide to Protein Purification」 Methods in Enzymology vol.182, およびこのシリーズにおける他の巻参照)。

【0123】

典型的なシーケンスは (主要なイオン交換相互作用によって吸着されるタンパク質を収集するための) 塩化ナトリウム、引き続いて、エチレングリコール (主として疎水性会合によるタンパク質相互作用のための溶離剤)、引き続いての2.5へのpHの降下 (変形緩衝液)、最後に、グアニジン-HClによる洗浄を含む。

【0124】

10

20

30

40

50

適当な溶出緩衝液の例は、pH緩衝液溶液のような、分析物および/または結合部分の表面電化を修飾するものを含む。酸性の修飾を介して表面電荷を破壊するのに用いられるpH緩衝液は、好ましくは、酸性の範囲における、すなわち、7未満の、好ましくは、6.8、6.5、6.0、5.5、5.0、4.0、または3.0未満のpHにおいて；7よりも大きい、好ましくは、7.5、8.0、8.3、8.5、9.0、9.3、10.0または11.0よりも大きなpHにおいて塩基性範囲において溶液のpHを維持するのに十分に強い緩衝液である。ある態様において、溶出緩衝液はpH3における9M尿素、pH11における9M尿素、または6.66% MeCN/13.33% IPA/79.2% H₂O/0.8 TFAの混合物を含むことができる。1つの方法対もう1つの方法の選択は、均等化された試料で用いられる分析方法に依存する。

【0125】

または、分析物および/または結合部分の電荷特徴をマスクするための十分なイオン強度を有する高塩濃度の溶液を用いることができる。多価イオン、例えば、アルカリ土類または遷移金属対イオンをもつスルフェートおよびホスフェートはこの点に関して特に好ましいが、一つまたは複数の一価に解離する塩もまた本発明で用いるのに適しており、但し、得られる溶液のイオン強度は少なくとも0.1、好ましくは0.25モル⁻¹、0.3モル⁻¹、0.35モル⁻¹、0.4モル⁻¹、0.5モル⁻¹、0.75モル⁻¹、1.0モル⁻¹またはそれより大きいモル⁻¹であるものとする。その例として、多くのタンパク質分析物/結合部分の相互作用はその環境のイオン強度の変化に対して感受性である。したがって、結合した分析物を塩溶液、好ましくは、塩化ナトリウムのような無機塩溶液と接触させることによって、分析物を結合部分から単離することができる。これは、分析物が結合した固体支持体を溶出緩衝液に漬け、浸透させ、または浸漬させることを含む種々の方法によって、あるいは緩衝液を固体支持体上にすすぎ、スプレーし、または洗浄することによって達成することができる。そのような処理は、固体支持体に結合した結合部分から分析物を放出させる。次いで、分析物を溶出緩衝液から回収することができる。

【0126】

グアニジンおよび尿素のようなカオトロピック剤は、結合部分および結合した分析物の周りの水の包みの構造を破壊し、分析物および結合部分の間の複合体を解離させる。本発明の溶出緩衝液で用いるのに適したカオトロピック塩溶液は適用特異的であって、日常的な実験を介して当業者が調合することができる。例えば、適当なカオトロピック溶出緩衝液は0.1~9Mの濃度範囲の尿素またはグアニジンを含有することができる。

【0127】

洗剤ベースの溶出緩衝液は、表面張力および分子複合体の構造に関して親和性分子の選択性を修飾する。溶出緩衝液として用いられる適当な洗剤はイオン性および非イオン性洗剤を共に含む。非イオン性洗剤は溶液の誘電定数を修飾することによって分子間の疎水性相互作用を破壊し、他方、イオン性洗剤は均一な電荷を付与するように一般的に各分子を被覆し、被覆された分子が被覆分子のように反発するようにする。例えば、イオン性洗剤ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)は、均一な負の電荷を付与するようにタンパク質を被覆する。非イオン性洗剤の例はトリトンX-100、TWEEN、NP-40およびオクチル-グリコシドを含む。双子イオン性洗剤の例はCHAPSを含む。

【0128】

溶液の誘電定数の修飾を介して疎水性相互作用を破壊するもう一つのクラスの洗剤様化合物は、エチレングリコール、プロピレングリコール、ならびにエタノール、プロパノール、アセトニトリルおよびグリセロールのような有機溶媒を含む。

【0129】

本発明の好ましい溶出緩衝液は、質量分析器で用いるのに適したマトリックス材料を含む。マトリックス材料は溶出緩衝液に含めることができる。本発明のいくつかの態様は、任意で、タンパク質またはバイオチップのような、質量分析器プローブへ直接的に分析部位からの分析物を溶出させることを含む。本発明の他の態様において、結合部分からの溶出の後に、マトリックスを分析物と混合することができる。なお他の態様は、タンパク質チップ上に予め配置されたエネルギー吸収マトリックスを含むSENDまたはSEAC/SENDタン

10

20

30

40

50

パク質チップへ直接的に分析物を溶出させることを含む。これらの後者の態様において、さらなるマトリックス材料を溶出緩衝液中に存在させる必要性はない。

【0130】

本発明で適当な他の溶出緩衝液は前記した緩衝液成分の組合せを含む。前記した溶出緩衝液成分の2またはそれから調合された溶出緩衝液は、複数溶出特徴に基づいて複合体のサブユニットの間の分子相互作用の選択性を修飾することができる。

【0131】

本発明を用いて単離された分析物は、テスト試料に元来存在する分析物の濃度の範囲または濃度分散未満である分析物の濃度の範囲または分析物の間の濃度分散を有する。例えば、本発明の方法を用いる操作の後、単離された分析物は、テスト試料を本明細書中に記載された方法のいずれかに供するに先立って、テスト試料に存在する同一の分析物の間の濃度分散よりも、少なくとも2つのファクター、より好ましくは、10、20、25、50、100、1000またはそれ以上のファクターだけ減少した、分析物の濃度の範囲、または他の単離された分析物の範囲からの濃度分散を有すると考えられる。好ましくは、本発明の方法を最小量の溶出緩衝液で実行して、溶出緩衝液における単離された分析物の濃度を最大化するのを確実にする。より好ましくは、少なくとも1つの単離された分析物の濃度は、先にテスト試料におけるよりも溶出緩衝液においてより高いと考えられる。

【0132】

捕獲された分析物を単離した後、分子量、等電点、または化学物質または生化学リガンドに対する親和性のようないくつかの化学的または物理的特性に基づいて濃縮または分画によって分析物をさらに処理することができる。核酸、タンパク質、脂質および多糖のための分画方法は当技術分野において周知であり、例えば、Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); Sambrook et al., Molecular Cloning--A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (Sambrook) (1989); および Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. と John Wiley & Sons, Inc. との合弁会社, (1994 別冊) (Ausubel) に記載されている。

【0133】

E. 単離された分析物の検出

分析物が溶出され、結合部分から開放されて単離された後、当業者に利用できるいずれかの技術を用いて分析物を検出し、定量し、またはそうでなければ特徴付けることができる。本発明の分析技術を複合テスト試料に適用する特徴は、元のテスト試料で見出される分析物濃度の大きな範囲に対して単離された分析物についての分析物濃度における分散の動的縮小である。分析物濃度範囲のこの縮小は、元のテスト試料で見出された分析物のかなり大きなパーセンテージは、元のテスト試料それ自体を用いる分析物検出で利用されると考えられる検出デバイスを再度キャリブレーションすることなく検出され、特徴付けられることを可能とする。達成された分析物濃度範囲の現実の縮小は、元のテスト試料の性質、および用いる結合部分の性質および多様性を含む種々の因子に依存する。一般には、本明細書中に記載された技術を用いる分析物濃度分散の縮小は、機器の再キャリブレーションなしで単離された分析物の少なくとも25%、より好ましくは少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%または80%が検出されるのが可能とするのに十分である。理想的には、本発明は、単離された分析物の少なくとも90%、95%、98%またはそれが機器の再キャリブレーションなしで検出されるのを可能とする。

【0134】

本明細書中に記載された技術を用いて単離された分析物の検出は、当業者に知られたいずれかの適当な方法を用いて達成することができる。例えば、色素を用いる比色アッセイ法は広く利用できる。または、検出は分光学的に達成することができる。分光ディテクターは屈折率の変化; 紫外線および/または可視光線吸収、または反応成分を検出するための適当な波長での励起後における蛍光に依拠する。例示的な検出方法は蛍光定量法、吸光度反射率、および透過率スペクトロスコピーを含む。複屈折、屈折率、または回折率の変

10

20

30

40

50

化を用いて複合体の形成または反応の進行をモニターすることもできる。分子相互作用を検出するための特に有用な技術は表面プラズモン共鳴、エリプソメトリー、共鳴鏡技術、格子結合導波管技術、および多極共鳴スペクトロスコピーを含む。これらの技術およびその他は周知であり、過度な実験なしで、当業者によって本発明に容易に適用され得る。これらの方法およびその他の多くは、例えば、「Spectrochemical Analysis」Ingle, J.D. and Crouch, S.R., Prentice Hall Publ. (1988) および「Analytical Chemistry」Vol.7 2, No.17に見出すことができる。

【0135】

検出の好ましい方法はマスマススペクトロスコピーによるものである。マスマススペクトロスコピー技術は、限定されるものではないが、マトリックス援助レーザー脱着(MALDI)、連続またはパルスエレクトロスプレー(ESI)および関連方法(例えば、IONSPRAYまたはTHE RMOSPRAY)、またはマシブクラスターインパクト(MCI)のようなイオン化(I)技術を含み;これらのイオン源は線状または非線状反射時間飛行(TOF)、単一または複数四極、単一または複数の磁気セクター、フーリエ変換イオンサイクロトン共鳴(FTICR)、イオン捕獲、およびその組合せ(例えば、イオン-捕獲/時間飛行)を含む検出フォーマットにマッチさせることができる。イオン化では、多数のマトリックス/波長組合せ(MALDI)または溶媒組合せ(ESI)を使用することができる。サブアトモレベルの分析物が、例えば、ESI(Valaskovic, G.A. et al., (1996) Science 273:1199-1202)またはMALDI(Li, L. et al., (1996) J. Am. Chem. Soc. 118:1662-1663)質量分析測定を用いて検出されている。ES質量分析測定はFenn et al. (J. Phys. Chem. 88, 4451-59 (1984); PCT出願WO 90/14148)によって導入されており、現行の適用は最近のレビュー論文にまとめられている(R. D. Smith et al., Anal. Chem. 62, 882-89 (1990) およびB. Ardrey, Electrospray Mass Spectrometry, Spectroscopy Europe, 4, 10-18 (1992))。MALDI-TOF質量分析測定はHillenkamp et al.によって導入されている(「Matrix Assisted UV-Laser Desorption/Ionization: A New Approach to Mass Spectrometry of Large Biomolecules」, Biological Mass Spectrometry (Burlingame and McCloskey editors), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp.49-60, 1990)。ESIに関しては、フェムトモル量の試料における分子量の決定は、質量の計算で用いることができる複数のイオンピースの存在のため非常に正確である。本発明の好ましい分析方法は、例えば、米国特許第6,020,208号で議論されているレーザー脱着/イオン化のために増強された表面(SELDI)を利用する。マスマススペクトロスコピーは本発明の態様における検出の特に好ましい方法であり、質量分析器のプロブまたはバイオチップへの直接的な分析物の溶出が起こり、あるいはそこでは、溶出緩衝液はマトリックス物質を含有し、あるいは結合部分からの分析物の溶出後にマトリックス材料と組み合わされる。

【0136】

広く用いられる検出のもう1つの方法は、対象となる分析物の一つまたは複数の物理学的特性に基づく電気泳動分離である。ポリペプチドおよびタンパク質分析物の分析のための特に好ましい態様は二次元電気泳動である。好ましい適用は第一の次元における等電点によって、および第二の次元におけるサイズによって分析物を分離する。分析物の電気泳動分析のための方法は調べるべき分析物に応じて広く変化するが、所与の分析物に適した特別な電気泳動方法を突き止めるための技術は当業者に周知である。

【0137】

II. バイオマーカーの同定

本発明のもう1つの態様は、病気、感染または汚染の診断用のバイオマーカーの同定における前記したピーズ化結合部分ライブラリーの使用である。バイオマーカーは前記した試料のいずれかで同定することができるが、好ましくは、生きた生物、最も好ましくはヒトから採取された血液、尿、脳脊髄液等のような試料から同定される。バイオマーカーが同定できるいくつかの方法がある。

【0138】

「バイオマーカー」は、生物学的試料に存在し、生体試料から単離することができるか

10

20

30

40

50

、または生体試料中で測定することができるタンパク質およびその断片、ペプチド、ポリペプチド、プロテオグリカン、糖タンパク質、リポタンパク質、炭水化物、脂質、核酸、有機または無機化学物質、天然ポリマー、および小分子のような実質的にいずれの生物学的化合物でもある。さらに、バイオマーカーは全無傷分子であり得るか、あるいはそれは、例えば、部分的に機能的であるか、あるいは例えば、抗体または他の特異的タンパク質によって認識できるその部分であり得る。バイオマーカーはエピトープ特異的抗体であり得る。もしバイオマーカーの測定可能な態様が、生きた生物における特定の病気または水体における汚染のレベルのような、与えられた表現型に関連すれば、前記バイオマーカーは情報的と考えられる。そのような測定可能な態様は、例えば、個体からの生物学的試料中のバイオマーカーの存在、非存在、または濃度、および/またはバイオマーカーのプロファイルの一部としてのその存在を含むことができる。バイオマーカーのそのような測定可能な態様は、本明細書中においては「特徴」と定義される。特徴は、バイオマーカーが例えば、公知の同一性のものであってもなくてもよいバイオマーカーの2またはそれ以上の測定可能な態様の比率であってもよい。「バイオマーカーのプロファイル」は少なくとも2つのそのような特徴を含み、そこでは前記特徴は、例えば、核酸および炭水化物のような同一または異なるクラスのバイオマーカーに対応することができる。バイオマーカーのプロファイルは少なくとも3、4、5、10、20、30またはそれ以上の特徴を含むこともできる。1つの態様において、バイオマーカーのプロファイルは何百、または何千さえの特徴を含む。もう1つの態様において、バイオマーカーのプロファイルは少なくとも1つの内部標準の少なくとも1つの測定可能な態様を含む。

10

20

【0139】

「表現型」は、遺伝的メーキャップおよび環境の影響双方によって決定される、生物の観察可能な物理的または生化学的特長である。または、本発明の文脈では、表現型は天然の非生物態様に関連させることもでき、例えば、水体の表現型は物理的または化学的いずれかで検出可能な水体の態様を含む。例えば、それが生命を維持できるか否か、もし維持できればいずれのタイプの生命であるかを問わず、水温、酸性度、ミネラル含有量、酸素含有量を含む。

【0140】

「表現型変化」は、与えられた表現型に関連するパラメーターの検出可能な変化である。例えば、表現型変化は体液中のバイオマーカーの増加または減少を含むことができ、ここでは、前記変化は病気状態と関連付けられる。表現型変化は、さらに、バイオマーカーの測定可能な態様の変化ではない患者の与えられた状態の検出可能な態様の変化を含むこともできる。例えば、表現型の変化は、体温、呼吸速度、拍動、血圧、または他の生理学的パラメーターの検出可能な変化を含むことができる。そのような変化は当業者に周知の慣用的技術を用いる臨床的観察および測定を介して決定することができる。本明細書中で用いるように「慣用的技術」は、本発明にしたがってバイオマーカープロファイルを得ることなく表現型変化に基づいて個体を分類する技術である。

30

【0141】

化学種または組織中の診断バイオマーカーを同定するために主張された発明を用いるのには、少なくとも2つの生体試料の利用性を必要とする。提供された生体試料は、同一個体から異なった時点に採取された、対照群、およびテスト群対照群およびテスト個体、あるいは当業者に容易に明らかであるいずれかの他の順列からのものであってよい。

40

【0142】

得られた各生体試料は本明細書中に記載されたビーズ化結合部分ライブラリーで処理される。このようにして、より推定的バイオマーカーが、以下の本明細書中における実施例セクションに記載されているように分析用に入手可能である。これは、結合部分ライブラリーが試料に存在する分析物の濃度範囲の分散を狭くし、それにより、低存在量および高存在量分析物双方が検出されるのを可能とすることから起こる。

【0143】

本発明の結合部分ライブラリーでの処理後、結合部分が結合した生体試料の各々につい

50

ての分析物を溶出し、別々にプールする。次いで、プールされた試料を分析して、試料中の通常の分析物のいずれが異なる発現（1つの生体試料対生体試料における増強された発現）を呈するか、あるいは他の生体試料では発現されないが、1つの生体試料で発現されるかを決定する。そのような異なる発現を表示する分析物は、表現型の変化、または各生体試料の源の間で観察される差のための推定的バイオマーカーと考えられる。次いで、更なる統計的および分析的テストを行って、バイオマーカーを、所望の程度の確実性をもってバイオマーカーを表現型変化に相関させることができる。

【0144】

バイオマーカーを同定するのに用いる分析的分析の好ましい方法は、一般に本発明の結合部分に結合する分析物を同定するための前記した方法と同一である。

【0145】

III. キット

また、本発明は、当業者が本明細書中に記載された技術を実行するのを可能とする成分を含有するキットも含む。この目的でのキットの最も基本は複数の結合部分を供することであり、各結合部分は異なる分析物の所定量を捕獲するよう選択された量である。本発明のいくつかのキット組成物においては、結合部分は固体支持体、好ましくは、不溶性ビーズに結合されるよう適用される。他の態様において、固体支持体および結合部分は別々に供給される。別々に供給される場合、結合部分および/または固体支持体は、本発明のオペレーターが、本明細書中に記載された発明を実行するコースの間に結合部分を固体支持体に結合させるのを可能とする捕獲部分を含む。別々の結合部分および固体支持体を提供するキットは、任意で、結合部分を固体支持体に結合させる反応を実行するのに必要な更なる試薬を提供することができる。

【0146】

本発明のキットは、試料の調製および分析物の単離のための成分を保持する複数の容器も含む。この性質の例示的成分は、分析物に特異的に結合した結合部分から未結合物質を除去するのに十分な一つまたは複数の溶液、および結合部分によって特異的に結合された分析物を放出するのに十分な少なくとも1つの溶出溶液を含む。

【0147】

キット態様は、任意で、本発明の方法において結合部分のライブラリーを用いるための説明書を含むことができる。

【0148】

これまでの発明は明瞭性および理解のための説明および例として幾分詳細に記載してきたが、ある変形、変化、修飾および同等物の置換は、本発明の精神および範囲から必ずしも逸脱することなくすることができるのは本発明の教示に照らして当業者に容易に明らかであると思われる。その結果、本明細書中に記載された態様は種々の修飾、変化等に供され、本発明の範囲は単に添付の請求項の範囲を参照することによって決定される。当業者であれば、変化させ、改変し、または修飾して実質的に同様な結果を生じさせる種々の非臨界的パラメーターを容易に認識すると思われる。

【0149】

本発明のエレメントの各々を複数態様を含むものとして本明細書中に記載するが、特記しない限り、本発明の与えられたエレメントの態様の各々は本発明の他のエレメントの態様の各々と共に用いることができ、各そのような使用は本発明の区別される態様を形成する意図のものであることは理解されるべきである。

【0150】

前記開示から認識できるように、本発明は広く種々の適用を有する。本発明は以下の実施例によってさらに説明され、前記実施例は説明的にすぎず、断じて本発明の定義および範囲を限定する意図のものではない。

【0151】

実施例

実施例1：ヒト血清タンパク質の濃度の範囲の縮小

10

20

30

40

50

本実施例は、前記した本発明の1つの態様がどのようにして複合生物学的試料、この場合、ヒト血清に適応できるかを説明する。本実施例においては、血清タンパク質濃度の分散の縮小は、血清タンパク質を不溶性ビーズに結合させたヘキサペプチドに選択的に吸着させることによって達成される。1×10⁶を超えるヘキサペプチドの可能な順列は、前記実施例の結合部分集団において、分裂、組換えおよびプールビーズのコンビナトリアルライブラリーの形態で表される。このフォーマットにおいては、アルブミンのような高存在量血清分析物がヘキサペプチド結合部分に結合されるが、特定の結合部分の飽和と同等なレベルまでに過ぎない。対照的に、低存在量血清分析物はその全体においてほとんど結合している。低存在量分析物を認識する結合部分の量は限定的でないからである。この選択的結合の結果は、高存在量分析物を選択的に除去することを求める方法において固有の低存在量分析物を失う危険性なしで、用いられる結合部分によって認識されるタンパク質についての分析物濃度の範囲の縮小である。その結果、前記方法を用いて単離された血清分析物の大きなパーセンテージは、検出デバイスの再キャリブレーションなしで1バッチ分析で検出することができる。これは、未処理血清において同一分析物を検出するためには検出デバイスは反復して再キャリブレートされなければならない、血清テスト試料中の同一分析物を検出する場合に表される状況とは対照的である。この例においては、30mL血清は4、14,000rpmにおいて15分間遠心し、全ての脂質物質は注意深く頂部層から除去された。残りの血清は0.8μmフィルター、次いで、0.45μmフィルターを通して濾過した。500μlのこの濾過した血清を非同等対照試料として取っておいた。(20%メタノール中で一晩、ついで、140mM塩化ナトリウムpH7を含有する20mMクエン酸ナトリウム緩衝液中で一晩膨潤させ、3回洗浄して微粒子物質を除去した)ほぼ1mLのヘキサペプチドライブラリーを3つの重力流カラムの各々に小分けした。ヘキサペプチドライブラリーの各アリコットを、温和に攪拌しつつ、7.6mLアリコットの濾過血清と共に室温にて2時間インキュベートした。インキュベーション後、カラムを排出し、収集した容量はフロースルーを表した。1mLのフロースルーを分析用に貯蔵した。次いで、カラムを直ちに20mLのクエン酸緩衝液(20mMクエン酸ナトリウム、140mM塩化ナトリウム、pH=7)で洗浄した。最初の1mLの洗浄を分析のために加えて収集した。洗浄の後、三通りのカラム各々からの数個の200uLアリコットの樹脂を除去し、次に記載するように処理した。各通りからの1つの200μlアリコットの樹脂に対し、試料を(500uL 4×LDS、200uL 10×DTT、および300uL dH2Oを混合することによって調製した)200uL 2×LDS緩衝液+DTT還元剤と共に90℃にて10分間加熱した。試料を冷却した後、それを2,000rpmにおいて1分間遠心した。上清を収集し、1D-ゲル分析のために-20℃で貯蔵した。各通りからの第二の200uLアリコットの樹脂に対し、試料を温和に攪拌しつつ、バッチフォーマットにて400uLのアリコットの6M尿素と共に1時間インキュベートした。次いで、試料を2,000rpmにおいて1分間遠心して、ヘキサマーリガンドビーズライブラリーをペレット化し、上清をSELDI-質量分析測定によって分析用に収集した。各通りからの第三の200uLアリコットの樹脂に対し、試料を温和に攪拌しつつバッチ様式にて400uLの6MGuHClと共に1時間インキュベートした。次いで、試料を2,000rpmにて1分間遠心して、ヘキサマーリガンドビーズライブラリーをペレット化し、SELDI質量分析測定による分析のために上清を収集した。

【0152】

SELDI-質量分析測定分析のために保持された全ての試料は、引き続いて、IMAC-Cu タンパク質チップアレイで処理した。50uLの100mM CuSO₄と共に5分間インキュベートして、表面にCuを充填することによって、IMACアレイをまず調製した。一定に振盪しつつインキュベーションを室温で行った。インキュベーション時間の後、アレイを蒸留水ですすぐことによって過剰なCuSO₄を除去した。次いで、充填されたIMAC-Cuアレイを、一定に振盪しつつ、100mM酢酸ナトリウムpH4.0で室温にて5分間中和した。インキュベーション時間の後に、酢酸ナトリウムを除去し、IMAC-Cuアレイを蒸留水ですすいだ。室温にて一定に振盪しつつ、次に、IMAC-Cuアレイを150uL結合緩衝液(0.1M NaPO₄、0.5M NaCl、pH7)で2回5分間予備コンディショニングを行った。予備コンディショニングの後、この緩衝液を除去し、新鮮な90uLアリコットの結合緩衝液を加え、続いて、均等化実験からのさらなる

10

20

30

40

50

10ulの試料を加えた(100ulの合計インキュベーション容量)。次いで、試料を一定に振盪しつつIMAC-Cuアレイ上で30分間インキュベートした。インキュベーションの後、過剰の試料容量を除去し、アレイを150uLの結合緩衝液で3回洗浄した；一定に攪拌しつつ5分間の各洗浄。最終の洗浄の後、IMAC-Cuアレイを150uLの蒸留水で2回すすぎ、次いで、乾燥した。最終工程として、1uLの(50%アセトニトリル、0.5%トリフルオロ酢酸中の)50%飽和SPAを各スポットに加え、乾燥し、次いで、マトリックスの添加をさらなる1ulの50%SPAで反復した。次いで、前記アレイはSELDI質量分析測定による分析のために用意ができた。

【0153】

均等化の前および後における濾過した血清のSELDI質量分析測定の比較を図6~8に示す。質量分析測定による試料の分析はピーク高さの増大した均一性、および観察されたピークの数が増大を示した。豊富な分子の減少は天然試料においてピークを隠したイオン抑制をやはり減少させた。この方法は、本発明の方法に付されず元の複合溶液を用いる検出可能な分析物の数よりも、少なくとも0.5、おそらく1、2、3またはそれ以上のオーダーの大ききだけ、血清のような複合溶液中での検出可能な分析物の数を増加させると予測される。

10

【0154】

700,000と少ない異なるメンバーを有するヘキサペプチドのライブラリーは64,000,000のメンバーまたは3,000,000のメンバーのライブラリーとして血清について同様な結果を生じることが判明した。

20

【0155】

(表1)均等化ビーズで処理しなかった血清からのS/N比>3でのタンパク質のピーク検出

M/z	質量	TOF	強度	MZ面積	TOF面積	S/N
2015.66	2014.65	17.177	6.4172	127.90	0.5429	49.02
2036.48	2035.47	17.265	5.3084	143.63	0.6038	40.64
2088.13	2087.12	17.482	2.2443	48.87	0.2033	17.28
2158.14	2157.14	17.771	1.1293	8.45	0.0346	8.76
2236.71	2235.71	18.090	1.4596	19.01	0.0765	11.41
2274.25	2273.24	18.240	2.6476	59.30	0.2367	20.78
2297.37	2296.36	18.332	1.7593	25.74	0.1021	13.84
2348.05	2347.05	18.532	1.1940	16.12	0.0632	9.44
2387.06	2386.06	18.685	1.0549	10.47	0.0408	8.38
2433.77	2432.76	18.865	1.1221	9.13	0.0352	8.95
2510.49	2509.48	19.159	1.1701	13.08	0.0497	9.41
2548.37	2547.36	19.302	1.4879	17.14	0.0645	12.01
2588.13	2587.13	19.451	1.1253	24.23	0.0903	9.12
2645.66	2644.65	19.665	0.8016	6.61	0.0244	6.53
2672.54	2671.53	19.764	0.7100	7.81	0.0287	5.80
2701.93	2700.92	19.872	0.6059	1.89	0.0069	4.96
2714.04	2713.03	19.916	0.7967	5.25	0.0192	6.53
2744.23	2743.22	20.026	1.5753	15.67	0.0569	12.96
2765.83	2764.82	20.105	1.9933	35.32	0.1277	16.43
2798.60	2797.60	20.223	1.8114	17.06	0.0614	14.98
2822.57	2821.56	20.309	2.2505	28.31	0.1013	18.66
2841.99	2840.98	20.378	1.0515	13.66	0.0487	8.73
2874.68	2873.68	20.494	1.3501	16.29	0.0578	11.25
2882.13	2881.12	20.521	1.0852	7.18	0.0254	9.05
2986.19	2985.19	20.886	1.6218	16.72	0.0582	13.66
3008.50	3007.50	20.964	0.7147	2.51	0.0087	6.03
3035.73	3034.72	21.058	0.6588	4.37	0.0151	5.58
3051.05	3050.04	21.111	0.3948	1.66	0.0057	3.35
3069.95	3068.95	21.176	0.4739	1.33	0.0046	4.02
3092.47	3091.47	21.253	1.1918	16.40	0.0561	10.14
3114.57	3113.56	21.328	0.4997	1.64	0.0056	4.26
3151.05	3150.05	21.452	0.6513	5.28	0.0179	5.57
3164.53	3163.52	21.498	0.9793	11.19	0.0378	8.39
3232.23	3231.22	21.725	1.5813	18.92	0.0633	13.63
3243.48	3242.47	21.763	0.7721	6.38	0.0213	6.66
3298.21	3297.21	21.945	3.4654	36.61	0.1212	30.07
3313.89	3312.88	21.997	5.1135	76.84	0.2537	44.43
3333.83	3332.82	22.063	2.5432	37.75	0.1242	22.14
3384.92	3383.91	22.230	2.1432	65.06	0.2129	18.75
3407.63	3406.63	22.304	1.0824	12.54	0.0408	9.49
3429.51	3428.51	22.375	0.6049	3.05	0.0099	5.31
3452.91	3451.90	22.451	0.8204	7.29	0.0236	7.22
3476.39	3475.38	22.527	0.5334	4.42	0.0142	4.71
3503.26	3502.25	22.614	0.5524	2.93	0.0094	4.89
3511.64	3510.63	22.641	0.4732	2.83	0.0091	4.19
3528.97	3527.96	22.696	0.4620	5.10	0.0163	4.10
3546.06	3545.06	22.751	0.5973	6.70	0.0214	5.30
3568.26	3567.25	22.821	1.0034	9.59	0.0305	8.93
3590.14	3589.14	22.891	1.0356	32.09	0.1018	9.23
3623.82	3622.81	22.998	0.4337	3.89	0.0123	3.88
3637.24	3636.23	23.040	0.4513	6.62	0.0208	4.04
3694.92	3693.91	23.221	0.5609	5.95	0.0186	5.05
3729.43	3728.42	23.329	0.4638	2.79	0.0087	4.19
3764.53	3763.52	23.438	0.4174	1.51	0.0047	3.78
3805.09	3804.09	23.563	0.8459	10.90	0.0336	7.69
3823.32	3822.31	23.619	1.7052	28.82	0.0886	15.54
3848.08	3847.07	23.695	1.0869	14.13	0.0433	9.93
3855.69	3854.69	23.719	0.8424	8.51	0.0260	7.70
3898.88	3897.87	23.850	2.3732	28.05	0.0854	21.77
3921.25	3920.25	23.919	1.1576	12.73	0.0387	10.64
3942.17	3941.16	23.982	0.5628	6.01	0.0182	5.18
3966.53	3965.52	24.056	0.5595	7.51	0.0227	5.16
3980.76	3979.76	24.099	0.4952	3.90	0.0118	4.58

10

20

30

40

4027.93	4026.93	24.240	0.3813	2.66	0.0080	3.54
4058.52	4057.52	24.332	0.5159	5.65	0.0169	4.80
4076.90	4075.89	24.386	1.2618	21.95	0.0653	11.77
4161.26	4160.25	24.636	9.0816	189.47	0.5588	85.34
4187.94	4186.94	24.715	3.9580	98.13	0.2882	37.28
4211.39	4210.38	24.784	1.9753	20.07	0.0588	18.65
4225.32	4224.31	24.824	1.7662	17.90	0.0524	16.69
4237.59	4236.58	24.860	1.0754	10.50	0.0307	10.18
4259.14	4258.13	24.923	1.1283	15.93	0.0464	10.70
4277.21	4276.20	24.976	0.9969	9.99	0.0290	9.47
4306.31	4305.31	25.060	1.4922	28.79	0.0835	14.21
4317.27	4316.27	25.092	1.4477	27.75	0.0803	13.80
4387.42	4386.41	25.294	0.5169	3.99	0.0114	4.96
4421.28	4420.27	25.391	0.6385	10.89	0.0311	6.14
4476.55	4475.55	25.549	1.6525	25.13	0.0714	15.98
4498.63	4497.62	25.611	0.8303	12.41	0.0352	8.04
4524.12	4523.11	25.683	0.5423	5.72	0.0162	5.27
4545.86	4544.85	25.745	0.7655	15.04	0.0424	7.45
4574.44	4573.43	25.825	0.2026	0.70	0.0020	1.98
4589.43	4588.42	25.867	0.2134	1.61	0.0045	2.08
4610.07	4609.07	25.925	0.1564	0.29	0.0008	1.53
4632.98	4631.97	25.989	0.9352	10.71	0.0299	9.17
4653.41	4652.40	26.046	0.3656	2.90	0.0081	3.59
4673.98	4672.97	26.104	0.2227	0.95	0.0026	2.19
4705.09	4704.08	26.190	0.1266	0.60	0.0017	1.25
4721.34	4720.33	26.235	0.5855	7.57	0.0209	5.79
4746.55	4745.55	26.305	0.5041	8.28	0.0228	4.99
4760.71	4759.70	26.344	0.4023	4.44	0.0122	3.99
4776.82	4775.81	26.388	0.5845	8.39	0.0231	5.81
4795.96	4794.95	26.441	0.8917	14.07	0.0386	8.87
4817.65	4816.64	26.500	0.7853	15.13	0.0414	7.83
4900.93	4899.92	26.727	0.5187	5.56	0.0151	5.21
4946.35	4945.35	26.850	0.3060	3.20	0.0086	3.09
4963.56	4962.55	26.897	0.4123	6.74	0.0182	4.16
5010.78	5009.78	27.024	12.5885	211.54	0.5681	127.69
5031.99	5030.99	27.081	5.8531	84.84	0.2273	59.48
5053.19	5052.18	27.137	3.0847	47.31	0.1265	31.41
5074.18	5073.17	27.193	1.7893	33.97	0.0906	18.25
5109.70	5108.69	27.288	1.4186	37.78	0.1004	14.52
5174.52	5173.52	27.460	0.4570	6.47	0.0171	4.70
5215.36	5214.36	27.568	0.7393	7.91	0.0208	7.64
5234.38	5233.38	27.618	0.5442	9.17	0.0241	5.63
5273.44	5272.43	27.720	0.2111	1.10	0.0029	2.19
5340.59	5339.58	27.895	0.5133	5.40	0.0140	5.36
5504.23	5503.22	28.318	0.3130	3.85	0.0099	3.32
5525.79	5524.79	28.373	0.3048	4.10	0.0105	3.24
5584.59	5583.58	28.523	0.4938	16.84	0.0429	5.27
5710.82	5709.81	28.842	0.2989	6.40	0.0161	3.23
5758.22	5757.21	28.961	0.3075	2.85	0.0071	3.33
5832.21	5831.20	29.146	0.4003	4.57	0.0114	4.37
5871.67	5870.66	29.244	0.3528	4.17	0.0103	3.86
5885.14	5884.13	29.277	0.3028	7.90	0.0195	3.32
6013.84	6012.83	29.595	0.7071	19.42	0.0477	7.84
6034.06	6033.06	29.644	0.4344	5.55	0.0136	4.83
6396.04	6395.03	30.517	3.0543	118.14	0.2814	35.06
6455.26	6454.25	30.657	26.1287	771.78	1.8272	301.52
6477.39	6476.38	30.710	12.0491	218.47	0.5159	139.32
6499.00	6497.99	30.761	7.2773	135.33	0.3190	84.31
6521.19	6520.18	30.813	5.3012	97.81	0.2302	61.54
6542.80	6541.79	30.864	4.2675	88.66	0.2083	49.63
6638.04	6637.03	31.087	20.2348	631.52	1.4750	237.36
6654.30	6653.29	31.125	19.0952	360.62	0.8401	224.32
6675.85	6674.84	31.175	9.8609	187.44	0.4359	116.07
6698.42	6697.41	31.227	6.2424	112.83	0.2620	73.63
6718.01	6717.00	31.273	4.2544	83.96	0.1946	50.27
6739.45	6738.44	31.322	2.7267	46.03	0.1065	32.28
6765.34	6764.34	31.382	1.9976	39.64	0.0916	23.70
6810.67	6809.66	31.487	2.0664	79.46	0.1831	24.62
6858.73	6857.73	31.597	1.8896	104.59	0.2400	22.61
7151.49	7150.48	32.262	0.9514	22.94	0.0516	11.69
7172.92	7171.91	32.310	1.0333	43.31	0.0971	12.72
7472.88	7471.87	32.977	0.4560	13.01	0.0286	5.77
7617.94	7616.93	33.294	0.4693	11.51	0.0251	6.02
7654.14	7653.13	33.373	1.3314	67.51	0.1465	17.12
7827.96	7826.96	33.748	0.2802	7.57	0.0163	3.66

10

20

30

40

7926.90	7925.89	33.960	2.4904	114.75	0.2450	32.85
7958.23	7957.23	34.027	1.3527	31.25	0.0665	17.89
8133.31	8132.30	34.398	7.5286	658.02	1.3865	101.22
8303.10	8302.09	34.754	0.8155	44.66	0.0931	11.14
8365.08	8364.07	34.883	0.5422	19.48	0.0405	7.45
8612.18	8611.18	35.393	10.6716	1028.00	2.1038	150.06
8774.36	8773.35	35.723	2.1558	178.91	0.3625	30.78
8940.04	8939.03	36.058	4.2497	277.17	0.5570	61.65
9028.23	9027.22	36.235	0.5131	9.18	0.0184	7.51
9116.51	9115.50	36.411	0.6114	14.83	0.0295	9.02
9162.72	9161.71	36.503	0.8263	59.88	0.1189	12.25
9307.46	9306.45	36.789	0.5852	23.46	0.0462	8.80
9454.10	9453.09	37.077	1.5935	140.29	0.2741	24.30
9585.08	9584.07	37.332	0.1746	4.40	0.0085	2.70
9683.68	9682.67	37.523	0.2391	6.15	0.0119	3.73
9743.77	9742.76	37.639	0.4345	27.31	0.0525	6.82
10072.71	10071.70	38.267	0.2760	15.39	0.0291	4.47
11533.88	11532.87	40.940	0.2410	19.15	0.0339	4.56
11691.05	11690.04	41.217	0.2518	35.15	0.0617	4.84
12454.78	12453.77	42.538	0.5778	57.72	0.0983	12.12
13574.94	13573.93	44.405	1.1111	178.32	0.2910	26.75
13715.41	13714.41	44.633	0.4473	42.34	0.0686	10.97
13866.02	13865.01	44.877	0.3384	35.35	0.0570	8.46
14034.19	14033.19	45.148	0.2951	53.00	0.0849	7.55
14392.29	14391.28	45.719	0.5330	106.02	0.1676	14.32
15118.66	15117.65	46.855	0.3627	57.41	0.0886	10.83
15313.34	15312.33	47.155	0.1527	18.28	0.0280	4.70
15870.49	15869.48	48.003	0.1483	34.49	0.0519	4.99
16659.22	16658.21	49.178	0.1152	23.78	0.0350	4.45
17261.53	17260.53	50.057	0.2182	48.44	0.0702	9.49
17403.26	17402.25	50.262	0.2735	94.70	0.1356	12.26
22185.18	22184.17	56.732	0.6056	798.59	1.0136	49.97
28054.19	28053.18	63.781	0.2571	107.68	0.1221	39.27
29051.79	29050.78	64.903	0.1030	74.85	0.0832	16.04
33245.74	33244.73	69.421	1.6601	1750.64	1.8258	281.43
34281.46	34280.45	70.492	0.5196	597.67	0.6025	89.96
39898.16	39897.15	76.038	0.0257	11.52	0.0110	4.98
44457.39	44456.39	80.258	0.3417	989.32	0.8917	69.77
49939.53	49938.52	85.055	0.0226	19.83	0.0169	4.91
51350.04	51349.03	86.246	0.0499	94.72	0.0792	10.85
55656.75	55655.74	89.784	0.0711	186.88	0.1514	15.47
59215.94	59214.93	92.607	0.1083	250.62	0.1967	23.63
66317.60	66316.59	97.995	2.2783	6680.56	4.9211	498.39
72737.16	72736.15	102.622	0.1259	350.29	0.2456	27.61
75001.97	75000.96	104.206	0.1127	216.04	0.1488	24.73
80013.65	80012.64	107.627	0.0678	279.89	0.1869	14.91
88591.36	88590.35	113.242	0.0472	171.17	0.1093	10.41
99724.32	99723.31	120.139	0.0857	436.66	0.2624	18.82
110663.70	110662.70	126.550	0.0315	123.51	0.0705	7.11
115751.09	115750.08	129.423	0.0392	84.89	0.0477	9.03
116910.94	116909.93	130.069	0.0411	256.88	0.1413	9.53
132576.48	132575.47	138.501	0.2015	1519.36	0.7867	49.62
175561.80	175560.79	159.360	0.0192	204.64	0.0927	5.21

10

20

30

検出された合計ピーク = 191

【 0 1 5 6 】

(表2) 均等化ピーズでの処理の後にける血清からのS/N比 > 3でのタンパク質のピーク検出

M/z	質量	TOF	強度	MZ面積	TOF面積	S/N
2021.84	2020.83	17.207	0.6376	12.12	0.0503	8.96
2067.93	2066.93	17.398	0.6601	6.51	0.0267	9.31
2087.13	2086.12	17.476	0.7201	7.41	0.0303	10.18
2106.09	2105.09	17.554	0.4864	3.56	0.0145	6.89
2180.24	2179.23	17.853	0.5382	3.23	0.0129	7.67
2221.86	2220.85	18.019	1.4170	8.54	0.0339	20.27
2240.96	2239.96	18.095	0.5589	6.06	0.0240	8.01
2266.94	2265.93	18.198	0.5494	3.98	0.0157	7.89
2293.08	2292.07	18.300	0.3779	2.12	0.0083	5.44
2339.18	2338.18	18.480	0.9868	7.77	0.0301	14.26
2378.63	2377.62	18.632	0.6337	4.75	0.0183	9.19
2396.27	2395.27	18.700	0.5728	5.76	0.0221	8.32
2439.97	2438.96	18.867	1.0408	6.19	0.0235	15.17
2467.12	2466.12	18.969	0.9706	8.52	0.0322	14.18

40

2497.92	2496.92	19.086	0.9600	7.48	0.0281	14.06
2526.24	2525.23	19.192	0.8088	7.31	0.0273	11.88
2553.87	2552.86	19.295	2.9512	30.44	0.1132	43.44
2625.36	2624.35	19.559	0.5117	2.40	0.0088	7.58
2655.34	2654.33	19.669	0.9776	9.38	0.0343	14.51
2683.62	2682.62	19.772	19.4999	144.76	0.5259	290.17
2706.16	2705.15	19.853	2.6950	27.91	0.1010	40.18
2729.04	2728.03	19.936	1.1192	9.74	0.0351	16.72
2801.03	2800.03	20.194	1.4372	7.80	0.0278	21.60
2841.72	2840.71	20.338	5.3061	38.45	0.1359	80.01
2864.83	2863.82	20.420	0.9591	9.76	0.0344	14.49
2889.55	2888.55	20.507	3.5170	27.58	0.0967	53.24
2930.16	2929.15	20.649	0.6606	5.11	0.0178	10.03
2946.66	2945.66	20.706	1.4513	12.23	0.0425	22.07
2991.41	2990.41	20.861	1.0116	11.76	0.0406	15.44
3068.43	3067.42	21.125	2.6692	27.74	0.0946	41.00
3091.47	3090.47	21.204	0.5713	6.74	0.0229	8.79
3104.33	3103.32	21.247	2.7977	23.84	0.0808	43.10
3128.84	3127.84	21.330	0.4361	3.91	0.0132	6.73
3159.53	3158.53	21.434	1.1023	8.52	0.0286	17.06
3186.78	3185.78	21.525	0.2998	2.51	0.0084	4.65
3203.52	3202.51	21.581	0.6912	5.44	0.0182	10.73
3224.18	3223.17	21.650	2.4947	24.72	0.0823	38.81
3237.12	3236.11	21.693	1.2228	9.75	0.0324	19.04
3247.56	3246.55	21.728	0.4539	3.69	0.0122	7.07
3289.31	3288.30	21.866	13.5948	102.60	0.3383	212.58
3311.94	3310.93	21.940	1.9602	14.93	0.0491	30.71
3336.82	3335.81	22.022	4.7302	36.91	0.1209	74.25
3346.26	3345.25	22.053	1.2829	10.27	0.0336	20.15
3358.47	3357.46	22.093	0.6222	3.29	0.0108	9.78
3373.64	3372.63	22.142	0.5314	4.59	0.0149	8.37
3385.05	3384.04	22.179	0.8139	6.98	0.0227	12.82
3415.17	3414.17	22.277	0.4451	3.75	0.0121	7.03
3427.49	3426.48	22.317	2.3109	15.05	0.0487	36.53
3438.79	3437.78	22.353	1.0937	8.77	0.0283	17.31
3447.05	3446.04	22.380	0.8280	5.94	0.0191	13.11
3459.90	3458.90	22.421	0.3291	1.87	0.0060	5.22
3467.20	3466.19	22.445	0.2547	1.29	0.0042	4.04
3485.27	3484.26	22.503	0.9642	6.74	0.0216	15.31
3495.20	3494.20	22.535	0.4776	3.13	0.0100	7.59
3506.27	3505.26	22.570	0.7766	5.56	0.0178	12.35
3524.49	3523.48	22.628	0.6243	5.34	0.0170	9.95
3530.57	3529.57	22.648	0.8564	6.82	0.0217	13.65
3552.77	3551.76	22.718	0.2099	1.07	0.0034	3.35
3573.00	3572.00	22.783	1.7464	12.44	0.0394	27.93
3642.53	3641.53	23.002	0.8032	4.85	0.0152	12.92
3660.13	3659.12	23.057	1.7988	14.34	0.0449	28.96
3683.85	3682.84	23.131	0.5319	4.38	0.0137	8.58
3702.01	3701.00	23.188	2.5079	18.21	0.0567	40.52
3746.51	3745.50	23.326	0.4842	3.69	0.0114	7.85
3774.17	3773.16	23.412	1.1931	13.41	0.0414	19.38
3789.41	3788.40	23.459	20.8035	191.08	0.5886	338.38
3811.60	3810.59	23.527	3.5547	39.12	0.1201	57.92
3833.14	3832.13	23.593	4.2186	38.90	0.1192	68.85
3848.99	3847.98	23.642	1.9147	24.85	0.0760	31.29
3887.00	3885.99	23.757	0.2288	0.81	0.0025	3.75
3907.37	3906.36	23.819	0.3720	1.41	0.0043	6.11
3916.17	3915.16	23.846	1.1685	9.34	0.0283	19.19
3931.92	3930.92	23.894	1.1141	11.11	0.0336	18.32
3946.05	3945.04	23.937	6.4985	54.40	0.1644	106.99
3960.15	3959.14	23.979	1.3249	16.05	0.0484	21.84
3979.74	3978.73	24.038	0.8035	6.65	0.0200	13.26
3996.40	3995.39	24.088	1.4516	16.40	0.0492	23.99
4013.73	4012.72	24.140	0.5642	5.43	0.0163	9.34
4037.17	4036.16	24.210	1.1069	9.51	0.0284	18.35
4079.33	4078.32	24.336	0.5052	2.25	0.0067	8.40
4101.88	4100.87	24.403	0.3796	2.87	0.0085	6.33
4116.36	4115.35	24.446	1.2880	7.31	0.0217	21.49
4123.41	4122.40	24.467	1.5143	14.62	0.0432	25.27
4147.47	4146.46	24.538	7.6159	67.57	0.1993	127.35
4161.38	4160.38	24.579	31.9075	291.83	0.8593	534.10
4181.81	4180.81	24.639	9.1974	127.91	0.3757	154.19
4205.75	4204.74	24.709	5.5891	74.72	0.2189	93.87
4227.41	4226.41	24.772	2.0620	29.87	0.0873	34.69
4249.76	4248.75	24.838	0.9303	10.38	0.0302	15.68

10

20

30

40

4272.77	4271.76	24.905	4.3852	39.31	0.1143	74.03
4295.30	4294.29	24.970	1.7984	15.14	0.0439	30.41
4316.14	4315.13	25.030	1.0213	13.60	0.0393	17.30
4334.00	4332.99	25.082	2.6466	26.85	0.0775	44.89
4356.55	4355.54	25.147	0.6608	5.66	0.0163	11.23
4367.67	4366.67	25.179	3.5704	34.89	0.1004	60.71
4386.58	4385.57	25.233	0.8809	9.31	0.0267	15.00
4412.41	4411.41	25.308	0.6081	2.58	0.0074	10.38
4435.68	4434.67	25.374	0.0322	-1.50	-0.0043	0.55
4445.90	4444.89	25.403	0.2572	0.77	0.0022	4.40
4494.15	4493.15	25.540	5.1702	62.47	0.1772	88.76
4516.89	4515.89	25.605	0.4659	3.11	0.0088	8.01
4540.00	4538.99	25.670	0.4298	6.56	0.0185	7.40
4573.91	4572.90	25.766	0.3421	4.53	0.0127	5.91
4607.33	4606.33	25.860	0.5394	7.83	0.0219	9.34
4622.34	4621.34	25.902	0.8686	6.78	0.0190	15.06
4651.23	4650.22	25.982	0.5581	4.93	0.0138	9.70
4680.47	4679.46	26.064	0.7940	11.05	0.0307	13.82
4717.86	4716.86	26.168	0.3405	3.24	0.0090	5.94
4737.63	4736.62	26.222	1.6830	16.14	0.0446	29.43
4746.03	4745.02	26.246	0.7521	4.57	0.0126	13.16
4759.22	4758.21	26.282	0.3119	3.05	0.0084	5.46
4787.60	4786.60	26.360	0.1802	0.99	0.0027	3.16
4816.82	4815.82	26.441	0.3586	2.73	0.0075	6.31
4829.31	4828.30	26.475	0.5449	7.60	0.0208	9.59
4849.72	4848.71	26.531	0.9698	9.32	0.0255	17.10
4869.86	4868.85	26.586	0.3755	3.13	0.0085	6.63
4899.44	4898.44	26.666	0.4979	5.97	0.0162	8.81
4918.11	4917.11	26.717	0.3938	4.58	0.0124	6.98
4963.85	4962.84	26.841	1.1185	16.74	0.0453	19.89
5062.61	5061.60	27.107	1.4525	17.55	0.0470	26.02
5094.27	5093.26	27.191	1.1946	17.48	0.0467	21.45
5108.24	5107.23	27.229	1.5213	20.68	0.0551	27.35
5128.79	5127.79	27.283	2.5384	26.47	0.0704	45.70
5145.89	5144.88	27.329	0.7368	10.95	0.0291	13.28
5173.86	5172.85	27.403	0.7359	13.56	0.0360	13.29
5187.50	5186.49	27.439	0.7046	7.49	0.0198	12.74
5205.84	5204.83	27.488	0.6291	8.47	0.0224	11.39
5274.33	5273.32	27.668	0.4129	4.92	0.0129	7.51
5315.83	5314.82	27.777	1.2730	19.00	0.0497	23.24
5341.10	5340.09	27.843	0.2176	2.07	0.0054	3.98
5359.34	5358.33	27.890	0.2531	2.97	0.0077	4.64
5402.17	5401.16	28.002	1.0504	16.14	0.0419	19.30
5433.21	5432.20	28.082	1.1667	14.37	0.0372	21.48
5454.45	5453.44	28.137	0.2116	2.89	0.0075	3.90
5504.70	5503.70	28.267	1.0223	19.86	0.0511	18.93
5546.41	5545.40	28.374	0.4939	6.77	0.0173	9.17
5609.12	5608.11	28.534	0.4736	9.68	0.0247	8.83
5624.76	5623.76	28.574	0.4185	4.48	0.0114	7.82
5682.49	5681.49	28.720	0.1958	1.06	0.0027	3.67
5733.38	5732.37	28.849	1.7600	31.18	0.0786	33.14
5755.15	5754.14	28.904	0.8682	12.82	0.0322	16.37
5797.90	5796.89	29.011	1.3933	36.06	0.0904	26.36
5847.40	5846.39	29.135	1.2801	24.84	0.0620	24.30
5874.14	5873.13	29.201	1.8388	62.45	0.1554	34.98
5934.72	5933.72	29.352	0.5579	12.73	0.0315	10.66
5978.50	5977.49	29.460	0.3853	7.29	0.0180	7.39
6013.90	6012.90	29.548	0.3552	2.90	0.0071	6.83
6032.85	6031.85	29.594	0.4093	3.60	0.0089	7.88
6133.82	6132.81	29.841	0.5865	6.96	0.0170	11.37
6162.34	6161.33	29.911	1.3553	20.48	0.0498	26.33
6184.57	6183.56	29.965	0.6588	9.78	0.0238	12.82
6216.02	6215.01	30.041	0.9219	19.68	0.0477	17.98
6236.00	6235.00	30.090	0.8304	10.75	0.0260	16.22
6255.36	6254.35	30.136	0.2361	2.34	0.0057	4.62
6320.39	6319.39	30.293	1.1214	17.58	0.0423	22.04
6342.23	6341.22	30.346	1.5366	26.64	0.0639	30.25
6456.30	6455.29	30.618	21.3573	431.55	1.0263	424.01
6498.25	6497.24	30.718	1.8487	25.84	0.0613	36.82
6521.67	6520.66	30.773	2.3440	32.22	0.0763	46.76
6551.22	6550.21	30.843	1.5207	32.41	0.0765	30.40
6614.06	6613.06	30.991	1.7907	21.31	0.0501	35.96
6653.73	6652.72	31.084	40.0260	990.54	2.3211	806.22
6696.04	6695.03	31.183	5.5580	89.50	0.2091	112.30
6718.43	6717.42	31.236	3.9535	70.52	0.1645	80.01

10

20

30

40

6740.82	6739.81	31.288	3.0803	58.81	0.1370	62.44
6763.08	6762.07	31.339	2.6139	47.31	0.1100	53.07
6832.17	6831.17	31.500	29.3327	769.05	1.7805	598.61
6852.89	6851.88	31.548	12.8114	225.11	0.5200	261.85
6873.74	6872.73	31.596	6.7676	115.78	0.2670	138.53
6895.96	6894.95	31.647	4.0495	126.91	0.2920	83.03
6968.15	6967.14	31.813	2.6462	48.81	0.1119	54.54
6987.83	6986.82	31.858	9.1160	179.49	0.4107	188.17
7007.18	7006.18	31.902	3.5064	48.01	0.1097	72.48
7035.74	7034.73	31.967	2.8179	55.45	0.1265	58.37
7054.79	7053.78	32.011	2.6118	69.35	0.1578	54.18
7219.97	7218.97	32.385	6.0098	205.68	0.4631	126.18
7323.59	7322.59	32.617	1.4502	43.84	0.0980	30.68
7354.38	7353.37	32.686	0.8418	14.96	0.0334	17.85
7426.45	7425.44	32.847	0.2530	8.63	0.0192	5.39
7632.91	7631.90	33.302	25.1248	922.09	2.0212	543.77
7697.48	7696.47	33.443	2.3440	94.17	0.2053	50.97
7781.99	7780.98	33.627	4.0191	140.62	0.3052	87.95
7839.40	7838.39	33.752	2.0650	82.17	0.1776	45.38
7929.48	7928.47	33.946	0.4065	11.97	0.0257	8.99
8003.12	8002.12	34.104	0.6177	20.19	0.0432	13.74
8070.02	8069.01	34.247	0.7401	21.61	0.0461	16.54
8141.70	8140.69	34.399	2.3180	68.48	0.1454	52.09
8158.61	8157.60	34.435	1.6675	29.11	0.0617	37.52
8251.98	8250.97	34.633	0.3282	9.23	0.0195	7.43
8294.07	8293.06	34.721	1.2292	37.02	0.0779	27.93
8372.44	8371.43	34.886	0.5741	27.10	0.0568	13.12
8484.99	8483.99	35.121	0.3754	8.50	0.0177	8.65
8589.51	8588.50	35.338	2.4703	105.46	0.2180	57.39
8651.75	8650.75	35.466	1.8591	59.08	0.1217	43.39
8713.50	8712.49	35.593	5.5491	204.46	0.4198	130.11
8756.81	8755.80	35.682	1.7265	52.13	0.1067	40.61
8833.41	8832.40	35.838	2.4403	133.47	0.2724	57.73
8939.05	8938.04	36.053	22.2153	1128.34	2.2880	529.75
9019.22	9018.21	36.216	2.3984	92.32	0.1862	57.54
9091.97	9090.96	36.362	2.3245	113.49	0.2282	56.07
9144.69	9143.68	36.468	2.3181	121.61	0.2437	56.14
9309.12	9308.12	36.796	3.6153	148.49	0.2952	88.65
9374.68	9373.68	36.926	2.4549	109.39	0.2167	60.49
9437.96	9436.95	37.051	2.7925	165.50	0.3267	69.14
9516.91	9515.90	37.207	1.8864	104.50	0.2055	46.99
9581.85	9580.84	37.334	1.3051	70.92	0.1390	32.67
9637.19	9636.19	37.443	1.0115	54.07	0.1056	25.43
9724.00	9722.99	37.612	0.3754	16.30	0.0317	9.50
9785.71	9784.70	37.732	0.2852	9.89	0.0192	7.25
9939.68	9938.68	38.029	0.7471	35.29	0.0679	19.22
10063.40	10062.39	38.267	4.5744	203.31	0.3889	118.81
10144.76	10143.75	38.422	0.5690	31.57	0.0601	14.87
10273.13	10272.12	38.666	0.7631	38.76	0.0734	20.15
10497.57	10496.57	39.089	0.2782	13.21	0.0247	7.47
10561.30	10560.29	39.208	0.4082	21.74	0.0406	11.02
10635.46	10634.45	39.346	0.5930	35.52	0.0661	16.10
10718.48	10717.47	39.500	0.9040	61.40	0.1139	24.71
10802.36	10801.36	39.656	0.8599	66.95	0.1236	23.66
10921.46	10920.45	39.875	0.4378	23.17	0.0426	12.16
11046.41	11045.40	40.104	0.1310	5.23	0.0096	3.68
11147.95	11146.94	40.289	0.1517	7.75	0.0141	4.29
11431.94	11430.93	40.802	1.5601	85.67	0.1542	45.13
11515.49	11514.48	40.952	3.4607	316.45	0.5666	100.79
11667.57	11666.56	41.223	5.1984	534.22	0.9496	153.29
11874.61	11873.61	41.590	0.8999	92.25	0.1626	26.99
12135.29	12134.28	42.047	0.3472	20.90	0.0365	10.64
12213.21	12212.20	42.183	0.1927	12.50	0.0217	5.94
12421.55	12420.55	42.543	0.4176	25.40	0.0438	13.11
12553.09	12552.08	42.770	0.3921	26.02	0.0446	12.44
12837.97	12836.97	43.255	0.7051	53.27	0.0904	22.92
13035.41	13034.40	43.589	0.2257	19.66	0.0331	7.46
13517.28	13516.27	44.393	1.7454	207.59	0.3436	60.20
13664.19	13663.19	44.635	1.0656	136.20	0.2239	37.24
13826.26	13825.25	44.901	0.9339	96.11	0.1572	33.11
14005.24	14004.23	45.193	4.3241	437.10	0.7106	155.80
14103.83	14102.82	45.353	2.4578	213.14	0.3450	89.36
14335.82	14334.81	45.727	8.7632	1030.75	1.6560	325.47
14534.46	14533.45	46.045	2.5813	335.53	0.5351	97.66
14717.09	14716.08	46.335	0.8605	197.18	0.3118	33.12

10

20

30

40

15187.24	15186.24	47.075	0.4437	75.60	0.1177	17.87
15657.41	15656.40	47.803	0.0897	8.45	0.0130	3.78
15820.39	15819.38	48.053	0.0865	9.75	0.0149	3.71
16443.65	16442.64	48.997	0.1190	11.73	0.0176	5.45
17066.08	17065.07	49.923	1.3076	165.52	0.2444	64.05
17175.08	17174.07	50.083	2.5670	301.87	0.4434	127.30
17296.48	17295.47	50.261	2.7701	417.80	0.6109	139.28
17482.10	17481.09	50.532	1.0341	142.54	0.2072	53.11
17766.54	17765.53	50.944	0.6228	131.11	0.1894	33.08
17945.02	17944.01	51.201	0.6698	282.23	0.4026	36.33
21092.56	21091.55	55.543	0.1325	101.64	0.1341	11.26
23718.05	23717.04	58.924	0.0883	65.37	0.0812	13.41
25789.62	25788.62	61.462	0.0509	34.02	0.0407	10.83
27804.46	27803.45	63.835	2.9497	1524.96	1.7606	669.03
28548.76	28547.75	64.689	0.8053	668.67	0.7571	187.12
31256.57	31255.56	67.709	0.0260	14.77	0.0161	6.61
32717.17	32716.17	69.284	0.0180	7.30	0.0078	4.81
34145.25	34144.24	70.791	0.1024	84.34	0.0879	28.83
34918.38	34917.37	71.593	0.0511	38.33	0.0394	14.78
37428.16	37427.16	74.139	0.0394	67.81	0.0677	12.55
39114.93	39113.92	75.802	0.0493	57.70	0.0560	16.80
41845.54	41844.54	78.421	0.1089	116.05	0.1097	40.17
42589.26	42588.26	79.120	0.0904	94.91	0.0883	33.69
44703.94	44702.93	81.073	0.0546	86.72	0.0788	20.98
50260.95	50259.94	85.996	0.0194	29.77	0.0255	8.06
55322.52	55321.51	90.250	0.1770	349.83	0.2859	79.52
65162.70	65161.69	97.996	0.0237	72.94	0.0551	11.64
69555.70	69554.69	101.264	0.0206	80.68	0.0584	10.46
82925.12	82924.12	110.623	0.0246	73.37	0.0490	13.93
89416.65	89415.64	114.894	0.0060	23.19	0.0148	3.43
97397.95	97396.94	119.939	0.0063	12.81	0.0079	3.57
110339.51	110338.50	127.698	0.0057	46.50	0.0263	3.26

10

20

検出された合計ピーク = 271

【 0 1 5 7 】

実施例2. 未分画未希釈ヒトプール血漿とのライブラリーのインキュベーション

複合試料の分析を助けるために、この方法は濃度の差を減少させるのに有用である。ヒト血漿は分析することが最も複雑で困難な物質の1つであり：タンパク質は 10^{10} を超える濃度範囲で存在し（Anderson and Anderson）；この範囲を減少させると微量タンパク質の分析を助ける。この方法の条件下で、リガンドライブラリーとの血漿のインキュベーションは、未処理出発物質の分析と比較して、検出でき、引き続いて分析できるタンパク質の数を増加させる。

30

【 0 1 5 8 】

A. 試料の調製

凍結されプールされたヒト血小板貧弱血漿（PPP）を37 で解凍し、0.8 μm および0.45 μm のフィルターを通して濾過した。EACA-Alaスパーサーを持つToyopearl 650Mアミノ樹脂（65 μm 平均直径、 $\sim 2 \times 10^6$ ビーズ/ml； Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA）上のヘキサマーペプチドリガンドのほぼ1mlのライブラリーの四通りを、各々、回転させつつ9mlの血漿と共に室温にて1時間インキュベートした。樹脂を排出し、1mlのクエン酸緩衝液（20mMシトレート、140mM NaCl, pH7.0）で洗浄した。この洗浄溶液、ならびに負荷血漿および初期フロースルーの試料を保持した。ビーズライブラリーを引き続いて20カラム容量のシトレートで洗浄した。

40

【 0 1 5 9 】

試料2および4からの100 μl の樹脂を等容量（100 μl ）の2 \times LDS緩衝液 + DTT（Invitrogen, Carlsbad, CA）と共に90 にて10分間インキュベートし、遠心した。上清を集め、分析のために保存した。

【 0 1 6 0 】

1 ~ 4通りからの200 μl の樹脂を400 μl の6M GuHClまたは400 μl の6M尿素と共にバッチ方式で1時間インキュベートした。樹脂を排出し、フロースルーを分析用に収集した。溶出物中のGuHClおよび尿素濃度は以下のようにしてG-25カラムにて1M尿素まで低下させた。G-25カラムを200 μl の1M尿素で2回5分間平衡化し、次いで、2,000rpmにおいて3分間遠心した。20 μl の尿素およびGuHCl試料を試験管に加え、同一条件下で再度遠心した。フロース

50

ルーを集めた。

【0161】

B. LDS-PAGE分析

初期PPP、フロースルーおよび洗浄をクエン酸緩衝液で1:25に、次いで、2×試料緩衝液で1:2に希釈した。14 μlの処理されたGuHClおよび尿素上清を5 μlの4×LDS緩衝液+2 μlのDTT還元剤中で90 °Cにて10分間加熱した。2つのウェルに試料2および4からのほぼ10 μlのビーズを負荷した。23 μlの残りの試料の各々を200VにおいてMOPS緩衝液中で4~12% Bis-Trisゲル (NuPage, Invitrogen) に泳動させた。製造業者の指示に従ってゲルをSimply Blue (Invitrogen) で染色した。結果を図1および4に示す。

【0162】

元の血漿中で目に見えないいくつかのバンドが処理した試料では存在し、他方、元の血漿に存在した非常に強いアルブミンバンド (~64kD) は実質的に低下した。これらの結果は、記載された方法がこの方法によって検出されるタンパク質の濃度範囲を減少させ、それにより、出発物質の分析と比較して、検出し、分析することができるタンパク質の数を増加させることを示す。

【0163】

実施例3. IgGの除去後における濃度分散の縮小

多くのプロテオミク適応において、試料調製の最初の工程の1つはアルブミンおよびIgGの除去である。というのは、これらの高存在量タンパク質はより低い存在量の化学種検出をマスクするからである。しかしながら、これらのタンパク質の除去はしばしばそれらに会合した微量な化学種もしばしば除去し、また、試料の喪失にも関連する。分析前にIgGの枯渇を必要としない試料調製の方法を有するのが有益であると考えられる。この実施例は、IgGの除去が、無傷血漿で検出されないタンパク質化学種を可視化するのに必要でないことを示す。LDS-PAGEで検出されたタンパク質のパターンを、IgGsを枯渇させた、およびIgGを枯渇させていない血漿において比較する。

【0164】

A. 試料の調製

凍結しプールしたヒト血小板貧弱血漿 (PPP) を37 °Cにて解凍し、0.8および0.45 μmのフィルターを通して濾過した。IgGを以下のようにして血漿から除去した。5mlのプロテインG セファロース Fast-Flow樹脂 (Amersham, T&S) をBio-Radカラムに充填し、10mlの濾過されたPPPを (蠕動ポンプによって制御された) 10cm/h流速で加え、フロースルーを集めた。

【0165】

EACA-Alaスパーサーを伴うToyopearl 650Mアミノ樹脂 (65 μm平均直径, ~2×10⁶ビーズ/ml; Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA) 上のヘキサマーペプチドリガンドのほぼ1mlライブラリーを9mlのフロースルー (前記) と共に1時間/室温/回転インキュベートした。インキュベーションの間に形成された血餅を手で除去した。樹脂を排出し、1mlのクエン酸緩衝液 (20mMシトレート, 140mM NaCl, pH7.0)、続いて、10mlのT-シトレート (クエン酸緩衝液+0.05% Tween-20) および10mlのクエン酸緩衝液で洗浄した。フロースルーおよび最初の1mlの洗浄を分析のために集めた。樹脂を3つのほぼ等しい200 μlのアリコットに分けた。

【0166】

1つの樹脂アリコットを等容量 (200 μl) の2×LDS緩衝液+DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA) と共に90 °Cにて10分間加熱し、遠心した。上清を集め、分析のために保存した。残りの樹脂アリコットをバッチ方式にて500 μlの6M GuHClまたは500 μlの6M尿素と共に1時間インキュベートした。樹脂を排出し、フロースルーを分析のために集めた。

【0167】

溶出物中のGuHClおよび尿素の濃度は6Mから1M濃度まで低下し、これはG-25カラム上での緩衝液交換による元の容量の半分である (2×濃縮)。

【0168】

10

20

30

40

50

B. LDS-PAGE分析

初期PPP、IgG-枯渇PPP、フロースルーおよび洗浄、ならびにGuHClおよび尿素上清の試料をLDS緩衝液 + DTT還元剤中で90℃にて10分間加熱した。LDS緩衝液、GuHCl、および尿素溶出物の最終希釈は、各々、0.25×、1×、および1×であった。PPP、IgG-枯渇血漿、フロースルー、および洗浄を50×希釈した。プロテインG LDSおよびグリシン溶出物を2×LDS緩衝液 + DTTと共にインキュベートした。23 μlの各試料を200VにおいてMOPS緩衝液中で4~12%Bis-Trisゲルで泳動させた。それからIgGを除去しなかった前記方法に従ってより早く調製された血漿の試料を同様に泳動させた。製造業者の指示に従い、ゲルをSimply Blue、続いて、SioverQuestで染色した。データを図2に示す。

【0169】

10

出発、フロースルー、および洗浄試料においては、MW50および25kDa（低下した免疫グロブリン重鎖および軽鎖のサイズ）におけるタンパク質の明瞭な減少があるが、ゲル上で可視化されたIgGの有りおよび無しにて、血漿からのLDS-PAGE溶出物の有意な差はない。尿素およびGuHCl試料からのシグナルは試料取り扱い論点のため区別されない。これらのデータは、IgGを除去する明白な効果はないことを示す。恐らくは独立した分析のためにIgGを除去し、保持するのは好ましい他の理由があり得る。しかしながら、除去はこの方法によって微量タンパク質を分析するのに必要なようには見えない。

【0170】

実施例4. ヒト血清中のタンパク質濃度の範囲の縮小

先の実施例は、未希釈かつ未分画のヒト血漿にての記載された方法の有用性を示した。臨床的診断においては、出発試料はしばしば血漿ではなく血清である。以下の実施例には、分析用の血清を調製するための記載された方法の使用の可能性を示す。

20

【0171】

A. 血清調製

ヒト血液の5つの7ml試験管を4℃にて一晩凝固させた。凝固した血液をSorvall遠心機RT7で4,000rpmにおいて5分間遠心し、血清を集め、0.8および0.45 μmフィルターを通して濾過した。

【0172】

B. 血液調製

1. Tentaゲルベースのライブラリーインキュベーション

30

15mlの円錐試験管中の250 μlのTentaゲルライブラリー [Glyスパーサー付のTentaGel M NH₂ 10 μm (Rapp Polymer) ライブラリー (Peptides International, Louisville, KY) -10 μm平均直径, ~5.6 × 10⁸ ビーズ/ml] を2.25ml (1:9 v/v) 血清と共に室温 (RT) にて1時間インキュベートした。樹脂を4000rpmにて2分間遠心し、上清を分析のために保存した (FT Tenta)。振盪し、次いで、2mlのエッペンドルフ試験管中で4,000rpmにおいて2分間遠心することによって、ビーズを1.25mlクエン酸緩衝液で洗浄した。分析のために洗浄を保存した (W Tenta)。ビーズをさらなる4 × 1.25mlクエン酸緩衝液で洗浄した。ビーズを3つのほぼ75 μlアリコットに分けた。

【0173】

1つの樹脂アリコットを75 μlの2 × LDS/DTTと共に90℃にて10分間インキュベートした。ビーズを遠心し、上清を-20℃で貯蔵した。他のものを200 μlの6M尿素または6MのGuHClと共に室温にて1.5時間インキュベートした。初期および未結合血清画分をシトレート1:25、次いで、2 × LDS/DTTで1:2希釈した。試料を90℃にて10分間加熱し、次いで、-20℃にて凍結させた。

40

【0174】

2. Toyopearlベースのライブラリーインキュベーション

ほぼ1mlのToyopearlライブラリー (65 μm平均直径, ~2 × 10⁶ ビーズ/ml ; Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA) を9mlの血清と共に1時間/室温/回転でインキュベートした。200 μlの樹脂を200 μlの2 × (LDS緩衝液 + DTT還元剤) と共に90℃にて10分間加熱した。上清を収集し、分析のために-20℃にて保存した。200 μlの樹脂をバッチ方式にて400 μ

50

l (v/v) 6M尿素と共に1時間インキュベートした。フロースルーを分析のために集め、室温に維持した。200 μ lの樹脂をバッチ方式にて400 μ lの6M GuHClと共に1時間インキュベートした。フロースルーを分析のために集め、室温に維持した。初期のおよび未結合血清画分をシトレートで1:25、次いで、2 \times LDS/DTTで1:2希釈した。試料を90 にて10分間加熱し、次いで、-20 にて凍結させた。200 μ lの血清および200 μ lの各未結合画分を分析のためにAnalytical Chemistryに送付した。

【0175】

C. LDS-PAGE分析

14 μ lの1M尿素およびGuHCl試料を5 μ lの4 \times LDS緩衝液および2 μ lの10 \times DTTと共に90 にて10分間加熱した。凍結されたLDS試料を90 にて10分間再度加熱した。20 μ lの各試料をウェル当たり2つの4~12% Bis Trisゲルに負荷した。色素の先端がゲルの底部に到達するまで、200Vにおいて、ゲルをMOPS実行緩衝液で泳動させた。ゲルを製造業者の指示に従ってSimply Blueタンパク質染料で染色し、H₂Oで脱染色した。ゲルを図3に示す。

10

【0176】

ライブラリーとのインキュベーションに続き、血清中で目に見えるバンドの数の実質的増加がある(レーン2をレーン3および8と比較されたし)。バンドのパターンは血漿とのライブラリーのインキュベーションで得られたパターンと非常に似ている(レーン3、図3をレーン7、図1と比較されたし)。これらの結果は、本発明の方法での血清試料の調製は、LDS-PAGEによって分析できるバンドの数を増加させ、出発血清と比較した溶出物中の最も豊富なタンパク質の濃度を減少させることを示す。

20

【0177】

前記発明を明瞭性および理解のために説明および例として幾分詳細に記載したが、添付の請求項の範囲の精神および範囲を逸脱することなくある種の変形および修飾をそれに対してなすことができるのは本発明の教示に照らして当業者に容易に明らかであると思われる。

【0178】

本明細書中で引用した全ての刊行物および特許出願は、あたかも各個々の刊行物または特許出願が具体的にかつ個々に示されて、引用により一体化されるように、参照により本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

30

【0179】

【図1】本発明のコンビナトリアルリガンドライブラリーと血漿とのインキュベーションの結果を示す分析を示す。ライブラリーは実施例2に記載された方法にしたがって血漿と共にインキュベートした。

【図2】ライブラリーとのインキュベーションに先立ってのIgGの除去の有りおよび無しでの血漿の比較である。実験は実施例3に記載したように行った。

【図3】本発明のコンビナトリアルリガンドライブラリーと血清とのインキュベーションとの結果を示す。実験は実施例4に従って行った。

【図4】プロテインGカラム濃縮するためのPAGE分析である。左のパネルはクーマシーブルー染料で染色し;右側のパネルはSilver Questで染色した同一ゲルである。

40

【図5】(質量に基づく)血液画分のグラフ表示であり、多数の低存在量タンパク質の追跡性質を強調する。

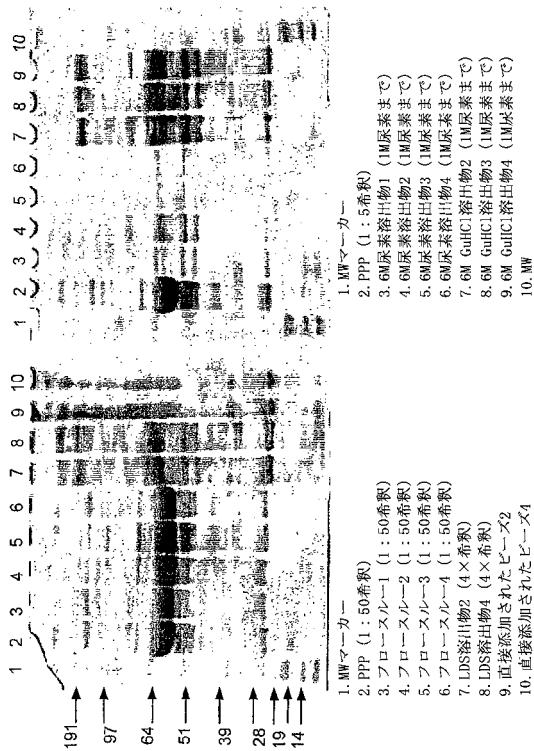
【図6】均等化ビーズでの処理の前および後における試料の質量分析測定比較である。質量の範囲は2.5kDa~10kDaである。実験は実施例1にしたがって行った。

【図7】均等化ビーズでの処理の前および後における試料の比較である。質量の範囲は2kDa~30kDaである。実験は実施例1に従って行った。

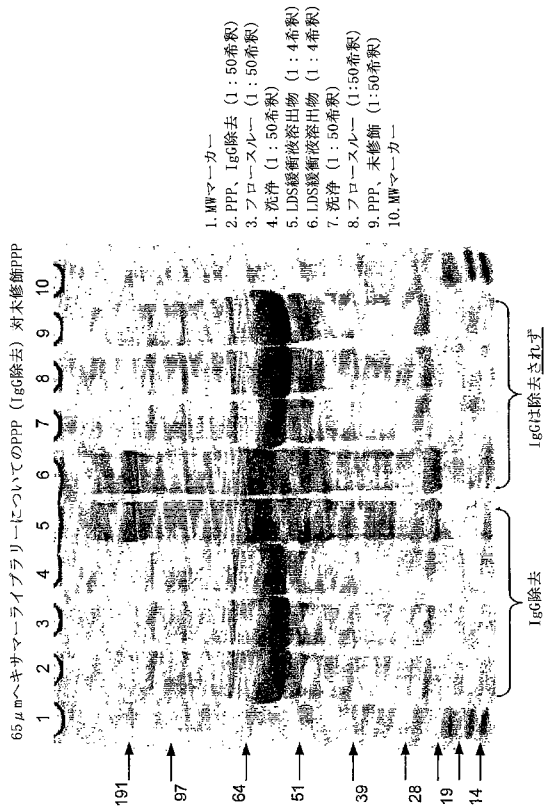
【図8】均等化ビーズでの処理の前および後における試料の比較である。質量の範囲は30kDa~180kDaである。実験は実施例1に従って行った。

【図9】本発明のイークオーサイザービーズ概念の1つの態様のグラフ表示である。

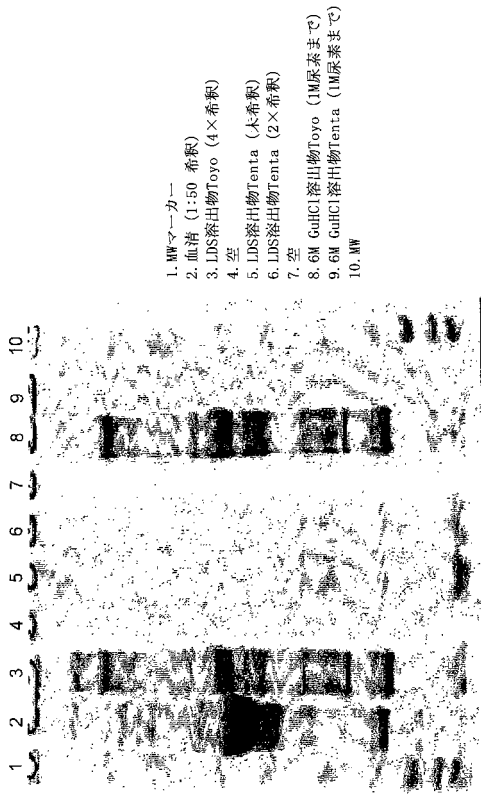
【 図 1 】



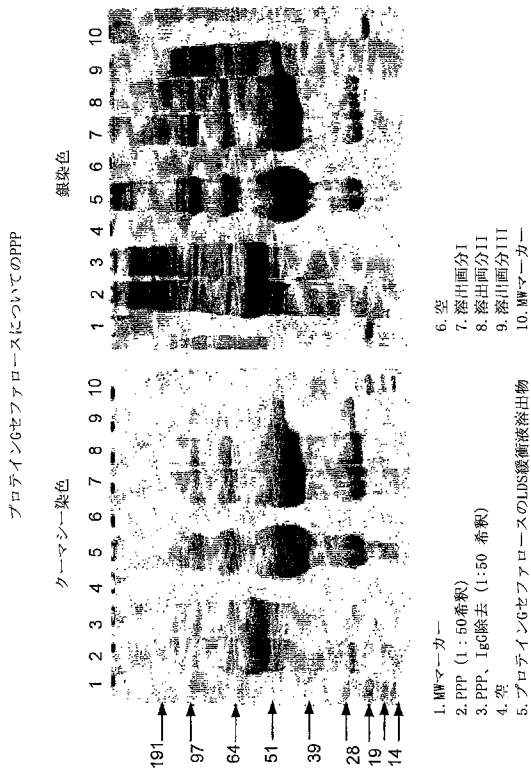
【 図 2 】



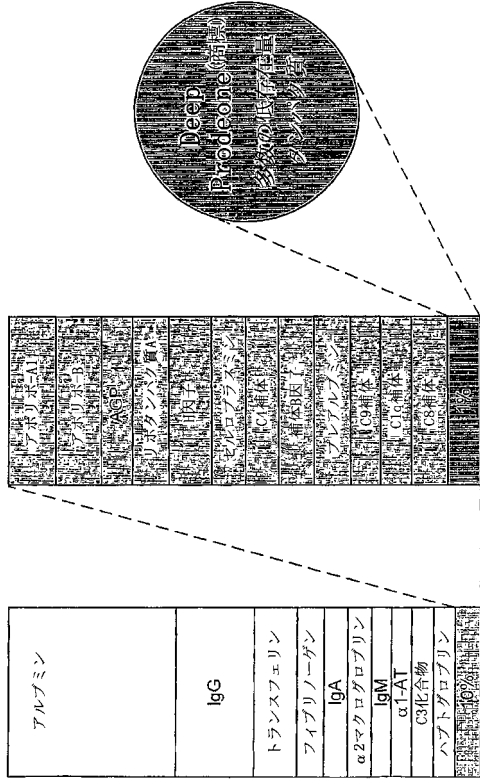
【 図 3 】



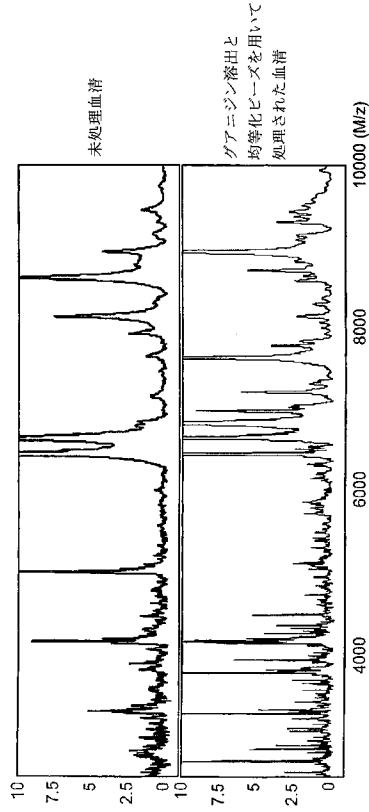
【 図 4 】



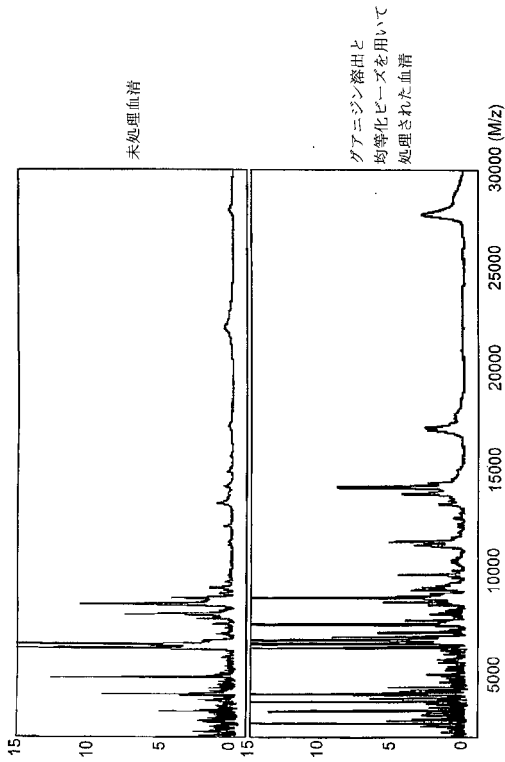
【 図 5 】



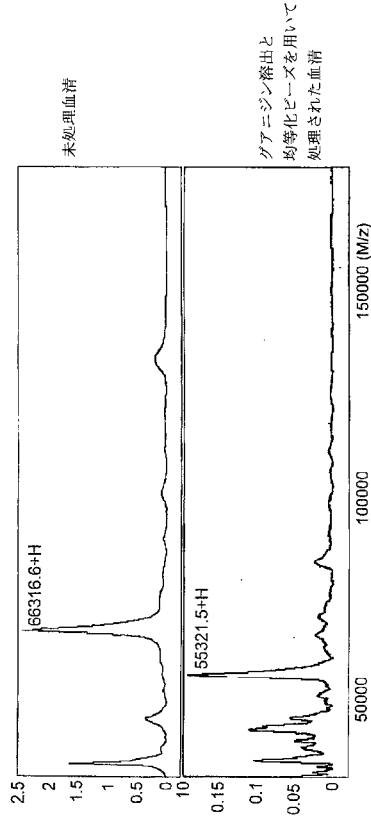
【 図 6 】



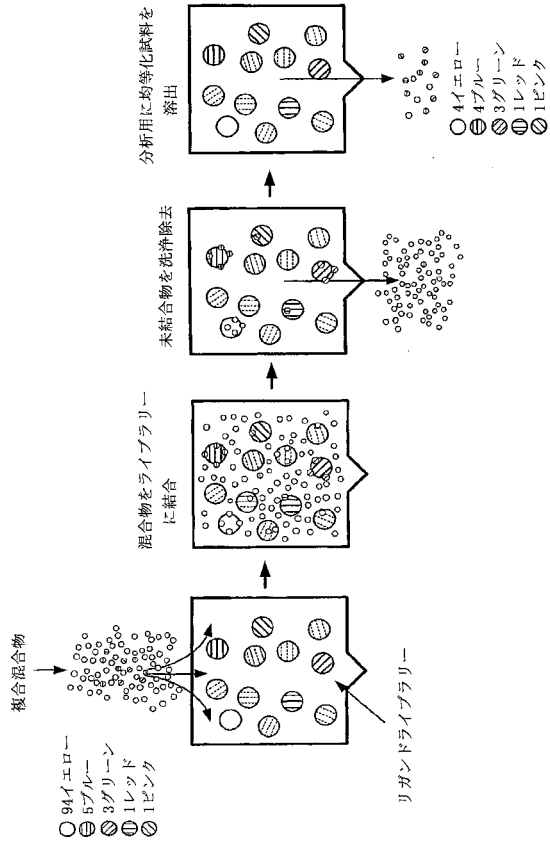
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 4 0 B 60/12

- (31)優先権主張番号 60/582,650
(32)優先日 平成16年6月23日(2004.6.23)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/587,585
(32)優先日 平成16年7月12日(2004.7.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/643,483
(32)優先日 平成17年1月12日(2005.1.12)
(33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 ブシエッティ エジスト
フランス国 クロッシェー スール セーニ ルー ドゥ ラ コート ア ベリエール 11
(72)発明者 ハモンド デイビッド
アメリカ合衆国 メリーランド州 レイトンスビル リップルミード コート 4916

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2003/0036095(US, A1)
特開2002-296281(JP, A)
国際公開第02/048716(WO, A1)
国際公開第03/058199(WO, A1)
特表平11-500741(JP, A)
特表2003-523502(JP, A)
特表2003-528605(JP, A)
分析化学, 1978年, Vol.27, No.1, Page.60-62
Electrophoresis, 2005年, Vol.26, No.18, Page.3561-3571,

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/566
C12Q 1/68
C40B 60/12
G01N 21/78
G01N 37/00
CA/MEDLINE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	降低样品中分析物种类浓度范围的方法		
公开(公告)号	JP4610018B2	公开(公告)日	2011-01-12
申请号	JP2007505108	申请日	2005-03-23
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad实验室股份有限公司Retiddo 美国国家红十字会		
当前申请(专利权)人(译)	生物 - Rad实验室股份有限公司Retiddo 美国国家红十字会		
[标]发明人	ブシエッティエジスト ハモンドデイビッド		
发明人	ブシエッティ エジスト ハモンド デイビッド		
IPC分类号	G01N33/566 G01N21/78 G01N37/00 C12Q1/68 C40B60/12 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6803 C40B30/04 G01N33/543 G01N33/54306 G01N33/6845		
FI分类号	G01N33/566.ZCC G01N21/78.Z G01N37/00.102 G01N37/00.103 C12Q1/68.A C40B60/12		
代理人(译)	清水初衷		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2004290775 2004-03-23 EP 60/559108 2004-04-02 US 60/582650 2004-06-23 US 60/587585 2004-07-12 US 60/643483 2005-01-12 US		
其他公开文献	JP2007530947A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及分子生物学，组合化学和生物化学领域。特别地，本发明描述了用于显著降低从复杂混合物中收集的分析物之间的分散的方法和试剂盒。

