

(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2005-522712

(P2005-522712A)

(43) 公表日 平成17年7月28日(2005.7.28)

(51) Int.Cl.⁷GO 1 N 33/543
// CO 7 K 7/04

F I

GO 1 N 33/543 5 1 5 Z
CO 7 K 7/04 Z N A

テーマコード (参考)

4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2003-586604 (P2003-586604)
 (86) (22) 出願日 平成15年4月14日 (2003. 4. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年11月15日 (2004. 11. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/011799
 (87) 国際公開番号 W02003/089922
 (87) 国際公開日 平成15年10月30日 (2003. 10. 30)
 (31) 優先権主張番号 60/372, 091
 (32) 優先日 平成14年4月15日 (2002. 4. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504382718
 アメリカン ナショナル レッド クロス
 アメリカ合衆国 20855 メリーラン
 ド州, ロックヴィル, クラブス ブランチ
 ウェイ 15601, オフィス オブ
 パテンツ アンド ライセンシング, ジェ
 ローム ホーランド ラボラトリー
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 混合物中のリガンドおよび標的を検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、リガンドと結合する標的を特性決定する方法を提供する。本発明の方法はリガンド、場合によっては支持体と結合したリガンドを用意し、少なくとも1種の標的が少なくとも1種のリガンドと結合しうるようにリガンドを標的と接触させることを含む。本発明の方法はさらに、それぞれの複合物が第1マトリックス内の異なる位置を有するように、得られる複合物を第1マトリックスに固定化すること、および、複合物の標的を第2マトリックスに移動させることを含む。第2マトリックス内の標的の位置は、第1マトリックス内のリガンド-支持体複合物の位置に対応する。次いで第2マトリックス上の標的を検出する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リガンドと結合する標的を特性決定する方法であって、

(i) 1 種以上のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して 1 種以上のリガンド-支持体複合物を形成するステップ、

(ii) 少なくとも 1 種の標的が少なくとも 1 種のリガンド-支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド-支持体複合物と 1 種以上の標的とを接触させ、それにより 1 種以上の標的-リガンド-支持体複合物を形成するステップ、

(iii) それぞれのリガンド-支持体複合物およびそれぞれの標的-リガンド-支持体複合物が第 1 マトリックス内で異なる位置を有するように、リガンド-支持体複合物および標的-リガンド-支持体複合物を第 1 マトリックス中に固定化するステップ、 10

(iv) 少なくとも 1 種の標的-リガンド-支持体複合物の標的の少なくとも一部分を第 2 マトリックスに移動させ、それによって、標的-リガンド-支持体複合物のリガンド-支持体複合物を第 1 マトリックス内に残す、ここで第 2 マトリックス内の標的の位置が第 1 マトリックス内のリガンド-支持体複合物の位置に対応する、ステップ、ならびに

(v) 第 2 マトリックス上の標的を検出し、それによりリガンドと結合する標的を特性決定するステップ

を含む上記方法。

【請求項 2】

ステップ(ii)において、少なくとも 1 種の標的が少なくとも 1 種のリガンド-支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド-支持体複合物と 2 種以上の標的とを接触させ、それにより 1 種以上の標的-リガンド-支持体複合物を形成させる、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 3】

支持体が樹脂ビーズである、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第 1 マトリックスがアガロース、ポリアクリルアミド、デキストラン、セルロース、多糖、これらのいずれかの誘導体、およびこれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される材料を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

リガンドと結合する標的を特性決定する方法であって、 30

(i) 1 種以上のリガンドを用意するステップ、

(ii) それぞれのリガンドが第 1 マトリックス内で異なる位置を有するように、それぞれのリガンドを第 1 マトリックス内に固定化するステップ、

(iii) 少なくとも 1 種の標的が少なくとも 1 種のリガンドと結合しうる条件下で第 1 マトリックス内のリガンドと 1 種以上の標的とを接触させ、それにより 1 種以上の標的-リガンド複合物を第 1 マトリックス内に形成させるステップ、

(iv) 第 1 マトリックス内の少なくとも 1 種の標的-リガンド複合物の標的の少なくとも一部分を第 2 マトリックスに移動させ、それによって、標的-リガンド複合物のリガンドを第 1 マトリックス内に残す、ここで第 2 マトリックス内の標的の位置が第 1 マトリックス内のリガンドの位置に対応する、ステップ、ならびに 40

(v) 第 2 マトリックス上の標的を検出し、それによりリガンドと結合する標的を特性決定するステップ

を含む上記方法。

【請求項 6】

ステップ(i)において 2 種以上のリガンドを用意する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

標的が生物学的体液である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

生物学的体液が血液、血漿、血清、細胞ホモジネート、組織ホモジネート、ならし培地、 50

醗酵ブロス、脳脊髄液、尿、唾液、乳汁、管液、涙、汗、リンパ液、および精液からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

標的が細胞、細菌、ウイルス、酵母、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、炭水化物、脂質、薬物、合成無機化合物、合成有機化合物、これらのいずれかのイソ型、およびこれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

標的が血漿タンパク質である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

血漿タンパク質がブチリルコリンエステラーゼ、フィブリノーゲン、 α -1プロテイナーゼ阻害剤、プリオンタンパク質、アポリポタンパク質A1、免疫グロブリン、パラオキシナーゼ、凝固因子、およびこれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択されるタンパク質である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

リガンドがアミノ酸、ペプチド、核酸、抗体またはその抗原-結合フラグメント、炭水化物、糖類、脂質、有機分子、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

リガンドが本質的に約 1 ~ 約 15 アミノ酸からなるペプチドである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

第 1 マトリックスがナイロン、綿、ポリニフッ化ビニルナイロン、シリコン、ガラス、スチレン、ポリスチレン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、これらのいずれかの誘導体、およびこれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される材料を含む、請求項 5 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

第 2 マトリックスがニトロセルロース、シリコン、スチレン、およびポリニフッ化ビニルナイロンからなる群から選択される材料を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

ステップ(v)が生物学的特性、化学的特性、物理的特性、生化学的特性、またはこれらのいずれかの組み合わせである特性について試験することを含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ(v)が結合アッセイを行うことを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

結合アッセイが第 2 マトリックスを抗体またはその抗原-結合フラグメントと接触させることを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

結合アッセイが第 2 マトリックスを検出可能なタグを用いて標識した結合部分と接触させることを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

検出可能なタグが放射性同位体、発色団、および蛍光タグからなる群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

ステップ(v)が酵素活性アッセイを行うことを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

ステップ(v)が、第 2 マトリックスを細胞と接触させて標的が細胞に与える作用を観察する細胞に基づくアッセイを行うことを含む、請求項 16 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 23】

さらに、ステップ(v)で試験した特性と異なる特性について試験するステップ(v)を繰返すステップ(vi)を含み、それによって標的の異なる特性または異なる標的を同定する、請求項 16 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

さらに、

(vi)第2マトリックス上の検出した標的の位置を同定するステップ、

(vii)第2マトリックス中の検出した標的の位置に対応する第1マトリックス中のリガンド-支持体複合物またはリガンドの位置を同定するステップ、および

(viii)リガンドの化学的同一性を決定するステップを含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 25】

さらに、

(ix)同定したリガンドの複数コピーを用意するステップ、

(x)同定したリガンドのそれぞれのコピーを支持体と結合させ、それにより複数のリガンド-支持体複合物を得るステップ、

(xi)標的の複数コピーを含有する組成物と複数のリガンド-支持体複合物とを、リガンドが標的と結合して複数の標的-リガンド-支持体複合物を形成することが可能である条件下で接触させるステップ、および

(xii)標的を標的-リガンド-支持体複合物から解離させるステップを含む、請求項 24 に記載の方法。 20

【請求項 26】

さらに、質量分析計を用いて標的を同定するステップ(xiii)を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

さらに、

(vi)前のステップ(iv)の繰返しとは異なる条件下及びマトリックスを用いてステップ(iv)を繰返し、それによりそれぞれ異なる量または異なる集団の標的を有するマトリックスのセットを作製するステップ、

(vii)ステップ(vi)の各マトリックス上で標的を検出するステップ、ならびに 30

(viii)第2マトリックスおよびステップ(vi)のマトリックスの各マトリックス上の標的の量を比較するステップを含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

さらに、

(vi)第2マトリックス上の検出した標的の位置を同定するステップ、

(vii)第2マトリックス中の検出した標的の位置に対応する第1マトリックス内のリガンド-支持体複合物またはリガンドの位置を同定するステップ、

(viii)リガンドを支持体および/または第1マトリックスから解離するステップ、

(ix)リガンドを第3のマトリックスへ移動させ、それによって、支持体を第1マトリックス内に残す、ここで第3マトリックス内のリガンドの位置が第1マトリックスの位置に対応する、ステップ、ならびに 40

(x)第3マトリックス上のリガンドを検出するステップ

を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

ステップ(x)がリガンドの化学的同一性を決定することを含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

リガンドの化学的同一性を、質量分析計、Edman分解、核酸配列決定、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)、またはこれらのいずれかの組合わせを用いて決定する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 3 1】

ステップ(iv)を、少なくとも1種の標的-リガンド-支持体複合物または標的-リガンド複合物の標的と結合してそれによりリガンドを標的から解離させる競合結合剤を含有する媒質中で行う、請求項1～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 2】

競合結合剤が、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、マルタ熱菌 (*Brucella melitensis*)、エボラ・ザイル (*Ebola Zaire*) ウイルス、ボツリヌス (*Botulinum*) 神経毒素、ブドウ球菌エンテロトキシン (*Staphylococcus enterotoxin*) B、および西ナイル (*West Nile*) ウイルス、リシン、マスタードガス (*sulfur mustard*)、ソマン、サリン、タブン、VX、およびホスゲンからなる群から選択される、請求項29に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2002年4月15日出願の米国仮特許出願第60/372,091号の利益を請求する。

【0002】

発明の分野

本発明はリガンドと結合する標的を特性決定する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

アフィニティクロマトグラフィは、標的分子をサンプルから濃縮しかつ分離する一般的方法であり、標的分子とそれが結合する実在物(すなわち、リガンド)との間の特異的な3次元相互作用に基づく。リガンドは、実際任意の標的分子と結合させるために単離または作製することができる。潜在のリガンドは生物学的分子、例えばタンパク質、抗体、ペプチドなどを含む。数百万種の潜在のリガンドのライブラリーがコンビナトリアル合成技術を用いて作製され、それらの多くは当技術分野において周知である(例えば、Lamら, *Nature*, 354, 82-84 (1991)および国際特許出願W0 92/00091を参照のこと)。サンプルからの標的分子の分離を助けるために、リガンドを固相支持マトリックス、例えば個々の粒子(例えば、クロマトグラフィ樹脂ビーズ)または連続支持体(例えば、アレイ)に固定

20

30

【0004】

アフィニティクロマトグラフィは、サンプルからの標的分子の単なる分離の他に、潜在のリガンドと標的分子との間の結合相互作用を調べる手段を提供する。標的-リガンド結合の検出は挑戦に値するものであろう。リガンド-標的複合物を検出する技術は開発されており、例えば放射標識による方法および免疫学的方法が挙げられる(例えば、米国特許第5,834,318号、国際特許出願W0 01/40265、および米国特許出願第09/453,115号を参照のこと)。しかし現在利用しうる検出技術は、潜在的な欠点として、放射性標識結合を介する標的の修飾、リガンド-標的検出系相互作用からの干渉、および既存検出系の限られた数の標的だけを検出する能力をもつ。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上記の点で、当技術分野においては、標的-リガンドを検出する方法に対するニーズであって、検出のための標的の修飾を避け、リガンドから分離された標的の検出およびリガンドの同定を可能にし、そしてその生物学的、生化学的または化学的活性による標的の検出を可能にする上記方法に対するニーズが依然としてある。本発明はかかる方法を提供する。本発明のこれらおよび他の利点ならびにさらなる本発明の特徴は、本明細書に提供さ

50

れる本発明の説明から明白になるであろう。

【課題を解決するための手段】

【0006】

発明の簡単な概要

本発明は、リガンドと結合する標的を特性決定する方法を提供する。一実施形態においては、本発明の方法は、(i)1種以上のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して1種以上のリガンド-支持体複合物を形成するステップ、(ii)少なくとも1種の標的が少なくとも1種のリガンド-支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド-支持体複合物と1種以上の標的とを接触させ、それにより1種以上の標的-リガンド-支持体複合物を形成するステップ、(iii)それぞれのリガンド-支持体複合物およびそれぞれの標的-リガンド-支持体複合物が第1マトリックス内で異なる位置を有するように、リガンド-支持体複合物および標的-リガンド-支持体複合物を第1マトリックス中に固定化するステップ、(iv)少なくとも1種の標的-リガンド-支持体複合物の標的の少なくとも一部分を第2マトリックスに移動させ、それによって、標的-リガンド-支持体複合物のリガンド-支持体複合物を第1マトリックス内に残す、ここで第2マトリックス内の標的の位置が第1マトリックス内のリガンド-支持体複合物の位置に対応する、ステップ、ならびに(v)第2マトリックス上の標的を検出するステップを含む。

【0007】

あるいは、リガンドと結合する標的を特性決定する方法は、(i)1種以上のリガンドを用意するステップ、(ii)それぞれのリガンドが第1マトリックス内で異なる位置を有するように、それぞれのリガンドを第1のマトリックスに固定化するステップ、(iii)少なくとも1種の標的が少なくとも1種のリガンドと結合しうる条件下で第1マトリックス内のリガンドと1種以上の標的とを接触させ、それにより1種以上の標的-リガンド複合物を第1マトリックス内に形成させるステップ、(iv)第1マトリックス内の少なくとも1種の標的-リガンド複合物の標的の少なくとも一部分を第2マトリックスに移動させ、それによって、標的-リガンド複合物のリガンドを第1マトリックス内に残す、ここで第2マトリックス内の標的の位置が第1マトリックス内のリガンドの位置に対応する、ステップ、ならびに(v)第2マトリックス上の標的を検出するステップを含む。これらの方法はリガンドと結合する標的の特徴づけ(即ち、特性決定)を可能にする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

発明の詳細な説明

本発明は、標的分子をサンプルから分離した後、同時に検出しかつ、場合によっては、標的と特異的に結合するリガンドの同定を行う方法を提供する。特に、本発明はリガンドと結合する標的を特性決定する方法を提供する。本発明の方法は、(i)1種以上のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して1種以上のリガンド-支持体複合物を形成するステップ、(ii)少なくとも1種の標的が少なくとも1種のリガンド-支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド-支持体複合物と1種以上の標的とを接触させ、それにより1種以上の標的-リガンド-支持体複合物を形成させるステップ、(iii)それぞれのリガンド-支持体複合物および標的-リガンド-支持体複合物が第1マトリックス内で異なる位置を有するように、リガンド-支持体複合物および標的-リガンド-支持体複合物を第1マトリックス中に固定化するステップ、(iv)少なくとも1種の標的-リガンド-支持体複合物の標的の少なくとも一部分を第2マトリックス内に移動させ、それによって、標的-リガンド-支持体複合物のリガンド-支持体複合物を第1マトリックス内に残す、ここで第2マトリックス内の標的の位置が第1マトリックス内のリガンド-支持体複合物の位置に対応することを特徴とするステップ、ならびに(v)第2マトリックス上の標的を検出するステップを含む。あるいは、本発明の方法は、(i)1種以上のリガンドを用意するステップ、(ii)それぞれのリガンドが第1マトリックス内で異なる位置を有するように、それぞれのリガンドを第1のマトリックス中に固定化するステップ、(iii)少なくとも1種の標的が少なくとも1種のリガンドと結合しうる条件下で第1マトリックス内のリガンドと1

種以上の標的とを接触させ、それにより１種以上の標的-リガンド複合物を第１マトリックス内に形成させるステップ、(iv)第１マトリックス内の少なくとも１種の標的-リガンド複合物の標的の少なくとも一部分を第２マトリックスに移動させ、それによって、標的-リガンド複合物のリガンドを第１マトリックスに残す、ここで第２マトリックス内の標的の位置が第１マトリックス内のリガンドの位置に対応する、ステップ、ならびに(v)第２マトリックス上の標的を検出するステップを含む。従って、本発明の方法は、リガンドと結合する標的の特性決定を可能にする。

【０００９】

本発明は従来のリガンドおよび標的スクリーニング方法を越えるいくつかの利点を提供する。第１に、標的およびその対応するリガンドを解離後に検出することができる。さらに、標的およびそのリガンドはともに予め修飾する必要なく検出される。従って、検出系の成分とリガンド、支持体、または系の他の要素との間の相互作用が避けられる。第２に、サンプル内の全成分を第１および第２マトリックス上のユニークな位置に捕捉できるので、第２マトリックスを、複数の独立した標的の存在に対して逐次的にまたは同時にスクリーニングすることができる。本発明のさらなる他の利点は、もし所望であれば、標的の生物学的、生化学的、および化学的活性を維持できることである。移動条件を有利に制御して、結合した標的の垂集団をいずれかの時点に移動させ、標的の特定の溶出条件を確定し、または標的のイソ型を選択的に移動させることができる。実際に溶出条件を変えることにより、化学構造もしくは一次構造またはエナンチオマーの点で実質的に同一であり、したがって異なる３次元または３次構造を示す分子もしくは生物学的実在物の間を識別することが可能である。さらに、活性部位との結合に対し競合する分子を含有する移動バッファを用いて標的を第２マトリックスへ移動させることにより、標的分子上の活性部位と特異的に結合するリガンドを同定することも可能である。これらの特性は、従来の技術に記載された技術を超える重要な利点を本発明の方法に与えるものである。

【００１０】

標的

本発明のために、本明細書で使用される用語「標的」は、リガンドと結合するいずれかの生物学的、化学的、または生化学的実在物、例えば化合物、分子、ウイルスまたは細胞を意味する。標的は天然から単離されてもよいしまたは合成により作られたものでもよく、かつ性質が有機または無機（例えば、合成無機化合物または合成有機化合物）であってもよい。例えば、標的は薬物または薬物候補（小分子薬物候補など）、肥料成分、殺虫剤成分、またはそれらの誘導体、類似体もしくはエナンチオマーであってもよい。さらに、標的はいずれの原核生物または真核生物、例えば、細菌、真菌、酵母、植物、または哺乳動物に対して内因性または外因性のものであってもよい。本発明の方法にとって好適な標的は、限定されるものでないが、細胞（例えば、幹細胞または培養細胞）、細菌、ウイルス、酵母、タンパク質、ペプチド、タンパク質複合体（例えば、血液凝固因子XIIIおよびフィブリノーゲン或いは血液凝固因子VIIおよびフォン・ビルブランド因子）、プリオン、アミノ酸、核酸、炭水化物、脂質、これらのいずれかのイソ型、およびこれらのいずれかの組み合わせを含む。好ましくは、標的はタンパク質である。好適なタンパク質標的は、例えば、受容体、抗体、免疫原、酵素（例えば、プロテアーゼ）、および酵素基質を含む。さらに好ましくは、タンパク質は血漿タンパク質である。血漿タンパク質は、例えば、ブチリルコリンエステラーゼ（BChE）、フィブリノーゲン、 α -1プロテインナーゼ阻害剤、アポリポタンパク質A1（Apo-A1リポタンパク質としても知られる）、免疫グロブリン、パラオキシナーゼ、または凝固因子を含み、これらは全て非病的状態の生物の血漿中に天然に見出される。あるいは、血漿タンパク質は病的状態に関連する血漿中に（場合によっては健康な被験者の血漿中に見出されない）または薬剤（例えば医薬）を投与した結果として存在する。この点では、血漿タンパク質は感染性PrPscプリオンタンパク質であってもよい。

【００１１】

本発明の方法の標的はいずれの供給源から得てもよい。標的を含有するサンプルは土壌

抽出液などの複合溶液、空気、水、食品、環境汚染評価用塗布物、中間または最終段階の化学反応混合物などであってもよい。標的を含有するサンプルは化学または合成混合物であってもよく、そしてコンビナトリアルライブラリー中におよび／または圧力、温度などの極限条件下の有機溶媒中に存在してもよい。好ましくは、標的は生物学的体液中に存在するかまたは生物学的体液から単離される。用語「生物学的体液」は、原核生物または真核生物由来の任意の水溶液を意味する。生物学的体液は、血液、リンパ液、涙、唾液、汗、および尿のように、原核生物または真核生物から直接得ることができるものである。あるいは、生物学的体液は、醗酵ブロスおよび細胞培養培地のように、生物の細胞を培養することにより得ることができるものである。本発明の方法に使用する好適な生物学的体液は、限定されるものでないが、血液、血漿、血清、細胞ホモジネート、組織ホモジネート、ならし培地、醗酵ブロス、脳脊髄液、尿、唾液、乳汁、管液、涙、汗、リンパ液、および精液を含む。好ましくは、生物学的体液は血液である。さらに好ましくは、生物学的体液は血漿である。

10

20

30

40

50

【0012】

本発明方法の1つの利点は、標的の分子同一性の事前知識なしに、標的を生物学的、生化学的、または化学的活性に基づいて同定するおよび／または特性決定する能力である。従って、標的は生物学的活性を提示するものであってもよく、本発明の方法を実施する前に処理（例えば、熱不活化）する必要がない。例えば、第2支持材料上で増殖した細胞培養の生存率を、未知の標的（例えばウイルス）を移動させておいた位置で高めてもよいし低下させてもよい。同様に、もっと特定の細胞機能（例えば特定のタンパク質または他の細胞構成物の産生）に影響を及ぼす標的の能力を増強させるかまたは低減させて、それにより標的に、価値のある特性を与えてもよい。標的はまた生細胞であってもよく、それを第2マトリックスに移動して有毒化合物に曝し、毒素に対する細胞耐性を特性決定することができる。従って、本発明は新規の標的または未知の標的（例えば、本発明の方法を実施する前に同定されていないタンパク質）を特定の生物学的活性を用いて同定する方法を提供する。標的の第2支持体上における特有の位置を同定すると、その第1支持体上における前の位置を決定することができるので、その元の捕捉に関わったリガンドを同定することができる。

【0013】

リガンド

本発明のために、本明細書で使用される用語「リガンド」は、標的と結合するいずれかの生物学的、化学的、または生化学的実在物、例えば化合物、分子、または細胞を意味する。リガンドは天然から単離されてもよいしまたは合成により作った物質であってもよい。リガンドは原核生物または真核生物、例えば、細菌、真菌、酵母、植物、または哺乳動物に対して内因性または外因性のものであってもよい。本発明の方法にとって好適なリガンドは、限定されるものでないが、アミノ酸、ペプチド、核酸、抗体調製物（例えば、抗体フラグメント、化学修飾した抗体など）、炭水化物、糖類、脂質、有機分子、およびそれらの組合わせを含み、これらは全て、生物学的機能障害の予防または治療用の推定治療薬でありうる。

【0014】

有機分子は、例えば、薬物治療剤として一般的に使用される合成有機化合物を含む。かかる分子は、場合によっては、コンビナトリアル合成法により、またはさらに具体的には、特定分子に到達するように工夫された戦略的合成により大量生産される。同様に、有機分子はまた、自然環境から抽出されたかまたは戦略的に合成されたかに拘らず、天然物および類似体を含む。本明細書で使用される用語「有機」は、炭素と水素だけを含む分子に限定されることを意図するのではなく、むしろ生物学的起源の高分子を包含するそのさらに広い意味で使用される。

【0015】

好ましくは、リガンドはペプチドである。さらに好ましくは、ペプチドは本質的に約1～約15アミノ酸から成る。本明細書で使用される用語「ペプチド」は、少なくとも1つの

ペプチド結合を含む実在物を意味し、そしてDおよび/またはLアミノ酸のいずれを含んでもよい。理想的にはリガンドは、本質的に約2～約10アミノ酸（例えば、約2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸）から成るペプチドである。もし所望であれば、ペプチドリガンドは、コンビナトリアルライブラリーの作製に一般的に使用される技術、例えば、開裂、カップリング、組換え法または当技術分野で公知の他の手法により作製することができる（例えば、Furkaら、Int. J. Peptide Protein Res., 37, 487-493 (1991) ; Lamら、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、第5,133,866号、および第5,498,538号を参照のこと）。ペプチドライブラリーの発現はまた、Devlinら、Science, 249, 404-406 (1990)に記載されている。ペプチドライブラリーにおいては、異なる配列の別々のペプチドの数は、実施するカップリング反
10
応数、ペプチドサイズ、および利用する別個のアミノ酸数により著しく増加する。例えば、19アミノ酸のペプタペプチドへの無作為な組込みは、最高2,476,099 (= 19⁵) 個の異なる配列の個々のペプチドを生じる（Lamら、前掲）。コンビナトリアル法は直接に支持体上でのリガンドのライブラリーの作製を可能にする。典型的には、リガンドは、単一リガンドの複数コピーが各粒子（例えばビーズ）上で合成されるように支持媒体の粒子上で合成されるが、これは本発明との関係において必要なものではない。

【0016】

本発明の方法は、標的と接触させるために2種以上の異なるリガンドを提供することにより、単一標的に対する複数のリガンドを同時に同定することができる。同様に、本発明の方法は、単一サンプル中に見出される複数の標的を同時に特性決定および/または同定
20
することができる。この意味で、リガンドまたはリガンド-支持体複合物と2種以上の標的とを、少なくとも1種の標的が少なくとも1種のリガンド-支持体複合物と結合しうる条件下で接触させて、それにより1種以上の標的-リガンド複合物を形成することができる（これをさらに支持体と複合化してもよい）。

【0017】

支持体とマトリックス

本発明の一実施形態において、リガンドは支持体と結合している。本明細書で使用される用語「支持体」は、例えば当技術分野で公知の固体支持体のような、リガンドを固定化する役割を果たすいずれかの支持体マトリックスを意味する。好適な支持体は、限定されるものでないが、セルロース、アクリルポリマー、ポリアクリルアミドまたはポリヒドロ
30
キシル化メタクリレートポリマー、ポリスチレン、デキストラン、アガロース、多糖類、親水性ビニルポリマー、これらのいずれかの重合誘導体、およびこれらのいずれかの組み合わせからなるか、或いはそれらによりコーティングされた、膜、フィルター、メッシュ、または粒子、ならびにリガンドをそれに直接結合することができるかまたはリガンドをその上に合成することができるいずれかの多孔質または非多孔質のマトリックスを含む。好ましくは、支持体は不活性であって、標的および/またはリガンドとの化学反応は最小限である。特に好ましい支持材料はポリヒドロキシル化メタクリレートポリマーである。様々な樹脂が市販され入手可能であり、好ましい支持体はクロマトグラフィ樹脂ビーズなどの樹脂ビーズである。潜在的リガンドとなりうる多数の固体支持体が市販され入手可能である。あるいは、本発明の方法の1種以上のリガンドを、標準の方法を用いて第1支持体
40
上に間接的に結合するかまたは直接固定することができる（例えば、HarlowおよびLane, 「抗体 (Antibodies)」, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988) ; Biancalalaら、Letters in Peptide Science, 7(291), 297(2000) ; MacBeathら、Science, 289, 1760-1763 (2000) ; Cassら編, 「第13回アメリカペプチドシンポジウム予稿集 (Proceedings of the Thirteenth American Peptide Symposium)」, Leiden, Escom, 975-979 (1994) ; 米国特許第5,576,220号 ; Cookら、Tetrahedron Letters, 35, 6777-6780 (1994) ; およびFodorら、Science, 251(4995),

767-773 (1991)を参照のこと）。一実施形態において、リガンドを支持体の表面上に合成するが、これはペプチドライブラリーを作製する上で有利である。リガンドを化学的に支持体に結合してもよいしまたはリンカー、例えばストレプトアビジン、βアラニン、グ
50

リシン、グリシン-セリンを含有するポリマー、式 $-(CH_2)_n-$ の短鎖炭化水素、ポリエチレングリコール、 ϵ アミノカプロン酸、および $-O(CH_2)_n$ （ここで n は1~30である）を含むリンカーなどを介して結合してもよい。もし所望であれば、リガンドに1つまたは複数の異なる切断可能なリンカー、例えば、光易分解性または酸易分解性部分を結合し、分析のためにリガンド集団の選択的脱着ができるようにしてもよい。脱着したリガンドは、例えば、タンパク質およびエナンチオマー分離用の（例えば、サンプル中の標的を濃縮し、単離し、検出し、特性決定し、定量し、または同定するための）アフィニティ精製媒質として、診断治療ツールとして、化学反応の触媒および促進剤として、ならびにタンパク質の選択的安定剤として利用することができる。

【0018】

本発明の方法においては、（実施者が測定する本発明の方法のパラメーターに依存して）リガンド-支持体複合物、標的-リガンド-支持体複合物、またはリガンドを第1マトリックスに固定化する。マトリックスは、その上にまたはその中にリガンド-支持体複合物、標的-リガンド-支持体複合物、またはリガンドを固定化することができる少なくとも2次元を有するいずれかの固体材料である。マトリックス材料としては、標的を第1マトリックスから第2マトリックスへ移動することができるようなものが選択される。理想的には、第1マトリックスは標的およびリガンドに関して化学的に不活性である材料からなる。第1マトリックスは、例えば、アガロース、ポリアクリルアミド、デキストラン、セルロース、多糖、これらのいずれかの誘導体、またはこれらのいずれかの組合わせを含むことができる。あるいは、第1マトリックスは、例えば、ナイロン、綿、ポリニフッ化ビニル 20
ナイロン、シリコン(silicon)、ガラス、スチレン、ポリスチレン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、これらのいずれかの誘導体、またはこれらのいずれかの組合わせを含んでもよい。マトリックスは、ゲル、膜、またはその他の好適な表面として調製することができる。

【0019】

本発明方法との関係において、1種以上のリガンドと結合した標的（すなわち、1種以上の標的分子）の少なくとも一部分を第2マトリックスに移動させる。第2マトリックスは少なくとも2次元を有しかつそれに第1マトリックスから標的を移動させることができるいずれの固体材料であってもよい。第2マトリックスは、第1マトリックスと同じように、望ましくは、標的およびリガンドに関して化学的に不活性な材料からなる。第2マトリックスは、第1マトリックスとして使用するのに好適であるのと同じ材料で構成することができる。好ましくは、第2マトリックスは、例えば、ニトロセルロース、シリコン 30
(silicon)、スチレン、ガラス、および/またはポリニフッ化ビニルナイロンからなる。

【0020】

標的-リガンド-支持体複合物の標的の少なくとも一部分を第2マトリックスに移動させるために、第1マトリックスを、標的およびリガンドの解離を促進する溶液（例えば、「移動溶液（transfer solution）」）と接触させてもよい。移動溶液は様々な塩濃度、pH、もしくは変性能力をもつバッファー、有機溶媒、および脱イオン水から選択することができる。あるいはまたはさらに、電気勾配により標的を標的-リガンド-支持体複合物から解離することができる。移動溶液はまた、リガンド（標的-リガンド-支持体複合物のリガ 40
ンドとは異なるもの）、標的に対する補助因子、エナンチオマー特異的分子などを含有してもよい。異なる移動溶液の使用により、溶出条件の研究または特定の標的亜集団の第2マトリックスへの移動が可能になる。

【0021】

本発明の方法において使用される解離および移動条件は、第1マトリックス中のリガンドの破壊を最小限に抑えるように選択する。言換えれば、溶出および移動条件はリガンド（またはリガンド-支持体複合物）を第1マトリックスから（所望されない限り）放出してはならない。さらに、第2マトリックス上の標的の位置が第1マトリックス中のリガンドの位置に対応するように、標的を第2マトリックスに固定化する。従って、第2マトリックス上の標的を選択すると、対応するリガンドは、第1マトリックス上のその位置を介 50

して容易に決定される。

【0022】

標的および／またはリガンドの検出／特性決定

本発明の方法はさらに、第2マトリックス上の標的を検出し、それによって、リガンドと結合する標的を特性決定することを含む。本明細書で使用される用語「特性決定」およびそれに関係する用語は、標的のいずれかの明確な品質(quality)または特質(trait)の同定を意味するのであって、精密な化学的同一性、例えば標的の分子式、化学構造、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を解明することを要求するものではない。実際、標的の特性決定は主に、第2マトリックス上の標的をどのように検出するかに依存する。この点については、検出法はなんらかの確認しうる方法で標的と相互作用する分子または生物学的実在物を使用し、それにより第2支持体上の標的の存在を同定する。多数のかかる方法および材料が当技術分野では公知である。

10

【0023】

標的は、例えば、免疫学的および放射線学的アッセイを用いて直接検出することができる。ペプチド標的については放射性アミノ酸同位体を標的に組み込み、第2マトリックスをオートラジオグラフィフィルムに対し露光することにより検出することができる。同様な方法は他の化学的標的に対しても利用可能である。

【0024】

あるいは、標的を、標的の特性または活性、例えば生物学的特性、化学的特性、物理的特性、生化学的特性、またはこれらのいずれかの組み合わせである特性について試験することにより検出することができる。検出可能な生物学的または化学的反応、例えば基質の酵素的変化をもたらすいずれの生物学的または化学的特性をアッセイしてもよい。本発明の1つの利点は、標的を、標的が生物学的活性を保持する条件下で第2マトリックスに移動することにある。化学的特性、例えば、標的の化学組成に直接関係する特性を用いてもよい。言換えれば、標的を、特定の化学的サブユニットもしくは部分または化学的構造の存在により同定することができる。検出法に有用な物理的特性は、例えば、それぞれ蛍光または質量分光計を介して決定しうる分光シグナルおよび分子量を含む。検出の方法は標的を単独で検出する必要はなく、標的複合体、例えば、補助因子または酵素などの他の生物学的実在物と複合化した標的を選択的に同定してもよい。

20

【0025】

第2マトリックス上の標的の検出は結合アッセイの実施を含むものであってもよい。結合アッセイは典型的には、第2マトリックスを、基質と結合することが公知の部分と接触させることを含む。結合アッセイに用いる結合部分は、例えば、抗体またはその抗原結合フラグメント、タンパク質、またはオリゴヌクレオチドを含む。好ましくは第2マトリックスを、標的(または、もし適切であれば、標的の化学的もしくは生物学的副生物またはこれらのいずれかの断片)と結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる。好ましくは結合部分を、検出可能なタグ、例えば放射性同位体、発色団、または蛍光タグを用いて標識する。かかる結合アッセイにおいては、検出可能なタグが放出するシグナルを検出し、それにより標的存在のシグナルを送る。第2マトリックス上の標的の位置が解明されると、第1マトリックス上の対応するリガンドを同定することができる。標的を検出するための結合アッセイはさらに詳細に、例えば、HarlowおよびLane、前掲; Sambrookら、「分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」, 第2版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Haugland, 「蛍光プローブおよび研究用化学品のハンドブック(Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals)」(第9版), Molecular Probes, Eugene, OR (2002); ならびにCoicoら, 「免疫学の実験手順(Current Protocols in Immunology)」, v1-4, Wiley & Sons, Inc., New York, NYに記載されている。場合によっては、本発明の方法はさらに、過剰の未結合部分またはマーカーを検出前に除去する洗浄ステップを含んでもよい。

30

40

【0026】

あるいは、本発明の方法は、生物学的活性に基づいて標的を特性決定する酵素活性アッ

50

セイの実施を含む。標的による基質の酵素的改変を可能にする条件下で、酵素基質を第2マトリックスに供して生成物を形成させる。次いでその生成物を第2マトリックス上で検出し、それにより標的の位置を同定する。酵素活性アッセイは、例えば、Haugland(前掲)にさらに記載されている。

【0027】

細胞に基づくアッセイを実施してもよく、その場合、第2マトリックスを細胞と接触させると標的がその細胞にいくつかの観察しうる生物学的作用、例えば、細胞増殖の変化、細胞遊走の変化、細胞死、検出可能な副産物の産生などの作用を及ぼす。純粹に説明の手段として挙げるが、好ましい標的は抗細菌薬であってもよい。本発明の方法のリガンドは、抗細菌薬の潜在的活性部位と結合し、それにより抗細菌薬標的をサンプル(例えば、潜在的治療薬のライブラリー)から分離する。抗細菌薬標的を第2マトリックスに移動し、その上に細菌叢を供する。第2マトリックス上の抗細菌薬標的は殺細菌活性のゾーンにより検出される。従って本発明の方法は、抗細菌薬標的を同定することに加えて、さらに抗細菌薬標的の活性部位の特性を同定することを可能にする。

10

【0028】

様々な特性による複数の標的または単一標的の検出は、第2マトリックスへの標的の単独移動後に、複数の独立した検出手順を実施することにより達成できる。従って、本発明の方法はさらに、ステップ(v)を繰返すが、ステップ(v)で試験した特性と異なる特性について試験するステップ(vi)を含んでもよい。そのようにしてその標的の異なる特性または異なる標的を同定することができる。例えば、もしステップ(v)が、酵素がデヒドロゲナーゼである酵素活性アッセイを含むのであれば、本方法はその標的をさらに特性決定するための結合アッセイの実施を含んでもよい。あるいはまたはさらに、本発明の方法は、異なる活性を検定する第2の酵素活性アッセイを行うことを含んでもよい。

20

【0029】

標的の特性決定に加えて、標的と結合するリガンドを同定することができる。この実施形態においては、本発明の方法は、第2マトリックス上の検出した標的の位置を同定し、第2マトリックス中の検出した標的の位置に対応する第1マトリックス中のリガンドまたはリガンド-支持体複合物の位置を同定し、そしてリガンドの化学的同一性を決定することをさらに含む。もしリガンドが第1マトリックス中の支持体と複合化していれば、リガンドをリガンド-支持体複合物から解離させてさらなる特性決定を容易にしてもよい。リガンドはまた、第3マトリックス内のリガンドの位置が第1マトリックス中のリガンドの位置に対応する第3のマトリックスに(もし所望であれば、支持体を第1マトリックス中に残すために)移動してもよい。次いでリガンドを第3マトリックス上でいずれかの適当な方法、例えば本明細書に記載の方法を用いて検出してもよい。リガンドの化学的同一性は、望ましくは、例えば、質量分析計、Edman分解、核酸配列決定、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)、またはこれらのいずれかの組み合わせを用いて決定する。

30

【0030】

第2マトリックスを第1マトリックスと整列配置(alignment)し、検出した標的に対応するリガンド-支持体複合物を、いずれかの利用しうる方法を用いて同定することができる。例えば、対照ピーズまたはリガンドを第1マトリックスアレイ内に存在させて適当な整列配置に対する基準点を提供してもよい。このためには、タグ付きかまたは他の同定可能なりガンドまたは支持体(例えば、検出可能なマーカーと結合するリガンドまたは支持体)の集団を対照粒子として調製する。少数の対照を標的-リガンド-支持体複合物に含ませて、続いて第1マトリックス中に固定化する。標的および対照実在物の両方に対する検出法を採用する。対照の位置の検出により発生するシグナルをタグ付き対照リガンドまたは支持体と整列配置して、固定化した支持体を第2マトリックスとともに位置決めする。さらなるまたは代替りの整列配置法を使ってもよい。第1マトリックスアレイの配置(orientation)と第2マトリックスの配置は、第1マトリックスと第2マトリックスを整列配置する個々別々の相補的マーキングなどの物理的手段によるか、またはジグソー合せ(jigsaw fitting)などの相補的な物理的特性によるマトリックスの整列配置、によって相関

40

50

づけることができる。

【0031】

本発明の一実施形態によれば、リガンドのライブラリーを支持体に固定化し、そのリガンド-支持体複合物をアレイ中でアガロースゲルなどの多孔質第1マトリックス内に固定する。標的を含有するサンプル（例えば、溶液）を、リガンド-支持体複合物のライブラリーと接触させる。標的を含有する溶液は多孔質第1マトリックスを通して浸出し、リガンド-支持体複合物と標的の間の接触を果たす。あるいは、標的を含有する溶液を、リガンド-支持体複合物を多孔質第1マトリックス中に固定化する前に、リガンド-支持体複合物と接触させる。リガンドのある画分は標的と特異的に結合しうる。一般的に、同定されるリガンドは、専ら単一標的に対してアフィニティを示して他の近い化学的および/または構造的類似体を排除することが好ましいが、しかしこれは必要条件ではない。

10

【0032】

移動溶液は多孔質第1マトリックスを通して移動し、標的-リガンド-支持体複合物を通過し、その毛細管作用を介して、標的を標的-リガンド-支持体複合物から解離し、そして溶出した標的を多孔質第1マトリックスから第2マトリックスに運び、そこで標的は第2マトリックスにより捕捉される。標的が第2マトリックス（例えば、膜）に移動すると、標的を第2マトリックス上で同定し、検出し、そして位置決定することができる。第2マトリックス上の標的を検出しかつ第2マトリックス上の標的の位置と第1マトリックスアレイのリガンド-支持体複合物の位置とを相関させることにより、標的に対してアフィニティを有するリガンド-支持体複合物を同定することが可能になる。

20

【0033】

本発明方法との関係において、標的-リガンド複合物を繰返してプローブすることができる。例えば、各支持体上のリガンドの一部を、切断可能なリンカー（例えば酸分解性リンカー、またはレーザーを各支持体に集中照射すると切断される光易分解性リンカー）により支持体と結合する。こうして、リガンド-支持体複合物を同定するときに、リンカーの切断により或るパーセントのリガンドを支持体から多孔質第1マトリックス中に放出しうる。次いでリガンドを単離し、特性決定することができる。

【0034】

リガンドが特定の標的に対して特異性を有するものとして同定されていれば、これらのリガンドを利用して、標的を、例えばクロマトグラフィ分離を用いて捕捉し、単離し、検出し、および/または特性決定することができる。この目的のために、本発明の方法はさらに、同定したリガンドの複数コピーを用意し、同定したリガンドの各コピーを支持体と結合し、それにより複数のリガンド-支持体複合物を得ることを含む。リガンドが標的と結合して複数の標的-リガンド-支持体複合物を形成することができる条件下で、複数のリガンド-支持体複合物を標的の複数コピーを含有する組成物と接触させる。標的を標的-リガンド-支持体複合物から解離し、もし所望であれば、さらなるラウンドのスクリーニングにかける。例えば、本方法はさらに、単離されかつ精製された標的の質量分析を実施して、標的を同定しまたはさらに特性決定することを含む。同定したリガンドはまた、診断アッセイにおいて、標的を固定化するかまたは標的を選択的に移動させるために、および擬（pseudo）受容体または合成受容体として利用することができる。（例えば、Still, A cc. Chem. Res., 29, 155-163 (1996)を参照のこと）。さらに、リガンドそれ自身を治療薬、触媒などとして利用することができる。

30

40

【0035】

その他の考察

本発明は、標的の生物学的、生化学的、または化学的活性に基づいて、リガンドを用いて標的を検出し、標的と結合するリガンドを同定し、そしてサンプル由来の未知のリガンドおよび新規の標的（潜在的に未知のリガンドおよび公知または新規の標的の両方を含む）を特性決定する方法を提供する。本発明はまた、生物学的および化学的実在物のスクリーニングを最適化する方法も提供する。

【0036】

50

本発明の方法を用いて、標的（または任意の分子）を第2マトリックス（または任意のマトリックス）に移動させる好ましい条件を決定することができる。例えば、本発明の方法は、前のステップ(iv)の繰返しと異なる条件下及びマトリックスを用いてステップ(iv)を繰返すステップ(vi)を含んでもよい。この点については、標的を第2マトリックスに移動するために用いる移動溶液を変更して塩濃度、pH、変性体含量、特異的競合分子などを変えてもよい。次いで溶出を異なる条件下で繰返し、それぞれ異なる量または異なる集団の標的を有する1セットのマトリックスを作製する。本方法はさらに、ステップ(vi)のそれぞれのマトリックス上の標的を検出するステップ(vii)、および第2マトリックス上の標的の量とステップ(vi)のそれぞれのマトリックスを比較するステップ(viii)を含む。また、本発明の方法のこの実施形態を用いて、リガンドが標的から解離する好ましい条件、バルクアフィニティ精製のための可能な溶出条件を決定し、または様々なリガンドの優先順序を付け、そしてそれらの結合特性への洞察を得ることもできる。

10

【0037】

さらに、本発明の方法は、標的および/またはリガンドの結合特性を研究する手段を提供する。例えば、本方法のステップ(iv)を、少なくとも1種の標的-リガンド-支持体複合物または標的-リガンド複合物の標的と結合する競合結合剤を含有する媒質中で実施して、それにより標的を第1マトリックス内のリガンド-支持体複合物またはリガンドから解離させてもよい。「競合結合剤」は、標的と結合しそれでいてリガンドでないいずれかの生物学的または化学的実在物を意味する。好ましくは、競合結合剤は、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)、マルタ熱菌(*Brucella melitensis*)、エボラ・ザイル(*Ebola Zaire*) ウイルス、ボツリヌス(*Botulinum*) 神経毒素、ブドウ球菌エンテロトキシン(*Staphylococcus enterotoxin*) B、および西ナイル(*West Nile*) ウイルスからなる群から選択される。競合結合剤はまた、これらのいずれかの部分または断片であってもよい。同様に、競合結合剤は、リシン、マスタードガス、ソマン、サリン、タブン、VX、およびホスゲンからなる群から選択してもよく、またはこれらのいずれかの断片を含むものであってもよい。競合結合剤を第1マトリックスに加えることにより、リガンドと標的の間の相互作用（例えば、結合アフィニティまたは特異性）を特性決定することができる。潜在的基質の存在下での標的の競合的溶出もアンタゴニストおよびアゴニストの活性部位の同定を可能にする。

20

【0038】

本発明の方法はまた、サンプルから構造的イソ型(isoforms)およびエナンチオマーを分離するために有用である。例えば、コンフォメーションが異なる型の標的の分離は、標的のただ1つの型の溶出を可能にする条件下で、標的を第2マトリックスに移動させることにより実施することができる。さらに、標的の1つのイソ型に特異的である検出法を採用することができる。次いで標的の異なる型と結合するリガンドを同定することができる。かかるリガンドは、誤って折り畳まれた、または翻訳後修飾された、タンパク質の除去、突然変異標的の同定などを含む広範囲の局面において、イソ型を分離することができる。

30

【0039】

さらに、サンプル中の標的の複合型を、移動条件または複合タンパク質に適した検出系を利用することにより同定し、分離し、または定量することができる。同様に、第2のマトリックスを逐次的に複合体の1つのメンバーについてプローブ（精査）し、そして複合体の第2のメンバーについて再プローブすることができる。もし所望であれば、タンパク質複合体をサンプルから精製するのに有用である、複合体の複数のメンバーと結合するリガンドを同定することができる。本発明の方法はまた、サンプル中の標的の量を定量するために、異なる条件下で細胞が発現するタンパク質の相違を検出するために、または疾病状態対正常状態に関連する生物学的サンプル（例えば、血漿またはその他の生物学的体液）中に存在するタンパク質を分離しかつ検出するために利用することができる。

40

【0040】

以下の実施例はさらに本発明を説明するものであるが、勿論、本発明の範囲をいかなる点においても限定するものではないと解釈されるべきである。

50

【実施例】

【0041】

実施例 1

本実施例は本発明の方法の好ましい実施形態を説明する。

【0042】

ペプチドリガンドのライブラリーをクロマトグラフィ樹脂ビーズ上に合成または固定化し、コンビナトリアルビーズライブラリー（リガンド-支持体複合物のライブラリー）を作製する。次いで、その樹脂ビーズを標的含有混合物（すなわち、サンプル）と接触させ、そして次のように多孔質ゲルマトリックス（すなわち、第1マトリックス）に固定化する。ゲル系は層で構成される。1%アガロースゲル基材をトレー上に注いで、これを「第1マトリックス」の部分とする。アガロースゲル基材はゲル系に安定性と堅牢度を与え、これにより、繰返して操作することかつ取扱うことを可能にする。第1マトリックスが固化するがまだ室温に達していないうちに、単層のコンビナトリアルビーズライブラリーによってアガロースゲル基材の上面を覆うのに十分な容積（一般的にベースに用いた容積の10分の1）の0.5%低融点（LMT）アガロースを、よく分離した単層のアガロースゲル基材の表面を実質的に覆うのに十分である容積（この例の0.5% LMTアガロースの容積の10分の1）のコンビナトリアルビーズライブラリーと混合する。標的-リガンド-支持体複合物をLMTアガロースにほぼ40℃の温度にて加える。混合物をしばらく激しく混合し、そしてアガロース基材層上にすぐに注ぐ。標的-リガンド-支持体複合物を含有する層をアガロースゲル基材の表面上に広げる。こうして、2次元アレイでアガロースゲル基材上に固定され、極薄層のLMTアガロースにより覆われたビーズからなる標的-リガンド-支持体複合物の単層が得られる。ゲル系は固化するまで4℃に保つ。

【0043】

ゲル系を、移動バッファのタンク上に掛けられた吸着紙（典型的には3MM紙）上に置く。吸着紙は、移動バッファが紙を通して吸上げられるように配置する。ゲル系は標的-リガンド-支持体複合物が上側に向くように配置する。タンパク質が結合しうる支持体（すなわち、第2マトリックス）（典型的には、ニトロセルロースまたはポリニフッ化ビニリデン（PVDF）膜）をゲルの表面に配置する。ゲル系と第2マトリックスの間のいずれの気泡も、膜とゲル系の上でピペットを回転することにより取除く。2層の吸着紙を膜の上面に配置し、次いで数層の紙タオルを置く。ゲル、膜、および紙のタイトな並置を保証するために十分な重量を上部に置く。移動（即ち、転写）は、適当な量の標的タンパク質がビーズから膜へ移動するのに十分な時間、続行する。このような手順の結果、タンクからゲル系および膜全体を通して、上部の吸着紙中へのバッファの均一な毛細管移動が得られる。この方法により、標的タンパク質はビーズから膜へ運ばれる。検出系が発生するシグナル、例えばX線フィルム上で捕捉される化学発光シグナルを第1支持体と整列させると、標的と結合したリガンドをもつビーズを明確に同定することができる。

【0044】

移動バッファの組成は所望の用途に最も適した条件に合せて調製することができる。一具体例においては、フィブリノーゲンを、ストリンジェンシーを増加させる条件下で標的-リガンド-支持体複合物から溶出させた。ある特定の標的-リガンド-支持体複合物は異なる条件下でシグナルを発生し、標的タンパク質のリガンドとのアフィニティは異なる移動バッファを用いて決定できることを実証した。標的タンパク質を、標的タンパク質の活性が保存される溶出条件を用いて、第2マトリックスへ移動することが可能である。標的タンパク質を、異なるバッファを逐次的にまたは平行的に用いて第2マトリックスへ移動することができる。

【0045】

標的タンパク質を第2マトリックス上で捕捉すると、個々のタンパク質の同一性を複数の技術を介して決定することができる。典型的な検出方法は、ウェスタンブロットで用いる技術などの抗体技術を含むが、放射性標識プローブおよび酵素活性を検出アッセイとして利用することもできる。

【0046】

実施例 2

本実施例は、アフィニティークロマトグラフィーで樹脂を使用することができる、精製オステオプロテグリンと結合するリガンドを同定する、本発明の方法の使用を例示する。

【0047】

リガンド-支持体複合物（アミノ酸末端位置のアミノ酸がD-イソ型であることが既知である6量体ペプチドリガンドを保持するポリメタクリレートビーズ；5mg）のライブラリーを、1%カゼイン、3%ウシ血清アルブミンの200 μ lとともに2時間22 $^{\circ}$ Cでインキュベートして非特異的結合部位をブロックした。オステオプロテグリンリガンドタンパク質（OPGL、330 μ g/mlの3 μ l）をブロッキングバッファーに加え、そしてビーズを15時間4 $^{\circ}$ Cで揺りながらインキュベートした。ペプチドリガンドのアミノ末端のアミノ酸が16種の天然アミノ酸の1種（システイン、グルタミン、およびメチオニンを除く）であるリガンド-支持体複合物サブライブラリーを用いて、別々の反応を実施した。インキュベーションの後、サブライブラリーを20mM Tris、500mM NaCl、0.1% Tween-20（TTBS）、pH7.2の50mlを用いて別々に洗浄し、非結合および弱く結合した標的タンパク質を除去した。それぞれのサブライブラリーのほぼ1mgを0.5%低融点アガロース（LMP）の50 μ lと混合した。LMPアガロース-ビーズ混合物を、ゲル系として予め形成した1%アガロース基材（10ml）の上面にスポットした。LMPアガロース-ビーズ混合物を4 $^{\circ}$ Cで約15分間硬化させた。硬化の後、ゲル系を、移動バッファー（4MグアニジニウムHCl（GuHCl）、pH 5）により予め湿らせた濾紙片の上に置き、濾紙片の末端を移動バッファーで満たした槽に漬けた。

【0048】

移動バッファーにより予め湿らせてゲル系のサイズに切断したニトロセルロース膜片（すなわち、第2マトリックス）をゲル系の上面に敷いた。2片の予め湿らせた濾紙を膜の上面に置き、そして数片の乾いた紙タオルを濾紙の上面に置いた。300g重量を装置の上部に置き、移動を18時間22 $^{\circ}$ Cで進行させた。

【0049】

タンパク質を膜へ移動した後、膜をゲルから分離し、TTBSバッファーを用いて濯ぎ、そして5%脱脂粉乳を用いて2時間室温で膜のインキュベーションにより非特異的結合部位をブロックした。標的タンパク質を、ポリクローナルウサギ抗マウスOPGL抗体を用いて検出した。膜をTTBSを用いて洗浄し、一次抗体の結合を、ヤギ抗ウサギHRP-標識二次抗体を用いて検出した。結合したタンパク質が膜上に位置するオートラジオグラフィーフィルム上にスポットを生じる、強化された化学発光基質を用いて、標的タンパク質を検出した。フィルムを元のゲルと整列させて、フィルム上のスポットと並びが一致するビーズをゲルから曲がった針を使って拾った。ビーズを70 $^{\circ}$ Cに加温して汚染アガロースを融解除去し、そして8MグアニジニウムHCl、メタノールおよび水を用いて洗浄した。ビーズを上記のOPGLタンパク質に再び曝し、再移動し、そして整列した。これらの二度目の整列を行ったビーズを拾い、洗浄し、そしてリガンドの配列決定をABIシーケンサーで実施した。全体で数万個のリガンド（全てN末端位置にDアミノ酸およびC末端位置にAlaを有する）から次の配列を得た：LVTWPA（配列番号1）、YDYHELA（配列番号2）、LHHPIA（配列番号3）、RANKTQA（配列番号4）、およびTTPSKKA（配列番号5）。

【0050】

この実施例は、予め定めた標的タンパク質に対するリガンドを同定し、次いでリガンドのアミノ酸配列を解明する、本発明の方法の使用を実証する。

【0051】

実施例 3

本実施例はその生物学的活性による標的タンパク質の検出を例示する。新規タンパク質の存在および活性を、タンパク質の同一性もその対応するリガンドの同一性も未知の条件下で、生物学的活性を使用して検出することができる。生物学的、生化学的、または酵素活性に基づくアッセイを実施するために、活性を維持する条件下で標的タンパク質を第2マトリックス（この例では膜）に移動しなければならない。

10

20

30

40

50

【0052】

クロマトグラフィ樹脂ビーズに結合したプロカインイミド (PAM) リガンド上に BChE (2 mg/ml) を固定化し、標的-リガンド-支持体複合物を形成させた。次いでクロマトグラフィ樹脂ビーズを 0.5% LMP アガロース中に固定化し、1% 正規アガロースゲル基材の上面に注いで、上記のように、ゲル系を形成させた。LMP アガロース-ビーズ混合物を 4 で 15 分間硬化させた。固化後に、ゲル系を移動バッファー (0.5M リン酸バッファー / 0.5M NaCl、pH 7.2) を用いて予め湿らせた濾紙片上に置き、その末端を移動バッファーを用いて満たした槽に漬けた。移動バッファーを用いて予め湿らせゲルサイズに切断したニトロセルロース膜片をゲル系の上面に敷いた。2 片の予め湿らせた濾紙を膜の上面に置き、そして数片の乾いた紙タオルを濾紙の上面に置いた。100g 重量を装置の上部に置き、装置を一夜 22 に放置した。

10

【0053】

タンパク質の移動後に、ニトロセルロース膜をゲルから分離した。第 2 のニトロセルロース膜片を移動バッファーに漬けて陰性対照として用いた。コリンエステラーゼ基質溶液 (BTC = 5mmol/l ヨウ化ブチリルチオコリン、0.25mmol/l 5,5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸、pH 7.2) を、未移動タンパク質を検出するために、膜およびゲル系上にピペティングした。膜およびゲル系を暗所で 22 で 1 時間インキュベートした。標的タンパク質が移動した膜上に、黄色が発色した。対照膜上に黄色は観察されなかった。ゲル系の樹脂ビーズ上に、いくつかの残余の標的タンパク質が残り、これらの条件下で全ての標的タンパク質が移動するのではないことを示した。

20

【0054】

この実施例は、生物学的活性を試験することにより、標的タンパク質を第 2 マトリックス上に検出しかつ特性決定することが可能であることを実証した。特に、移動膜上の黄色の存在は、BChE がゲル系の樹脂ビーズから移動して膜上に捕捉され、活性を保持することを示した。

【0055】

実施例 4

本実施例は、タンパク質がリガンドから溶出する条件を確定するための本発明の方法の使用を例示する。溶出特性の理解は、標的を複合物混合物からバルク精製するためのアフィニティ精製プロセスの開発に役立つ。特定標的と結合する複数の潜在的リガンドのうち、結合して優先的条件下で溶出するリガンドは、複数の溶出条件を逐次的または平行して試験することにより検出する。本実施例においては、フィブリノーゲンをリガンド-支持体複合物のライブラリーから複数の条件下で溶出させた。様々なリガンドが様々な条件下で上記タンパク質を溶出することが見出された。

30

【0056】

Ala-ε アミノカプロン酸 (EACA) スペーサーの付いた 650-M アミノ ToyoPearl 樹脂 (Toso haas BioScience) 上に合成した 6 アミノ酸のリガンドを有するリガンド-支持体複合物のライブラリー (樹脂ビーズ、32mg) を 20% メタノールを用いて洗浄し、1 時間 20mM クエン酸バッファー中で膨張させた。樹脂ビーズを、1% (w/v) カゼイン / 3% (w/v) ウシ血清アルブミンを用いて 1 時間 22 でブロックした。樹脂ビーズを 3.2ml ヒト低血小板血漿とともに 1 時間 22 でインキュベートし、150mM NaCl、20mM クエン酸、pH 7.12 の 50ml を用いて洗浄した。ライブラリー (320 μg) の一部分を 0.5% 低融点 (LMP) アガロースの 240 μl と混合し、これを続いて 1% アガロース基材 (すなわち、第 1 マトリックス) の 30ml 上に広げた。第 2 マトリックスへの標的タンパク質の移動を、実施例 1 ~ 3 に記載した通り、PVDF 膜上へ実施した。最初の移動バッファーは 0.45M NaCl / 20mM クエン酸、pH 7.2 を含むものであり、このバッファーをゲル系および PVDF 膜と 24 時間接触させた。最初の移動後にゲル系を装置から取除いて、第 2 および第 3 ラウンドの標的移動を実施した。新しい膜をゲル系の上面に置き、移動バッファー (1.0M NaCl (第 2 移動) または 1.5M NaCl (第 3 移動) / 20mM クエン酸、pH 7.12) に 24 時間曝した。第 3 移動操作の後に、最後の移動手順を実施し、この手順ではゲル系および新しい膜を 6M GuHCl に 8 時間曝した。全ての移動手順の

40

50

完了まで、膜を湿ったまま4 で保存し、その時点で全ての膜を同時に処理した。

【0057】

それぞれの膜を5%脱脂粉乳を用いて2時間22 でブロックした。次いで膜を、1:8000に希釈したポリクローナルヒツジ抗ヒトフィブリノーゲン抗体 (Affinity Biologicals) とともに1時間22 でインキュベートした。膜をTTBSを用いて洗浄し、そして1:8000に希釈した第2のHRP-結合ヒツジ抗ヒトフィブリノーゲン抗体との1時間22 でのインキュベーション後に移動タンパク質を検出した。標的タンパク質と結合した抗体からのシグナルは、増強された化学発光西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 基質 (10分間インキュベートした) を用いて検出し、そしてX線フィルム上に捕捉された。フィルムをゲル系と整列し、対応するリガンド-樹脂ビーズをゲル系から拾った。樹脂ビーズを洗浄し、結合したリガンドの配列を決定した。スクリーニングした樹脂から次の配列を得た: IAIWVA (配列番号13)。次の他のアミノ酸配列も同定した: AREADVA (配列番号6); YEYARP (配列番号7); WDGATY (配列番号8); FDPHWS (配列番号9); FSDVED (配列番号10); FEYAPS (配列番号11); およびHGTWEP (配列番号12)。

10

【0058】

この実施例は、予め定めた標的タンパク質に対するリガンドを同定するための本発明の方法の使用を実証する。様々なリガンドが様々な条件下でタンパク質を溶出することを見出し、これはアフィニティークロマトグラフィプロトコルにおいて同定したリガンドを用いるための価値ある情報を提供する。

【0059】

20

実施例 5

本実施例は、疾患に関連するタンパク性病原因子、すなわち感染性海綿状脳症に関連するプリオンタンパク質、と結合するリガンドを同定する方法を例示する。

【0060】

2 アミノ酸長のリガンドを有する650-Mアミノポリメタクリレート樹脂ビーズのライブラリー (5mg) を1% (w/v) カゼインとともに18時間4 で揺りながらブロックした。PBSを用いて1:10に希釈した正常なハムスター脳ホモジネートを0.5% (w/v) ザルコシル (sarkosyl) と30分間インキュベートした。処理した材料の1:10希釈物 (1ml) を、ブロックしたリガンド結合樹脂ビーズとともに1時間22 で揺りながらインキュベートした。標的-リガンド-樹脂ビーズ複合物の一部分 (90 µl) を0.5% LMPアガロース800 µlと混合し、1%アガロース9mlを含有するゲル基材 (すなわち、第1マトリックス) 上に注いだ。LMPアガロース-ビーズ混合物を4 でほぼ15分間硬化させてゲル系を形成させた。第2マトリックス (PVDF膜) への標的タンパク質の移動を、実施例1~3に記載の通り6MグアニジウムHCLを移動バッファーとして用いて実施した。移動反応は一夜進行させた。移動後、PVDF膜をゲル系から分離し、5%脱脂粉乳を用いてブロックした。プリオンタンパク質標的 (PrPc) を、3F4 (PrPcの変性型に対して特異的な抗体) を一次抗体として用いて検出した。HRP-標識ヤギ抗マウス二次抗体を、増強された化学発光基質と一緒に用いて膜上に結合したPrPcを検出し、そのシグナルをX線フィルム上に捕捉した。フィルムをゲル系と整列し、対応するリガンド結合樹脂ビーズを回収し洗浄した。リガンドの配列決定を行ってアミノ酸配列を同定した。

30

40

【0061】

この実施例は、疾患に関わるタンパク質と結合するリガンドを同定するための本発明方法の能力を実証する。同定したリガンドを使用して様々な複合物混合物 (例えば、生物学的サンプル) 中の標的の存在を診断し、または疾患の原因となる標的タンパク質を混合物から除去することができる。

【0062】

実施例 6

本実施例は、リガンド-支持体複合物ライブラリーとサンプルとの1回のインキュベーションを複数の検出ステップと組合わせて実施することによる複数の標的の同定を例示する。

50

【0063】

次の樹脂を用いた：650-MアミノToyoPearl樹脂（Tosohaas Bioscience）上に直接合成されたフィブリノーゲン-結合リガンド（GPRPGG（配列番号23））を含む樹脂、緑色アガロースPIKSIT（登録商標）ビーズ（API-結合の対照）からなる α -1プロテアーゼ阻害剤（API）-結合樹脂、およびN-末端位置にD-アミノ酸を含む6量体リガンドを有する650-Mアミノ樹脂（Tosohaas BioScience）ライブラリーからなるリガンド-支持体複合物樹脂。GPRPGG（配列番号23）樹脂（2.5mg、予め膨張させた）および6量体ライブラリー樹脂（2mg、予め膨張させた）を、別容器中で1%（w/v）カゼイン/3%（w/v）ウシ血清アルブミン（BSA）を用いて3時間22℃でブロックし、その後ブロッキングバッファーを廃棄した。ヒト低血小板血漿（20ml）をGPRPGG（配列番号23）樹脂および6量体ライブラリー樹脂に加え、18時間4℃で揺りながら結合させた。樹脂を50ml TTBSを用いて洗浄し、50 μ l TTBSを洗浄後のチューブ内に残した。それぞれの洗浄した樹脂の一部分（5 μ l）および純粋なAPIとブレインキュベートした緑色アガロースPIKSIT（登録商標）ビーズ2.5mgを別々に、0.5% LMPアガロース330mlと混合した。3つの樹脂混合物をそれぞれ、GPRPGG（配列番号23）樹脂、6量体ライブラリー樹脂、および緑色アガロースPIKSIT（登録商標）樹脂が、ゲル基材上で重なり合わない領域に位置するように、1%アガロース基材上にスポットした。標的タンパク質を、次の条件下で連続溶出によって、異なるニトロセルロース膜上に移動させた：0.2M NaCl/20mMクエン酸、pH 7.12、8時間；1.5M NaCl/20mMクエン酸、pH 7.2、15時間；2M NaCl/20mMクエン酸、pH 7.2、8時間；および4M GuHCl、pH5、13時間。膜は処理するまで4℃で保存した。

10

20

【0064】

全ての膜を同時に処理した。膜を最初に5%脱脂粉乳で2時間22℃でブロックした。ヒツジ抗ヒトフィブリノーゲンポリクローナル抗体を一次抗体として用いてフィブリノーゲン標的タンパク質を検出した。その後の洗浄ステップの後に、膜を、一次抗体と結合するHRP-結合ヒツジ抗ヒトフィブリノーゲン抗体を用いてプローブした。シグナルをオートラジオグラフィフィルム上で、HRP用の増強化学発光基質を用いて発色させた。

【0065】

フィブリノーゲン検出後、膜をTTBSと50℃でインキュベートして、結合した抗体を取り外した。膜を再ブロックし、ヤギ抗ヒト α -1アンチトリプシンポリクローナル抗体に曝した。その後の洗浄ステップの後に、膜をHRP-結合ウサギ抗ヤギIgGポリクローナル抗体を用いてプローブし、得られるシグナルを増強化学発光HRP基質を用いて検出し、X線フィルム上で捕捉した。

30

【0066】

この実施例においては、様々な血漿タンパク質と結合することが知られるリガンドを、標的タンパク質を含有する血漿サンプルに曝した。使用した検出法は、フィブリノーゲンとAPIの両方が同時にゲル系から膜に移動することを実証した。さらに2種のタンパク質のうちの1種だけがそれぞれの樹脂ビーズと結合した。従って、この実施例は、膜上の複数のタンパク質が、その後の取り外し（stripping）および再プローブ（re-probing）により、検出されることを実証する。

【0067】

実施例7

本実施例は、優先的に生物学的体液サンプル中の標的タンパク質APIと結合するリガンドを同定するための本発明方法の使用を例示する。

【0068】

リガンド-支持体複合物ライブラリーを、N末端にD-アミノ酸を含むペプチド6量体のライブラリーをToyoPearl 650-Mアミノ樹脂（Tosoh BioScience）上に作製することによって得た。リガンド-支持体複合物ライブラリーのほぼ10mgを洗浄し、膨張させ、洗浄し、そして等容積の平行バッファー（EQバッファー；140mM NaCl、20mMクエン酸、pH 7.4）を用いて希釈した1ml血漿とともに、BioRadカラム中で1時間室温にてタンブラー攪拌しながらインキュベートした。BioRadカラムを排水し、そして樹脂ビーズを10カラム容積のEQバ

50

ッファーを用いて洗浄した。樹脂ビーズ（この時点で、標的-リガンド-支持体複合物である）を1ml EQバッファー中に再懸濁した。樹脂ビーズ約10 μ lをLMPアガロース900 μ lと、実施例1～3に記載の通り混合した。樹脂-アガロース混合物を、固化した通常のアガロース基材（第1マトリックス）の表面上に広げてゲル系を形成させた。樹脂-アガロース混合物を4で固化させた。第2マトリックスとして膜を用いる移動系を実施例1～3に記載の通り調製した。第2マトリックス膜への血漿タンパク質の移動は一夜室温にてEQバッファー+2M NaClを用いて行った。膜を、 α -1アンチトリプシン（API）と結合するHRP-結合ポリクローマルヤギ抗ヒト α -1アンチトリプシン抗体（ICN）を用いて処理した。膜上のAPIタンパク質の位置を決定した。膜上のAPIタンパク質の位置と並びが一致するゲル系中の樹脂ビーズを選択し、洗浄し、そして血漿とともに再インキュベートした。標的-リガンド-支持体複合物から膜への血漿タンパク質の移動およびAPI標的タンパク質の検出を繰返し、潜在的陽性を確認しかつ標的タンパク質と結合したリガンド-樹脂ビーズ複合物を明確に同定した。陽性樹脂ビーズを集めて、清浄にし、そして結合したリガンドをABIシーケンサー上でEdman分解により配列決定した。数個の配列を確定し、そしてフィブリノーゲンおよびアポ-A1リポタンパク質を枯渇させておいた血漿からAPIを精製するための分取用規模の樹脂として使用するために、該配列を合成した。これらの中から次の配列を同定した：KFQARA（配列番号14）；KWSITN（配列番号15）；KSPRWP（配列番号16）；およびAKVSKG（配列番号17）。同定したリガンドがAPIと優先的に結合することを示された。

10

【0069】

この実施例により実証されるように、本発明の方法を用いて標的タンパク質に特異的なリガンドをペプチドライブラリーから同定することができる。同定されたりガンドは予め定めた標的タンパク質を優先的に捕捉することから、大規模な標的タンパク質精製のために適する。

20

【0070】

実施例 8

本実施例は、タンパク質複合体、すなわち因子VIII（fVIII）およびフォン・ビルブラント因子（vWF）と結合するリガンドの同定を例示する。

【0071】

ペプチド6量体のライブラリーを提示するリガンド-支持体複合物約10mgを実施例7の通り調製した。ペプチドライブラリーを提示する樹脂ビーズを、等容積のEQバッファーを用いて希釈した1ml血漿と一緒にBioRadカラム中で1時間室温にてタンブラー攪拌しながらインキュベートした。BioRadカラムを排水し、濯ぎ、そして樹脂ビーズを10カラム容積のEQバッファーを用いて洗浄した。樹脂ビーズ（この時点で、標的-リガンド-支持体複合物）を1ml EQバッファー中に再懸濁した。次いで樹脂ビーズ約10 μ lをLMPアガロース900 μ lと合わせ、アガロース基材全体に広げた。樹脂-アガロース混合物を硬化させてゲル系を形成させ、そして標的タンパク質移動手順を実施例1～7に記載の通り設定した。標的-リガンド-支持体複合物から第2マトリックス（膜）への標的タンパク質の移動は一夜室温にてEQバッファー+2M NaClを用いて進行させた。膜を、HRP-標識ポリクローマル抗ヒトvWF抗体（Enzyme Research Labs）を用いて1時間処理し、そして膜上のvWF標的タンパク質の位置を、標準ECL+化学発光基質を用いて決定した。膜上の標的タンパク質の位置と並びが一致する樹脂ビーズを選択し、洗浄し、そして血漿とともに再インキュベートした。第2マトリックス（膜）への標的タンパク質の移動および膜上の標的タンパク質の検出を繰返し、潜在的陽性を確認しかつvWFと結合したリガンドを含む樹脂ビーズを明確に同定した。陽性樹脂ビーズを集めて、清浄にし、そして結合したリガンドをABIシーケンサー上でEdman分解により配列決定した。数個の配列を確定し、分取用規模の樹脂として使用するために、該配列を合成した。さらに、無濾過の血漿とインキュベートした樹脂ビーズを96ウエルマイクロタイタープレートのウエルに移し、Coatest fVIII活性アッセイキット（Chromagenix）を用いてインキュベートした。色変（黄色）により同定されるfVIIIと結合したリガンドを提示する樹脂ビーズを選択し、さらに評価を行った。vWFおよびfVIIIを同時精製する数個のリガンドが同定され、それらはFSYDED（配列番号18）、LEDnal

30

40

50

、EE（配列番号19）、WEEPEQ（配列番号20）、EADnaLED（配列番号21）、およびYVDEDD（配列番号22）を含む。

【0072】

この実施例は、タンパク質複合体を複数の検出法を用いて特性決定し、生物学的サンプルから除去する本発明の方法の実施形態を例示する。

【0073】

刊行物、特許出願および特許を含む本明細書に引用された全ての参考文献は、あたかもその各々が個々にかつ具体的に参考として取り込まれ、その全体が本明細書に記載されていたかのように、それと同じ程度に、参考として本明細書に取り込まれるものとする。

【0074】

本発明を説明する文脈において（特に、添付の特許請求の範囲において）、用語「a」、「an」および「the」の使用および類似の参照は、本明細書において特に断らない限りまたは文脈との明らかな矛盾がない限り、単数および複数の両方を包含すると解釈されるべきである。用語「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」および「含有する（containing）」は、特に断らない限り、制限がない（open-ended）用語（すなわち、「含むが、しかしそれに限定されない」を意味する）と解釈されるべきである。本明細書における数値範囲の記載は、本明細書で特に断らない限り、その範囲内に入るそれぞれ別々の値を個々に参照する手間を省く方法として使用することを意図するだけであり、各個別の値は、あたかもその値が個別に本明細書に記載されていたかのように本明細書に組み入れられているものとする。本明細書に記載の全ての方法は、本明細書で特に断らない限りまたは明らかに文脈との矛盾がない限り、任意の好適な順序で行うことができる。本明細書に記載される任意のおよび全ての具体例または例示の用語（例えば「のような（such as）」）の使用は、単に本発明をより明らかにすることを意図するのであり、別段の請求がない限り、本発明の範囲の限定を示したものではない。本明細書中の用語はいずれも、本発明の実施に必須であるクレーム中になく構成を示す用語であると解釈されるべきでない。

【0075】

本発明の好ましい実施形態を、本発明者らが知る本発明を実施するための最良の形態を含めて本明細書に記載した。これらの説明を読めば、当業者には、これらの好ましい実施形態の変形が明らかになるだろう。本発明者らは、当業者がかかる変形を適宜使用することを予想し、また本発明者らは、本明細書に具体的に記載したもの以外の発明が実施されることを意図する。従って、本発明は、本明細書に添付された特許請求の範囲に記載された発明対象の、適用法律により認められる全ての変更物および均等物を包含する。さらに、その全ての可能な変形における上記構成のいずれの組み合わせも、本明細書で特に断らない限りまたは文脈との別段の明らかな矛盾がない限り、本発明に包含される。

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> American National Red Cross

<120> METHOD FOR DETECTING LIGANDS AND TARGETS IN A MIXTURE

<130> 221007

<150> US 60/372,091

<151> 2002-04-15

<160> 23

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 1

Leu Val Thr Val Trp Pro Ala
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

Tyr Asp Tyr His Glu Leu Ala
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 3

Leu His His Pro Pro Ile Ala
1 5

10

20

30

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 4

Arg Ala Asn Lys Thr Gln Ala
1 5

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 5

Thr Thr Pro Ser Lys Lys Ala
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 6

Ala Arg Glu Ala Asp Val Ala
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 7

Tyr Glu Tyr Ala Arg Pro
1 5

<210> 8

10

20

30

40

<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 8

Trp Asp Gly Ala Thr Tyr
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 9

Phe Asp Pro His Trp Ser
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 10

Phe Ser Asp Val Glu Asp
1 5

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 11

Phe Glu Tyr Ala Pro Ser
1 5

<210> 12
<211> 6

10

20

30

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 12

His Gly Thr Trp Glu Pro
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Synthetic

<400> 13

Ile Ala Ile Trp Val Ala
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Synthetic

<400> 14

Lys Phe Gln Ala Arg Ala
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

30

<220>
<223> Synthetic

<400> 15

Lys Trp Ser Ile Thr Asn
1 5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT

40

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 16

Lys Ser Pro Arg Trp Pro
1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Synthetic

<400> 17

Ala Lys Val Ser Lys Gly
1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Synthetic

<400> 18

Phe Ser Tyr Asp Glu Asp
1 5

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is naphthylalanine

<400> 19

Leu Glu Asp Xaa Glu Glu
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 20

Trp Glu Glu Pro Glu Gln
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is naphthylalanine

<400> 21

Glu Ala Asp Xaa Leu Glu Asp
1 5

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 22

Tyr Val Asp Glu Asp Asp
1 5

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 23

Gly Pro Arg Pro Gly Gly
1 5

10

20

30

40

【 国際調査報告 】

REVISED
VERSION

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/11799

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC(7) : G01N 33/00; A61K 38/04; C07K 5/00; C12Q 1/37, 1/70												
US CL : 435/5, 7, 23, 24; 530/327, 328; 436/500, 501;												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/5, 7, 23, 24; 530/327, 328; 436/500, 501;												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	RACUSEN et al. Microscale, Filtration-Type Binding Assay for Studying Myosin-Erythrocyte Protein 4.1 Interactions. Analytical Biochemistry. 01 August 1990, Vol. 188, No. 2, pages 344-348, see entire document.	1-3 and 5										
Y	TURCK, C.W. Radioactive Screening of Synthetic Peptide Libraries. METHODS: A Companion to Methods in Enzymology. 1994, Vol. 6, No. 4, pages 396-400, see entire document.	1-3 and 5										
Y	US 5,235,039 A (HEATH, Jr. et al.) 10 August 1993 (10.08.1993), see abstract.	1-3 and 5										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 11 July 2003 (11.07.2003)		Date of mailing of the international search report 18 AUG 2003										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Lisa W. Griffith-Cook Telephone No. (703) 308-0196										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/11799

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

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

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claim Nos.: 4 and 6-32
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. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/11799

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
East and West Patent Database
STN-biosis, caplus, embase, medline, cancerlit, japio

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ハモンド, デイヴィッド, ジェイ.

アメリカ合衆国 20882 メリーランド州, レイトンスヴィル, リップルミード コート 4
916

(72)発明者 ラスロップ, ジュリア, テイト

アメリカ合衆国 22046 ヴァージニア州, フォールズ チャーチ, ポプラー ドライブ 1
00

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA14 CA40 EA50 FA34

专利名称(译)	检测混合物中配体和靶的方法		
公开(公告)号	JP2005522712A	公开(公告)日	2005-07-28
申请号	JP2003586604	申请日	2003-04-14
申请(专利权)人(译)	美国国家红十字会		
[标]发明人	ハモンドデイヴィッドジェイ ラスロップジュリアテイト		
发明人	ハモンド,デイヴィッド,ジェイ. ラスロップ,ジュリア,テイト		
IPC分类号	G01N33/543 C07K1/04 C07K1/14 C07K5/087 C07K5/09 C07K5/097 C07K5/103 C07K7/04 C07K7/06 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/537 G01N33/554 G01N33/567 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/54306 C07K1/047 C07K1/14 C07K5/0812 C07K5/0815 C07K5/0821 C07K5/1008 C07K7/06 G01N33/54313 G01N33/54386 Y02P20/582		
FI分类号	G01N33/543.515.Z C07K7/04.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/CA40 4H045/EA50 4H045/FA34		
优先权	60/372091 2002-04-15 US		
其他公开文献	JP4585766B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了表征与配体结合的靶的方法。本发明的方法包括提供配体，任选地与支持物结合的配体，并使配体与靶接触，使得至少一个靶可以与至少一个配体结合。本发明的方法还包括将所得复合材料固定在第一基质上，使得每种复合材料在第一基质内具有不同的位置，并将复合物的靶转移到第二基质中。例如。靶在第二基质中的位置对应于第一基质中配体 - 支持复合物的位置。然后检测第二矩阵上的目标。

(43) 公表日 平成17年7月28日 (2005.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/543	G O 1 N 33/543	4 H O 4 5
// C O 7 K 7/04	C O 7 K 7/04	Z N A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31)

(21) 出願番号	特願2003-586604 (P2003-586604)	(71) 出願人	504382718
(86) (22) 出願日	平成15年4月14日 (2003. 4. 14)	アメリカン ナショナル レッド ク	
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月15日 (2004. 11. 15)	アメリカ合衆国 20855 メリー	
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/011799	ド州, ロックビル, クラブス プラ	
(87) 国際公開番号	W02003/089822	ウェイ 15601, オフィス オ	
(87) 国際公開日	平成15年10月30日 (2003. 10. 30)	パテント アンド ライセンシング, ミ	
(31) 優先権主張番号	60/372, 091	ローム ホーランド ラボラトリー	
(32) 優先日	平成14年4月15日 (2002. 4. 15)	(74) 代理人	100091096
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 平木 祐輔	
		(74) 代理人	100096183
		弁理士 石井 貞次	
		(74) 代理人	100118773
		弁理士 藤田 節	

最終頁に続