

(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2005-516183
(P2005-516183A)

(43) 公表日 平成17年6月2日(2005.6.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	
GO 1 N 37/00	GO 1 N 37/00 1 0 2	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 60 頁)

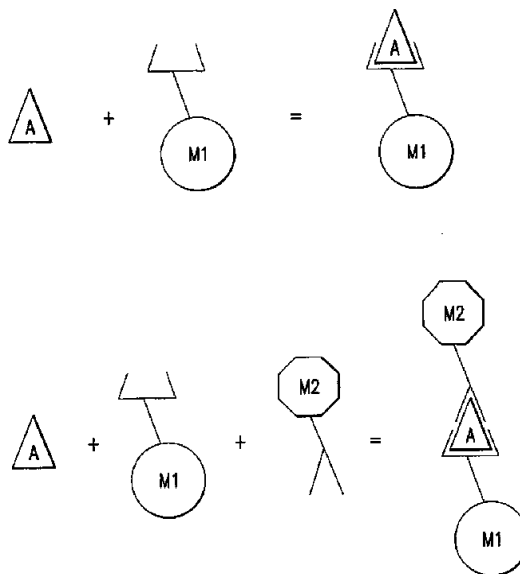
(21) 出願番号	特願2003-545174 (P2003-545174)	(71) 出願人	504191361 プロトメトリックス、インコーポレーテッド アメリカ合衆国 06405 コネチカット州、ブランフォード、イーストメイン ストリート 688
(86) (22) 出願日	平成14年11月19日 (2002.11.19)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月14日 (2004.7.14)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/036959	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開番号	W02003/043487		
(87) 国際公開日	平成15年5月30日 (2003.5.30)		
(31) 優先権主張番号	60/331,706		
(32) 優先日	平成13年11月19日 (2001.11.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検体を検出および測定するための非抗体タンパク質の使用法

(57) 【要約】

本発明は、診断、特に、検体を検出および/または測定するための結合アッセイに関する。本発明は、1つ以上の非抗体分子、特に検体の種と異なる種に由来する非抗体分子との会合により、検体の存在および/または量を決定する方法に関する。さらに、本発明は、特定の疾患に関連する検体を検出および/または測定することにより、疾患を診断および進行度の判断する方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体を検出または測定する方法であって、

- (a) 生体分子検体に結合する第 1 の分子と該検体を含有するサンプルとを、該検体が第 1 の分子に結合する条件下で接触させるステップ；
- (b) 該結合した検体を、該第 1 の分子に結合している該検体に結合する第 2 の異なる分子と、該検体が該第 2 の分子と結合する条件下で接触させるステップ；および
- (c) 該第 1 の分子と結合している該検体と該第 2 の分子との結合を検出または測定するステップ；

を含み、ここで、該第 1 および第 2 の分子のうちの少なくとも一方は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第 1 の分子は、ステップ (a) の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示す、上記方法。 10

【請求項 2】

検体を検出または測定する方法であって、

- (a) 生体分子検体に結合する第 1 の分子と該検体を含有するサンプルとを、該検体が該第 1 の分子に結合する条件下で接触させるステップ；
- (b) 該結合した第 1 の分子を、該検体に結合している該第 1 の分子に結合する第 2 の異なる分子と、該第 2 の分子が該第 1 の分子と結合する条件下で接触させるステップ；および
- (c) 該検体が結合している該第 1 の分子と該第 2 の分子との結合を検出または測定するステップ；

を含み、ここで、該第 1 の分子は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第 1 の分子は、ステップ (a) の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示す、上記方法。 20

【請求項 3】

前記ステップ (c) の前に、結合していないサンプルを除去するステップをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ステップ (c) の前に、結合していない第 2 の分子を除去するステップをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。 30

【請求項 5】

前記第 1 および第 2 の分子は、非抗体タンパク質である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 および第 2 の分子は、前記検体の種と異なる種に由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 および第 2 の分子は、同じ種に由来する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 および第 2 の分子は、異なる種に由来する、請求項 6 に記載の方法。 40

【請求項 9】

前記ステップ (a) の前に、前記第 1 の分子を前記固体支持体に付着させるステップをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 1 および第 2 の分子の少なくとも一方が酵母に由来する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 11】

前記検体がヒトに由来し、前記第 1 の分子または第 2 の分子は酵母に由来する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 12】

前記検体に結合する前記分子は、以下の方法：

(a) 該検体を、各タンパク質が固体支持体上の異なる位置にある、複数のタンパク質を含む位置特定可能アレイと接触させるステップ；および

(b) あらゆる検体-タンパク質相互作用を検出するステップ；

を含み、ここで、該複数のタンパク質は、単一種における少なくとも50%の既知遺伝子によりコードされる少なくとも1つのタンパク質を含み；該固体支持体上の位置における該相互作用の検出により該検体に結合する分子を同定する方法により同定される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項13】

前記検体に結合する前記分子は、以下の方法：

(a) 該検体を、各タンパク質が固体支持体上の異なる位置にある、複数のタンパク質を含む位置特定可能アレイと接触させるステップ；および

(b) あらゆる検体-タンパク質相互作用を検出するステップを含み；

ここで、該複数のタンパク質は、単一種において発現される全タンパク質の少なくとも50%を含み(ここで、タンパク質アイソフォームおよびスプライス変異体は単一タンパク質として数える)、該固体支持体上の位置における該相互作用の検出により該検体に結合する分子を同定する方法により同定される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項14】

前記検体に結合する前記分子は、以下の方法：

(a) 該検体を、各タンパク質が固体支持体上の異なる位置にある、複数のタンパク質を含む位置特定可能アレイと接触させるステップ；および

(b) あらゆる検体-タンパク質相互作用を検出するステップ；

を含み、ここで、該複数のタンパク質は、単一種において発現される少なくとも1000のタンパク質を含み、かつ該固体支持体上の位置における該相互作用の検出により該検体に結合する分子を同定する方法により同定される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項15】

前記検体に結合する前記分子は、以下の方法：

(a) 該検体を、各タンパク質が固体支持体上の異なる位置にある、複数のタンパク質を含む位置特定可能アレイと接触させるステップ；および

(b) あらゆる検体-タンパク質相互作用を検出するステップ；

を含み、ここで、凝集した該複数のタンパク質は、単一種における少なくとも1000の異なる既知遺伝子によりコードされるタンパク質を含み、かつ該固体支持体上の位置における該相互作用の検出により該検体に結合する分子を同定する方法により同定される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項16】

前記検出は、オートラジオグラフィ、ホスホイメージ化(phosphoimager)分析、ハプテン結合、免疫蛍光法、免疫化学法、質量分析法、原子間力顕微鏡法、赤外分光法、ポリメラーゼ連鎖反応、または比色手法により行われる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項17】

前記検体が、タンパク質、脂質、核酸、または小分子である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項18】

前記検体が、疾患または障害についてのマーカーである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項19】

前記疾患または障害は、アレルギー、不安障害、自己免疫疾患、行動障害、出生異常、血液性障害、骨疾患、癌、循環疾患、歯の疾患、抑うつ障害、解離性障害、耳の症状、摂食障害、目の症状、食物アレルギー、食品媒介疾病、胃腸疾患、遺伝障害、心臓病、ホルモン障害、感染症、昆虫媒介疾病、栄養障害、腎臓病、大脳白質萎縮症、肝疾患、精神衛生障害、代謝病、気分障害、神経障害、神経変性障害、人格障害、恐怖症、妊娠合併症、

10

20

30

40

50

プリオン病、前立腺病、呼吸器系疾患、性障害、皮膚の症状、睡眠障害、言語障害、スポーツ障害、熱帯病、または前庭障害である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

被験体における疾患または障害を診断する方法であって、

(a) 生体分子検体に結合する第 1 の分子を、該被験体から得た検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第 1 の分子と結合する条件下で接触させるステップ；

(b) 該結合した検体を、該第 1 の分子に結合した該検体に結合する第 2 の異なる分子と、該検体が該第 2 の分子と結合する条件下で接触させるステップ；および

(c) 該第 1 の分子に結合している該検体と該第 2 の分子との結合を検出または測定するステップ；

を含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示し；該第 1 および第 2 の分子の少なくとも一方は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体分子であり；該第 1 の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(c)における検体の存在または量が、該疾患または障害を患っていない被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量を示す対照値と異なる場合に、該疾患または障害が存在すると決定される、上記方法。

【請求項 21】

被験体における疾患または障害を診断する方法であって、

(a) 生体分子検体に結合する第 1 の分子を、該被験体から得た該検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第 1 の分子と結合する条件下で接触させるステップ；

(b) 該結合した第 1 の分子を、該検体に結合している該第 1 の分子に結合する第 2 の異なる分子と、該第 1 の分子が該第 2 の分子と結合する条件下で接触させるステップ；および

(c) 該検体が結合している該第 1 の分子と該第 2 の分子との結合を検出または測定するステップ；

を含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第 1 の分子は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体分子であり；該第 1 の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(c)における検体の存在または量が、該疾患または障害を患っていない被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量を示す対照値と異なる場合に、該疾患または障害が存在すると決定される、上記方法。

【請求項 22】

前記ステップ(c)の前に、結合していないサンプルを除去するステップをさらに含む、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ステップ(c)の前に、結合していない第 2 の分子を除去するステップをさらに含む、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記ステップ(a)の前に、前記第 1 の分子を前記固体支持体に付着させるステップをさらに含む、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 25】

前記疾患または障害は、アレルギー、不安障害、自己免疫疾患、行動障害、出生異常、血液性障害、骨疾患、癌、循環疾患、歯の疾患、抑うつ障害、解離性障害、耳の症状、摂食障害、目の症状、食物アレルギー、食品媒介疾病、胃腸疾患、遺伝障害、心臓病、ホルモン障害、感染症、昆虫媒介疾病、栄養障害、腎臓病、大脳白質萎縮症、肝疾患、精神衛生障害、代謝病、気分障害、神経障害、神経変性障害、人格障害、恐怖症、妊娠合併症、プリオン病、前立腺病、呼吸器系疾患、性障害、皮膚の症状、睡眠障害、言語障害、スポーツ障害、熱帯病、前庭障害、前立腺癌、後天性免疫不全症候群、肝炎、または乳癌である、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 26】

前記障害が、前立腺癌、後天性免疫不全症候群、肝炎、または乳癌である、請求項 25

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 27】

被験体における疾患または障害の進行度を決定する方法であって、

(a) 生体分子検体に結合する第 1 の分子を、被験体から得た該検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第 1 の分子に結合する条件下で接触させるステップ；

(b) 該結合した検体を、該第 1 の分子に結合した該検体に結合する第 2 の異なる分子と、該検体と該第 2 の分子とが結合する条件下で接触させるステップ；および

(c) 該第 1 の分子と結合した該検体と該第 2 の分子との結合を、検出または測定するステップ；

を含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第 1 の分子および第 2 の分子の少なくとも一方は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体分子であり；該第 1 の分子は、ステップ (a) の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ (c) における検体の存在または量を、該疾患または障害の特定の進行度にある被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量と比較して、該被験体における疾患または障害の進行度を判断する、上記方法。

10

【請求項 28】

被験体における疾患または障害の進行度を決定する方法であって、

(a) 生体分子検体に結合する第 1 の分子を、被験体から得た検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第 1 の分子に結合する条件下で接触させるステップ；

(b) 該結合した第 1 の分子を、該検体に結合した該第 1 の分子に結合する第 2 の異なる分子と、該第 1 の分子と該第 2 の分子とが結合する条件下で接触させるステップ；および

(c) 該第 2 の分子と、該検体と結合した該第 1 の分子との結合を、検出または測定するステップ；

を含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示し；該第 1 の分子は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第 1 の分子は、ステップ (a) の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ (c) における該検体の存在または量を、該疾患または障害の特定の進行度にある被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量と比較して、該被験体の該疾患または障害の進行度を判断する、上記方法。

20

【請求項 29】

前記ステップ (c) の前に、結合していないサンプルを除去するステップをさらに含む、請求項 27 または 28 に記載の方法。

30

【請求項 30】

前記ステップ (c) の前に、結合していない第 2 の分子を除去するステップをさらに含む、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記ステップ (a) の前に、前記第 1 の分子を前記固体支持体に付着させるステップをさらに含む、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 32】

前記疾患または障害は、アレルギー、不安障害、自己免疫疾患、行動障害、出生異常、血液性障害、骨疾患、癌、循環疾患、歯の疾患、抑うつ障害、解離性障害、耳の症状、摂食障害、目の症状、食物アレルギー、食品媒介疾病、胃腸疾患、遺伝障害、心臓病、ホルモン障害、感染症、昆虫媒介疾病、栄養障害、腎臓病、大脳白質萎縮症、肝疾患、精神衛生障害、代謝病、気分障害、神経障害、神経変性障害、人格障害、恐怖症、妊娠合併症、プリオン病、前立腺病、呼吸器系疾患、性障害、皮膚の症状、睡眠障害、言語障害、スポーツ障害、熱帯病、前庭障害、前立腺癌、後天性免疫不全症候群、肝炎、または乳癌である、請求項 27 または 28 に記載の方法。

40

【請求項 33】

前記障害が、前立腺癌、後天性免疫不全症候群、肝炎、または乳癌である、請求項 32 に記載の方法。

50

【請求項 3 4】

- (a) 第 1 の容器に入った、精製生体分子検体；
 (b) 第 2 の容器に入った、該検体に結合する第 1 の分子；および
 (c) 該第 1 の分子に結合している該検体に結合する第 2 の異なる分子が付着した固体支持体を含み、

ここで、該第 1 および第 2 の分子の少なくとも一方が、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である、キット。

【請求項 3 5】

- (a) 第 1 の容器に入った、精製生体分子検体；
 (b) 検体に結合し、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である第 1 の分子
 が付着した固体支持体；および
 (c) 第 2 の容器に入った、該検体に結合している該第 1 の分子に結合する第 2 の異なる分子を含む、キット。

10

【請求項 3 6】

前記検体に結合した前記第 1 の分子を検出するための検出手段をさらに含む、請求項 3 4 または 3 5 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野は、診断、特に、検体を検出および/または測定するための結合アッセイ
 である。本発明は、1 つ以上の非抗体タンパク質、特に検体の種とは異なる種に由来する
 分子との会合により、検体の存在および/または量を決定する方法に関する。さらに、本
 発明は、特定の疾患に関連する検体を検出および/または測定することにより、疾患を診
 断および進行度付け(staging)する方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

検体を *in vitro* で検出する方法は、当該分野で周知である。一般的に、検出プロセスは、
 検体との接触、および検体との接触が生じたと言う測定可能なりポート(定質的または
 定量的)を必要とする。最も単純な形式では、接触分子およびリポーター分子は、単一の
 二分子状分子上にあってもよいが、このようなアッセイ形式は、1 つを上回る分子を検出
 プロセスにおいて使用する他のアッセイ形式と比べて精度が劣りがちである。より一般的
 には、少なくとも 2 つの異なる試薬分子を診断アッセイにおいて使用する。例えば、検体
 に結合する第 1 の分子、および成果のあった結合事象を記録する第 2 の分子があり得る。
 一般的には、検体に結合できる 1 つを上回る分子を過程において使用する：第 1 の分子を
 固体支持体に付着させて、検体と該第 1 の分子との複合体を精製し易くしてもよい。その
 後、検体に結合する第 2 の分子を添加してもよい。このような第 2 の分子は、第 1 の分子
 と検体との結合が生じたというシグナルを提供するか、またはシグナルを伝達する第 3 の
 分子と相互作用してもよい。

30

【0003】

検体検出法は、典型的に、抗体利用型イムノアッセイ、検体と相互作用する、検体の種
 と同じ種由来のタンパク質を使用するアッセイ、またはポリヌクレオチド利用型ハイブリ
 ダイゼーションスクリーニングである。抗原検体を検出するためのイムノアッセイは当該
 分野で周知であり、抗原-抗体複合体の形成を伴う。検体は、免疫拡散プレートで行うよ
 うに液体形態で添加されてもよいし、またはよく使用される 96 ウェル形式において酵素免
 疫吸着アッセイ(ELISA)を使用して行うように表面上に固定化されてもよい。免疫拡散ア
 ッセイでは、抗体-抗原複合体は沈降線(precipitation line)として検出され得る。ラジ
 オイムノアッセイ(RIA)では、放射性同位体を使用して、検体の存在を検出する。酵素イ
 ムノアッセイでは、(例えば、発色または蛍光発生基質で)酵素活性により生成される検出
 可能マーカーを使用して、検体の存在を検出する(Engvall および Perlmann, 1972, "Enzym
 e-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by e

40

50

nzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes" J. Immunol. 109:129-35)。

【0004】

2つのクラスのイムノアッセイがある。「直接」抗体イムノアッセイでは、検体と相互作用する抗体は、(例えば、RIAまたはELISAにより)直接測定される。この場合、抗体は、検体と接触すること、およびこのような相互作用のリポートを提供することの両方を行うように作用する。「間接」抗体イムノアッセイでは、第1の抗体は検体に結合し、第1の抗体に結合する第2の抗体を(例えば、RIAまたはELISAにより)検出および測定する。間接イムノアッセイはまた、3つの抗体を伴い得る：例として、抗体のうちの2つは(以下に記載する「サンドウィッチ」技法の場合のように)それぞれ検体に結合することができ、他の2つの抗体のうちの1つに結合する第3の抗体は、成果のあった相互作用のリポートを提供する。間接イムノアッセイは、一般的に、直接イムノアッセイよりも好ましい。なぜなら、間接イムノアッセイはより感受性が強くかつ特異的であり、リポーター抗体をジェネリック試薬として使用して、それぞれ異なる検体に結合する多くの異なる抗体を測定することができるからである。

10

【0005】

イムノアッセイの一種として「サンドウィッチ」技法がある。サンドウィッチアッセイは、一般的にELISA読出しを使用し、少なくとも2つの抗体の使用を伴う。典型的に、目的の検体を含む可能性のあるサンプルを、固体支持体上の第1の抗体と接触させる。結合していないサンプルを除去した後、第2の酵素複合型(conjugated)抗体を、第1の抗体と結合した検体と接触させる。結合していない第2の抗体を除去した後、酵素の基質(例えば、発色性または蛍光発生性)を、固体支持体上の抗体-検体-抗体複合体と接触させる。検出可能マーカの生成は、サンプル中の検体の存在を示し、生成された検出可能マーカの量、または検出可能マーカの生成率を使用して、検体の量を決定できる。

20

【0006】

サンドウィッチアッセイは、一般的に、検体に結合するのに単一の抗体しか使用しないイムノアッセイよりも感受性および信頼性が高い。なぜなら、検出可能マーカの非特異的バックグラウンド生成が少ないからである。上記例のサンドウィッチアッセイは、検体に結合する抗体の1つがリポーター分子としても作用するため直接イムノアッセイであるが、サンドウィッチアッセイは、上記例における第2の抗体が酵素複合型ではなく、酵素複合型の第3の抗体により検出される場合には、間接イムノアッセイとしても設計され得る。サンドウィッチアッセイは、ELISA型アッセイを使用したブタの仮性狂犬病の診断に例えられるように、疾患を診断するのに有用であり続けてきた(H. Jooに発行された米国特許第4,562,147号)。

30

【0007】

上述したように、ELISA技法は、目的の検体を検出するのに成果を上げたが、このアッセイは、典型的に、検体に特異的な2つの抗体を必要とする。さらに、サンドウィッチ技術を使用する場合、両方の抗体が検体に結合しなければならないが、理想的には、検体の同じ部分に結合してはならず、さもなければ、一方の抗体が、他方の抗体が検体に結合するのを妨げてしまう。一般的に、抗体特異性は、操作するのが困難で、検体への結合部位が異なる2つの抗体を生成するのは、達成するのがさらに困難である。このような抗体の供給は限られており、抗体の生成には費用および時間がかかり得る。さらに、十分な特異性および親和性を有する抗体は、標的検体の抗原性が弱い場合には、得ることが特に難しい。サンドウィッチアッセイのために弱い抗原に対する2つの重複しない抗体を得ることは特に厳しい。

40

【0008】

従って、当該分野においては、標的検体の結合および検出のために抗体だけに頼らない、in vitroで検体を検出および定量する方法が必要とされている。

【発明の開示】

【0009】

50

本発明は、検体を検出するために分子を使用する(すなわち、分析的手順において目的の分子を検出または測定する)方法に関し、少なくとも1つの分子が非抗体タンパク質であり、少なくとも1つの分子が検体の種と異なる種に由来する。非抗体結合タンパク質は、検体の種と異なる種に由来することが好ましい。

【0010】

従って、一実施形態では、本発明は、検体を検出または測定する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子と該検体を含むサンプルとを、該検体が第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)該結合した検体を、該第1の分子に結合している該検体に結合する第2の異なる分子と、該検体が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；および(c)該第1の分子と結合している該検体と該第2の分子との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、該第1および第2の分子の少なくとも一方は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示す、上記方法である。

10

【0011】

さらなる実施形態では、第1および第2の分子は、検体の種とは異なる種に由来する非抗体タンパク質である。特定の実施形態では、本方法は、ステップ(a)の前に、第1の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。

【0012】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子を除去する。

20

【0013】

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子を、順次にサンプルと接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触させてよい。また、結合分子を、目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

30

【0014】

別の実施形態では、本発明は、検体を検出または測定する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子と該検体を含むサンプルとを、該検体が第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)該結合した検体を、該第1の分子に結合している該検体に結合する第2の異なる分子と、該検体が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該第1の分子と結合している該検体と該第2の分子との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、該第1および第2の分子の少なくとも一方は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示す、上記方法である。さらなる実施形態では、第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である。特定の実施形態では、本方法は、ステップ(a)の前に、第1の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。

40

【0015】

全ての異なる分子が、目的の検体に結合する必要はない。例えば、シグナル増幅を得るためには、リポーター酵素と複合化した第2の異なる分子を使用して、検体に結合した第1の分子に結合させればよい。さらに、第3の異なる分子を第2の分子に結合させてもよい。一実施形態では、検体に結合した第1の分子に結合するいくつかの異なる二次分子を

50

使用して、検体の存在に対応するシグナルを増幅する。

【0016】

従って、一実施形態では、本発明は、検体を検出または測定する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子と該検体を含むサンプルとを、該検体が該第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)該結合した第1の分子を、該第1の分子が該検体に結合している場合に該第1の分子に結合する第2の異なる分子と、該第2の分子が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；および(c)該検体が結合している該第1の分子と該第2の分子との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、該第1の分子は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示す、上記方法である。

10

【0017】

さらなる実施形態では、第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する。具体的な別の実施形態では、第1および第2の分子は、非抗体タンパク質である。特定の実施形態では、本方法は、ステップ(a)の前に、第1の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。

【0018】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子を除去する。

20

【0019】

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子を、サンプルと順次に接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触させてよい。また、結合分子を、目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

【0020】

別の実施形態では、本発明は、検体を検出または測定する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子と該検体を含むサンプルとを、該検体が該第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)該結合した第1の分子を、該検体に結合している該第1の分子に結合する第2の異なる分子と、該第2の分子が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該検体が該結合している該第1の分子と該第2の分子との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、該第1の分子は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示す、方法である。さらなる実施形態では、第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する。さらなる具体的な実施形態では、第1および第2の分子は、非抗体タンパク質である。特定の実施形態では、本方法は、ステップ(a)の前に、第1の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。

30

40

【0021】

一実施形態では、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つの異なる分子をアッセイで使用して、検体を検出および/または測定する。さらなる実施形態では、2つ、3つ、4つまたは5つの分子が、非抗体タンパク質である。別の実施形態では、全ての異なる分子が、非抗体タンパク質である。

【0022】

一実施形態では、検体に結合する少なくとも1つの分子が、検体の種と異なる種に由来

50

する。さらなる実施形態では、検体に結合する全ての異なる分子が、検体の種と異なる種に由来する。好適な実施形態では、目的の検体の種と異なる種に由来する2つの非抗体結合タンパク質をアッセイに使用して、検体を検出および/または測定する。

【0023】

別の実施形態では、検体に結合する少なくとも1つの分子が、検体に結合する別の異なる分子の種と異なる種に由来し、この種は検体の種と異なる。別の実施形態では、検体に結合する少なくとも1つの分子が、検体に結合した別の分子に結合する別の異なる分子の種と異なる種に由来し、この種は検体の種と異なる。さらに別の実施形態では、検体に結合する全ての異なる分子が、同じ種に由来し、この種は検体の種と異なる。具体的な別の実施形態では、検体に結合する第1および第2の異なる分子が同じ種に由来し、この種は検体の種と異なる。別の具体的な実施形態では、目的の検体に結合する全ての異なる分子が酵母に由来し、検体は酵母以外の生物に由来する。別の具体的な実施形態では、目的の検体はヒトに由来し、検体に結合する第1の分子は酵母に由来する。さらに別の具体的な実施形態では、目的の検体はヒトに由来し、(検体に結合するか、または検体に結合した第1の分子に結合する)第1または第2の分子の一方が酵母に由来する。

10

【0024】

別の実施形態では、目的の検体に結合する少なくとも1つの分子が検体の種と異なる種に由来し、少なくとも1つの分子は検体が由来する種においてホモログを持たない。別の実施形態では、目的の検体に結合する全ての異なる分子が、検体の種と異なる種に由来し、少なくとも1つの分子が検体が由来する種においてホモログを持たない。さらなる実施形態では、目的の検体に結合する全ての分子が酵母に由来し、検体は酵母以外の生物に由来し、ここで少なくとも1つの分子は検体が由来する種においてホモログを持たない。

20

【0025】

目的の検体に結合する分子は、抗体または非抗体タンパク質であり得る。ここで、タンパク質は全長タンパク質、タンパク質の一部、またはペプチドである。一実施形態では、目的の検体に結合する第1の分子は非抗体タンパク質であり、目的の検体に結合した第1の分子に結合する第2の異なる分子は抗体である。別の実施形態では、目的の分子に結合する全ての異なる分子が非抗体タンパク質である。具体的な実施形態では、目的の検体に結合する第1および第2の分子は非抗体タンパク質である。別の具体的な実施形態では、目的の検体に結合する第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり、検体が由来する種においてホモログを持たない。

30

【0026】

目的の検体に結合する分子は、固体支持体に結合していなくても結合していてもよい。一実施形態では、目的の検体に結合する分子は結合していない。別の実施形態では、目的の検体に結合する分子は、固体支持体の表面に結合している。別の実施形態では、目的の検体に結合する分子は、固体支持体のウェルの表面に結合している。具体的な実施形態では、目的の検体に結合する分子は、ポリスチレン96ウェルマイクロタイタープレートのウェルの表面に結合している。別の実施形態では、目的の検体に結合する分子は、PCT国際特許公報第W0 0183827号(2001年11月8日に発行)およびZhuら(2000, "Analysis of yeast protein kinases using protein chips", Nature Genet. 26:283-289)に記載されているナノアレイデバイスのウェルの表面に結合している。

40

【0027】

目的の検体に結合する分子、または検体に結合している異なる分子に結合する分子は、検出可能マーカーと複合化されるか、または検出可能マーカーに結合され得る。一実施形態では、目的の検体に結合する分子は、例えばフルオレセイン等の検出可能マーカーと複合化される。別の実施形態では、目的の検体に結合する分子、または検体に結合した分子に結合する分子は、例えばアルカリホスファターゼ等の検出可能マーカーを生成する酵素と複合化される。別の実施形態では、目的の検体に結合する分子、または検体に結合している異なる分子に結合する分子は、例えばp-アゾベンゼンアルソン酸等のハプテンと複合化される。別の実施形態では、目的の検体に結合する分子、または検体に結合している異

50

なる分子に結合する分子は、例えば分子質量マーカー等の検出可能マーカーにより結合されている。

【0028】

本明細書に記載する診断アッセイにおいて使用する少なくとも1つの結合分子は非抗体タンパク質であるが、使用する結合分子の1つ以上が抗体、好ましくはモノクローナル抗体であってもよい。限定しない例として、検体に結合する非抗体結合タンパク質は、タンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定され得、非抗体結合タンパク質に結合するモノクローナル抗体は、検出可能分子との複合化によりリポーター分子として機能し得る。

【0029】

本発明の方法に有用な分子としては、例えば、目的のタンパク質を検出する技術分野において公知の任意のスクリーニングアッセイにより同定されるタンパク質を含む。当業者は、当該分野で周知の多くの結合アッセイが、本発明の方法に有用な分子を同定および単離するために使用できることを理解するであろう。

【0030】

例えば、本発明のアッセイに有用な結合タンパク質は、目的の検体でタンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定され得る。従って、一実施形態では、目的の検体に結合する結合タンパク質は、検体でタンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定される。さらなる実施形態では、タンパク質アレイは、単一種の既知遺伝子の少なくとも50%または少なくとも70%の既知遺伝子によりコードされる少なくとも1つのタンパク質を含む。別のさらなる実施形態では、タンパク質アレイは、単一種において発現される全タンパク質の少なくとも50%を含む(ここで、タンパク質アイソフォームおよびスプライス変異体は単一タンパク質として数える)。別のさらなる実施形態では、タンパク質アレイは、単一種において発現される少なくとも1000のタンパク質を含む。さらに別の実施形態では、タンパク質アレイは、単一種の少なくとも1000の異なる既知遺伝子によりコードされるタンパク質を含む。

【0031】

さらなる実施形態では、目的の検体に結合し、特定の種に由来する第1の結合タンパク質、および第1の結合タンパク質が由来する種と同じまたは異なる種に由来する第2の結合タンパク質は、タンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定される。その後、検体を、第2の結合タンパク質の存在下で第1の結合タンパク質に結合する能力、および第1の結合タンパク質の存在下で第2の結合タンパク質に結合する能力についてテストする。2つの結合タンパク質が、互いの存在下で検体に結合可能である場合、このような2つの結合タンパク質は、サンドウィッチイムノアッセイと同様の診断アッセイにおいて試薬として使用できる。

【0032】

別のさらなる実施形態では、目的の検体に結合し、特定の種に由来する第1の結合タンパク質は、タンパク質アレイをスクリーニングすることにより得られる。次いで、第1の結合タンパク質および検体を含む複合体を、第1の結合タンパク質を同定するために使用したのと同じまたは異なるタンパク質アレイ上でスクリーニングして、複合体に結合する第2の結合タンパク質を同定する。その後、第2の結合タンパク質は、複合体の別個の成分に対してテストして、第2の結合タンパク質が検体に結合するのか、または第1の結合タンパク質に結合するのかを決定し得る。第2の結合タンパク質は、このようにして、様々な診断アッセイ形式用の試薬として特徴決定され得る。

【0033】

さらに別の実施形態では、目的の検体に結合し、特定の種に由来する第1の結合タンパク質は、タンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定され、このような第1の結合タンパク質を、その後、第1の結合タンパク質の種と同じ種に由来するか、または第1の結合タンパク質の種と異なる種に由来する少なくとも1つのタンパク質を含む、同じまたは異なるアレイ上でのスクリーニングにおいて使用して、第1の結合タンパク質に結

10

20

30

40

50

合する第2の結合タンパク質を同定する。このような第2の結合タンパク質は、任意に、その後、第2の結合タンパク質の種と同じ種に由来するか、または第2の結合タンパク質の種と異なる種に由来するタンパク質を含む、同じまたは異なるアレイ上でのスクリーニングにおいて使用して、第2の結合タンパク質に結合する第3の結合タンパク質を同定してもよく、以下同様が続いてもよい。

【0034】

別の実施形態では、タンパク質集合中のタンパク質を互いとテストして、どのタンパク質が、集合中のその他全てのタンパク質のいずれと結合するかを決定し、このような結合アッセイにより得られたデータを「相互作用プロファイル」として記録する。タンパク質の集合は大規模であってもよく、例えばプロテオーム全体を意図してもよい。タンパク質集合の全てまたはほぼ全ての(例えば、50%、60%、70%、80%、90%、95%を上回る)結合相互作用が明らかになったら、目的の検体をタンパク質集合に対する結合についてテストし得る。検体に結合すると同定された第1の結合タンパク質については、相互作用プロファイルを参照することにより、このような第1の結合タンパク質に結合する全ての第2のタンパク質が示される。次いで、相互作用プロファイルをさらに参照することにより、このような第2の結合タンパク質に結合する全ての第3のタンパク質が示され、以下同様が続く。一連の結合タンパク質を規定するこの過程は、検体に結合するあらゆる結合タンパク質について繰り返され得る。

10

【0035】

従って、このような相互作用のデータベースは、診断アッセイを設計するのに有用であり得る。例えば、ヒト由来検体を、非ヒト種由来タンパク質の集合に対してスクリーニングしてもよい(この集合は、互いに対する結合アッセイにおいてテストされて、集合中のどのタンパク質が集合中の互いのタンパク質と結合するかを同定されている(すなわち、相互作用プロファイル))。検体と結合するタンパク質を集合から同定し、相互作用プロファイルを参照することにより、第2レベルまたは第3レベル結合タンパク質として使用できる、集合中の他のタンパク質を同定する。このようにして、タンパク質の集合中の(検体に結合する)1つの結合タンパク質が既知である場合には、目的の検体についての結合アッセイを設計できる。通常、検体に結合する結合タンパク質は、一度のスクリーニングアッセイのみを行うことにより同定できる。このような診断アッセイ設計方法は有利である。なぜなら、この方法は、それぞれの異なるアッセイについて必要な結合タンパク質を実験的にテストおよび同定する必要を軽減するからである。

20

30

【0036】

検体でタンパク質アレイをスクリーニングすることにより、1つの結合タンパク質を同定し得る。タンパク質相互作用データベースを使用して、第1の結合タンパク質に結合する第2、第3および第4レベルの結合タンパク質を同定し得る。このような場合、アッセイは、サンドウィッチアッセイではない。なぜなら、検体には1つのタンパク質しか直接結合しないからである。検体でアレイをスクリーニングすることにより1つを上回るタンパク質を同定する場合、検体に同時に結合する2つのタンパク質を、サンドウィッチアッセイ用の第1レベル結合タンパク質として選択できる。

【0037】

検体は、タンパク質相互作用データベースのメンバーであり得る。このような場合、第1の結合タンパク質は、データベースを参照することにより同定され得る。検体でのアレイのスクリーニングは必要ではない。なぜなら、検体に結合するタンパク質は、タンパク質相互作用データベースを用いて決定済みであるからである。例えば、酵母プロテオームのタンパク質相互作用データベースは、全ての酵母タンパク質間の全ての相互作用を含み得る。従って、検体が酵母タンパク質である場合、全ての結合タンパク質がデータベースに含まれ得る。このような場合、検体および結合タンパク質は、同じ種に由来する。

40

【0038】

検体は、タンパク質相互作用データベースのメンバーと相同であり得る。検体のホモログと相互作用することが知られているデータベースの全てのメンバーが、検体の可能性の

50

ある結合体であり得る。従って、検体でアレイをスクリーニングする必要はない。これらの可能性のある結合体は、検体に結合する能力について個々にテストされ得る。第2、第3および第4レベルタンパク質は全て、データベースから知り得る。

【0039】

目的の検体に対する結合体として、タンパク質アレイから同定された結合タンパク質は、脂質結合体であり得る。このような場合、脂質を使用して、このような結合タンパク質と結合させ、このような脂質の直接的もしくは間接的な検出を、直接的または間接的に、検体の存在の指示体として使用し得る。

【0040】

あるいはまた、目的の検体に対する可能性のある結合体としてタンパク質アレイから同定された結合タンパク質は、核酸結合体であり得る。このような場合、コグネイト核酸を使用して、このような結合タンパク質と結合させ、このような核酸の直接的または間接的な検出を、検体の存在の指示体として使用し得る。従って、まず、検体は、核酸により結合され、第2の結合体(例えば、検体-核酸複合体を認識する、検体の種と異なる種に由来するタンパク質)が結合および検出され得る。さらに、当該分野で周知の核酸増幅に対するいくつかの代替的なアプローチのうちのいずれかを使用して、検出シグナルを増幅できる。

10

【0041】

従って、検体は、生体分子であることが好ましく、つまりタンパク質、炭水化物または脂質であり得る。検体は、無傷細胞または細胞の構成要素でもあり得るが、これらに限定

20

【0042】

検体の他の例としては、細菌、ウイルス、抗原、抗体、およびポリヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されない。特に有用な検体は、例えば、その存在またはレベルが疾患または障害に相関するタンパク質、炭水化物、および脂質である。このような検体の存在またはレベルは、疾患または障害の危険性、発症、進行、緩和および/または鎮静と相関し得る。

【0043】

検出は、例えば、オートラジオグラフィおよび/またはホスホイメージ化分析(放射活性用)、免疫蛍光法(蛍光タグ付けリガンド用)、免疫化学法(抗原性リガンド用)、質量分析法もしくは原子間力顕微鏡検査(分子質量標識用)、赤外分光法(赤外線標識用)、ポリメラーゼ連鎖反応(増幅可能オリゴヌクレオチド用)、または比色手法(リポーター酵素連結リガンド用)により、行うことができる。

30

【0044】

本発明は、疾患または障害と相関する検体の存在または量をアッセイし、実験サンプル中の検体の存在または量を対照値と比較することにより、疾患または障害の診断または予後を判断する方法にも関し、疾患または障害の診断または予後は、実験サンプル中の検体の存在または量が、対照値と異なる場合に判断する。

【0045】

従って、一実施形態では、本発明は、被験体における疾患を診断する方法であって、(a)目的の検体に結合する第1の分子を、該被験体から得た検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(b)該結合した検体を、該第1の分子に結合した該検体に結合する第2の異なる分子と、該検体が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；および(c)該第1の分子に結合している該検体と該第2の分子との結合を検出または測定するステップを含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示し；該第1および第2の分子の少なくとも一方は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(c)における検体の存在または量が、該疾患または障害を患っていない被験体から得た同種サンプル

40

50

に存在する検体の量を示す対照値と異なる場合に、該疾患が存在すると決定される、上記方法である。

【0046】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子を除去する。

10

【0047】

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子を、サンプルと順次に接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触させてよい。また、結合分子を目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

【0048】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患を診断する方法であって、(a)目的の検体に結合する第1の分子を、該被験体から得た検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)該結合した検体を、該第1の分子に結合した該検体に結合する第2の異なる分子と、該検体が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該第1の分子に結合している該検体と該第2の分子との結合を検出または測定するステップを含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示し；該第1および第2の分子の少なくとも一方は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(e)における検体の存在または量が、該疾患または障害を患っていない被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量を示す対照値と異なる場合に、該疾患が存在すると決定される、上記方法である。

20

【0049】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患を診断する方法であって、(a)目的の検体に結合する第1の分子を、該被験体から得た該検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(b)該結合した第1の分子を、該検体に結合した該第1の分子に結合する第2の異なる分子と、該第1の分子が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；および(c)該検体が結合している該第1の分子と該第2の分子との結合を検出または測定するステップを含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第1の分子は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(c)における検体の存在または量が、該疾患または障害を患っていない被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量を示す対照値と異なる場合に、該疾患が存在すると決定される、上記方法である。

30

40

【0050】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子を除去する。

【0051】

50

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子を、サンプルと順次に接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触され得る。また、結合分子を、目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

【0052】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患を診断する方法であって、(a)目的の検体に結合する第1の分子を、該被験体から得た該検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)該結合した第1の分子を、該検体に結合した該第1の分子に結合する第2の異なる分子と、該第1の分子が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該検体が結合している該第1の分子と該第2の分子との結合を検出または測定するステップを含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第1の分子は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(e)における検体の存在または量が、該疾患または障害を患っていない被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量を示す対照値と異なる場合に、該疾患が存在すると決定される、上記方法である。

10

【0053】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患の進行度を決定する方法であって、(a)目的の検体に結合する第1の分子を、被験体から得た該検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)該結合した検体を、該第1の分子に結合した該検体に結合する第2の異なる分子と、該検体と該第2の分子とが結合する条件下で接触させるステップ；および(c)該第2の分子と、該第1の分子と結合した該検体との結合を、検出または測定するステップを含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第1の分子および第2の分子の少なくとも一方は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(c)における検体の存在または量を、該疾患および/または障害の特定の進行度にある被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量と比較して、該被験体における疾患の進行度を判断する、上記方法である。

20

30

【0054】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子を除去する。

【0055】

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子を、サンプルと順次に接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触され得る。また、結合分子を、目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

40

【0056】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患の進行度を決定する方法であって、(a)目的の検体に結合する第1の分子を、被験体から得た該検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)該結合した検体と、該第1の分子に結合している該検体に結合する第2の異なる分子と、該検体と該第2の分子とが結合する条件下で接

50

触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該第2の分子と、該第1の分子と結合した該検体との結合を、検出または測定するステップを含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第1の分子および第2の分子の少なくとも一方は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(e)における検体の存在または量を、該疾患および/または障害の特定の進行度にある被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量と比較して、該被験体における疾患の進行度を判断する、上記方法である。

【0057】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患の進行度を決定する方法であって、(a)目的の検体に結合する第1の分子を、被験体から得た検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)該結合した第1の分子を、該検体に結合した該第1の分子に結合する第2の異なる分子と、該第1の分子と該第2の分子とが結合する条件下で接触させるステップ；および(c)該第2の分子と、該第1の分子と結合した該検体との結合を、検出または測定するステップを含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示し；該第1および第2の分子の少なくとも一方は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(c)における該検体の存在または量を、該疾患または障害の特定の進行度にある被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量と比較して、該被験体の該疾患の進行度を判断する、上記方法である。

10

20

【0058】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子を除去する。

【0059】

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子は、サンプルと順次に接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触され得る。また、結合分子を、目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

30

【0060】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患の進行度を決定する方法であって、(a)目的の検体に結合する第1の分子を、被験体から得た検体を含むことが疑われるサンプルと、該検体が該第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)該結合した第1の分子を、該検体に結合した該第1の分子に結合する第2の異なる分子と、該第1の分子と該第2の分子とが結合する条件下で接触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該第2の分子と、該第1の分子と結合した該検体との結合を、検出または測定するステップを含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、該検体の存在または量を示し；該第1および第2の分子の少なくとも一方は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(e)における該検体の存在または量を、該疾患または障害の特定の進行度にある被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量と比較して、該被験体の該疾患の進行度を判断する、方法である。

40

【0061】

従って、本発明の方法は、例えば、アレルギー、ホルモン障害、自己免疫疾患、癌、胃

50

腸疾患、血液性障害、遺伝障害、食品媒介疾病、心臓病、感染症、循環疾患、代謝障害、神経変性障害、または行動障害等の疾患または障害についての診断または予後を判断するのに有用である。

【0062】

本発明はまた、1つ以上の結合分子、および/または分子と検体との結合を検出するための検出手段を含む、キットにも関する。一実施形態では、キットは、(a)第1の容器に入った、精製生体分子検体；(b)第2の容器に入った、該検体に結合する第1の分子；および(c)該第1の分子に結合した該検体に結合する第2の異なる分子が付着した固体支持体を含み、ここで、該第1および第2の分子の少なくとも一方が、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である。

10

【0063】

別の実施形態では、キットは、(a)第1の容器に入った、精製生体分子検体；(b)検体に結合し、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である第1の分子が付着した固体支持体；および(c)第2の容器に入った、該検体に結合した該第1の分子に結合する第2の異なる分子を含む。

【0064】

本発明はまた、特定の検体に適した結合タンパク質を同定するように設計されたキットにも関する。本発明はまた、結合タンパク質を同定するためのタンパク質アレイ、および/または分子と検体との結合を検出するのに有用な試薬、を含むキットにも関する。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0065】

本発明は、検体に結合し、検体の種と異なる種に由来する非抗体分子を使用して、目的の検体を検出する方法に関する。検体の種とは異なる種に由来する分子を使用する利点は、とりわけ、交差反応が低いことを見込まれ、従って、バックグラウンドレベルが低く、特異性が高く、および/または偽陽性が少なくなることである。さらなる利点は、検体が由来する種において相同遺伝子またはオーソログ遺伝子生成物を持たないような分子を使用することにより得られる。このような分子は、特異的に結合し、実験的サンプル中の他の化合物には結合しない可能性が高い。非抗体分子を使用する別の利点は、大多数の抗体が、検体の特に免疫原性のエピトープを指向する一方で、結合タンパク質が、検体の免疫原性に関係なく、検体上の複数の可能性のある結合部位のいずれかに結合し得ることである。これにより、検体上の異なる部位に結合するタンパク質を同定する確率が高くなり、従って、図2に模式的に示すサンドウィッチイムノアッセイと同様のアッセイ等の診断アッセイにおいて試薬として並行して使用することができる。

30

【0066】

目的の検体に結合し、従って、本発明の方法のために有用な分子は、結合アッセイを行うことにより同定および単離することができる。例えば、目的の検体をプローブとしてタンパク質アレイをスクリーニングし、タンパク質のアレイに対する検体の結合を検出および同定できる。しかし、多くの他の種類の結合アッセイが当該分野で公知であり、本発明の方法のために有用である。

【0067】

従って、本発明は、目的の検体でスクリーニングするのに有用な任意の結合アッセイを使用して、検体に結合する分子を同定することを意図する。多くのこのようなアッセイは当該分野で周知であり、当業者は、このようなアッセイの改変版を本発明に従って使用できることが理解できるであろう。

40

【0068】

結合アッセイは、一度ずつ行い、個々の分子と目的の検体との結合親和性を順次にテストすることができ、この一例を図1Aに模式的に示す。1つを上回る分子が、目的の検体の結合体として同定された場合には、2つの分子を同時にまたは順に検体と結合する能力についてテストしてもよい(図1B)。

【0069】

50

検体上の異なるドメインに結合する結合タンパク質が見とめられる可能性が高いと考えられている。このような検体の一例は、EGF受容体である。EGFとEGF受容体の細胞外ドメインとの結合は、AP-2クラスリンアダプター複合体を、EGF受容体の細胞内ドメイン、特にアダプター複合体の $\mu 1$ および $\mu 2$ サブユニットに結合させる(Sorkinaら, 2001, "Clathrin, adaptors and eps15 in endosomes containing activated epidermal growth factor receptors", J. Cell Sci. 112:317-327)。2つの他のタンパク質と同時に結合できるタンパク質の別の例は、Grb-2タンパク質であり、これは、EGF受容体およびタンパク質Sosと同時に結合する(ZhangおよびLautar, 1996, "A yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components", Anal. Biochem. 242:68-72)。

【0070】

10

別の例では、Zhuら(2001, "Global analysis of protein activities using proteome chips", Science. 293:2101-2105)は、酵母タンパク質アレイ中の39のタンパク質がカルモジュリンに結合することを報告している。このような多数のタンパク質が全て、カルモジュリンの同じ部位に結合することは考えられにくく、従って、39の同定された結合タンパク質のいずれかが結合する複数の結合部位がある可能性が高い。図1Bは、結合体M1およびM2の模式的例を示しており、これらは、検体上の遠位部位に結合するため、両方の分子が検体に同時に結合できる。このような結合アッセイは、溶液中で、および/または固体支持体に結合した結合分子もしくは検体で行うことができる。検体は、結合体と同時にまたは順に接触され得る。

【0071】

20

検体が第1の結合分子に結合している状態で検体に結合できるタンパク質を同定することにより、検体上の異なる部位に結合し、検体に同時に結合できる複数のタンパク質を得ることができる。従って、一実施形態では、タンパク質アレイは、結合タンパク質M1に結合した検体Aでスクリーニングされる。この複合体に結合するタンパク質は、診断アッセイにおいて第1の結合タンパク質として使用され得る。このように複数の結合タンパク質を同定することにより、検体に同時に結合する能力について、個別に単離された結合タンパク質を再度スクリーニングする必要が無くなる。

【0072】

あるいはまた、目的の検体を使用して、可能性のある結合タンパク質の集合をプロービングすることもできる。タンパク質の集合は、とりわけ、検体に結合するタンパク質の同定および単離を簡易化するために、アレイ状に配置されていることが好ましい。従って本発明は、タンパク質アレイを使用して、目的の検体に結合するタンパク質を同定することを意図する。目的の検体でスクリーニングして結合タンパク質を同定するために有用なあらゆるタンパク質のアレイが、本発明の方法により使用できる。このようなアレイは、タンパク質の任意の集合であり得、任意の由来源から得られ得る。

30

【0073】

目的の検体でスクリーニングして、検体と結合するタンパク質を同定するために、タンパク質マイクロアレイ(すなわち、タンパク質チップ)を使用することは、他のアプローチよりも有意な利点を有する。タンパク質マイクロアレイ技法のひとつの利点は、異なるタンパク質の大きな集合を、ハイスループットな手法で直接スクリーニングできる点である。さらに、アレイ上に配置するタンパク質をいったん調製すれば、タンパク質アレイスクリーニングは費用が高くなく、自動化に適合し、既存の装置および分析ソフトウェアを使用してスクリーニングの分析を迅速に行える。さらに、いったん同定されれば、(タンパク質アレイの調製プロセスにおいて目録化(inventoried)されたと思われる)目的のタンパク質をコードするクローンを増幅および発現させることができ、目的の検体に結合するタンパク質を、迅速かつ費用をかけずに大量に作製できる。

40

【0074】

タンパク質マイクロアレイを使用する別の利点は、位置特定可能なアレイにより、各タンパク質が固体上の既知の位置にあるという構成が得られ、目的の検体に結合した各タンパク質をアレイ上の位置から同定できる。従って、アレイ上の各タンパク質は、固体支持

50

体上の既知の所定の位置にあって、検体に結合した各タンパク質が固体支持体上の位置から同定できることが好ましい。

【0075】

タンパク質マイクロアレイを使用することのさらなる利点は、このようなマイクロアレイを検体以外の分子との結合活性についてテストすることにより、アレイ中のタンパク質についての相互作用プロファイルを展開できることである。例えば、目的の検体が、カルモジュリンに結合することが予め分かっている39の酵母タンパク質の1つと結合することが分かった場合(Zhuら, 2001, "Global analysis of protein activities using proteome chips", Science, 293:2101-2105)、該結合タンパク質を、その検体についての診断アッセイに使用できる。例えば、図3に示す模式図では、M1およびM2は検体に結合する2つのタンパク質であり、M2は予め同定されたカルモジュリン結合タンパク質でもある。この形式では、検体およびカルモジュリンがM2上の重複しない部位に結合するという前提で、検出可能シグナルDを生成可能な酵素と複合化したカルモジュリンは、結合分子M3として作用でき、アッセイにおけるリポーター分子として使用できる。

10

【0076】

タンパク質以外の分子は、診断アッセイ用の有用な試薬として使用できる。例えば、Zhuら(2001, "Global analysis of protein activities using proteome chips", Science, 293:2101-2105)は、およそ150の酵母タンパク質が、6つのリン脂質のいずれかに結合することが分かったことを報告している。従って、検体が、脂質に結合することが記録されたマイクロアレイ中の結合タンパク質に結合する場合、脂質の検出を使用して、検体への結合を測定できる。限定しない例では、目的の検体のサンプルを、検体に対する第1の結合分子が付着したマイクロタイタープレートのウェルに添加してもよい。サンプル中の検体の結合後、ウェルを洗浄し、特定の脂質にやはり結合する第2の結合分子を添加すればよい。結合していない第2の結合分子を全て除去した後、コグネイト脂質をウェルに添加し、ウェルを再度洗浄する。残った脂質の存在を測定することにより、サンプル中の検体の存在が示される。

20

【0077】

限定しない別の例として、Zhuら(2001, "Global analysis of protein activities using proteome chips", Science, 293:2101-2105)は、多数の酵母タンパク質が、核酸に結合することが同定されたことを報告している。脂質読み出しを使用する(脂質の検出により検体の存在が決定される)上述した形式と同様の診断形式では、核酸が検出される同様のアッセイを設計できる。従って、検体が、核酸に結合することが記録されたマイクロアレイ中の結合タンパク質に結合した場合には、核酸読み出し(核酸の検出)を使用して、検体への結合を測定し得る。限定しない例では、目的の検体のサンプルを、検体に対する第1の結合分子がウェルの表面に付着したマイクロタイタープレートのウェルに添加してもよい。サンプル中の検体の結合後、ウェルを洗浄し、特定の核酸に同じく結合する第2の結合分子を添加し得る。結合していない第2の結合分子を全て除去した後、コグネイト核酸をウェルに添加し、ウェルを再度洗浄し得る。その後、残った核酸を、直接測定、あるいはまた、核酸の測定前に、ポリメラーゼ連鎖反応(Mullis, 1990, "Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction", Ann. Biol. Clin. (Paris) 48(8):579-582; Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology)またはローリングサークル増幅(Hatchら, 1999, "Rolling circle amplification of DNA immobilized on solid surfaces and its application to multiplex mutation detection", Genet. Anal. 15(2):35-40); Deanら, 2001, "Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification", Genome Res. 11:1095-1099; SchweitzerおよびKingsmore, 2001, "Combining nucleic acid amplification and detection", Curr. Opin. Biotech. 12:21-27を含む(がこれらに限定されない)当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかにより核酸を増幅してもよい。

30

40

また、タンパク質マイクロアッセイを使用して、検体に結合する分子を同定するだけでなく、検体に結合する分子に結合する複数の分子を同定することができる。限定しない例

50

として、全ての可能性のある互いの相互作用についてタンパク質の集合をテストすることにより、アレイ中の全てのタンパク質について、相互作用プロファイルを記録できる。このような相互テストは、同定されたカルモジュリン結合タンパク質を使用して、他の全てのタンパク質のアレイを、アレイ中の他の全てのタンパク質に対するタンパク質アレイに対してスクリーニングして、相互作用プロファイルデータベースを作成することにより、ピオチン化カルモジュリンの評価を拡張することにより達成され得る (Zhuら 2001, "Global analysis of protein activities using proteome chips", Science. 293:2101-2105)。このようなデータベースは、グループ中のタンパク質間の既知の相互作用を全て含み得る。例えば、酵母プロテオームの全体または一部を含むタンパク質グループを使用して、タンパク質アレイを調製してもよい。アレイの各タンパク質メンバーを使用して、アレイ中の他の任意のタンパク質に結合する能力について評価して、アレイ中の全てのタンパク質間の全ての相互作用を同定し得る。これらの相互作用は全て、相互作用プロファイルデータベースにおいて目録作成される。

10

【0078】

目的の検体、例えば、カルモジュリンが、アレイ中の第1の結合タンパク質に結合する場合、調査者は、相互作用プロファイルデータベースを参照して、第1の結合タンパク質の可能性のある結合体となりうるアレイ中のタンパク質(「第2レベルタンパク質」)だけではなく、第2レベルタンパク質に結合し得るタンパク質(「第3レベルタンパク質」)、第3レベルタンパク質に結合し得るタンパク質(「第4レベルタンパク質」)(以下同様)を都合良く予測できる。このような第2レベル、第3レベル、第4レベル(以下同様)の結合タンパク質は、様々な形式化された診断アッセイにおいて試薬として使用し得る。図4および5はそれぞれ、4つおよび5つの結合タンパク質を利用した診断アッセイ形式の限定しない模式的な例を示す。アッセイの形式は、タンパク質を互いと接触させる順序も異なり得る。アッセイの各結合タンパク質は、サンプルと順次に接触され得る。あるいはまた、第2および第3もしくは第3および第4レベル結合タンパク質、または3つのタンパク質全てを、サンプルとの接触前に互いと接触させてもよい。

20

【0079】

また、タンパク質相互作用データベースを使用して、検体が小分子である診断アッセイに有用な結合タンパク質を同定できる。小分子を使用して、第1の結合タンパク質を同定できる。いったん第1の結合タンパク質を同定すれば、タンパク質相互作用データベースを使用して、第2、第3および第4レベル結合タンパク質を予測し得る。これらの予測されたタンパク質結合体は、検体が小分子である診断アッセイで使用できる。

30

【0080】

上記例から予測された第2レベルタンパク質は潜在的に有用な試薬であるが、第2レベルタンパク質が、検体と、第1結合タンパク質上の同じ部位または重複した部位に結合する可能性もある。この場合、このような第2レベルタンパク質は、検体を検出するための診断試薬として有用でないかもしれない。第2レベル結合タンパク質の潜在的な有用性の判断は、例えば、検体を第1の結合タンパク質に結合して、タンパク質のアレイを、検体/第1結合タンパク質複合体でスクリーニングすることにより行うことができる。第2レベルタンパク質が、検体と、第1の結合タンパク質の異なる部位に結合する場合、複合体は、該第2のレベルタンパク質に結合することが予測されるが、第2レベルタンパク質が、検体と、第1の結合タンパク質上の同じ部位に結合する場合には、複合体は該タンパク質に結合するとは予想されない。検体のみを使用、および検体/結合タンパク質複合体を使用したスクリーニングアッセイから得た結果の比較により、重複および非重複結合体を区別できる。第2レベル、第3レベル、第4レベル(以下同様)、タンパク質も、互いの重複、対、非重複部位について同様にテストでき、このような情報を相互作用プロファイルデータベースと使用して、その後、有用な診断試薬を選択し易くする。

40

【0081】

従って、目的の検体に結合するタンパク質だけではなく、第2レベル、第3レベル、第4レベルタンパク質(以下同様)も同定するのに有用であるアレイとしては、複数のタンパ

50

ク質を含む位置特定可能アレイ(各タンパク質が固体支持体上の異なる位置に配置)が挙げられるがこれに限定されない。結合タンパク質の同定および単離に有用なアレイの例は、2001年11月8日にYale Universityに発行されたPCT国際特許公報第W0 0183827号に記載されている(その全体が参照により本明細書に援用される)。目的の結合タンパク質のスクリーニング、同定および単離に使用できるタンパク質アレイの具体的な例としては、Zhuら(2001, "Global analysis of protein activities using proteome chips", Science. 293:2101-2105)、ZhuおよびSnyder(2001, "Protein arrays and microarrays", Curr Opin Chem Biol. 5:40-45)、ならびにZhuら(2000, "Analysis of yeast protein kinases using protein chips", Nature Genet. 26:283-289)を参照のこと。

【0082】

一実施形態では、アレイは、複数のタンパク質を含み、これら複数のタンパク質は、単一種の既知遺伝子の少なくとも50%または70%にコードされた少なくとも1つのタンパク質を含む。別の実施形態では、アレイは、複数のタンパク質を含み、これら複数のタンパク質は、単一種において発現される全タンパク質の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%を含む(ここで、タンパク質アイソフォームおよびスプライス変異体は単一タンパク質として数えられる)。別の実施形態では、アレイは、複数のタンパク質を含み、これらの複数のタンパク質は、単一種において発現される少なくとも1000、1500、2000、2500、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000または10000のタンパク質を含む。さらに別の実施形態では、アレイは、複数のタンパク質を含み、これらの複数のタンパク質は全体で、単一種の少なくとも1000、1500、2000、2500、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000または10000の異なる既知遺伝子にコードされるタンパク質を含む。1つの特定の実施形態では、種は酵母である。別の特定の実施形態では、種はヒトである。別の特定の実施形態では、種は線虫(*C.elegans*)である。別の実施形態では、種は、大腸菌等の細菌である。さらに別の実施形態では、種は、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)等の植物である。

【0083】

高密度タンパク質アレイを作成して、タンパク質の存在および/または結合についてのアッセイをハイスループットな手法で実施できる。例えば、タンパク質チップは、固体支持体の表面上にプリンティングされた複数のタンパク質を含み得る。ここで、プリンティング密度は、少なくとも100プリンティング/cm²、1000プリンティング/cm²、10,000プリンティング/cm²、100,000プリンティング/cm²、1,000,000プリンティング/cm²、10,000,000プリンティング/cm²、25,000,000プリンティング/cm²、10,000,000,000プリンティング/cm²、または100,000,000,000プリンティング/cm²である。チップ上の個々のタンパク質サンプルは、別個の「プリンティング」を構成する。

【0084】

タンパク質チップは、固体支持体の表面上に複数のウェルを含み得る。ここで、ウェル密度は、少なくとも100ウェル/cm²、1000ウェル/cm²、10,000ウェル/cm²、100,000ウェル/cm²、1,000,000ウェル/cm²、10,000,000ウェル/cm²、25,000,000ウェル/cm²、10,000,000,000ウェル/cm²または100,000,000,000ウェル/cm²である。複数のプリンティングまたは複数のウェルを含む種々のタンパク質アレイは、本発明の方法のために有用であり、例えば、2001年11月8日にYale Universityに発行されたPCT国際特許公報第W0 0183827号等、当該分野で公知である(その全体が参照により本明細書に援用される)。

【0085】

アレイ上のタンパク質は、原核生物または真核生物から誘導され得る。従って、アレイ上のタンパク質は、線虫、げっ歯類、サル、ショウジョウバエ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、シチメンチョウ、ウズラ、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、ヒト、酵母、細菌、植物またはウイルスから誘導され得る。例えば、植物由来の結合タンパク質は、目的の検体について、動物由来型(特にヒト由来型)サンプルをスクリーニングするのに特に有用であり得る。このようなタンパク質はまた、タンパク質の生成、精製、結合等に有用であるが、天然型の目的のタンパク質では通常見とめられない天然または合成のア

10

20

30

40

50

ミノ酸も含み得る。このような場合、天然型タンパク質に対して外来のアミノ酸(または他の改変)の存在にもかかわらず、タンパク質は、天然型タンパク質が由来する種に由来すると考えられる。

【0086】

アレイ上のタンパク質は、完全長タンパク質、キメラタンパク質、完全長タンパク質の一部、および(天然または合成の)ペプチドを含み得、これらは、例えば、組換え過剰発現、大きいタンパク質の断片化、および/または化学合成により調製され得る。タンパク質は、例えば、酵母、細菌、昆虫、ヒトまたはげっ歯類に由来する細胞において過剰発現され得る。さらに、天然型または合成タンパク質に付着した規定ドメインを含む融合タンパク質が使用できる。

10

【0087】

タンパク質は、タンパク質チップへの付着前または付着時に、人工または天然の膜(例えば、リポソーム、膜断片、膜小胞)に埋め込まれ得る。また、タンパク質は、タンパク質チップの固体支持体に付着され得る。あるいはまた、タンパク質は、タンパク質チップのウェルに送達され、そこでタンパク質チップの固体支持体に結合しないままであってもよい。

【0088】

タンパク質チップの固体支持体は、例えば、微小加工、マイクロリソグラフィまたは成形に適した、シリコン、ガラス、石英、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート(Lucite)、セラミック、非晶質炭化ケイ素、ポリスチレン、ニトロセルロース、アクリルアミド、アガロース、金、および/または任意の他の材料を含み得る。2001年11月8日にYale Universityに発行されたPCT国際特許公報第W0 0183827号(参照によりその全体を本明細書に援用する)を参照のこと。一実施形態では、固体支持体は、疎水性マイクロタイタプレート(例えば、Millipore(商標))を含む。別の実施形態では、固体支持体はスライドガラスを含む。具体的な実施形態では、固体支持体は、ニッケル被膜スライドガラスを含む。

20

【0089】

タンパク質チップ上の各タンパク質は、検体と接触され得、結合を検出および定量できる。検体とアレイ上のタンパク質との結合は、例えば、放射活性物質で標識化したリガンドを使用し、その後オートラジオグラフィおよび/もしくはホスホイメージ化分析; 酵素もしくはハプテンの結合(これは、その後蛍光標識または酵素標識された抗体を使用して、またはビオチンもしくはストレプトアビジン等の高親和性ハプテンリガンドを使用して検出される); 質量分析法; 原子間力顕微鏡法; 表面プラスモン共鳴; 蛍光偏光(polarization)法; 赤外線標識化合物もしくはタンパク質; 増幅可能オリゴヌクレオチド、ペプチドもしくは分子質量標識; タンパク質の酵素活性の刺激もしくは阻害; ローリングサークル増幅検出; 競合PCR; 比色手法; または生物学的アッセイ(例えば、ウイルス力価)を使用して検出され得る。

30

【0090】

ビオチン化検体を使用して、タンパク質アレイをスクリーニングして、検体と結合タンパク質との結合の検出を補助し得る。弱くビオチン化されたタンパク質は、結合活性をより維持しやすい。つまり、緩いビオチン化処置の方が、検体の結合活性を保持するために好ましい。従って、特定の実施形態では、ビオチン伝達(biotin-transferring)化合物(例えば、スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン; Pierceカタログ番号21338、USA)を用いて、検体を異なる程度にビオチン化する。結合した検体は、例えば、蛍光標識化アビジン化合物とのインキュベーションにより同定され得る。

40

【0091】

あるいはまた、チップ上のタンパク質と検体とのインキュベーションの後、結合した検体を、例えば、質量分析法により同定できる(Srinivasら, 2001, "Proteomics in early detection of cancer", Clin Chem. 47:1901-1911; Lakeyら, 1998, "Measuring protein-protein interactions", Curr Opin Struct Biol. 8:119-123)。

50

【0092】

従って、一実施形態では、目的の検体に結合するタンパク質は、(a)検体を、各タンパク質が固体支持体上の異なる位置に配置された、複数のタンパク質を含む位置特定可能アレイと接触させること；および(b)全ての検体-タンパク質相互作用を検出することにより同定でき、ここで、該複数のタンパク質は、単一種の既知遺伝子の少なくとも50%または少なくとも70%にコードされた少なくとも1つのタンパク質を含み、および固体支持体上の位置における相互作用の検出により検体に結合するタンパク質が同定される。

【0093】

別の実施形態では、目的の検体に結合するタンパク質は、(a)検体を、各タンパク質が固体支持体上の異なる位置に配置された、複数のタンパク質を含む位置特定可能アレイと接触させること；および(b)全ての検体-タンパク質相互作用を検出することにより同定でき、ここで、該複数のタンパク質は、単一種において発現される全タンパク質の少なくとも50%を含み(タンパク質アイソフォームおよびスプライス変異体は単一のタンパク質として数えられる)、および固体支持体上の位置における相互作用の検出により検体に結合するタンパク質が同定される。

10

【0094】

別の実施形態では、目的の検体に結合するタンパク質は、(a)検体を、各タンパク質が固体支持体上の異なる位置に配置された、複数のタンパク質を含む位置特定可能アレイと接触させること；および(b)全ての検体-タンパク質相互作用を検出することにより同定でき、ここで、該複数のタンパク質は、単一種において発現される少なくとも1000のタンパク質を含み、および固体支持体上の位置における相互作用の検出により検体に結合するタンパク質が同定される。

20

【0095】

さらに別の実施形態では、目的の検体に結合するタンパク質は、(a)検体を、各タンパク質が固体支持体上の異なる位置に配置された、複数のタンパク質を含む位置特定可能アレイと接触させること；および(b)全ての検体-タンパク質相互作用を検出することにより同定でき、ここで、凝集した該複数のタンパク質は、単一種の少なくとも1000の異なる既知遺伝子によりコードされるタンパク質を含み、および固体支持体上の位置における相互作用の検出により検体に結合するタンパク質が同定される。

【0096】

目的の検体に結合する、比較的低い濃度の分子を、高親和性結合分子を用いるアッセイに使用できる。さらに、高親和性結合分子を使用することで、より大きな特異性およびより低いバックグラウンドシグナルを生じ得る。高親和性結合タンパク質は、ストリンジエントな条件下(例えば、界面活性剤の存在下、および/または高いもしくは低いpH、および/または低濃度の検体もしくは候補結合分子)で、検体との結合アッセイを行うことにより同定および単離できる。具体的な検体および/または結合分子に応じて、高濃度の界面活性剤の存在下において、スクリーニングアッセイを行うことができる。スクリーニングアッセイを行う温度および浸透圧強度を変化させても、ストリンジエンシーに影響を与えることができる。

30

【0097】

タンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定された目的の検体に結合するタンパク質は、例えば、ハイスループット分析に向けた簡単に測定可能な形式において、合成および単離できる。このような方法としては、自動技術に適合したアレイ形式でタンパク質を合成および精製することが挙げられるがこれに限定されない。例えば、目的の検体に結合するタンパク質を合成および単離する方法は、調節配列に作用可能に連結した異種配列を有するベクターで形質転換された真核生物細胞を成長させるステップ、該調節配列を、異種配列にコードされたタンパク質の発現を増強させるインデューサーと接触させるステップ、細胞を溶解するステップ、タンパク質を剤と接触させて、タンパク質と剤との複合体を形成させるステップ、該複合体を細胞屑から単離するステップ、および該複合体からタンパク質を単離するステップを含み、ここで各ステップは96ウェル形式で行われる。

40

50

【0098】

タンパク質合成を駆動させる誘導可能プロモーターを有するあらゆる発現構築物が使用できる。発現構築物は、形質転換のために使用する細胞型に合わせることが好ましい。培養で成長可能なあらゆる宿主細胞が、目的の検体に結合するタンパク質を合成するために使用できる。発現構築物と宿主細胞との適合性は、当該分野で公知である。タンパク質を過剰生成し、タンパク質の適切な合成、折畳み、および翻訳後修飾を生じさせる宿主細胞が好ましい。このようなタンパク質プロセッシングにより、本発明のアッセイに有用なエピトープ、結合部位等が形成されることが好ましい。従って、真核生物細胞(例えば、酵母、昆虫細胞、ヒト細胞)を使用して、真核生物細胞を合成することが好ましい。操作されたタンパク質の発現に有用な細胞は当該分野で公知であり、このような細胞の変異体および発現系は、当業者に理解され得る。

【0099】

一実施形態では、真核生物発現系を使用する。例えば、InsectSelect系(Invitrogen, Carlsbad, CA)は、高品質タンパク質の発現を簡易化して、ウイルス株の生成および増幅の必要を無くす。この系における好ましいベクターは、pIB/V5-His TOP0 TAベクター(カタログ番号K890-20)である。

【0100】

別の実施形態では、BAC-T0-BACTM系(Lifetech, Rockville, MD)が使用できる。BAC-T0-BACTM系は、大腸菌において、相同組換えではなく部位特異的転位に依存して、組換えバキュロウイルスを生成する。遺伝子発現は、高度に活性なポリヘドリンプロモーターにより駆動され、従って、目的のタンパク質は、感染昆虫細胞において25%に及ぶ細胞タンパク質を占め得る。

【0101】

別の実施形態では、酵母発現系を使用する。具体的な別の実施形態では、酵母発現系を使用して、目的の検体に結合する酵母タンパク質を過剰発現させる。

【0102】

細胞サイクルの任意の時点において、タンパク質を細胞から回収することができるが、タンパク質合成が増強される対数期の中に細胞を単離することが好ましい。例えば、酵母細胞は、 $OD_{600} = 0.3 \sim OD_{600} = 1.0$ 、好ましくは $OD_{600} = 0.5 \sim OD_{600} = 0.9$ 、より好ましくは $OD_{600} = 0.6 \sim OD_{600} = 0.8$ で回収され得る。別の実施形態では、酵母細胞は、 0.5×10^6 細胞/ml $\sim 1.0 \times 10^6$ 細胞/ml、好ましくは 0.6×10^6 細胞/ml $\sim 0.9 \times 10^6$ 細胞/ml、より好ましくは 0.7×10^6 細胞/ml $\sim 0.8 \times 10^6$ 細胞/mlの密度で回収され得る。特定の実施形態では、休止(mid-log)期後の時点において、タンパク質が細胞から回収される。

【0103】

具体的な実施形態では、酵母細胞は、 $OD_{600} = 0.3$ 、 $OD_{600} = 0.4$ 、 $OD_{600} = 0.5$ 、 $OD_{600} = 0.6$ 、 $OD_{600} = 0.7$ 、 $OD_{600} = 0.8$ または $OD_{600} = 0.9$ で回収される。別の具体的な実施形態では、酵母細胞は、 0.5×10^6 細胞/ml、 0.6×10^6 細胞/ml、 0.7×10^6 細胞/ml、 0.8×10^6 細胞/ml、 0.9×10^6 細胞/ml、または 1.0×10^6 細胞/mlの密度で回収される。回収された細胞は、今後の操作のために冷凍保存され得る。

【0104】

回収された細胞は、当該分野で公知の様々な方法により溶解され得る。溶解方法は、宿主細胞の種類に適しているべきである。例えば、新鮮なプロテアーゼ阻害剤を含む溶解緩衝液を、細胞壁を破壊する剤(例えば、砂、ガラスビーズ、ジルコニアビーズ)と共に、酵母細胞に添加し、その後、混合液をシェーカー(例えば、ボルテックサー、ペンキシェーカー)を用いて激しく振とうさせる。得られた細胞屑は、例えば遠心分離により、タンパク質から分離できる。さらに、ハイスループットな手法で、タンパク質サンプルの純度を上げるために、タンパク質富化上清をろ過してもよい。フィルターは、タンパク質結合の低い固体支持体を含むことが好ましい。好適な実施形態では、非タンパク質結合固体支持体に載せたフィルターを使用する。さらに、これらのステップを、細胞屑を含む画分に対して繰り返して、タンパク質の収量を増加することができる。

10

20

30

40

50

【0105】

次いで、目的の検体に結合するタンパク質が、当該分野で公知の様々な親和精製法を使ってタンパク質富化上清から精製され得る。融合タンパク質の親和精製法に有用な親和性タグとしては、カルモジュリン結合タンパク質、ウシ膵臓トリプシン阻害剤、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(「GSTタグ」)、抗原またはプロテインA、マルトース結合タンパク質、ポリヒスチジン(「Hisタグ」)、およびアビジン/ストレプトアビジンにそれぞれ結合する、カルモジュリン、トリプシン/アンヒドロトリプシン、グルタチオン、免疫グロブリンドメイン、マルトース、ニッケル、またはビオチンおよびその誘導体、が挙げられるがこれらに限定されない。目的の検体に結合するタンパク質を含む融合タンパク質は、適切な結合化合物を用いて親和精製され、例えば、低タンパク質結合フィルター上の結合タンパク質を含む複合体を捕捉することにより単離できる。タンパク質の一方の端部に1つの親和性タグを配置し、タンパク質の他方の端部に第2の親和性タグを配置することにより、完全長タンパク質の精製を助けることができる。

10

【0106】

精製タンパク質は、タンパク質を安定化し、サンプルの乾燥を防ぐ媒体に保存されることが好ましい。例えば、精製タンパク質は、例えば、15%~50%グリセロール、好ましくは約40%グリセロール等の高粘性液体中に保存され得る。具体的な実施形態では、精製タンパク質は、10%、20%、30%、40%、50%、60%または70%グリセロール、好ましくは15%~55%グリセロール；より好ましくは25%~45%グリセロールの溶液中に保存される。

20

【0107】

5.1. 検体に結合する非抗体分子を使用して検体を検出する方法

本発明は、分子を使用して検体(すなわち、分析過程において検出または測定される目的の分子)を検出および/または測定するアッセイに関し、ここで少なくとも1つの分子が非抗体タンパク質であり、少なくとも1つのタンパク質が検体の種と異なる種に由来する。本発明は、検体に結合するか、または検体に結合した別の異なる分子に結合する少なくとも1つの分子、好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9または10つの異なる分子、より好ましくは2、3、4または5つの異なる分子、最も好ましくは2または3つの異なる分子の使用を意図する。具体的な実施形態では、2つのこのような分子は非抗体タンパク質であり、検体の種と異なる種に由来し、サンプル中の検体の存在および/または濃度

30

【0108】

図2Aに模式的に示す限定しない例である一実施形態では、本発明は、検体を検出または測定する方法であり、該方法は、(a)生体分子検体に結合する第1の分子と検体を含むサンプルとを、該検体が第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合した検体を、該第1の分子に結合している該検体に結合する第2の異なる分子と、該検体が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(c)該第2の分子と検体との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、該第1および第2の分子の少なくとも一方は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後のいずれかにおいて固体支持体に付着され；結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示す。好適な実施形態では、第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である。好適な実施形態では、結合は、検体が第1の分子に結合しているときに検出または測定する。別の好適な実施形態では、結合は、検体が、第1の分子を介して固体支持体に結合しているときに検出または測定する。

40

【0109】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、

50

ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子(例えば、汚染物、過剰試薬)を除去する。

【0110】

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子を、サンプルと順次に接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触され得る。また、結合分子を、目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

【0111】

図2Bに模式的に示す限定しない例である別の実施形態では、本発明は、検体を検出または測定する方法であり、該方法は、(a)生体分子検体に結合する第1の分子と検体を含むサンプルとを、該検体が第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)結合した検体を、該第1の分子に結合している該検体に結合する第2の異なる分子と、該検体が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該第2の分子と検体との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、該第1および第2の分子の少なくとも一方は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示す。好適な実施形態では、第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である。好適な実施形態では、結合は、検体が第1の分子に結合しているときに検出または測定する。別の好適な実施形態では、結合は、検体が、第1の分子を介して固体支持体に結合しているときに検出または測定する。

10

20

【0112】

代替的な実施形態では、結合していないサンプルまたは結合分子を除去するステップは、ステップ(e)の前の任意のステップにおいて行ってもよい。例えば、ステップ(b)および(d)の代わりに、ステップ(e)の前にいくつかのステップを導入して、結合していないサンプル、結合していない第1の分子または結合していない第2の分子を選択的に除去できる。

【0113】

異なる分子はそれぞれ、目的の検体に結合し得る。あるいはまた、第2の異なる分子は、検体に結合した第1の分子に結合し得る。さらに、図3に模式的に示す限定しない例では、第3の異なる分子が第2の分子に結合し得る。さらに、図4Bに模式的に示す限定しない例では、第4の異なる分子が第3の分子に結合し得る。さらに図5Cに模式的に示す限定しない例では、第5の異なる分子が第4の分子に結合し得、以下同様に続く。一実施形態では、検体に結合した異なる分子に結合する1つを上回る異なる二次分子を使用して、図4Aおよび5Aに模式的に示す限定しない例のように、検体の存在および/または量に対応するシグナルを増幅させる。さらに一実施形態では、図4B、5Bおよび5Cの模式的に示す限定しない例のように、検体、または検体に結合する1つ以上の異なる分子のいずれかに結合する異なる分子に結合する1つを上回る異なる二次分子を使用して、検体の存在および/または量に対応するシグナルを増幅させる。上記実施形態に記載したような分子の「カスケード」様結合は、検体にのみ結合する分子を使用した場合に得られるシグナルを何倍も増幅することにより、低存在量の検体を検出するのに有効であり得る。アッセイの感度の増強は、標的検体がサンプル中に低濃度で存在する場合に特に有利である。

30

40

【0114】

多くの分子は、異なるコンホメーションで存在し、これらの分子の一部は、特定の第2の分子に結合した場合にのみ特定のコンホメーションをとる。このようなアロステリックな変化は、シグナル伝達に關与するタンパク質において一般的に見とめられる。本発明は、このようなアロステリックタンパク質を結合タンパク質として有利に利用できる。例えば、図6に限定しない例を示すこのような実施形態のひとつでは、本発明は、検体を検出

50

または測定する方法であって、該方法は、(a)生体分子検体に結合する第1の分子を、検体を含むサンプルと、該検体が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合した第1の分子を、該検体と結合している場合にのみ該第1の分子と結合する第2の異なる分子と、第2の分子が第1の分子と結合する条件下で、接触させるステップ；および(c)第2の分子と第1の分子との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、該第1の分子は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；および結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示す。

【0115】

好適な実施形態では、結合は、検体が第1の分子に結合しているときに検出または測定する。別の好適な実施形態では、検体が、第1の分子を介して固体支持体に結合しているときに、結合を検出または測定する。

10

【0116】

一実施形態では、第1の分子にそれぞれ結合する異なる第2の分子を使用する。別の実施形態では、第2の分子に結合する第3の分子を使用する。好適な実施形態では、検体に結合する分子は、検体の種とは異なる種に由来する非抗体タンパク質である。

【0117】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子(例えば、汚染物、過剰試薬)を除去する。

20

【0118】

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子を、サンプルと順次に接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触され得る。また、結合分子を、目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

【0119】

別の実施形態では、本発明は、検体を検出または測定する方法であり、該方法は、(a)生体分子検体に結合する第1の分子と検体を含むサンプルとを、該検体が第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)結合した第1の分子を、該検体が結合している該第1の分子に結合する第2の異なる分子と、該第1の分子が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該第2の分子と該第1の分子との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、該第1の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示す。

30

40

【0120】

好適な実施形態では、結合は、検体が第1の分子に結合しているときに検出または測定する。別の好適な実施形態では、検体が第1の分子を介して固体支持体に結合しているときに、結合を検出または測定する。

【0121】

一実施形態では、第1の分子にそれぞれ結合する異なる第2の分子を使用する。別の実施形態では、第2の分子に結合する第3の分子を使用する。好適な実施形態では、検体に結合する分子は、検体の種とは異なる種に由来する非抗体タンパク質である。

【0122】

代替的な実施形態では、結合していないサンプルまたは結合分子を除去するステップは

50

、ステップ(e)の前の任意のステップにおいて行われ得る。例えば、ステップ(b)および(d)の代わりに、ステップ(e)の前にいくつかのステップを導入して、結合していないサンプル、結合していない第1の分子、または結合していない第2の分子を選択的に除去できる。

【0123】

図7に限定しない例を模式的に示す別の実施形態では、本発明は、既知リガンドに結合する検体を検出または測定する方法であって、該方法は、(a)生体分子検体のリガンドであることが既知の第1の分子を、検体を含むサンプルと、該検体が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)結合した検体を、該第1の分子に結合している該検体と結合する第2の異なる分子と、該検体が該第2の分子と結合する条件下で、接触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該第2の分子と該検体との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、該第1の分子は該検体のリガンドであり、該第2の分子は該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後のいずれかにおいて固体支持体に付着され；および結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示す。

10

【0124】

好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が第1の分子に結合しているときに検出または測定する。別の好適な実施形態では、検体が第1の分子を介して固体支持体に結合しているときに、結合を検出または測定する。

20

【0125】

別の実施形態では、リガンドおよび結合分子は、サンプルと同時に接触させる。一実施形態では、結合していないサンプルまたは結合分子を除去するステップは、ステップ(e)の前の任意のステップにおいて行われ得る。

【0126】

別の実施形態では、検体は抗体である。さらに別の実施形態では、検体は、疾患を患う個体が生成する抗体であり、該抗体の生成は疾患を指示するものである。さらに別の実施形態では、検体は、感染性生物に応答して患者により生成される抗体である。さらに別の実施形態では、上記検体の過剰生成は、疾患の原因である。さらに別の実施形態では、上記検体の過剰生成は、疾患を示すものである。さらに別の実施形態では、1つ以上の他の異なる分子が、目的の検体に結合し得る。あるいはまた、さらに別の実施形態では、1つ以上の他の分子が、検体に結合した第2の分子に結合し得る。さらに他の実施形態では、第2の分子に結合する分子に結合するか、または他の二次分子に結合する二次分子も採用する。

30

【0127】

別の実施形態では、診断アッセイに使用する結合タンパク質を同時に添加して、中間の洗浄ステップを省略するが、酵素的読み出しを使用する場合には、最終的な洗浄ステップは行って、基質等の特定の検出分子を添加する前に結合していない分子を全て除去する。

【0128】

さらに別の実施形態では、診断テストにおける全ての洗浄ステップを省略し、当該分野で周知のいくつかのアプローチのいずれかにより、アッセイをいわゆる「均一アッセイ」として形式化する。当該分野で公知の均一アッセイの例としては、(a)リポーター移動度(mobility)の変化(スピン分離ピーク(splitting peak)の広がり)により結合タンパク質と検体との結合を検出する、スピン標識化リポーター；(b)蛍光効率の変化、またはFRET(蛍光エネルギー移動顕微鏡検査；例えば、Kenworthy, 2001, "Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy", *Methods*, 24:289-296)により結合を検出する、蛍光リポーター；(c)シンチレーション近接(proximity)(例えば、AldertonおよびLowe, 1999, "Scintillation proximity assay to measure nitroarginine and tetrahydrobiopterin binding to heme domain of neuronal nitric oxide synthase", *Methods Enzymol.* 301:114-125)；(d)結合により酵素/基質相互作用

40

50

が生じる、酵素リポーター；ならびに(e)結合により、リポソーム溶解およびカプセル化リポーターの放出が生じる、リポソーム結合リポーター(例えば、米国特許第6,214,970号を参照)が挙げられるがこれらに限定されない。

【0129】

タンパク質を固体支持体に付着させる分野において公知の任意の技術を使用して、分子を固体支持体に付着させることができる。一実施形態では、固体支持体は、ポリスチレンの96ウェルマイクロタイタープレートである。別の実施形態では、固体支持体は、ウェルに入れられる組成物(例えば、ニッケル被膜ビーズ、抗体複合型セファロース、磁気粒子)である。さらに別の実施形態では、固体支持体は、例えば、2001年11月8日にYale Universityに発行されたPCT国際特許公報第W0 0183827号、およびZhuら(2000, "Analysis of yeast protein kinases using protein chips", Nature Genet. 26:283-289)に記載されるようなナノアレイデバイスのウェルである。

10

【0130】

検体に結合する分子、または検体に結合した分子に結合する分子は、あらゆるタンパク質由来源からのものであり得る。一実施形態では、分子は、合成タンパク質の集合から誘導される。別の実施形態では、分子は原核生物に由来する。別の実施形態では、分子は真核生物に由来する。別の実施形態では、分子は脊椎動物に由来する。別の実施形態では、分子は哺乳動物に由来する。別の実施形態では、分子は霊長類に由来する。別の実施形態では、分子は、げっ歯類、昆虫、線虫または植物に由来する。具体的な実施形態では、分子は、例えば、サル、ショウジョウバエ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、シチメンチョウ、ウズラ、ネコ、イヌ、マウス、ラットまたはウサギに由来する。具体的な実施形態では、分子は酵母に由来する。

20

【0131】

検体に結合する分子、または検体に結合した別の分子に結合する分子は、検体の種または他の分子の種と同じかまたは異なる種に由来し得る。しかし、検体の種と異なる種に由来する分子を使用することが、特に非特異的結合を減らすために有利である。例えば、植物種に由来する分子は、(目的の検体を含む)サンプルが由来する種において同種またはオーソロガス遺伝子生成物を持たない。従って、このような植物由来分子を、結合アッセイにおいて使用して、ヒト由来サンプルをスクリーニングすることは、検出可能なシグナルを生成し易く、偽陽性の生成が少ない。

30

【0132】

従って、一実施形態では、検体に結合する少なくとも1つの分子は、検体の種と異なる種に由来する。別の実施形態では、検体に結合する全ての異なる分子が、検体の種と異なる種に由来する。具体的な実施形態では、検体に結合する第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する。

【0133】

別の実施形態では、検体に結合する少なくとも1つの分子が、検体に結合する別の分子の種と異なる種に由来する。別の実施形態では、検体に結合する全ての異なる分子が、検体と異なる同じ種に由来する。さらに別の実施形態では、検体に結合する全ての分子が、検体の種と異なる種に由来し、これらの分子は、検体が由来する種において同種またはオーソロガス遺伝子生成物を持たない。具体的な実施形態では、検体に結合する第1および第2の分子は、検体の種と異なる同じ種に由来する。別の具体的な実施形態では、検体に結合する第1および第2の分子の少なくとも1つは、酵母に由来する。別の具体的な実施形態では、検体に結合する全ての異なる分子が、酵母に由来する。別の具体的な実施形態では、検体はヒトに由来し、第1の分子は酵母に由来する。さらに別の具体的な実施形態では、検体はヒトに由来し、第1または第2の分子の一方は酵母に由来する。

40

【0134】

特定の例では、検体は、特定の種に特異的でなくてもよく、従って、検体に結合するのに使用する分子は任意の種に由来し得る。例えば、一部の小分子、無機化合物、炭水化物、脂質、ステロイドホルモンまたは非天然型化合物は、種に由来しない、または種特異的

50

発現を示さないかもしれない。このような場合、検体についてテストするサンプルを得た種と異なる種に由来する結合分子の使用は、それでも有利である。なぜなら、サンプル中の他の分子は、結合分子と非特異的に交差反応する可能性が低いからである。

【0135】

本発明において、検体に結合する分子、または検体に結合した分子に結合する分子は、抗体または非抗体タンパク質であり得る。しかし、このような非抗体分子を、検体を検出および/または測定するアッセイにおいて使用することは、いくつかの利点を有する。このような非抗体分子は、当該分野で公知の抗体利用型診断アッセイの抗体の代わりに使用できる。このような非抗体分子は、標的検体が弱抗原性である場合に特に有用である。なぜなら、弱抗原性検体に対して十分な特異性および親和性を有する抗体を生成するのは困難であり得るからである。

10

【0136】

従って、一実施形態では、検体または検体に結合した分子に結合する2つ、3つまたは4つの分子は、非抗体タンパク質である。別の実施形態では、検体または検体に結合した分子に結合する全ての異なる分子が非抗体タンパク質である。別の実施形態では、検体に結合する第1の分子は非抗体タンパク質であり、検体に結合している第1の分子に結合する第2の分子は抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。別の実施形態では、検体に結合する第1の分子、および検体に結合した第1の分子に結合する第2の異なる分子は、非抗体タンパク質である。さらなる実施形態では、第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である。限定しない実施形態では、非抗体結合タンパク質に結合する抗体は、検出可能分子と複合化することから、リポーター分子として機能する。

20

【0137】

検体または検体に結合した分子に結合する分子は、キメラタンパク質、融合タンパク質、完全長タンパク質、タンパク質の一部、またはペプチドであり得る。一実施形態では、1つ、2つ、3つ、または4つの異なる分子をアッセイに使用して、検体を検出および/または測定する。

【0138】

検体または検体に結合した分子に結合する分子は、検出可能マーカーと複合化されているか、または検出可能マーカーに結合されているか、または検出可能マーカーと複合化されている。別の実施形態では、このような分子は、検出可能マーカーと複合化されている。別の実施形態では、このような分子は、検出可能マーカーを生成する酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ)と複合化されている。別の実施形態では、このような分子は、ハプテン(例えば、ビオチン、アビジン)と複合化されている。別の実施形態では、このような分子は検出可能マーカーに結合している。

30

【0139】

本発明のアッセイに有用な分子としては、タンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定される分子が挙げられる。検体または検体に結合した分子に結合する分子を同定および単離し、このようなアレイを用いて同定された分子を結合するのに有用なアレイの例は、2001年11月8日にYale Universityに発行されたPCT国際特許公報第W0 0183827号(その全体を参照により本明細書に援用する)に記載されている。また、Zhuら(2001, "Global analysis of protein activities using proteome chips", Science. 293:2101-2105)、ZhuおよびSnyder(2001, "Protein arrays and microarrays", Curr Opin Chem Biol. 5:40-45)、ならびにZhuら(2000, "Analysis of yeast protein kinases using protein chips", Nature Genet. 26:283-289)も参照のこと。そして、タンパク質、核酸および脂質が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0140】

従って、一実施形態では、検体に結合する(または検体に結合した別の分子に結合する、または異なる第1の分子に結合した第2の分子に結合する)タンパク質が、単一種における既知遺伝子の少なくとも50%または少なくとも70%によりコードされる少なくとも1

50

つのタンパク質を含むタンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定され、本発明のアッセイにおいて使用される。別の実施形態では、このようなタンパク質が、単一種において発現される全てのタンパク質の少なくとも50%を含むタンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定され、使用される(タンパク質アイソフォームおよびスプライス変異体は単一タンパク質として数える)。別の実施形態では、このようなタンパク質は、単一種において発現される少なくとも1000のタンパク質を含むタンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定され、使用される。さらに別の実施形態では、このようなタンパク質は、単一種における少なくとも1000の異なる既知遺伝子によりコードされるタンパク質を含むタンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定され、使用される。

10

【0141】

本発明のアッセイに有用な検体を含む可能性のあるサンプルとしては、水溶液、土、食物、糞便、植物もしくは動物細胞、組織もしくは組織抽出物、組織培養物、組織培養物抽出物、または組織培養媒体が挙げられるがこれらに限定されない。一実施形態では、検体の存在および/または量についてアッセイするサンプルは、患者サンプルである。さらなる実施形態では、患者サンプルは、血液、血清、リンパ液、血漿、乳汁、尿、唾液、胸水、涙液、髄液、組織浸潤または腫瘍浸潤物等の(ただしこれらに限定されない)生物学的流体である。別の実施形態では、患者サンプルは、組織または組織抽出物である。さらに別の実施形態では、患者サンプルは糞便である。具体的な実施形態では、サンプル組織は、生検から得られる。

20

【0142】

検体は生体分子であることが好ましい。検体は、無傷細胞または細胞の構成要素であってもよいがこれらに限定されない。しかし、検体は、小分子(例えば、ステロイド、医薬)であってもよい。小分子は、500ダルトン未満の分子量の非ペプチド化合物と考えられている。本発明の好適な実施形態における検体は有機分子であり、より好ましくは生体分子であるが、本発明の他の実施形態における検体は、鉱物、毒性無機化合物、無機汚染物質、非生物学的アレルゲン等の(ただしこれらに限定されない)非生体分子である。本発明の一つの具体的な実施形態では、検体は鉛である。別の具体的な実施形態では、検体は鉛であり、鉛の存在についてテストするサンプルはヒト患者から得る。

30

【0143】

従って、例えば、小分子は、アドレナリン、ノンアドレナリン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、皮質性ホルモン、アンドロゲン(例えば、テストステロン)、エストロゲン(例えば、エストラジオール)、またはプロゲステン(例えば、プロゲステロン)等の(ただし、これらに限定されない)ヒト由来ステロイドホルモンであり得る。

【0144】

診断アッセイは、植物タンパク質の集合から得た結合タンパク質を使用してホルモン検体を検出するように設計され得る。植物タンパク質アレイから得た結合タンパク質は、例えば上記同定したヒト由来ステロイドホルモンが由来する種と異なる種に由来する可能性が高い。なぜなら、ほとんどの哺乳動物ホルモンが植物に存在しないからである。例えば、ステロイドホルモンを使用して、植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)に由来するタンパク質の群を含むタンパク質アレイをスクリーニングできる。このスクリーニング方法により同定されたあらゆる結合タンパク質が、このようなホルモン検体を検出および同定するための診断アッセイにおいて結合タンパク質として使用できる。

40

【0145】

検体の例としては、細菌、ウイルス、抗原、抗体、およびポリヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されない。特に有用な検体は、疾患または障害と存在またはレベルが関連する、例えば、タンパク質、炭水化物、および脂質である。このような検体の存在またはレベルは、疾患または障害の危険性、発症、進行、緩和および/または鎮静と関連し得る。

【0146】

50

従って、検体は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、炭水化物、または脂肪酸を含む脂質であり得る。一実施形態では、検体は、リン酸化、グリコシル化またはアシル化等の(ただし、これらに限定されない)修飾を有するポリペプチドである。別の実施形態では、検体は、合成ペプチド、オリゴヌクレオチドまたは脂肪酸である。

【0147】

特定の実施形態では、検体は、ガストリン、セクレチン、コレシストキニン、インスリン、グルカゴン、チロキシン、トリヨードチロニン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン、チモシン、放出ホルモン、オキシトシン、バソプレシン、成長ホルモン、プロラクチン、メラニン細胞刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、またはメラトニン等の(ただし、これらに限定されない)ヒト由来ホルモンである。

10

【0148】

一実施形態では、検体は、疾患または障害に対するマーカーである。このような疾患または障害は、限定するものではないが、アレルギー、不安障害、自己免疫疾患、行動障害、出生異常、血液性障害、骨疾患、癌、循環疾患、歯の疾患、抑うつ障害、解離性障害、耳の症状、摂食障害、目の症状、食物アレルギー、食品媒介疾病、胃腸疾患、遺伝障害、心臓病、ホルモン障害、免疫不全、感染症、炎症疾患もしくは障害、昆虫媒介疾病、栄養障害、腎臓病、大脳白質萎縮症、肝疾患、精神衛生障害、代謝病、気分障害、筋変性(musculodegenerative)障害、神経障害、神経変性障害、神経筋障害、人格障害、恐怖症、妊娠合併症、プリオン病、前立腺病、心理的障害、精神障害、呼吸器系疾患、性障害、皮膚

20

【0149】

別の実施形態では、検体は、後天性免疫不全症候群(AIDS/HIV)もしくはHIV関連障害、アルパーズ(Alpers)症候群、炭疽病、ウシ海綿状脳症(BSE)、水疱瘡、コレラ、結膜炎、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、デング熱、エボラ、象皮病、脳炎、致死性家族性不眠症、第5病、ゲルストマン-ストロイスラー-シェンカー症候群、ハンタウイルス、ヘリコバクター・ピロリ、肝炎(A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎)、ヘルペス、インフルエンザ、クールー、らい病、ライム病、マラリア、出血熱(例えば、リフトバレー熱、クリミア-コンゴ出血熱、ラッサ熱、マルブルグウイルス病およびエボラ出血熱)、麻疹、髄膜炎(ウイルス性、細菌性)、単核細胞症、院内感染、中耳炎、骨盤炎症性疾患(PID)、ペスト、肺炎、ポリオ、プリオン病、狂犬病、リウマチ熱、バラ疹、ロス川ウイルス感染、風疹、サルモネラ症、敗血症関節炎、性感染症(STD)、帯状ヘルペス、天然痘、連鎖球菌性咽頭炎、破傷風、毒素性ショック症候群、トキソプラズマ症、トラコーマ、結核、野兔病、腸チフス、溪谷熱、百日咳、または黄熱病等の(ただしこれらに限定されない)感染または感染性疾患についてのマーカーである。

30

【0150】

別の実施形態では、検体は、アディソン病、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群(APS)、ベーチェット病、慢性疲労症候群、クローン病および潰瘍性大腸炎、線維筋痛、グッドパスチャー症候群、対宿主性移植片病、狼瘡(例えば、全身性エリテマトーデス)、メニエール病、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、サルコイドーシス、硬皮症、脈管炎、白斑またはヴェーゲナー肉芽腫症等の(ただしこれらに限定されない)自己免疫疾患についてのマーカーである。

40

【0151】

別の実施形態では、検体は、エカルディ症候群、白皮症、無脳症、チャージ症候群、口蓋裂、胎児アルコール症候群(FAS)、尿道下裂、脊椎披裂、血小板減少 橈骨欠損(TAR)症候群、または三染色体性等の(ただしこれらに限定されない)出生障害についてのマーカーである。

【0152】

別の実施形態では、検体は、貧血、抗リン脂質症候群(APS)、青色ゴムまり様母斑症候

50

群、通風、血友病、白血病、骨髄増殖性障害、敗血症、鎌状赤血球症、またはサラセミア等の(ただしこれらに限定されない)血液性障害についてのマーカーである。

【0153】

別の実施形態では、検体は、軟骨無形成症、骨肉腫、進行性骨化性線維形成異常症、線維性形成障害、レッグ カルヴェ ペルテス病、骨髄腫、変形性関節症、骨形成不全症、骨粗鬆症、パジェット病、または脊柱側弯症等の(ただしこれらに限定されない)骨疾患についてのマーカーである。

【0154】

別の実施形態では、検体は、象皮病、心臓病、ヘモクロマトーシス、血友病、高血圧、低血圧、クリペル トルノネー ウェーバー症候群、リンパ水腫、好中球減少症、末梢血管病(PVD)、静脈炎、レイノー現象、血栓症、双胎児間輸血症候群、または脈管炎等の(ただしこれらに限定されない)循環疾患についてのマーカーである。

【0155】

別の実施形態では、検体は、酸性マルターゼ欠乏症(acid maltase deficiency)、糖尿病、ガラクトース血症、低血糖症、レッシュ ナイハン症候群、メープルシロップ尿病(MSUD)、ニーマン ピック病、フェニルケトン尿症、または尿素回路障害等の(ただしこれらに限定されない)代謝病についてのマーカーである。

【0156】

別の実施形態では、検体は、虫垂炎、ボツリヌス中毒症、口内炎、セリアック病、結腸炎(潰瘍性結腸炎を含む)、周期性嘔吐症(CVS)、下痢、裂孔ヘルニア、感染性大腸炎(IBM)、過敏性腸症候群(IBS)、消化性潰瘍、原発性胆汁性肝硬変、サルモネラ中毒症、拒食症、過食症、ウシ海綿状脳症(BSE)、フグ毒、または憩室炎等の(ただしこれらに限定されない)栄養または胃腸障害についてのマーカーである。

【0157】

別の実施形態では、検体は、聴神経腫、コレステリン腫、難聴、乳様突起炎、メニエール病、耳炎、耳鳴り、または前庭障害等の(ただしこれらに限定されない)耳の障害についてのマーカーである。

【0158】

別の実施形態では、検体は、弱視、白内障、色覚異常、結膜炎、緑内障、円錐角膜、黄斑変症、小眼球症、無眼球症、網膜色素変性症、網膜芽腫、斜視、またはトラコーマ等の(ただしこれらに限定されない)目の障害についてのマーカーである。

【0159】

別の実施形態では、検体は、軟骨形成不全症、色覚異常、酸性マルターゼ欠乏症、副腎白質ジストロフィー、アイカルディ症候群、 α -1抗トリプシン欠乏症、アンドロゲン不感性症候群、アペール(Apert)症候群、不整脈惹起性右室異形成、毛細血管拡張性運動失調症、カナバン病、ネコ鳴き症候群、嚢胞性線維症、ダーカム病、家族性大腸腺腫症、家族性乳癌感受性、先天性再生不良性貧血(Fanconi anemia)、脆弱性X症候群、ガラクトース血症、ゴーシェ病、ヘモクロマトーシス、ハンチントン病、フルラー症候群、低ホスファターゼ血症、クラインフェルター症候群、クラッペ病、ランガー-ギーディオン症候群、大脳白質萎縮症、QT延長症候群、マルファン症候群、メビウス症候群、ムコ多糖症(MPS)、爪・膝蓋骨症候群、腎性尿崩症、ポルフィリン症、非遺伝性ポリープ症結腸直腸癌(NHPC)、プラダ-ウィリ症候群、早老症、プロテウス(Proteus)症候群、レット症候群、ルピンスタイン-テイビ症候群、サンフィリポ(Sanfilippo)症候群、シューバックマン(Shwachman)症候群、スミス-マゼニス(Smith-Magenis)症候群、スティックラー症候群、テイ・サククス病、トレチャー・コリンズ症候群、トリオースリン酸イソメラーゼ欠乏症、トリソミー、結節硬化症、ターナー症候群、尿素回路障害、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、または狭心症等の(ただしこれらに限定されない)遺伝病についてのマーカーであり得る。

【0160】

別の実施形態では、検体は、不整脈惹起性右室異形成、アテローム性動脈硬化症/動脈

硬化症、心筋症、先天性心疾患、心内膜炎、拡張型心筋症、心臓発作、心不全、心雑音、心臓動悸、高コレステロール、高トリグリセリド(high tryglycerides)、高血圧、QT延長症候群、僧帽弁逸脱、起立性頻拍症候群、ファロー四徴症、または血栓症等の(ただしこれらに限定されない)心臓病についてのマーカーであり得る。

【0161】

別の実施形態では、検体は、腎臓癌、腎感染、腎結石、腎臓移植、腎性尿崩症、腎臓学(nephrology)、または横紋筋融解症等の(ただしこれらに限定されない)腎障害についてのマーカーであり得る。

【0162】

別の実施形態では、検体は、副腎白質ジストロフィー、およびクラッペ病等の(ただしこれらに限定されない)大脳白質萎縮症についてのマーカーである。

10

【0163】

別の実施形態では、検体は、 α -1抗トリプシン欠乏症、ギルバート症候群、肝炎、または肝臓癌等の(ただしこれらに限定されない)肝臓障害についてのマーカーであり得る。

【0164】

別の実施形態では、検体は、双極性障害(躁鬱)、抑うつ障害、または季節性情動障害等の(ただしこれらに限定されない)気分障害についてのマーカーであり得る。

【0165】

別の実施形態では、検体は、アICALディ症候群、アルツハイマー病、健忘症、筋萎縮性側索硬化症(ルー・ゲーリック病)、無脳症、失語症、クモ膜炎、アーノルド-キアリ奇形、毛細血管拡張性運動失調症、パッテン病、ベル麻痺、上腕神経叢損傷、脳損傷、脳腫瘍、シャルコー-マリー-トゥス病、脳炎、癲癇、本態性振戦、ギラン・バレー症候群、水頭症、多汗症、クラッペ病、髄膜炎、メビウス症候群、筋ジストロフィー、多発性硬化症、パーキンソン病、末梢神経障害、起立性頻拍症候群、進行性核上麻痺、ライ症候群、帯状疱疹、シャイ・ドレーガー症候群(SDS)、痙性斜頸、二分脊椎、脊髄性筋萎縮症、スティフマン症候群、共感覚、脊髄空洞症、胸郭出口症候群、トゥレット症候群、トキソプラズマ症、または三叉神経痛等の(ただしこれらに限定されない)神経および筋骨格障害についてのマーカーであり得る。

20

【0166】

別の実施形態では、検体は、肺胞毛細管異形成、喘息、黒色肺、細気管支炎、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気腫、喉頭癌、喉頭軟化症、レジオネラ病、肺癌、肺リンパ脈管筋腫症(LAM)、肋膜炎(胸膜炎)、肺炎、呼吸窮迫症候群、呼吸合胞体ウイルス(RSV)、サルコイドーシス、珪肺症、鼻炎、扁桃炎、結核症、または渓谷熱等の(ただしこれらに限定されない)呼吸器疾患についてのマーカーであり得る。

30

【0167】

別の実施形態では、検体は、水疱瘡、慢性蕁麻疹(掻痒)、褥瘡性潰瘍、湿疹、エーラー・ダンロス症候群、表皮水疱症、壊疽、汗腺膿瘍、ホットタブ(hot tub)毛嚢炎、多汗症、魚鱗癬、膿痂疹、毛包性角化症、ハンセン病、麻疹、伝染性軟属腫、バラ色靴糠疹、ポルフィリン症、偽性毛嚢炎、乾癬、酒さ、風疹、強皮症、帯状疱疹、または皮膚癌等の(ただしこれらに限定されない)皮膚症状についてのマーカーである。

40

【0168】

別の実施形態では、検体は、シャーガス病、コレラ、デング熱、ジフテリア、赤痢(細菌性もしくはアメーバ性)、エボラ、脳炎、ランブル鞭毛虫症、ラッサ熱、リーシュマニア症、ハンセン病、マラリア、マールブルグ出血熱、髄膜炎、ポリオ、ロス川ウイルス感染、住血吸虫症、破傷風、結核、腸チフス、タイプス(typhus)、または黄熱病等の(ただしこれらに限定されない)熱帯病についてのマーカーであり得る。

【0169】

別の実施形態では、検体は、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ヒト免疫不全ウイルス-1、アデノウイルス、ライノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス-2、ヒトパピローマウイルス、HTLV-I、HTLV-II、またはHTLV-III等の(

50

ただしこれらに限定されない)ウイルスの構成要素であり得る。従って、別の実施形態では、検体は、ウイルスの構成要素であり得、ここで、該ウイルスは、ポックスウイルス科、イリドウイルス科、ヘルペスウイルス科、アデノウイルス科、パポバウイルス科、ヘパドナウイルス科、パルボウイルス科、レオウイルス科、ビルナウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、フィロウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブンヤウイルス科、アレナウイルス科、レトロウイルス科、ピコルナウイルス科、カルシウイルス科(Calciviridae)、またはクラミジア等のファミリーのメンバーである。

【0170】

別の実施形態では、検体は、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病(例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫)、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、子宮頸癌、睾丸癌、肺癌、膀胱癌、黒色腫、頭頸部癌、脳癌、原発部位不明癌、新生物、末梢神経系癌、中枢神経系癌；ならびに他の型および亜型の腫瘍(例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫(endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫(lymphangi endotheliosarcoma)、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、へん平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、小細胞肺癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髓芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、稀突起膠腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫)、重鎖病、転移、または非制御下もしくは異常細胞成長に特徴付けられる疾患もしくは障害等の(ただしこれらに限定されない)癌についてのマーカーである。

10

20

【0171】

具体的な実施形態では、検体は、rasタンパク質である。

【0172】

別の実施形態では、検体は、トリパノゾーマおよびリーシュマニア等のキネトプラスト目(Kinetoplastida)、ジアルジア等のディプロモナス亜目(Diplomonadina)、二核アメーバおよびトリコモナス等のトリコモナス目、ネグレリア等の裸変形虫目、エントアメーバおよびアカンソアメーバ(Acanthamoeba)等のアメーバ目、バベシア等の種虫綱(Sporozoasida)、ならびにイソスポラ、トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、アイメリア、テレルリア(Theileria)およびプラスモジウム等のコクシジウム亜綱(Coccidiasina)により引き起こされる原虫病等の(ただしこれらに限定されない)原虫症についてのマーカーである。

30

【0173】

別の実施形態では、検体は、回虫属、トキソカラ属、鉤虫、ストロンギロイデス属、鞭虫、蟯虫、ドラクンクルス属、旋毛虫属、および糸状虫等の線形動物門(回虫)、ならびに住血吸虫属、住血吸虫、肝吸虫、腸内吸虫、肺吸虫等の吸虫綱、および条虫等の多節条虫亜綱等の扁形動物門(扁形動物)により引き起こされる後生動物病等の(ただしこれらに限定されない)後生動物病についてのマーカーである。

【0174】

別の実施形態では、検体は、(例えば、B群連鎖球菌、リステリア・モノサイトゲネス、髄膜炎菌、ブドウ球菌、サルモネラ菌、または大腸菌により引き起こされる)細菌疾患、マイコバクテリア症、スピロヘータ症、クラミジア、リケッチア症、または真菌病についてのマーカーである。

40

【0175】

他の症状についての検体マーカーもアッセイでき、妊娠、アルコール依存症、薬物中毒、アレルギー、中毒、治療に対する二次影響もしくは応答、または疾患の二次影響が挙げられるがこれらに限定されない。

【0176】

検出可能マーカーは、裸眼で見るか、または光学フィルタの助けを借りて可視化できる

50

。そのようなものとして、検出可能マーカーは、金属ゾル粒子、金ゾル粒子、染料ゾル粒子、染色ラテックス粒子、およびリポソームでカプセル化された染料を含む(ただし、これらに限定されない)比色標識であり得る。他の検出可能マーカーとしては、放射性核種、蛍光部分、および発光部分が挙げられるがこれらに限定されない。一実施形態では、目的の検体に結合する分子は、検出可能マーカーと複合化される。別の実施形態では、検出可能マーカーと複合化した分子は、直接的または間接的に検体に結合する分子に結合する。

【0177】

別の実施形態では、検体に結合する分子、または検体に結合する別の分子に結合する分子は、検出可能であるか、または検出可能マーカーを生成できる酵素と複合化している。好適な実施形態では、検体に結合する別の分子に結合する分子は、このような酵素と複合化している。当該分野で公知の多数の酵素が、本発明のアッセイのために有用である(例えば、Engvall, 1980, "Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT", Methods of Enzymology, 70:419-439を参照のこと)。従って、検体に結合する分子、または別の分子に結合する分子は、例えば、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、リゾチーム、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、またはウレアーゼと複合化し得る。

【0178】

別の実施形態では、検出可能マーカーは、分子と検体との結合により形成される複合体と接触させてから、直接可視化する。例えば、検体に結合する分子を指向するか、または複合体を指向する蛍光タグ付け抗体は、複合体に結合した後に、エピ蛍光(epifluorescence)により検出され得る。

【0179】

検体と分子との結合は、例えば、放射活性物質標識化リガンドを使用した後に、オートラジオグラフィおよび/またはホスホイメージ化分析を行うことにより検出され得る；ハプテンの結合後、それを蛍光標識化もしくは酵素標識化抗体、またはビオチンもしくはストレプトアビジン等の高親和性ハプテンリガンドにより検出する；質量分析法；原子間力顕微鏡法；蛍光偏光法；赤外線標識化合物もしくはタンパク質；放射性物質標識化、蛍光標識化もしくは増幅可能オリゴヌクレオチド；検体、または検体もしくは検体に結合する別の分子に結合する分子の生物学的活性の刺激または阻害；ローリングサークル増幅-検出法；競合PCR；比色手法；または(例えば、ウイルス力価についての)生物学的アッセイ。

【0180】

一実施形態では、本発明のアッセイにより得られる値は、定量的な値である。別の実施形態では、アッセイにより得られる値は、半定量的または定質的な値(すなわち、閾値の上下)である。

【0181】

結合アッセイは、例えば、バッチ様式でアッセイを実施する場合に好ましい96ウェル形式(例えば、マイクロタイタープレート)を含む様々な形式で実施できる。バッチ様式分析に好ましいものとしては、2001年11月8日に発行されたPCT国際特許公報第WO 0183827号、およびZhuら(2000, "Analysis of yeast protein kinases using protein chips", Nature Genet. 26:283-289)に記載されているナノアレイデバイス等の(ただし、これに限定されない)ナノアレイデバイスもある。アッセイは、多数の異なるサンプルに対してアッセイを実施できる(例えば、連続/ランダムアクセス型の)自動化アッセイ分析器において実施でき、当該分野で周知である。このような自動化アッセイ分析器の例は、PB Diagnostic Systems, Inc.に発行された米国特許第5,207,987号および同第5,518,688号に記載されている。自動化アッセイ分析器は市販されており、例えば、OPUS.R(商標)、OPUS MAGNUM.R(商標)、Vitros(商標)(Ortho)、Elecsys(商標)(Roche)、AxSYM(商標)(Abbott)、Prism(商標)(Abbott)、Architect(商標)(Abbott)、Centaur(商標)(Bayer)、およびImmuno 1(商標)(Bayer)が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0182】

本発明に使用できる別のアッセイ形式は、サンプルを得る現地(例えば、診療所)において行うことができる高速マニュアルテストである。

【0183】

1つ以上の分子(すなわち、検体に結合する分子、もしくは検体に結合する別の分子に結合する分子)、および/または検体は、固体支持体に結合させてもよい。固体支持体としては、ガラス、セラミックス、非晶質炭化ケイ素、不定形酸化物(castable oxides)、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、シリコンエラストマー、ニトロセルロース、アクリルアミド、アガロース、または金が挙げられる。一実施形態では、固体支持体は、ウェルを含む。具体的な実施形態では、固体支持体は、96ウェルマイクロタイタープレートである。別の具体的な実施形態では、固体支持体は、ナノアレイデバイスである。

10

【0184】

別の実施形態では、固体支持体は、ウェル内に含まれてもよい。特定の実施形態では、固体支持体は、磁性粒子であり得る。別の特定の実施形態では、固体支持体は、ポリスチレンビーズであり得る。検体、および/または検体に結合する分子もしくは検体に結合する別の分子に結合する分子は、固体支持体に直接結合されるか、リンカー化合物を介して固体支持体に付着され得る。リンカーは、固体支持体表面を誘導化して、固体支持体の表面に、検体、または検体に結合する分子もしくは検体に結合する別の分子に結合する分子が付着し易いようする任意の化合物であり得る。リンカーは、このような分子および/または検体の1つを、固体支持体の表面に共有結合または非共有結合させる。さらに、リンカーは、無機化合物でも有機化合物でもあり得る。

20

【0185】

別の実施形態では、固体支持体は、結合分子および/または検体が固体支持体に結合するのを助ける物質を含む。例えば、固体支持体は、目的の検体に結合する分子上の親和性タグに結合する物質で被覆されてもよい。具体的な実施形態では、固体支持体はグルタチオンを含む。別の具体的な実施形態では、固体支持体はニッケルを含む。別の具体的な実施形態では、固体支持体は、グルタチオンおよびニッケルを含む。

【0186】

5.2. 検体に結合する非抗体分子を使用して検体を検出することにより、疾患または障害の診断または予後を判断する方法

30

本発明は、被験体における疾患または障害を診断する方法にも関する。従って、一実施形態では、本発明は、被験体における疾患または障害を診断する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子を、該被験体から得た検体を含みうるサンプルと、該検体が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(b)存在する全ての結合した検体を、該第1の分子に結合した検体に結合する第2の異なる分子と、該検体が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(c)該第2の分子と該検体との結合を検出または測定するステップを含み、ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第1および第2の分子の少なくとも一方は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体分子であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(c)における検体の存在、不在または量が、該疾患または障害を患っていない被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量を示す対照値と異なる場合に、該疾患または障害が存在すると判断される、方法を提供する。さらなる実施形態では、本方法は、ステップ(a)の前に、第1の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。

40

【0187】

好適な実施形態では、第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体分子である。別の好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が第1の分子に結合している場合に検出または測定する。別の好適な実施形態では、第2の分子は、検体が第1の分子を介して固体支持体に結合している場合に検出または測定する。

50

【0188】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子(例えば、汚染物、過剰試薬)を除去する。

【0189】

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子を、サンプルと順次に接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触され得る。また、結合分子を、目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

10

【0190】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患または障害を診断する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子と、被験体から得た検体を含みうるサンプルとを、該検体が第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)存在する全ての結合した検体を、該第1の分子に結合している該検体に結合する第2の異なる分子と、該検体が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該第2の分子と検体との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第1および第2の分子の少なくとも一方は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(e)における検体の存在、不在または量が、該疾患または障害を患わない被験体から得た同様のサンプルに存在する検体の量を表す対照値と異なる場合に、該疾患または障害が存在すると判断される、方法を提供する。さらなる実施形態では、ステップ(a)の前に、本方法は、第1の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。

20

【0191】

好適な実施形態では、第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である。別の好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が第1の分子に結合しているときに検出または測定する。別の好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が、第1の分子を介して固体支持体に結合しているときに検出または測定する。

30

【0192】

代替的な実施形態では、結合していないサンプルまたは結合分子を除去するステップは、ステップ(e)の前のいずれかのステップにおいて行われ得る。例えば、ステップ(b)および(d)の代わりに、ステップ(e)の前にいくつかのステップを導入して、結合していないサンプル、結合していない第1の分子、または結合していない第2の分子を選択的に除去できる。

【0193】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患または障害を診断する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子を、該被験体から得た検体を含みうるサンプルと、該検体が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合した第1の分子を、該検体に結合した該第1の分子に結合する第2の異なる分子と、該第1の分子が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；および(c)該第1の分子と該第2の分子との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第1の分子は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体分子であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(c)における検体の存在、不在または量が、該疾患または障害を患っていない被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量を表す対照値と異なる場合に

40

50

、該疾患または障害が存在すると判断される、方法を提供する。さらなる実施形態では、本方法は、ステップ(a)の前に、第1の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。

【0194】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子(例えば、汚染物、過剰試薬)を除去する。

10

【0195】

好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が第1の分子に結合したときに検出または測定する。別の好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が第1の分子を介して固体支持体に結合しているときに検出または測定する。

【0196】

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子を、サンプルと順次に接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触され得る。また、結合分子を、目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

【0197】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患または障害を診断する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子と、被験体から得た検体を含みうるサンプルとを、該検体が第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)結合した第1の分子を、該検体に結合している該第1の分子に結合する第2の異なる分子と、該第1の分子が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該第2の分子と該第1の分子との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第1の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(e)における検体の存在、不在または量が、該疾患または障害を患わない被験体から得た同様のサンプルに存在する検体の量を表す対照値と異なる場合に、該疾患または障害が存在すると判断される、方法を提供する。さらなる実施形態では、ステップ(a)の前に、本方法は、第1の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。

20

30

【0198】

好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が第1の分子に結合しているときに検出または測定する。別の好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が、第1の分子を介して固体支持体に結合しているときに検出または測定する。

【0199】

代替的な実施形態では、結合していないサンプルまたは結合分子を除去するステップは、ステップ(e)の前のいずれかのステップにおいて行われ得る。例えば、ステップ(b)および(d)の代わりに、ステップ(e)の前にいくつかのステップを導入して、結合していないサンプル、結合していない第1の分子、または結合していない第2の分子を選択的に除去できる。

40

【0200】

本発明は、疾患、障害、または他の症状の予後を判断する方法も包含する。応答(有毒または改善)についての予後マーカーをアッセイして、治療経過および投薬量にとって重要な情報を得られる。疾患の予後、または治療処置に対する可能性のある応答の判断は、一般的に、疾患または障害の進行度の決定を伴う。例えば、任意の症状の徴候の前、疾患または障害の進行時点、または治療的介入の前、途中もしくは後に基準を決定できる。

50

【0201】

従って、一実施形態では、本発明は、被験体における疾患または障害の進行度を決定する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子を、該被験体から得た検体を含みうるサンプルと、該検体が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(b)存在する全ての結合した検体を、該第1の分子に結合した検体に結合する第2の異なる分子と、該検体が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；および(c)該第2の分子と該検体との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の不在、存在または量を示し；該第1および第2の分子の少なくとも一方は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体分子であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(c)における検体の存在または量を、疾患もしくは障害を患っていない、または疾患もしくは障害の特定の進行度にある被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量と比較して、被験体の該疾患または障害の進行度を判断する、方法を提供する。さらなる実施形態では、本方法は、ステップ(a)の前に、第1の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。

10

【0202】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子(例えば、汚染物、過剰試薬)を除去する。

20

【0203】

好適な実施形態では、第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体分子である。別の好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が第1の分子に結合している場合に検出または測定する。別の好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が、第1の分子を介して固体支持体に結合している場合に検出または測定する。

【0204】

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子を、サンプルと順次に接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触され得る。また、結合分子を、目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

30

【0205】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患または障害の進行度を決定する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子と、被験体から得た検体を含みうるサンプルとを、該検体が第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)結合した検体を、該第1の分子に結合している該検体に結合する第2の異なる分子と、該検体が該第2の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(d)結合していない第2の分子を除去するステップ；および(e)該第2の分子と検体との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の不在、存在または量を示し；該第1および第2の分子の少なくとも一方は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(e)における検体の存在または量を、該疾患もしくは障害を患っていない、または疾患もしくは障害の特定の進行度にある被験体から得た同様のサンプルに存在する検体の量と比較して、被験体の該疾患または障害の進行度を判断する、方法を提供する。さらなる実施形態では、ステップ(a)の前に、本方法は、第1の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。

40

【0206】

好適な実施形態では、第1および第2の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である。別の好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が第1の分子に

50

結合しているときに検出または測定する。別の好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が、第1の分子を介して固体支持体に結合しているときに検出または測定する。

【0207】

代替的な実施形態では、結合していないサンプルまたは結合分子を除去するステップは、ステップ(e)の前のいずれかのステップにおいて行われ得る。例えば、ステップ(b)および(d)の代わりに、ステップ(e)の前にいくつかのステップを導入して、結合していないサンプル、結合していない第1の分子、または結合していない第2の分子を選択的に除去できる。

【0208】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患または障害の進行度を決定する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子を、該被験体から得た検体を含みうるサンプルと、該検体が該第1の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合した第1の分子を、検体が結合している該第1の分子に結合する第2の異なる分子と、該第1の分子が該第2の分子に結合する条件下で接触させるステップ；および(c)該第1の分子と該第2の分子との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第1の分子は、該検体の種と異なる種に由来する非抗体分子であり；該第1の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(c)における検体の存在、不在または量を、疾患および/もしくは障害を患っていない、または疾患もしくは障害の特定の進行度にある被験体から得た同種サンプルに存在する検体の量と比較して、被験体における該疾患または障害の進行度を判断する、方法を提供する。さらなる実施形態では、本方法は、ステップ(a)の前に、第1の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。

10

20

【0209】

さらなる実施形態では、結合していないサンプルをステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1または第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。別のさらなる実施形態では、結合していないサンプル、ならびに結合していない第1および第2の分子をステップ(c)の前に除去する。さらに別の実施形態では、ステップ(c)の前に1つ以上のステップを加えて、検体、第1の分子および第2の分子を含む複合体に存在しない分子(例えば、汚染物、過剰試薬)を除去する。

30

【0210】

好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が第1の分子に結合したときに検出または測定する。別の好適な実施形態では、第2の分子の結合は、検体が第1の分子を介して固体支持体に結合しているときに検出または測定する。

【0211】

代替的な実施形態では、結合していないサンプルまたは結合分子を除去するステップは、ステップ(e)の前のいずれかのステップにおいて行われ得る。例えば、ステップ(b)および(d)の代わりに、ステップ(e)の前にいくつかのステップを導入して、結合していないサンプル、結合していない第1の分子、または結合していない第2の分子を選択的に除去できる。

40

【0212】

結合分子は、サンプルと同時に接触させてもよい。あるいはまた、結合分子を、サンプルと順次に接触させてもよい。結合分子は、任意の順序でサンプルと接触され得る。また、結合分子を、目的の検体を含むと疑われるサンプルと接触させる前に、異なる結合分子を任意の順序で互いと接触させてもよい。

【0213】

別の実施形態では、本発明は、被験体における疾患または障害の進行度を決定する方法であって、(a)生体分子検体に結合する第1の分子と、被験体から得た検体を含みうるサンプルとを、該検体が第1の分子に結合する条件下で接触させるステップ；(b)結合していないサンプルを除去するステップ；(c)結合した第1の分子を、該検体に結合している

50

該第 1 の分子に結合する第 2 の異なる分子と、該第 1 の分子が該第 2 の分子と結合する条件下で接触させるステップ；(d)結合してない第 2 の分子を除去するステップ；および(e)該第 2 の分子と該第 1 の分子との結合を検出または測定するステップを含み；ここで、結合の検出または測定はそれぞれ、検体の存在または量を示し；該第 1 の分子は、検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質であり；該第 1 の分子は、ステップ(a)の前後いずれかにおいて固体支持体に付着され；ステップ(e)における検体の不在、存在または量を、該疾患および/もしくは障害を患っていない、または該疾患もしくは障害の特定の進行度にある被験体から得た同様のサンプルに存在する検体の量と比較して、被験体における該疾患または障害の進行度を判断する、方法を提供する。さらなる実施形態では、ステップ(a)の前に、本方法は、第 1 の分子を固体支持体に付着させるステップを含む。別の実施形態では、結合分子は、サンプルと順次に接触される。一実施形態では、結合していないサンプルまたは結合分子を除去するステップは、ステップ(e)の前の任意のステップにおいて行われ得る。

10

【0214】

別の好適な実施形態では、第 2 の分子の結合は、検体が第 1 の分子に結合しているときに検出または測定する。別の好適な実施形態では、第 2 の分子の結合は、検体が、第 1 の分子を介して固体支持体に結合しているときに検出または測定する。

【0215】

代替的な実施形態では、結合していないサンプルまたは結合分子を除去するステップは、ステップ(e)の前のいずれかのステップにおいて行われ得る。例えば、ステップ(b)および(d)の代わりに、ステップ(e)の前にいくつかのステップを導入して、結合していないサンプル、結合していない第 1 の分子、または結合していない第 2 の分子を選択的に除去できる。

20

【0216】

疾患もしくは障害の診断もしくは予後、または検体に関連する治療に対する応答についての基準を得るために、当該分野で公知の様々な技術を使用して、発現についての正常または標準プロファイルを確立する。例えば、正常な被験体(動物またはヒトのいずれか)から採取したサンプル(例えば、体液、細胞抽出物)を、サンプル中の目的の検体に結合可能なタンパク質(例えば、抗体)と接触させ、会合に適した条件下で、検出および測定される。これらの正常被験体から得られた値を、既知量の目的の検体を使用した並行実験から得た値と比較して、標準値を計算する。疾患もしくは障害を患っているかもしくは引き起こす危険のある患者、または治療を受けているかもしくは受けた患者のサンプルから得た値を標準値と比較し、標準値からの偏差を使用して、疾患もしくは障害の予後および/もしくは診断、ならびに/または治療に対する応答もしくは応答の欠如を判断する。

30

【0217】

診断もしくは予後、または治療に対する応答は、上記開示した疾患等(ただし、これらに限定されない)特徴的な検体を有するあらゆる疾患について確立できる。疾患または障害の存在が被験体において確立され、治療プロトコルを開始した場合、上記アッセイを定期的に繰り返して、被験体のサンプルから得た値が、時間経過と共に、正常被験体のサンプルで見とめられた値に近づいているかまたはさらに離れていくかを判断できる。この

40

【0218】

5.3. 本発明のキット

本発明は、1つ以上の結合分子、結合タンパク質を同定するタンパク質アレイ、および/または分子と検体との結合を検出するのに有用な試薬を含む、キットにも関する。

【0219】

一実施形態では、キットは、(a)第 1 の容器に入った、精製生体分子検体；(b)第 2 の容器に入った、該検体に結合する第 1 の分子；および(c)該第 1 の分子に結合した検体に結合する第 2 の異なる分子が付着した固体支持体を含み、ここで、該第 2 の分子は該第 1 の分子に結合した検体に結合し、該第 1 および第 2 の分子の少なくとも一方が、該検体の

50

種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である。

【0220】

別の実施形態では、キットは、(a)第1の容器に入った、精製生体分子検体；(b)検体に結合し、該検体の種と異なる種に由来する非抗体タンパク質である第1の分子が付着した固体支持体；および(c)第2の容器に入った、検体に結合した該第1の分子に結合する第2の異なる分子を含む。

【0221】

本発明のキットは、例えば、分子と検体との結合をアッセイするのに有用な試薬等、検体に結合している第1の分子を検出する検出手段をさらに含み得る。別の実施形態では、キットは、例えば、抗体と別の異なる分子との結合をアッセイするのに有用な試薬等、第1の分子に結合した第2の分子を検出するための検出手段を含む。

10

【0222】

本発明のキットは、第1の分子または第2の分子のいずれかに結合する追加の結合タンパク質をさらに備え得る。このような実施形態では、キットは、そのような結合タンパク質を1つ以上検出する手段を含む。あるいはまた、別の実施形態では、キットは、第1または第2の結合タンパク質のいずれか一方に加えて、さらに別のこのような追加結合タンパク質を1つ以上検出する手段を含む。

【0223】

本発明のキットは、複数の結合タンパク質さらに含んで、1つまたは2つの結合タンパク質が検体に結合し、残りの結合タンパク質がそれぞれ直接的または間接的に、最初の2つの結合タンパク質のいずれかに結合し得る。このような実施形態では、キットは、このような結合タンパク質を1つ以上検出するための検出手段を含む。

20

【0224】

本発明のキットは、キットの結合タンパク質の相互作用を一覧した、タンパク質相互作用データベースから得たチャートをさらに備え得る。このチャートは、目的のタンパク質についてのタンパク質相互作用のデータベースから得た情報を使ってアSEMBルできる。

【0225】

検体に結合する分子、または検体に結合した別の分子に結合する分子の1つは、平坦固体支持体の表面に付着されるか、固体支持体上のウェルに含まれるか、または固体支持体上のウェル表面に付着され得る。一実施形態では、検体に結合する分子、または検体に結合した別の分子に結合する分子の1つは、固体支持体に既に付着している。別の実施形態では、検体に結合する分子、または検体に結合した別の分子に結合する分子は、固体支持体のウェルに付着せず、ウェルに含まれている。さらに別の実施形態では、検体に結合する分子、または検体に結合した別の分子に結合する分子は、固体支持体のウェルに付着せず、1つ以上の容器に等分され、固体支持体のウェルに添加され得る。一実施形態では、キットは、基体(例えば、ビーズ)を提供でき、これに、検体に結合する分子、または検体に結合した別の分子に結合する分子を付着させた後、分子が付着した基体を固体支持体のウェルの中に入れることができる。

30

【0226】

別の実施形態では、キットは、(a)任意に固体支持体上に配列された、第1の容器に入ったタンパク質の集合；および(b)第2の容器に入った、目的の検体についての検出手段を含み、従って、検体は、該第2の容器中の該タンパク質の集合への結合についてテストされた後、該検出手段により検出されて、検体を測定するためのアッセイにおける試薬として適しうる、第1の容器中のタンパク質を同定する。

40

【0227】

さらに別の実施形態では、キットは、(a)第1の容器に入った、目的の検体と検出分子とを複合化させるための試薬；および(b)任意に固体支持体上に配列された、第2の容器に入ったタンパク質の集合を含み、従って、該検体は、該検出分子と複合化された後、該第2の容器において該タンパク質の集合への結合についてテストされる。

【実施例1】

50

【0228】

アッセイ

6.1. 前立腺癌マーカーについてのアッセイ

例えば、前立腺特異的抗原(PSA)、ヒトカリクレイン-2、BPSA、プロ-PSA(pro-PSA)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、ヘプシン(膜貫通セリンプロテアーゼ)、pim-1(セリン/スレオニンキナーゼ)等、前立腺癌に相関するいくつかのマーカーが当該分野で公知である(例えば、Dhanasekaranら, 2001, "Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer", *Nature*. 412:822-826を参照)。このようなマーカーは、前立腺癌の診断、予後、進行度の決定、治療に対する応答、および/または管理に有用であり得る。PSA(ヒト腺カリクレイン3としても知られている)、カリクレイン様セリンプロテアーゼは、ヒト前立腺癌のスクリーニング、診断、および管理のために有益な腫瘍マーカーとして認識されている。血清PSA値のレベルは、前立腺疾患管理において、前立腺癌に対する危険性の評価、治療前進行度の決定の判断、治療効力のモニタリング、および疾患の再発の検出等の臨床的な意味を有する(Gaoら, 1997, "Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer", *Prostate*. 31(4):264-281)。以下の限定しない実施例では、目的の検体は、例示する目的のために、ヒト前立腺特異的抗原("PSA")である。PSAは、前立腺に比較的特異的であるために、結合タンパク質試薬を得る種(酵母)において明確なホモログまたはオソログを持たない検体の良い例である。

10

【0229】

PSA結合パートナーは、全てがN末端においてGSTおよびHisX6に融合している酵母タンパク質のアレイを、PSAでスクリーニングすることにより同定される。一般的に、PSAと、酵母タンパク質チップ上のタンパク質との結合は、以下のようにアッセイされ得る。ブロックされたタンパク質チップを、3~5回PBS緩衝液中で洗浄し、スライドをKimwipe™上で垂直にして軽く叩くことにより、ガラス表面上の余分な液体を除去する。ビオチン化PSA(200µl)をタンパク質チップに添加し、疎水性プラスチックカバースリップ(Grace Bio-Labs, USA)ですぐに覆う。閉じ込められた気泡を除去した後、チップを、加湿チャンバ中で室温にて1時間インキュベートする。大容量のPBS緩衝液(>50 ml)に浸すことにより、カバースリップを外す。次いで、チップを第2のPBS浴(>50 ml)に移し、振とうしながら、5分間、室温(RT)にて3回洗浄する。チップ表面上の余分な液体を除去した後、少なくとも150µlのCy3-複合型またはCy5-複合型ストレプトアビジン(Pierce, USA; 1:2000~1:4000希釈)をチップ表面に添加し、疎水性プラスチックカバースリップ(Grace Bio-Labs, USA)で覆う。チップを、少なくとも30分間、暗所にて室温でインキュベートする。次いで、上述したように、チップを洗浄する。チップ上の液体を完全に除去するために、乾燥するまでチップを1500~2000rpm、室温にて5~10分間回転させる。

20

30

【0230】

タンパク質チップを、ストレプトアビジンではなく、抗ビオチン抗体でスクリーニングする場合には、タンパク質-抗体相互作用は以下のように検出され得る。ブロックされたタンパク質チップをPBS緩衝液中で3~5回洗浄し、スライドをKimwipe™上で垂直にして軽く叩くことにより、ガラス表面上の余分な液体を除去する。一次抗体(1~3%BSAおよび0.1%TritonX-100を含むPBSに正確に希釈された200µl)をタンパク質チップに添加し、疎水性プラスチックカバースリップ(Grace Bio-Labs, USA)ですぐに覆う。閉じ込められた気泡を除去した後、チップを、加湿チャンバ中で室温にて1時間インキュベートする。大容量のPBS緩衝液(>50 ml)に浸すことにより、カバースリップを外す。次いで、チップを第2のPBS浴(>50 ml)に移し、振とうしながら、5分間、室温(RT)にて3回洗浄する。チップ表面上の余分な液体を除去した後、少なくとも150µlのCy3-複合型またはCy5-複合型二次抗体(1~3%BSAおよび0.1%TritonX-100を含むPBSに正確に希釈されたもの)を表面に添加し、疎水性プラスチックカバースリップ(Grace Bio-Labs, USA)で覆う。チップを、少なくとも30分間、暗所にて室温でインキュベートする。次いで、上述したように、チップを洗浄する。チップ上の液体を完全に除去するために、乾燥するまでチップを1500~2000rpm、室温にて5~10分間回転させる。

40

50

【0231】

PSAに対する結合タンパク質を同定した後、(使用前に選択的タンパク質分解により任意に除去できるN末端GST-HisX6を有する)結合タンパク質をコードするそれぞれの酵母クローンを、ガラクトース誘導可能GAL1プロモーターの制御下にある酵母中で発現させる。結合タンパク質についてのクローンを含む酵母グリセロールストックを、URA-/ラフィノース培養液に植菌する。培養物が、30にて約16時間の激しい振とう下で、4.0のO.D.₆₀₀に到達した後、1mlの培養物を、100 μ lのURA-/ラフィノース培養液に植菌する。細胞を、30にて激しく振とうしながら培養させる。12~16時間の培養後、培養物は、0.6~0.8のO.D.₆₀₀に到達しているはずである。O.D.₆₀₀が1.0を超える場合には、培養物を捨てる。40%ガラクトースストックを、最終濃度2%まで添加して、細胞を誘導する。培養物を、30にて4時間振とうしながら誘導する。3000rpmにて2~10分間回転させて細胞を回収し、細胞ペレットを100~1000 μ lの冷水中に攪拌させて再懸濁させる。遠心分離により細胞を回収し、RocheおよびPMSFから得たEDTAとのプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む100~1500 μ lの冷たい溶解緩衝液中に、氷上にて再懸濁させる。洗浄した細胞を、短い遠心分離により回収し、溶解緩衝液を捨てる。洗浄した半乾燥培養物を、-80の冷凍庫にすぐに入れて保存する。

10

【0232】

細胞を、ガラスビーズで溶解させる。ガラスビーズ(1ml)を、冷凍細胞ペレットに添加する。細胞を、プロテアーゼ阻害剤の存在下で高速攪拌して、細胞を溶解する。必要量のグルタチオンビーズ(サンプルにつきおよそ10~50 μ lのビーズ)(Amersham Pharmacia Bio tech, USA)を、プロテアーゼ阻害剤の入っていない冷たい溶解緩衝液で4回洗浄し、次いで、元の容量の5倍の、新鮮なプロテアーゼ阻害剤を含む溶解緩衝液に再懸濁させる。グルタチオンビーズを細胞溶解物に添加し、ローラードラム上で4にて1時間インキュベートする。3000rpmにて10~60秒間回転させることによりビーズを回収し、上清を捨てる。ビーズを、プロテアーゼ阻害剤を含む200~800 μ lの緩衝液で1回洗浄し、阻害剤の入っていない緩衝液で2回洗浄する。次いで、ビーズを、200~800 μ lの緩衝液で3回洗浄する。緩衝液を完全に除去した後、20~50 μ lの低塩緩衝液を各ウェルに添加し、4にて1時間インキュベートする。溶出液/ビーズ懸濁液を、グルタチオンで被覆された96ウェルマイクロタイタープレートに移す。1時間結合させた後、プレートをPBSで洗浄する。結合パートナーは、グルタチオン被覆ウェルに結合したままである。結合パートナーは、ウェルから精製され、PSAアッセイに使用され得る。

20

30

【0233】

PSAに結合する酵母由来タンパク質を、96ウェルプレートに付着させる。血清サンプルを、根治的な前立腺手術後の男性から得る。血清サンプル(200 μ l)、ならびに陽性および陰性対照を、96ウェルプレートの異なるウェルに添加する。プレートを室温にて2時間インキュベートして、サンプル中のPSAを、ウェル表面上の酵母タンパク質と結合させる。プレートの各ウェルは、200~800 μ lのリン酸緩衝化食塩水および0.1% Tween-20で洗浄して、汚染している非特異的結合を除去する。結合したPSAを、西洋ワサビペルオキシダーゼと複合化した抗ヒトPSAマウスモノクローナル抗体と接触させ、2時間インキュベートして、PSAを抗体に結合させる。余分な抗体は、洗浄して除去する。抗体とPSAとの結合を、各ウェルに西洋ワサビペルオキシダーゼ用の基質を添加して検出し、比色反応を96ウェルプレートリーダーで測定する。任意に、結合の量を測定して、患者におけるPSAの循環濃度を推測する。酵母タンパク質アレイのスクリーニングにより、PSAに結合するタンパク質が少なくとも2つ明らかになり、それらの少なくとも2つのタンパク質が互いの存在下でPSAに結合できる場合、PSAに結合し、西洋ワサビペルオキシダーゼと複合化している非抗体タンパク質を、抗-PSAマウスモノクローナル抗体の代わりに置き換えてもよい。根治的な前立腺摘除術後のPSAの再発は、通常前立腺癌の再発を示すため、根治的な前立腺摘除術を受けた男性の血清PSAの有無を判断するための定質アッセイは、臨床的な利益を有する。バックグラウンドを超える値は、PSAについて陽性と考えられ、前立腺癌の危険性が高いことを示す。

40

50

【0234】

6.2. ヒト免疫不全ウイルスのマーカーについてのアッセイ

酵母から誘導した2つの結合タンパク質を使用してアッセイを行い、後天性免疫不全症候群(AIDS)をもたらすHIVへの曝露およびHIV感染の危険性を示す、HIVのenv13タンパク質に対する抗体の存在を判断する。

HIVのenv13タンパク質に結合するタンパク質は、6.1節に開示した方法に従い酵母タンパク質チップをスクリーニングすることにより同定および単離される。それぞれ互いの存在下でenv13タンパク質に結合できる酵母結合タンパク質を2つ選択する。上記スクリーニングでこのように同定された2つのタンパク質を、西洋ワサビペルオキシダーゼと複合化させて、本診断アッセイにおいて使用するために準備する。

10

【0235】

ポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルを、受動的吸着(passive adsorption)によりマウス抗ヒト免疫グロブリン抗体(抗hulIgと抗hulIgMとの混合液を使用して、env13に対して特定される循環IgMおよびIgG抗体を検出する)で被覆し、次いでこれらのプレートを洗浄する。血清サンプルを被覆ウェルに添加し、サンプル中の抗env13抗体が、ウェルを覆っている抗免疫グロブリン抗体に結合するような条件下で十分な時間の間インキュベートし、プレートを再度洗浄する。この時点で、サンプル中に元々存在していた抗env13抗体は、ウェル表面上の抗体に結合している。

【0236】

次いで、組換えenv13タンパク質をウェルに添加し、存在する全ての抗env13抗体がenv13タンパク質に結合できるように十分な時間の間インキュベートする。余分なenv13タンパク質は、洗浄して除去する。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼと複合化した2つの酵母結合タンパク質をウェルに添加する。env13タンパク質の存在(これは、血清サンプル中の抗env13抗体の存在を示す)は、西洋ワサビペルオキシダーゼの基質を添加することにより検出され、その後比色反応を自動化アッセイ分析器で測定する。env13タンパク質の異なる部位に結合する2つの酵母リポータータンパク質を添加することにより、任意のenv-13結合を検出する確率が高まり、シグナルが増幅する。バックグラウンドを超える値は、抗env13抗体について陽性であると考えられ、患者のHIVに対する事前の曝露、およびAIDSを発症する危険性が高いことを示す。

20

【0237】

6.3. 乳癌マーカーについてのアッセイ

HER2原癌遺伝子生成物は、乳癌の30%において過剰発現され、良好でない予後に関連する。しかし、HER2原癌遺伝子の過剰発現は、原癌遺伝子に対して特異的なモノクローナル抗体を含む治療計画に対する良好な応答の確率を高める。結合アッセイを行って、Her-2/neu("ERBB2/c-erbB-2")遺伝子配列のレベル(この増幅により、侵襲性乳癌が指摘される)を決定する。ERBB2/c-erbB-2は、多数のヒト乳腺腫瘍、およびこのような腫瘍に由来する細胞系において増幅される場合が多い(Krausら, 1987, EMBO J. 6:605-610)。従って、サンプル中のERBB2/c-erbB-2のレベル上昇の検出は、乳癌の危険性の上昇を示しうる。

30

【0238】

本アッセイにおいて測定する検体は、ERBB2/c-erbB-2遺伝子配列である。このアッセイのための結合タンパク質の1つはHer-2/neuプロモーター結合因子、すなわち、ERBB2/c-erbB-2のプロモーター領域に結合するDNA結合である(Scottら, 2000, "Ets regulation of the erbB2 promoter", Oncogene. 19(55):6490-6502)。第2の結合タンパク質は、6.1節に記載した方法を使用して、酵母タンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定および単離する。手短かに言うと、酵母タンパク質チップを、ERBB2/c-erbB-2プロモーターの配列を含むオリゴヌクレオチドを含む溶液とインキュベートする。次いで、検出された全ての結合タンパク質を、後者タンパク質の濃度がERBB2/c-erbB-2オリゴヌクレオチドの濃度を超えるように、Her-2/neuプロモーター結合因子の存在下で再テストする。Her-2/neuプロモーター結合因子の存在にも関わらずオリゴヌクレオチドに結合する能力を保持する酵母タンパク質を、アッセイのための適切な試薬として選択する。このような酵母結合

40

50

タンパク質はまた、非ERBB2/c-erbB-2配列を有するオリゴヌクレオチドよりも、ERBB2/c-erbB-2オリゴヌクレオチドに結合し易いことが明らかであることが好ましい。選択した結合タンパク質は、検出、同定および単離される。6.1節に記載の方法に従い、大規模量の選択結合タンパク質を、対応クローンを含む酵母株から精製する。

【0239】

96ウェルマイクロタイタープレートのウェルを、Her-2/neuプロモーター結合因子で覆う。腫瘍生検サンプルをウェルに入れてインキュベートし、ERBB2/c-erbB-2プロモーター配列とHer-2/neuプロモーター結合因子とを結合させる。ERBB2/c-erbB-2遺伝子へ結合させる一晚のインキュベーションの後、10 mM Tris-HCl(pH 7.5)、40 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM EDTAを含む緩衝液でプレートを洗浄する。次いで、ウェルを、蛍光タグと複合化した酵母結合タンパク質とインキュベートする。同じ緩衝液で洗浄した後、スキャナで蛍光を測定する。蛍光強度は、ERBB2/c-erbB-2遺伝子配列の存在および量を示す。同量のDNAを含む対照サンプル(ERBB2/c-erbB-2遺伝子が増幅されていないことが分かっている乳癌サンプル)の蛍光シグナルと比べて高い蛍光シグナルは、ERBB2/c-erbB-2遺伝子の増幅を示し、これは乳癌の危険性が高いことを予測している。

10

【0240】

本アッセイの代替的な実施形態では、Her-2/neuプロモーター結合因子は、酵母タンパク質チップに対してスクリーニングされ、このタンパク質に結合する酵母タンパク質を同定する。これらの酵母タンパク質をテストして、Her-2/neuプロモーター結合因子がそのコグネイトDNA配列に結合する一方で、Her-2/neuプロモーター結合因子に同時に結合できるタンパク質を同定する。後者のタンパク質およびHer-2/neuプロモーター結合因子は全て、同じ蛍石(fluor)と複合化され得る。本アッセイでは、蛍石タグ付けされたHer-2/neuプロモーター結合因子の添加後、サンプルを再度洗浄し、蛍石タグ付け酵母タンパク質をサンプルに添加して、蛍光の測定ができる。このようにして、蛍石シグナルは、ERBB2/c-erbB-2遺伝子配列の濃度に比例して増幅され得るため、遺伝子の濃度を測定し易くする。

20

【0241】

本アッセイのさらに別の実施形態では、蛍石タグ付けHer-2/neuプロモーター結合因子に結合する第1の蛍石タグ付け酵母タンパク質、および該第1の蛍石タグ付け酵母タンパク質に結合する第2の蛍石タグ付け酵母タンパク質をアッセイにおいて使用することにより、増幅が達成される。

30

【0242】

6.4. B型肝炎表面抗原についてのアッセイ

B型肝炎表面抗原("HbsAg")は、B型肝炎ウイルス("HBV")粒子の外膜の構成要素である(Gerlich, 1993, Viral Hepatitis, Churchill Livingstone(編), pp. 83-113)。ヒト血清または血漿中のHbsAgの検出は、B型肝炎ウイルスによる感染を示す。HbsAgは、血流中で検出可能な最初の免疫学的マーカーであり、一般的に、感染した個人において臨床的症状が現れ始める数日または数週間前に現れる。HbsAgは、急性および慢性HBV感染を患う人物の血液中で見とめられる。HbsAgスクリーニングアッセイを使用して、HBVに感染した人物を識別する。感染人物の識別は、とりわけ、血液および血液製剤を介したHBVの感染を防ぐ助けになる。HbsAgアッセイは、急性または慢性HBV感染を患う人物における疾患の経過をモニターするためにも使用される。さらに、HbsAgの存在についてのテストは、新生児へのHBV感染の予防処置を取るための妊婦管理の一部として推奨される。

40

【0243】

アッセイを行って、ヒト血清中のHbsAgを検出する。本アッセイは、HbsAgに結合する2つの酵母タンパク質を使用する。6.1節に記載したように酵母タンパク質チップをスクリーニングすることにより、HbsAgに結合するタンパク質を同定する。次いで、HbsAgと選択されたタンパク質の1つとで調製された複合体を、別のHbsAg結合タンパク質に対してテストして、第1の結合タンパク質とHbsAgとの結合によって、第2のタンパク質とHbsAgとの結合が妨げられないような、酵母結合タンパク質の対を同定する。本アッセイは、サンドウィッチアッセイ原理に基づき、Roche Elecsys 1010イムノアッセイ分析器上で実施す

50

る。第1のHbsAg結合タンパク質はビオチンと複合化させる。第2のHbsAg結合タンパク質は、電子化学発光ルテニウム複合体と複合化させる。第1のインキュベーションでは、50 μ lの血清サンプルを、第1および第2の結合タンパク質の両方と接触させて、サンドウィッチを形成する。ストレプトアビジンで被覆した磁気微粒子を反応に加えて、10分間インキュベートする。ビオチン化結合タンパク質を含む複合体を、ビオチンとストレプトアビジンとの相互作用を介して、固相に結合させる。反応混合液を、微粒子が電極の表面に磁氣的に捕捉された測定セルに吸引させる。電極に電圧をかけることで、化学発光が誘導され、これを光電子増倍管で測定する。結果は、サンプルから得た電子化学発光シグナルを、先に測定した閾値と比較することにより、Elecsysソフトウェアで自動的に計算される。

10

【0244】

6.5. ヒト絨毛性ゴナドトロピンについてのアッセイ

本発明の方法に従ってアッセイを行い、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、すなわち妊娠についてのマーカーを検出する。hCGは、受精後約6~7日目の妊婦の血液中および尿中に現れる。

【0245】

本アッセイは、6.1節に記載したように酵母タンパク質アレイをスクリーニングすることにより同定される、hCGに結合する2つの結合タンパク質を使用する。本アッセイは、それぞれhCGに結合する第1および第2の結合タンパク質が付着した膜ストリップ上で行われ、該第2の結合タンパク質はストリップに永久付着させる。比色的に標識化された第1の結合タンパク質は、サンプルを添付する膜ストリップ部分に付着させる。尿サンプルを、第1の結合タンパク質が付着した、膜ストリップ部分に接触させる。尿は、第1の結合タンパク質を水和して、サンプル中のhCGを、第1の結合タンパク質に結合させる。すると、hCG-第1の結合タンパク質複合体(「複合体」)は、膜に沿ってクロマトグラフィー的に広がり、最終的に、第2の結合タンパク質が永久付着した膜ストリップ部分に到達する。複合体は、第2の結合タンパク質に結合して、比色的に標識化された第1の結合タンパク質を濃縮して、裸眼でも見える色線が現れる。

20

【0246】

線の出現は、hCGに対する陽性の結果を示す。線が現れない場合、結果は陰性である。対照として、結合していない第1の結合タンパク質が、膜ストリップに沿ってさらに広がり、第1の結合タンパク質に結合し濃縮する化合物に接触し、色線が現れ、つまりアッセイが正確に行われたことが確認される。

30

【実施例2】

【0247】

7. 酵母プロテオームマイクロアレイを使用したヒトタンパク質検体(RAS)の検出

ほぼ全ての酵母タンパク質を含む酵母プロテオームマイクロアレイを調製し、いくつかの生化学活性についてスクリーニングした。5800の酵母ORF(合計の93.5%)の高品質集合を、標準的な方法により組換えクローニングを使用して、酵母高コピー発現ベクター中でクローニングした(Mitchellら, 1993, Yeast 9:715)。酵母タンパク質を、アミノ末端においてGST-HisX6に融合させ、ガラクトース誘導可能GAL1プロモーターの制御下で酵母中で発現させた(Zhuら, 2000, Nature Genet. 26:283-289; Mitchellら, 1993, 9(7):715-722)。酵母発現株は、個々のプラスミドを含み、その中で正しい酵母ORFはDNAは、DNA配列決定により、インフレームでGSTに正確に融合されていることが見とめられた。

40

【0248】

7.1. 材料および方法

簡単に言うと、酵母ORFを、PCRにより増幅し、ベクターと共に酵母細胞に同時形質転換させ、発現クローンを生成した。プラスミドを、大腸菌中で捕獲(rescue)し、ベクター挿入接合部を配列決定した。クローニングしたORFが目的のORFでない場合、またはフレームシフトが検出された場合、クローニングサイクルを繰り返した。構築物を確認した後、プラスミドDNAを酵母および大腸菌に再導入し、今後の分析のための永久ストックを作製し

50

た(Zhuら, 2000, Nature Genet. 26:283-289)。クローニングサイクルを繰り返すことで、全体の93.5%を表す5800の固有の酵母ORFを都合良くクローニングした。

【0249】

生化学分析用の精製タンパク質を生成するために、96ウェル形式でタンパク質を調製する着実かつハイスループットな精製方法を開発し、最適化した。グルタチオン-アガロースペースを使用して酵母抽出物を調製し、融合タンパク質を精製した。溶解緩衝液および最初の洗浄は、0.1% Tritonを含んで、精製されたタンパク質が脂質を確実に含まないようにした。本明細書に開示する本発明の方法を使用して、少なくとも1152のタンパク質サンプルを、10時間未満で細胞から調製できる。精製タンパク質の質および量を、60のランダムなサンプルのイムノプロット分析を使用してモニターした。80%を上回る株が、予測した分子量の融合タンパク質を検出可能な量生成した。

10

【0250】

7.1.1. 酵母培養物調製

以下のステップを以下の順序で実施した：

1. 96ウェルプレート中に-80 で保存されている酵母グリセロール株を、96プロンガー(pronger)を使用して、URA-アガープレート(Omni, USA)上に植菌した。

【0251】

2. 培養物を、30 にて48時間アガー上で、目に見えるコロニー(直径2 mm)が見とめられる時点まで成長させた。

【0252】

3. 96プロンガーを使用して、酵母細胞を、アガープレートから、全てのウェルがURA-/ラフィノース液体培地および均一に成長させ易くする直径2 mmのガラスボールを含む96ウェル2 mlボックスに植菌した。

20

【0253】

4. 培養物が、30 にて激しく振とう(300 rpm)して約16時間で4.0の OD_{600} に到達した後、15 μ lの同株を、4つの異なるボックスに入った750 μ lのURA-/ラフィノース液体培地に植菌して、3 mlの培養液を得た。同じく、各ウェルは、同じガラスボールを含んで、通気および均一な成長を得た。細胞を30 にて激しく振とうしながら成長させた。

【0254】

5. 12~16時間の成長後、培養物は、0.6~0.8の OD_{600} に到達するはずである。自動液体処理装置(Q-Fill, Genetix, UK)を使用し、40%ガラクトースストックを各ウェルに2%の最終濃度まで添加して、細胞を誘導化した。培養物を、30 にて4時間振とうしながら誘導化した。

30

【0255】

6. 3000rpmにて2~10分間回転させることにより細胞を回収し、攪拌することにより細胞ペレットを冷水に再懸濁させた。次いで、同株の細胞を、4つのウェルから1つにまとめた。スピンにより細胞を回収し、氷上で、プロテアーゼ阻害剤を含まない冷たい溶解緩衝液中に再懸濁させた。洗浄した細胞を、短い遠心分離により回収し、溶解緩衝液を捨てた。洗浄し、半分乾燥した培養物は、すぐに-80 の冷凍庫に保存した。培養物は数週間保存できる。

40

【0256】

7.1.2. 96ウェル形式でのタンパク質精製

以下のステップを以下の順序で実施した：

1. 96ウェルボックス中の冷凍培養物を、-80 から氷に移し、100~300 μ lのジルコニアビーズ(直径0.5 mm、BSP, Germany)を、各ウェルに25個添加した。培養物が凍っている間に、新鮮なプロテアーゼ阻害剤を含む溶解緩衝液を添加した。キャップマットを使用して、各ウェルを封止した。氷上で5~25分間、培養物を解凍した後、96ウェルボックス中の細胞を20~60秒間、1~5分間の間隔で3~6回、氷上で攪拌した。酵母細胞壁を効率的に破壊するために、そして、一度に多くのプレートを処理するために、ペイントシェーカー(HARBILTM 5G HD、収容能力36kg、圧力および振とう時間は調節可能、速度は200回/

50

分にて固定)を使用して、サンプルを激しく攪拌した。

【0257】

溶解緩衝液：

30～300 mM Tris (pH 7.5)

50～300 mM NaCl

0.1～10 mM EGTA

0.01～1.0% TritonX-100

0.01%～1% -メルカプトエタノール

0.1～3 mMフェニルメチルスルホニルフッ化物("PMSF")

2. 3000 rpmにて2～10分間スピンの後、広口チップ(Fisher, USA)を使用して上清を回収し、96ウェルフィルタープレート(Whatman, USA; 疎水性PVDFフィルターを有するWhatman UNIFILTER™, Cat. No. 7700-1801)に移し、これを96ウェルボックスの上に置いた。

【0258】

3. より多くのタンパク質を得るために、新鮮なプロテアーゼ阻害剤を含む100～150 μlの溶解緩衝液を、細胞屑に添加し、ステップ1および2を繰り返した。

【0259】

4. 組み合わせた細胞溶解物を、3000rpmにて10～30分間スピンの後、フィルタープレートを介して、冷たく且つ清潔な96ウェルボックスに入れた。

【0260】

5. その間、必要量のグルタチオンビーズ(Amersham, USA)を、プロテアーゼ阻害剤を含まない冷たい溶解緩衝液で4回洗浄し、最終的に、元の容量の5倍の、新鮮なプロテアーゼ阻害剤を含む溶解緩衝液中に再懸濁させた。

【0261】

6. 100 μlの洗浄グルタチオンビーズを各ウェルに添加し、キャップマットで固く封止した。ビーズを溶解物と、ローラードラム上で4にて1時間インキュベートした。最良の混合を得るために、ボックスをローラードラム上で360°回転させた。

【0262】

7. 3000 rpmにて10～60秒間スピンさせてビーズを回収し、上清を捨てた。ビーズを、プロテアーゼ阻害剤を含む洗浄緩衝液で1回洗浄し、阻害剤無しで2回洗浄した。

【0263】

洗浄緩衝液：

30～300 mM Trisまたは50～200 mM HEPES(pH 7.5)

50～600 mM NaCl

0.0～10 mM EGTA

0.0～1.0% TritonX-100

0.01～1% -メルカプトエタノール("BME")

0.1～3 mM "PMSF"

0～15% グリセロール

Rocheプロテアーゼ阻害剤錠剤(EDTAを含有)

8. 次に、ビーズを洗浄緩衝液で3回洗浄した。緩衝液を完全に除去した後、20～50 μlの溶出緩衝液を各ウェルに添加した。溶出ステップにおいて使用したフィルタープレートは、タンパク質に対して低い親和性を有する材料から構成された(疎水性PVDFフィルターを有するMILLIPORE MULTISCREEN Cat. No. MADVN6550)。ボックスを短時間攪拌してビーズを再懸濁させ、ローラードラム上で4にて1時間インキュベートした。

【0264】

溶出緩衝液：

30～200 mM HEPES(pH 7.5)

50～200 mM NaCl

20～40% グリセロール

5~40 mM グルタチオン(還元形態)

9. 溶出物/ビーズスラリーを冷たいフィルタープレート(Millipore, USA)に移し、300 rpm、4 にて0.5~2分間、フィルタープレートを通してスピンのことにより、溶出液を96ウェルPCRプレートに回収した。

【0265】

10. 各精製タンパク質を、96ウェルPCRプレートに等分し、すぐに-80 の冷凍庫に保存した。

【0266】

7.1.3. プロテオームマイクロアレイの作製方法

プロテオームチップを調製するために、5800の異なる酵母タンパク質を、ニトロセルロース被膜スライドガラス(FASTTMスライド, Schleicher and schuell, Keene, NH)上に、市販されているマイクロアレイヤーを使用して正副でプリンティングした。Cy5-標識化BSA、ビオチン化IgG、およびGSTの希釈を含む様々な対照もプリンティングした。

【0267】

融合タンパク質がどのくらいスライドの表面に付着したかを判断し、タンパク質付着の再現性を評価するため、チップを抗GST抗体でプロービングした。93.5%を上回るタンパク質サンプルが、バックグラウンドを有意に超える(すなわち、約10 fgのタンパク質を上回る)シグナルを生じた。同じくスライドにプリンティングされた既知量のGSTとの比較により、約90%のスポットが約10 fg~950 fgのタンパク質を含むことが示された。3 mlの培養液から1/10,000の精製タンパク質しかスライドにスポットされないにも関わらず、蛍光標識化された抗体を用いた、プロテオームチップ上のタンパク質の検出は非常に感度が高い(すなわち、シグナル:ノイズ比が高い)。タンパク質スポットの再現性をテストするため、正副スポットの各対からのシグナルを互いと比較したところ、95%のシグナルが平均の5%以内であった。

【0268】

7.1.4. プロテオームマイクロアレイの使用法

生物学的活性のいくつかの種類例についてプロービングすることによりプロテオームチップをテストした:すなわち、タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-核酸相互作用、およびタンパク質-脂質相互作用。一般的に、プロテオームチップは、以下のようにアッセイ用に調製した。プリンティングしたスライドガラスを、BSA(PBS緩衝液に入った1~3% (w/w)BSA; SIGMATM, USA)またはグリセリンブロック緩衝液(30~300 mMグリシン; 50~300 mM Tris(pH 6.5~8.5); 50~300 mM NaCl; SIGMATM, USA)のいずれかに、タンパク質側を上にしてゆっくりと浸漬させて、プロテオームチップをブロックした。緩衝液を2マイクロンフィルターを通して濾過して粒子を除去した。スライドをブロック緩衝液中で、振とうせずに4 にて一晩インキュベートした(ブロック緩衝液の妨害により、スライドガラス上のタンパク質が筋になり得る)。

【0269】

プローブタンパク質は、概して、以下のように調製した。酵母タンパク質は、ビーズから溶出させない標準的プロトコールを使用して、50 ml培養液から、グルタチオンビーズを使用し、アフィニティーカラムにより精製した。タンパク質ビーズを冷たいPBS緩衝液(pH 8.0)(SIGMATM, USA)で3~5回洗浄した。0.1~50 mg/mlの濃度でPBS(pH 8.0)に溶解させた約1 mlのスルホ-NHS-LC-LC-ビオチン(PIERCETM Cat No. 21338, USA)を、グルタチオンビーズに添加し、4 にて2時間インキュベートした。ビーズを、冷たいPBS緩衝液(pH8.0)で5回洗浄し、100~500 µlの溶出緩衝液(50~200 mM HEPES pH 7.5; 50~200 mM NaCl; 20~40%グリセロール; 5~40 mMグルタチオン)で溶出した。ビオチン化がより弱いタンパク質を生じるプロトコールが好ましい。異なる程度にまでビオチン化されるタンパク質のバッチを、今後の使用のためにプールした。

【0270】

7.2. 結果および論考

7.2.1. ヒトRas相互作用酵母タンパク質の同定

10

20

30

40

50

一方の種に由来する非抗体タンパク質を使用して、他方の種に由来するタンパク質検体を検出および測定することを実証するため、上記構築した酵母プロテオームマイクロアレイを、ヒトタンパク質rasでプロービングした。Ras遺伝子は、進化的に保存され、単量体Gタンパク質結合GTP(活性形態)またはGDP(不活性形態)について体系化されている(Macalusoら, 2002, Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer, J Cell Physiol. 192(2):125-30)。各ras遺伝子における突然変異は、異なる腫瘍において見とめられることが多く、特定の新生組織形成の発達への関与を示唆している。これらの突然変異は、細胞サイクルの規制性を解除しうる構成的に活性かつ発癌性の可能性のあるタンパク質を生じる。最近の観察から、Ras活性化、アポトーシスおよび細胞性増殖間の複雑な関係が明らかになり始めている。これらのプロセスをより深く理解することで、いくつかの腫瘍における細胞サイクル規則性解除に直接的に関与する要素を識別する助けになり、さらに、新生細胞の増殖に対する制御についての特定の治療戦略を設計する助けになりうる。この例では、ヒトrasタンパク質プローブをビオチン化し、Cy3-標識化ストレプトアビジンを使用して結合したプローブを検出した。同種酵母rasタンパク質で、酵母プロテオームもプロービングした。

10

20

30

40

50

【0271】

簡単に言うと、ヒトおよび酵母rasタンパク質の組換えGST融合物を、上述したように精製およびビオチン化した。酵母プロテオームスライドを、50 ml 1X PBS、0.1% Tween-20、1% BSAで、振とうしながら冷室で1時間ブロックした。200 μ l(約10 μ l)のビオチン化ヒトまたは酵母rasタンパク質を別個のアレイに添加した。氷上で1時間プロービングを実施した後、1X PBS、0.1% Tween-20(PBST)で洗浄した。次いで、50 mlのPBST+0.3%B SAに入った3 μ lのCy5-ストレプトアビジン(PIERCE, USA; 1:2000~1:4000希釈)を添加し、振とうしながら6 にて1時間インキュベートした。次いで、スライドをPBSTで洗浄し、dH₂Oで2回濯いだ後に、遠心分離(4000 rpm)で1分間乾燥させた。100%レーザパワーおよび500 PMTの設定で、Axon Instrumentsマイクロアレイスキャナ上でスライドをスキャンした。

【0272】

ヒトおよび酵母rasタンパク質での酵母プロテオームマイクロアレイのプロービングの結果を図8に示す。左のパネル(A)は、ヒトrasタンパク質でプロービングした酵母プロテオームマイクロアレイから得たスキャン画像の一部を示す。右のパネル(B)は、酵母タンパク質でプロービングした酵母プロテオームマイクロアレイから得たスキャン画像の一部を示す。プローブと特異的に相互作用する単一のタンパク質を表すスポットの対は実線の四角で囲んだ。破線の四角は対照スポットを囲んでいる。図中、4つのタンパク質が、ヒトおよび酵母rasタンパク質の両方と相互作用することが分かる。これは、驚くべきことではない。なぜなら、これら2種のrasタンパク質間には有意な程度の相同性があることが知られているからである。1つの酵母タンパク質(左のパネルにおいて星印で示している)は、ヒトタンパク質としか特異的に相互作用しないことも留意されたい。従って、このタンパク質は、ヒトrasタンパク質を特異的に検出するためにアフィニティー試薬として使用できる。

【0273】

8. 引用文献

本明細書において引用した全ての参考文献は、それらの全体を参照により本明細書に援用する。これは、個々の文献、または特許もしくは特許出願を具体的且つ個別にあらゆる目的のために参照によりその全体を援用すると記載するのと同等の意味を持つ。

【0274】

9. 等価物

本発明の思想および範囲から逸脱することなく、本発明の多くの改変および変更を行うことができる。当業者は、本明細書に記載した本発明の特定の実施形態の様々な代替例、適用例、および改変例(これらは全て本発明の範囲内にある)を認識または常套的な実験により確認できるであろう。従って、請求の発明は、このような全ての等価物を包含するこ

とを意図する。つまり、本明細書に記載する具体的な実施形態は、あくまで例示のものであり、本発明は、請求の範囲、およびこのような請求の範囲が権利を有する等価物の範囲全体によってのみ限定される。

【図面の簡単な説明】

【0275】

【図1】検体と、検体の種と異なる種に由来する1つ以上のタンパク質との結合を示す模式図。(A)において、特定の種に由来する非抗体タンパク質M1は、M1の種と異なる種に由来する検体Aに結合する。(B)において、特定の種に由来する非抗体タンパク質M1、およびM1の種と同じまたは異なる種のいずれかに由来する第2の非抗体タンパク質M2は両方とも、タンパク質M1および/またはタンパク質M2の種と異なる種に由来する検体A上の異なる部位に結合する。

10

【図2A】検体に結合する2つの異なる非抗体タンパク質を使用して、目的の検体を検出するためのアッセイの模式図。(A)マイクロタイタープレートのウェルを、第1のタンパク質M1で被覆する。結合していないM1を洗浄した後、目的の検体Aを含むサンプルを、M1結合部位と異なる部位において検体に結合する第2のタンパク質M2と共に、各実験ウェルに添加する。M2は、検出可能シグナルDを生成可能な酵素と複合化している(ステップ1)。サンプルを、検体をM1およびM2の両方と結合させる条件下で、M1およびM2とインキュベートする。必要であれば、既知検体濃度の標準値(standard)/または陰性対照を、対照ウェル中で並行に処理してもよい。余分である結合していないM2を洗浄した後、検出可能生成物Pを生成する酵素基質Sを各ウェルに添加し、混合液を十分な時間、かつ酵素活性に適した条件下でインキュベートする(ステップ2)。検出可能生成物は、目的の検体が存在する場合には、閾値レベルを上回って生成される。検出可能生成物は、(例えば、スキャナまたは分光光度計を使用して)可視的に見とめられるか測定され、定質的または定量的な結果を得られる。サンプル中に存在する検体の量は、並行して測定される所定の標準値または標準曲線と比較することにより測定され得る。

20

【図2B】検体に結合する2つの異なる非抗体タンパク質を使用して、目的の検体を検出するためのアッセイの模式図。代替的なアッセイ形式では、目的の検体(A)を有するサンプルのみが、M1を含む各実験ウェルに添加され(ステップ1)、洗浄ステップを加えて、第2の結合分子M2を添加する前に結合していないサンプルを除去する(ステップ2)。その後、図2Aと同様に、検体の測定を実施する(ステップ3)。

30

【図3】検体に結合する2つの異なる非抗体タンパク質、および2つの検体結合タンパク質の一方に結合するリポータータンパク質を使用して、目的の検体を検出するためのアッセイの模式図。マイクロタイタープレートのウェルを、第1のタンパク質M1で被覆する。余分である結合していないM1を洗浄した後、以下をウェルに添加する：すなわち、1)目的の検体Aを有するサンプル、2)M1と異なる部位において検体に結合する第2のタンパク質M2、および3)検体に対するM2の結合エピトープとは異なるエピトープにおいてM2に結合し、検出可能シグナルDを生成可能な酵素と複合化している第3のタンパク質M3。検体がM1およびM2の両方に結合し、かつM3がM2に結合する条件下で、サンプルを、M1、M2およびM3とインキュベートする。必要であれば、既知検体濃度の標準値/または陰性対照を、対照ウェル中で並行に処理してもよい。余分である結合していないM2およびM3を洗浄した後、検出可能生成物を生成する酵素基質を各ウェルに添加し、図2に示すように検体の測定を実施できる。M1、M2およびM3は、同時にまたは順次に添加され得る。

40

【図4A】(A)検体に結合する2つの異なる非抗体タンパク質、および2つの検体結合タンパク質の一方に結合する2つのリポータータンパク質を使用して、目的の検体を検出するためのアッセイの模式図。マイクロタイタープレートのウェルを、第1のタンパク質M1で被覆する。余分である結合していないM1を洗浄した後、以下をウェルに添加する：すなわち、1)目的の検体Aを有するサンプル、2)M1と異なる部位において検体に結合する第2のタンパク質M2、3)検体に対するM2の結合エピトープとは異なるエピトープにおいてM2に結合し、検出可能シグナルDを生成可能な酵素と複合化している第3のタ

50

ンパク質 M 3、および 4) M 2 または M 3 の結合エピトープと異なるエピトープにおいて M 2 に結合し、かつ検出可能シグナル D を生成可能な酵素とも複合化している第 4 のタンパク質 M 4。検体が M 1 および M 2 の両方に結合し、かつ M 3 および M 4 が M 2 に結合する条件下で、サンプルを、M 1、M 2、M 3 および M 4 とインキュベートする。必要であれば、既知検体濃度の標準値/または陰性対照を、対照ウェル中で並行に処理してもよい。余分である結合していない M 2、M 3 および M 4 を洗浄した後、検出可能生成物を生成する酵素基質を各ウェルに添加すれば、図 2 に示すように検体の測定を実施できる。

【図 4 B】検体に結合する 2 つの異なるタンパク質、および 2 つのリポータータンパク質を使用して、目的の検体を検出するためのアッセイの模式図。第 4 の結合タンパク質 M 4 ' が M 2 ではなく M 3 に結合すること以外は、形式および手順は (A) と同様である。

【図 5 A】検体に結合する 2 つの異なる非抗体タンパク質、および 3 つのリポータータンパク質を使用して、目的の検体を検出するためのアッセイの模式図。マイクロタイタープレートのウェルを、第 1 のタンパク質 M 1 で被覆する。余分である結合していない M 1 を洗浄した後、目的の検体 A を含むサンプルを、M 1 と異なる部位において検体に結合する第 2 のタンパク質 M 2、および検出可能シグナル D を生成可能な酵素と複合化した 3 つのタンパク質と共に、各実験ウェルに添加する。検体を M 1 および M 2 の両方と結合させ、かつ他の 3 つのタンパク質がそれらのコグネイト結合部位と結合させる条件下で、サンプルを、5 つのタンパク質とインキュベートする。必要であれば、既知検体濃度の標準値/または陰性対照を、対照ウェル中で並行に処理してもよい。余分である結合していないタンパク質を洗浄した後、検出可能生成物を生成する酵素基質を各ウェルに添加し、その後検体の測定を図 2 に示すように実施できる。図 5 A ~ C における 3 つの形式は、異なる結合の組み合わせからなる限定しない代替的なアプローチであり、図 5 A では、M 1 および M 2 は検体に結合し、M 3 は M 2 に結合し、M 4 ' は M 3 に結合し、ならびに M 5 は M 2 に結合する。

【図 5 B】検体に結合する 2 つの異なる非抗体タンパク質、および 3 つのリポータータンパク質を使用して、目的の検体を検出するためのアッセイの模式図。M 1 および M 2 は検体に結合し、M 3 は M 2 に結合し、ならびに M 4 ' および M 5 ' は M 3 に結合する。

【図 5 C】検体に結合する 2 つの異なる非抗体タンパク質、および 3 つのリポータータンパク質を使用して、目的の検体を検出するためのアッセイの模式図。M 1 および M 2 は検体に結合し、M 3 は M 2 に結合し、M 4 ' は M 3 に結合し、ならびに M 5 ' は M 4 ' に結合する。

【図 6】2 つの異なる非抗体タンパク質(一方は、検体に結合し、検体と接触するとアロステリックな変化を生じ、他方は、そのようなアロステリックな変化の後に第 1 の結合タンパク質に結合する)を使用して、目的の検体を検出するためのアッセイの模式図。マイクロタイタープレートのウェルを、検体と接触するとアロステリックな変化を経ることが可能な第 1 のタンパク質 M 1 で被覆する。余分な結合していない M 1 を洗浄した後、目的の検体 A を有するサンプルを、各実験ウェルに添加する。洗浄により結合していないサンプルを除去した後、検出可能シグナル D を生成可能な酵素と複合化し、検体と異なる部位において M 1 に結合する(ただし、M 1 が検体に結合した場合にのみ)第 2 のタンパク質 M 2 を、各ウェルに添加する。必要であれば、既知検体濃度の標準値/または陰性対照を、対照ウェル中で並行に処理してもよい。余分である結合していない M 2 を洗浄した後、検出可能生成物 P を生成する酵素基質 S を各ウェルに添加し、混合液を十分な時間、かつ酵素活性に適した条件下でインキュベートすれば、検体の測定を図 2 に示すように実施し得る。検出可能生成物は、目的の検体が存在する場合に、閾値を上回って生成される。サンプル中に存在する検体の量は、並行して測定された所定の標準値または標準曲線に対して推測することにより測定できる。

【図 7】既知リガンドに結合する検体に結合する非抗体タンパク質を使用して、目的の検体を検出するためのアッセイの模式図。マイクロタイタープレートのウェルを、目的の検体のリガンド L で被覆する。余分である結合していない L を洗浄した後、目的の検体 A を有するサンプルを、M 1 ' が L に結合する部位と異なる部位において検体に結合し、検出

10

20

30

40

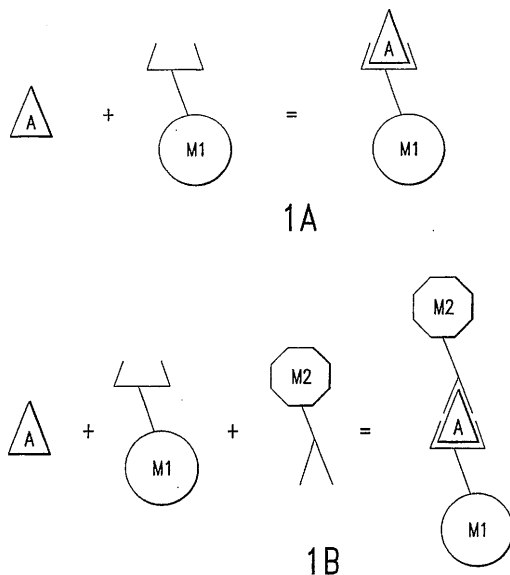
50

可能シグナルDを生成可能な酵素と複合化した第2のタンパク質M1'と共に、各実験ウェルに添加する。必要であれば、既知検体濃度の標準値/または陰性対照を、対照ウェル中で並行に処理してもよい。余分である結合していないM1'を洗浄した後、検出可能生成物Pを生成する酵素基質Sを各ウェルに添加し、混合液を十分な時間、かつ酵素活性に適した条件下でインキュベートすれば、検体の測定を図2に示すように実施し得る。検出可能生成物は、目的の検体が存在する場合に、閾値を上回って生成される。サンプル中に存在する検体の量は、並行して測定された所定の標準値または標準曲線に対して推測することにより測定できる。

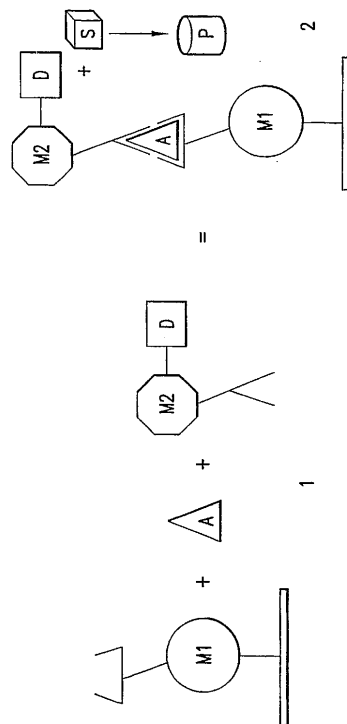
【図8】ヒトおよび酵母rasタンパク質で、酵母プロテオームマイクロアレイをプロービングした結果。上のパネル(A)は、ヒトrasタンパク質でプロービングした酵母プロテオームマイクロアレイから得たスキャン画像の一部を示す。下のパネル(B)は、酵母タンパク質でプロービングした酵母プロテオームマイクロアレイから得たスキャン画像の一部を示す。プローブと特異的に相互作用する単一のタンパク質を表すスポットの対は実線の四角で囲んだ。破線の四角は対照スポットを囲んでいる。図中、4つのタンパク質が、ヒトおよび酵母rasタンパク質の両方と相互作用することが分かる。1つの酵母タンパク質(左のパネルにおいて星印で示している)は、ヒトタンパク質としか特異的に相互作用しないことも留意されたい。従って、この酵母タンパク質は、ヒトrasタンパク質を特異的に検出するためにアフィニティー試薬として使用できる。詳細については実施例2を参照のこと。

10

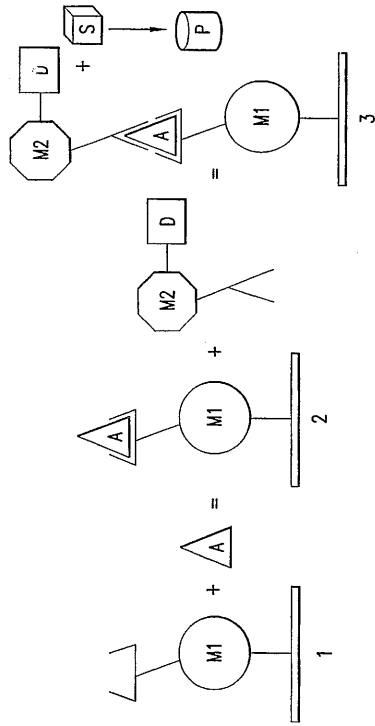
【図1】



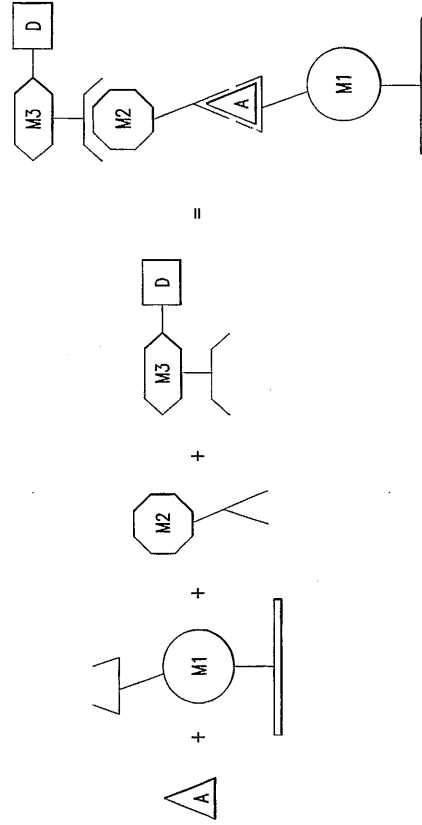
【図2A】



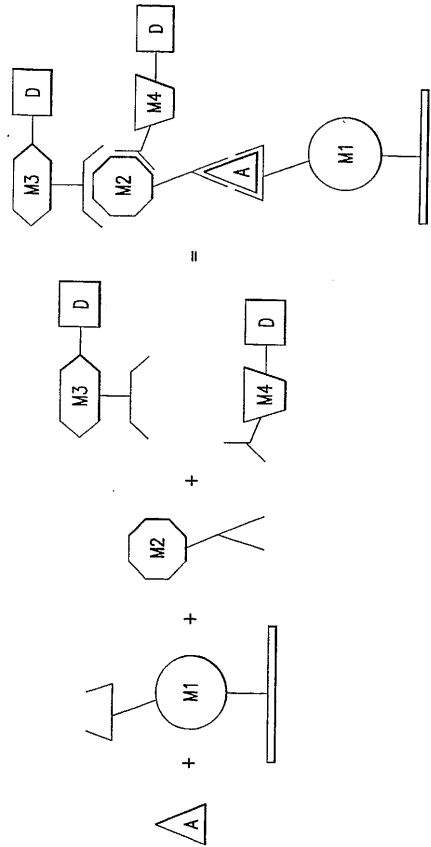
【 2 B 】



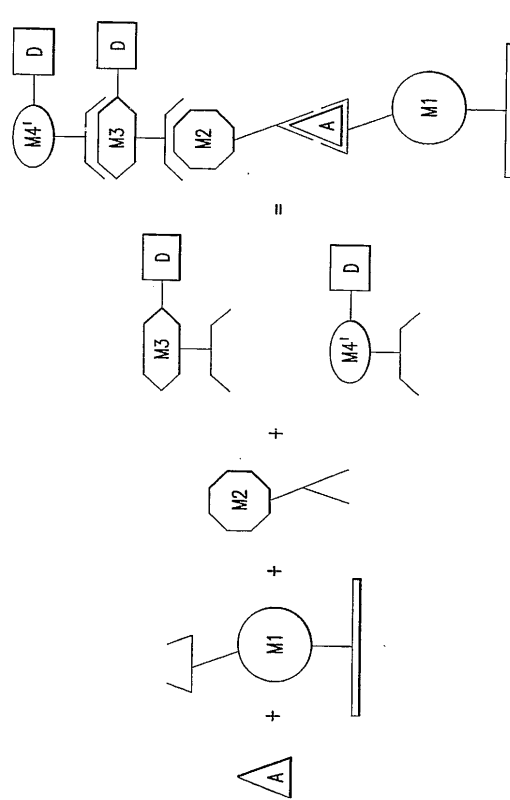
【 3 】



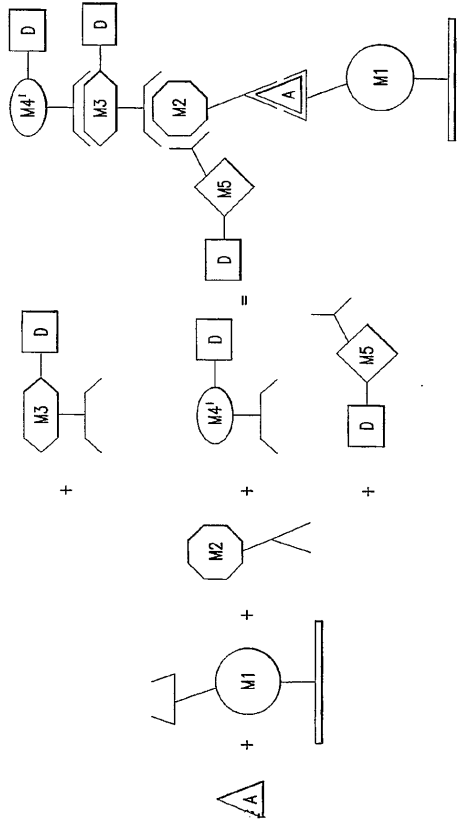
【 4 A 】



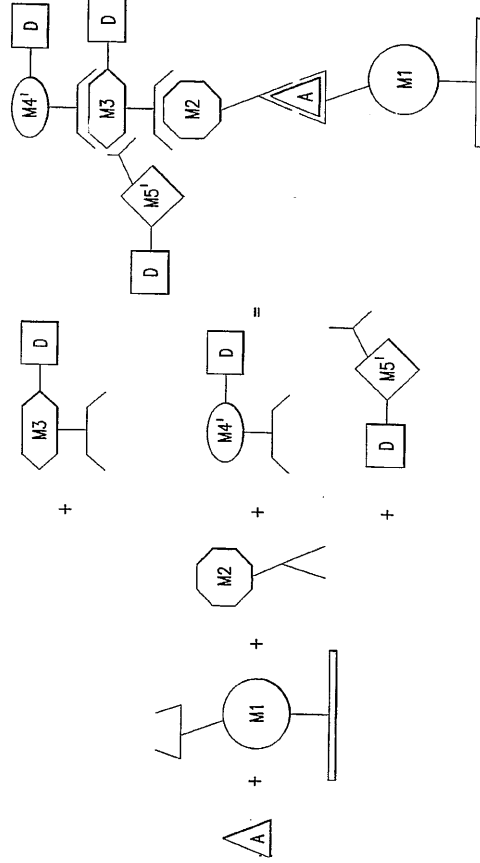
【 4 B 】



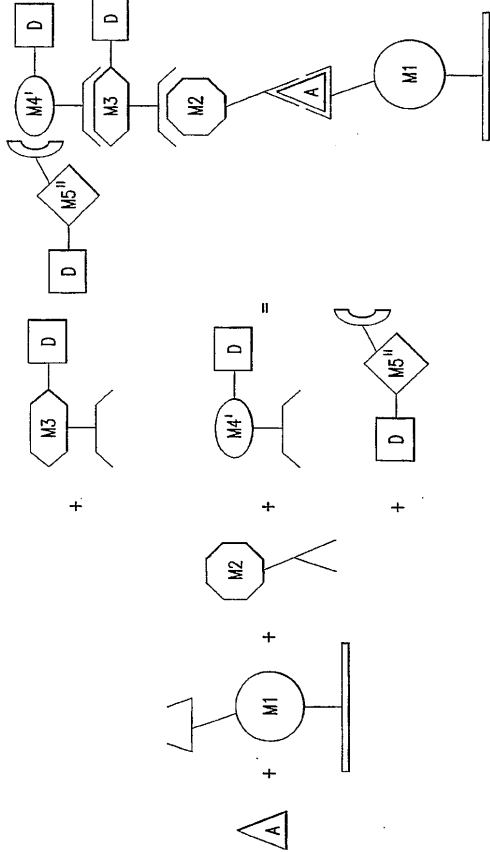
【 5 A 】



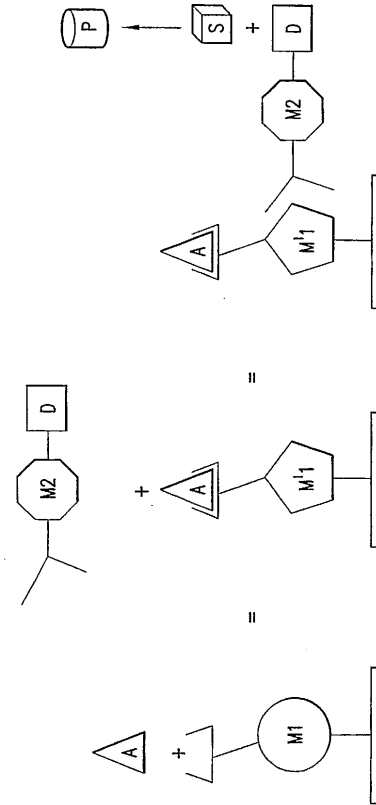
【 5 B 】



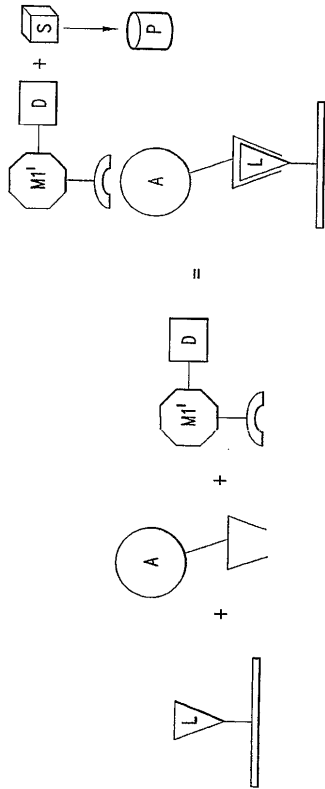
【 5 C 】



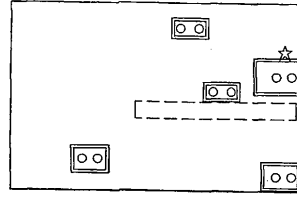
【 6 】



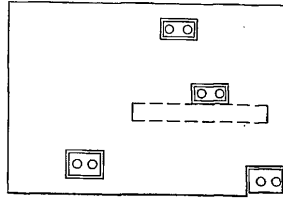
【 図 7 】



【 図 8 】



8A



8B

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/36959		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : G01N 33/53, 33/543, 33/544, 33/551; C12N 1/00 US CL : 435/7.1, 810; 436/518, 524, 528, 808				
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. : 435/7.1, 810; 436/518, 524, 528, 808				
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) STN, East				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	WO 01/83827 A1 (YALE UNIVERSITY) 08 November 2001 (08.11.2001), see entire document.	1-4, 9-36		
A	US 6,197,599 B1 (CHIN et al) 06 March 2001 (06.03.2001), see entire document.	1-36		
Y,P	US 6,329,209 B1 (WAGNER et al.) 11 December 2001 (11.12.2001), see entire document.	1-36		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 02 June 2003 (02.06.2003)		Date of mailing of the international search report 12 AUG 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer: Gary Counts Telephone No. (703) 308-0196		

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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 シャーマン, マイケル, アイ.

アメリカ合衆国 07028 ニュージャージー州, グレン リッジ, フォレスト アベニュー
314

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ42 QQ52 QR55 QR82 QS34 QS36 QX02

专利名称(译)	使用非抗体蛋白质检测和测量分析物的方法		
公开(公告)号	JP2005516183A	公开(公告)日	2005-06-02
申请号	JP2003545174	申请日	2002-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	原公司的指标		
申请(专利权)人(译)	原度量公司		
[标]发明人	シャーマンマイケルアイ		
发明人	シャーマン,マイケル,アイ.		
IPC分类号	G01N33/53 A61B C12N1/00 C12Q1/68 G01N33/543 G01N33/544 G01N33/551 G01N33/566 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/54306		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/68.A G01N33/566 G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	60/331706 2001-11-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及诊断，特别涉及用于检测和/或测量分析物的结合测定。本发明涉及通过与一种或多种非抗体分子结合确定分析物的存在和/或量的方法，特别是与衍生自不同于分析物种类的物种的非抗体分子。此外，本发明涉及通过检测和/或测量与特定疾病相关的标本来诊断疾病和确定进展程度的方法。

