

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-523747

(P2004-523747A)

(43) 公表日 平成16年8月5日(2004.8.5)

(51) Int.Cl.⁷

G01N 33/53

F I

G01N 33/53

D

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 88 頁)

(21) 出願番号 特願2002-556705 (P2002-556705)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月9日 (2002.1.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年7月9日 (2003.7.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/000060
 (87) 国際公開番号 W02002/055654
 (87) 国際公開日 平成14年7月18日 (2002.7.18)
 (31) 優先権主張番号 60/260, 217
 (32) 優先日 平成13年1月9日 (2001.1.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/977, 358
 (32) 優先日 平成13年10月16日 (2001.10.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501288525
 ラージ スケール プロテオミクス コー
 ポレーション
 アメリカ合衆国, メリーランド州 208
 76, ジャーマンタウン, ゴールデンロッ
 ド レーン 20451
 (71) 出願人 503248008
 ピーパー, レムバート
 アメリカ合衆国ワシントン・ディー・シー
 ・20008, ノースウエスト・ナンバー
 204, ティルデン・ストリート・302
 O
 (74) 代理人 100087642
 弁理士 古谷 聡

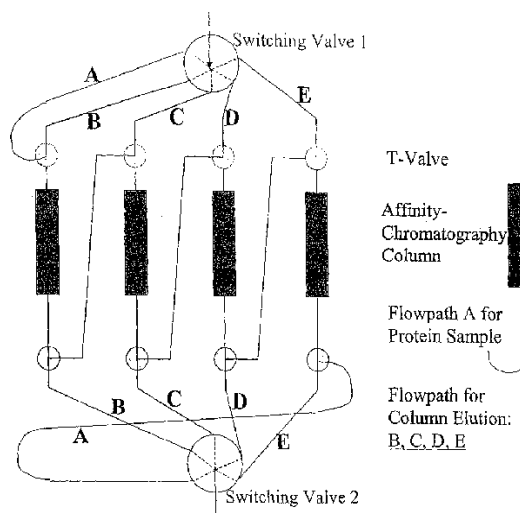
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2-D GE 用試料調製のための免疫サブトラクション法

(57) 【要約】

2次元ゲル電気泳動などにおいて、試料から豊富なタンパク質を除去することによって、試料中のより豊富でないタンパク質の検出及び分析が向上される。この除去は、いくつかの極めて豊富な、干渉又は汚染を生ずるタンパク質を同時に免疫除去することによって達成される。

【選択図】図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

相互に接触する第 1 及び第 2 の固相マトリックスと、
第 1 のリガンドに対して特異的に結合可能であるが第 2 のリガンドに対してはそうでない、前記第 1 の固相マトリックスに固定化された第 1 の受容体と、及び
前記第 2 のリガンドに対して特異的に結合可能であるが、前記第 1 のリガンドに対してはそうでない、前記第 2 の固相マトリックスに固定化された第 2 の受容体とからなる、親和性結合組成物。

【請求項 2】

第 3 のリガンドに対して特異的に結合可能であるが、前記第 1 のリガンド又は前記第 2 のリガンドに対してはそうでない、第 3 の固相マトリックスに固定化された第 3 の受容体をさらに含む、請求項 1 に記載の親和性結合組成物。 10

【請求項 3】

第 4 のリガンドに対して特異的に結合可能であるが、前記第 1 のリガンド、前記第 2 のリガンド、又は前記第 3 のリガンドに対してはそうでない、第 4 の固相マトリックスに固定化された第 4 の受容体をさらに含む、請求項 2 に記載の親和性結合組成物。

【請求項 4】

第 5 のリガンドに対して特異的に結合可能であるが、前記第 1 のリガンド、前記第 2 のリガンド、前記第 3 のリガンド、又は前記第 4 のリガンドに対してはそうでない、第 5 の固相マトリックスに固定化された第 5 の受容体をさらに含む、請求項 3 に記載の親和性結合組成物。 20

【請求項 5】

前記リガンドがタンパク質である、請求項 1 に記載の親和性結合組成物。

【請求項 6】

前記受容体が抗体である、請求項 1 に記載の親和性結合組成物。

【請求項 7】

前記マトリックスが多孔性である、請求項 1 に記載の親和性結合組成物。

【請求項 8】

液体入口及び液体出口を備えるチャンバと、前記チャンバ内の請求項 1 に記載の親和性結合組成物からなり、前記入口から前記出口に流れる液体が前記親和性結合組成物を通過又は貫通する、親和性カラム。 30

【請求項 9】

液体入口及び液体出口を備えるチャンバと、前記チャンバ内の請求項 2 に記載の親和性結合組成物からなり、前記入口から前記出口に流れる液体が前記親和性結合組成物を通過又は貫通する、親和性カラム。

【請求項 10】

液体入口及び液体出口を備えるチャンバと、前記チャンバ内の請求項 6 に記載の親和性結合組成物からなり、前記入口から前記出口に流れる液体が前記親和性結合組成物を通過又は貫通する、親和性カラム。

【請求項 11】

受容体を有する少なくとも 1 つの固相マトリックスが、異なる受容体を有する少なくとも 1 つの他の固相マトリックスから選択的に除去可能である、請求項 10 に記載の親和性カラム。 40

【請求項 12】

液体入口及び液体出口を備えるチャンバと、前記チャンバ内の請求項 7 に記載の親和性結合組成物からなり、前記入口から前記出口に流れる液体が前記親和性結合組成物を通過又は貫通する、親和性カラム。

【請求項 13】

第 1 の液体入口、第 1 の液体出口、及び、第 1 の固相マトリックスに固定化され、第 1 のリガンドに対して特異的に結合可能であるが第 2 のリガンドに対してはそうでない第 1 の 50

受容体を含むチャンバを備えた、第 1 の親和性カラムと、
第 2 の液体入口、第 2 の液体出口、及び、第 2 の固相マトリックスに固定化され、第 2 の
リガンドに対して特異的に結合可能であるが第 1 のリガンドに対してはそうでない第 2 の
受容体を含むチャンバを備えた、第 2 の親和性カラムと、及び
前記第 1 の液体出口を前記第 2 の液体入口に接続する導管とからなる、親和性分離装置。

【請求項 1 4】

受容体を含む液体をリガンドに接触させ、
前記リガンドに結合した前記受容体を、前記受容体を含む液体中の他の成分から分離し、
前記リガンドに結合した前記受容体を溶離して、精製受容体を生成し、及び
前記精製受容体をマトリックスに固定化して受容体マトリックスを形成することからなる 10
、受容体マトリックスの調製方法。

【請求項 1 5】

前記精製受容体を固定化する前に、さらに、前記溶離に寄与した試薬を中和又は除去し、
或いは中和及び除去し、若しくは物理的条件を変更する、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記試薬が脱塩によって除去される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記リガンドが固定化される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 8】

第 2 の受容体及び第 2 のリガンドについて前記方法を繰り返し、第 2 の受容体マトリックス 20
を調製する、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記受容体マトリックスと前記第 2 の受容体マトリックスを混合する、請求項 1 8 に記載
の方法。

【請求項 2 0】

第 3 の受容体及び第 3 のリガンドについて前記方法を繰り返し、第 3 の受容体マトリックス
を調製する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記受容体が抗体であり、前記リガンドがタンパク質である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 2】

液体入口、液体出口を備え、固定化されたりガンドを含む第 1 のカラムと、
液体入口、液体出口を備え、受容体を固定化するためのマトリックスを含む第 2 のカラム
と、及び

前記第 1 のカラムの出口と前記第 2 のカラムの入口との間の液体接続とからなる、受容体
マトリックスを調製するための装置。

【請求項 2 3】

液体入口、液体出口を備え、試薬の中和剤又は除去剤或いは受容体 - リガンド結合を解離
させる条件を含む中間カラムをさらに含み、

前記第 1 のカラムの液体出口が前記中間カラムの入口に対する液体接続を備え、前記中間
カラムの出口が前記第 2 のカラムの入口に対する液体接続を備える、請求項 2 2 に記載の 40
装置。

【請求項 2 4】

第 1 の受容体マトリックスと第 2 の受容体マトリックスを混合することからなり、
前記第 1 の受容体が前記第 2 の受容体とは異なるリガンドと結合する、受容体マトリックス
の調製方法。

【請求項 2 5】

複数の化学的に異なる架橋剤を 2 つのタンパク質に同時に反応させることからなり、
両方の架橋剤だけで前記 2 つのタンパク質の間に共有結合を形成可能である、2 つのタン
パク質の間に共有結合を形成するための方法。

【請求項 2 6】

前記架橋剤と反応する前に、前記 2 つのタンパク質は非共有結合によって相互に結合している、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

試料から少なくとも 2 つの特定の事前定義されたりガンドを除去し、及び前記試料中に残存するリガンドを分析することからなる、試料からリガンドを分離し、残存するリガンドを分析するための方法。

【請求項 28】

少なくとも 3 つのリガンドが除去される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

少なくとも 4 つのリガンドが除去される、請求項 28 に記載の方法。

10

【請求項 30】

前記リガンドがタンパク質である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 31】

前記リガンドが特定の事前定義された受容体との結合によって除去され、前記受容体の不溶性形態であるか、又はリガンドとの結合後に不溶化される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 32】

前記試料中の全リガンドの少なくとも 50 重量%が除去される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 32】

前記試料中の全リガンドの少なくとも 75 重量%が除去される、請求項 32 に記載の方法。

20

【請求項 33】

前記結合したリガンドを前記受容体から除去する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記受容体を新しい試料に再使用することによって前記処理が繰り返される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

同じ受容体で前記処理が 20 回繰り返される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

同じ受容体で前記処理が 50 回繰り返される、請求項 35 に記載の方法。

30

【請求項 37】

同じ受容体で前記処理が 200 回繰り返される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記残存するリガンドが、前記残存するリガンドの分離及び定量によって分析される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 39】

少なくとも 1 つの固定化された受容体が、少なくとも 1 つの他の固定化された受容体から選択的に除去される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 40】

1 つの受容体画分を他の受容体画分から選択的に除去可能である、請求項 31 に記載の方法。

40

【請求項 41】

少なくとも 2 つの受容体画分が少なくとも 2 つの事前定義された位置に固定化され、少なくとも 1 つの受容体が、別の受容体とは異なる事前定義された位置に配置され、及び前記試料が、両方の事前定義された位置を順次通される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 42】

前記 2 つの特定の事前定義されたりガンドの本質的に全てが前記試料から除去される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 43】

タンパク質含有試料から分離されたタンパク質を含む 2 次元電気泳動ゲルであって、少な

50

くとも2つの所定のタンパク質が前記ゲル中に実質的に存在せず、前記タンパク質含有試料が前記所定のタンパク質を含み、前記試料中の他のタンパク質が2次元電気泳動ゲル中に存在する、2次元電気泳動ゲル。

【請求項44】

タンパク質含有試料から分離されたタンパク質を含む2次元電気泳動ゲルであって、少なくとも2つの所定のタンパク質及びこれらに結合したタンパク質が前記ゲル中に存在する実質的に全てのタンパク質であり、前記タンパク質含有試料が前記所定のタンパク質及び前記これらに結合したタンパク質を前記試料中に含む、2次元電気泳動ゲル。

【請求項45】

前記2次元電気泳動ゲル中に、実質的に前記結合したタンパク質のみが存在する、請求項44に記載の2次元電気泳動ゲル。 10

【請求項46】

請求項27に記載の方法によって生成された、変性リガンド含有試料。

【請求項47】

ある試料中の他のタンパク質に自然に結合した関連タンパク質を検出するための方法であって、

1つ又はより多くのタンパク質に対する固定化された受容体と、前記タンパク質及びそれに自然に結合した関連タンパク質との結合を可能にする条件下において、前記試料を前記受容体に接触させ、

前記固定化された受容体から非結合タンパク質を除去し、及び 20

前記自然に結合した関連タンパク質の存在を検出することからなる方法。

【請求項48】

前記自然に結合した関連タンパク質を、前記受容体及び前記タンパク質から溶離する、請求項47に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【背景技術】

【0002】

複合試料からタンパク質を迅速及び特異的に精製するについて関心の高いクロマトグラフィ手法は、免疫アフィニティクロマトグラフィである。例えば、Anuradha Subramanian「Methods in Molecular Biology」における章、Affinity Chromatography第147巻p. 95以下、Pfeiffer他J. Immunol. Methods97p. 1-9、及びCuatrecasas, J. Boil. Chem. 245、p. 3059以下を参照されたい。この技法は、免疫アフィニティクロマトグラフィカラムによって試料から成分を分離するための、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の適用に関して改良されている。Gersten & Marchalonis, J. Immunol. Methods127、p. 215以下、及びSchneider他、J. Biol. Chem. 257、p. 10766以下には、より大きな容量でもって抗原を第1のステップで結合し第2のステップで溶離させるのを容易にする、クロマトグラフィマトリックスへの抗体の部位特異的な固定化に関する大幅な改良が報告されている。 30

【0003】

ほとんどの場合、免疫アフィニティクロマトグラフィは、特定のタンパク質の精製に用いられてきた。より少ない事例では、免疫アフィニティクロマトグラフィマトリックスを利用する目的は、例えば、組織又は体液試料からウイルス(タンパク)成分を特異的に取り除くとか(Schreiber他、Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus. 1989年、第56号、p. 146以下)、あるいは、患者の血液から臨床的に望ましくないタンパク質を除去するといった(Vallar他、J. Chromatogr. Biomed. Appl. 1995年、第664号、p. 97以下)、望ましくないタンパク質のサブトラクション即ち除去であった。この場合において、免疫アフィニティクロマトグラフィマトリックスに対して親和性のないタンパク質混合物を回収することが、主たる問題になる。Flurer及びNovotny (Anal. Chem. 1993年、第15巻、p. 817以下)は、免疫アフィニティクロマトグラフィカラムを用いて 40 50

、ヒトの血漿からタンパク質が除去され、２次元ＲＰ－ＨＰＬＣによって血漿タンパク質分布が生成される、分析スケールの手法について解説している。

【０００４】

２次元ゲル電気泳動（２－ＤＧＥ）は、複数のタンパク質を含有する試料中の個々のタンパク質を識別できるようにする方法である。こうした試料には、細胞ライセート、組織ライセート、血清試料等が含まれる。タンパク質を同定する上での困難が生じるのは、タンパク質が同様の電荷及び分子量を有し、そのため２つ又はより多くのタンパク質が同様に移動し、ディスプレイではほぼ同様に近接して位置する場合である。

【０００５】

同定が困難になる別の要因は、１つ又はいくつかの極めて豊富なタンパク質の存在量が本来的に異なることである。こうしたタンパク質は一般に、他のより豊富ではないタンパク質と共に、２次元（２－Ｄ）電気泳動ゲル上で共に移動する。より豊富ではないタンパク質を検出しようとしてゲルに十分なタンパク質を加えると、２－Ｄゲルの像は極めて豊富なタンパク質によって極めて強く着色又は標識され、その結果、近くの関係のないタンパク質の弱い信号は隠蔽される。この効果は、ＷＯ ０１／１６８８４において実証されたように、染色が顕色するにつれて一連の光学測定を行うことによって、部分的に改善することが可能である。

10

【０００６】

さらに、等電点電気泳動手法においては、限られた量の試料タンパク質を用いて、許容可能な分離を実現することが可能である。２－Ｄゲルは、保持可能な全タンパク質の量に制限があり、従ってゲル中でより豊富でないタンパク質試料の量を最大化するのが望ましい。そこでＷＯ ００／３３０７５では、１回又はより多くの２－ＤＧＥを実施する前に、試料を分画することが提案されている。

20

【０００７】

これらの困難な条件は、ゲルの同じ辺りにある異なるタンパク質を明らかにすることが可能な、差別的検出法を利用して克服することが可能である。例えば、特定のタンパク質、及び恐らくはその副次的な変種に特異的に結合する試薬（例えば抗体、受容体、又はレポータ分子としてのリガンド）を利用するといった、特異的検出手段を用いることが可能である。かくして、より豊富なタンパク質を含有する試料中におけるより豊富ではないタンパク質の検出を可能にする技法が必要とされる。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

本発明の目的は、クロマトグラフィ、電気泳動、質量分析、結合反応等のような、タンパク質分析に用いられることになる試料から、所望の、所望でない、及び／又は豊富なタンパク質を選択的に除去する方法及び手段を提供することにある。除去されるタンパク質は一般に、試料中に豊富にあり、従ってこれらが、より豊富でないタンパク質のために選択される。所望の目標にとって中心となる本発明の実施態様の１つは、分析を受ける試料中の他のタンパク質の濃縮を可能にするだけでなく、タンパク質の再現可能な定量化、サブトラクションマトリックスの再生利用可能性、高い処理量をも可能にするいくつかのタンパク質の除去である。目標の１つは、免疫サブトラクション（除去）技法に適切な高分解能の技法によって、試料中の多くのタンパク質を同時に定量することである。

40

【０００９】

これまでは、２次元ゲル電気泳動（２－ＤＧＥ）が、タンパク質について高分解能及び高処理量を可能にする、利用可能な最良の技法であった。２－ＤＧＥの障害は、ゲルに数百の精製されたタンパク質のスポットが生じることになる高分解能な、類似性の高いタンパク質の電気泳動分離に対して、制限された量のタンパク質しか適用できないという点である。本発明を利用すると、タンパク質試料から幾つかのタンパク質が除去されており、また同時に、他のより豊富でないタンパク質がかなり濃縮されている場合、数百の追加スポットを２－ＤＧＥによって分解し、プロテオミクスデータ分析によって定量することが可

50

能になる。こうした方法がうまくいくためには、試料中に残存するより豊富でないタンパク質を不当に希釈してはならない。従って例えば、より豊富なタンパク質の約80%又はより多くを試料から完全に除去する場合、より豊富でないタンパク質の有効濃度は5倍に増し、これに応じてタンパク質の定量感度も高くなる。

【課題を解決するための手段】

【0010】

2-DGEのような、タンパク質分離及び/又は同定技法による分離及び/又は同定に適した試料は、どれも、本発明の選択的分画がやりやすい。本発明の特定の用途は、試料から豊富なタンパク質を除去して、一般により豊富でない共に移動するタンパク質及びより豊富でないタンパク質の2-Dゲル上での分解を可能にすることである。この除去は、分離を促進し、試料の希釈を抑える低抵抗マトリックスの利用によって容易になる。

【0011】

適切な試料には、細胞ライセート、組織ライセート、器官ライセート、生物体ライセート、体液試料、垂細胞画分、環境試料等が含まれる。それぞれの可溶性画分を用いるのが望ましい。適切な液体試料には、動物の場合、細胞質、血漿、血清、全血、脳脊髄液(CSF)、滑液、組織液、胆汁や精液等の器官液、体液、粘液、滲出液、唾液及び涙のような分泌物、尿及び汗のような老廃物、及び他の生物学的液体が含まれる。植物、微生物、及び、他のこうした有機体の場合、他のさまざまな液体、組織、及び細胞抽出液が含まれる。従って、葉の組織のような植物の組織は、適正な緩衝液内で分解することによって、適正な試料が得られる。また、樹液のような天然の植物液を利用することも可能である。さまざまな他の環境的及び生物学的試料には、1つ又はより多くの共通するタンパク質、汚染物、干渉物質、又は、天然に産生する極めて豊富な物質、微生物、又は、細胞が、かなりの割合で含有されている。1又は2-DGE、液体クロマトグラフィ、質量分析(ICAT-MSを含む)、HPLC、結合分析、染色等によるような、こうした試料の任意のプロテオメトリック分析、及び試料からの単一のタンパク質の検出の場合でさえ、本発明のサブトラクション技法の恩恵に浴することが可能である。

【0012】

環境的試料及び工業用試料の場合、極めて豊富な物質又は干渉物質が存在することが多い。例えば、下水中の病原体にスクリーニングを施す場合、極めて多数の比較的無害なバクテリア又はウイルスが存在している。本発明のものを含む任意の濃縮法によって、所望の物質の検出及び/又は定量化及び/又は分離が単純化される。

【0013】

汚染物質及び干渉物質の除去は、多くの状況にとって重要である。プロテアーゼ及びヌクレアーゼは、多くの試料に遍在しており、測定される分析物を劣化させるので、通常は望ましくない。タンパク質及びペプチドの質量分析の分野では、試料及び中間体はケラチンによって汚染される場合が多いが、これはヒトが絶えず周囲にこのタンパク質を放出してためである。こうした汚染試料は容易に分析することができない。こうした状況において、質量分析の準備プロセスにおける初期試料採集時点から、より好ましくはもっと後の時点までの、プロセスの任意の時点において、ケラチン又はそのペプチドに対する受容体を有する免疫サブトラクションカラムを利用することが可能である。特に望ましいのは、LC/MSのための液体クロマトグラフィカラムに試料が注入される直前に、カラムを利用することである。

【0014】

血液及び血清タンパク質はまた、どの組織にとっても共通の汚染物質であり、従って分析を終了する前に、試料からこれらを除去するのが望ましい。また、免疫化のため抗原を調製する場合、特定の免疫優性抗原又は免疫抑制化合物を除去するのが望ましい場合が多い。さらに、DNA結合タンパク質又はそれらがDNA上で結合する「フットプリント」を分離したい場合には、選択的除去システムも望ましい。生物学的液体の従来のイムノアッセイ、臨床化学分析、及び、他の分析では、天然タンパク質による干渉が多い。アルブミンのような多量のタンパク質を含有する試料は、周知のように、濁度、分析物の吸着等の

ため、取り扱いが困難である。この問題を解決するための従来の方法は、生理食塩水で試料を希釈することである。これはうまく作用するが、豊富でない分析物の濃度はさらに、おそらくは検出不可能な値域まで低下する。本発明は、過剰の希釈なしに生物学的試料中の干渉物質を除去するのに有効であり、実際のところ、そうした豊富でない分析物の検出及び定量に役立つ濃度とすることさえ可能である。

【0015】

植物は、選択される組織に応じて、いくつかの共通するタンパク質を備えている。豆の種子の場合、全タンパク質の約40%がファゼオリンである。トウモロコシの種子の場合、共通するタンパク質には、ゼイン、グロブリン、プロタミン、及びグルチンなどがある。脂肪種子の多くでは、1つ又は少数の貯蔵タンパク質が、全タンパク質のかなりの部分を占めている。 10

【0016】

種子の貯蔵タンパク質以外では、大部分の植物の葉の組織は、その大きい単位及び小さい単位を考慮すると、約20~30%のルビスコを含有しており、これは露光後には高レベルになり、光がないと低レベルになる。他の共通するタンパク質には、葉緑体とサイトゾルの両方のリボソームタンパク質、チラコイト、光合成系Ⅰタンパク質、光合成系Ⅱタンパク質、葉緑体膜結合タンパク質、及び他の構造タンパク質が含まれる。

【0017】

植物、又は培地内の植物細胞がウイルス感染を受けた場合、天然のものか人工によるものに関係なく、全タンパク質のかなりの部分が、ウイルス性となる可能性がある。例えば、感染した組織からは、全タンパク質試料中で20~30%のタバコモザイクウイルス外殻タンパク質が発見される可能性がある。 20

【0018】

同様に、バクテリオファージに感染したバクテリア及びウイルスに感染した動物細胞は、全タンパク質試料中に、かなりの割合のウイルスタンパク質を含有している可能性がある。

【0019】

従って、そうした状況においては、やはり、干渉タンパク質又は豊富なタンパク質の除去が望ましい。

【0020】

試料からのタンパク質の除去は、除去すべきタンパク質と特異的に結合する受容体に試料をさらすことによって行われる。結合剤の再利用、並びに、分離されたタンパク質種の回収を可能にするため、結合は可逆性であるのが望ましい。適切な結合分子には、抗体、コンカナバリンA、コムギ胚芽凝集素、アブリン等のレクチン、受容体、金属、補因子、除去されるリガンド(アプタマー)に対して特異的結合受容体の働きをするように設計された組み合わせ化合物、重合体、核酸、人工タンパク質配列、及びヘパリン、ポリミキシンのような特定クラスのタンパク質、チバクロンブルーF3GAのような色素、及び、疎水性タンパク質を結合するメチル及びフェニル基のような炭化水素を結合する他の化合物が含まれる。試薬は、タンパク質が誘引される官能基を含む場合が多い。こうした官能基の例には、ヒドラジド、アミン、N-ヒドロキシ-スクシンイミド、カルボキシル、ホウ酸塩、及び、有機水銀が含まれる。 30 40

【0021】

本特許出願は、一般に、試料からのタンパク質の除去に関するものであるが、本技法は、干渉し、妨害する、又は単に極めて豊富に存在する物質、複合体、粒子など、さらには微生物全体や細胞さえも含む、任意のリガンドを除去するために利用することが可能である。同様に、特異的に結合する相手方の具体例としては抗体が挙げられるが、現在説明中の技法に関して、試料中のリガンドと特異的に結合する任意の受容体を用いることが可能である。リガンド及び対応する受容体は、相互に比較的特異的に結合する。リガンドも受容体も、単一の化合物である必要はなく、複合体、錯体、粒子、及び、さらに大きい構造を含むことも可能である。本特許出願は、アフィニティ及び免疫アフィニティという用語を特 50

定の例に用いているが、これらは受容体とリガンドの間の特異的結合関係を表すものと、広義に解釈すべきである。

【0022】

望ましい結合分子は抗体である。抗体は、任意の動物種のものであることが可能である。抗体は、天然でも、あるいは組み換えによって生成されたものでもかまわない。抗体は、任意のクラス、サブクラス、単鎖、及び、単機能性、二機能性、又は多機能性のものとすることが可能である。抗体は、もとのままか、又は、ほぼもとのままにしておくことが可能である。すなわち、抗原との結合又はFc受容体との結合のような所望の機能が保持される限りにおいて、抗体のさまざまな部分を除去することが可能である。従って、グリコシル化部位を削除し、かつFc受容体結合能力を保持することが可能である。

10

【0023】

クローンによって、高親和性、高結合活性、又はその両方を備えた抗体が、本質的に量的に無制限に、質的に再現可能に得られるので、モノクローナル抗体は強力な試薬である。個々の抗体は、抗体とマトリックスの結合によって、抗原結合に障害を生じないことを確認するため、本明細書の教示に従って検査することが可能である。さらに、モノクローナル抗体を利用すると、本明細書で教示するように、対象となる同族抗原が結合したマトリックスを用いて抗体を精製する必要性がなくなる。

【0024】

試料から極めて豊富なタンパク質を除去するため、マトリックスに結合させられる特異的結合剤は、組み換えにより生成された、単鎖の二重特異性抗体又は抗体ディスプレイファージとすることも可能である。抗体ディスプレイファージが利用され、従来のパニングがその調製に用いられる場合、極めて親和性の高い及び/又は結合活性の高いディスプレイファージが調製される。しかし、プロテインA、又はGと結合するFc部分のない抗体は、異なる付着メカニズムを必要とする。しかし、ディスプレイファージは本質的に多価であるため、多くの技法によって固相に固定化することが可能であり、しかも依然として抗原結合のない抗体状の機能成分を備える。

20

【0025】

Fab又はFab2のような抗体断片を利用することが可能であるが、Fabの非エピトープ領域のための特異的結合剤を備えた固相を利用することになる。二官能性抗体(二重特異性抗体及び再組み合わせFab2又は再組み合わせ抗体)は、それぞれ、第1の抗原結合部分と、第2の抗原結合部分を備えることができる。二官能性抗体を固定化するための方法として、第1の抗原に結合した固相を有するのが有利である可能性があり、これはまた本明細書で説明するように、さらに架橋させることができる。これによって、結合を受けない試料から除去される抗原のための結合部位が残される。

30

【0026】

合成受容体に関する最近の進展は、有望であるように思われる。これらは、単独か、又はより長い重合体配列内で用いられるかはともかくとして、組合せペプチド、オリゴマ、重合体等である。本発明の目的からすると、これらも受容体とみなされる。

【0027】

分離及び除去プロセスを容易にするため、結合分子は、結合剤及び試料に対して不活性な固相に固定化するのが望ましい。結合剤は、既知の手法を用いて、結合剤又は分子のタンパク質結合能力を実質的に低下させないやり方で、固相に固定される。さらに、マトリックスの再現性を促進するため、結合分子は固相にしっかりと結合するのが望ましい。従って例えば、結合分子は、固相に吸着し、共有結合し、又は捕捉することが可能であり、或いは固相のコーティングに付着させるか、又は取り込むことが可能である。

40

【0028】

結合剤又は分子の固定化に望ましい固相は、強化表面領域を備えるマトリックスである。適切なマトリックスは、例えば、ビーズ又は微小ビーズ形状及び形態である。こうしたビーズ又は微小ビーズは一般に、特定の樹脂又は重合体の球体であり、抗体を結合し、抗体に対して実質的に不活性であり、試料に対して実質的に不活性であり、分離プロセスに用

50

いられる条件下で安定であるといった、アフィニティークロマトグラフィに適した特性を備える。

【0029】

適切なマトリックスは、デキストラン、スチレン、アガロース、リン酸カルシウム、アクリル酸エステル、ポリアミン、アクリルアミド、シリカのような材料から造られたビーズである。シリカのような材料は通常、化学的に「樹脂」とはみなされないけれども、本明細書においてはこれらを総称して「樹脂」と呼ぶ。多くのこうした材料は、例えばファルマシア社、バイオラド社、シグマ社、及び他の販売業者から市販されている。望ましいマトリックスは、低い背圧で高流速を可能にするものである。とりわけ望ましいのは、P O R O S (商標) (カリフォルニア州フォスターシティのアプライド・バイオシステムズ社の商標) クロマトグラフィ媒体ゲルビーズのような灌流クロマトグラフィを可能にする多孔質ビーズのような、タンパク質多孔性マトリックス、及び、U N O (商標) (カリフォルニア州リッチモンドのバイオラド・ラボラトリ社の商標) クロマトグラフィカラムのような連続ベッドマトリックスを利用した、高処理量の技法である。他の適切なマトリックスが、ファルマシア社他によって生産されている。

10

【0030】

高速分離の場合、固体マトリックスを用いて、液体がマトリックスを迅速に貫通するか、又はその表面を通過することができるようにするのが望ましい。前に結合した材料が溶離した後、同じマトリックスに多数の試料を順次通すことにより、それらの試料を同様に処理したい場合、試料がマトリックスを通過する速度は、時間制限因子になる。「灌流」マトリックスは、この技法にとってとりわけ望ましいが、他のマトリックスを利用することも可能である。以下の例のいくつかでは、100を超える試料を同じカラムに通して、試料の充填、非結合タンパク質の溶離、溶離緩衝液の添加、結合タンパク質の溶離、及び最終洗浄からなる1サイクルを完了するのにかった時間が、約15分以下であった。

20

【0031】

分離されることになっている試料は、一般に量が少ないので、迅速で、試料をあまり希釈しない分離プロセスを行うのが望ましい。とりわけ、空隙容量、又は固相マトリックスと結合しない入力タンパク質の部分には、もとの試料において豊富でないタンパク質が含まれているためである。

【0032】

P O R O S 粒子はスチレン及びジビニルベンゼンの微小球体に相当し、これらは相互付着して、粒子内に豊富な孔とチャンネルを備えたほぼ円形の粒子を生成する。その結果、有効な結合が粒子表面だけでなく粒子内部でも生じる、極めて多孔性の粒子が得られる。従って、高流速の利用が可能になる。

30

【0033】

U N O カラムには、ビーズのような離散的構造ではなく、均質なマトリックスを含む連続ベッドマトリックスが含まれている。従って、単量体及びアイオノマーは、現場で重合される。重合体鎖は、微小粒子から構成される小結節の稠密網状構造に凝集される。結果として、分解能及び捕集容量を犠牲にすることなく、高流速に耐えることが可能なカラムが得られる。

40

【0034】

利用可能な流速が、P O R O S 及びU N O マトリックスに用いられる流速と同等か、又はそれより速い限りにおいて、他の望ましい固相マトリックスを利用することも可能である。

【0035】

かくしてマトリックス自体が、特定のタンパク質又は特定のクラスのタンパク質に結合するか又はそれを取り込み、誘導体化又は修飾されて、その機能を実施するか、又はその機能を実施可能な分子を取り込むことになる。例えば特定の結合剤が、マトリックス表面に固定される。例えば特定の試料タンパク質に対する特異的な抗体のような結合分子が、マトリックスに固定される。抗体又は他の受容体は、モノクローナル又はポリクローナルと

50

することが可能である。すなわちそれらは、除去すべきリガンド上の1つ又は複数のエピトープを認識する。ポリクローナル抗体は有効である。ポリクローナル調製物は、さまざまなエピトープに結合し、特定の決定基に制限されるのではなく、除去すべきタンパク質の決定基に結合する。マトリックスに特定の抗体が結合すると、どの抗体種についても抗原結合能力及び容量に有害な影響を及ぼすことになる。従って、ポリクローナル抗体によれば、いくつかの利点が得られる。

【0036】

抗体をマトリックスに固定する方法の1つは、免疫グロブリンのFc部分に結合することが知られている、プロテインA及び/又はプロテインG及び/又はプロテインL等の利用である。プロテインA及びプロテインGは、さまざまなクラス及びサブクラスの抗体、並びに、さまざまな動物の種から得られた抗体に関して特別な親和性を備えている。プロテインA又はプロテインGに対する任意のある抗体調製物の親和性は、既知のところであるか、又は、本明細書に教示の方法を実施して確かめることが可能である。

10

【0037】

表面に共有結合したプロテインA又はプロテインGを有するマトリックスは、例えば、アプライド・バイオシステムズ社及びパイオラド社から市販されている。あるいはまた、共有ヒドラゾン結合によって、免疫グロブリンのFc部分と結合するヒドラジン基を有するマトリックスが、同様に有効である。抗体を固相に固定化する方法を利用することが可能であるが、結合反応の制御が困難であるため、又は結果として抗体がいっそう不活性になり、その結果結合能力が低下することになるため、一般にはあまり望ましくない。

20

【0038】

かくして抗体調製物は、マトリックスに対する抗体の結合を促進するのに適した条件下において、マトリックスと混合される。いったん結合したならば、抗体とマトリックスを共有結合して、抗体をあまり損失することなく、処理に対して安定したマトリックスが得られるようにするのが望ましい。抗体をプロテインA、プロテインG、又はマトリックスに共有結合させる方法は既知である。例えば、イミダミド架橋を生じる、グルタルアルデヒド、ジメチルアジピニデート、ジメチルスベリミデート(DMS)、ジメチルピメリミデート(DMP)、テトラニトロメタン、及びジメチル3,3'ジチオビスプロプリオニミデートのような二官能性架橋分子は、この目的に関して周知であり、こうした共有結合は、当該技術において既知である。どれを用いてもかまわないが、複数の架橋剤を用いて、受容体をマトリックスにしっかりと結合させるのが望ましい。あるいは、反応成分間の間隔がわずかに異なる場合には、各架橋剤としてプロテインA又はGのような中間結合剤を有するマトリックスが望ましい。

30

【0039】

抗体が除去すべきタンパク質にとって特異的であることを確認するため、特にポリクローナル抗体が用いられる場合には、抗体調製物を精製して、交差反応抗体を除去することが可能である。抗体の特異性を改善するため、抗体調製物は、特定の同族抗原タンパク質に抗体をさらすことによって分画することが可能である。特定の同族抗原タンパク質は、上述のように不活性マトリックスに結合して、そのタンパク質に特異的に結合する抗体を分離するためのアフィニティークロマトグラフィマトリックスを生じさせることが可能である。マトリックスに固定されるタンパク質は、抗体調製物の特異性を強化するため、高純度であることが望ましい。用いられるマトリックスは、タンパク質の結合が容易なものが望ましいが、一般にプロテインA及びプロテインGが固定されたものではない。マトリックス又はその誘導体形態は、抗原結合部位にとって特異的であって、精製される抗体調製物の抗原結合部位によって結合されねばならないからである。

40

【0040】

従って、抗体調製物は、対象とするタンパク質、即ちバッチ、カラム、又は他の適切な形態をもって、後の分析に備えて試料から除去され、培養されることにより抗体がマトリックスに保持され、本明細書に規定のように使用すべく溶離され採集されるタンパク質を含有する、対応するマトリックスにさらすことが可能である。

50

【0041】

結合マトリックスの一貫した製造のため、容易に自動化し得る再現可能なプロセスが望ましい。これには、2つの重要な機能、すなわち、(1)リガンドを利用して受容体を精製するための手段を設ける機能と、(2)受容体を利用して試料からリガンドを除去する機能が必要になる。例えば、アフィニティマトリックスを利用して、受容体を精製することが可能である。まず精製リガンドと前もって活性化したマトリックス材料を混合して、リガンドを結合させる。あるいはまた別個のステップとして、リガンドと樹脂を化学的に結合させることも可能である。あるいはまた、リガンドは誘導体化して、マトリックスと直接結合するか(例えば、ビオチン化リガンド及びアビジン結合マトリックス)、又はマトリックスと容易に反応するようにすることも可能である。リガンドマトリックスは次いで、既知の緩衝液を用いてカラム又は同様の形態に充填され、第1のカラムが形成される。前もって活性化されたマトリックスの反応基は、リガンドの相補性基に結合、できれば共有結合する。一般に、飽和量のリガンドがマトリックスに添加される。マトリックスを洗浄すると、結果として、リガンドがマトリックスに共有結合的に固定される。任意選択的に、阻害剤を加えて、マトリックスに対する受容体の非特異的吸着を減少させることが可能である。リガンドマトリックスは、パッチ形式で利用し、及び/又はカラム、或いはラテラル流装置、スピンカラム、マイクロ流体モジュール、若しくは取り外し可能コンポーネントのような別の装置の一部に充填することが可能である。次に、マトリックスに受容体調製物が添加され、特異的結合を可能にするのに適した条件下で培養される。結合した受容体は、例えば低いpHにさらすことによって、マトリックスから溶離される。溶離は、例えば、UV280吸着によってリガンドについてモニタされ、タンパク質リガンド及びタンパク質受容体が採集される。

10

20

【0042】

カラムに類似した形態には、マトリックスが疎性ビーズか、浸透性パケットをなすか、磁気(又は磁気応答)マトリックスビーズであるかを問わず、液体試料中でのマトリックスの混合があり、また異なる受容体がマトリックス、リボソーム又はミセルエマルジョン、ディップスティック、チューブコーティング(毛細管、マイクロ流体装置のような)、ゲルビーズ、又はスラリー等の異なる位置に固定化されるマイクロ配列形式等が含まれる。固相は、容器、管、又は毛細管内部に緩く付着させることが可能である。こうした固定化技法は、受容体-リガンド結合の後でさえ実施可能である。例えば、抗Ig抗体(クームズ試薬)を利用して抗体、及びそれに結合した何らかのタンパク質を沈殿させる。あるいはまた、受容体はアルギン酸塩のような、選択的に分画可能な物質に結合させることが可能である。カルシウムイオンが付加されると(受容体-リガンド結合の前又は後に)、受容体及びそれに結合する他の何であろうと、固定化される。同様に、受容体は、ビオチンのような特異的結合相手の一部とすることもできるし、あるいは、それに結合させることも可能である。アビジンを加えると、受容体及びそれに結合する他の何であろうと、不溶化される。このプロセスにおいては、例えばEDTAを添加してカルシウムイオンをキレートして除去し、その結果アルギン酸塩が液化されるようにするといったように、対応する可逆反応によって受容体を選択的に再可溶化することによって、受容体を再利用することが可能になる。鍵となる特徴は、マトリックスが試料の液体から分離可能であるということである。「固相」及び「固相マトリックス」という用語は、本来固体であるか、又は固体にすることが可能な(上記アルギン酸塩ゲルのような)材料、或いはリボソーム、ミセル、固相上の液体コーティング、極めて粘性の高い不溶性液体といった、不溶性液体とみなすことが可能であるが固体のような働きをする材料を表している。「固相」材料は、本発明の方法の一部においてのみ、固体とすることが可能である。

30

40

【0043】

ここで第1のカラムは第2のカラムと直列に接続することが可能であるが、この第2のカラムは例えばセファデックスを、任意選択的には緩衝液の中和物と共に含有するサイズ排除カラムであり、溶離剤を除去する。第1のカラムからの精製受容体は、マトリックスを通過して排除され、その結果、そうした排除がなされない塩が除去される。この場合にも、

50

タンパク質リガンド及び／又は受容体が用いられる場合には、例えばUV280nm吸着によって、タンパク質について溶離をモニタすることが可能である。

【0044】

次いで第2のカラムは第3のカラムと直列に接続されるが、これには抗体の結合に反応する成分を含有した望ましいマトリックスが充填されることになる。

【0045】

プロセスを開始するため、第1のカラムに受容体調製物が添加され、カラムを通過させられる。リガンドマトリックスに付着したリガンドに特異な受容体がカラムに保持され、非結合物質は廃棄される。こうした結合に続いて、受容体は、例えば酸性又はアルカリ性緩衝液、カオトロピック剤又は変性剤（好ましくは可逆性の）にさらすことによって、リガンドマトリックスから溶離させられる。次いで酸性緩衝液中の溶離受容体は、任意選択的に中和され、第2のサイズ排除カラムに送られ、塩交換が実施される。そして溶離受容体は、まだ中和されていなければ任意選択的に中和され、受容体と結合するマトリックスを有する第3のカラムに送られる。第3のカラムには、カラムの受容体に対する所望の結合能力が得られるまで、受容体が充填される。その結果、特定のタンパク質に特異な抗体を含むマトリックスを有するカラムが得られる。

10

【0046】

受容体に結合したマトリックスは、次に任意選択的に、既知の方法を利用した処理を受けて、例えば共有結合的付着によって受容体と永久的に結合し、それによって受容体がマトリックスに「固定」される。その結果、試料から同族リガンドを除去する際の反復利用に適したマトリックスが得られる。同族リガンドに関するマトリックスの単位容積又は重量当りの結合能力は、既知の方法を用いて決定される。

20

【0047】

採集された受容体は、別個の結合分析のような既知の技法を用いて、問題となるリガンドに対する特異性についてテストすることが可能である。

【0048】

次に、本明細書の教示に従って、マトリックスに受容体を結合させると、例えば2-DGEによって、試料中の分析物の分析又は精製、及び／又は検出が後で行われることになっている同族リガンドを試料から除去するための試薬が得られる。

【0049】

最初にリガンドを固相に固定化する代わりに、遊離リガンドを利用し、受容体と混合することも可能である。受容体が少なくとも二価の場合、用いられる液体の残りから分離して回収することが容易な、不溶性錯体が生成しうる。分離は、濾過、傾瀉、遠心分離等によって可能である。

30

【0050】

あるいはまた、リガンドがビオチンのような結合相手によって標識される場合、受容体との接触前又は後に、アビジンのような相補性結合相手を固相に結合させることが可能である。これに関しては、固相との結合によって、受容体-リガンド錯体を溶液から除去することが可能である。次に、遊離の受容体が溶離される。リガンドを利用して受容体を精製する他の形態を利用することも可能である。

40

【0051】

従って例えば、試料から除去すべき特定のタンパク質に関して特異的な適切な抗体を望ましいマトリックスに付着させて、対象とする試薬を得ることが可能である。特異的抗体調製物を得て、その特異的抗体を精製し、望ましいマトリックスにその抗体を結合させるプロセスは、一連のカラムにおいて実施可能である。他のタンパク質にこのプロセスを繰り返すことによって、試料から除去すべき特定のタンパク質に対して特異的ないくつかのマトリックス試薬を生成することが可能である。

【0052】

多くのタンパク質は量が異なる炭水化物を有し、そのため電荷は同様であるが分子量が異なる複数の分子を生ずるため、糖タンパク質の除去が有効である可能性がある。こうした

50

分子は、2-Dゲルに「系列」をなすスポットの水平配列を生じる。こうした系列は、2-Dディスプレイに対して複雑性を加え、分解及び同定を混乱させる可能性があるので、糖タンパク質の除去は有効と考えられる。さらに、糖タンパクを除去する方法は、グリコシル化される試料とされない試料の比較を可能にする。既知のように、腫瘍発生には、細胞の正常なグリコシル化の妨害を伴う場合が多い。

【0053】

グリコシル化に基づく分離が重要な場合、上述の教示に従ってマトリックスにレクチンを添加することにより、レクチンが結合する特定の単数又は複数の糖を有する分子と結合するマトリックスを提供することが可能である。

【0054】

系列を除去する代替的な方法は、試料をサッカライダーゼ又はグリコシダーゼにさらして、試料中のタンパク質に結合した炭水化物を除去することである。多くの炭水化物はタンパク質に結合することが分っており、特定の糖を開裂させるさまざまな酵素のうち任意のものを利用することが可能である。

【0055】

例えば、多くの糖タンパク質は、1回又は複数回にわたってシアリン酸化される。従ってノイラミニダーゼで試料を処理することによって、タンパク質から1つ又はより多くのシアリン酸残基を除去することが可能である。多くの糖タンパクはフコシル化される。従って、1つ又はより多くのフコシダーゼを利用して、フコース残基を除去することが可能である。炭水化物は、1-3又は1-4のようなさまざまなリンクでもってタンパク質及び他の糖と結合し、また幾つかの酵素は特異的であって、特定のリンクだけを切断するものもあるので、糖残基を除去するために頑強な酵素又はいくつかの酵素を用いることが可能である。試料は適正な条件下において、適切なサッカライダーゼ又はグリコシダーゼで処理され、所望の脱グリコシル化が実現される。脱グリコシルの結果として、より単純なパターンのタンパク質が生じ、タンパク質の総数が減少する。ある種の分析では、グルコシル化されたアイソフォームは、重要ではなく、従って1回の測定で消滅させても構わない。しかし、他の分析については、1つ又はより多くのアイソフォーム量の比が病気等の診察に用いられるので、全てのグリコシル化アイソフォームを保存するのが望ましい。同じことが、リン酸エステル化、金属イオン結合、及び他の任意の翻訳後修飾にも当てはまる。

【0056】

一般に特定の分子だけに結合する抗体のような、結合剤を利用する上記手法とは異なり、脱グリコシル化では恐らく、特定のタンパク質ではなく、多数のタンパク質、又はあるクラスのタンパク質を除去することになる。異なるグリコシル化の分析が望ましい場合には、レクチンカラムの利用が好ましい。

【0057】

本発明の別個の目的は、試料から多数の選択されたタンパク質を除去するため、組み合わせることが可能な試薬を提供することにある。一般に、複数のタンパク質が試料から除去される。したがって、あるクラスのタンパク質を結合する多機能マトリックス、又は異なる特異性を備えた抗体のような異なる試剤を担持する複数の個別マトリックスが組み合わせられる。複数の特異的マトリックスを用いる場合、異なる特異的マトリックスをバッチ的に混合することが可能である。混合物は、バッチ形態で維持し、利用することができるし、カラムに充填することも可能である。その場合、異なる種のマトリックスを相互に混合することが可能である。

【0058】

あるいはまた、カラム形態を利用する場合には、順次添加又は充填する前に、異なる結合剤を担持する異なるマトリックスを混合することが可能であり、その場合に個々のマトリックスは、層中の多孔性膜のような不活性キャリアによって分離することができ、あるいは別個のカラム内に収容することも可能である。こうした状況において、少なくとも1つの受容体は受容体の区画であり、受容体の少なくとも1つの他の区画から分離した所定の

10

20

30

40

50

位置にある。

【0059】

異なるタンパク質に結合する特異的な個別マトリックスを混合すべき場合には、その組合せによって、同族タンパク質に関するどのマトリックスの結合能力も実質的に低下しないことを確認しなければならない。その実施は、任意の1つのマトリックスだけの結合能力を確立し、混合物中におけるその同族タンパク質の結合能力を比較する標準的な技法を用いて行うことが可能である。

【0060】

従って、いくつかの試料について特殊化された、混合物中の特定のマトリックスのいくつかの組合せを生成することが可能である。従って、血清中においてより豊富なタンパク質が何かは分っているので、血清試料に対して、特異的マトリックスの特定の組合せを再現可能に利用することが可能である。同様に、血漿、尿、CSF、及び、他の生物学的試料からより豊富なタンパク質を除去することになる、特定の混合物を構成することが可能である。こうして、各マトリックスの結合能力で測定される、プールされた組合せ混合物中の、比例した量の各特定マトリックスを利用することが可能である。

10

【0061】

あるいはまた、試料中の豊富でない分析物と同時に、豊富な分析物も定量測定したい場合には、豊富な分析物にとって最適な量より少ない特定のマトリックスを利用することが可能である。その結果、問題となる豊富な分析物の全てではないが、大部分が除去されることになる。特定の結合樹脂の量を慎重に測定することによって、試料中の豊富な分析物を豊富ではない分析物に変換することが可能である。そのデータ分析及び解釈を行う間に、測定量に制御された除去量を加えて、試料中の実際の量を推論することが可能である。

20

【0062】

従って、別の形態では、異なる結合剤を担持する個別のマトリックスが、別個の容器、層、又は、コンパートメントに収容され、及び/又は、容器は例えば、導管又は管材料によって順次直列に接続される。例えば、毛細管、又は、各ウェルの底（浸透性とすることが可能な）にマトリックスが収容される96ウェルプレート形態がある。

【0063】

受容体マトリックスが異なれば、安定している時間期間も異なる。後述する実施例の方法によって調製される受容体マトリックスの幾つかは、特異性又は有効性を損なうことなく、数百サイクルの利用、ストリッピング、及び、再平衡化にわたって安定していた。他のマトリックスには、劣化の兆候を示すまでに12又は24サイクルしか安定しないものもあった。安定性を決定する要素には、受容体の選択、マトリックスの選択、及び固定化技法が含まれる。

30

【0064】

受容体又はリガンドの幾つかが他より先に劣化する場合、易動性受容体又はリガンドに結合したマトリックスを別個のカラム内に入れて、除去及び新しい結合受容体との交換を容易にして、カラム全体の取替えを回避するのが望ましい。あるいはまた、易動性の結合相手は、浸透性膜によって離隔された別個の層内、又は、浸透性バッグ又はポケット内に入れてカラム内に収容し、交換のため容易に分離できるようにすることも可能である。易動性結合相手のマトリックスを入れる、上部及び底部に細かいメッシュを備えた厚い金属リングのような、永久サブカラムセクション又はチャンバを利用することが可能である。この構造は、米国特許第4636361号明細書におけるように、これまでは異なる目的のために利用されている。粒子状マトリックスの場合、易動性結合相手に結合したマトリックスには、磁性、常磁性、又は反磁性材料が取り入れられている。これらのマトリックス粒子は、カラムから全てのマトリックス粒子を除去し、磁界又は他の磁気反応部材を適用することによって、容易に分離可能である。一方のマトリックスが、他方のマトリックスが溶解しない条件において溶解するといった、1組の固相マトリックスを別の1組の固相マトリックスから分離する他の方法を利用することも可能である。これらの設計の全てにとって鍵となる特徴は、簡単に交換できるように、易動性マトリックス受容体を安定した

40

50

マトリックス受容体から選択的に除去できるようにすることである。

【0065】

どのマトリックスを組み合わせるべきかの選択は、恣意的であってはならず、除去される特定のタンパク質が共通の特性を共有しうることを観測することによって容易になるであろう。適切な特性の1つは、除去手順の後の、マトリックスからの溶離である。かくして、単一の緩衝液を用いて抗体を含むマトリックスから溶離させることが可能なタンパク質によって、どのマトリックスの組合せが可能であるかが分る。異なる充填又は溶離条件が望ましい場合、異なる条件を選択する抗体にとっては、異なるカラムが望ましく、少なくとも溶離条件と同じ数のカラムが設けられる。

【0066】

保持されたタンパク質を使用することができる。例えば、免疫グロブリンが試料から除去されると、回収された免疫グロブリンは、治療に用いるか、又は例えば、除去された抗体が特定の抗原に結合するか否かを判定するための診断分析に用いることが可能である。除去される特定のタンパク質の量はまた、特定の条件を示す。例えば異常に低レベルのアルブミンは、特定の肝臓疾患、組織損傷、及び飢餓に際して見いだされる。同様に、鉄の量、肝臓及び腎臓疾患によって、トランスフェリンの発生量が影響を受ける。また、アンチトリプシンは妊娠中に増大し、また炎症の指標としてさえ用いられてきた。

【0067】

血清中における免疫グロブリン組成物の評価は、自己免疫疾患、又は自己免疫反応を伴う疾患（例えば、慢性関節リウマチ、狼瘡...）、又は免疫系が危うくなる疾患（例えばエイズ、放射線被爆又は毒素への暴露...）、又は血液悪性疾患（例えば、骨髄腫、リンパ腫...）において重要になる可能性がある。免疫グロブリンの包括的分析は、こうした疾患における抗体発現の定量的変化、並びに感染（例えば、肝炎、梅毒...）に対する免疫反応をモニタするのに役立つ可能性がある。図9は、本発明の免疫サブトラクションカラムに結合される免疫グロブリンの分離から得られた結果を示している。

【0068】

異なる受容体は、相互の結合と競合するか、又は干渉することになるので、個々の受容体には個別のマトリックスを利用するのが望ましい。制御反応が弱ければ、各リガンドに関するマトリックスの結合能力は、予測しにくくなる。さらに、工業プロセスとして、単一マトリックスに対する多くの異なる受容体の結合は、制御が困難である。

【0069】

複数のマトリックスが組み合わせられて1つの混合物になる場合、任意の1つのマトリックスの結合能力を判定して、他のマトリックス種の結合能力と比較してその相対量を調整し、長期にわたる均一な利用を保証するのが望ましい。この相対結合能力によって、試料中のタンパク質の相対的存在度を監視することが可能である。従って、ある特定のタンパク質の場合、アルブミンに対して特異的な抗体を含有する1ミリigramのマトリックスが、例えば2mgのアルブミンと結合することを判定できる。これは、既知の量のマトリックスを既知濃度の種々の量のタンパク質溶液に曝露することによって測定可能である。次いで例えば、マトリックスが実用的に最大量のアルブミンと結合した時点を、マトリックスにさらした後の液体のUV280nm吸着をモニタすることによって測定可能である。マトリックスの結合能力、並びに結合したタンパク質の除去効率は、ELISA、UV280nm吸着、又はタンパク質染料のような標準的方法を用いて、試料及び溶離物中におけるタンパク質レベルをモニタすることによって査定可能である。

【0070】

既知のように、一般に、血清には約44mg/mlのアルブミンが含まれている。従って、50µlのアルブミン試料のほぼ全てを除去するためには、少なくとも1.6mgのマトリックスに血清試料をさらすことが必要になる。

【0071】

また、タンパク質A及びBが、それぞれ、試料中の全タンパク質の30%を占めているものと仮定する。タンパク質Cは、試料中の全タンパク質の20%を占めている。それぞれ

10

20

30

40

50

、A、B、又はCと特異的に結合する3つのマトリックスが調整される。各マトリックスが、同じモル量のA、B、又はCと結合し、それぞれの特異的マトリックスからA、B、及びCを同じ緩衝液を利用して溶離可能であるとする。試料からA、B、及びCを除去するため、パッチ式に又は順次カラム内で、マトリックスA、B、及びCを37.5:37.5:25の比率で混合することによって、こうした試料からA、B、及びCを取り除くことが可能な試薬を生成することが可能である。試薬に試料を加え、試薬と共に培養可能としておくと、A、B、及びCがそれぞれのマトリックスに結合する。A、B、及びCのない溶離物が採集される。

【0072】

溶離試料に各種の利用可能なアッセイの任意の何れかを適用して、対象となるタンパク質の除去を確認することが可能である。例えば、溶離試料にELISAを実施して、試料中の除去しようとするタンパク質の存在によって、任意のマトリックスの結合能力のキャパシティが超過されているか否かを判定することが可能である。溶離物中に存在する場合には、再生マトリックス又は新しいマトリックスによって試料をリサイクルするのが望ましい。

10

【0073】

最終溶離物は採集され、次いで処理されて、試料に残存しているタンパク質が濃縮され、2-DGE又はタンパク質測定のための用途に適した緩衝液中にタンパク質があることが確保される。さらに試料には、透析、凍結乾燥等を施すことも可能である。

【0074】

特に分離に際して糖タンパク質を除去するための試薬が含まれていない場合には、分離された試料に対して、任意選択的に脱グリコシル工程を実施することが可能である。例えば試料は、広範な基質特異性を備えた組み換え酵素である、プロザイムによって市販されるシアリダーゼAのようなノイラミニダーゼによって、適切な条件下で培養することが可能である。

20

【0075】

酵素処理の後、試料は好ましくは脱塩され、任意選択的に酵素から分離されて、等電点電気泳動の準備が施される。これに続く工程は、2-DGE技法自体において周知である。

【0076】

別の実施態様の場合、本発明は、タンパク質間の相互作用の判定とタンパク質錯体の結合の程度及び親和性の判定、及び、錯体結合タンパク質及び一緒に又は順次機能する可能性のある関連したタンパク質を見出すために利用可能である。これは、タンパク質が相互作用するためである。腎臓によって血液から除去されるほど小さい低分子量タンパク質の場合、より大きいタンパク質への結合は、そのタンパク質を血液中に維持するために重要である。本実施態様によれば、分子量、及びアルブミンのような高分子量分子に対する結合能力だけに基づく、化合物の血中半減期の指標が得られる。多くの医薬品及び生物学的に活性のペプチド及びタンパク質は、ある程度アルブミンと結合するので、これはアルブミン結合化合物の測定について特に有用である。

30

【0077】

いくつかのタンパク質は、例えば信号伝達カスケード又はタンパク質分解経路といった複雑な生物学的プロセスにおいて、重要な役割を果たすことが知られている。これらの経路が生ずるためには、タンパク質間結合事象、又は他の代謝物質-タンパク質結合を生じさせることが必要になることが多い。こうした事象に関与する全てのタンパク質を調べて、同定することが望ましい。分子クロニングによって、ある役割を果たす複数のタンパク質を識別することができるが、全部というわけにはいかない。これまで人々は、イースト-2-ハイブリッドのスクリーニングを用いて、ある特定の相互作用に集中的に取り組んできた(例えば、米国特許第5283173号明細書、第5637463号明細書他)。しかし、異質環境及び不自然な相互作用タンパク質のために、得られたデータは現実を必ずしも反映しない。

40

【0078】

50

本発明の場合、ある経路に含まれることが知られており、又は含まれると思われる幾つかのタンパク質に関して、1つの抗体又は1プールをなす抗体が生成される。抗体又はタンパク質（又は両方）が、クロマトグラフィマトリックス又は他の固相に固定化されて、固定化されたタンパク質に接触させられる可溶性の水性相の生物学的試料が適用される。所定の生物学的経路が生じるか、又は生じると予想される生物学的試料を選択することが重要である。試料中の結合しない全てのタンパク質は、通り抜けて廃棄される。抗体、又は特異性を備えた固定化タンパク質に結合する全ての試料タンパク質、及び選択された緩衝条件下で固定化されたタンパク質、又はその後のタンパク質に対して実質的な親和性を示すタンパク質が結合される。濃縮されたタンパク質は、直接分析されるか、又は例えば酸性溶液によって溶離させられる。溶離した画分内のタンパク質は、質量分析、液体クロマトグラフィ、電気泳動等のようないくつかの技法によって分析される。好ましい方法は2-D電気泳動である。タンパク質が調製され、適用され、2-DEによって分離され、染色される。タンパク質は、イメージング技術によって高い分解能で検出できるので、質量分析、イムノアッセイ等のような、それ自体周知の技法によって個別に同定することが可能である。

10

【0079】

血清中の極めて豊富な4つのタンパク質に対する抗体を含む本発明のカラムを利用して、血清試料が適用され、非結合画分が廃棄された。結合したタンパク質は酸性緩衝液によって溶離され、本明細書に教示の標準的な2次元電気泳動法によって分離された。その結果が図8であり、予測される4つのタンパク質に関するタンパク質スポットと、血清試料中でこれら4つのタンパク質に結合したタンパク質及びペプチドに相当する他のいくつかのタンパク質スポットが示されている。

20

【0080】

豊富でないタンパク質に関する分離及び検出法の感度を高めるため、本発明の別の実施態様は、望ましくない極めて豊富なタンパク質を用いずに、免疫親和性カラムからの関連するタンパク質をストリッピングする。これは、タンパク質を解離するが、抗体-タンパク質結合を破壊するほど過酷ではない溶離条件を利用して実施される。例えばそれほど極端でないpH、カオトロピック剤、熱等は、この目的に有効である。変性条件も、やはり同じ目的に有効である可能性がある。抗体-タンパク質結合をさらに強化して極めて豊富なタンパク質の溶離を阻止すべく、抗体に結合するいかなるタンパク質にも化学反応するように、近くの抗体又は化学部分（例えば架橋剤）をあらかじめ活性化させておくことが可能である。

30

【0081】

極めて豊富な、干渉又は汚染する、若しくは望ましくない物質に対する受容体を用いて、タンパク質間相互作用等を判定するという本発明の主たる目標とは異ならせて、受容体を、豊富ではないリガンドを含む、任意の存在度のリガンドに対するものとすることが可能である。目的は、分析のために結合タンパク質を回収することにあるから、特異的に結合する受容体を用いる場合、試料中におけるリガンドの相対濃度は余り重要でない。

【0082】

この実施態様をどのように利用可能であるかの適切な例の1つは、アルツハイマー病の研究分野である。現在のところ診断は、検死解剖において組織学的に班を観測することによって実施されている。アミロイド班が、この病気の進行に多少関連するものと考えられているが、そうしたことは生きている患者について容易に診断できるものではなく、病理学的事象及び要素を確認することが、薬剤の開発において役立つことになる。最初に、アミロイドタンパク質に対する抗体がカラムに固定化される。アルツハイマーの患者からの脳ホモジェネートがカラムに結合され、全ての非結合材料が自由に洗浄される。結合した関連タンパク質は、共に固定化される。アミロイドタンパク質及び結合した関連タンパク質は次いで、pH2.5の緩衝液によってカラムからストリッピングされ、その結果生じる溶離物は、さらに2-DE、LC/MS、イムノアッセイその他の方法によって分析され、結合した関連タンパク質の身元が確認される。これらは、潜在的な可能性のある診断分析

40

50

物、薬剤目標等に相当する。

【0083】

あるいはまた、アミロイドタンパク質を固定化し、CSFを加え、タンパク質を結合させることが可能である。他の全ての非結合材料は、洗浄して廃棄される。次に、結合した関連タンパク質は、直接分析されるか、又はそれ自体周知の技法の任意の1つによって溶離されて分析され、その身元が確認される。一般に、こうした関連タンパク質のための抗体及びイムノアッセイを用意することが可能である。アルツハイマー患者のCSFと正常なCSF中におけるこれら関連タンパク質の量を比較することによって、適切な診断が行われる。測定可能な量の同じタンパク質を備え、診断に用いることが可能な、他の体液、血清、尿、血漿等についても同様である。

10

【0084】

任意の試料源の1つにおいて、目標は、最も豊富なタンパク質を除去して、あまり豊富ではないタンパク質の有効濃度が高くなるようにすることである。本発明のサブトラクション技法の前に、又はより好ましくは後に、さまざまなタンパク質分離及び検出を利用することが可能である。

【0085】

動物の血清試料及び特にヒトの血清試料の場合、より豊富なタンパク質の中には、免疫グロブリン、アルブミン、トランスフェリン、ハプトグロビン、 γ -1-アンチトリプシン、ヘモペキシン、 γ -1-酸性糖タンパク質、ミオシン、トランスサイレチン、 γ -1-アンチキモトリプシン、アポリポプロテインAⅠ、 γ -2-マクログロブリン、フィブリノーゲン、及びブレアルブミンがある。同様の分布が、脳脊髄液にも存在する。尿試料の場合、アルブミン及び γ -酸性糖タンパク質が最も豊富なタンパク質である。組織試料の場合、血液及び血清タンパク質による汚染が一般的であり、従って上述のアルブミン、ヘモグロビン、及び他の任意の血清タンパク質が、除去すべき汚染物質である。したがって、いくつかのタンパク質の除去が可能である。それは全タンパク質の少なくとも約85%のサブトラクション(除去)に相当する。しかし、異なるマトリックスを個々のタンパク質に結合させ、試料からそれらのタンパク質を取り除くのに利用することができるので、除去可能なタンパク質の数に制限はない。かくして、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、又はこれらの間の任意の数、又はこれらを超える数のタンパク質であっても、除去し、通常は分解不能なタンパク質を識別し得る量で含有するように濃縮可能な試料を生じさせることができる。

20

30

【0086】

他の試料の場合、数種の極めて豊富か、又は相当に干渉するタンパク質を除去できるのが望ましい。換言すると、本発明の実施において、試料中のタンパク質の少なくとも40%を除去するのが望ましい。好ましくは、タンパク質の少なくとも50%を除去する。用いられる特定のマトリックスの数を増すことによって、後続の分析に先立って、試料中に存在するタンパク質の50%を超える除去、60%を超える除去、70%を超える除去、75%以上の除去、80%を超える除去、及び90%を超える除去さえ可能になる。下記の例の1つでは、もとの血清タンパク質濃度は88mg/mlであった。カラムを通過した後、74mg/mlが除去され、流通した溶出液は、濃縮後に1.4mg/100mlのアリコートしか含んでいなかった。理論的には、除去量は、試料中の各種リガンドの存在度、及びこれらの除去に用いられる対応する受容体の数によってのみ制限される。典型的な割合は表1から明らかであるが、これは元の試料が異なれば異なることになる。同様に、他の試料に関して最も共通するタンパク質又は最も干渉するタンパク質のリストを求める(既に公知文献に記載されていなければ)ことが可能であり、これらから、利用に適した抗体を選択することが可能になる。

40

【0087】

任意の試料から除去すべき特定のタンパク質は、試料中に存在する豊富なタンパク質に基づいて任意に決定することが可能である。異なる試料が有する除去すべき豊富なタンパク質は、殆ど同じ場合もあり、また異なる場合もある。植物試料の場合、一般にリブロー

50

2 リン酸オキシゲナーゼ / カルボキシラーゼ (ルビスコ) が、多くの植物の葉において最も豊富なタンパク質の 1 つである。

【 0 0 8 8 】

どのタンパク質が豊富なタンパク質であるかが未知の試料については、まず予備分離及び分析を行って、最も豊富なタンパク質を確認することが可能である。次に、これらのタンパク質に対する抗体を生成し利用して、豊富なタンパク質を除去する。このプロセスを繰り返すことによって、所望の除去を実現することができる。

【 0 0 8 9 】

こうした再利用可能なマトリックスを利用して、豊富なタンパク質を除去すると、再現可能で処理能力の高い仕方で、試料中においてより豊富でないタンパク質を同定し分解することが可能になる。再現性のおかげで、試料間における比較が可能になる。バッチ式に各試料を流すか、又は同じカラムで実験して、免疫サブトラクションにおける変動を制御するのが望ましい。

10

【 0 0 9 0 】

本発明の方法及び試薬の多くは、自動化が容易であり、処理能力及び再現性がさらに向上する。アプライド・バイオシステムズ社によって市販されている I N T E G R A L 及び B I O V I S I O N ワークステーションといった、市販のクロマトグラフィカラム及びステーションのような、現在利用可能な分離技法は自動化が可能である。こうしたワークステーションは、直列をなす複数のカラムの設置を可能にし、この場合異なる緩衝液で種々のカラムを溶離することが可能になる。また 2 - D G E の場合、それらの手法の多くはやはり自動化が容易であり、又は自動化がなされている。例えば出願人の先の特許である Anderson 他 の米国特許第 5 9 9 3 6 2 7 号明細書を参照されたい。その結果、非常に時宜に適った仕方で成果が得られる、極めて再現性の高いシステムとなる。

20

【 0 0 9 1 】

「豊富」とは、例えば、試料中の各種タンパク質の実際の相対量に基づき、試料中でより多量に存在するタンパク質を意味する。豊富さはまた、2 - D ゲル上で迅速かつ強く染色されるタンパク質スポットとしても明らかになる。豊富さの測定法は、例えばタンパク質の全量と比較して、相対測定値を確認することである。染色ゲルの濃度走査によって、こうした測定を得ることが可能である。分離された染色タンパク質を含む 2 - D ゲルは、デンストメータで得られ、走査される。デンストメータは次いで、ゲル上の染色タンパク質の全量、及び任意のタンパク質の全量に対する相対比率を計算する。こうした計算を用いると、豊富なタンパク質とは、試料中における全タンパク質の少なくとも 1 % に相当するタンパク質である。

30

【 0 0 9 2 】

本明細書において用いられる「タンパク質」は、機能とは関係なく、アミノ酸を含む任意の重合体である。タンパク質は、リン酸塩、糖、及び他の有機基といった、他の化学部分を含むことによって変性可能である。従って、2 つのアミノ酸を含むジペプチドであって、既知の機能がないものは、本出願の目的からはタンパク質である。タンパク質の別名は、ポリペプチドである。タンパク質は、動物由来、微生物由来、及び環境由来又は植物由来として得ることが可能である。

40

【 0 0 9 3 】

本発明は、複数化合物の同時精製、又は特に規定された量の複数物質が所望される場合の組成物の調製といった、多くの多岐に渡る用途に用いることが可能である。この実施態様の場合、固相には、存在する受容体のモル比によって規定されるモル比でもって、溶液から対応するリガンドを吸着する、複数の受容体が含まれる。例えばバクテリアの発酵によって、洗濯用洗剤に用いられる混合されたプロテアーゼ及びリパーゼが得られる。各プロテアーゼ及び各リパーゼ毎に所望の比率で受容体を有する吸着剤が、バクテリア酵素又はライセートに添加される。吸着剤は、沈殿、濾過、磁力 (磁気ビーズの場合) 等によって回収され、所望のプロテアーゼ及びリパーゼが溶離されて、回収される。他の用途には、粉ミルクを製造するためのプロテアーゼ、及び他のタンパク質加水分解物、デンプン加水

50

分解酵素、人工香料、及び芳香剤、又はそれらを製造するための酵素が含まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0094】

以上で本発明を完全に記述したが、下記の非制限的な例において、本発明のさまざまな態様が示される。

本発明技術の能力の立証

本発明では、処理能力の高い、新規な免疫アフィニティクロマトグラフィをベースにしたテクノロジーと、多成分免疫アフィニティクロマトグラフィタンパク質サブトラクションを施された試料の2次元電気泳動による逐次のタンパク質試料定量分析を組み合わせた手法を記述している。記述した免疫アフィニティクロマトグラフィ技法の個々の側面、及び2次元電気泳動と組み合わせたその応用が報告されているが、(i)単純な2ステップのクロマトグラフィ手法による個々の免疫アフィニティマトリックス生成方法について記述し、(ii)任意の所望の割合で利用することが可能な各免疫親和性成分毎に別々のクロマトグラフィマトリックス材料を生成し、(iii)再現可能な多成分の「プール」されたクロマトグラフィマトリックスの生成に成功し、(iv)多成分クロマトグラフィマトリックスの相当の再利用性(>300回)を立証し、(v)高処理能力の自動化手法であり(1日当り>50試料の処理能力)、及び(vi)クロマトグラフィ試料が2次元電気泳動による分離を施された後、純タンパク質の正確な定量を可能にするといった応用例については知られておらず、発表もされていない。さらに、高処理能力の獲得に成功するため、クロマトグラフィマトリックスは、高流速、効率の良い結合、及び、マトリックスの高速再生を可能にするように選択された。極めて多孔性のビーズの表面对体積比によって可能になる高試料処理能力にとっては、灌流クロマトグラフィが理想的である。こうした灌流クロマトグラフィマトリックス(「POROS」ビーズ)の製造業者には、アプライド・バイオシステムズ社(米国マサチューセッツ州フランingham)がある。

10

20

【0095】

本明細書において解説のテクノロジーは、制限するわけではないが、生体からの液体試料、又は生体の一部又は全部から得られた液体といった、生物学的試料に適用される。このテクノロジーは、試料の処理能力を実質的に損なうことなく、液体から少なくとも50%を超えるタンパク質の定量を可能にするので、特にこれらの試料中におけるタンパク質の分析に適用可能である。さらに、免疫親和性を利用したクロマトグラフィ分離手法を、各試料毎に2つ以上の画分を生成する特定の種類の試料に適した別の親和性手法又は他のクロマトグラフィ手法に転用するというフレキシビリティがある。免疫アフィニティクロマトグラフィと麦芽凝集素(レクチン)アフィニティクロマトグラフィを組み合わせる、血清タンパク質分画法が実証されている。

30

調製例A: 個別のクロマトグラフィ用免疫アフィニティマトリックスの生成

これまでに発表されている免疫クロマトグラフィ法とは異なり、以下に述べる技法では、極めて純度の高い抗体、及びそれを含有する極めて特異性の高い免疫アフィニティクロマトグラフィマトリックスが生成される。

【0096】

アフィニティクロマトグラフィマトリックスは、灌流クロマトグラフィに用いられるPOROSマトリックスを利用して生成された。このマトリックスの誘導体は、アプライド・バイオシステムズ社から入手した。サイズ排除クロマトグラフィカラム(SEC)は、バイオラド社から入手した。抗血清は、多くの異なる会社から入手し、力価は最高濃度の活性純抗体を備えた抗血清を選択するように決定された。

40

【0097】

POROS-ALは、タンパク質を共有結合的に固定化するために用いられた、あらかじめ活性化された(アルデヒド機能)マトリックスである。ある所与の体液試料から全てのタンパク質を除去するため、複合的な抗血清からの純粋な特異的抗体に関する「選択」試薬として、タンパク質親和性マトリックスが生成された。この試薬は、(a)市販の、又は追加的に精製された純タンパク質、及び(b)POROS-ALマトリックスであった

50

。タンパク質親和性マトリックスは、バッチ手法で生成された。かくして、ある所与の試料から取り除かれるタンパク質と同じ数だけの、別々のタンパク質誘導体化親和性マトリックスが合成された。

【0098】

POROS - G20及びPOROS - A20は、既に特定のタンパク質が固定されたマトリックスである。これらのタンパク質はそれぞれ、プロテインG及びプロテインAである。これら2つのタンパク質は、抗体のFc断片に対する親和性が極めて高く、従って部位指向的な仕方で抗体を固定化するのに理想的に適している。マトリックスに容易に結合するプロテインA及びプロテインGの注目すべき利点は、(a)固定化状態における抗体の安定性、(b)対応する抗原との相互作用に利用可能な全てのFabフラグメントを備えた抗体の正確な配向、及び(c)抗体分子の構造と干渉しない極めて効率の良い共有結合ステップである。

10

【0099】

図1には、抗血清から抗体を精製し、親和性カラムに固定化するために用いられるクロマトグラフィシステム及びプロセスが示されている。このシステムでは、複数カラムのためにカラム切替弁V1、V2、及びV3が用いられた。カラム1は抗原タンパク質カラム(上述の活性化POROS - ALマトリックスが充填された)である。カラム2は、酢酸で溶離された抗体を中和し、塩を部分的に除去し、POROS A又はGカラムでアフィニティトラッピングを施す前に、孔によって分子を篩にかけるSECカラムである。抗血清充填及び抗体トラッピングからなるワンステップクロマトグラフィが一続きで、POROS A又はGカラムが抗体によって飽和するまで実施された。この飽和プロセスは、クロマトグラフィステーションの検出器D1、D2、及びD3を用いて、直接UV280nmの吸着を測定することによってモニタ可能である。

20

【0100】

抗体カラムが得られると、100%DMP架橋に関する従来の手順の後で、二官能性架橋剤として50%ジメチルピミジミレート(DMP)及び50%ジメチルスベリミデート(DMS)を用いて、固定化された抗体がプロテインA又はGに架橋され、かくしてマトリックスに共有結合的に付着される。DMP/DMSは、アミン基との反応、及びイミノアミド結合によるプロテインA又はGと抗体の結合が素早いので、「カラムでの架橋」手法において有効に作用する。酸性及び中性のpH条件下において、その化学結合は極めて安定しており、タンパク質抗原結合及び溶離に対する抗体カラムの再生可能な利用が可能になる。

30

調製例B：多成分クロマトグラフィシステム用のマトリックスのプール

上述の手法は、多数のタンパク質抗原について実施可能であり、従って多数の免疫特異的抗体誘導体化マトリックスの生成が可能である。ここに記載する発明は、こうした抗体誘導体化免疫アフィニティクロマトグラフィマトリックスを利用する柔軟性を有する。個々のマトリックスを生成し、規定の量又は重さの分だけ、カラムに充填することが可能である。

【0101】

カラムの抗原結合能力は、飽和ピークが観測されるまで、カラムに抗原を個別に段階的に充填することによって評価することができる。従って、それぞれの抗体誘導体化マトリックスについて、カラムで捕捉可能な抗原の最大量を個別に計算することが可能である。規定の複数タンパク質結合能力を備えた多成分免疫アフィニティシステムへとマトリックスをプールすることによって、特定の目的のための特定のクロマトグラフィカラムを生成することが可能になる。下記の表は、こうした実体がいかに有用であるかの例である。血清には、いくつかの極めて豊富なタンパク質が含有されている。2-DGEのような「下流の」手順において、より豊富でないタンパク質を検出できるようにするためには、豊富なタンパク質を除去することが関心事となる。上述の多成分クロマトグラフィカラムの場合、こうしたタンパク質を数分で特異的に除去することが可能である。

40

【0102】

50

下記の表 1 には、多成分抗体アフィニティマトリックス (MCAAM) が生成され、血清試料の生成に利用されたタンパク質がリストされている。この血清試料は結果として、これらのタンパク質とは全く異なるタンパク質分布を含み、また他の場合には検出できない、図 3 の銀染色ゲルのタンパク質スポットパターンで見えるようになる、より豊富でないタンパク質を含む。しかし、取り除かれるタンパク質の性質によっては、全てのマトリックスを 1 つのカラム本体にプールするのが必ずしも望ましいとは限らない。多くの例示的な用途では、少なくとも 2 つの独立したカラム本体が望ましい。タンパク質は、以下で詳述するさまざまな特定の溶離条件下で、その同族固定化抗体から溶離する可能性があるからである。

【0103】

10

【表 1】

血清タンパク質 Putnam「plasma proteins」Vol. IV (1984) によるタンパク質ID	全血清中の タンパク質の 相対量	MCAAM中の アフィニティマト リックスの相対量
アルブミン	50	48
免疫グロブリンG	15	0*
トランスフェリン	3.1	4
ハプトグロブリン	6.8	7
α -1-アンチトリプシン	3.5	5
α -2-マクログロブリン	3.0	10
免疫グロブリンA	3.3	5
免疫グロブリンM	1.9	3
α -1-酸性糖タンパク質	1.2	2
ヘモペキシン	1.1	3
α -2-HS糖タンパク質	0.8	2
α -1-アンチキモトリプシン	0.5	2
トランスサイレチン	0.3	1
アポA1リポタンパク質	3.0	8

20

30

【0104】

免疫グロブリン G については、非誘導体化プロテイン G 及び A による十分な残留物との結合によって取り除かれるので、免疫アフィニティマトリックスを付加する必要はなかった。残留物との結合が不十分であれば、抗 Ig G アフィニティ・マトリックスを利用することが可能である。

【0105】

血清タンパク質の良好なサブトラクションに関する 3 つの特定の例が示された、図 3 を参照されたい。矢印 1 ~ 3 は、両ゲル中におけるタンパク質の位置を示している。従って、ゲル B 中において、矢印 1 はアルブミンを表し、矢印 2 はトランスフェリンを表し、矢印 3 は、ハプトグロビン鎖を表している。ゲル A 中における矢印 4 は、血清から取り除かれる他の主たるタンパク質を表しており、これらはゲル B には現れないか、ごくわずかな量しか現れない。両ゲルとも、2 - D 電気泳動に先立って、IEF ゲルに約 180 μ g の血清タンパク質が加えられた。試料の付加前又は試料の溶離時に、溶離した抗体は本質的になかった。

40

調製例 C : クロマトグラフィ分離

本発明におけるタンパク質のクロマトグラフィ分離では、少なくとも 2 つのカラムのためのカラム切換弁を備えたクロマトグラフィステーションが利用され、タンパク質が溶離緩衝液中における溶解度に関して異なる特性を有する場合には、MCAAM カラムに結合し

50

たタンパク質の個別溶離が利用される。大部分のタンパク質は、酸性条件下（例えば、5 % 酢酸）において、同族抗体から溶離する。しかしタンパク質には、酸性緩衝液に溶解せず、カオトロピック塩 / 洗剤混合物（2 M の尿素及び 2 % の C H A P S）による溶離を必要とするものもあり、疎水性タンパク質には、同族抗体からの溶離に有機溶剤（例えば、30 % アセトニトリル）を必要とするものもある。従って、上述の血清の例では、2 - マクログロブリン及びアポ - A 1 リポタンパク質は、カオトロピック塩と、それぞれ 20 % 及び 30 % の有機溶剤緩衝液を含有する緩衝液を用いると、いっそう容易に溶離する。血漿について作業する場合、免疫アフィニティマトリックスからの溶離のためにカオトロピック塩緩衝液を用いると、フィブリノーゲンがより効率的に取り除かれる。図 2 には、カラム切換弁及び流路を含む、免疫サブトラクションクロマトグラフィシステムの組合せに関する例が示されている。 10

【0106】

用いられた緩衝液は、

- a . 酸性溶離緩衝液 : 5 % 酢酸、500 mM の N a C l
- b . カオトロピック塩緩衝液 : 2 M の尿素、2 % C H A P S、7 % 酢酸
- c . 有機溶剤緩衝液 : 50 mM の トリス - H C L、p H 7 . 5、30 % アセトニトリルであった。

【0107】

あるいはまた、ヒトのフィブリノーゲンは、断片 D への結合性に鑑みて、受容体としてアスペルギルス・フミガーツス・コニディアを利用することによって、又は A 群連鎖球菌の表面上の M タンパク質を利用することによって除去することが可能である。 20

例 D : 2 - D G E 用に 2 組のタンパク質試料を生成する免疫アフィニティとレクチンアフィニティクロマトグラフィの組合せ

本発明の異なる実施態様の 1 つにおいて、免疫アフィニティクロマトグラフィと、麦芽凝集素 (W G A) レクチンアフィニティクロマトグラフィが組合せられた。2 つの画分が生成された。試料が血清の場合、全タンパク質の約 30 % ~ 50 % にあたる、高度にグリコシル化されたタンパク質が W G A カラムによって結合され、糖 N - アセチルグルコサミンの 0 . 5 M 溶液で個別に溶離されたが、第 2 の画分は、グリコシル化されないか、又はこのレクチンに対する親和性のないタンパク質から構成されており、従ってカラムに結合されなかった。図 4 のゲルは、(a) 結合されなかった血清、又は (b) 結合され、糖でレクチン親和性カラムから溶離された血清からの、タンパク質の組を視覚化したものである。この分画は、2 - D ゲル電気泳動のためのタンパク質の充填量を増すことによって、2 つの画分のいずれにおいてもタンパク質をさらに濃縮することを目的としている。このレクチンアフィニティ分画の手法を用いると、2 つの異なる画分において取り除かれなかった血清タンパク質のほぼ 2 倍の濃縮が生じ、また 2 - D G E ゲル像の獲得時により容易な分析を可能にする、さらなる「パターンの単純化」が得られる。 30

【0108】

図 4 において、血清タンパク質のサブトラクションは、第 1 のクロマトグラフィステップで実施され、残存するタンパク質は、ビオチン化 W G A でさらに固定化された、ストレパビジン誘導体化 P O R O S マトリックスにさらされた。カラムを通過した画分から生じるゲル A 中のタンパク質、レクチンで結合され 0 . 5 M の N - アセチルグルコサミンで溶離された分画からのゲル B 中のタンパク質が、2 - D G E によって分析された。何れのゲルにおいても、2 - D 電気泳動に先立って、約 180 μ g の血清タンパク質が、I E F ゲルに加えられた。 40

例 E : 2 - D G E 及び分析のための試料調製

ここに記述する免疫アフィニティクロマトグラフィによって生成される試料は、サブトラクションプロセス中に希釈された。3 ~ 5 mL のサブトラクション血清タンパク質溶離液が収集され、ポリスルホン膜濃縮ユニット (ミリポア社製の U l t r a f r e e 4) で濃縮され、25 mM の重炭酸アンモニウムで平衡化され、凍結乾燥され、9 M の尿素 / 2 % C H A P S / 60 mM の D T T 緩衝液、すなわち 2 - D G E の一次元分離中に試料中の 50

タンパク質を等電点電気泳動するのに用いられる緩衝液で再度溶解される。

【実施例 1】

【0109】

6つの豊富な血清タンパク質と結合する抗体を担持するマトリックスが生成された。6つのタンパク質は、アルブミン、ハプトグロビン、トランスフェリン、 γ -1-アンチトリプシン、 γ -2-マクログロブリン、及び、アポリポプロテインA Iであった。これらのタンパク質は、市販品を購入し、POROS ALマトリックスに個別に加えて結合させた。このマトリックスはカラムに充填され、各タンパク質毎に市販のポリクローナル抗体が添加された。非結合マトリックスは廃棄された。抗体は、上述し図1に示した方法によって溶離され、中和され、脱塩され、POROSプロテインAカラムに充填された。抗体は、上述の方法でその場で架橋された。1つのタイプの抗体を担持する各マトリックスは、既知の技法を用いて結合能力をテストされた。これには、濃度が既知の種々の量の溶液をマトリックスにさらし、次いでマトリックスによって結合されるタンパク質がそれ以上なくなる時点を確認することを含む。これは、UV280nmでの流通物の吸着を確認することが可能なUVモニタを用いるといった、既知の技法を利用して確認可能である。各マトリックスに対する結合能力を判定する。次に、6タイプ全てのマトリックスが、血清中の各タンパク質の相対量に比例した、それぞれの結合能力に基づく比率で混合され、カラムに充填された。

10

【0110】

血清試料は、カラムに通された。試料の量は一般に、100 μ l未満の量であった。タンパク質は、中性緩衝液で洗浄された。溶離液が得られ、濃縮され、次いでその中のタンパク質が2-DGEによって分離された。ゲルはクーマシーブルー及び銀染色剤で染色され、血清のより豊富ではないタンパク質が明らかになった。

20

【0111】

約10の血清試料を充填し、溶離を繰り返した後、 γ -2-マクログロブリンサブトラクションの減少が認められた。約25血清試料を充填し、溶離を繰り返した後、アポリポプロテインA Iサブトラクションの低減も観測された。 γ -2-マクログロブリン及びアポリポプロテインA₁を分離及び/又は可溶化する酸性の水性溶離緩衝液(0.8Mの酢酸/0.15MのNaCl)が、不十分又は不安定になっていたものと推定された。これら2つのタンパク質は、抗体マトリックスと結合したままであるか、或いはマトリックスの抗体から解放された後に沈殿したように思われた。アルブミン、ハプトグロビン、トランスフェリン、及び γ -1-アンチトリプシンを完全に取り除くこのカラムの容量は、62.5 μ Lの血清中に見出されるタンパク質の量に近い。下記の緩衝液を有し、アンチ- γ -2-マクログロブリン及びアンチ-アポリポプロテインA Iが別々のカラムに入れられた、2つのカラムシステムが利用された。 γ -2-マクログロブリンは、1.5Mのチオシアン酸アンモニウムでマトリックスから溶離することができ、アポリポプロテインA Iは、0.15MのNaCl水溶液中の30%アセトニトリルで溶離できた。

30

【実施例 2】

【0112】

500mMの重炭酸アンモニウム(AmBic)中の分画後のタンパク質試料が、限外濾過膜によって濃縮された。AmBicの濃度は、25mMのAmBiにまで希釈され、試料は凍結乾燥バイアル(小瓶)に移され、6 μ Lの2Mスクロースが添加され、試料は少なくとも48時間にわたって凍結乾燥された。等電点電気泳動装置チューブのゲルに試料を加える1時間前に、試料は、Pink Mix(9Mの尿素、2%CHAPS(市販の緩衝液)、0.5%DTT、及び2%両性電解質(pH8~10.5))中で再度可溶化され、完全に溶解したかが検査された。試料は、Anderson他著、Electrophoresis12、p.907-930(1991年)に記載の手順に従った後に、2-DGE電気泳動に用いられた。

40

【実施例 3】

【0113】

50

ノイラミニダーゼは、いくつかのタンパク質（グリコシル化）系列の崩壊に有効である。スポットの複雑性を軽減し、特定スポットの強度を改善するには、少量のノイラミニダーゼで十分である。90分の消化後に、1つの2-D血清タンパク質充填アリコートに相当する量の最も明瞭なグリコシル化系列を除去するには、約25m単位のノイラミニダーゼ（プロザイム、シアリダーゼA）で十分であった。タンパク質スポットの有用な比較を可能にするには、脱グリコシル化が完全であることが望ましい。プロザイム酵素は組換え体であるため、汚染プロテアーゼは存在しない。

【実施例4】

【0114】

血漿内にある血漿タンパク質の分解は、主としてゲル内に豊富なフィブリノーゲン鎖があるため、タンパク質が組織内にある場合よりも悪い。実施例1の方法によって、ポリクローマルアンチフィブリノーゲンマトリックスが生成された。結合特異性及び能力は、フィブリノーゲンのサブトラクションを可能にするのに十分であった。

【実施例5】

【0115】

血清中に見出される豊富なタンパク質を取り除くための複数の抗体を担持するカラムが、脳脊髄液に用いられた。血清との主たる相違点は、脳脊髄液中のタンパク質量が少ないので、クロマトグラフィ分離のための充填量がかなり多いという点である（血清の場合の62μLに比べて、1.2mL）。カラムは脳脊髄液用に最適化されていなかったが、十分に機能した。図5には、免疫サブトラクション手法を用いた場合と、用いない場合の、2-D EによるCSF試料タンパク質の比較結果が示されている。豊富でないタンパク質のスポットの多くは、免疫サブトラクションを施された試料の2-D Gにおいて視認可能であるが、これは試料全体の2-D Gでは観察できない。

【実施例6】

【0116】

タンパク質サブトラクションカラムが、試料中のタンパク質の大部分を占める共通タンパク質を除去するように準備された。血清は、約80対の一卵性双生児から得た。血清試料には、約70mg/mLのタンパク質が含まれている。脂質は、クロマトグラフィ分離に干渉しないことが分った。25~50マイクロリットルの血清試料が用いられた。

【0117】

幾つかの試料については、2つのカラムが用いられた。第1のカラムにはPOROSビーズが充填され、アルブミン、トランスフェリン、及びハプトグロビンを対象とする抗体が結合された（ATHカラム）。抗体はこのマトリックスに対し、プロテインA、プロテインG、又はこれら2つの混合物によって結合され、続いて上記のように架橋された。第2のカラムには、固定化された麦芽凝集素が充填された。

【0118】

他の試料については、第1のカラムには、1-アンチトリプシン、アルブミン、トランスフェリン、及びハプトグロビンに対して特異な抗体が充填された（AAATHカラム）。第2のカラムには、固定化プロテインAが充填された。全ての抗体は、Schneider他著、J. Biol. Chem. 257: 10766-10769（1982年）に記載の方法を利用して、プロテインA又はプロテインGに架橋された。約4mLの親和性樹脂が用いられた。一般に、これらのカラムによって、選択された成分の全てが除去された。

【0119】

上述のように、第1のカラムには約1.7~3.4mgのタンパク質が添加された。ATHカラムの場合、非結合タンパク質は、0.5Mの重炭酸アンモニウム緩衝液を用いて溶解され、次いで第2のカラムに移された。第1の非結合画分は、0.5Mの重炭酸アンモニウム緩衝液で溶解され、次いで第2の画分が、0.5MのN-アセチルグルコサミン、続いて0.5Mの重炭酸アンモニウムを用いて溶解された。280nmのUVの読み値をモニタして、再現性及びカラム挙動が制御された。カラムに保持されたタンパク質は、pH2.5の酢酸緩衝液を用いてATHカラムから除去され、カラムが再生された。

【0120】

血清タンパク質の約半分が、この手法によって試料から除去された。第1の試料には、グリコシル化タンパク質が含まれている。レクチンカラムに通された第2の試料には、非グリコシル化タンパク質が含まれている。最終のタンパク質濃度は、0.5 Mの重炭酸アンモニウム緩衝液中において、12 ~ 22 mg/mlの範囲であった。画分は濃縮され、緩衝液は交換され、次いで試料は凍結乾燥された。

【0121】

これらの試料は、9 Mの尿素、2 % CHAPS (市販の緩衝液)、0.5 % DTT、及び2 % 両性電解質 (pH 8 ~ 10.5) を含む緩衝液中で再度可溶化され、5 ~ 20 µlの試料が2-Dゲルに加えられた。試料のタンパク質は、当該技術で既知のところに従い、また上記実施例2に従って、ISO-DALTシステムで分離された。結果的に得られたクーマシーで染色されたゲルは、133 µmの分解能で赤色光によって走査され、デジタル化され、像は当該技術において既知のケプラーシステムを用いて処理された。各ゲルに存在するタンパク質のパターンは、相互にほぼ完全に異なっていた。

10

【0122】

ゲルは脱染され、次いで銀染色された。像は30秒間隔で撮影され、WO 01/16884に記載の方法に従い、2 Lの脱イオン水中88 gのトリス及び44 mlの氷酢酸を用いて展開が停止された。

【0123】

最初にAATHカラムに流された試料も、同様に処理された。ゲルを比較して、双生児対の間における、タンパク質と、肥満、糖尿病、骨粗鬆症、骨関節炎、及び高血圧症といった特定の疾病の状態との相関関係が確認された。

20

【実施例7】

【0124】

表1に示された12及び14の抗原に対する抗体マトリックスを利用する点を除いて、実施例1の方法が繰り返された。図4には、免疫サブトラクション手法を用いた場合と、用いなかった場合の、試料タンパク質の2-DG比較が示されている。豊富でないタンパク質スポットの多くが、免疫サブトラクションを施された試料の2-DGでは視認可能となるが、これは試料全体の2-DGでは観察できない。

【実施例8】

【0125】

血清及び血液タンパク質に対する抗体マトリックスを利用する点を除いて、実施例1の方法が繰り返された。図6には、免疫サブトラクション手法を用いた場合と、用いなかった場合の、腎臓皮質組織タンパク質画分の2-DEによる比較が示されている。豊富でないタンパク質スポットの多くが、免疫サブトラクションを施された試料の2-DGでは視認可能となるが、これは試料全体の2-DGでは観察できない。

30

【実施例9】

【0126】

アルブミン及び - 酸性糖タンパク質に対する抗体マトリックスを利用する点を除いて、実施例1の方法が繰り返された。図7には、免疫サブトラクション手法を用いた場合と、用いなかった場合の、尿素試料タンパク質の2-DEによる比較が示されている。豊富でないタンパク質スポットの多くが、免疫サブトラクションを施された試料の2-DGでは視認可能となるが、これは試料全体の2-DGでは観察できない。

40

【実施例10】

【0127】

血清中の4つの豊富なタンパク質に対する抗体を有するカラムを利用する点を除いて、實質的に実施例1の方法が繰り返された。血清試料が加えられ、非結合画分が廃棄された。結合したタンパク質は、pH 2.5の酸性緩衝液によって溶離され、回収され、pH 9.0のトリス-HCL緩衝液によって中和され、上記実施例に教示した標準的な2次元電気泳動法によって調製され分離された。その結果が図8であり、この図には、予想された4

50

つのタンパク質のタンパク質スポットと、血清試料中でこれら4つのタンパク質に結合したタンパク質及びペプチドを表す、他のいくつかの他のタンパク質スポットが示されている。

【実施例11】

【0128】

関連タンパク質、タンパク質間相互作用、及びある種の選択されたタンパク質に結合された他のタンパク質は、次のように決定される。実施例10の2次元ゲルは走査され、免疫サブトラクションが施された4つのタンパク質に明確には属さない全てのスポットがゲルから切り取られ、トリプシンで消化され、タンパク質分析の標準的方法に従って質量分析に備えて調製された。同定された全てのタンパク質は、マトリックス中の抗体によって結合された4つのタンパク質の少なくとも1つに関連したタンパク質であると考えられる。

10

【0129】

確認は、実施例1の固定化タンパク質カラムを用い、血清試料をそれに通し、非結合タンパク質を溶離し、続いて結合タンパク質の酸性ストリッピングを行い、2-D E及び質量分析法による分離及び分析を行うことによってなされる。

【0130】

本明細書に開示の実施態様に対して、さまざまな修正が可能であることが理解されよう。したがって以上の記述は、制限の意味にとるべきではなく、望ましい実施態様の例証としてのみ解釈すべきである。当業者であれば、添付の請求項の範囲及び思想を逸脱することなく、他の修正に思い至るであろう。

20

【0131】

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献は、ここでの参照によってその全体が本明細書に明示的に取り入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0132】

【図1】抗原カラムにおける親和性結合、サイズ排除クロマトグラフィによるサイズ分画、及びプロテインAに対する逐次の固定化による、抗血清からの精製ポリクローナル抗体の生成システムを示す図である。

【図2】試料を複数のアフィニティクロマトグラフィカラムに通すための構成を示す図である。

30

【図3A】14のポリクローナル血清タンパク質特異な又は血清タンパク質系統特異なクロマトグラフィIgG樹脂の混合物を用いた免疫アフィニティサブトラクション前における、ヒト血清の銀染色2-D電気泳動ゲルの像である。X軸はpIを示し、Y軸は分子量をKダルトンで示している。

【図3B】14のポリクローナル血清タンパク質特異な又は血清タンパク質系統特異なクロマトグラフィIgG樹脂の混合物を用いた免疫アフィニティサブトラクション後における、ヒト血清の銀染色2-D電気泳動ゲルの像である。X軸はpIを示し、Y軸は分子量をKダルトンで示している。

【図4A】12の血清タンパク質のクロマトグラフィによる免疫アフィニティサブトラクション、及び残存するタンパク質の画分をレクチン親和性のない画分へと分画した、ヒト血清のクーマシー・ブルーG250染色を施した2-D電気泳動ゲルの像である。X軸はpIを示し、Y軸は分子量をKダルトンで示している。

40

【図4B】12の血清タンパク質のクロマトグラフィによる免疫アフィニティサブトラクション、及び残存するタンパク質の画分をレクチン親和性のある画分へと分画した、ヒト血清のクーマシー・ブルーG250染色を施した2-D電気泳動ゲルの像である。X軸はpIを示し、Y軸は分子量をKダルトンで示している。

【図5】1、2、及び3は、ヒトの脳脊髄液のクロマトグラフィによる免疫アフィニティサブトラクション前、カラムに保持されたタンパク質、及び通過したタンパク質の、クーマシー・ブルーG250染色を施した2-D電気泳動ゲルの像である。

【図6】1及び2は、クロマトグラフィによる免疫アフィニティサブトラクションの前後

50

における、腎臓皮質組織の可溶性タンパク質画分のクーマシー・ブルー G 2 5 0 染色を施した 2 - D 電気泳動ゲルの像である。

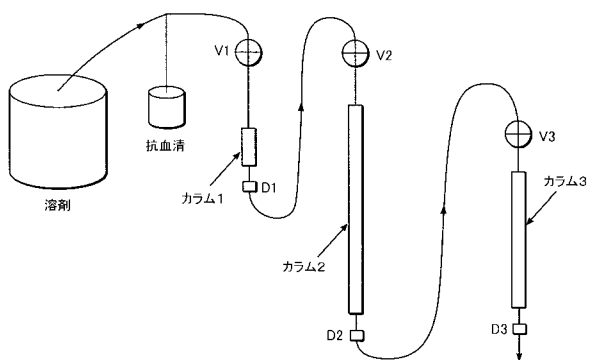
【図 7】 1 及び 2 は、クロマトグラフィによる免疫アフィニティサブトラクションの前後における、尿タンパク質のクーマシー・ブルー G 2 5 0 染色を施した 2 - D 電気泳動ゲルの像である。

【図 8】 本発明の免疫アフィニティクロマトグラフィ・カラムによって取り除かれた、4 つの豊富な血清タンパク質及びこれらのタンパク質に結合したものの銀染色 2 - D 電気泳動ゲルの像である。

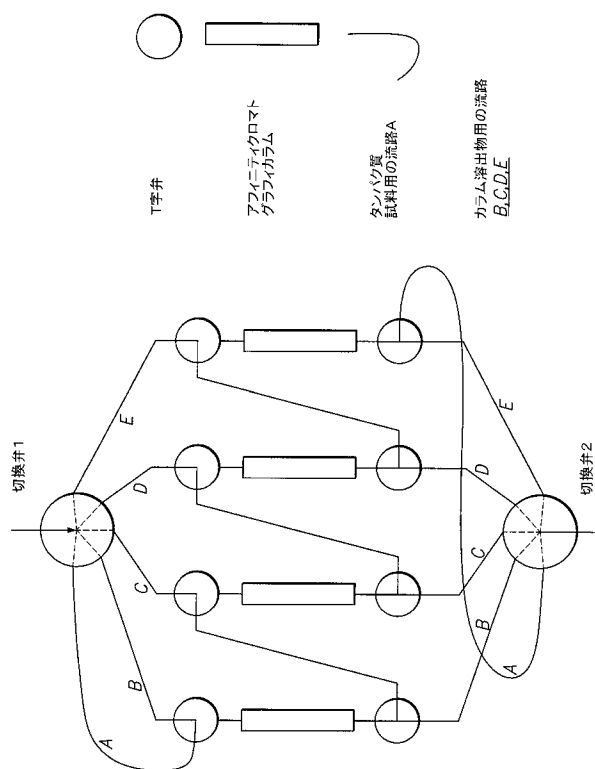
【図 9】 本発明の免疫アフィニティクロマトグラフィカラムによって取り除かれた、免疫グロブリン系列及びこれらのタンパク質に結合したものに関する銀染色を施された 2 - D

10

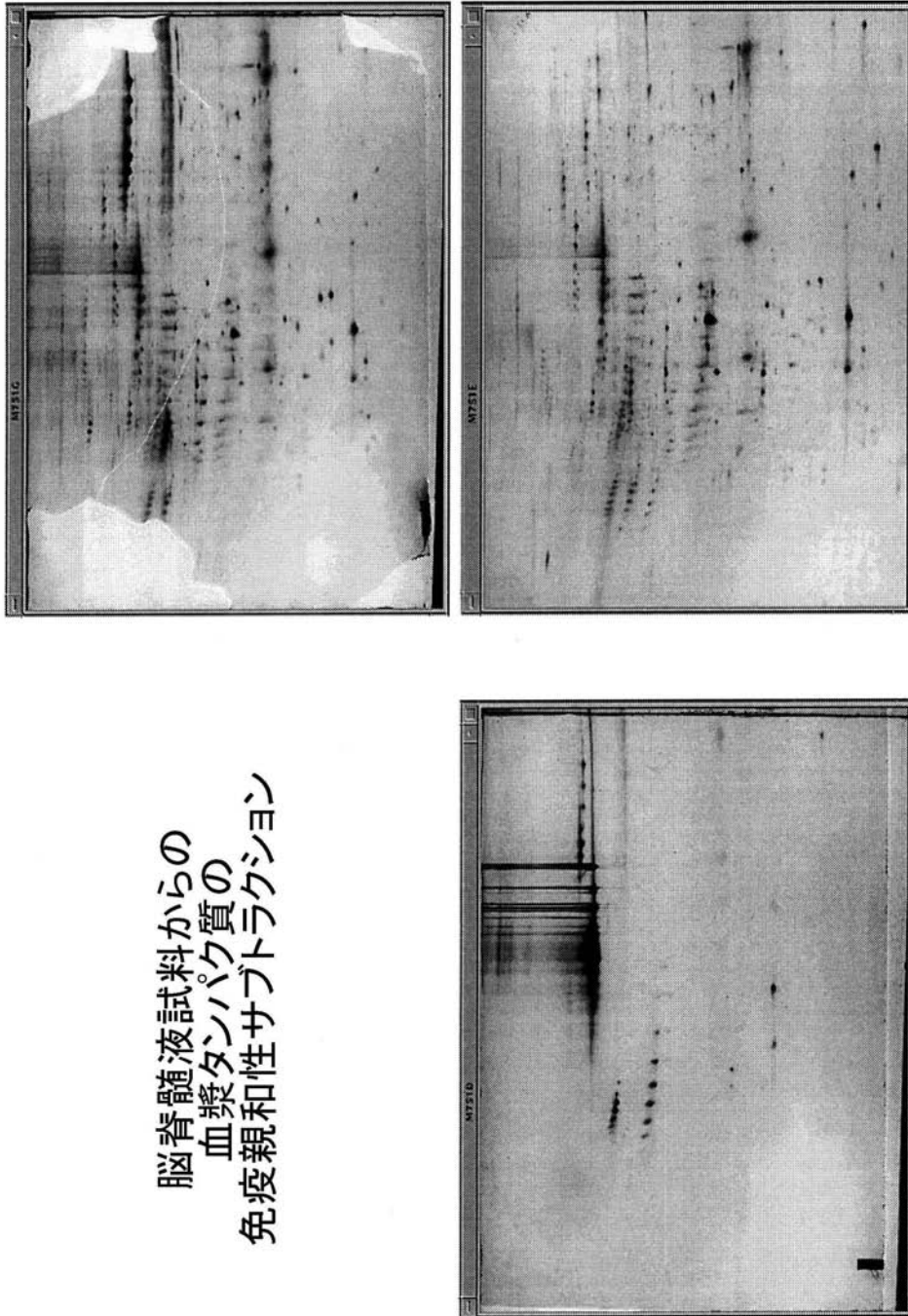
【図 1】



【図 2】

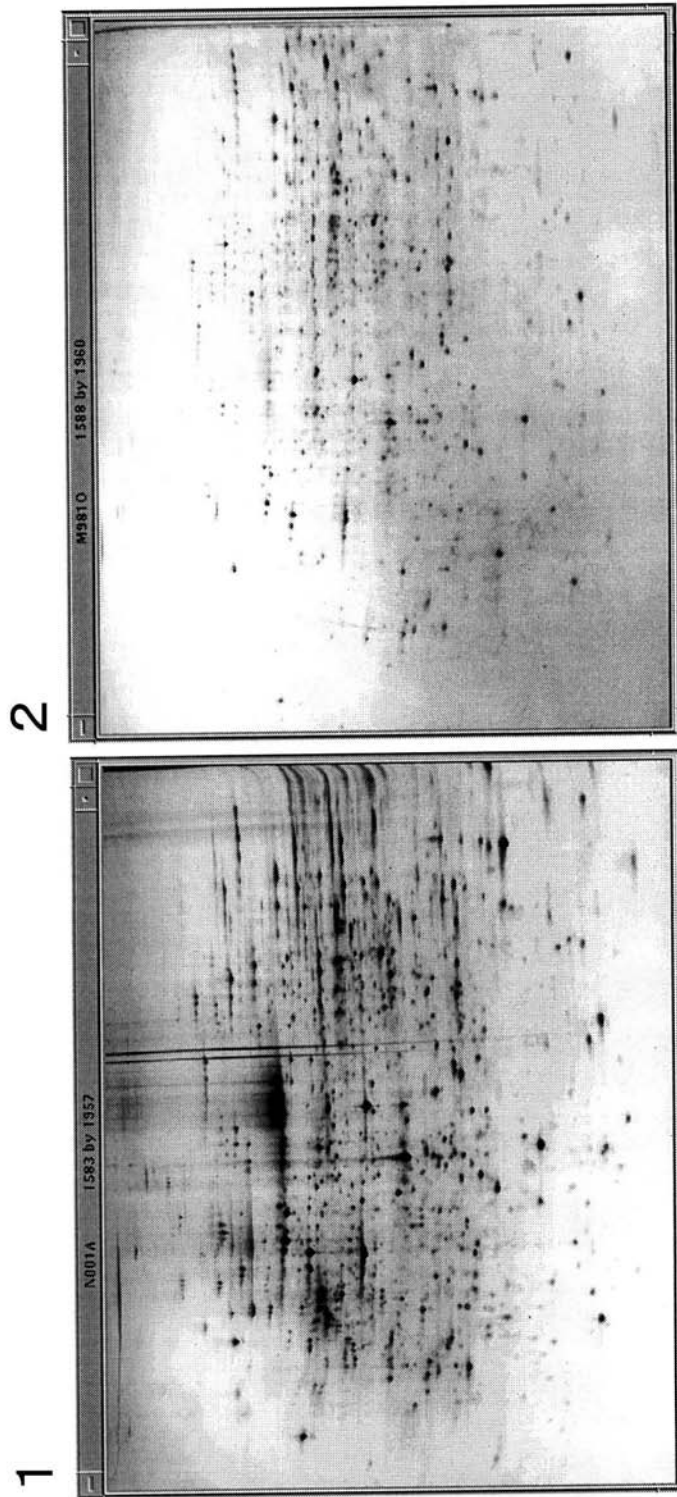


【 図 5 】



【図 6】

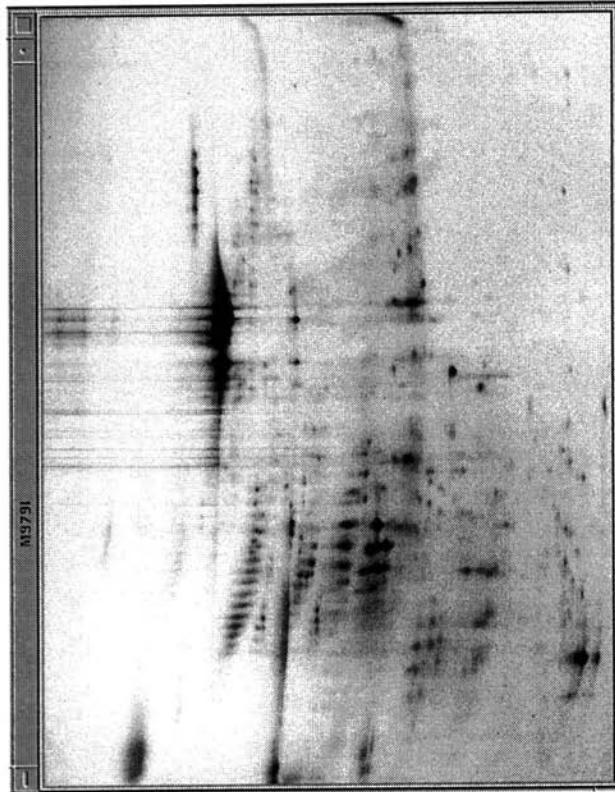
腎臓皮質組織のタンパク質画分からの
血漿タンパク質の免疫親和性サブトラクション



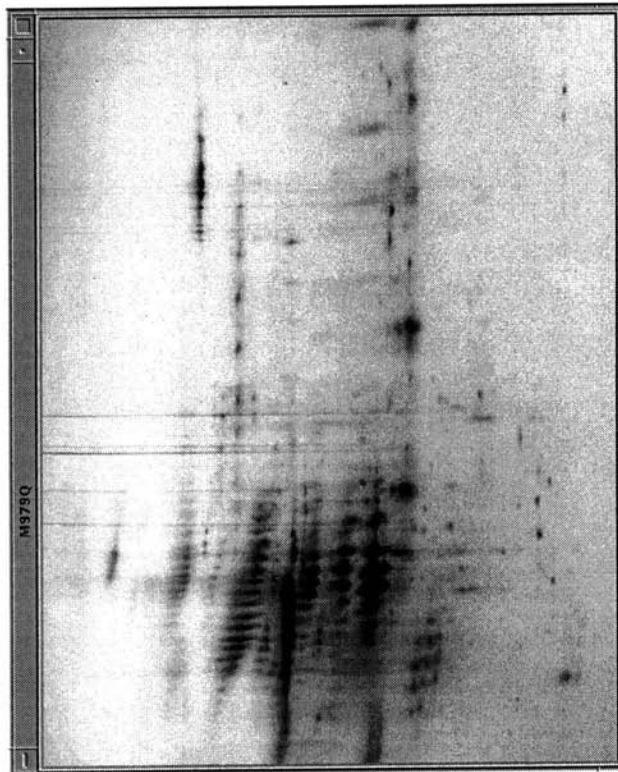
【 図 7 】

ヒトの尿からのアルブミン及び α -酸性糖タンパク質の
免疫親和性サブトラクション

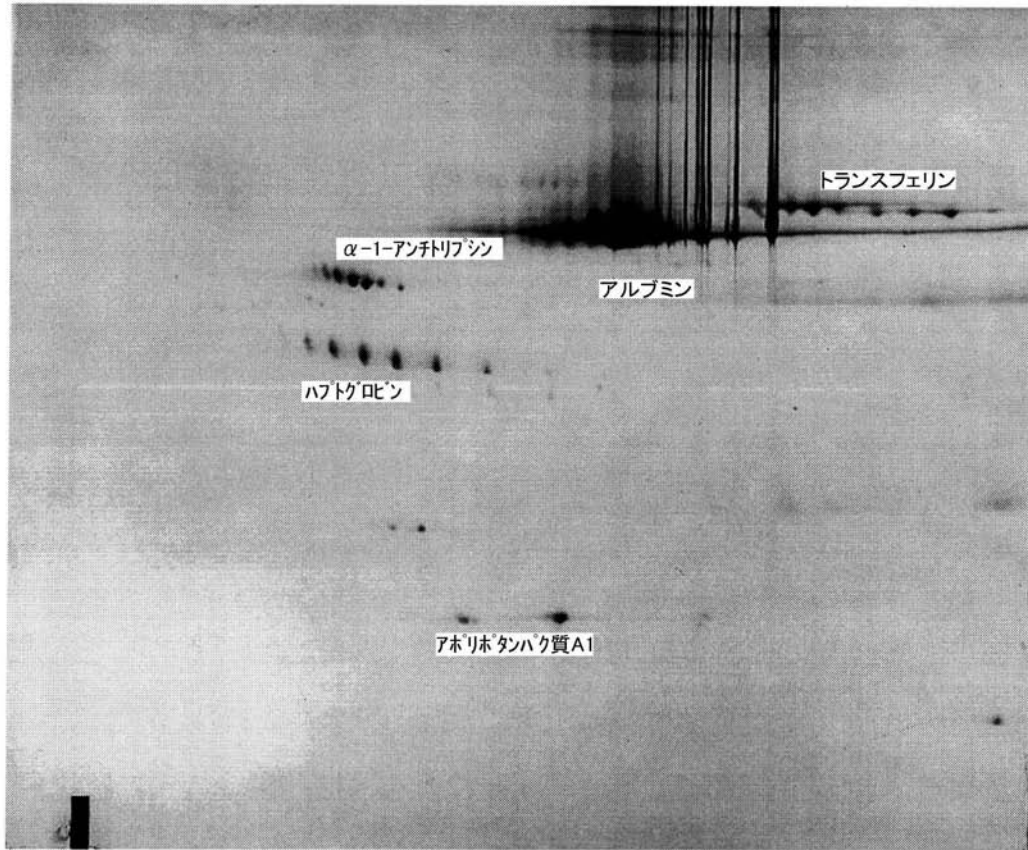
1



2

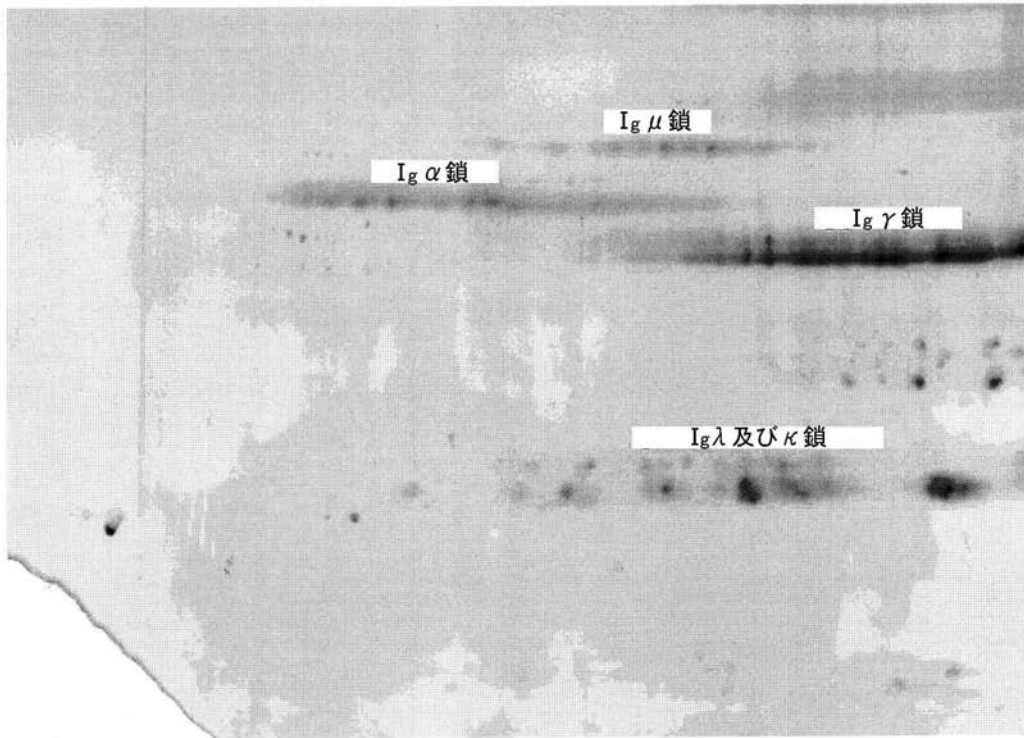


【 図 8 】



免疫アフィニティクロマトグラフィにより除去された4つの豊富な血清タンパク質を有する銀染色2次元電気泳動ゲル(M751D)

【 図 9 】



免疫アフィニティクロマトグラフィにより除去された免疫グロブリン系列を有する銀染色2次元電気泳動ゲル(M782K)

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 July 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/055654 A2(51) International Patent Classification: C12M 1/34,
3/00, C12N 1/00, 11/00, C12Q 1/00, G01N 21/00, 33/00,
33/53, 33/543, 33/559, 33/561Leigh [US/US]; 1759 Willard Street, N.W., Washington,
DC 20009 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/00060

(74) Agents: NAKAMURA, Dean et al.; Roylance, Abrams,
Berdo & Goodman, L.L.P., 1300 19th Street, N.W. Suite
600, Washington, DC 20036 (US).

(22) International Filing Date: 9 January 2002 (09.01.2002)

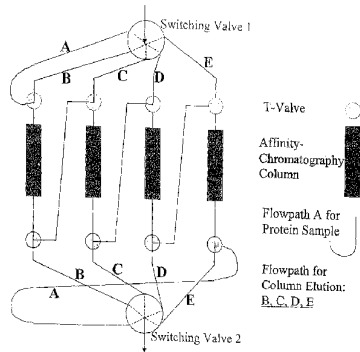
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/260,217 9 January 2001 (09.01.2001) US
09/977,358 16 October 2001 (16.10.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): LARGE
SCALE PROTEOMICS CORPORATION [US/US];
20451 Goldenrod Lane, Germantown, MD 20876 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AT
(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE
(utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE,
ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK
(utility model), SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BJ, BF, CI, CG, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: IMMUNOSUBTRACTION METHOD FOR SAMPLE PREPARATION FOR 2-DGE



(57) Abstract: Removal of abundant proteins from a sample enhances detection and resolution of less abundant proteins in the sample such as in two-dimensional gel electrophoresis. The removal is accomplished by immunosubtraction of several high abundance, interfering or contaminating proteins simultaneously.



WO 02/055654 A2

WO 02/055654 A2 **Published:**

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

5 Background of the Invention

In most cases, immunoaffinity chromatography has been used for the purification of a specific protein. In fewer cases, subtraction or removal of undesired proteins has been the purpose for the use of immunoaffinity chromatography matrices, e.g. in the specific removal of viral (protein) components from a tissue or body fluid sample (Schreiber et al., *Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.* (1989) 56, 146ff.) or in the removal of clinically undesirable proteins from blood of patients (Vallar et al., *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* (1995) 664, 97ff.). In this situation, recovery of a protein mixture that has no affinity for the immunoaffinity chromatography matrix is of primary interest. Flurer and Novotny (*Anal. Chem.* (1993) 15, 817ff.) describe an analytical-scale procedure in which immunoaffinity chromatography columns are used to subtract proteins from human plasma to generate a plasma protein profile by second-dimension RP-HPLC.

Two-dimensional gel electrophoresis (2-DGE) is a method that enables distinguishing
30 individual proteins in a sample that contains a plurality of proteins. Such samples include cell
lysates, tissue lysates, serum samples etc. Difficulties in discriminating proteins can arise when

WO 02/055654

PCT/US02/00060

proteins have similar charge and molecular weight so that the two or more proteins comigrate and are located in the same general vicinity of the display.

Another factor contributing to poor discrimination is the disparate abundance of one or several high abundance proteins that generally comigrate on 2-D gels with other comigrating proteins of lower abundance. In an attempt to detect lower abundance proteins, sufficient protein is loaded onto the gels such that the images on the 2-D gels are stained or labeled very heavily due to high abundance proteins thereby obliterating weaker signals of nearby, unrelated proteins. This effect may be partially ameliorated by taking a series of optical measurements as the staining develops as demonstrated in WO 01/16884.

Additionally, a limited amount of sample protein may be used in the isoelectric focusing procedure to achieve acceptable separation. 2-D gels have limits on the amount of total protein they can hold and thus it is desirable to maximize the amount of protein sample of low abundance in the gel. Thus partitioning the sample before running one or more 2-DGE has been proposed in WO 00/33075.

Such confounding conditions might be overcome by using differential detection methods that might reveal the different proteins that are situated in the same vicinity on a gel. For example, a specific detection means can be employed such as using a reagent (e.g. antibodies, receptors or ligands as reporter molecules) that specifically bind to a particular protein, and perhaps minor variants thereof. Thus, there is a need for techniques, which permit measurement of lower abundance proteins in samples containing higher abundance proteins.

Summary of the Invention

It is an purpose of the invention to provide a method and means for selectively removing desired, undesired and/or abundant proteins from a sample that is to be used for protein analysis such as chromatography, electrophoresis, mass spectrometry, binding reactions, etc.. The proteins removed generally are abundant in the sample so that those that one selects for those less abundant. An embodiment of the present invention that is central to the desired goals is the removal of several proteins which not only allows for the enrichment of other proteins in the samples subject to analysis, but also permits reproducible quantitation of proteins, recyclability of the subtraction matrix and high-throughput. A goal is to simultaneously quantitate many proteins in a sample by a high-resolution technique that is compatible with the immunosubtraction technique.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

To date, 2-dimensional gel electrophoresis (2-DGE) is the best available methodology allowing high resolution and high-throughput for proteins. A bottleneck of 2-DGE is that only a limited amount of protein can be applied to high-resolution, highly parallel electrophoretic protein separation resulting in hundreds of purified protein spots on a gel. Using the present
 5 invention, hundreds of additional proteins can be resolved by 2-DGE and quantitated by proteomic data analysis, when the protein sample was depleted of some proteins and simultaneously substantially enriched for other less abundant proteins. For such a method to be successful, it should not unduly dilute the remaining less abundant proteins in the sample. Thus, for example, if about 80% or greater of the more abundant proteins are perfectly removed from a
 10 sample, the effective concentration of the less abundant proteins is increased five fold with corresponding increase in protein determination sensitivity.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 depicts a system for the generation of purified polyclonal antibody from
 15 antiserum by affinity binding on an antigen column, size fraction by size exclusion chromatography and successive immobilization on Protein A.

Figure 2 depicts an arrangement for passing a sample through multiple affinity chromatography columns.

Figure 3A and 3B are images of a silver stained 2-D electrophoresis gels of human
 20 serum before, 3A, and after, 3B, immunoaffinity subtraction with a mixture of 14 polyclonal serum protein specific or serum protein family specific chromatographic IgG resins. The X axis shows the pI and the Y axis shows the molecular weight in Kdal.

Figure 4A and 4B are images of Coomassie Blue G250 stained 2-D electrophoresis gels
 25 of human serum after chromatographic immunoaffinity subtraction of 12 serum proteins and fraction of the remaining proteins into a fraction without, 4A, and a fraction with, 4B, lectin affinity. The X-axis shows the pI and the Y-axis shows the molecular weight in Kdal.

Figure 5(1), 5(2) and 5(3) are images of Coomassie Blue G250 stained 2-D
 electrophoresis gels of human cerebral spinal fluid before chromatographic immunoaffinity subtraction, the column retained proteins and the flow-through proteins.

Figure 6 (1) and (2) are images of Coomassie Blue G250 stained 2-D electrophoresis
 30 gels of soluble protein fraction of kidney cortex tissue before and after chromatographic immunoaffinity subtraction.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

Figure 7(1) and (2) are images of Coomassie Blue G250 stained 2-D electrophoresis gels of urine proteins before and after chromatographic immunoaffinity subtraction.

Figure 8 is an image of a silver-stained 2-DE gel of 4 abundant serum proteins and whatever bound to the proteins that were subtracted by an immunoaffinity chromatography column of the present invention.

Figure 9 is an image of a silver-stained 2-DE gel with immunoglobulin trains and whatever bound to the proteins that were subtracted by an immunoaffinity chromatography column of the present invention.

10

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Any sample suitable for separation and/or identification by protein separation and/or identification techniques, such as by 2-DGE is amenable to the selective partitioning of the instant invention. A particular use of the instant invention is the removal of abundant proteins from a sample to enable resolution of less abundant comigrating proteins and less abundant proteins in general on 2-D gels. The removal is facilitated by the use of low resistance matrices that speed separation and reduce dilution of the sample.

Suitable samples include cell lysates, tissue lysates, organ lysates, organism lysates, body fluid samples, subcellular fractions, environmental samples and the like. Preferably, soluble fractions of each are used. Suitable fluid samples include cytoplasm; plasma; serum; whole blood; cerebrospinal fluid (CSF); synovial fluid; tissue fluid; organ fluids, such as bile, semen and the like; humors; secretions, such as mucinous fluids, exudates, saliva and tears; waste products, such as urine and perspiration; and other biological fluids in the case of animals. For plants, microorganisms and other such organisms, various other fluids, tissue and cell extracts can be used. Thus, plant tissue, such as leaf tissue, can be macerated in a suitable buffer to yield a suitable sample. Also, a natural plant fluid, such as sap, can be used. A variety of other environmental and biological samples contains a large percentage of one or more common proteins, contaminants, interferants, or naturally occurring high abundance substance, microorganisms or cells. Any proteomic analysis of such samples, such as by 1 or 2-DGE, liquid chromatography, mass spectrometry (including ICAT-MS), HPLC, binding assays, staining, etc., and even detection of single proteins in a sample, may benefit from the instant subtraction technique.

With environmental and industrial samples, a high abundance or interfering substance is frequently present. For example, when screening for pathogens in sewage, a very large number of

WO 02/055654

PCT/US02/00060

relatively harmless bacteria or viruses are present. Any enrichment method, including that of the present invention, simplifies the detection and/or quantification and/or isolation of the desired material.

Removal of contaminants and interferants is important for a number of situations.

5 Proteases and nucleases are ubiquitous in many samples and are usually unwanted as they degrade the analytes being measured. In the field of mass spectrometry of proteins and peptides, samples and intermediates are frequently contaminated with keratin because humans continually shed the protein into the environment. Such contaminated samples are not readily assayable. In such a situation, an immunosubtraction column with receptors to keratin or its peptides may be used at

10 any time in the process from initial sample gathering to more preferable late in the process of preparation for mass spectrometry. Particularly preferred is the column's use immediately before the sample is injected into a liquid chromatography column for LC/MS.

Blood and serum proteins are also common contaminants for any tissue and thus it is preferable to remove these from such samples before finishing analysis. Also, when preparing an

15 antigen for immunization, it is frequently desirable to remove certain immunodominant antigens or immunosuppressive compounds. Furthermore, if one wished to isolate DNA binding proteins or the "footprints" where they bind on the DNA, a selective removal system is also desirable. In conventional immunoassays, clinical chemistry and other analysis of biological liquids naturally occurring proteins frequently interfere. Samples, which contain large amounts of proteins such as

20 albumin, are notoriously difficult to work with due to turbidity, adsorption of analytes, etc.. The conventional way to solve the problems is to dilute the sample with saline. While this does work, the concentration of a low abundance analyte is reduced even further, perhaps to the undetectable range. The present invention is useful for removing the interfering materials in a biological sample without significant dilution, and indeed may even involve concentration to aid in the detection and

25 quantification of such low abundance analytes.

Plants have a number of common proteins depending on the tissue selected. In the seeds of beans, about 40% of all protein is phaseolin. For corn seeds, common proteins include zein, globulins, protamines and glutinins. For many of the oil seeds, one or a few storage proteins

comprise a large percentage of all protein.

30 Outside of the storage proteins of seed, leaf tissue from most plants contains about 20-30% Rubisco, considering the large and small unit thereof, with higher levels after exposure to light and lower levels in the absence of light. Other common proteins include ribosomal proteins, both

WO 02/055654

PCT/US02/00060

chloroplast and cytosolic, thylacoid, photosynthesis system I proteins, photosynthesis system II proteins, chloroplast membrane binding proteins and other structural proteins.

Should the plant, or plant cells in culture, be infected with a virus, whether natural or man-made, large percentages of total protein may be viral, for example, 20-30% of tobacco mosaic virus coat protein may be found in total protein samples from infected tissues.

Likewise, bacteriophage infected bacteria and virus infected animal cells might contain large percentages of viral proteins in the total protein sample.

Hence, removal of interfering or abundant proteins is desirable in those circumstances as well.

The proteins to be removed from the sample are done so by exposing the sample to receptors that specifically bind the proteins to be removed. Preferably, the binding is reversible to enable reuse of the binding agents as well as recovery of the isolated protein species. Suitable binding molecules include antibodies; lectins, such as concanavalin A, wheat germ agglutinin, abrin and so on; receptors; metals; co-factors; combinatorial compounds, polymers, nucleic acids, artificial protein sequences designed to act as specific binding receptors for the ligands being removed (aptamers) and other compounds that bind particular classes of proteins, such as heparin, polymyxin, dyes, such as Cibacron blue F3GA, and hydrocarbons, such as methyl and phenyl radicals that bind hydrophobic proteins. Often the agents comprise a functional group to which a protein is attracted. Examples of such functional groups include hydrazide, amine, N-hydroxy-succinimide, carboxyl, boronate and organomercury.

While this patent application generally refers to removal of proteins from a sample, the same techniques may be used for removing any ligand such as contaminating, interfering or simply high abundance substances, complexes, particles and even whole microorganisms or cells. Likewise, while antibodies are exemplified as the specific binding partner, any receptor that specifically binds to a ligand in the sample may be used for the presently described technique. The ligand and corresponding receptor bind relatively specifically to each other. Neither ligand nor receptor need be a single compound but may also include complexes, particles and larger structures. While this patent application uses the terms *affinity* and *immunoaffinity* for the specific examples, these should be interpreted broadly to refer to specific binding relationships between the receptor and ligand.

A preferred binding molecule is an antibody. The antibody can be of any animal species. The antibody can be natural or produced recombinantly. The antibody can be of any class,

WO 02/055654

PCT/US02/00060

subclass, single chain and monofunctional, bifunctional or polyfunctional. The antibody can be intact or substantially intact, that is various portions of the antibody can be removed so long as the desired functions, such as antigen binding or Fc receptor binding, is retained. Hence, glycosylation sites can be deleted as well as can Fc receptor binding ability.

5 Monoclonal antibodies are powerful reagents because a clone can yield an antibody of high affinity, high avidity or both in essentially unlimited quantity and reproducible quality. Individual antibodies can be examined as taught herein to ensure that binding of the antibody to the matrix does not compromise antigen binding. Moreover, use of a monoclonal antibody should preclude the need for antibody purification using a matrix to which is bound the cognate antigen of interest

10 as taught herein.

The specific binding agent bound to the matrix for removing a high abundance protein from the sample may also be a recombinantly produced, single chain, diabodies or antibody display phage. When antibody display phage are used and conventional panning employed in its preparation, very high affinity and/or high avidity display phage are prepared. However, any

15 antibody, which lacks the Protein A, or G binding Fc portion will require a different attachment mechanism. However, since display phage are inherently polyvalent they may be immobilized on a solid phase by many techniques and still have functional antibody-like moieties free for antigen binding.

Antibody fragments such as Fab or Fab2 may be used but will utilize a solid phase with a specific binding agent for the non-epitopic region of the Fab. Bifunctional antibodies (diabodies and reassortant Fab2 or reassortant antibodies) each may have a first antigen binding portion and a second antigen-binding portion. One may advantageously have the solid phase bound to the first antigen as a way for immobilizing the bifunctional antibody which may then be crosslinked as

20 described herein. This leaves the binding site for the antigen being removed from the sample free

25 for binding.

Recent developments with synthetic receptors appear promising. These are combinatorial peptides, oligomers, polymers, etc. either alone or used within a longer polymer sequence. For the purposes of the present invention, these are also considered receptors.

To facilitate the separation and removal process, it is preferable that the binding molecules

30 be immobilized on a solid phase that is inert to the binding agent and to the sample. The binding agent is affixed to the solid phase using known procedures and in a fashion that does not substantially reduce the protein binding ability of the binding agent or molecule. Moreover, to

WO 02/055654

PCT/US02/00060

facilitate reproducibility of the matrix, it is preferable that the binding molecule be stably bound to the solid phase. Thus, for example, the binding molecule can be adsorbed, bound covalently to or entrapped in the solid phase, attached to or incorporated into a coating for the solid phase.

Preferred solid phase for immobilizing binding agents or molecules are matrices that have enhanced surface area. A suitable matrix is, for example, a bead or a microbead shape and form. Such beads or microbeads generally are spheres of a particular resin or polymer having properties suitable for such affinity chromatography, such as binds antibody, substantially inert to the antibody, substantially inert to the sample, is stable under conditions used for the separation process and so on.

Suitable matrices are beads made of materials such as dextrans, styrenes, agarose, calcium phosphates, acrylics, polyamines, acrylamides or silicas. Collectively, these may be referred to as "resins" in this application even though materials such as silica are not usually chemically considered "resins". Many such materials are available commercially, for example, from Pharmacia, Bio-Rad, Sigma and other distributors. Preferred matrices are those that permit high flow rates with low back pressure. Particularly preferred are high throughput techniques using protein porous matrixes, such as porous beads that enable perfusion chromatography, such as POROSTM (a trademark of Applied Biosystems, Foster City, CA) chromatography media, gel beads, and continuous bed matrices such as UNOTM (a trademark of Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) chromatography columns. Other suitable matrixes are produced by Pharmacia and others.

For fast separation, it is preferable to use a solid matrix, which will allow liquids to rapidly pass through or by the matrix. When one wishes to treat a considerable number of samples identically by sequentially passing them through the same matrix after elution of previously bound material, the rate at which the sample passes through the matrix becomes a time-limiting factor. "Perfusion" matrixes are particularly preferred for this technique but other matrixes may be used also. In some of the examples below, over one hundred were passed through the same column with time to complete one cycle of sample loading, unbound protein elution, adding elution buffer, bound protein elution and final wash being approximately 15 minutes or less.

Because the samples destined for separation are generally of low volume, it is desirable to have a separation process that is quick and does not unduly dilute the sample, particularly since the void volume or that portion of input proteins that do not bind to the solid phase matrix, will contain those proteins that are not abundant in the original sample.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

POROS particles represent microspheres of styrene and divinylbenzene that are interadhered to create essentially circular particles with an abundance of pores and channels within the interior of the particles. The result is a highly porous particle wherein effective binding occurs not only on the surface of the particle but in the interior as well. Thus, high flow rates can be used.

5 UNO columns contain continuous bed matrices that contain a homogeneous matrix rather than discrete structures, such as beads. Thus, monomers and ionomers are polymerized in situ. The polymer chains aggregate into a dense network of nodules consisting of microparticles. The result is a column that can tolerate high flow rates without sacrificing resolution and capacity.

10 Other preferred solid phase matrices can be used so long as the flow rates usable with the other matrices are comparable to or faster than that used with the POROS and UNO matrices.

Thus, either the matrix itself binds or entraps a particular protein or class of protein, is derivatized or modified to carry out that function or entraps a molecule that can carry out that function. For example, a particular binding agent is affixed to a surface of the matrix. By way of example, a binding molecule, such as an antibody specific for a particular sample protein, is affixed
15 to the matrix. The antibody, or other receptor(s), can be monoclonal or polyclonal, that is they recognize one or plural epitopes on the ligand to be removed. Polyclonal antibodies are useful because the polyclonal preparation binds to different epitopes and determinants of the protein to be removed rather than being restricted to a particular determinant. Binding of a particular antibody to the matrix could have an untoward effect on the antigen binding ability and capacity of any one
20 antibody species. Thus, a polyclonal antibody offers certain advantages.

One way to affix antibody to the matrix is by the use of protein A and/or protein G and/or protein L or the like that are known to bind to the F_c portion of immunoglobulin. Protein A and protein G have particular affinity for different classes and subclasses of antibody as well as for antibodies obtained from different animal species. Either the affinity of any one antibody
25 preparation for protein A or protein G is known or can be determined practicing the methods taught herein.

Matrices carrying protein A or protein G covalently bound to the surface thereof are available commercially, for example, from Applied Biosystems and Bio-Rad. Alternatively, matrices carrying hydrazine groups that bind to the F_c portion of immunoglobulin by way of
30 covalent hydrazone bonds can be used in similar fashion. Other methods to immobilize antibodies onto the solid phase may be used but are generally less preferred because of difficulties controlling

WO 02/055654

PCT/US02/00060

the binding reaction or because they result in more antibody becoming inactive resulting in lower binding capacity.

Thus, the antibody preparation is mixed with the matrix under conditions suitable for facilitating binding of antibody to the matrix. Once bound, it is preferable to bind the antibody to the matrix covalently to provide a matrix that is stable to treatment without substantial loss of antibody. Methods for covalently binding antibody to protein A, protein G or to the matrix are known. For example, bifunctional crosslinking molecules are well known for this purpose, such as glutaraldehyde, dimethyladipinidate, dimethyl suberimidate (DMS), dimethyl pimelimidate (DMP), tetraanitromethane and dimethyl 3, 3' dithiobispropionimidate that generate imidamide crosslinking and such conjugating bonds are known in the art. While any may be used, it is preferred to use plural crosslinking agents to tightly bind the receptor to the matrix or matrix having an intermediate binding agent such as Protein A or G as each crosslinking is preferred for slightly different spacing between reactive moieties.

To ensure the antibody is specific for the protein to be removed, the antibody preparation can be purified to remove cross-reacting antibody, particularly if polyclonal antisera is used. To refine the specificity of the antibody, the antibody preparation can be fractionated by exposing the antibody to the particular cognate antigen protein. The particular cognate antigen protein can be bound to an inert matrix as described hereinabove to yield an affinity chromatography matrix for isolating antibody that specifically binds to that protein. It is preferable that the protein affixed to the matrix be of high purity to enhance the specificity of the antibody preparation. The matrix used is one amenable to binding proteins and generally would not be one to which protein A and protein G are affixed as the matrix or derivatized form thereof must be specific for the antigen binding site and be bound by the antigen binding site of the antibody preparation to be purified.

Thus, the antibody preparation may be exposed to the corresponding matrix containing the protein of interest, that is, the protein which is to be removed from the samples for further analysis, in a batch, column or other suitable format and incubated so that the antibody is retained on the matrix, eluted and collected for use as provided herein.

For the consistent manufacture of binding matrix, a reproducible process that is readily automatable is preferred. This involves two important features, 1) preparing a means for purifying the receptor using the ligand and 2) using the receptor to remove ligand from the sample. For example, an affinity matrix can be used for purifying receptors. First, purified ligand is mixed with the preactivated matrix material to bind the ligand. Alternatively, the ligand may be

WO 02/055654

PCT/US02/00060

chemically bound to the resin as a separate step. Alternatively, the ligand may be derivitized so that it will bind to the matrix directly (e.g. biotinylated ligand and avidin bound matrix) or easily reacted with the matrix. The ligand matrix then is loaded into a column or similar format using a known buffer to form a first column. Reactive groups of the preactivated matrix bind, preferably covalently bind, to complementary groups on the ligand. Generally, saturating amounts of ligand are added to the matrix. The matrix is washed resulting in ligand covalently affixed to the matrix. Optionally, a blocking agent may be added to reduce non-specific absorption of receptor to the matrix. The ligand matrix can be used in batch format and/or can be packed into a column or a part of another device such as a lateral fluid flow device, spin column, microfluidics module, or a removable component. The receptor preparation is then added to the matrix and incubated under conditions to enable specific binding. The bound receptor is eluted from the matrix, for example, by exposure to a low pH. The eluate is monitored for ligand, for example by UV 280 absorption with protein ligands and the protein receptors collected.

Similar formats to columns include mixing of matrix in a liquid sample whether the matrix is loose beads or in permeable packets, magnetic (or magnetically responsive) matrix beads, microarray formats where different receptors are immobilized on different locations on the matrix(es), liposome or micelle emulsions, dipsticks, tube coatings (such as capillaries, microfluidics devices), gel beads or slurries, etc. The solid phase may be loosely attached to the inside of a container, tube or capillary. The immobilization technique may even be performed after receptor-ligand binding, for example using an anti-Ig antibody (Coombs reagent) to precipitate antibody and whatever protein is bound thereto. Alternatively, the receptor may be bound to a substance that is selectively partitionable such as an alginate. When calcium ions are added (before or after receptor-ligand binding) the receptors and whatever else is bound thereto are immobilized. Likewise, the receptor may be part of or bound to a specific binding partner such as biotin. By adding avidin, the receptor and whatever else is bound thereto are insolubilized. The processes may reuse the receptors by selectively resolubilizing the receptor by corresponding reversible reactions such as adding EDTA to chelate and remove calcium ions thereby liquefying alginate. The key feature is that the matrix is partitionable from the sample liquid. The terms "solid phase" and "solid phase matrix" refer to materials which are originally solid or may be made solid (such as the alginate gel above) or which act like solids even though they may be considered insoluble liquids such as liposomes, micelles, liquid coatings on a solid phase, very viscous

WO 02/055654

PCT/US02/00060

insoluble liquids etc. The "solid phase" material may be solid during only part of the method of the present invention.

The first column then can be connected in series to a second column, which removes elution agent(s), for example, a size exclusion column, such as one containing Sephadex, optionally with a neutralizer of buffer. The purified receptor from the first column passes through the matrix and is excluded therefrom which effects salt removal, which is not so excluded. Again, the eluate can be monitored for protein, such as by 280 nm absorption when protein ligands and/or receptors are used.

The second column then is connected in series to a third column, which would be packed with a preferred matrix containing a moiety reactive for binding the antibody.

To begin the process, a receptor preparation is added to the first column and allowed to pass through the column. Receptor specific to the ligand attached to the ligand matrix will be retained on the column and unbound substances are discarded. Following such binding, the receptor is eluted from the ligand matrix, for example, by exposure to an acidic or alkaline buffer, a chaotropic or denaturing agent (preferably reversible). The eluted receptor in the acidic buffer then is optionally neutralized, channeled to the second size exclusion column to effect salt exchange. The eluted receptor then is optionally neutralized if not already done and channeled to the third column containing the matrix for binding receptor. The third column is loaded with receptor until the desired binding capacity of the column for receptor is obtained. The result is a column containing a matrix containing an antibody specific for a particular protein.

The matrix bound to receptor then is optionally treated using known methods to permanently bind, e.g. covalent attach the receptor thereby "fixing" the receptor to the matrix. The result is a matrix suitable for repeated use in removing the cognate ligand from a sample. The binding capacity of a unit volume or weight of matrix for the cognate ligand is determined using known methods.

The collected receptor can be tested for specificity to the ligand of interest using known methodologies, such as a separate binding assay.

Then the receptor is then bound to a matrix as taught herein to yield a reagent for removing the cognate ligand from a sample destined for later analysis or purification and/or detection of analytes in the sample, such as by 2-DGE.

In lieu of initially immobilizing the ligand to a solid phase, free ligand may be used and mixed with receptor. If the receptor is at least divalent, an insoluble complex may form which is

WO 02/055654

PCT/US02/00060

readily recovered separate from the remainder of the liquids being used. Separation may be by filtration, decanting, centrifugation, etc.

Alternatively, if the ligand is labeled with a binding partner, such as biotin, a complementary binding partner, such as avidin, may be bound to a solid phase before or after contact with the receptor. In this matter, receptor-ligand complexes may be removed from solution by binding to the solid phase. Free receptor is then eluted therefrom. Other formats for using the ligand to purify the receptor may also be used.

Thus, for example, suitable antibody specific for a particular protein that is to be removed from a sample can be attached to a preferred matrix to provide a reagent of interest. The process of obtaining a specific antibody preparation, purification of that specific antibody and binding of the antibody to a preferred matrix can be accomplished in a series of columns. The process is repeated for other proteins to yield a number of matrix reagents specific for the particular proteins to be removed from a sample.

Removal of glycoproteins can be beneficial as many proteins carry graded amounts of carbohydrate yielding plural molecules of similar charge but different molecular weight. Such molecules yield a horizontal array of spots in a "train" on the 2-D gel. Because such trains can add complexity to the 2-D display and can confound resolution and discrimination, removal of glycoproteins can be beneficial. Moreover, methods to remove glycoproteins will enable comparisons of samples that are and are not glycosylated. It is known that oncogenesis often is accompanied by disruptions of normal glycosylation of cells.

When separation based on glycosylation is important, lectins can be affixed to a matrix as taught hereinabove to provide a matrix that will bind molecules carrying the particular sugar or sugars to which the lectin binds.

An alternative method to remove trains is to expose the sample to a saccharidase or glycosidase to remove carbohydrate bound to proteins in the sample. A number of carbohydrates are known to be bound to proteins and any of a variety of enzymes that cleave a particular sugar can be used.

For example, many glycoproteins are sialylated, once or multiply. Thus, the sample can be treated with a neuraminidase to remove the one or more sialic acid residues from the protein. Many glycoproteins are fucosylated. Hence, one or more fucosidases can be used to remove fucose residues. Because carbohydrates can be linked to proteins and to other sugars in a variety of linkages, such as, 1→3 or 1→4, and some enzymes are specific and cleave only a particular

WO 02/055654

PCT/US02/00060

linkage, a robust enzyme or several enzymes may be employed to remove sugar residues. The samples are treated with the suitable saccharidase(s) or glycosidase(s) under the appropriate conditions to obtain the desired deglycosylation. Deglycosylation results in a simpler pattern of proteins and reduces the overall number of proteins. In certain analysis, the glycosylated isoforms are unimportant and thus may be collapsed to one measurement. However, for other analysis, it may be desirable to preserve all glycosylated forms, as the ratio of amount of one or more isoform may be diagnostic for a disease, etc. The same may apply for phosphorylation status, metal ion binding, and any other post translational modification status.

Unlike the above procedure using a binding agent such as an antibody, which generally binds to only a particular molecule, a deglycosylation likely would remove a number of proteins, or a class or proteins, as compared to a particular protein. When analysis of different glycosylation is desirable, the use of a lectin column is preferable.

A separate purpose of the instant invention is to provide reagents that can be combined, for removing multiple selected proteins from a sample. Generally, plural proteins are removed from the sample. Thus, a multifunctional matrix that binds a class of proteins or a plurality of individual matrices carrying different agents, such as antibodies of different specificities, are combined. When plural specific matrices are used, the different specific matrices can be mixed in a batch. The mixture can be maintained and used in a batch format or can be loaded into a column. In that case, the different species of matrices can be mixed together.

Alternatively, when a column format is used, different matrices carrying different binding agents can be mixed before adding or loaded sequentially, wherein the individual matrices may be separated by an inert carrier, such as a porous membrane, in layers, or the individual matrices can be contained in a separate column. In such a situation, at least one receptor is a division of receptor(s) that is at a separate predetermined location from at least one other division of receptor(s).

When individual matrices specific for binding different proteins are to be mixed, it must be ascertained that the combination does not substantially lessen the binding capacity of any one matrix for the cognate protein. That exercise can be conducted using standard techniques of establishing the binding capacity of any one matrix alone and comparing the binding capacity of that cognate protein in a mixture.

It thus is possible to produce certain combinations of particular matrices in a mixture that is particularized for certain samples. Hence, a particular combination of specific matrices can be

WO 02/055654

PCT/US02/00060

used reproducibly for serum samples because it is known what are the more abundant proteins in serum. In the same fashion, a particular mixture can be configured that would remove the more abundant proteins from plasma, urine, CSF and other biological samples. In such a manner, one may use proportional amounts of each particular matrix, as measured by the binding capacity of each matrix, in the pooled combination mixture.

Alternatively, if one wishes to quantitatively measure a high abundance analyte at the same time as a low abundance analyte in a sample, one may use a smaller than optimal amount of the particular matrix to that high abundance analyte. The result is a removal of most but not all of the high abundance analyte of interest. By careful measuring of the amount of particular binding resin, a high abundance analyte in a sample may be converted into a lower abundance analyte. During the data analysis and interpretation, the controlled removal amount may be added to the measured amount to deduce the actual amount in the sample.

Thus, in another format, individual matrices carrying different binding agents are housed in separate vessels, layers or compartments therein, and/or the vessels are connected sequentially in series, connected, for example by a conduit or tubing. For example, capillaries or 96 well plate formats where the bottoms of each well (which may be permeable) contain the matrices.

Different receptor matrixes are stable for different periods of time. Some receptor matrixes prepared by the methods of the Examples below have been stable for hundreds of cycles of use, stripping and reequilibration without loss of specificity or effectiveness. Other matrixes have been stable through only a dozen or two cycles before showing signs of degrading. The factors determining stability include receptor choice, matrix choice and immobilization technique.

Where some of the receptors or ligands are subject to degradation before others, it may be desirable to have matrixes bound to the labile receptors or ligands to be present in a separate column for easy removal and replacement with fresh binding receptor to avoid replacing the entire column. Alternatively, labile binding partners may be located inside a separate layer separated by permeable membranes or inside a permeable bag or packet and placed inside the column such that they may be easily separated for replacement. A permanent subcolumn section or chamber, such as a thick metal ring with a fine mesh on top and bottom, enclosing the labile binding partner matrix may be used. This structure has been used for different purposes previously such as in U.S. Patent 4,636,361. For particulate matrixes, those bound to labile binding partners may have magnetic, paramagnetic or diamagnetic materials incorporated therein. Those matrix particles may be readily separated by removing all matrix particles from the column and applying a magnetic

WO 02/055654

PCT/US02/00060

field or other magnetically responsive member. Other methods for partitioning one set of solid phase matrix from another set may also be used such as one matrix dissolving in conditions where the other is insoluble. The key feature to all of these designs is to have the labile matrix-receptor be selectively removable from the stable matrix-receptor for easy replacement.

5 The choice of which matrices are to be combined into a mixture may not be arbitrary and may be facilitated by observing that certain proteins to be removed that may share a common property. One suitable property is elution from the matrix following the removal procedure. Thus, proteins that can be eluted from the antibody-containing matrices using a single buffer can indicate which matrices can be combined. If different loading or elution conditions are preferred, different
10 columns are preferred for those antibodies preferring different conditions, creating at least the same number of columns as elution conditions.

The retained proteins can be of use. For example, if immunoglobulins are removed from the sample, the recovered immunoglobulin may be used for treatment or the subject of diagnostic assays, for example, to determine whether the removed antibodies bind to a particular antigen. The
15 quantity of certain removed proteins is also indicative of certain conditions. For example, abnormally low levels of albumin are found during certain liver diseases, tissue damage and starvation. Likewise, transferrin abundances are affected by amount of iron, liver and kidney diseases. Also, alpha antitrypsin is increased during pregnancy and has even been used as a marker for inflammation.

20 Evaluating the immunoglobulin compositions in serum can be important in autoimmune diseases or diseases with autoimmune reactions (e.g. rheumatoid arthritis, lupus...) or diseases in which the immune system is compromised (e.g. AIDS, radiation or toxin exposure...) or in hematologic malignancies (e.g. myeloma, lymphoma...). Comprehensive analysis of immunoglobulins can help monitor quantitative antibody expression changes in such diseases as
25 well as monitoring the immune response to an infection (e.g. hepatitis, syphilis...). Figure 9 depicts the results from separation of the immunoglobulins bound to the immunosubtraction column of the present invention.

The use of separate matrices for separate receptors is preferred because different receptors will compete or interfere with each other's binding. With a less controlled reaction, determining
30 the binding capacity of the matrix for each ligand becomes less predictable. Furthermore, as an industrial process, binding many different receptors to a single matrix simultaneously is difficult to control.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

When plural matrices are combined into a mixture, preferably the binding capacity of any one matrix is determined and the relative amount thereof in comparison to the binding capacity of other matrix types is adjusted to ensure uniform usage over time. The relative binding capacities can track the relative abundance of the proteins in the sample. Thus, in the case of one particular protein, it can be determined that one milligram of matrix containing an antibody specific for albumin, for example, binds 2 mg of albumin. That can be determined by exposing a known volume of matrix to graded amounts of a protein solution of known concentration. Then it can be determined, for example, by monitoring the 280 nm absorbance of the fluid following exposure to the matrix, when the matrix has bound as much albumin as practical. The binding capacity of the matrix as well as the efficiency of removing bound protein can be assessed by monitoring protein levels in the sample and in the eluate, using standard methods such as, ELISA, 280 nm absorbance or protein dyes.

It is known that generally, serum contains about 44 mg/ml of albumin. Thus, to remove essentially all of the albumin in a 50 µl sample of albumin, it will be necessary to expose the serum sample to at least 1.6 mg of matrix.

Also, suppose proteins A and B each comprise 30% of the total protein in a sample. Protein C comprises 20% of the total protein in the sample. Three matrices that each specifically binds A, B or C are prepared. Assume each matrix binds the same molar amount of A, B or C and A, B and C can be eluted from the respective specific matrix using the same buffer. To remove A, B and C from the sample, matrices A, B and C can be mixed at the ratio of 37.5:37.5:25, either in a batch or sequentially in a column(s) to yield a reagent that can subtract A, B and C from such a sample. The sample is applied to the reagent and allowed to incubate with the reagent to enable A, B and C to bind to the respective matrix. The eluate sans A, B and C is collected.

Any of a variety of available assays can be used on the eluted sample to ensure removal of the protein(s) of interest. For example, an ELISA can be performed on the eluted sample to determine if capacity of the binding ability of any one matrix is exceeded by presence of the protein sought to be removed in the samples. If present in the eluate, it may be desirable to recycle the sample over regenerated matrix or over fresh matrix.

The final eluate is collected and then treated to concentrate the proteins remaining in the sample and to ensure that the proteins are in a buffer suitable for 2-DGE or other use for measuring the proteins. The sample can also be dialyzed, lyophilized and so on.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

An optional deglycosylation step can be conducted on the separated sample, particularly if the separation did not include a reagent for removing glycoproteins. For example, the sample can be incubated under suitable conditions with a neuraminidase, such as, sialidase A distributed by Prozyme, which is a recombinant enzyme with broad substrate specificity.

5 Following enzymatic treatment, the sample is preferably desalted, optionally separated from the enzyme and made ready for isoelectric focusing. The succeeding steps are known in the 2-DGE art per se.

In another embodiment, the present invention may be used for determining protein-protein interactions, the extent and affinity of protein complex binding, and the finding of complex binding
10 proteins and related proteins that are likely to function together or in sequence because the proteins interact. For low molecular weight proteins so small that they are cleared from the blood by the kidneys, binding to a larger protein is important for maintaining the protein in the blood. The present embodiment provides some measure of the half-life of a compound in blood based solely on its molecular weight and its ability to bind to high molecular weight molecules, such as
15 albumin. This is of particular use for measuring albumin binding compounds as many pharmaceuticals and biologically active peptides and proteins bind to albumin to some extent.

Several proteins are known to play a crucial role in a complex biological process, e.g. a signaling cascade or a proteolytic pathway. For these pathways to occur, it is frequently necessary to have a protein-protein binding event or other metabolite-protein binding happen. It
20 is desirable to investigate and identify all proteins involved in such events. Molecular cloning can identify multiple but not all factors that play a role. Previously, people have focused on one specific interaction using yeast-2-hybrid screening (e.g. U.S. Patent No. 5,283,173, 5,637,463 and others). However, because of the foreign environment and unnatural interacting proteins, the data obtained may not reflect reality.

In the present invention, one or a pool of antibodies are generated for several proteins known or suspected to be involved in one pathway. Either the antibodies or the proteins (or both) are immobilized together on a chromatographic matrix or other solid phase, and apply a biological sample in a soluble aqueous phase is contacted to the immobilized proteins. It is important to choose a biological sample in which the addressed biological pathway takes or is
30 assumed to take place. All proteins in the sample that don't bind flow through and are discarded. All sample proteins that bind to the antibodies or immobilized proteins with specificity and proteins that have substantial binding affinity to the immobilized or later proteins

WO 02/055654

PCT/US02/00060

under chosen buffer conditions are bound. The enriched proteins are assayed directly or eluted, for example by an acidic solution. The proteins in the eluted fraction are analyzed by a number of techniques such as mass spectrometry, liquid chromatography, electrophoresis etc. A preferred method is 2D-electrophoresis. The proteins are prepared, applied, separated by 2-DE and stained. Highly resolved and detectable by imaging technologies, proteins can be individually identified by techniques known per se such as by mass spectrometry, immunoassay etc.

By using a column of the present invention having antibodies to four high abundance proteins in serum, a serum sample was applied and the unbound fraction discarded. The bound proteins were eluted by acidic buffer and separated by the standard 2-dimensional electrophoresis methods taught herein. The result is Figure 8, which shows protein spots for the four proteins expected and several other protein spots, which represent proteins and peptides, which were bound to these four proteins in the serum sample.

To enhance sensitivity of a separation and detection method for the low abundance proteins, another embodiment of the invention is the stripping of the associated proteins from an immunoaffinity column without the unwanted high abundance protein. This is effected by using elution conditions which disassociate proteins but are not sufficient harsh to break the antibody-protein bond. For example, less extremes of pH, chaotropic agents, heat, etc. are usable for this purpose. Denaturing conditions may also be effective for the same purpose also.

To further strengthen the antibody-protein bond to prevent elution of the high abundance protein, one may preactivate the antibody or chemical moieties nearby to chemically react (e.g. crosslinking agents) with whatever protein binds to the antibody.

Unlike the primary focus of the present invention to use receptors for high abundance, interfering, contaminating or unwanted substances, for determining protein-protein interactions and the like, the receptors may be to ligands of any abundance, including low abundance ligands. Since the objective is to recover binding proteins for analysis, when using specifically binding receptors, the relative concentration(s) of ligands in the sample is relatively unimportant.

One suitable example of how this embodiment may be used is in the field of Alzheimer's disease research. Presently diagnosis is performed at autopsy by observing plaques histologically. While it is believed that the amyloid plaques are somehow involved in the disease process, such are not readily diagnosable in living patients and determining the pathological

WO 02/055654

PCT/US02/00060

events and components would be of assistance in drug development. Initially, antibodies to amyloid protein are immobilized on a column. Brain homogenates from Alzheimer's patients are then allowed to bind to the column and all unbound material washed free. Bound associated proteins will coimmobilize. The amyloid protein and bound associated proteins are then

5 stripped from the column by pH 2.5 buffer and the resulting eluate is then analyzed by 2-DE, LC/MS, immunoassay or otherwise to determine the identity of the bound associated proteins. These represent potential diagnostic analytes, drug targets etc.

Alternatively, the amyloid protein may be immobilized, CSF added and proteins allowed to bind. All other unbound material is washed to waste. The bound associated proteins are then

10 directly analyzed or eluted and analyzed by any of the techniques known per se to determine their identity. Generally, one may prepare an antibody and immunoassay for such an associated protein. By comparing the amounts of these associated proteins in Alzheimer's patients CSF and normal CSF, one has a suitable diagnostic. Likewise for other body fluids, serum, urine, plasma, etc. which may have measurable quantities of the same protein and be diagnostic.

15 In any one sample source, the goal is to remove the most abundant proteins so that the effective concentration of the less abundant proteins is enhanced. Various protein separation and detection may be used before or more preferably after the subtraction technique of the present invention.

In the case of animal serum samples and particularly human serum samples, some of the

20 more abundant proteins are immunoglobulins, albumin, transferrin, haptoglobin, α -1-antitrypsin, hemopexin, α -acid glycoprotein, myosin, transthyretin, α -1-antichymotrypsin, apolipoprotein AI, α -2-macroglobulin, fibrinogen and prealbumin. A similar profile exists for cerebral spinal fluid. For urine samples, albumin and alpha acid glycoprotein are the most abundant proteins. For tissue samples, contamination by blood and serum proteins is common and thus albumin, hemoglobin

25 and any other serum protein mentioned above are contaminants for removal. Thus, several proteins can be removed. That would represent subtraction of at least about 85% of the total proteins. However, the number of proteins that can be removed is not limited as different matrices can be made to bind to the individual proteins and used to subtract those proteins from a sample. Thus, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 or any number in between and even more proteins

30 can be removed to yield samples that can be concentrated to contain discernible amounts of proteins that generally cannot be resolved.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

- In other samples, perhaps only a few highly abundant or highly interfering proteins may desirably be removed. Put in another way, it is desirable to remove at least 40% of the protein of a sample in the practice of the instant invention. Preferably, at least 50% of the proteins can be removed. By increasing the number of particular matrices used, more than 50%, more than 60%,
5 more than 70%, 75% or more, more than 80% and even more than 90% of the proteins found in a sample can be removed prior to further analysis. In one example below, the original serum protein concentration was 88 mg/ml. After passage through the column, 74 mg/ml was removed and the flow-through effluent, after concentration, contained only 1.4 mg/100 microliter aliquot. Theoretically, the amount of removal is limited only by the abundance of various ligands in the
10 samples and the number of corresponding receptors used to remove them. Representative percentages can be seen from Table 1 above, which will differ with different sample sources. A list of most common proteins or interfering proteins for other samples may likewise be determined (if not already listed in the public literature) and from these one can choose appropriate antibodies to use.
- 15 The particular proteins to be removed from any one sample are discretionary based on the abundant proteins found in the sample. Different samples can have nearly the same or different abundant proteins that are to be removed. In plant samples, ribulose biphosphate oxygenase/carboxylase (Rubisco) is generally one of the more abundant proteins in many plant leaves.
- 20 For a sample where it is unknown which proteins are abundant proteins, one may first do a preliminary separation and analysis to determine the most abundant proteins. Antibodies to these proteins are then generated and used to remove the abundant proteins. The process may be repeated to obtain the desired removal.
- 25 The use of such reusable matrices for removing abundant proteins enables the identification and resolution of less abundant proteins in a sample in a reproducible and high throughput fashion. Reproducibility enables comparisons between and among samples. It is preferable to run every sample in a batch or experiment through the same column(s) to control for any variation in immunosubtraction.
- 30 Many of the methods and reagents of the instant invention are amenable to automation, further enhancing throughput and reproducibility. The separation technology currently available can be automated, such as commercially available chromatography columns and stations, such as the INTEGRAL and BIOVISION workstations distributed by Applied Biosystems. Such

WO 02/055654

PCT/US02/00060

workstations enable setting up a plurality of columns in series wherein the various columns can be eluted with different buffers. Moreover, in the case of 2-DGE, many of those procedures also are amenable to or are automated. For example, see applicant's previous patent, Anderson et al, U.S. Patent 5,993,627. The result is a highly reproducible system that yields results in a very timely fashion.

By "abundant" is meant those proteins that are more plentiful in a sample, based on, for example, actual relative amounts of the various proteins in the sample. Abundance also can be revealed as a protein spot that stains quickly and heavily on a 2-D gel. A measure of abundance is to ascertain a relative measure, for example, as compared to the total amount of protein. A densitometric scan of a stained gel can provide such a measure. A 2-D gel containing separated, stained proteins is obtained and scanned in a densitometer. The densitometer then will calculate the total amount of stained proteins on the gel and the relative percentage of any one protein relative to the total. Using such a calculation, an abundant protein is one that represents at least 1% of the total protein in a sample.

"Protein" as used herein is any polymer comprising amino acids irrespective of function. The protein may be altered by having other chemical moieties contained therein such as phosphates, sugars and other organic groups. Thus, a dipeptide containing two amino acids, wherein the dipeptide has no known function, is for the purposes of the instant application, a protein. Another term for protein is polypeptide. The protein can be obtained from an animal source, a microbial source, and environmental source or a plant source.

The present invention may be used for a number of diverse applications such as co-purification of multiple compounds or the preparation of compositions where specific defined amounts of plural substances are desired. In this embodiment, the solid phase contains multiple receptors that adsorb the corresponding ligands from a solution in a molar ratio defined by the molar ratio of receptors present. For example, bacterial fermentation produces mixed proteases and lipases for use in laundry detergent. An adsorbent having receptors for each protease and each lipase is a desired ratio is added to the bacterial ferment or lysate. The adsorbent is recovered by sedimentation, filtration, magnetic force (for magnetic beads), etc. and the desired proteases and lipases are eluted and recovered. Other uses include proteases for making baby formula and other protein hydrolysates, starch hydrolysis enzymes, flavorings and fragrances or enzymes for making them.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

The invention now having been described thoroughly, various aspects of the invention are provided in the non-limiting Examples hereinbelow.

DEMONSTRATING THE CAPABILITIES OF THE TECHNOLOGY

5 The present invention describes a procedure that combines a novel high-throughput immunoaffinity chromatography-based technology and successive quantitative protein sample analysis by 2-dimensional electrophoresis of samples that had been subjected to multi-component immunoaffinity chromatographic protein subtraction. While individual aspects of the described immunoaffinity chromatography methodology and its application in combination
10 with 2-dimensional electrophoresis have been reported, no application is known and published, that (i) describes individual immunoaffinity matrix generation methods in simple two-step chromatographic procedures, that (ii) generates separate chromatographic matrix materials for each immunoaffinity component which may be used in any proportion desired, that (iii) succeeds in the generation of reproducible multi-component "pooled" chromatographic
15 matrices, that (iiii) demonstrates the extensive recyclability (> 300-fold) of multi-component chromatographic matrices, that (iiiii) is a high-throughput automated procedure (throughput of > 50 samples a day), and that (iiiii) allows accurate quantitation of pure proteins after the chromatographic sample has undergone 2-dimensional electrophoretic separation. Furthermore, to succeed in obtaining high-throughput, a chromatographic matrix was chosen to allow high
20 flow rates, efficient binding, and fast regeneration of the matrix. Perfusion chromatography is ideal for high sample throughput made possible by the high surface-to-volume ratio of highly porous beads. A manufacturer of such perfusion chromatography matrices ("POROS" beads) is Applied Biosystems Inc., (Framingham, Mass.).

The technology described here is applied to, biological samples such as, but not
25 restricted to, fluid samples from organisms or fluids derived from parts or the whole organism. It is particularly applicable for analysis of proteins in these samples, because it allows the quantitation of at least 50% more proteins from the fluids without substantially losing sample throughput. In addition, there is flexibility to convert the chromatographic separation procedure using immunoaffinity with another affinity or other chromatography procedure, suitable for a
30 specific type of sample that generates two or more fractions for each sample. A method for serum protein fractionation was exemplified that combines the immunoaffinity with wheat germ agglutinin (lectin) affinity chromatography.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

PREPARATIVE EXAMPLE A: GENERATION OF INDIVIDUAL CHROMATOGRAPHIC IMMUNOAFFINITY MATRICES

5 Unlike previously published methods for immunoaffinity chromatography, the following described techniques yield very high purity of antibodies and very high specificity of the immunoaffinity chromatographic matrices containing them.

Affinity chromatography matrices were generated using a POROS matrix that is used for perfusion chromatography; derivatives of this matrix were acquired from Applied Biosystems. Size exclusion chromatography columns (SEC) were from Bio-Rad. Antisera were acquired
10 from many different companies and the titers determined to select antisera with the highest concentrations of active pure antibody.

POROS-AL is a pre-activated (aldehyde-function) matrix that was used to immobilize proteins covalently. For all proteins to be removed from a given body fluid sample, a protein affinity matrix was generated as the "selecting" reagent for pure specific antibodies from complex
15 antisera. The reagents were (a) pure protein either commercially available or additionally purified and (b) the POROS-AL matrix. The protein affinity matrix was generated in a batch procedure. Thus, as many individual protein-derivatized affinity matrices were synthesized as there were proteins to be subtracted from a given sample.

POROS-G 20 and POROS-A 20 are matrices that are already immobilized with a
20 specific protein. The proteins are protein G and protein A, respectively. These two proteins have an extremely high affinity for Fc fragments of antibodies and are thus ideally suited to immobilize antibodies in a site-oriented manner. The considerable advantages of protein A and protein G readily coupled to a matrix are (a) the stabilization of antibodies in an immobilized state, (b) the correct orientation of antibodies with all Fab fragments available for interaction
25 with the corresponding antigen and (c) a very efficient covalent coupling step that does not interfere with the structure of the antibody molecule.

Figure 1 depicts a chromatographic system and process used for purifying antibodies from antisera and immobilizing them on an affinity column. The system used column switching valves, V1, V2 and V3 for multiple columns. Column one is an antigenic protein column
30 (packed from the abovementioned activated POROS-AL matrix. Column two is a SEC column that neutralizes the acetic acid-eluted antibodies, partially removes salts and sieves the molecules through the pores before affinity-trapping them on the POROS A or G column. A

WO 02/055654

PCT/US02/00060

series of the antiserum-loading and antibody-trapping one-step chromatographies were carried out until the POROS A or G column was saturated with antibody. The saturation process can be monitored by measuring absorbance at UV280 directly through the detectors D1, D2 and D3 of the chromatography station.

- 5 Once an antibody column is obtained, the immobilized antibody is crosslinked to the protein A or G and thus covalently attached to the matrix using 50% dimethyl pimidylylate (DMP) and 50% dimethyl suberimidate (DMS) as the bifunctional crosslinker following conventional procedures for 100% DMP crosslinking. DMP/DMS works effectively in an "on-column-crosslinking" procedure due to its rapid reaction with amine groups and the coupling of
- 10 protein A or G and the antibody via iminoamide bonds. Under acidic and neutral pH conditions, the chemical bonds are very stable and allow recyclable use of the antibody column for protein antigen binding and elution.

PREPARATIVE EXAMPLE B: POOLING OF MATRICES TO MULTI-COMPONENT

15 CHROMATOGRAPHIC SYSTEMS

The above-described procedure can be exercised for numerous protein antigens and thus numerous immunospecific antibody-derivatized matrices can be generated. The presently described invention has flexibility of use of such antibody-derivatized immunoaffinity chromatography matrices. Individual matrices are generated and defined volumes or weights

20 can be packed into columns.

- The column capacity for antigen binding can be evaluated by individually loading antigen stepwise onto the column until a saturation peak is observed. Thus, the maximal amount of the antigen that can be trapped on the column can be calculated individually for every antibody-derivatized matrix. Pooling the matrices into multi-component immunoaffinity
- 25 systems with defined capacities for multiple protein binding allows one to generate a specific chromatographic column for a specific purpose. The following table is an example how such entities are useful. Serum contains a few very abundant proteins. In order to be able to detect lower abundance proteins in a "downstream" procedure such as 2-DGE, it is of interest to subtract the abundant ones. With the above-described multi-component chromatography
- 30 column, such proteins can be specifically removed within minutes.

Table 1 below has a list of proteins for which a multi-component antibody affinity matrix (MCAAM) was generated and used to generate a serum sample that consequently

WO 02/055654

PCT/US02/00060

contains a protein distribution completely different for these proteins and less abundant proteins which are not otherwise detectable, and becomes visible in the silver-stained gel protein spot patterns in Figure 3. However, depending on the nature of the proteins to be subtracted, it is not always desirable to pool all matrices into one column body. For many sample applications, at least two separate column bodies are preferred for the reason that proteins may elute from their cognate immobilized antibodies under different specific elution conditions as detailed below.

TABLE 1

Serum protein Protein ID according to "plasma proteins", Putnam volume IV, 1984	Relative amount of protein in total serum	Relative amount of affinity matrix in MCAAM
Albumin	50	48
Immunoglobulin G	15	0*
Transferrin	3.1	4
Haptoglobin	6.8	7
Alpha 1 antitrypsin	3.5	5
Alpha 2 macroglobulin	3.0	10
Immunoglobulin A	3.3	5
Immunoglobulin M	1.9	3
Alpha 1 acid glycoprotein	1.2	2
Hemopexin	1.1	3
Alpha 2 HS glycoprotein	0.8	2
Alpha 1 antichymotrypsin	0.5	2
Transthyretin	0.3	1
Apo A1 lipoprotein	3.0	8

No immunoaffinity matrix had to be added in for immunoglobulin G, because it is subtracted due to sufficient residual binding by the underivatized protein G and A. Where the residual binding is insufficient, and anti-IgG affinity matrix may be used.

See Figure 3 where three specific examples of successful subtraction of serum proteins are shown. Arrows 1-3 point out the protein location in both gels. Thus in gel B, arrow 1 indicates albumin, 2 indicates transferring and 3 indicates haptoglobin chains. Arrows 4 in gel A indicate other major proteins subtracted from serum and do not or in very low amounts appear on gel B. In both gels, about 180 µg serum protein was loaded on IEF gels prior to the 2-D electrophoresis. Essentially no antibody was eluted either before the sample was added or upon elution of sample.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

PREPARATIVE EXAMPLE C: CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

The chromatographic separation of proteins in the present invention uses a chromatography station with column switching valves for at least two columns and separate elution of MCAAM column bound proteins wherein they have different characteristics in terms of their solubilities in elution buffers. Most proteins elute from their cognate antibodies under acid conditions (e.g. 5% acetic acid). Some proteins, however, are not soluble in acidic buffers and may require elution with a chaotropic salt/detergent mixture (2 M urea and 2% CHAPS), some hydrophobic proteins may require organic solvent (e.g. 30% acetonitrile) to elute from their cognate antibodies. Thus, in the abovementioned example of serum, alpha-2 macroglobulin and Apo-A1 lipoprotein elute more efficiently with the chaotropic salts and buffers containing 20% to 30% organic solvent buffer, respectively. Working with plasma, fibrinogen is more efficiently subtracted when a chaotropic salt buffer is applied for the elution from the immunoaffinity matrix. Figure 2 shows an example for the combination of the immunosubtraction chromatography system including column switching valves and flow path.

The buffers used were:

- a. acid elution buffer: 5% acetic acid, 500 mM NaCl
- b. chaotropic salt buffer: 2 M urea, 2% CHAPS, 7% acetic acid
- c. organic solvent buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 30% acetonitrile

Alternatively, human fibrinogen may be removed by using *Aspergillus fumigatus* conidia as the receptor due to its binding to fragment D or by using the M protein on the surface of group A streptococci.

EXAMPLE D: COMBINATION OF IMMUNOAFFINITY WITH LECTIN-AFFINITY CHROMATOGRAPHY GENERATING TWO SETS OF PROTEIN SAMPLES FOR 2-DGE

In a different embodiment of the present invention, immunoaffinity chromatography was combined with wheat germ agglutinin (WGA) lectin affinity chromatography. Two fractions were generated. In the case of serum as a sample, highly glycosylated proteins, about 30% to 50% of the total protein, were bound by the WGA column and separately eluted with a 0.5 M solution of the sugar N-acetylglucosamine, whereas the second fraction consisted of protein unglycosylated or lacking of affinity for this lectin and thus not bound by the column. The gels in Figure 4 visualize the set of proteins from serum unbound (a) or bound and eluted from the lectin affinity column with the sugar (b). This fractionation has the purpose to further enrich

WO 02/055654

PCT/US02/00060

proteins in either of the two fractions by increasing the protein loading amount for 2-D gel electrophoresis. Using the lectin affinity fractionation procedure, the gain is a nearly two-fold enrichment of unabstracted serum proteins in two different fractions and a further "pattern simplification" that allows easier analysis upon post-2-DGE gel image acquisition.

5 In Figure 4, subtraction of serum proteins was done in the first chromatographic step and remaining proteins were subjected to a streptavidin-derivitized POROS matrix that was further immobilized with biotinylated WGA. In gel A proteins originating from the flowthrough fraction of the column, in gel B proteins from the lectin-bound and 0.5 M N-acetylglucosamine-eluted fraction were analyzed by 2-DGE. In both gels, about 180 µg serum protein was loaded
10 on IEF gels prior to the 2D-electrophoresis.

EXAMPLE E: SAMPLE PREPARATION FOR 2-DGE AND ANALYSIS

Samples generated by the described immunoaffinity chromatography were diluted during the subtraction process. 3 to 5 mL of subtraction serum protein elutant were collected
15 and concentrated in polysulfone membrane concentration units (Ultrafree 4, from Millipore), equilibrated in 25 mM ammonium bicarbonate, lyophilized, and resolubilized in 9 M urea / 2% CHAPS / 60 mM DTT buffer a buffer generally used for isoelectric focusing of the proteins in the sample during the first dimension separation of 2-DGE.

20 Example 1

Matrices carrying antibody that binds six abundant serum proteins were produced. The six proteins were albumin, haptoglobin, transferrin, α -1-antitrysin, α ₂-macroglobulin and apolipoprotein AL. These proteins were commercially purchased and individually loaded on and bound to a POROS AL matrix. The matrix was packed into a column and commercial polyclonal
25 antibody to each protein was added. The unbound material was discarded. Antibody was eluted, neutralized, desalted and loaded onto a POROS protein A column by the methods mentioned above and as shown in Figure 1. The antibodies were crosslinked in place by the methods above. Each matrix carrying one type of antibody was tested for binding capacity using known techniques, including exposing graded amounts of a solution of known concentration to the matrix and then
30 determining when no further protein is bound by the matrix. That can be ascertained using known techniques, such as using a UV monitor capable of ascertaining absorbance of the flow through at 280 nm. The binding capacity for each matrix was determined. Then all six types of matrix were

WO 02/055654

PCT/US02/00060

mixed in a ratio based on binding capacity of each, which was proportional to the relative amounts of each protein in serum, and loaded into a column.

Serum samples were passed over the column. Sample volumes generally were less than 100 μ L in volume. The proteins were washed through with neutral buffer. The eluate was obtained, concentrated and then the proteins therein were separated by 2-DGE. The gels were stained with Coomassie blue and silver stains to reveal the less abundant proteins of serum.

After about ten serum samples loading and elution repeats, a decrease in α_2 -macroglobulin subtraction was noted. After about 25 serum samples loading and elution repeats, a decline in apolipoprotein AI subtraction also was observed. It is hypothesized that, the acidic aqueous elution buffer (0.8 M acetic acid /0.15 M NaCl) to detach and/or to solubilize a α_2 -macroglobulin and apolipoprotein A₁ was insufficient or destabilizing. The two proteins appeared to remain associated with the antibody matrix or may have precipitated after release from the antibody on the matrix. The capacity of the column to completely subtract albumin, haptoglobin, transferrin and α -1-antitrypsin was close to the amounts of proteins found in 62.5 μ L serum. A two column system where anti- α_2 -macroglobulin and anti-apolipoprotein AI are present on a separate column with the following buffers were used. It was determined that α_2 -macroglobulin could be eluted from the matrix with 1.5 M ammonium thiocyanate and apolipoprotein AI with 30% acetonitrile in aqueous 0.15 M NaCl.

20

Example 2

Post-fractionation protein samples in 500 mM ammonium bicarbonate (AmBic) were concentrated over ultrafiltration membranes. The AmBic concentration was diluted to 25 mM AmBi, the sample was transferred into a lyophilization vial, 6 μ L of 2 M sucrose were added, and the sample was lyophilized for at least 48 h. An hour before applying the sample to the isoelectric focusing unit tube gel, the sample was resolubilized in Pink Mix (9M urea, 2% CHAPS (a commercially available buffer), 0.5% DTT and 2% ampholytes (pH 8-10.5)) and checked for complete solubility. Those samples were used in 2-DG electrophoresis following the procedure of Anderson et al, Electrophoresis, 12: 907-930 (1991) .

30

Example 3

Neuraminidase is efficient in collapsing some protein (glycosylation) trains. A small amount of neuraminidase is sufficient to reduce spot complexity and to improve the intensity of

WO 02/055654

PCT/US02/00060

specific spots. About 25 mUnits of neuraminidase (Prozyme, sialidase A) were sufficient to eliminate the most obvious glycosylation trains in the equivalent of one 2-D serum protein loading aliquot following a 90 minute digest. Deglycosylation should be complete to enable useful protein spot comparisons. Because Prozyme enzyme is recombinant, contaminating proteases are absent.

5

Example 4

Resolution of plasma proteins is worse in plasma than proteins are in tissues primarily because of the abundant fibrinogen chains in the gels. A polyclonal anti-fibrinogen matrix was generated by the method of Example 1. Binding specificity and capacity were satisfactory to enable subtractions of fibrinogen.

10

Example 5

A column carrying plural antibodies to subtract abundant proteins found in serum was used with cerebrospinal fluid. The major difference from serum is the significantly higher loading volume for a chromatographic separation (1.2 mL as compared to 62 μ L for serum) because of the lower protein amounts in cerebrospinal fluid. Even though the column was not optimized for cerebrospinal fluid, it preformed well. A comparison by 2-DE of CSF sample proteins with and without the immunosubtraction procedure is shown in Figure 5. Many low abundance protein spots are visible in the immunosubtracted sample 2-DG, which are not observable in the whole sample 2-DG.

15
20**Example 6**

Protein subtraction columns were prepared to remove common proteins that comprise most of the protein in the sample. Serum was obtained from about 80 pairs of monozygotic twins. The serum samples contain about 70 mg/ml of protein. Lipids were found not to interfere with the chromatographic separations. Twenty-five to fifty microliter serum samples were used.

25

For some samples, two columns were used. The first column contained POROS beads to which was bound antibodies directed to albumin, transferrin and haptoglobin (ATH column). The antibodies were bound to the matrix by protein A, protein G or a mixture of the two followed by crosslinking as above. The second column contained immobilized wheat germ agglutinin.

30

WO 02/055654

PCT/US02/00060

For other samples, the first column contained antibody specific for α_1 -antitrypsin, albumin, transferrin and haptoglobin (AATH column). The second column comprised immobilized protein A. All antibodies were crosslinked to the protein A or protein G using the method of Schneider et al., J. Biol. Chem. 257:10766-10769, 1982. Approximately 4 ml of affinity resin were used. Generally, the columns removed all of the selected components.

As indicated above, about 1.7 to 3.4 mg of protein was added to the first column. In the case of the ATH column, unbound protein was eluted using 0.5 M ammonium bicarbonate buffer and then transferred to the second column. A first unbound fraction was eluted with the 0.5 M ammonium bicarbonate buffer and then a second fraction was eluted using 0.5 M N-acetylglucosamine followed by 0.5 M ammonium bicarbonate. UV readings at 280 nm were monitored to control for reproducibility and column performance. Proteins retained on the column were removed from the ATH column using a pH 2.5 acetic acid buffer to regenerate the column.

About half of the serum protein was removed from the sample by this procedure. The first sample contains glycosylated proteins. The second sample that was passed over the lectin column contains non-glycosylated proteins. The final protein concentrations ranged between 12 and 22 mg/ml in 0.5 M ammonium bicarbonate buffer. The fractions were concentrated, the buffer was exchanged and then the sample was lyophilized.

The samples were resolubilized in a buffer comprising 9 M urea, 2% CHAPS (a commercially available buffer), 0.5% DTT and 2% ampholytes (pH 8-10.5) and 5-20 μ l samples were loaded onto 2-D gels. The sample proteins were separated in an ISO-DALT system as known in the art and per example 2 above. The resulting Coomassie stained gels were scanned and digitized in red light at 133 μ m resolution and the images were processed using the Kepler system as known in the art. The patterns of proteins found on each gel were almost completely different from each other.

The gels were destained then silver stained. Images were taken at 30-second intervals and the development was stopped using 88 g tris in 2 L of deionized water and 44 ml of glacial acetic acid in accordance with the methods described in WO 01/16884.

The samples first run over the AATH column were treated in a similar fashion. The gels were compared to ascertain correlation of proteins with particular disease states, such as obesity, diabetes, osteoporosis, osteoarthritis and hypertension between the twin pairs.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

Example 7

The method of Example 1 was repeated except for using antibody matrixes to 12 and 14 antigens as given in Table I. A comparison of 2-DG of sample proteins with and without the immunosubtraction procedure is shown in Figure 4. Many low abundance protein spots are visible in the immunosubtracted sample 2-DG, which are not observable in the whole sample 2-DG.

Example 8

The method of Example 1 was repeated except for using antibody matrixes to serum and blood proteins. A comparison by 2-DE of kidney cortex tissue protein fraction with and without the immunosubtraction procedure is shown in Figure 6. Many low abundance protein spots are visible in the immunosubtracted sample 2-DG, which are not observable in the whole sample 2-DG.

Example 9

The method of Example 1 was repeated except for using antibody matrixes to albumin and alpha acid glycoprotein. A comparison by 2-DE of urine sample proteins with and without the immunosubtraction procedure is shown in Figure 7. Many low abundance protein spots are visible in the immunosubtracted sample 2-DG, which are not observable in the whole sample 2-DG.

Example 10

The method of Example 1 was approximately repeated except for using a column having antibodies to four high abundance proteins in serum. The serum sample was applied and the unbound fraction discarded. The bound proteins were eluted by acidic buffer pH 2.5, recovered, neutralized by Tris-HCl buffer at pH 9.0, prepared and separated by the standard 2-dimensional electrophoresis methods taught in the examples above. The result is Figure 8, which shows protein spots for the four proteins expected and several other protein spots that represent proteins and peptides, which were bound to these four proteins in the serum sample.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

Example 11

Associated proteins, protein-protein interacting and other proteins bound to certain select proteins are determined as follows. The two-dimensional gel of EXAMPLE 10 is scanned and all spots not clearly belonging to the four immunosubtracted proteins are excised from the gel, digested with trypsin and prepared for mass spectrometry according to standard methods of protein analysis. All proteins identified are considered associated proteins to at least one of the four proteins bound by antibodies in the matrix.

Confirmation is determined by using the immobilized protein column of Example 1, passing a serum sample through it and eluting the unbound proteins followed by acid stripping of the bound proteins and repeating the 2-DE and mass spectrometry separation and analysis.

It will be understood that various modifications may be made to the embodiments disclosed herein. Therefore, the above description should not be construed as limiting, but merely as exemplifications of preferred embodiments. Those skilled in the art will envision other modifications within the scope and spirit of the claims appended hereto.

All patents and references cited herein are explicitly incorporated by reference in their entirety.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

We claim:

1. An affinity binding composition comprising;
a first and second solid phase matrix contacting each other;
5 a first receptor immobilized on said first solid phase matrix, capable of specific binding to a first ligand but not a second ligand; and
a second receptor immobilized on said second solid phase matrix, capable of specific binding to the second ligand but not the first ligand.
- 10 2. The affinity binding composition of claim 1 further comprising;
a third receptor immobilized on a third solid phase matrix, capable of specific binding to a third ligand but not the first ligand or the second ligand.
3. The affinity binding composition of claim 2 further comprising;
15 a fourth receptor immobilized on a fourth solid phase matrix, capable of specific binding to a fourth ligand but not the first ligand, the second ligand or the third ligand.
4. The affinity binding composition of claim 3 further comprising;
a fifth receptor immobilized on a fifth solid phase matrix, capable of specific
20 binding to a fifth ligand but not the first ligand, the second ligand, the third ligand or the fourth ligand.
5. The affinity binding composition of claim 1 wherein the ligands are proteins.
- 25 6. The affinity binding composition of claim 1 wherein the receptors are antibodies.
7. The affinity binding composition of claim 1 wherein the matrixes are porous.
8. An affinity column comprising; a chamber having a fluid inlet and a fluid outlet and
30 within the chamber the affinity binding composition of claim 1 such that fluid flowing from the inlet to the outlet passes by or through the affinity binding composition.

WO 02/055654

PCT/US02/00060

9. An affinity column comprising; a chamber having a fluid inlet and a fluid outlet and within the chamber the affinity binding composition of claim 2 such that fluid flowing from the inlet to the outlet passes by or through the affinity binding composition.
- 5 10. An affinity column comprising; a chamber having a fluid inlet and a fluid outlet and within the chamber the affinity binding composition of claim 6 such that fluid flowing from the inlet to the outlet passes by or through the affinity binding composition.
11. An affinity column of claim 10 wherein at least one solid phase matrix having a receptor is selectively removable from at least one other solid phase matrix having a different receptor.
12. An affinity column comprising; a chamber having a fluid inlet and a fluid outlet and within the chamber the affinity binding composition of claim 7 such that fluid flowing from the inlet to the outlet passes by or through the affinity binding composition.
- 15 13. An apparatus for affinity separation comprising;
a first affinity column having a first fluid inlet, a first fluid outlet and a chamber containing a first receptor immobilized on a first solid phase matrix, capable of specific binding to a first ligand but not a second ligand,
20 a second affinity column having a second fluid inlet, a second fluid outlet and a chamber containing a second receptor immobilized on a second solid phase matrix, capable of specific binding to a second ligand but not a first ligand, and
a conduit connecting the outlet from the first fluid outlet to the second fluid inlet
- 25 14. A method for preparing a receptor matrix comprising;
contacting a receptor containing liquid with a ligand,
separating the receptor bound to the ligand from other components in the receptor containing liquid,
30 eluting the receptor from being bound to the ligand to produce purified receptor,
and
immobilizing the purified receptor on a matrix to form the receptor matrix

WO 02/055654

PCT/US02/00060

15. The method of claim 14 further comprising:
neutralizing or removing a reagent that contributed to said eluting before
immobilizing the purified receptor, or both, or altering a physical condition.
- 5 16. The method of claim 15 wherein the reagent is removed by desalting.
17. The method of claim 14 wherein the ligand is immobilized.
- 10 18. The method of claim 14 further comprising repeating the method with a second
receptor and a second ligand to prepare a second receptor matrix.
19. The method of claim 18 further comprising mixing the receptor matrix with the
second receptor matrix.
- 15 20. The method of claim 18 further comprising repeating the method with a third
receptor and a third ligand to prepare a third receptor matrix.
21. The method of claim 14 wherein the receptor is an antibody and the ligand is a
20 protein.
22. An apparatus for preparing a receptor matrix comprising;
a first column having a fluid inlet, a fluid outlet and containing an immobilized
ligand;
25 a second column having a fluid inlet, a fluid outlet and containing matrix for
immobilizing receptor; and
a fluid connection between the outlet of the first column and the inlet of the second
column.
- 30 23. The apparatus of claim 22 further comprising;
an intermediate column having a fluid inlet, a fluid outlet and containing a
neutralizer or remover of a reagent or conditions causing dissociation of receptor-ligand binding;

WO 02/055654

PCT/US02/00060

wherein the first column fluid outlet has a fluid connection to the inlet of the intermediate column and the outlet of the intermediate column has a fluid connection to the inlet of the second column.

- 5 24. A method for preparing a receptor matrix comprising;
mixing a first receptor matrix with a second receptor matrix,
wherein the first receptor binds a different ligand from the second receptor.
25. A method for forming a covalent bond between two proteins comprising; reacting a
10 plurality of chemically different crosslinking agents simultaneous with both proteins,
wherein both crosslinking agents by themselves alone are capable of forming
covalent bond between the two proteins.
26. The method of claim 25 wherein the two proteins are bound to each other by non-
15 covalent bonds before reacting with the crosslinking agents.
27. A method for separating ligands from a sample for analysis of remaining ligands
comprising;
20 removing at least two specific predefined ligands from the sample, and
analyzing the remaining ligands in the sample.
28. The method of claim 27 wherein at least three ligands are removed.
29. The method of claim 28 wherein at least four ligands are removed.
- 25 30. The method of claim 27 wherein the ligands are proteins.
31. The method of claim 27 wherein the ligands are removed by binding to specific
predefined receptors wherein the receptors are in insoluble form or is insolubilized after binding to
30 the ligands

WO 02/055654

PCT/US02/00060

32. The method of claim 27 wherein at least 50% by weight of all ligands in the sample are removed.
32. The method of claim 32 wherein at least 75% by weight of all ligands in the sample are removed.
33. The method of claim 31 further comprising, removing the bound ligands from the receptors.
34. The method of claim 33 further comprising, repeating the process by reusing the receptors with a new sample.
35. The method of claim 34 wherein the process is repeated 20 times with the same receptors.
36. The method of claim 35 wherein the process is repeated 50 times with the same receptors.
37. The method of claim 36 wherein the process is repeated 200 times with the same receptors.
38. The method of claim 27 wherein the remaining ligands are analyzed by separation and quantification of the remaining ligands.
39. The method of claim 31 wherein at least one immobilized receptor is selectively removable from at least one other immobilized receptor.
40. The method of claim 31 wherein one division of receptor is selectively removable from another division of receptor.
41. The method of claim 31 wherein at least two division of receptors are immobilized in at least two predefined locations,

WO 02/055654

PCT/US02/00060

wherein at least one receptor is located in a different predefined location from another receptor, and
wherein the sample is sequentially passed through both predefined locations.

5 42. The method of claim 27 wherein essentially all of the two specific predefined ligands are removed from the sample.

43. A two dimensional electrophoresis gel comprising isolated proteins from a protein containing sample, wherein at least two predetermined proteins are substantially not present in the
10 gel, wherein the protein containing sample contained said predetermined proteins and other proteins in said sample are present in the two-dimensional electrophoresis gel.

44. A two dimensional electrophoresis gel comprising isolated proteins from a protein containing sample, wherein at least two predetermined proteins and proteins bound thereto are
15 substantially the only proteins present in the gel, wherein the protein containing sample contained said predetermined proteins and said proteins bound thereto in said sample.

45. A two dimensional electrophoresis gel of claim 44 wherein substantially only said proteins bound thereto are present in the two dimensional electrophoresis gel.
20

46. The modified ligand-containing sample produced by the process of claim 27.

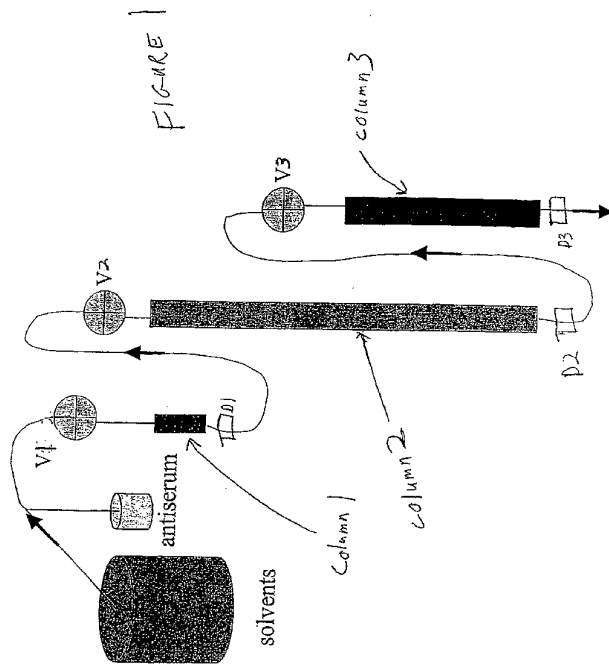
47. A method for detecting associated proteins naturally bound to other proteins in a sample comprising,
25 contacting the sample with an immobilized receptor to one or more proteins under conditions allowing binding between said receptor and said protein and associated proteins naturally bound thereto,
removing unbound proteins from said immobilized receptor, and
detecting the presence of said associated proteins naturally bound.
30

48. The method of claim 47 further comprising eluting said associated proteins naturally bound from said receptor and said proteins.

WO 02/055654

1/9

PCT/US02/00060



WO 02/055654

2/9

PCT/US02/00060

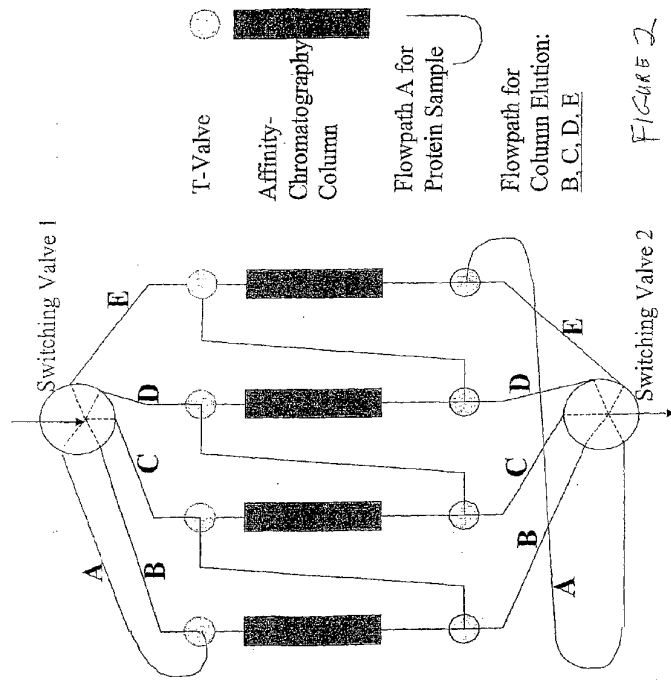


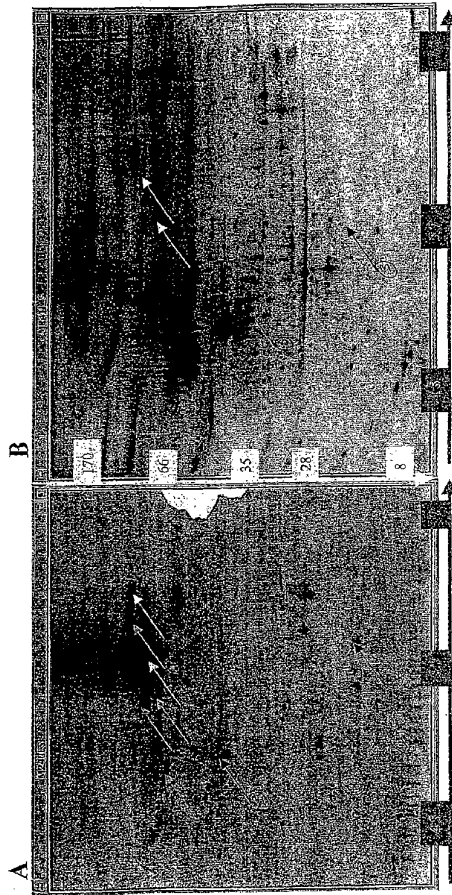
FIGURE 2

WO 02/055654

3/9

PCT/US02/00060

FIGURE 3

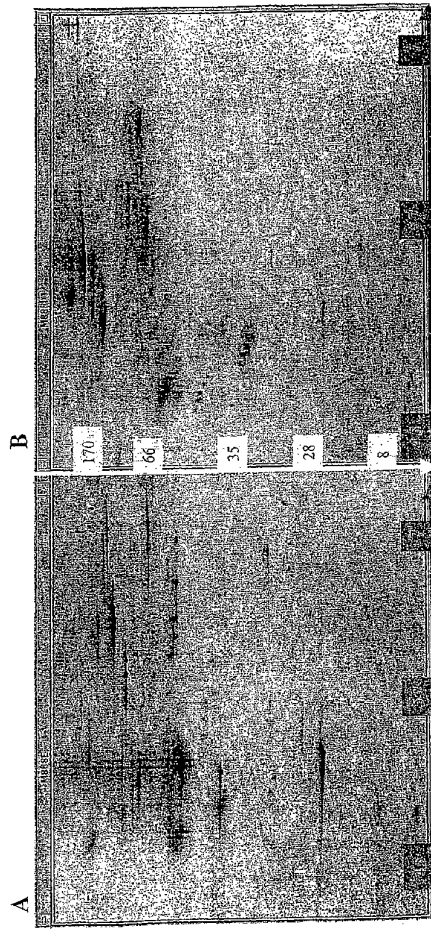


WO 02/055654

4/9

PCT/US02/00060

FIGURE 4



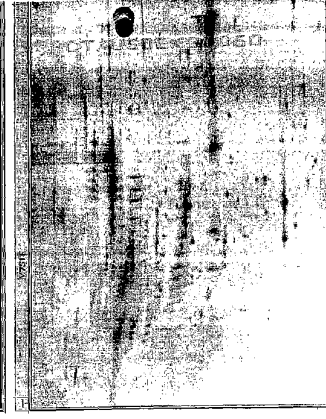
WO 02/055654

5/9

PCT/US02/00060



1

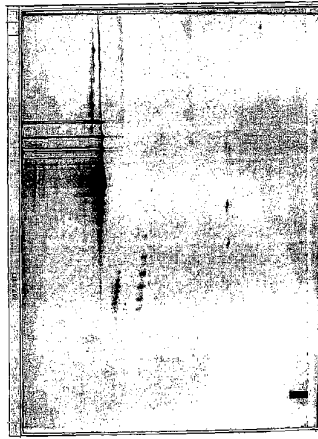


3

Large Scale
BIOLOGY

Immunoaffinity Subtraction
of Plasma Proteins from a
Cerebrospinal Fluid Sample

Figure 5



2

WO 02/055654

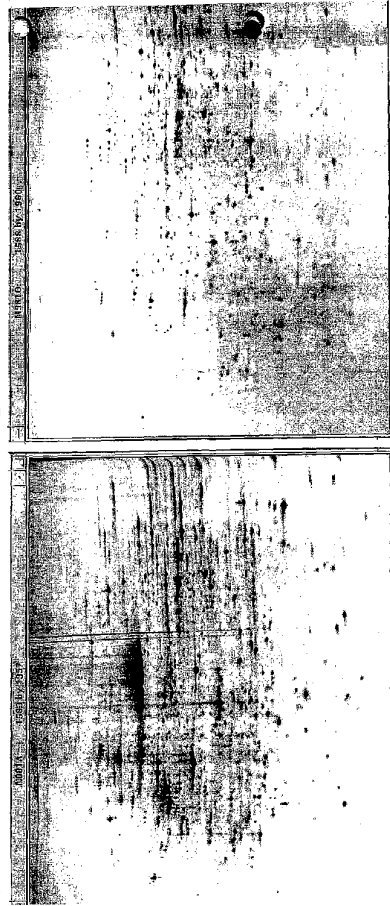
PCT/US02/00060

Immunofluorescence Subtraction of Plasma Proteins from
a Protein Fraction of Kidney Cortex Tissue

Figure 6

2

1



Large Scale
BIOLOGY

• • • • •

WO 02/055654

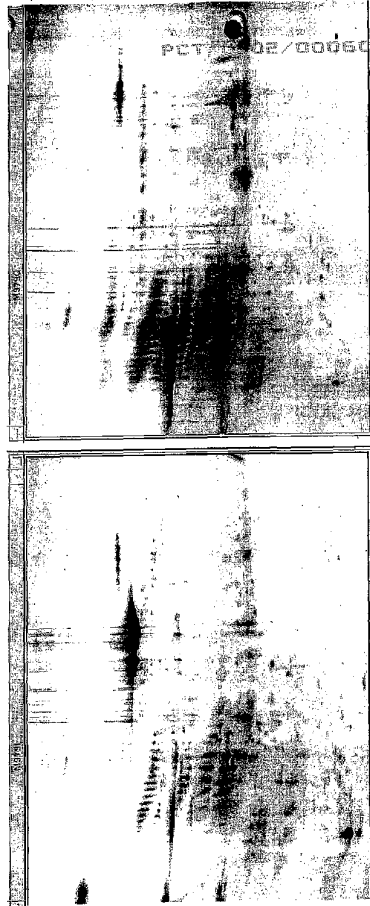
PCT/US02/00060

Immunofluorescence Subtraction of
Albumin and α -Acid Glycoprotein from Human Urine

Figure 7

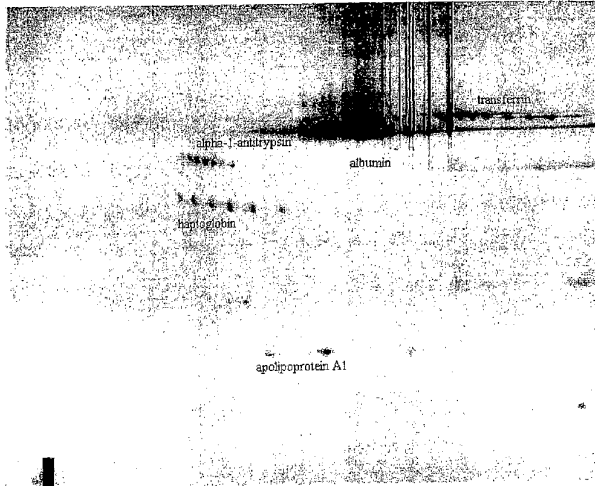
1

2



Large Scale
BIOLOGY

Figure 8



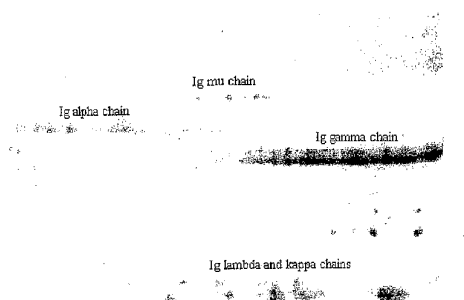
silver-stained 2-DE gel with 4 abundant serum protein that were subtracted by IAC (M751 D)

WO 02/055654

9/9

PCT/US02/00060

Figure 9



silver-stained 2-DE gel with immunoglobulin trains that were subtracted by IAC
(M782 K)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 July 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/055654 A3(51) International Patent Classification: C12M 1/34,
3/00, C12N 1/00, 11/00, C12Q 1/00, G01N 21/00, 33/00,
33/53, 33/543, 33/559, 33/561Leigh [US/US]; 1759 Willard Street, N.W., Washington,
DC 20009 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/00060

(74) Agents: NAKAMURA, Dean et al.; Roylance, Abrams,
Berdo & Goodman, L.L.P., 1300 19th Street, N.W., Suite
600, Washington, DC 20036 (US).

(22) International Filing Date: 9 January 2002 (09.01.2002)

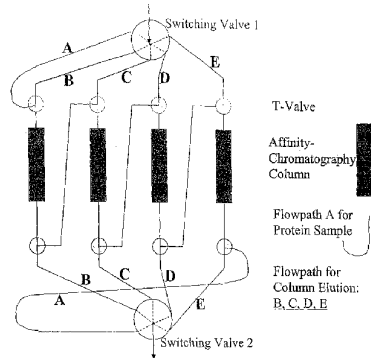
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/260,217 9 January 2001 (09.01.2001) US
09/977,358 16 October 2001 (16.10.2001) US(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AU, AT
(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE
(utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE,
ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK
(utility model), SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) Applicant (for all designated States except US): LARGE
SCALE PROTEOMICS CORPORATION [US/US];
20451 Goldenrod Lane, Germantown, MD 20876 (US).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).(71) Applicant and
(72) Inventor: PIEPER, Rembert [US/US]; 3020 Tilden
Street, N.W. #204, Washington, DC 20008 (US).(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): ANDERSON, N.

[Continued on next page]

(54) Title: IMMUNOSUBTRACTION METHOD FOR SAMPLE PREPARATION FOR 2-DIGE



(57) Abstract: Removal of abundant proteins from a sample enhances detection and resolution of less abundant proteins in the sample such as in two-dimensional gel electrophoresis. The removal is accomplished by immunosubtraction of several high abundance, interfering or contaminating proteins simultaneously.

WO 02/055654 A3

WO 02/055654 A3

Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(88) Date of publication of the international search report:
19 September 2002

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/00060																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12M 1/34, 3/00; C12N 1/00, 11/00; C12Q 1/00; G01N 21/00, 33/00, 33/53, 33/543, 33/559, 33/561 US CL : 422/68.1, 82.05, 82.07, 82.09; 435/4, 6, 7.9, 7.92, 2871.-288.9, 808; 436/164, 172, 514-516, 518, 815, 823 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. : 422/68.1, 82.05, 82.07, 82.09; 435/4, 6, 7.9, 7.92, 2871.-288.9, 808; 436/164, 172, 514-516, 518, 815, 823 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Derwent, STN Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, STN																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A,P</td> <td>WO 01/44269 A2 (LARGE SCALE PROTEOMICS CORPORATION) 21 June 2001 (21.06.2001), whole document.</td> <td>1-48</td> </tr> <tr> <td>A,P</td> <td>US 6,245,227 B1 (MOON et al) 12 June 2001 (12.06.2001), whole document.</td> <td>1-48</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 98/19271 A1 (MOSE LARSEN) 07 May 1998 (07.05.1998), whole document.</td> <td>1-48</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 5,993,627 A (ANDERSON et al) 30 November 1999 (30.11.1999), whole document.</td> <td>1-48</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 98/42736 A1 (PROTEOME SCIENCES PLC) 01 October 1998 (01.10.1998), whole document.</td> <td>1-48</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A,P	WO 01/44269 A2 (LARGE SCALE PROTEOMICS CORPORATION) 21 June 2001 (21.06.2001), whole document.	1-48	A,P	US 6,245,227 B1 (MOON et al) 12 June 2001 (12.06.2001), whole document.	1-48	A	WO 98/19271 A1 (MOSE LARSEN) 07 May 1998 (07.05.1998), whole document.	1-48	A	US 5,993,627 A (ANDERSON et al) 30 November 1999 (30.11.1999), whole document.	1-48	A	WO 98/42736 A1 (PROTEOME SCIENCES PLC) 01 October 1998 (01.10.1998), whole document.	1-48
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
A,P	WO 01/44269 A2 (LARGE SCALE PROTEOMICS CORPORATION) 21 June 2001 (21.06.2001), whole document.	1-48																		
A,P	US 6,245,227 B1 (MOON et al) 12 June 2001 (12.06.2001), whole document.	1-48																		
A	WO 98/19271 A1 (MOSE LARSEN) 07 May 1998 (07.05.1998), whole document.	1-48																		
A	US 5,993,627 A (ANDERSON et al) 30 November 1999 (30.11.1999), whole document.	1-48																		
A	WO 98/42736 A1 (PROTEOME SCIENCES PLC) 01 October 1998 (01.10.1998), whole document.	1-48																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Special categories of cited documents:</th> <th></th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention</td> <td></td> </tr> <tr> <td>* "E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> <td></td> </tr> <tr> <td>* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>* "Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> <td></td> </tr> <tr> <td>* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>* "A" document member of the same patent family</td> <td></td> </tr> <tr> <td>* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Special categories of cited documents:			* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention		* "E" earlier application or patent published on or after the international filing date	* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* "Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	* "A" document member of the same patent family		* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Special categories of cited documents:																				
* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention																			
* "E" earlier application or patent published on or after the international filing date	* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																			
* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* "Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																			
* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	* "A" document member of the same patent family																			
* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of actual completion of the international search 26 April 2002 (26.04.2002)		Date of mailing of the international search report 21 JUN 2002																		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3220		Authorized officer Kartie Padmanabhan Telephone No. 703-308-0196																		

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

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

(74)代理人 100076680

弁理士 溝部 孝彦

(74)代理人 100121061

弁理士 西山 清春

(72)発明者 ピーパー , レムバート

アメリカ合衆国ワシントン・ディー・シー・ 2 0 0 0 8 , ノースウエスト・ナンバー 2 0 4 , ティ
ルデン・ストリート・ 3 0 2 0

(72)発明者 アンダーソン , エヌ・レイ

アメリカ合衆国ワシントン・ディー・シー・ 2 0 0 0 9 , ノースウエスト , ウィラード・ストリー
ト・ 1 7 5 9

专利名称(译)	用于2-DGE的样品制备的免疫减法方法		
公开(公告)号	JP2004523747A	公开(公告)日	2004-08-05
申请号	JP2002556705	申请日	2002-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	大型企业蛋白质组学 撒尿每雷姆环		
申请(专利权)人(译)	大型企业蛋白质组学 ピーパー，雷姆伯特		
[标]发明人	ピーパーレムバート アンダーソンエヌレイ		
发明人	ピーパー，レムバート アンダーソン，エヌ・レイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/447 G01N30/02 G01N30/14 G01N30/46 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	G01N27/44773 G01N30/02 G01N30/14 G01N30/461 G01N30/466 G01N30/468 G01N33/54306 G01N33/54366 G01N33/6803 Y10S436/807 G01N27/447 B01D15/3804		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	古屋聡 清春西山		
优先权	60/260217 2001-01-09 US 09/977358 2001-10-16 US		
其他公开文献	JP2004523747A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

例如在二维凝胶电泳中从样品中去除丰富的蛋白质，可以改善对样品中较丰富的蛋白质的检测和分析。这种清除是通过同时免疫消耗几种极其丰富的干扰或污染蛋白质来实现的。[选择图]图2

