

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4829797号
(P4829797)

(45) 発行日 平成23年12月7日(2011.12.7)

(24) 登録日 平成23年9月22日(2011.9.22)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 5
	GO 1 N 27/26 3 0 1 A

請求項の数 50 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2006-548377 (P2006-548377)	(73) 特許権者	506233184
(86) (22) 出願日	平成17年1月6日(2005.1.6)		バドリラ・リミテッド
(65) 公表番号	特表2007-518088 (P2007-518088A)		イギリス国, エム2・5ジービー マンチ
(43) 公表日	平成19年7月5日(2007.7.5)		ェスター, ピーター・ストリート 37,
(86) 国際出願番号	PCT/GB2005/000015		ハーヴェスター・ハウス
(87) 国際公開番号	W02005/066630	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開日	平成17年7月21日(2005.7.21)		弁理士 奥山 尚一
審査請求日	平成20年1月7日(2008.1.7)	(74) 代理人	100096769
(31) 優先権主張番号	0400122.8		弁理士 有原 幸一
(32) 優先日	平成16年1月6日(2004.1.6)	(74) 代理人	100107319
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 松島 鉄男
		(72) 発明者	コリア, ジョン
			イギリス国, エルエス17・9ダブリュー
			エイ リーズ, ピー・オー・ボックス 2
			51, バドリラ・リミテッド内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結合を定量化する薬剤および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料に存在する標的部分の量を定量するための提示システムの使用であって、この提示システムは、結合パートナーによって認識されうる標的部分またはその一部の少なくとも1つのコピーと、前記標的部分に共有結合している骨格材料の少なくとも1つのドメインとを備えており、この骨格材料は、制御可能な数の化学的反応性があるシステインおよび/またはリジンアミノ酸残基を有しているとともに、この反応性システインおよび/またはリジン残基の数は、望ましい数の反応性システインおよび/またはリジン基を含有する天然起源から骨格タンパク質を選択することによって、またはタンパク質配列に反応性残基を導入またはタンパク質から反応性残基を脱離させて選択的に突然変異することによって、および/または選択した骨格タンパク質の反応性システインおよび/またはリジン残基の任意の1つ以上を無効にすることによって、制御され、前記骨格材料の少なくとも1つのドメインは、前記標的部分またはその一部に対して特異的な結合パートナーと無反応性である、使用。

【請求項2】

前記標的部分またはその一部のコピーが、DNAもしくはRNAの配列、ペプチド、抗原構造または化学物質または部分を含む群から選択される請求項1に記載の使用。

【請求項3】

前記標的部分が、さらに、サッカライド、代謝産物補助因子、ハプテンまたはホスフェート、ニトロシル基、硫酸基もしくはグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)

基による修飾を含む請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 4】

前記骨格材料がタンパク質である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

【請求項 5】

前記骨格材料が、残基の側鎖内に少なくとも 1 つ以上の化学基を有する少なくとも 1 つの天然型または非天然型アミノ酸を含む請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の使用。

【請求項 6】

前記化学基が、グルタミン酸、アスパラギン酸のカルボニル、チロシン、システインおよびリジンのヒドロキシルを含む群から選択される請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記骨格が、タイチンの I 27 ドメイン、スプライシングファクター 3 b のサブユニット (サブユニット 5) である I 39 ドメイン、コルチ器官のタンパク質 (Mus 筋)、ヒートショックタンパク質、ミトコンドリア (Mus 筋)、スプライシングファクター 3 B サブユニット 5 (Mus 筋)、ユビキノール - チトクローム C 還元酵素複合体ユビキノール - 結合タンパク質、E 1 B タンパク質 (ヒトアデノウイルスタイプ 11)、シャペロニン (アラビトプシス サリアナ (*Arabidopsis thaliana*))、光化学系 II 反応中心 H タンパク質 (アラビトプシス サリアナ (*Arabidopsis thaliana*))、NADH - ユビキノールオキシリダクターゼサブユニット、ミトコンドリア [前駆体] (ヒト (*Homo sapiens*))、信号認識粒子タンパク質 (Mus 筋)、DNA ポリメラーゼ サブユニット (Mus 筋) を含む群から選択される請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の使用。

10

【請求項 8】

請求項 7 に記載の骨格の任意の 1 つ以上の組み合わせを含む請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

複数の同一の骨格を含む請求項 7 に記載の使用。

【請求項 10】

複数の同一または同一でないドメインを混合物またはブレンドとして含む請求項 7 に記載の使用。

20

【請求項 11】

タイチンの複数の骨格 I 27 ドメインを含み、少なくとも 1 つのドメインまたは単位は、ペプチド結合のために 1 つのシステイン残基を有するように工作されているが、他の全てのまたは選択した数の I 27 ドメインまたは単位は、リジン、グルタメートおよびアスパルテートを含む基から選択される他の反応性残基を欠損している請求項 7 に記載の使用。

30

【請求項 12】

スプライシングファクター 3 b のサブユニット (サブユニット 5) である少なくとも 1 つ以上の骨格 I 39 ドメインを含む請求項 7 に記載の使用。

【請求項 13】

前記骨格ドメインが 10 kDa である請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の使用。

【請求項 14】

前記骨格材料の直鎖状単位またはドメインがタンデムに接続されている請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の使用。

40

【請求項 15】

少なくとも 1 つの生物または非生物ポリマーを含む請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の使用。

【請求項 16】

前記非生物ポリマーが PEG (ポリエチレングリコール) である請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

前記標的部分のコピーが、システイン残基のチオール基による共有結合を使用して提示

50

システムに組み込まれている、または標的部分がタンパク質もしくはペプチドであり、提示システムもタンパク質もしくはペプチドである場合には、標的部分をコードするDNAセグメントが提示システムをコードするDNAに組み込まれており、結果として提示システムと共に発現される請求項1～16のいずれかに記載の使用。

【請求項18】

前記提示システムのドメインが、前記標的部分またはその一部のコピーとは別に、実質的に不活性であるかまたは前記試料の標的部分またはその一部の特異的な結合パートナーに無反応性である請求項1～17のいずれかに記載の使用。

【請求項19】

前記標的部分またはその一部のコピーが、前記試料に存在する標的部分と同一でない請求項1～18のいずれかに記載の使用。

10

【請求項20】

前記標的部分の複数のコピーを含む請求項1～19のいずれかに記載の使用。

【請求項21】

前記標的部分またはその一部のコピーが提示システム内で直鎖状または分岐鎖状である請求項1～20のいずれかに記載の使用。

【請求項22】

前記共有結合が骨格材料の側鎖によるように、前記標的部分のコピーが分岐鎖状である請求項21に記載の使用。

【請求項23】

前記結合パートナーが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、RNAまたはDNAまたはペプチドアプタマーまたは他の抗体等価物、染料、薬物および金属キレートを含む群から選択される請求項1～22のいずれかに記載の使用。

20

【請求項24】

少なくとも1つのI27ドメインおよび/または少なくとも1つのI39ドメインおよびA1、PS-38またはPT17ペプチドを含む群から選択される標的部分を含む請求項1～23のいずれかに記載の使用。

【請求項25】

試料中に存在する可能性のある標的部分の量を定量するための産物の使用であって、この産物は複数の提示システムを含み、これら各提示システムは、結合パートナーによって認識されうる標的部分またはその一部の少なくとも1つのコピーと、前記標的部分に共有結合している骨格材料の少なくとも1つのドメインとを備えており、この骨格材料は、制御可能な数の化学的反応性があるシステインおよび/またはリジンアミノ酸残基を有しているとともに、この反応性システインおよび/またはリジン残基の数は、望ましい数の反応性システインおよび/またはリジン基を含有する天然起源から骨格タンパク質を選択することによって、またはタンパク質配列に反応性残基を導入またはタンパク質から反応性残基を脱離させて選択的に突然変異することによって、および/または選択した骨格タンパク質の反応性システインおよび/またはリジン残基の任意の1つ以上を無効にすることによって、制御され、前記骨格材料の少なくとも1つのドメインは、前記標的部分またはその一部のコピーに対して特異的な結合パートナーに無反応性であり、さらに前記各提示システムは、他の提示システムとは前記産物において異なる分子量を有する、使用。

30

40

【請求項26】

陽性対照もしくは内部標準としての、または検量線を作成するための請求項1～25のいずれかに記載の使用。

【請求項27】

試料の標的部分の量を定量するためのキットであって、請求項1～24のいずれかに記載の提示システムを含むキット。

【請求項28】

標的部分を含有する可能性のある試料における標的部分の量を定量する方法であって、

a) 結合パートナーによって認識可能な標的部分またはその一部の少なくとも1つのコ

50

ピーと、前記結合パートナーに無反応性の少なくとも1つのドメインとを備え、前記標的部分の少なくとも1つのコピーが、制御可能な数の化学的反応性があるシステインおよび/またはリジンアミノ酸残基を有している骨格材料の少なくとも1つのドメインに共有結合している、提示システムを提供するステップと、

b) 特定の量で存在する前記提示システムに分離検出法を実施するステップと、

c) 前記提示システムの量に対する前記提示システムによって形成される信号の強度を含む少なくとも1つの比較ポイントを作成するステップと

を含む方法。

【請求項29】

前記提示システムが1つの特定の量で存在する請求項28に記載の方法。

10

【請求項30】

前記提示システムが一連の種々の量で存在する請求項28に記載の方法。

【請求項31】

前記種々の量が、プロットの同じまたは異なるレーンまたはチャンネルに存在する請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記比較ポイントが、一体として検量線を提供する複数の比較ポイントである請求項30または31に記載の方法。

【請求項33】

前記比較ポイントを前記試料と比較して、この試料に存在する標的部分の量を定量するステップをさらに含む請求項30～32のいずれかに記載の方法。

20

【請求項34】

前記提示システムが既知の分子量またはpIのものである、請求項28～33のいずれかに記載の方法。

【請求項35】

前記提示システムが非生物ポリマー、核酸分子、ペプチド、タンパク質またはそれらの組み合わせを含む、請求項28～34のいずれかに記載の方法。

【請求項36】

前記提示システムがタンデムに接続されている複数のドメインを含む、請求項28～35のいずれかに記載の方法。

30

【請求項37】

前記提示システムが、同じ単位もしくはドメインまたは同じでない単位もしくはドメインを含む、請求項28～36のいずれかに記載の方法。

【請求項38】

前記提示システムの単位が、前記標的部分またはその一部に特異的な結合パートナーに無反応性である請求項28～37のいずれかに記載の方法。

【請求項39】

前記標的部分またはその一部のコピーが、DNA、RNAの配列、タンパク質またはペプチド、サッカライド、ハプテン、ホスフェート、ニトロシル基、硫酸基、GPI基、エピトープ、抗原構造物または化学物質を含む請求項28～38のいずれかに記載の方法。

40

【請求項40】

前記標的部分のコピーが、SERCA2aまたはセリン-38がリン酸化されているSERCA2aを含む請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記提示システムが異なる標的部分またはその一部を含む請求項28～40のいずれかに記載の方法。

【請求項42】

前記標的部分またはその一部のコピーが前記提示システム内で直鎖状または分岐鎖状である、請求項28～41のいずれかに記載の方法。

【請求項43】

50

前記特異的な結合パートナーが、前記標的部分に特異的な結合親和性を有し、且つそれに結合することができる分子を含む請求項 28 ~ 42 のいずれかに記載の方法。

【請求項 44】

前記結合パートナーが、抗体、DNA 配列、RNA 配列、染料、金属キレートまたは薬物分子を含む請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記分離検出法が、ドットプロット、ウェスタンプロット、RIA、蛍光偏光、ELISA、ノーザンプロット法、サザンプロット法、PCR、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、キャピラリー電気泳動、1D 電気泳動、等電点電気泳動法、質量分析法または上記の組み合わせを含む請求項 28 ~ 44 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 46】

前記提示システムが、試料における標的部分の有無を検出するための陽性対照として作用する請求項 28 ~ 45 のいずれかに記載の方法。

【請求項 47】

前記提示システムが、1ポイントキャリブレーションを提供することによって内部標準として作用する請求項 28 ~ 45 のいずれかに記載の方法。

【請求項 48】

前記提示システムが、検量線を提供するために、多数の比較ポイントを作成するために使用される請求項 28 ~ 45 のいずれかに記載の方法。

【請求項 49】

前記提示システムが、免疫沈降の効率および/または免疫沈降過程の段階をモニターするために使用される請求項 28 ~ 45 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 50】

結合パートナーによって認識されうる標的部分またはその一部の少なくとも1つのコピーと、前記標的部分に共有結合している骨格材料の少なくとも1つのドメインとを備えた産物であって、前記骨格材料が、制御可能な数の化学的反応性があるシステインおよび/またはリジンアミノ酸残基を有しているとともに、前記骨格材料の少なくとも1つのドメインが、前記標的部分またはその一部に対して特異的な結合パートナーと無反応性であり、前記標的部分が、A1、PS-38またはPT17ペプチドを含む群から選択されるものであり、前記骨格材料が、タイチンからのI27ドメイン、スプライシングファクター3bのサブユニット(サブユニット5)であるI39ドメイン、コルチタンパク質の器官(Mus筋)、ヒートショックタンパク質、ミトコンドリア(Mus筋)、スプライシングファクター3Bサブユニット5(Mus筋)、ユビキノール-チトクロームC還元酵素複合体ユビキノ-結合タンパク質、E1Bタンパク質(ヒトアデノウイルスタイプ11)、シャペロニン(Arabidopsis thaliana)、光化学系II反応中心Hタンパク質(Arabidopsis thaliana)、NADH-ユビキノオキシリダクターゼサブユニット、ミトコンドリア[前駆体](ホモサピエンス)、信号認識粒子タンパク質(Mus筋)、およびDNAポリメラーゼサブユニット(Mus筋)を含む群から選択されるものである、産物。

30

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、ある薬剤の特定の結合パートナーに対する結合を定量または数値化するための薬剤およびその方法、並びにその校正結果および使用に関する。本発明は、限定を意図するものではないが、特に、プロットに基づいた検出法に使用するためのものであり、試料中の薬剤の量の定量に関する。

【背景技術】

【0002】

プロットを使用する技法などの分離法を使用して、試料中の特定の標的分子の存在を同定することができる。プロットを使用する技法の1つであるウェスタンプロット法を使用

50

して、特定のタンパク質に特異的な抗体との相互作用により、試料中のそのタンパク質の存在を同定することができる。試料のタンパク質は電気泳動によって互いに分離し、好適な膜支持体に移し、次いで特異的な抗体を用いて調べる。タンパク質への抗体の結合は膜の「スポット」として可視化され、その存在および位置としての情報を提供する。この位置はタンパク質の物理的な状態、例えば、グリコシル化、リン酸化またはタンパク質分解についての情報を提供することができる。

【0003】

ウェスタンブロット法および他の免疫学的技法の欠点は、作成されるデータは定性的（単位なし）であり、実験で得られる情報を制限し、単位を含む定量的な結果を提供しないことである。さらに、感度の大きな日間変動が観察され、別個の日時に実施される実験間の容易な比較、特に実験が異なる研究者によって実施される場合の容易な比較を妨害する。従って、実験間の比較を困難にし、不正確にする大きな実験間変動が存在する。これらの短所は、得られる情報の質および技法の再現性を制限する。

10

【0004】

種々の他のプロットを使用する検出法がある。サザンブロット法は、特定のDNA配列の存在を検出するために使用される技法であるが、ノーザンブロット法は混合物内の特定のRNA配列を位置決めするために使用される。ELISA法は感度が高く、従って試料中の非常に少量のタンパク質または他の抗原物質を検出することができる。この方法の基礎は、プレート表面に接続されている抗体による抗原の結合である。免疫複合体の形成は、抗体に結合されているペルオキシダーゼの使用によって検出され、ペルオキシダーゼは増幅的な呈色反応を形成するために使用される。しかし、ELISAは、高感度性にもかかわらず、試料中に存在するタンパク質または抗原の量を定量しない。従って、ウェスタンブロット法に関連して記載される欠点は他のプロットを使用する検出法にも関連する。

20

【0005】

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）および等電点電気泳動法などの他の分離を使用する技法がある。等電点電気泳動法は、タンパク質の等電点の差を使用する、タンパク質を分離するために使用される技法である。タンパク質の等電点は、タンパク質が正味荷電を持たないpHである。そのような環境下では、タンパク質は電場中で移動しない。等電点電気泳動技法は、陰極と陽極の間に設定されるpH勾配を使用しており、タンパク質は各々の等電点方向に移動する。等電点電気泳動技法は真に定量的な結果を提供しない。

30

【0006】

従って、簡単で、効果的に再現可能な較正技術が記載されている短所を修正し、実験間で容易に比較可能な定量的データを提供することが長い間望まれている。

【発明の開示】

【0007】

本発明は、骨格材料の少なくとも1つ以上の制御された数の部位またはドメインへの標的部分の共有結合にあり、骨格材料は制御された特性を有する。この方法では、標的部分および骨格材料は、陽性対照、内部標準として使用してもまたは検量線を作成するために使用してもよい提示システムを含む。

【0008】

本発明はまた、標的部分を含有する可能性のある試料において標的部分を定量する方法であって、提示システムによって作成される信号と試料によって作成される信号を比較する手段を提供する比較ポイントまたは検量線を作成するために、提示システムの特定の量を使用するステップまたは提示システムの量を変更するステップを含み、提示システムは標的部分またはその一部の少なくとも1つのコピーを含む方法も提供する。

40

【0009】

以下の明細書および特許請求の範囲において、内容がそうでないことを要求しない限り、「含む」という用語または「含む（comprises）」もしくは「含む（comprising）」などの変化形は、記載されている整数または整数群を含むが、任意の他の整数または整数群を除外しないことを示すことが理解される。

50

【0010】

本発明の第一の態様によると、試料に存在する標的部分の量を定量する際に使用するための提示システムであって、結合パートナーによって認識されうる標的部分またはその一部の少なくとも1つのコピーおよび標的部分に共有結合している骨格の少なくとも1つのドメインを含み、ドメインは標的部分またはその一部に特異的な結合パートナーと無反応性である提示システムが提供される。

【0011】

本明細書における標的部分またはその一部への言及は、DNAもしくはRNAの配列、タンパク質またはペプチド、抗原構造または化学物質または部分を含むが、これらに限定されない。標的部分は、さらに、サッカライド、代謝産物補助因子、ハプテンまたは修飾基を含んでもよい。修飾基は、ホスフェート、ニトロシル基、硫酸基またはグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)基を含んでもよい。

10

【0012】

好ましくは、提示システムの骨格材料は制御可能な特性を有し、好ましくは、この特性は、相対的分子質量(Mr)もしくは分子量(Mwt)または溶液中の所定の物質の等電点のためのpH値(pI)である。

【0013】

好ましくは、骨格材料はタンパク質である。

【0014】

好ましくは、骨格材料は、好ましくは、残基の側鎖内に少なくとも1つ以上の化学的に反応性の基を有する少なくとも1つの天然型または非天然型アミノ酸を含む。

20

【0015】

好ましくは、骨格は、1つ以上の化学的に反応性の基、例えば、グルタミン酸もしくはアスパラギン酸のカルボニル、チロシンのヒドロキシルを含み、さらに好ましくは、少なくとも1つのシステインおよび/またはリジンアミノ酸基を含む。従って、骨格材料はチオールまたは一級アミンまたは標的部分と共有結合するのに利用可能なアスパラギン酸、グルタミン酸、システインおよび/またはリジン基などの好適な反応性の側鎖基が存在する任意の他のタンパク質であってもよいことが考えられる。骨格ドメインの化学的に反応性の基への標的部分の共有結合は制御可能であることが望ましい。

【0016】

好ましくは、反応性システインおよび/またはリジン残基の数は、望ましい数の反応性システインおよび/またはリジン基を含有する天然起源から骨格タンパク質を選択することによって制御することができる。

30

【0017】

好ましくは、骨格タンパク質は、2つのシステイン残基を含有するタイチンのI27、1つのシステイン残基を含有するスプライシングファクター3bのサブユニット(サブユニット5)であるI39ドメイン、1つのシステインおよび1つのリジン残基を含有するコルチ器官のタンパク質(Mus筋)Swiss-Prot/TrEMBL Primary Accession Number Q8R448; 11のリジン残基を含有するヒートショックタンパク質、ミトコンドリア(Mus筋)Swiss-Prot/TrEMBL Primary Accession Number Q64433; 1つのシステインおよび5つのリジン残基を含有するスプライシングファクター3Bサブユニット5(Mus筋)Swiss-Prot/TrEMBL Primary Accession Number Q923D4; 1つのシステインおよび6つのリジン残基を含有するユビキノール-チトクロームC還元酵素複合体ユビキノン-結合タンパク質QP-C(シゾサッカロミセス ポンベ(Schizosaccharomyces pomme))Swiss-Prot/TrEMBL Primary Accession Number P50523; 1つのシステイン残基を含有するE1Bタンパク質(ヒトアデノウイルスタイプ11)Swiss-Prot/TrEMBL Primary Accession Number Q8B8U6; 9のリジン残基を含有するシャペロニン(ア

40

50

ラビトブシス サリアナ (*Arabidopsis thaliana*) Swiss-Prot/TrEMBL Primary Accession Number P34893; 3つのリジン残基を含有する光化学系II反応中心Hタンパク質 (アラビトブシス サリアナ (*Arabidopsis thaliana*) Swiss-Prot/TrEMBL Primary Accession Number P56780; 1つのシステインおよび9のリジン残基を含有するNADH-ユビキノンオキシリダクターゼサブユニット、ミトコンドリア [前駆体] (ヒト (*Homo sapiens*)) Swiss-Prot/TrEMBL Primary Accession Number 56181; 2つのシステインおよび8つのリジン残基を含有する信号認識粒子タンパク質 (Mus筋); 2つのシステインおよび6つのリジン残基を含有するDNAポリメラーゼ サブユニット (Mus筋) を含む群から選択される。

10

【0018】

従って、本発明の提示システムは標的部分に共有結合するための数多くの部位を提供することができることおよび骨格はユーザーの要求により選択することができることが考慮される。例えば、1つのシステインおよび9のリジン残基を含有するミトコンドリア [前駆体] (ヒト (*Homo sapiens*)) Swiss-Prot/TrEMBL Primary Accession Number P56181を1つのシステイン残基に標的部分のコピーを結合するために選択しても、または1つのシステインおよび1つのリジン残基を含有するコルチ器官のタンパク質 (Mus筋) Swiss-Prot/TrEMBL Primary Accession Number Q8R448を、

20

【0019】

特定の実施態様において、提示システムは、タイチン由来のI27などの1つ以上のドメインを含んでもよい。タイチンは、Igファミリーに属する数多くの - サンドイッチドメインを含有する。I27ドメインは、通常、2つのシステイン残基を含有し、10kDaの安定な構造を形成するように折りたたむ。本来I27ドメインは2つのシステイン残基 (ペプチドの共有結合するための部位) を含有するが、これらのシステイン残基の例えばセリンへの突然変異はドメインの折りたたみに適合する。従って、分子量ステップサイズが適当な単位 (10kDaステップ) であり、ペプチド結合のための1つのシステイン残基を有するように1単位 (または必要な場合にはそれ以上) を工作することができるが、I27の他の全ての単位はシステイン残基を欠損するI27の提示システムを形成することができる。別の実施態様において、I27の単位は他の反応性残基を欠損してもよい。これらの残基には、リジン、グルタメートおよびアスパルテートを挙げることができるが、それに限定されるわけではない。I27のコピーはこれらの反応性残基の1つ以上を含有し、標的部分の共有結合のための制御された数の部位を提供してもよい。

30

【0020】

好ましくは、反応性システインおよび/またはリジン基の数は、反応性システインおよび/またはリジン残基の任意の1つ以上を付加もしくは脱離することによってまたは無効にすることによって選択的に突然変異することによって上記の骨格タンパク質のいずれかを改変することによって制御することができる。

40

【0021】

または、システイン残基を1つ有するまたはシステイン残基を持たないようにタイチンドメインの1つ以上を突然変異することができる。一実施態様において、提示システムは、1つ以上のI27ドメインおよび標的部分のコピーを含み、I27ドメインの1つは1つのシステイン残基を含み、他のI27ドメインはシステイン残基を欠損する。好ましい実施態様において、提示システムは5つのI27ドメインを含む。

【0022】

50

別の実施態様において、提示システムのドメインは、スプライシング因子3bのサブユニット(サブユニット5)であるI39ドメインを含んでもよい。I39ドメインは10kDaドメインである。

【0023】

以前に考察されているように、一実施態様において、提示システムは同じでないドメインを含んでもよい。例えば、提示システムは、少なくとも1つのI39ドメインおよび少なくとも1つのI27ドメインまたは標的部分もしくはその一部の少なくとも1つのコピー以外に上記の骨格タンパク質ドメインの任意の1つ以上を含んでもよい。一実施態様において、提示システムは、4つのI27ドメインおよび1つのI39ドメインまたは本明細書において先に記載する骨格タンパク質由来の上記のドメインから選択される任意の1つを含む任意の他の組み合わせを含んでもよい。

10

【0024】

好ましくは、本発明のドメインまたは骨格タンパク質は適当な分子量であり、典型的には、利便性のために10kDaとして選択される。

【0025】

好ましくは、提示システムは、異なる種類の単位もしくはドメインまたは数多くの同じドメインの混合物を含んでもよい。単位またはドメインは既知の分子量および/またはpIであってもよく、標的部分またはその一部に特異的な結合パートナーにブラインド(blind)、すなわち、無-反応であってもよく、従って提示システムの単位またはドメインは、それらが絶対的もしくは相対的に「免疫学的にブラインド」または「反応的に不活性」または実質的にそうであるように、識別することができると思われることができる。好ましい実施態様において、少なくとも1つのドメインは、標的部分またはその一部と異なる分子由来であるまたは異なる種である。

20

【0026】

本明細書における提示システムへの言及は、タンデムに接続されている1つ以上の直鎖状の単位またはドメインを含む分子を含むが、これらに限定されないことが意図されている。

【0027】

さらに別の実施態様において、提示システムは少なくとも1つの生物または非生物ポリマーを含んでもよい。非生物ポリマーの一例はPEG(ポリエチレングリコール)である。この実施態様において、提示システムは、従って、ペグ化されていると考えることができる。標的部分がペプチドまたはタンパク質である実施態様において、PEGポリマーは、少なくとも1つの標的部分のアミノ酸配列の官能基に結合されていてもよい。または、PEGポリマーは、提示システムの標的部分の少なくとも1つのコピー内に含有される糖鎖に結合されていてもよい。

30

【0028】

種々の既知の方法を使用して、標的部分を提示システムに組み込むことができる。例えば、システイン残基のチオール基による共有結合。特定の態様において、標的部分を提示システムに結合してもよい。または、標的部分がタンパク質またはペプチドであり、提示システムもタンパク質またはペプチドである場合には、標的部分をコードするDNAセグメントを提示システムをコードするDNAに組み込み、その後既知のタンパク質発現方法を使用して提示システムと共に発現してもよい。

40

【0029】

一実施態様において、提示システムがタンパク質またはペプチドである場合には、それは、安定した状態で折りたたまれている数多くのタンパク質ドメインを含んでもよい。提示システムの分子量を変更するために、ドメインの数を変更してもよい。好ましい実施態様において、少なくとも1つのドメインは、標的部分またはその一部からの共有結合を收容することができるアミノ酸を含有する。別の実施態様において、少なくとも1つのドメインまたは標的部分もしくはその一部の少なくとも1つのコピーは共有結合を提供するように改変してもよい。提示システムのドメインは、標的部分またはその一部は別として、

50

不活性である、すなわち、これらのドメインは標的部分またはその一部の特異的な結合パートナーに無反応性である。「不活性な」ドメインは提示システムの分子量を制御して、試料の多重化を容易にする。本明細書における多重化への言及は、試験および提示システム試料の混合物を使用して、試験成分から誘導される信号および提示システムから誘導される信号を得る手法から誘導される情報の容易なデコンボリューションを意味する。

【 0 0 3 0 】

提示システムが取る形態は、検出および定量される標的部分の形態に依存する。例えば、定量される標的部分が核酸である場合には、提示システムは核酸の配列を含むことができる。提示システムは、既知の分子量のDNA単位またはドメインの配列を含んでもよい。または、提示システムはRNA単位を含んでもよい。または、標的部分がペプチドエピトープまたはタンパク質である場合には、提示システムもペプチド単位またはドメインを含み、ウェスタンブロット法またはELISAを使用して、試料に存在する標的部分の量を定量することができる。ヘテロコンビネーションが提示システムを形成する、すなわち、提示システムはペプチドおよび核酸を含んでもよいことも想定される。

10

【 0 0 3 1 】

標的部分またはその一部はペプチドまたはタンパク質配列であってもよい。別の方法としてまたは追加として、標的部分またはその一部はエピトープまたは抗原配列であってもよい。提示システムの直鎖状配列内の標的部分またはその一部の位置は変わってもよい。本発明の一実施態様において、提示システムは、配列内に存在する標的部分またはその一部の1つのコピーを有してもよい。別の実施態様において、提示システムは、標的部分またはその一部の2つ以上のコピーを含んでもよい。特定の実施態様において、提示システムは異なる標的部分またはその一部を含んでもよい。例えば、一実施態様において、提示システムはタンパク質配列および金属または染料も含んでもよい。一実施態様において、標的部分の1つはHis-タグであってもよく、別の標的部分はペプチドエピトープであってもよい。これらの実施態様において、標的部分またはその一部は、試料に存在する可能性のある標的部分でなくてもよい。

20

【 0 0 3 2 】

標的部分またはその一部は、提示システム内で直鎖状または分岐鎖状であってもよい。すなわち、標的部分は、骨格材料の側鎖を介する共有結合を有してもよい。本明細書における「分岐鎖状」への言及は非-直鎖状であることおよびポリマーは、ペプチド鎖の骨格ではなく側鎖または核酸の等価物を介する共有結合によって形成されることを意味する（骨格は、リボース/デオキシリボース環の炭素3と5の間のホスホジエステル結合によって形成される、核酸の他の部位への標的部分の共有結合は本明細書において分岐鎖状構造と同じである）。

30

【 0 0 3 3 】

本明細書におけるタンパク質または産物への言及は：タンパク質複合体または断片、酵素、酵素産物または結合物、一次代謝物、ホルモンまたは抗体を含むことが意図されている。

【 0 0 3 4 】

提示システムおよび/または標的部分がタンパク質またはペプチドである場合には、等電点(pI)は制御可能となりうる。この特定の実施態様は、使用する分離法が2-D電気泳動である場合に特定の利点を提供する。

40

【 0 0 3 5 】

本発明の特定の実施態様において、標的部分はタンパク質SERCA2aを含む。提示システムはSERCA2aのエピトープを含んでもよい。SERCA2aは、筋小胞体Ca²⁺-ATPaseファミリーの心筋アイソフォームである。好ましい実施態様において、SERCA2aのエピトープはアミノ酸配列CLEPAILEを含む。

【 0 0 3 6 】

別の実施態様において、標的部分は、セリン-38がリン酸化されているタンパク質SERCA2aである。好ましくは、提示システムはこのタンパク質由来のエピトープを含

50

む。好ましくは、エピトープはアミノ酸配列³¹ K L K E R W G S (P O₄) N E L⁴¹を含む。

【 0 0 3 7 】

本明細書における特異的な結合パートナーへの言及は、標的部分のコピーに特異的な結合親和性を有し、それに結合することができる任意の分子をいう。

【 0 0 3 8 】

好ましくは、結合パートナーは、抗体、RNAまたはDNAまたはペプチドアダプターまたは他の抗体等価物、染料、薬物および金属キレートを含む群から選択される。結合パートナーは標的部分と同じ種であってもよく、例えば、ポリペプチドのペプチドへの結合または核酸ポリマーの核酸ポリマーへの結合であってもよい。または、特異的な結合パートナーは標的部分と異なる種であってもよく、例えば、核酸ポリマーのペプチド/ポリペプチドへの結合、染料のペプチド/ポリペプチドへの結合であってもよい。標的部分が抗体である場合には、それはモノクローナルであってもよく、例えば、A1または抗-his6であってもよいが、これに限定されず、標的がポリクローナル抗体である場合には、それは例えば、PS-38、PT-17、CLEPまたは抗-Alexa fluor抗体であってもよいが、これに限定されない。結合パートナーが抗体である場合には、それは、ペプチドエピトープまたは染料エピトープを含む標的部分に特異的に結合することができる。特異的な結合パートナーが金属キレートである場合には、それは例えば、Ni+ペルオキシダーゼの形態のニッケルイオンであってもよいが、これに限定されない。

【 0 0 3 9 】

本発明の特定の実施態様において、提示システムは少なくとも1つのI27ドメインおよび/または少なくとも1つのI39ドメインを含み、標的部分は、A1(LTRSAIRRAS)、PS-38(すでに規定されている)またはPT17ペプチド(RSAIRRAST(PO₄)IEY)から選択される。

【 0 0 4 0 】

従って、本発明は、単純で、信頼性があり、別個に実施された実験の結果の正確な比較も可能にする較正標準をさらに提供する。

【 0 0 4 1 】

本発明のさらに別の態様において、試料中に存在する可能性のある標的部分の量を定量する際に使用する産物であって、産物は複数の提示システムを含み、各提示システムは標的部分またはその一部の少なくとも1つのコピーおよび標的部分に共有結合している少なくとも1つのドメインを含み、ドメインは標的部分またはその一部の特異的な結合パートナーに無反応性であり、さらに各提示システムは、産物の他の提示システムと異なる分子量を有する産物が提供される。

【 0 0 4 2 】

本発明のよりさらに別の態様において、試料中の標的部分の量を定量するためのキットであって、キットが提示システムを含み、提示システムは本明細書において先に記載されているキットを提供する。必要に応じて、キットは、標的部分またはその一部に特異的な結合パートナーをさらに含む。提示システムのドメインは結合パートナーに「不活性」またはブラインドであってもよく、すなわち結合パートナーに結合しない。必要に応じて、キットは使用するための取扱説明書を含んでもよい。

【 0 0 4 3 】

本発明の一実施態様において、提示システムは陽性対照試料としてキットに提供される。キットは、抗体産物をさらに含。抗体産物は結合パートナーであってもよい。提示システムは、抗体結合パートナーと反応し、従って陽性対照を提供する標的部分またはその一部を含む。

【 0 0 4 4 】

本発明のよりさらに別の態様において、試料中に存在する可能性のある標的部分の量を定量するための、本明細書の先に記載されている産物(提示システム)の使用が提供される。

10

20

30

40

50

【0045】

本発明のさらに別の態様において、標的部分を含有する可能性のある試料における標的部分の量を定量する方法であって、

a) 結合パートナーによって認識可能な標的部分またはその一部の少なくとも1つのコピーおよび結合パートナーに無反応性の少なくとも1つのドメインを含み、標的部分の少なくとも1つのコピーが骨格の少なくとも1つのドメインに共有結合している提示システムを提供するステップと、

b) 特定の量で存在する提示システムに分離検出法を実施するステップと、

c) 提示システムによって形成される信号の強度対提示システムの量を含む少なくとも1つの比較ポイントを作成するステップ

を含む方法が提供される。

10

【0046】

好ましくは、本発明の方法は、本明細書に先に記載されている特徴の任意の1つ以上を含む。

【0047】

本明細書において分離に基づいた検出実験または技法の言及は、提示システムまたは試料のどちらかに存在する場合に、標的部分を特異的に認識する抗体または他の種類の特異的な結合パートナーによる検出に基づいた免疫学的アッセイなどの検出法を含むが、これらに限定されないと考えることができる。このようなアッセイには、ドットプロット、ウェスタンプロット、RIA、免疫沈降および蛍光偏光が挙げられる。または、本発明の方法は、ノーザンプロット法もしくはサザンプロット法などの他のプロットに基づいた検出実験もしくは技法またはPCRを使用してもよい。分離に基づいた技法には、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、キャピラリー電気泳動、質量分析法および等電点電気泳動および上記の組み合わせ(例えば、2D電気泳動、HPLC-MS)も挙げることができる。本発明の方法は、ELISAなどの技法に使用することもできることが想定される。別の実施態様において、質量分析法は、単離またはHPLCなどの他の検出方法との組み合わせにおいて検出方法として使用してもよい。技法の選択は、ユーザーの結合パートナーおよび標的部分の選択に依存し、本発明の範囲を限定することは意図されていない。分離法の適当な選択は本発明の以下および実施例に提供されている。

20

【0048】

好ましくは、本発明の方法は、比較ポイントまたは多数の比較ポイントを試料と比較して、試料中に存在する標的部分の量を定量するステップをさらに含む。好ましくは、提示システムは既知の分子量のものである。別の方法としてまたは追加として、提示システムは既知のpIのものである。提示システムと、標的部分またはその一部を含有する可能性のある試料を比較するために、提示システムの分子量がわかることが特に有利である。一実施態様において、提示システムは1つの量で存在する。この実施態様において、1つの比較ポイントが作成される。従って、この実施態様において、提示システムは内部標準として使用することができると思われる。これは、標的分子の検出が適切に実施されたことを確認するために使用することができると思われ、提示システムは陽性対照および基準信号として作動する。標的分子が試料に存在しない状況においてこれは特に重要である(図2の例参照)。

30

40

【0049】

本明細書において「提示システムの量」という用語の言及は、いくつかの態様において、提示システムが使用される濃度をいうことが考慮されうる。他の実施態様において、「提示システムの量」という用語は、提示システムが試料中に存在する密度をいうことが考慮されうる。密度は、いくつかの方法を使用して、例えば、試料の蛍光強度または光強度を検出して数値化することができる。

【0050】

本発明の実施態様は、異なる生理的状态(例えば、発生の状態、疾病対照等)から誘導される試料間でなされる、細胞または組織の一部または全てのタンパク質レポーター

50

を比較する際に使用することができることが想定される。リンタンパク質および糖タンパク質などのある形態のタンパク質の翻訳後修飾を染色することが今や可能である。好適に修飾されたペプチド構造（ホスホペプチド、グリコペプチドまたは他の修飾ペプチド）である標的部分を含む提示システムを含む内部標準を実験デザインに組み入れることによりデータの定量を改善すると思われ、平行して実施された実験間または別個に実施された実験間の結果の容易な比較を可能にすると思われる。

【0051】

好ましくは、提示システムは一連の種々の量で存在する。この実施態様において、多数の比較ポイントを作成することができ、従って検量線を作成することができる。

【0052】

一実施態様において、次いで作成された比較ポイントまたは検量線を使用して、試料中の標的部分の量を定量することができる。特に、本発明によって作成される比較ポイントまたは検量線は、提示システムの一部としての標的部分または一部によって作成される信号強度を提示システムの濃度に対してプロットする。次いで、さらに別の分離を使用する検出法を、標的部分を含有する可能性のある試料に実施することができる。または、さらに別の分離を使用する技法を、提示システムと同時に試料に実施することができる。任意の信号が観察される場合には、次いで信号の強度を求めることができる。次いで、比較ポイントを使用して、校正点または検量線において標的部分の量と比較して試料中の標的部分の量を表し、試料に存在する標的部分の量を求めることができる。試料または提示システムによって形成される信号は、例えば、化学発光であってもよいが、これに限定されない。他の検出方法には、ペルオキシダーゼに基づいた抗-IgGの4-メトキシ-ナフトール/H₂O₂などの不溶性着色産物である酵素触媒による検出のための発色基質または抗体もしくはプロテインAもしくはプロテインGなどの検出試薬に結合しているフルオロフォアを使用する蛍光に基づいた検出システムが挙げられる。放射能¹²⁵I標識抗体またはプロテインAもしくはプロテインG。別の実施態様において、提示システムへの染料の結合に関係する検出方法を使用してもよい。使用することができると思われる染料には、リン酸化アミノ酸を含有するタンパク質の染料であるPro-Qダイアモンド(Molecular Probes, OR, USA)および炭水化物を含有する部分の染料であるPro-Qエメラルド(Molecular Probes, OR, USA)が挙げられるが、これに限定されるわけではない。他の結合パートナーが、薬物または候補薬物分子などの他の化学分子であってもよい。

【0053】

この実施態様または他の実施態様において、検出法はINDIA(登録商標)HisProbe(登録商標)-HRP化学を使用するステップを含んでもよい。Perbio(登録商標)INDIAHisProbe(登録商標)-HRPプローブは、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)のニッケル(Ni²⁺)-活性化誘導体である。活性リガンドは、標的部分のその後の相互作用および検出のためにNi²⁺を活性型で結合させることができる三座配位子キレート剤である。活性なキレート剤は、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)に長い間使用されているイミノ二酢酸について報告されているものと同様の結合能力を有する。INDIA(登録商標)HisProbe(登録商標)-HRP化学以外に、さらに別の検出法、例えば、化学発光基質技術を使用してもよい。または、他の分離法を使用してもよい。

【0054】

提示システムが、試料のSERCA2aと別個である十分に集束されているまたは異なったバンドとして移動するように、分離法、例えば、プロットに基づいた技法を提示システムに実施することができる。分離法が実施されたら、本発明の方法により、ユーザーは試料から提示システムを明らかに誘導することができる。これは多重化の一例である。従って、本発明は、分離法実験からの真の定量データの作成を可能にする方法を提供する。

【0055】

一実施態様において、2つ以上の提示システムを使用して、試料中の標的部分の量を定

10

20

30

40

50

量することができる。この実施態様において、各提示システムは、使用する他の提示システムと異なる分子量を有してもよい。例えば、1つだけのドメインを含む提示システムを、2、3、4、5またはそれ以上のドメインを含有する提示システムと同じレーンまたはチャンネルに置き、異なる分子量の提示システムの「ラダー」を提供してもよい。好ましくは、提示システムの各々は、標的部分を含有する可能性のある試料との比較を容易にするために、同じ標的部分またはその一部のコピーを有する。

【0056】

この実施態様において、各提示システムは、他の提示システムと異なる濃度または量で存在してもよい。または提示システムは同じ濃度または量で存在してもよい。1つ以上の分離を使用する検出法を、複数の提示システムに実施してもよい。次いで、分離を使用する検出法の結果を使用して、試料中に存在する標的部分の量を求めるために使用することができる検量線を作成することができる。

10

【0057】

従って、一実施態様において、提示システムはプロットの1チャンネルに存在し、標的部分を含む可能性のある試料は別のチャンネルに存在する。異なる分子量の複数の提示システムを使用する実施態様では、提示システム試料の全てを1つのチャンネルにロードして、1つのレーンにいくつかの基準ポイントを提供することができる。同様に、異なる濃度で存在する複数の提示システムを含有する試料を使用する実施態様において、特定の提示システムを含有する各試料を同じレーンにロードして、1つのレーンに異なる濃度の例を提供することができる。本発明のこのような実施態様では、本発明の方法により、提示システムおよび標的部分を含有する可能性のある試料の1つの実験における同時の調査が可能になる。この実施態様は、有利なことに、分離を使用する技法が同時に両方に実施されるにもかかわらず、提示システムと試料間の明白な区別を提供する。

20

【0058】

または、提示システムおよび試料はプロットの同じチャンネルまたはレーンに存在してもよい。

【0059】

実施態様は、特異的な結合パートナーである薬物分子に結合することができる標的部分またはその一部を含む提示システムを提供する。次いで、提示システムによって作成される信号の強度を、試料の信号強度と比較することができる。

30

【0060】

別の実施態様において、結合パートナーは染色液または染料であってもよい。1つのような染色液は、標的部分またはその一部が糖タンパク質である場合に結合パートナーとなりうるPro-Qエメラルド(Molecular Probes)である。結合パートナーとしての染色液のさらに別の例は、リンタンパク質を含む標的部分に結合することができるPro-Dダイヤモンド(Molecular Probes)である。結合パートナーが染料または染色液である場合には、提示システムのドメインは実質的に「サイレント(silent)」であるべきであり、染料または染色液によって強力に認識または検出されてはいけない。

【0061】

好ましくは、結合パートナーはアプタマーである。アプタマーは、アミノ酸、薬物、タンパク質および他の分子に対して作製することができる人工核酸リガンドと規定されている新規合成DNAまたはRNAリガンドである。アプタマーは2本鎖DNAリガンドまたは1本鎖RNAリガンドであってもよい。それらは、吸着、回収および増幅の反復プロセスによって合成核酸の複雑なライブラリーから単離される(SELEX)。RNAアプタマーは、特異的な標的分子に対する親和性を有する核酸分子である。それらは、リガンド結合特性のために核酸抗体に結合している(Likened)。

40

【0062】

提示システムは、タグまたは検出可能な分子をさらに含んでもよい。タグは、提示システムの精製の機能を実施することができる。タグの位置は、提示システムのアミノ酸配列

50

に関してアミノ末端もしくはカルボキシ末端であってもよくまたは内部に挿入されてもよいことが考慮される。タグまたは検出可能な分子の他の例には、ポリHis-タグ、FLAG、STREP、GSTまたはGFPなどの蛍光標識を挙げることができるが、それに限定されるわけではない。別の実施態様において、タグは提示システムの標的部分またはその一部を含んでもよい。

【0063】

別の実施態様において、免疫沈降を分離方法として使用してもよい。免疫沈降は、抗体を形成した特異的なタンパク質の精製を可能にする技法である。従って、免疫沈降は、提示システムの一部を形成する標的部分またはその一部に対する抗体を使用して提示システムを単離するために使用することができ、次いで存在する場合には、試料から標的部分を単離するために使用することもできる。免疫沈降に次いで、分析のためにSDS-PAGEおよびイムノブロット法を実施することができる。本発明のこの実施態様において、免疫沈降の派生物である、特定の標的材料の「プルダウン」を可能にするアフィニティー相互作用、例えば、(his)₆タグ化タンパク質をプルダウンするNi-NTAビーズ、GST-タグ化タンパク質をプルダウンするグルタチオンビーズを使用してプロセスにおける段階の効率をモニターすることができる。

10

【0064】

本発明は、提示システムの制御された予測可能な製造を提供する。さらに、それは、提示システムのほぼ一様な電気泳動挙動ならびに試験試料および提示システム試料の多重化を含む高品質の特徴を示す較正標準を提供する。これは、試料スループットの増加という利点を有する。

20

【0065】

本発明のよりさらに別の態様において、試料中のSERCA2aタンパク質の量を定量する方法であって、

a) 抗体によって認識可能なSERCA2aのエピトープの少なくとも1つのコピーおよび抗体に無反応性のタイチンタンパク質由来の少なくとも1つのI27ドメインを含み、既知の分子量のものであるタンパク質を提供するステップ、

b) 特定の濃度で存在するタンパク質にウェスタンブロットを実施するステップ、

c) タンパク質によって作成される信号強度対タンパク質の濃度を含む少なくとも1つの比較ポイントを作成するステップ

30

を含む方法が提供される。

【0066】

好ましくは、タンパク質は一連の異なる濃度で存在し、比較ポイントは複数の比較ポイントを含み、検量線を提供する。好ましくは、次いで、比較ポイントまたは検量線を使用して、試料によって作成される信号強度と検量線を比較することによって、試料に存在するSERCA2aタンパク質の量を求める。好ましい実施態様において、エピトープはアミノ酸配列YLEPAILEを含む。

【0067】

別の実施態様において、SERCA2aタンパク質はセリン-38がリン酸化されている。好ましくは、タンパク質は、リン酸化SERCA2aタンパク質のエピトープを含む。特定の実施態様において、エピトープはアミノ酸配列³¹KLKERWGS(PO₄)NEL⁴¹を含む。

40

【0068】

本発明のよりさらに別の態様において、試料のタンパク質エピトープの量を定量するための方法であって、

(b) タンパク質エピトープの少なくとも1つのコピーおよび少なくとも1つのさらに別のタンパク質ドメインを含み、既知の分子量のタンパク質提示システムを提供するステップ、

b) 提示システムにウェスタンブロット実験を実施するステップであって、提示システムが特定の濃度で存在し、ウェスタンブロット実験が標的部分に特異的な結合パートナー

50

を使用し、さらに提示システムのタンパク質ドメインが結合パートナーに無反応性であるステップと、および

c) 技法において提示システムによって形成される信号強度対提示システムの濃度を含む比較ポイントを作成するステップを含む方法が提供される。

【0069】

好ましくは、提示システムは一連の異なる量で存在し、比較ポイントは、検量線を作成するために使用することができる複数の比較ポイントである。一実施態様において、提示システム内の標的部分の数の制御は、望ましい数の反応性残基を有するタンパク質を選択することによってまたはタンパク質エピトープの共有結合のための限られた数のアクセプター部位を含有するようにタンパク質の配列を工作することによって実施することができる。好ましい実施態様において、共有結合のための部位は1つだけである。別の実施態様において、タンパク質ドメインに結合して、提示システムを形成するためのタンパク質エピトープの部位は2つ以上であってもよい。本発明の利点は、提示システムの分子量は制御可能であるということである。これは、安定した状態で折りたたまされている数多くのドメインから作成される提示システムを使用することによって達成される。この実施態様において、ドメインはタンパク質ドメインである。提示システムにおけるドメインの数を変更することによって、提示システムの分子量を変更することができる。好ましい実施態様において、これらのドメインの1つは、修飾されているエピトープタンパク質からの共有結合を受容することができるアミノ酸を含有する。他のドメインはこの意味において不活性であるが、提示システムの分子量を制御するために存在し、試料の多重化を容易にし、多数の要素が存在する場合には、多数の提示システム要素の分離を容易にする（例えば、本明細書において以下に記載するシングルショットアプリケーション、2D電気泳動の内部標準）。

【0070】

本発明は、有利なことに、広いMr範囲において（10kDa～250kDaまたはそれ以上、または必要がある場合にはそれ以下）提示システムの分子量の正確な制御を可能にする。結果として、本発明は、標準および試験試料の多重化にフレキシビリティを提供する。それはまた、「シングルショット」における較正基準範囲の分注を可能にし、エンド-ユーザーの利便性を最大にする、較正基準技術の先端的なフォーマットの開発を可能にする。好ましい実施態様において、異なる分子量を有してもよい一連の提示システムに、分離法を実施すると同時に1つのチャンネルにロードする。この実施態様は、必要がある場合には、試料と比較するための種々の較正基準をユーザーに提供する。好ましい実施態様において、本発明の方法は、1つの実験で使用されて範囲を提供することができる複数の提示システムを使用する。複数の提示システムは異なる分子量であってもよく、特定のモル比で混合またはブレンドされて、1つの分離を使用する実験に使用することができるある範囲の提示システムを作成してもまたは2つの検出を同じ提示システムにおいて実施してもよい。

【0071】

本発明は、例にすぎないものとして添付の図面を参照することによってここで説明される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0072】

(構築物A: -(I27)₅)

タイチンのI27ドメインに関しては、システイン残基C47はエピトープペプチドの共有結合部位である。(実施例2、セクション「タイチンI27ドメインを含む骨格タンパク質を含む提示システムの実施態様の製造(詳細は(I27)₅と示されている)参照)。連続するI27の5つのコピーをコードする合成遺伝子を構築した。I27のコピー1、2、4および5はシステイン残基を欠損するが、コピー3はペプチド結合のために1つのcysを保持する。(His)₆モジュールは産物の精製のために含まれる。リンカ

10

20

30

40

50

一領域は独自の配列および制限部位を含有する(図4A参照)。

【0073】

ヒトタイチン分子の5つのI27ドメインを含む構築物をpET3dのHis6タグの下流に挿入した。ドメインI27₁、I27₂、I27₄、I27₅はシステイン残基が以下の突然変異C47SおよびC67Sで脱離されている。ドメインI27₃は63位(C63S)のシステイン残基が脱離されているが、47位にシステイン残基を保持する(図4A参照)。

【0074】

BLR(DE3)pLysS細胞系統(Novagen)において構築物を発現し、1mM IPTGによる誘導の4時間後に細胞を回収した。(I27)₅構築物の略図は図4A参照。構築に使用される独自の制限部位を図4Aに示す。

10

【0075】

(構築物B: -I39(I27)₄)

「I39」という用語は、マウスプライシング因子3b、サブユニット5遺伝子(Accession BC006603)のIMAGEコンソーシアムによって提供されるcDNAクローンであるIMAGEクローン3965951の略語として使用されている。マウスプライシング因子3b、サブユニット5遺伝産物は、1つのシステイン残基を含有する10kDaタンパク質である。

【0076】

I39 cDNAを増幅し、隣接する制限酵素認識部位、BssHII(5-prime)およびSacI(3-プライム)の付加を工作するためにPCRを使用した。これらの2つの制限酵素を使用して、(I27)₅構築物の中心のI27₃ドメイン(図4A)をI39 cDNA配列と置換して、I39(I27)₄構築物(図4B)を作製した。図4Bは、構築に使用される独自の制限部位を示す。

20

【0077】

BLR(DE3)pLysS細胞系統(Novagen)においてI39(I27)₄構築物を発現し、1mM IPTGによる誘導の1時間後に細胞を回収した。

【0078】

(構築物C: -I39pET14b)

「I39」という用語は、上記に考察するように、マウスプライシング因子3b、サブユニット5遺伝子(Accession BC006603)のIMAGEコンソーシアムによって提供されるcDNAクローンであるIMAGEクローン3965951の略語として使用されている

30

【0079】

I39 cDNAを増幅し、隣接する制限酵素認識部位、BamHI(5-prime)およびBlnI(3-prime)の付加を工作するためにPCRを使用した。これらの2つの制限酵素を使用して、発現ベクターpET14b(Novagen)の相反部位にPCR産物をクローニングした。構築目的のために、タンパク質のC-末端残基を改変した、N111T。I39pET14b構築物をロゼッタ-ガミ(Rosetta-gami)B(DE3)pLysS細胞系統(Novagen)において発現し、1mM IPTGによる誘導の4時間後に細胞を回収した。

40

【実施例1】

【0080】

本発明の方法を使用して、試料中のタンパク質SERCA2aを検出した。SERCA2aのC-末端を認識する抗体-CLEPAILEの提示システム(較正基準)は、0.1マイクロモルのペプチドYLEPAILE(1文字コード)を5マイクロモルのスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)と反応させ、ゲルろ過クロマトグラフィーによってペプチド-クロス-リンク複合体を精製し、9M尿素の存在下において(I27)₅(0.02マイクロモル)と共にペプチド-クロス-リンク産物をインキュベーションすることによって

50

較正 S E R C A - P S 3 8 について記載するように構築した。実施例 2 のセクション「構成基準（提示システム）の S E R C A P S - 3 8 認識」に詳細に記載するように、産物を水で透析し、B C A アッセイおよび質量分析を使用してタンパク質濃度を求めた。

【 0 0 8 1 】

（心筋筋小胞体試料における S E R C A の定量）

心筋筋小胞体（10 μg）および較正 - C L E P A I L E 基準（15 ~ 0.05 pmol）を 10% SDS - P A G E ゲルの個々のレーンで分離した。試料を P V D F 膜に移し、S E R C A 2 a 配列 L E P A I L E（1 : 5000 希釈）に特異的な抗体でプロービングした。ヤギ抗 - ウサギ I g G - ペルオキシダーゼおよび市販の化学発光基質調製物（P i e r c e）を使用してエピトープに結合する抗体を検出した。C C D カメラを使用して化学発光を検出した（図 3）。

10

【 0 0 8 2 】

試料中の S E R C A 2 a の量の定量は、デンストメトリーによる試料の分析バンド強度および構成基準によって実施することができる。提示システム（較正基準）の量に対する光学密度（バックグラウンド信号を補正）のプロットを作成するべきである。このプロットは較正基準曲線であると考えられる。試料の S E R C A 2 a タンパク質含量は、このプロットから試料の光学密度信号（バックグラウンドを補正済み）をエピトープの pmol e に変換することによって、較正基準曲線を使用して算出することができる。

【 0 0 8 3 】

上記の実施例は、本発明の提示システムおよび方法を使用して試料中の標的部分をポジティブに同定し、試料中の標的部分の量を定量することができる方法を示す。

20

【実施例 2】

【 0 0 8 4 】

実施例 2 は、提示システムおよび本発明の方法を使用して試料中の標的部分をネガティブに同定することができる方を示す法、すなわち標的部分が試料中に存在しない。

【 0 0 8 5 】

筋小胞体 C a 2 + - A T P a s e（S E R C A 2 a）のセリン - 3 8 のリン酸化を検出するために本発明の方法を使用した。標準的なウェスタンプロット方法は、キナーゼ処理した筋小胞体小胞および単離ラット心室筋細胞においてセリン - 3 8 リン酸化 C a 2 + - A T P a s e を検出しなかった。

30

【 0 0 8 6 】

心筋アイソフォームの筋小胞体 C a 2 + - A T P a s e（S E R C A 2 a）のセリン - 3 8 のリン酸化は、酵素活性をかなり大きく増強することができる通常の事象と記載されている。これらの観察の直接確認は現れそうにない。C a 2 + - A T P a s e のリン酸化セリン - 3 8 エピトープに完全に特異的であるポリクローナル抗体を使用して、単離筋小胞体小胞および単離心室筋細胞における S E R C A 2 a のリン酸化を評価した。定量的なウェスタンプロット方法は、キナーゼ処理した筋小胞体小胞または好適に刺激した心筋細胞においてセリン - 3 8 リン酸化 C a 2 + - A T P a s e を検出しなかった。本発明の提示システムは、アッセイの検出感度（0.03 ~ 0.1 pmol）は C a 2 + - A T P a s e 分子のセリン - 3 8 のわずか 1% のリン酸化を検出するのに十分であることを確認した。100 k D a のリンタンパク質はウサギ心臓 S R 調製物において明らかであったが、それはホスホ - セリン - 3 8 特異的抗体（2）によって認識されなかった。

40

【 0 0 8 7 】

（ホスホ - 特異的抗体の作製）

ペプチド³¹K L K E R W G S N E L⁴¹の C a M K I I リン酸化によって、S e r - 3 8 残基がリン酸化された C a²⁺ - A T P a s e ペプチド（³¹K L K E R W G S（P O 4）N E L⁴¹）を作製した。逆相高速液体クロマトグラフィーによってホスホペプチドを均一になるまで精製した。カルボジイミド架橋（3）を使用して、ペプチドをキーホールリンペットヘモシアニン（K L H）に結合し、緩衝液（50 mM T r i s - H C l p H 7.2、150 mM N a C l）で十分に透析した。ニュージーランドシロウサギ成獣を

50

~ 150 µgのKLHで免疫し、6週間隔でペプチドを付着し、免疫化後11日めに免疫血清を回収した。血清を調製し、-70℃で保存した。ポリクローナル抗血清は本明細書に記載されている。SERCA PS-38はリン酸化ペプチドに対して形成された。

【0088】

(タイチンI27ドメインを含む骨格タンパク質を含む提示システムの実施態様の製造(I27)₅と示す)

タイチンのI27の突然変異型のコンカテマーをコードする遺伝子を使用した。構築物は、2つのC-末端システイン残基が欠損しているという点においてBrockwellら(4)に記載されているものと異なる。それは本発明の検討において(I27)₅と呼ぶ。Brockwellら(4)に記載されているように、(I27)₅を発現し、精製した。

10

【0089】

(提示システム：コンカテマーに結合したペプチドを含む実施態様)

0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M NaClを含有する緩衝液pH7.2中で、精製したリン酸化Ser-38ペプチド(³¹KLKERWGS(PO₄)NEL⁴¹)(0.1 µmol)を過剰量のスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)架橋剤(5 µmol)と混合した。室温において1時間インキュベーション後、Superdex Peptide HR 10/30カラム(Pharmacia Biotech)を使用するゲルろ過クロマトグラフィーによってマレイミド-活性化ペプチドを精製した。クロマトグラフィーは、0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.2および流速0.25 ml/minを使用して実施した。関心対象の分画をプールし、尿素を分画に添加して、最終尿素濃度を9Mにした。(I27)₅コンカテマー(0.1 µmol)を混合物に添加し、室温において2時間インキュベーションした。結合物を水で十分に透析した。最終産物(本発明による提示システム)を-20℃において保存した。同じ手法を実施してSERCA 2aペプチド(YLEPAILE)を(I27)₅コンカテマーに結合して、別の提示システムを製造した。BCAアッセイ(5)によってタンパク質濃度を求めた。

20

【0090】

(イムノブロット分析)

Laemmli(8)によって記載されているように、10%および15%ポリアクリルアミドゲルを使用するSDS-PAGEによって心筋タンパク質を分離した。分離後、セミドライブロッティングによってタンパク質をPVDF膜(Pall BioSupport, Portsmouth, UK)に移し、5%ドライミルクおよびTris-緩衝生理食塩液(pH 7.4)、0.1% Tween 20を使用して室温において2~4時間非特異的結合部位をブロックした。膜を一次抗体: Thr-17リン酸化型のホスホランバンのPT-17(1:5000)(6); SERCA 2aの-CLEP(1:5000)(16); およびSer-38リン酸化型のCa²⁺-ATPaseに特異的なSERCA PS-38(1:5000)抗血清で4℃において終夜ブローディングした。ウサギにおいて形成した西洋ワサビペルオキシダーゼ-標識二次抗体(ヤギ抗-ウサギIgG(H+L); Jackson Immunochemicals; ロットナンバー38179)またはプロテインAペルオキシダーゼ(Sigma)を2つの高感度化学発光検出システム(SuperSignal West Pico Chemiluminescent SubstrateおよびSuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce)と併用して、一次抗体を可視化した。Fuji LAS-1000 Imaging System CCD Camera(分析用AIDAソフトウェア)を使用してデータを捕獲した。

30

40

【0091】

SERCA 2のSer-38のリン酸化は、Ca²⁺-ATPase活性をかなり大きく活性化することができる通常の特徴と記載されている。この部位は、SERCA 2に独

50

自であるが、SERCA1とSERCA2の間で、特に残基39の前方で高度に保存されているタンパク質セグメント内に含有される。従って、2つのタンパク質はこの領域において同等の構造を示す可能性がある。2つの高解像度構造が存在するSERCA1との類似によって、SERCA2のリン酸化のSer-38部位は、タンパク質の表面に露出している可動性の大きいセグメントであることが予測される。このセグメントは、酵素の配座の両極端(E1、E2)において溶媒露出を維持し、これらの状態においてキナーゼおよびホスファターゼに接近しやすいと思われる。これらの特性により、表面に露出しているとき、部位に抗体を結合させ、可動性を大きくする。本発明者らは、心筋におけるSer-38リン酸化の頻度および役割を規定する目的で、この特徴に対するリン酸化-部位特異的抗体を作製した。ポリクローナル抗体を配列³¹KLKERWGS(PO4)NEL⁴¹に対して作製し、示すようにSer-38をリン酸化した。ホスホペプチドは抗原に結合する抗体の強力な阻害剤だったが(IC₅₀ 18 nM)、等価な脱リン酸ペプチドは抗体：抗原認識を妨害することができなかつたので、このポリクローナル抗血清、SERCA PS-38はリン酸化ペプチドに完全に特異的であった。

10

【0092】

(校正基準(提示システム)のSERCA PS-38認識)

ポリクローナル抗体SERCA PS-38がリン酸化Ser-38エピトープに完全に特異的であることを確認し、本発明者らは、CaMKIIに心臓SR小胞を接触後、SERCAのこの残基のリン酸化状態を調査した。SERCAはこれらのウェスタンブロット実験において検出されなかつた。ネガティブな結果は、抗体または実験の技術的な失敗を記録するのではなく、Ser-38リン酸化の頻度に関する情報を提供していることを確実にするために、このネガティブな結果の基礎を確立することが重要であった。このために、本発明者らは、既知の分子量の不活性な骨格タンパク質に結合している標的部分、この場合には、ホスホペプチドエピトープを含む提示システムを構築した。この骨格タンパク質は、ペプチド結合のための1つの部位を含有し(図1A)、正確な定量に理想的なエピトープペプチドの提示のための均一な構造を提供するので、選択した。

20

【0093】

使用した提示システムは、コンカテマー配列から1つ以外の全てのシステイン残基を脱離させるように突然変異された、タイチン由来のドメイン(I27)の5つのコピーからなるコンカテマーを含んだ(図1A)。標的部分、この場合には、精製ホスホエピトープペプチドを、タンパク質のシステイン残基のみを介して(I27)₅コンカテマーに結合し(図1Aに略図で示す、I27ドメイン3のC47)、ペプチドの共有結合の化学量論は質量分析によって評価した。コンカテマーへのペプチド結合の低い化学量論(最終産物の質量54124 Da、標識校正-38、図1B)がこの場合に観察され、総調製物の5.4%を含む。にもかかわらず、コンカテマーへの結合はこのような低いレベルでも免疫検出に十分であることが証明された(図1C)。抗体SERCA PS-38は関連するホスホペプチド(校正-38)で修飾されたコンカテマー産物を認識したが、60 pmolのコンカテマーが提供された場合でも、関係のないペプチド(校正-CLEP)で修飾された同じコンカテマー(I27)₅を認識しなかつたことを図1Cは示している。校正基準は、SDS-PAGEにおいて~60 kDaの単一の分子種として移動する。さらに、リン酸化エピトープは、標準的な(SuperSignal West Pico, Pierce)ECL基質を使用すると、抗体SERCA PS-38によって高感度で、0.1 pmolエピトープペプチドの下限まで検出された(図1C)。

30

40

【0094】

校正基準(校正-38)は若干の少量の夾雑物を含有した。質量スペクトルに見られる51230 Daの夾雑物はペプチドを受容するとは思われなかつた(ウェスタンブロット実験では検出されない、図1C)。この物質は、総タンパク質にかなり寄与したので、産物(校正-38)の割合の算出に含まれた。(I27)₅調製物の第2の夾雑物はペプチドによって共有結合により標識される。それは高Mr(~250 kDa、図1C)の複合体の免疫染色に内在する。この産物は質量スペクトルにおいて検出されず、校正-38調製物

50

において低量が存在する。それは総タンパク質に大きな寄与をせず、この検討において実施される定量における考慮から除外された。

【0095】

従って、SERCAリン酸化は、すべてに生ずる場合には、検討した細胞(10,000の生筋細胞)において0.03 pmol未満のSer-38リン酸化を形成すると本発明者らは結論づける。以前の検討において、同様の介入後の筋細胞におけるホスホランバンのSer-16リン酸化は8.5 pmol / 1,000細胞であると定量されており(7)、本発明の検討の10,000細胞において少なくとも85 pmolのホスホランバンが存在することを示す。ホスホランバンおよびSERCAは心筋において同様の量で発現されるので(SERCAあたり2ホスホランバン、(1))、本発明者らは、実施した実験において42 pmolのSERCAを予測してもよい。本明細書に記載する抗体でSer-38ホスホタンパク質を検出できなかったのは、CaMKII刺激物質で処理したラット心筋細胞ではSERCAは0.1%未満しかリン酸化されないことを示唆している。本発明の検討は、SERCA2のリン酸化Ser-38エピトープに完全に特異的なポリクローナル抗体を記載している。抗体は、校正基準のリン酸化エピトープを高感度(0.03~0.1 pmol)で検出することができた。しかし、大量のSERCA(10~60 pmol)の提示および100 kDaのホスホタンパク質の存在にもかかわらず、それは種々の動物種由来の心臓SR試料においてSERCA2を認識しなかった。SERCAはSer-38がリン酸化されないことまたはSERCA分子は少量しか(すなわち、~1%)Ser-38がリン酸化されないことをこれは示している。単離心筋細胞のCaMKII活性化は、4つの独立した刺激を使用して実施し、ホスホランバンはThr-17がリン酸化された。同じ実験において校正基準の免疫検出は0.03 pmolであるにもかかわらず、これらはどれもこの抗体を使用して検出可能なSERCAのSer-38リン酸化を生じなかった。無傷の心筋細胞におけるCaMKII活性化刺激に応答して、SERCA分子の0%~0.1%がSer-38がリン酸化されていることをこれは示している。この検討は、SERCA2aのSer-38リン酸化は心筋細胞または心臓SR調製物において重要な事象であるという証拠を提供していない。

【実施例3】

【0096】

図5に示すように、3つの異なるペプチド(PS-38、PT-17およびA1)を、チオール特異的なマレイミド(maleimide)反応基を介して同じ構築物および同じでない構築物の遊離チオール基に結合した。(A) = (I27)₅ + PS-38、PT17またはA1。(B) = I39 - (I27)₄ + PS-38、PT17またはA1(A = マーカー、kDa = キロダルトン)。

【0097】

結合反応は、GMB S - 修飾ペプチド(H₂Oに溶解)に対するコンカテマー(同じおよび同じでない)(20 mM NaPO₄、0.5 M NaClおよび8 M尿素を含有する結合緩衝液に溶解)のモル比1:100を混合するによって実施した。GMB Sはヘテロ二官能性架橋剤である。本明細書において使用するとき、それはチオール指向性反応性基を含有する。GMB Sのアミン反応基は、ペプチドの化学合成中にペプチドのN-末端に分子を結合するために使用された。混合物を室温において2時間放置した。

【0098】

各反応の試料を12% SDS-PAGEゲルで泳動し、ウェスタンブロットのために終夜移動させた。各ペプチドに特異的な抗体を使用して、結合物を検出する。

PS-38一次抗体 = ウサギ抗-PS-38ポリクローナル(5000倍希釈)。

PT17一次抗体 = ウサギ抗-PT17ポリクローナル(5000倍希釈)。

A1一次抗体 = マウス抗-A1モノクローナル(5000倍希釈)。

【0099】

二次抗体を使用して一次抗体の信号を増幅する。ウサギ一次抗体には、ヤギ-抗-ウサギHRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)二次抗体を使用する(5000倍希釈)。マウ

10

20

30

40

50

ス一次抗体には、ヤギ - 抗 - マウスHRP二次抗体を使用する(5000倍希釈)プロットは、Perbio SuperSignal West Pico Chemiluminescentキット(反応の詳細は上記参照)を使用して画像化した。

【実施例4】

【0100】

(関連のない抗体との結合は交差 - 認識がない)

(実施例3と同様に)A1、PS-38またはPT17ペプチドに結合した(I27)₅およびI39-(I27)₄の試料ならびにネイキッド(未結合)コンカテマー骨格を12%SDS-PAGEゲルにトリプリケートで泳動させた。次いで、ウェスタンプロットのための膜にゲルを終夜移動させた。次いで、膜を3つに分割し、各ペプチドのエピトープに特異的な抗体でプロービングした。従って、抗体は特異的なエピトープだけを認識し、異なるペプチドのエピトープまたはコンカテマー自身の任意の部分を認識しないはずである。各抗体は、形成されたペプチドの特異的なエピトープだけを認識し、任意の他のペプチドのエピトープを認識しないことを示すウェスタンプロット(データは示していない)を本発明者らは作製した。また、抗体はネイキッドコンカテマー(標的部分を含有しない提示システム)自体を認識せず、結合しない。

10

【実施例5】

【0101】

(異なるサイズの結合物(提示システム)のブレンド)

同じ試料中の少なくとも2つの異なるサイズの結合物の混合物を泳動し、明確に分離し、プロービングすることができることを示すために、実施例3に記載するように作製した、(I27)₅およびI39-(I27)₄とA1ペプチドの結合ならびに(I27)₁とA1ペプチドの結合物をブレンドした(それぞれ、A1-(I27)₅+A1-(I27)₁およびA1-I39-(I27)₄+A1-(I27)₁)。このブレンドは、同じコンカテマードメインに基づいた結合物に限定されず、結合物の1つが異なる官能性ドメインを有する場合(I39-(I27)₄)にも有効となりうる。図6参照。

20

【実施例6】

【0102】

(ホスホタンパク質特異的染料による較正基準/結合物の染色)

結果は図7および図8参照。PS-38-(I27)₅、PT17-(I27)₅およびA1-(I27)₅の試料を12%SDS-PAGEゲルで泳動し、Pro-Qダイヤモンド(Molecular Probes)と呼ばれるホスホタンパク質特異的染料で染色した。PS-38およびPT17だけがリン酸化されているので、PS-38-(I27)₅およびPT17-(I27)₅だけが検出されるはずである。A1はリン酸化されていない、従ってA1-(I27)₅は検出されない。全ての試料および手法は、染料製造業者の取扱説明書により実施した。

30

【0103】

使用したマーカーはPeppermint Stickホスホタンパク質分子量標準(Molecular Probes)であり、45(卵白アルブミン=リン酸化されている)および23.5kDa(-カゼイン=リン酸化されている)の陽性対照も含有する。PS-38-(I27)₅は、それぞれ、40および20μlの2つの異なる容量をロードした。

40

【0104】

Pro-Q染色ゲル(図7の左側)は、未リン酸化結合物またはタンパク質とは明白にリン酸化結合物を主に検出することを示している。これは、リン酸化タンパク質の光学密度は、若干のバックグラウンド蛍光(Peppermint Stickホスホタンパク質の非-ホスホタンパク質要素でも見られる)を有する未リン酸化タンパク質より大きいことによってもわかる。

【実施例7】

【0105】

50

(結合物の完全な定量および校正基準の作成)

フルオロフォア (Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)) を使用すると、結合実験において作製される結合物 (提示システム) の正確な量を求めることができた。製造業者の取扱説明書により、(I27)₅ および (I27)₁ を 100 倍過剰モルの Alexa Fluor 488 と反応させた。図 10 参照。結合混合物を水で透析して、過剰の未結合のフルオロフォアを除去した。フルオリメータ (結合物によって放射される蛍光を測定する)、分光光度計 (総タンパク質含量を測定する A_{280nm}、Alexa Fluor 488 含量を測定する A_{493nm}) およびフルオロフォアの製造業者 (Molecular Probes) によって提供される式を使用して結合の程度を求めた。(I27)₅ と Alexa Fluor 488 の結合は 100% (Alexa - (I27)₅ を作製する) であり、(I27)₁ と Alexa Fluor 488 の結合は 12% (Alexa - (I27)₁ を作製する) であることが算出された。標識化の程度が判定されたので、結合物の正確で真の校正を作成できると思われる。

10

【0106】

検量線用の Alexa - (I27)₅ 結合物を 15% SDS - PAGE ゲルにトリプリケートでロードし、ウェスタンブロットのために移し、次いで抗 - Alexa Fluor (ウサギポリクローナル IgG 分画) 一次抗体 (3000 倍希釈)、次いでヤギ - 抗 - ウサギ HRP 二次抗体 (5000 倍希釈) を使用してプロービングした。次いで、先に記載されているように、ブロットを展開した。また、Alexa - (I27)₅ および Alexa - (I27)₁ の 3 つの異なるブレンドもロードし、結合物のブレンド能力は、コンカテマーに結合する物質による影響または決定を受けないことを示している。ウェスタンブロット (示していない) は、コンカテマーに結合されている部分はペプチドに限定されないことを実証している。

20

【0107】

検量線を作成する 7 つの異なる量のキャリブ rant: 5 pmol、2.5 pmol、1.25 pmol、0.63 pmol、0.31 pmol、0.16 pmol および 0.08 pmol の Alexa - (I27)₅ をトリプリケートでロードした。

【0108】

各量の Alexa - (I27)₅ の各バンドの光学密度を測定し、同様の量を平均し、エクセルにプロットして検量線を作成した (図 12、平均 + / - 標準偏差)。次いで、この検量線を使用して、以前には未知の量の試料を求めることができる。

30

【実施例 8】

【0109】

(イヌ筋小胞体のホスホランバン量を求めるための A1 - (I27)₅ の検量線の使用)
先に記載されているように、検量線用の 5 pmol、2.5 pmol、1.25 pmol、0.63 pmol、0.31 pmol、0.16 pmol および 0.08 pmol の A1 - (I27)₅ を 15% SDS - PAGE にトリプリケートでロードし、ウェスタンブロットのために移し、A1 エピトープについてプロービングした。A1 エピトープは、筋小胞体 (SR) 膜に存在するホスホランバン (PLB) と呼ばれるタンパク質由来である。イヌ筋小胞体 (CSR) の 3 つの試料もゲル/ブロットにロードし、試料中の PLB 量を、CSR の PLB の A1 エピトープ (A1 - (I27)₅ 結合物を作製するために使用した A1 ペプチドに存在する同じ A1 エピトープ) を認識する抗 - A1 (マウスモノクローナル) 一次抗体を使用して求めた。

40

【0110】

検量線 (図 12) を作成する 7 つの異なる量のキャリブ rant: 5 pmol、2.5 pmol、1.25 pmol、0.63 pmol、0.31 pmol、0.16 pmol および 0.08 pmol の A1 - (I27)₅ をトリプリケートでロードした。各量の A1 - (I27)₅ の各バンドの光学密度を測定し、同様の量を平均し、エクセルにプロットして (図 12 参照、平均 ± 標準偏差)、検量線を作成した。この検量線を使用して、各 CSR 試料の以前には未知の量の PLB の量を求めることができる。図 12 の線を使用して

50

、各CSR試料のPLBのpmol量を算出した。

【実施例9】

【0111】

(2つの異なる検出方法および2つの異なる認識エピトープを使用するPS-38-(I27)₅構築物の検出)

図13に関して、レーン1~4は、20、15、10および5pmolのPS-38-(I27)₅結合物のロードを示す。パネルAでは、プロットをPerbio(商標)INDIA HisProbe(商標)-HRPプローブでプロービングした。剥離後、プロットを、PS-38結合ペプチドに特異的なポリクローナル抗体で再プロービングした、パネルB。プロットを再度は戻し、His-6タグに対するモノクローナル抗体(Novagen)を使用して最後のプロービングを実施した、パネルC。

10

【0112】

図13のパネルAは、His6タグエピトープを認識する非-抗体媒介Perbio(商標)INDIA HisProbe(商標)-HRPプローブを使用したPS-38-(I27)₅構築物の検出を示す。従って、His-6タグは、この実施態様において標的部分の1つであると考えられる。

【0113】

図13のパネルBは、PS-38ペプチドに対して形成された一次抗体を使用したPS-38-(I27)₅構築物の検出を示す。(パネルBの約150kDaにおける追加のバンドは、構築物のオリゴマーであると考えられるが、夾雑物である可能性もある)。

20

【0114】

図13のパネルCは、His6タグに対して形成された一次抗体を使用したPS-38-(I27)₅構築物の検出を示す。従って、一次抗体は特異的な結合パートナーであると考えられ、His6タグは標的部分である。

【0115】

パネルA、BおよびCは、提示システムは異なる検出方法によって、異なる結合パートナーを使用して、すなわち、修飾酵素(パネルA)および抗体(パネルBおよびC)によって認識されうことを示している。さらに、同じ提示システムの異なる標的部分を検出に使用することができる: His6エピトープ(パネルAおよびC)およびPS-38ペプチドのエピトープ(パネルB)。

30

【実施例10】

【0116】

図15に関して、I27モジュールを含有しない(I39)₁ドメインが示されている。室温において100過剰モルのGMBS-PT17を用いて(I39)₁への結合を実施した。先に記載されているように、試料を15%SDS-PAGEゲルで泳動し、ウェスタンブロットのために移し、抗-PT17抗体でプロービングした。プロットは、室温における結合後にPT17-(I39)₁の検出を示す。

【実施例11】

【0117】

(A1-(I27)₁およびA1-(127)₅結合物の免疫沈降)

40

標準的なプロトコールを使用して、抗-A1特異的モノクローナル抗体を用いてA1-(I27)₁結合物を免疫沈降させた。回収した試料をウェスタンブロットで分析することによって(異なる量)、A1-(I27)₁の検量線を使用して回収された量を求めることができる。この実験では免疫沈降は成功せず、回収されたA1-(I27)₁は0%であった(データは示していない)。

標準的なプロトコールを使用して、抗-A1特異的モノクローナル抗体を用いてA1-(127)₅結合物を沈降させた。回収した試料をウェスタンブロットで分析することによって(異なる量)、検量線を使用して回収された量を求めることができる。図17は、A1-(127)₅IP試料およびA1-(127)₅キャリブランチのウェスタンブロットを示す。7つの異なる量のキャリブランチは検量線を作成する: 5pmol、2.5p

50

mol、1.25 pmol、0.63 pmol、0.31 pmol、0.16 pmol および 0.08 pmol の A1 - (127)₅。

【0118】

各量の A1 - (127)₅ キャリブランチの各バンドの光学密度を測定し、エクセルにプロットして、図18の線を作成した。この検量線を使用して、IPにより A1 - (127)₅ の回収された量を求めた。グラフを使用して、IPにより回収された A1 - (127)₅ の pmol 量を以下に算出した。

【0119】

A1 - (127)₅ は明らかに免疫沈降されたが（レーン A1 回収試料2）、プロテイン A ビーズ単独ではほとんど沈降しなかった（対照回収）。検量線試料および免疫沈降試料のデンストメトリーは、免疫沈降において 0.53 pmol の A1 - (127)₅ の算出を可能にした。効率 100% である場合には、30 pmol の A1 - (127)₅ が回収されたと思われる、従ってこのプロセスは効率 1.77% であった。

10

【0120】

データはまた、プロセスのどこで効率の悪さが導入されたかの同定を可能にする。対照試料上清および A1 上清の定量により、免疫沈降過程の最終段階において A1 抗体によって除去される A1 - (127)₅ 材料の記載を可能にする。これは、可能性のある 100 pmol のうちの 50 pmol であり、すなわち効率 50% であった。免疫沈降後の種々の洗浄ステップは産物のかなりの損失の原因となっており、最終収率（または効率）は 1.77% であった。この定量的なアプローチは、実験（または産業）プロセスの個々のステップの有効性の記載を可能にする。

20

【0121】

従って、この実施例において、本発明の提示システムおよび方法は、プロセスのどのポイントが最も効率が悪く/良く、改善により利益を生じると思われることを評価するために、IP 技法の効率を全ての段階においてモニターするために使用することもできることが考慮される。本発明の提示システムおよび方法は他の技法の効率をモニターするためにも使用することができると考えられる。

【0122】

参照文献

【表 1】

1. Colyer, J., Wang, J.H. (1991) *J Biol Chem.* **266**, 17486-93.
2. Goodfriend, T., Fasman, G., Levine, L. (1964) *Science* **144**, 1344-1346.
3. Gopalakrishna, & Anderson (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **104**, 830-836
4. Brockwell, D.J., Beddard, G.S., Clarkson, J., Zinober, R.C., Blake, A.W.,
Trinick, J., Olmsted, P.D., Smith, D.A., Radford, S.E. (2002) *Biophys J.* **83**,
458-72. 10
5. Li, C, Wang, J.H., Colyer, J. (1990) *Biochem.* **29**, 4535-4540.
6. Drago, G.A., Colyer, J. (1994) *J. Biol. Chem* **269**, 25073-25077.
7. Brette, F., Calaghan, S.C., Lappin, S., White, E., Colyer, J., Le Guennec, J.Y.
(2000) *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **279**, H1963-71. 20
8. Laemmli, U.K. (1970) *Nature Lond.* **227**, 680-685.
9. Rodriguez, P., Jackson, W.A., & Colyer, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**,
17111-17119

【図面の簡単な説明】

30

【 0 1 2 3 】

【図 1】セリン - 38 提示システムの特異的な認識を示す図である (較正基準)。図 1 A は、較正基準の略図を示す (較正 - 38 と呼ぶ)。参照文献 9 に記載する (I 27)₅ コンカテマーの第 3 ドメインのシステイン残基にエピトープペプチドを共有結合した。図 1 B は、エレクトロスプレー質量分析によって記載される較正 - 38 組成を示す。産物 (較正 - 38) を基板 (I 27)₅ 要素および夾雑物から分離する。* で印をつけた要素は産物の収率 (5.4%) の算出に含まれた。C) 較正 - 38 (0.06 ~ 3.2 pmol) および較正 - CLEP (0.3 ~ 60 pmol 総 (I 27)₅ タンパク質) を、10% SDS - PAGE ゲルによる電気泳動後に、抗体 SERCA PS - 38 (1:5000 希釈) を用いるウェスタンブロット法で分析した。SERCA PS - 38 は、0.1 pmol 以上のロード量で較正 - 38 産物 (~ 60 kDa) を検出した。図 1 C は、較正 - 38 だけが抗 - SERCA - 38 抗体によって認識されることを示しており、提示システムは免疫学的にサイレントであることを確認している。

40

【図 2】抗体 SERCA PS - 38 によって検出されないラット心筋細胞における SERCA リン酸化を示す図である。従って、図 2 は陰性の結果である。単離したラット心筋細胞は、特に記載しない限り、0.5 Hz で 5 分間電氣的に鼓動させた。細胞 (A; 10, 000; B; 2, 500; 棒状体細胞計数) は、さらに介入しないで (対照レーン 1) または 1 μM イソプロテレノールで処理し (レーン 2)、増加的な刺激頻度に暴露し (2.5 Hz; レーン 3)、2.5 mM の細胞外カルシウムに暴露し (レーン 4)、または 1 μM カリクリン A に暴露した (レーン 5)。A) 較正 - 38 (濃度範囲 0.01 ~ 3. 50

2 pmol) およびラット筋細胞に SDS - PAGE (10% ポリアクリルアミド) を実施し、P V D F 膜に移した。プロットを抗体 SERCA P S - 38 (1 : 5000) でプロービングし、ヤギ抗 - ウサギ I g G ペルオキシダーゼおよび高感度化学発光基質 (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce) で可視化した。B) 平行実験において、筋細胞を 15% SDS - PAGE によって分離し、P V D F 膜に移した。抗体 P T - 17 (1 : 5000) を使用してスレオニン 17 リン酸化ホスホランパンを検出した。

【図 3】異なるレーンに SERCA 2 a タンパク質の種々の濃度の提示システムおよび SERCA 2 a タンパク質を含む試料を含有する 1 つのレーンを保有する SDS - PAGE ゲルを示す図である。図 3 は、陽性対照として使用される本発明の実施態様を示す。

10

【図 4 A】5 つの同じ I 27 ドメインを有する (I 27)₅ 構築物の略図である。ドメイン 3 は、チオール特異的反応基を有するペプチドの共有結合のための遊離チオール基 (C 47) を含有する。図 4 A はまた、対応する遺伝子の独自の制限部位の位置も示す。

【図 4 B】4 つの同じ I 27 ドメインおよび同じでない I 39 ドメインを有する I 39 - (I 27)₄ 構築物の略図であり、同じでないドメインを含む提示システムを示す。I 39 ドメインは、チオール特異的反応基を有するペプチドの共有結合のための遊離チオール基 (C 41) を含有する。図 4 B はまた、対応する遺伝子の独自の制限部位の位置も示す。

【図 5】チオール特異的マレイミド (maleimide) 反応基を介する同じおよび同じでないコンカテマーの遊離チオール基への 3 つの異なるペプチド (P S - 38、P T 17 および A 1) の結合の成功を示す図である。(A) = (I 27)₅ + P S - 38 / P T 17 または A 1。(B) = I 39 - (I 27)₄ + P S - 38 / P T 17 または A 1。(M = マーカー、k D a = キロダルトン)。実施例 6 参照。

20

【図 6】A 1 - (I 27)₅ および A 1 - I 39 (I 27)₄ は共に異なる比で A 1 - (I 27)₁ とブレンドが成功して、較正基準の「ラダー」を示すことができることを示すウェスタンプロットである。(A) = A 1 - (I 27)₅ と A 1 - (I 27)₁ のブレンド。(B) = A 1 - I 39 - (I 27)₄ と A 1 - (I 27)₁ のブレンド。試料は、15% SDS - PAGE ゲルで泳動する。結合およびウェスタンプロットは先に記載するように実施した。

【図 7】リン酸化結合物の特異的な検出を示す Pro - Q 染色ゲル (図 7 A) および、右側には (図 7 B)、各試料の総タンパク質含量を示すクーマシー染色ゲルを示す図である。マーカーは、45 k D a (卵白アルブミン = リン酸化) および 23.6 k D a (- カゼイン = リン酸化) の陽性対照も含有する、Peppermint Stick リンタンパク質分子量標準 (Molecular Probes) である。P S - 38 - (I 27)₅ は、それぞれ、40 および 20 μ l の 2 つの異なる容量をロードした。

30

【図 8】総タンパク質クーマシー染色に対する割合として表す Pro - Q 染色リンタンパク質の光学密度 (A I D A Image Analyser (Raytest) を使用して測定) を示す棒グラフである。図 8 は、リン酸化結合物の光学密度は、ネイキッド未結合コンカテマー骨格および非リン酸化結合物の固有のバックグラウンド蛍光より有意に高いことを示している。

40

【図 9】試料容量が変化するときの光学密度の比例的な変化を示す棒グラフである。リン酸化結合物の試料容量を半分にするによって、試料の光学密度も約半分低下する。従って、コンカテマー / 結合物は、染料の較正基準として使用することができる。

【図 10 A】A l e x a - (I 27)₅ (実施例 7 参照) の略図であり、図 10 B は A l e x a - (I 27)₁ (実施例 8 参照) の略図である。

【図 11】A l e x a - (I 27)₅ 結合物 (提示システム) の検量線を示す図である (実施例 7 参照)。

【図 12】A 1 - (I 27)₅ 結合物 (提示システム) の検量線である。

【図 13】2 つの異なる検出方法および 2 つの異なる認識エピトープを使用する P S - 38 - (I 27)₅ 構築物の検出を実証する図である。

50

【図14】同一分子の2つの別個のエピトープを使用するPT17-(I27)₅構築物を検出した図である。レーン1は、His6タグエピトープに対する一次モノクローナル抗体を使用する5 pmolのPT17-(I27)₅の検出を示す。レーン2は、剥離し、PT17ペプチドに対して形成された抗体で再-プロービングした同じプロットを示す。

【図15】(I39)₁へのPT17ペプチドの結合を示す図である。

【図16】室温において(I139)₁へのPT17ペプチドの結合を示すウェスタンブロットである。

【図17】A1-(I27)₅結合物の免疫沈降を示す図である。

【図18】A1-(I27)₅結合物の免疫沈降を示す図である。

【図1】

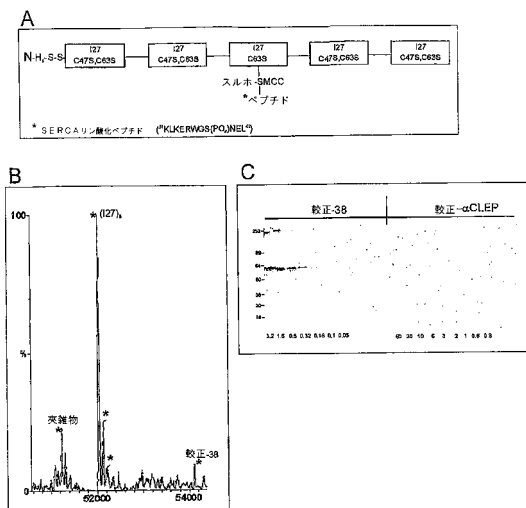


Figure 1

【図2】

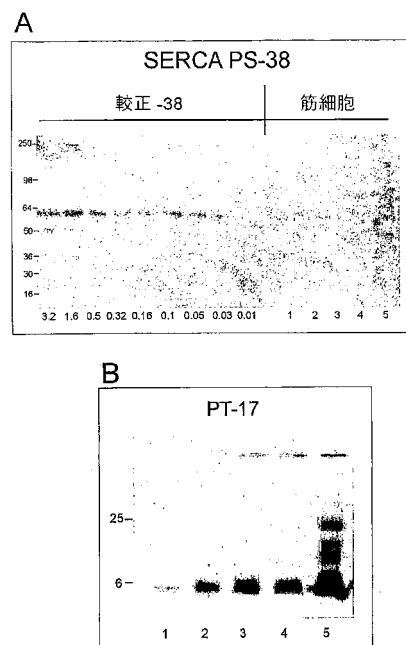
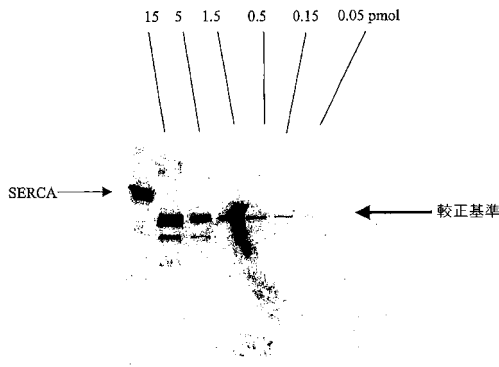


Figure 2

【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4

Figure 4A

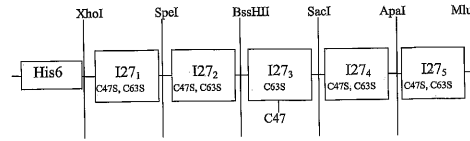
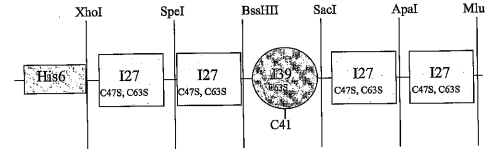
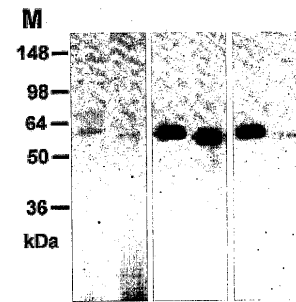


Figure 4B



【 図 5 】

Figure 5



【 図 6 】

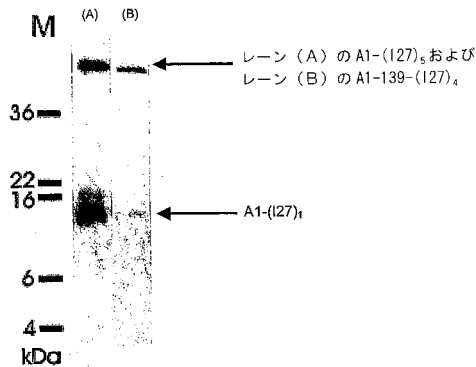


Figure 6

【 図 8 】

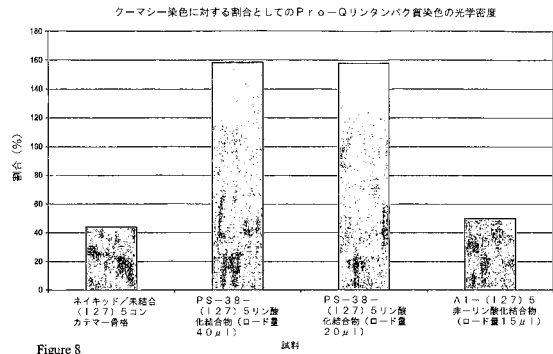


Figure 8

【 図 7 】

Figure 7A

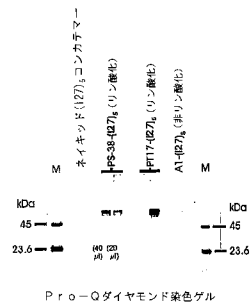
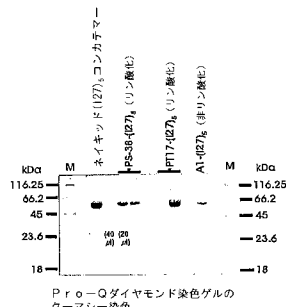


Figure 7B



【 図 9 】

Figure 9

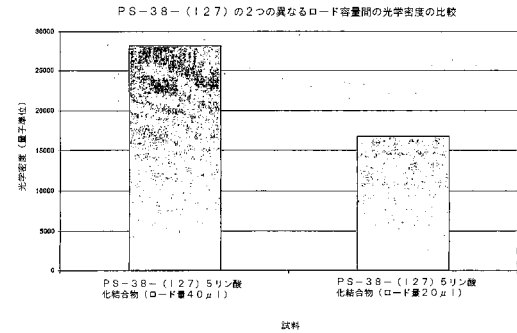


Figure 9

【 図 1 0 】

Figure 10
Figure 10A

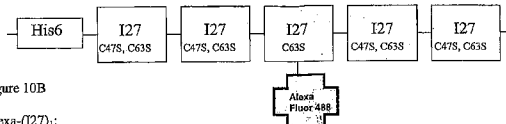
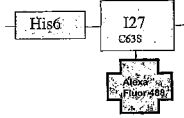


Figure 10B

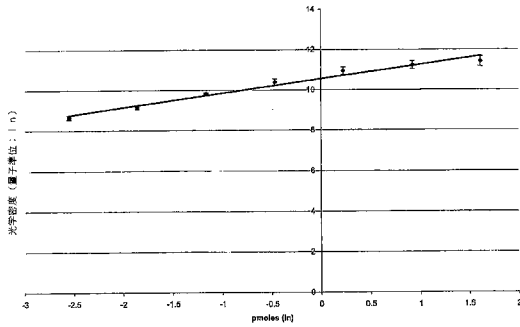
Alexa-(I27)₅:



【 図 1 1 】

Figure 11

Alexa Fluor 488-I (I27)₅ 結合物の検量線



【 図 1 2 】

CSR試験試料のA1-I (I27)₅ 結合物検量線

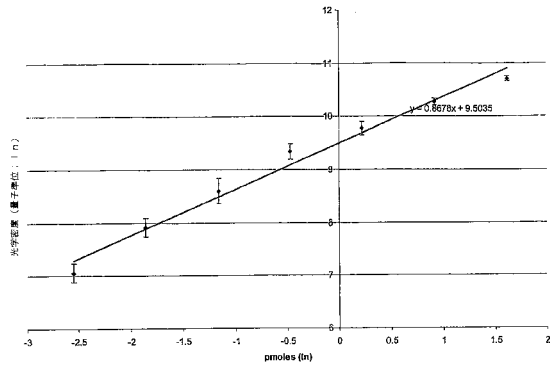


Figure 12

【 図 1 3 】

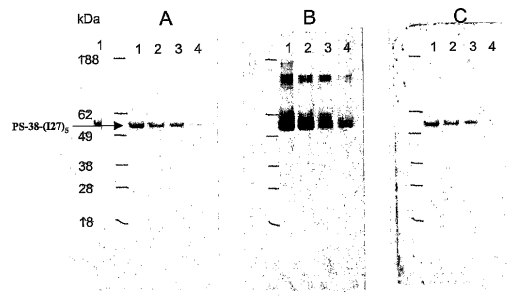


Figure 13

【 図 1 4 】

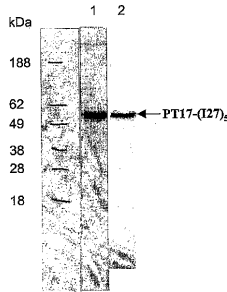


Figure 14

【 図 1 6 】

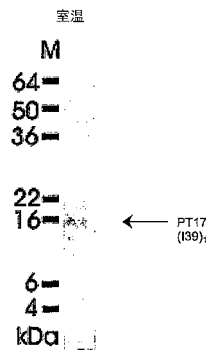
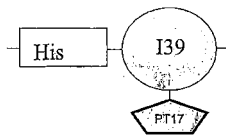


Figure 16

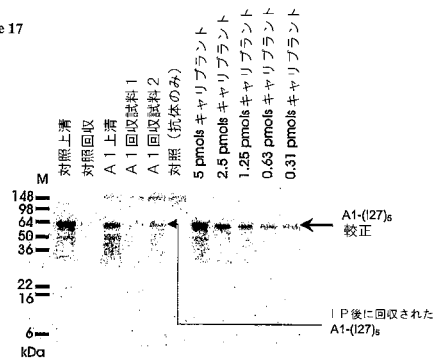
【 図 1 5 】

Figure 15



【 図 1 7 】

Figure 17



【 図 18 】

A1-(127)₅結合物の免疫沈降検量線

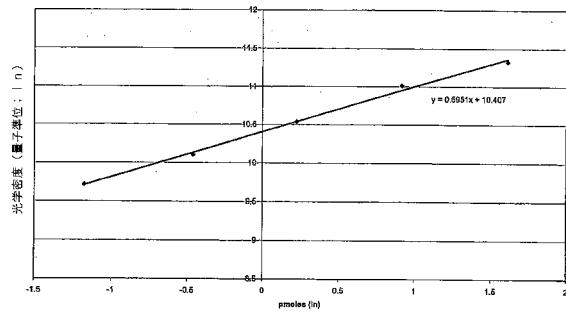


Figure 18

フロントページの続き

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特表2002-526060(JP,A)

特表2001-501920(JP,A)

BROCKWELL, BIOPHYSICAL JOURNAL, 2002年 7月, V83, P458-472

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53-33/566

专利名称(译)	用于量化结合的试剂和方法		
公开(公告)号	JP4829797B2	公开(公告)日	2011-12-07
申请号	JP2006548377	申请日	2005-01-06
申请(专利权)人(译)	Badorira有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Badorira有限公司		
[标]发明人	コリアジョン		
发明人	コリア,ジョン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N27/447 G01N33/68 G01N33/96		
CPC分类号	G01N33/6845 G01N33/68 G01N33/6842 G01N33/96		
FI分类号	G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/543.585 G01N27/26.301.A		
优先权	2004000122 2004-01-06 GB		
其他公开文献	JP2007518088A5 JP2007518088A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于定量可能含有靶向部分的样品中的靶部分的呈递系统和方法。该方法包括使用特定浓度或呈现系统的浓度来创建比较点或校准曲线的步骤，该比较点或校准曲线提供用于将由呈现系统产生的信号与由样本产生的信号进行比较的手段。变化包括的步骤。呈现系统包括目标部分或其一部分的至少一个副本。

【 図 1 】

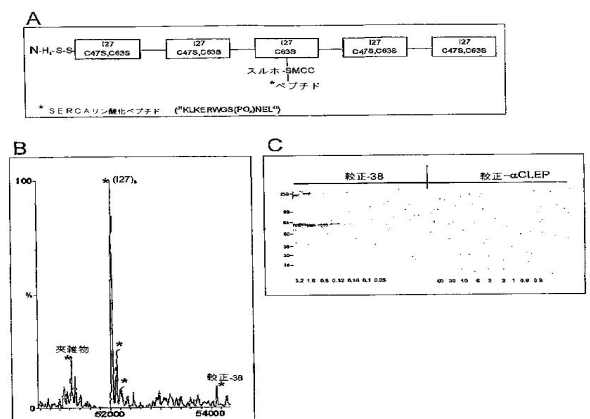


Figure 1