

(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2004-506880

(P2004-506880A)

(43) 公表日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/532

F I

GO 1 N 33/543 5 2 5 G

GO 1 N 33/532 Z

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2002-514400 (P2002-514400) | (71) 出願人 | 500536467 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバー シティー オブ ペンシルヴァニア アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19 107、フィラデルフィア、マーケット ストリート 3700、スイート 300 、センター フォー テクノロジー トラ ンスファー |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年7月18日 (2001.7.18) | (74) 代理人 | 100102842 弁理士 葛和 清司 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成15年1月24日 (2003.1.24) | (72) 発明者 | グリーン, マーク アイ. アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 1 9071、ペン バレー、ライターズ ミ ル ロード 300 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2001/022645 | | |
| (87) 国際公開番号 | W02002/008757 | | |
| (87) 国際公開日 | 平成14年1月31日 (2002.1.31) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 09/624, 946 | | |
| (32) 優先日 | 平成12年7月25日 (2000.7.25) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エピトープの免疫検出のための方法

(57) 【要約】

オリゴヌクレオチドに付着した、選択されたエピトープに対する単鎖 F v または束縛されたエピトープ特異的 C D R を含むエピトープ検出体を用いることによる、試料中の選択されたエピトープを発現する分子を検出するための方法、システムおよびキットを提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料中の選択されたエピトープを発現する分子を検出するための方法であって：

- (a) 試料中の選択されたエピトープを発現する分子を、選択された表面に固定化し；
- (b) 表面と、エピトープ検出体とを接触させて、エピトープ検出体が、表面上の固定化された分子に結合するようにし；および
- (c) 表面に結合したすべてのエピトープ検出体を検出し、ここで、結合したエピトープ検出体は、試料中の選択されたエピトープを発現する分子を示すことを含む、前記方法。

【請求項 2】

選択されたエピトープを発現する分子が、選択された表面に、選択されたエピトープに特異的な表面上のエピトープアンカーに結合することにより固定化される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

エピトープ検出体が、一般的なエピトープを検出するユニバーサルエピトープ検出体を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

検出された分子が、翻訳後に修飾される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

選択されたエピトープを発現する分子を検出するためのシステムであって：

- (a) 選択されたエピトープを発現する分子を固定化するか、または固定化することができる、選択された表面；および
- (b) 選択されたエピトープに対する単鎖 Fv または束縛されたエピトープ特異的 CDR を含み、それが修飾されてオリゴヌクレオチドの付着を可能にする、エピトープ検出体を含む、前記システム。

20

【請求項 6】

さらに、分子を選択された表面に固定化するためのエピトープアンカーを含み、前記エピトープアンカーが、選択されたエピトープに特異的である、請求項 5 に記載のシステム。

【請求項 7】

エピトープ検出体が、一般的なエピトープを検出するユニバーサルエピトープ検出体を含む、請求項 5 に記載のシステム。

30

【請求項 8】

選択されたエピトープを発現する分子を検出するためのキットであって、選択されたエピトープに対する単鎖 Fv または束縛されたエピトープ特異的 CDR を含むエピトープ検出体を含む、前記キット。

【請求項 9】

さらに、選択されたエピトープに特異的なエピトープアンカーを含む、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 10】

単鎖 Fv または束縛されたエピトープ特異的 CDR が、オリゴヌクレオチドの付着のために修飾されている、請求項 8 に記載のキット。

40

【請求項 11】

エピトープ検出体が、一般的エピトープを検出するユニバーサルエピトープ検出体を含む、請求項 8 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の背景**

細胞生物学および医学における中心的な問題の 1 つは、タンパク質、脂質、糖および代謝物レベル、並びに、単一の生存細胞中でのこれらの修飾をモニターすることが不可能であることに関する。種々の技術が用いられて、これらの分子の検出の感受性が改善された。

50

【0002】

例えば、極めて少ない量でタンパク質を検出することができるイムノアッセイの感受性を増大させるために、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術が、慣用の免疫検出方法と組み合わせられた（米国特許第5,665,539号）。イムノ-PCRと名付けられたこの技術は、タンパク質を検出する極めて感受性のある方法を提供する。イムノ-PCRにおいて、DNAおよび抗体に対する二重特異結合親和性を有するリンカー分子を用いて、抗原-抗体複合体に特異的にマーカーDNA分子を付着させ、従って特異的な抗原-抗体-DNA接合体の形成がもたらされている。

【0003】

付着したマーカーDNAを、PCRにより、適切なプライマーを用いて増幅することができる。米国特許第5,665,539号に記載されているように、抗原を、マイクロタイタープレートの表面上に固定化し、その後イムノ-PCRにより検出する。この技術を用いて、アルカリホスファターゼ接合ELISAに対し、感受性において約 10^5 の増大が得られた。イムノ-PCRの感受性の利点は、その後、マウス抗リポタンパク質IgG（Ruzicka et al. Science 1993 260: 698-699）；ヒトプロトオンコジーンタンパク質（Zhou et al. Nucleic Acid Res. 1993 21: 6038-6039）；および腫瘍壊死因子アルファ（Sanna et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1995 92: 272-275）についてのアッセイにおいて確認された。

【0004】

しかし、本来のイムノ-PCRプロトコルは、ストレプトアビジン-プロテインAキメラを用いて、抗原-抗体複合体を検出した。種々の群のIgGに対するプロテインAの親和性の変化により、広い範囲の抗原の検出における直接的な適用が制限される。ある改善されたプロトコルは、この問題を、ビオチン化された二次抗体または遊離のストレプトアビジンを導入することにより、解決することを試みた。

【0005】

Joergger et al. (Clin. Chem. 1995 41(9): 1371-1377)は、二重らせんDNA標識が、抗体に直接付着することができ、従って接合体試薬を、アッセイ前に調製することが可能になることを例証した。

【0006】

Suzuki et al. (Jpn. J. Cancer Res. 1995 86: 885-889)は、2種のモノクローナル抗体を用い、ここで、抗原をはさみ、特異的なDNA分子をマーカーとして用いる、二重決定因子（double-determinant）イムノポリメラーゼ連鎖反応（二重決定因子イムノ-PCR）と呼ばれる方法を記載している。この方法において、循環抗原に結合する第1のモノクローナル抗体を、抗原自体の代わりに、固定化する。ビオチン化された第2のモノクローナル抗体を、抗原に結合させ、遊離のストレプトアビジンを用いて、ビオチン化されたDNAを、第2のモノクローナル抗体に付着させる。抗原-抗体-ストレプトアビジンと複合した、ビオチン化されたDNAを、PCRにより増幅する。次に、生成物を、サザンブロット分析により分析する。

【0007】

これらのイムノ-PCR手法が、タンパク質検出の伝統的な方法にまさる利点、例えば感受性の増大を提供した一方、これらの使用に対していくつかの顕著な制限が尚存在する。イムノ-PCRの主要な制限の1つは、PCR反応の非直線的増幅能力にある。シグナルの量と存在するタンパク質の量との間には、直接的な相関はない。従って、この手法は、定量的検出方法としては制限される。

【0008】

米国特許第5,922,553号には、イムノ-aRNAと呼ばれる手法により、選択されたタンパク質のレベルを定量するための方法が開示されている。この方法において、選択されたタンパク質に標的された第1の抗体を、固体支持体に固定化する。次に、支持体

を、選択されたタンパク質と接触させ、選択されたタンパク質が、第1の抗体に固定化されるようにする。次に、固体支持体を、選択されたタンパク質に標的された第2の抗体に共有結合した、RNAプロモーターにより駆動されたcDNA配列と接触させて、第2の抗体が、結合した選択されたタンパク質に結合するようにする。選択されたタンパク質の量を、結合した第2の抗体に共有結合した、プロモーターにより駆動されたcDNA配列のレベルを、増幅されたRNA手法により定量することにより、決定する。好ましい態様において、T7プロモーターにより駆動されたcDNA配列を、第2の抗体に共有結合させる。

【0009】

ここで、単鎖フラグメントおよび、環外ペプチドに基づいた相補性決定領域(CDR)サブユニットを、このイムノ-aRNA手法において用いることができることを見出された。さらに、PCRおよび増幅されたRNA手法を用いて、結合した単鎖フラグメントまたはCDRサブユニットに共有結合した、プロモーターにより駆動されたcDNA配列を定量することができる。すでに存在する大きい単鎖または環式ペプチドライブラリーと結合した、一層小さい抗体結合単位およびフラグメントを用いることおよびロボット工学的補助を用いることにより、この方法が、医学的および研究目的の両方のために広範囲に有用になる。さらに、単一の第3の検出体種を、二重らせんDNAと結合させ、単鎖FvまたはCDRのいずれかに結合させ、検出を均一かつ簡単にすることができる。これを、本明細書において、普遍的検出体と呼ぶ。

10

【0010】

発明の概説

本発明の目的は、試料中の選択されたエピトープを発現する分子を検出するための方法を提供することである。この方法において、選択されたエピトープに特異的なエピトープアンカーを、選択された表面に固定化する。エピトープアンカーは、単鎖Fvフラグメント、CDR、抗体または、選択されたエピトープと相互作用する他のリガンドペプチドもしくは化学物質もしくは医薬を含むことができる。次に、表面を、選択されたエピトープを発現する分子を含むことが疑われる試料と接触させて、分子が、固定化されたエピトープアンカーに結合するようにする。次に、オリゴヌクレオチドに付着した、選択されたエピトープに対する単鎖Fvまたは束縛されたエピトープ特異的CDRを含むエピトープ検出体を用いて、すべての結合した分子を検出する。1つの態様において、単鎖FvまたはCDRを修飾して、オリゴヌクレオチドの単一の部位への付着を可能にした。あるいはまた、本発明の方法を、エピトープアンカーと共に実施することができる。この態様において、エピトープ検出体を用いて、表面に直接結合する分子を規定する。

20

30

【0011】

本発明の他の目的は、選択されたエピトープを発現する分子を検出するためのシステムを提供することである。本発明のこれらのシステムは、選択されたエピトープに特異的なエピトープアンカー、エピトープを固定化するか、または固定化することができる、選択された表面および、オリゴヌクレオチドに付着した、選択されたエピトープに対する単鎖Fvまたは束縛されたエピトープ特異的CDRを含むエピトープ検出体を含む。1つの態様において、単鎖Fvまたは束縛されたエピトープ特異的CDRを修飾して、オリゴヌクレオチドの付着を可能にする。

40

【0012】

本発明の尚他の目的は、選択されたエピトープを発現する分子を検出するためのキットであって、選択されたエピトープに特異的なエピトープアンカーおよび、オリゴヌクレオチドに付着した、選択されたエピトープに対する単鎖Fvまたは束縛されたエピトープ特異的CDRを含むエピトープ検出体を含む、前記キットを提供することにある。1つの態様において、単鎖Fvまたは束縛されたエピトープ特異的CDRを修飾して、オリゴヌクレオチドの付着を可能にする。

【0013】

発明の詳細

50

本発明は、選択された分子のレベルを定量するための改善された方法並びに、これらの改善された方法を実施するためのシステムおよびキットに関する。1つの態様において、この方法は、分子の選択されたエピトープに特異的なエピトープアンカーを選択された表面に結合させることを含む。エピトープアンカーは、単鎖Fvフラグメント、CDR、抗体または、選択されたエピトープに特異的な他のリガンドペプチドもしくは化学物質を含むことができる。好ましい態様において、エピトープアンカーを、表面上の指定された箇所に結合させる。例えば、表面は、チップを含むことができ、エピトープアンカーは、チップの規定された箇所に結合する。1つの態様において、エピトープアンカーは、ピペッターまたは、単一の部位における適用を可能にする同様の装置の補助の下に、表面またはプレート上に堆積する。次に、結合したエピトープアンカーを有する表面を、選択されたエピトープを発現する分子を含むことが疑われる試料と接触させて、分子がエピトープアンカーに結合するようにする。他の態様において、分子を、エピトープアンカーを用いずに、表面に直接付着させる。

10

【0014】

本発明の方法によりアッセイすることができる試料の例には、個別の細胞および、生物学的流体、例えば血清を含む溶液が含まれるが、これには限定されない。次に、表面上のすべての結合した分子に結合することができるエピトープ検出体を用いて、結合した分子の量を検出し、定量する。エピトープ検出体は、オリゴヌクレオチドを単一の部位において付着させることを可能にするように修飾された、選択されたエピトープに対する単鎖Fvまたは束縛されたエピトープ特異的CDRを含む。

20

【0015】

選択されたエピトープのためのFvフラグメントを、細胞中に、または微生物上に、組み換えDNA技術を用いることにより、得ることができる。例えば、SkerraおよびPluckthun (Science 1988 240: 1038-1041)には、大腸菌中での機能的Fvフラグメントの生成のための発現システムが記載されている。

【0016】

抗体軽鎖または重鎖のみの可変ドメインをコードするDNA配列を有するオペロンを有する真核発現ベクターを有する真核宿主細胞において、Fvフラグメントを得るための方法もまた、記載されている (J. Mol. Biol. 1988 203: 825-828)。Fvフラグメントの鎖は、宿主細胞により分泌され、正確に組み立てられて、完全に機能的なFvフラグメントが、培養上清液中に生成するようにされている。さらに、DNAコード配列を、この5'末端の方向に変化させて、アミノ末端が、オリゴヌクレオチドの共有結合に適する表面を有する1または2以上の残基を発現するようにすることができる。さらに、3'末端を変化させて、システイン残基が、各々の可変ドメインのC末端の方向に生成して、二量体中の可変ドメインがジスルフィド結合により一緒に連結されることを可能にするようにすることができる。また、これにより、Fvフラグメントの組立が促進される。

30

【0017】

あるいはまた、Fvフラグメントを、第1の可変ドメインをコードする第1のDNA配列および第2の可変ドメインをコードする第2のDNA配列を有し、第1の配列および第2の配列が、接合ペプチド配列をコードする第3のDNA配列により結合されているベクターを用いることにより、安定化することができる。この場合において、接合ペプチド配列は、2つのポリペプチドを機能的な単鎖Fvに折り畳むのを可能にするのに十分長く、可撓性である。好ましくは、宿主細胞は、形質転換前に、抗体または軽鎖の全体を分泌しない骨髓腫細胞系である。このような細胞系は、十分知られており、広範囲に入手可能である (Reichmann et al. J. Mol. Biol. 1988 203: 825-828)。

40

【0018】

また、すべてのハプテンまたは化学的化合物に対するランダムなファージ技術を用いて、Fvを選択することができると考えられる (Harrison et al. Unite

50

d States Biochemical Pharma Ltd. (Europe), Watford, 英国)。

【0019】

CDR技術は、十分知られており、米国特許第5,334,702号、米国特許第5,663,144号および米国特許第5,919,764号に記載されている。一般的に、CDRは、環状に束縛され、芳香族残基により修飾された6~15量体ペプチドを含む。本発明において用いるための配座的に束縛されたペプチドの設計における重要な段階は、活性のために重要な残基の描写である。これは、一般的に、先ず、最初の抗体またはレセプターまたは種々の長さのリガンドの生物活性なドメインからの1つの群の類似体を合成し、完全なおよび部分的な活性についての最小の鎖の長さ確立することにより、達成される。

10

【0020】

最小の鎖の長さ確立された後に、各々の側鎖を、系統的に変化させて、電荷、立体的嵩、疎水性、芳香性およびキラリティーを各々の位置において決定することができる。多くの一連の類似体の特性の評価の後に、官能基を同定し、結合に伴う特徴を確認することが可能である。次に、種々の配座的に束縛された類似体を、発生させることができる。ペプチドを束縛するための種々の手段が、開発された。

【0021】

1つの手段は、配座的に束縛されたアミノ酸を導入することを含む。Hruby (Life Sci. 1982 31: 189-199)は、本来的な配座的束縛を有する多数のアミノ酸およびジペプチドの合成、並びにこれらの生物学的に活性なペプチド中への導入を記載している。Prasad et al. (Biopolymers 1995 35: 11-20)はまた、 α -炭素における水素原子をメチル基で置換して、ジアルキルアミノ酸を生成することによる、アミノ酸単位の配座を束縛する方法を記載している。米国特許第6,022,523号には、アミノ酸の配座的自由度を、C- およびC-原子において二重結合を導入することにより制限する方法が記載されている。

20

【0022】

ペプチドを束縛するための他の手段は、共有架橋の導入を含む。ペプチド主鎖を共有架橋の導入により束縛することにより、異常なアミノ酸を導入するよりも劇的な効果が得られる。大環化 (macrocyclization) は、しばしば、ペプチドN末端とC末端との間、側鎖とNまたはC末端との間、または2つの側鎖の間にアミド結合を形成することにより、達成される。最初の発生のジアルコキシ-ベンジル結合剤である、4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ酢酸で誘導体化されたポリステリン樹脂上でのFmoc/t-ブチル固相手順により合成された、側面保護されたペプチドの頭尾環化は、Sheppard, R. C. (Int. J. Peptide Res. 1982 20: 451-454)により記載されている。

30

【0023】

さらに、類似体結合剤である、4-(4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ)-酪酸 (HAMA) は、最近、フラグメント縮合、およびこれらの高度に酸性感受性であるリンカーを用いたペプチドの固相合成において用いられた (ペプチドにおいて、E. Giralt および D. Andreu 編、ESCOM, Leiden, オランダ国、1991, 131-133)。Schillerにより記載されているエンケファリン類似体は、側鎖から主鎖への共有環化の例を提供し、ここで、D-lys残基の ϵ -アミノ基の、LeuのC末端主鎖カルボン酸基への共有結合により、高い効力および顕著な μ レセプター選択性を有する、環式16員環類似体を得られる (Schiller et al. Int. J. Pept. Prot. Res. 1985; 25: 171-177)。BOP試薬およびカルボイミド/1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾールの組み合わせはまた、環式ペプチドの形成において有用であると報告されている (Felix, A. M. Int. J. Pept. Prot. Res. 1988 31: 231-238)。Degrado et al. はまた、m-アミノメチル安息香酸をリンカーとして用い

40

50

て、GP I I b / I I I a 複合体の生物学的に活性な環化されたペプチド類似体を開発した(米国特許第6,022,523号)。

【0024】

ジスルフィドはまた、ある位置におけるシステインの導入による酸化により、生成することができる。例えば、Roman i, S. (Int. J. Pep. Prot. Res. 1987 29: 107-117)は、非対称ジスルフィドを、アゾジカルボン酸のジ-tert-ブチルエステルの補助により構築することができることを例証した。Ploux, O. (Int. J. Pep. Prot. Res. 1987 29: 162-169)はまた、3S-3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基のチオール置換による、非対称ジスルフィドの生成のための方法を記載している。

10

【0025】

好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、T7プロモーターにより駆動されたcDNA配列を含み、従って、これを、T7RNAポリメラーゼを用いて増幅することができる。この態様において、二重らせんcDNAを、T7RNAポリメラーゼ転写のための鋳型として用いるために合成する。T7RNAポリメラーゼは、このプロモーター部位が、二重らせんであることを必要とする。

【0026】

1つの態様において、オリゴヌクレオチドが付着するFvまたはCDR上の部位は、化学物質、例えばヘテロ二量体カップリング試薬からなるリンカーまたは他のリンカーの付着を可能にする、一連の残基を含む。これらの残基は、リンカー付着のための均一な結合部位を提供する。このリンカーは、この部位に付着し、またオリゴヌクレオチドをFvまたはCDRに結合させる。オリゴヌクレオチドはまた、修飾されていないかまたは修飾されていることができる。例えば、増幅されたオリゴヌクレオチドの存在は、指針または蛍光標識したオリゴヌクレオチドを混合物中に導入し、エピトープ発現分子の迅速な半定量的評価を可能にすることにより、増強することができる(Tan et al., Chemistry Eur. J. 2000 6(7): 1107-1111; Leone et al., Nucleic Acids Res. 1998 26(9): 2150-2155)。

20

【0027】

結合したエピトープ検出体を、方法、例えば慣用のPCRまたはaRNA手法による増幅により定量することができる。用いる検出方法がイムノaRNAである場合には、二重らせんオリゴヌクレオチドを、エピトープ検出体において用いる。この例において、aRNAを、特定のプロモーターを認識するポリメラーゼ、例えばT7RNAポリメラーゼ、T3RNAポリメラーゼまたはSP6RNAポリメラーゼ、未標識リボヌクレオチドおよび蛍光的に標識されたリボヌクレオチドを用いて、固体支持体上に転写する。

30

【0028】

種々の手段が、エピトープ検出体の増幅された生成物の検出のために有用である。1つの態様において、aRNAを、例えば放射活性標識または蛍光標識で検出可能に標識する。あるいはまた、aRNAを、cDNAに転化し、方法、例えばゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー、ハイブリッド形成アッセイ、免疫組織化学的アッセイおよび/または特異的に結合するタンパク質アッセイにより、検出することができる。

40

【0029】

FvおよびCDRペプチドをエピトープ検出体として用いることにより、この方法が、米国特許第5,922,553号のイムノ-aRNA手法により同定することができるよりも大きいポリペプチドの同定において、および上清液、流体、細胞もしくは細菌の抽出物またはすべての他の真核生物におけるモチーフの同定において、有用になる。従って、本発明の方法は、医学的および研究目的の両方において、広範囲の適用可能性を有する。さらに、本発明の方法は、現在入手可能な方法よりも感受性が高く、定量的結果を提供する。

【0030】

50

本発明の方法において選択された分子のエピトープ検出体として作用する、FvおよびCDRペプチドの能力を、p185レセプターについて例証した。この方法を用いて、放出されたp185レセプターを、ELISAに対し感受性において 10^8 倍の増大、およびウエスタン-ECL方法に対し約1000倍の増大で検出した。これらの実験のために、7.16.4の単鎖Fv(ScFv)構造物(7.16.4ScFvと表示する)を、Peterson & Greene (DNA and Cell Biology 1998 17(12): 1031-1040)により概説された手順に従って生成し、ここで、重鎖および軽鎖領域のFv領域は、(gly4-Ser)5リンカーにより接合された。ScFv7.16.4が、ポリヒスチジンタグを含んでいたため、これを、Ni-NTA樹脂上で精製した。精製の後に、7.16.4ScFvの結合を、B104-1-1細胞に対するFACS分析により、直接結合およびモノクローナル抗体7.16.4に対する競合的結合の両方において確認した。

10

【0031】

抗ヒトp185抗体4D5のCDR3.H領域から設計された、束縛された環外ペプチドである、AHNPもまた、用いた。AHNPは、p185に結合し、4D5の成長阻害効果を模倣する(Park et al. Nature Biotechnology 2000 18: 194-198)。

【0032】

ScFv7.16.4とAHNPとの両方を、二重らせんオリゴヌクレオチド(ds-オリゴ)に結合させて、エピトープ検出体を形成した。ds-オリゴが結合した7.16.4ScFvおよびAHNPの両方は、これらの抗原、それぞれB104-1-1細胞からのラットp185neuおよびT6-17細胞からのヒトp185her2/neuを検出することが可能であった。さらに、ds-オリゴと接合して、エピトープ検出体を形成することにより、プラスモン共鳴分析により決定して、CDR検出分子のこれらの抗原との結合親和性は、変化しなかった。7.16.4ScFvおよびmAb7.16.4が、p185レセプターに対して同等の結合親和性を有するため、これらを、このアッセイにおいて同等のモル濃度において用いた。しかし、親和性が、4D5よりも、p185Her2/neuに対して低いため、AHNPを、一層高い濃度で用いた。

20

【0033】

ds-オリゴをCDRまたは単鎖Fvに直接カップリングさせることは、特に目的が、質量スクリーニングプロテオミクスアッセイにおいて、数百または数千の抗原を検出する場合には、時間を消費する手順であり得る。さらに、カップリング能力の変化は、増幅結果の解釈を複雑にし得る。従って、本発明の好ましい態様において、FvまたはCDRは、一般的な、またはユニバーサルエピトープ、例えばヘマグルチニンHAタグまたはポリヒスチジンタグを含む。一般的な、またはユニバーサルエピトープの例は、最初はタンパク質の精製のために設計された7.16.4ScFvにおけるポリ-His-タグである。次に、単一のモノクローナル抗体またはds-DNAと結合した単鎖Fvを用いて、一般的なエピトープに結合させて、ユニバーサルエピトープ検出体を作成する。

30

【0034】

本発明の方法におけるユニバーサルエピトープ検出体の能力は、7.16.4ScFvにおけるポリ-His-タグを用いて例証された。これらの実験において、p185レセプターを、プレート上に塗布したA11により捕集し、遊離の7.16.4ScFvを加え、続いて、長時間洗浄し、次にds-オリゴと接合した抗His抗体と共にインキュベートした。T7ポリマーゼ増幅の後に、細胞の 10^6 希釈の可溶化液からの特異的なバンドを検出した。従って、この感受性は、ユニバーサルエピトープ検出体を有しない基本的なプロトコルを用いて見られる感受性よりも、さらに高かった。

40

【0035】

本発明の方法はまた、翻訳後修飾の検出において有用である。PCRおよびaRNA手法を、最初に開発して、DNAレベルにおける標的遺伝子の活性を検出した。これらの方法は、専ら、時々ハイブリッド形成と組み合わせ、ゲノム研究の用途において採用された

50

。感受性にかかわらず、これらの方法は、タンパク質レベルにおける翻訳後修飾を検出することはできない。しかし、このような事象のモニタリングは、リン酸化およびグリコシル化を含むが、これらには限定されない多くの修飾が、タンパク質の機能的な状態に関連するため、極めて重要である。

【0036】

従って、実験を実施して、本発明の方法の、EGF処理により誘発されたp185レセプターのリン酸化を検出する能力を例証した。シグナル形成モデルを確立し、ここで、EGF刺激により、EGFRは、p185とヘテロ二量体化し、これをトランス活性化し(trans-activate)、p185レセプター上のチロシン残基のリン酸化がもたらされる(Qian et al. Proc. Natl Acad. Sci. 1994 91: 1500-1504)。EGFRおよびp185erbB2を過剰発現するA431細胞系を、これらの実験において用いた。EGF刺激の後に、細胞可溶化液中のp185レセプターを、1E1により捕集し、モノクローナル抗体を、p185erbB2/neuに対して発生させた。抗リン酸化Tyr抗体のIgG2bタイプである、PY99を用いて、リン酸化されたレセプターを検出した。

10

【0037】

第2の抗体である、ds-オリゴと結合した抗IgG2bを用いて、抗原-抗体サンドイッチ複合体を探索した。EGFで刺激したA431細胞は、正のバンドを形成し、これは、EGF処理を施さない細胞においては、観察されなかった。しかし、T6-17細胞はまた、正のバンドを示し、p185レセプター上の構成的ホスホチロシンを示した。これらのデータは、この方法が、タンパク質の機能的な状態を、この修飾を分析することにより検出することが可能であることを示す。また、ds-オリゴに結合したFvまたはCDRを含むエピトープ検出体を用いて、タンパク質の機能的な状態を検出することができる。

20

【0038】

従って、本発明は、イムノ-PCR手法の非定量的な性質についての懸念を解消し、プロテオミクスの分野における極めて大きい可能性を提供する、感受性のある検出方法を提供する。特異的なプロモーターを認識するポリメラーゼ、例えばT7RNAポリメラーゼ、T3RNAポリメラーゼまたはSP6RNAポリメラーゼおよび増幅段階における特異的なプロモーターを用いることにより、この方法に従って実施されるアッセイは、生物学的および医学的アッセイに関連する直線状の増幅および正確な定量を有する。検出の感受性に影響する因子の数もまた、減少した。抗原と、これらのFvまたは1価のCDRとの間の特異的な結合は、この方法の唯一の臨界的に重要なパラメーターである。

30

【0039】

ユニバーサルエピトープ検出体を提供する能力により、本発明の方法に、多数の追加の利点が付与される。まず、すべての細胞抗原を、先ずモノクローナル抗体をds-オリゴに結合させずに検出することができる。ユニバーサルプローブを用いないと、この方法は、1種または数種の特定の抗原を一度に観察するのに有用であるに過ぎない。他方、ユニバーサルプローブにより、有用なFvまたはCDRを有するすべての細胞状または流体存在抗原の検出が可能である。さらに、プロトコルをわずかに変更して、種々の大きさのオリゴヌクレオチドが、エピトープ検出体のFvまたはCDRに付着する際には、種々のタンパク質を、単一の電気泳動レーンにおいて同時に検出することができる。従って、本明細書中に例証するように、本発明の方法は、タンパク質抗原の同定並びに、検出の単一の細胞レベルでの、ポリペプチドおよび他の構造物、例えば糖または脂質の翻訳後修飾に適用可能な、多用途の手法を提供する。

40

【0040】

この方法はまた、タンパク質相互作用の分析および小さい分子の検出に有用であると考えられる。例えば、リガンドペプチドを、組織試料に対するエピトープ検出体として用いて、特定のレセプターの発現を同定することができ、またその逆もできる。有用なFv、CDRまたは結合タンパク質を用いて、小さい分子、例えばトキシンまたは薬剤代謝物を、

50

水、食物および体液を含むが、これらには限定されないすべての溶液において検出することができる。

【0041】

最初のイムノ-PCRは、アッセイにおいて純粋な抗原を用いた。イムノ-PCRの後の反復は、混合された抗原を試験したが(Hendrickson et al. Nucleic Acids Research 1995 23(3): 522-529)、ELISAよりも2~3桁高い感受性を示したに過ぎない。極めて大きい種々の非特異的抗原を含む背景を有する実在のアッセイにおいて、感受性は、常に、アッセイの特異性により制限される。FvまたはCDRフラグメントにより結合したエピトープは、比較的大きいポリペプチドを同定すると予測され、これを用いて、上清液、流体、細胞もしくは細菌の抽出物またはすべての他の真核生物におけるモチーフを同定することができる。さらに、ポリペプチド、有機分子または糖構造の実際の同一性を、いくつかのエピトープのFvによる結合をガイドとして用いて、データベースのコンピューターにより補助された分析により、決定することができる。

10

【0042】

例えば、Fv a、d、eおよびfによる結合により、側鎖a、d、eおよびfを有するものとして糖分子が同定され、従って、これらの同一の側鎖を有する等の族に属する。このようにして、本発明により、細胞中の、すべてではないとしても、多くの分子の定義および同定が、すべての1の特定の時点において可能である。さらに、この方法を用いて、活性細胞または細胞上清液において翻訳された代替の転写形態を同定することができる。この手順は、1)非放射活性検出方法での使用、2)微小化された(microtized)液体取り扱い手順、3)低い試料体積検出、例えば「タンパク質チップ」分析および4)自動化の影響を容易に受ける。

20

【0043】

以下の限定的でない例を提供して、本発明をさらに例示する。

例

例1：材料

用いた抗体は、mAbs 7.16.4およびA11を含み、これらの各々は、p185neuの細胞外ドメイン中の異なるエピトープと反応性である。p185neuの細胞内ドメインに対して向けられた、ポリクローナル抗血清、-Bacneuを、ウエスタンブロットティングのために用いた。1E1は、ヒトp185her2/neuの外部ドメインに対して発生したIgG1モノクローナル抗体である。rhUMA b 4D5(Herceptin)を、Genentechから得た。

30

【0044】

抗ホスホチロシンモノクローナル抗体PY99を、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)から得た。細胞系B104-1-1を、NIH3T3細胞から、ラットオンコジーンp185neuを発現させることにより、誘導した。B104-1-1細胞中のp185neuの発現レベルを、¹²⁵Iで標識した抗neu mAb結合アッセイを用いて決定した。EGFRおよびp185neuの両方に陰性のNR6は、NIH3T3からのサブクローンであった。T6-17を、NIH3T3から、ヒトp185her2/neuレセプターを過剰発現させることにより、誘導した。これらの細胞系を、すべて、10%胎児ウシ血清(FBS、Hyclone)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中で、37°Cにおいて5%CO₂雰囲気中で培養した。

40

【0045】

例2：免疫プロット手順

10cmディッシュ中のサブコンフルエント(subconfluent)細胞を、冷PBSで2回洗浄し、PI/RIPA(1%のトライトンX-100、1%のデオキシコール酸塩、0.1%のSDS、0.15MのNaCl、0.01Mのリン酸ナトリウム、pH7.4、1%のアプロチニン、1mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド、2mM

50

のEDTA、10 mMのピロリン酸ナトリウム、400 mMのオルトバナジウム酸ナトリウムおよび10 nMのヨードアセトアミド緩衝液)で可溶化した。タンパク質を、適切な濃度のSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース膜(Nitrobind, MSI)に移送した。膜を、ブロッキング緩衝液(PBS中の0.5%脱脂乳および5%ヤギ血清)と共に一晩インキュベートした。免疫ブロット(ウエスタンブロット)分析のために、抗体を、0.1%脱脂乳および1%ヤギ血清を含むPBSで希釈した。すべてのポリクローナル血清および二次的HRP共役抗体(Boehringer Mannheim)を、1:5000の希釈において用いた。バンドを、ECLアッセイ(Amersham)を用いて視覚化した。

【0046】

10

例3: Hisタグ7.16.4の発現および精製

50 µg/mlのアンプシリンを含むLB培地(150 ml)に、15 mlの大腸菌DH5の一晩の培養物を接種し、0.5の光学密度(600 nm)が得られるまで、30に維持した。イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を、1 mMの最終濃度において加えて、Hisタグ7.16.4 ScFvを誘発した。3時間後、細胞を収穫し、凍結および融解することにより溶解し、0.5 mMのフェニルメチルホルホルニルフルオリド、2 µMのペプスタチンAおよび2 µMのロイペプチンを捕捉した10 mlの尿素溶解緩衝液(10 mMのトリス-Cl、pH 8.0、0.1 MのNaH₂PO₄、1 MのNaCl、8 Mの尿素)中に再懸濁した。

【0047】

20

不溶性の細胞残骸を、遠心分離(12,000 × gで15分間、続いて12,000 × gで30分間)により除去した。透明にした上清液を、2 mlのNi-NTAアガロースと混合し、続いて、氷上で1時間温和に振盪した。混合物を、空のカラム中に装入し、結合していないタンパク質を、4で尿素溶解緩衝液(pH 6.3)で洗浄した。Hisタグタンパク質を、尿素溶解緩衝液(pH 4.5)で溶離し、溶離フラクションを、例4に記載するように、SDS-PAGEおよびFACS分析により試験した。ピークフラクションにおけるタンパク質をプールし、TKC緩衝液(50 mMのトリス-Cl、pH 8.0、100 mMのKCl、10 mMのCaCl₂、1 mMのEDTA、0.1 mMのPMSEF)に対して透析した。

【0048】

30

例4: FACS分析による7.16.4 ScFv結合の確認

細胞表面抗原を、蛍光活性化細胞分類(FACS)により検出した。B104-1-1細胞(約5 × 10⁵)を、精製した7.16.4 ScFvを含む200 µlのFACS緩衝液(0.5%ウシ血清アルブミンおよび0.02%アジ化ナトリウムを含むPBS)中で、インキュベートした(4で30分間)。次に、細胞を、FACS緩衝液で洗浄し、抗His抗体(Invitrogen)と共にインキュベートした(30分、4)。この第2のインキュベーションの後に、細胞を、FACS緩衝液で再び洗浄し、さらに、マウス免疫グロブリンに対してFITC標識したIgG(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)と共にインキュベートした。

【0049】

40

FACS緩衝液で洗浄した後、細胞ペレットを、PBS緩衝液中に懸濁させ、FACS走査フローサイトメーター(Becton Dickinson)による分析のために加工した。各々の試料について、10,000個の生存可能な細胞を、大きさ(前方向散乱、FSC)および粒度(側面散乱、SSC)パラメーターに続いてゲートし、CellQuest Software(Becton Dickinson)を用いて分析した。競合的結合のために、B104-1-1細胞を、先ず、種々の濃度の7.16.4 ScFvの存在下で、モノクローナル抗体7.16.4と共にインキュベートした。次に、細胞を、FACS緩衝液で洗浄し、マウス免疫グロブリンに対してFITC標識したIgG(Sigma Chemical Co.)と共にさらにインキュベートし、次にフローサイトメーター上で分析した。

50

【0050】

例5：ds-cDNAの抗体またはFvまたはCDRへの付着
以下の配列

【外1】

(GAGAGAGGATCCAAGTACTAATACGACTCACTATAGGGCCGAGAGCCGAGAAGAAAGA

CGTTTTTTTTTT (配列番号 :1))

を有するcDNAオリゴヌクレオチドを、5'末端において活性化可能なアミンと共に設計して、T7RNAポリメラーゼの酵素活性によりcDNA鋳型からRNAの合成を導くために用いられる、一級アミンおよびT7プロモーター部位

10

【外2】

(TAATACGACTCACTATAGGG (配列番号 :2))

への共有結合を可能にする。1μgの抗体を30μgのds-cDNAに、または1μgのCDRを0.1μgのds-cDNAに、または1μgのScFvを3μgのds-cDNAに付着させるために、等しい容量の0.1%のグルタルアルデヒドを、10μlのアリコート中に加えた。溶液を、回転装置上で3時間、室温で混合した。次に、エタノールアミン(1M; 1/20容積; pH7.5)を加えた。溶液を、さらに2時間、室温で混合した。タンパク質-DNA複合体を、4℃で貯蔵した。

20

【0051】

例6：RNA増幅

RNA増幅を、第1のAb-抗原複合体を含む96ウェルプレート中で実施した。以下の試薬を加えた：1X RNA増幅緩衝液(40mMのトリス-塩基、pH7.5、7mMのMgCl₂、10mMのNaCl、2mMのスペルミジン; 5mMのDTT; 250μMのATP、UTP、GTP; 5μMのCTP; 0.5μlのRNAsin; 1000UのT7 RNAポリメラーゼおよび3μlのP³²-CTP)。次に、この溶液を、4時間37℃でインキュベートした。RNA生成物を、ウェルから除去し、3μlを、3μlの反応停止溶液(95%のホルムアミド、10mMのEDTA、0.1%のプロモフェノールブルー、0.1%のキシレンシアノール)に加え、15%変性ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。ゲルを、ホスホイメージャー(phosphorimager)スクリーンに5~60分間並べ、100uMの解像度でホスホイメージャー上で現像した。

30

【0052】

例7：対照方法としての標準的なサンドイッチELISA

96ウェルマイクロタイタープレート(Nunc-Immuno Plate, Maxi SorpTM)を、1E1(ヒトp185の細胞外ドメインに対して向けられたモノクローナル抗体)で、100μlの被覆緩衝液(抗体濃度:5μg/ml)と共に、4℃で一晩インキュベーションプレートにより被覆した。次に、プレートを、0.2%のトウイン20(PBS-T; 200μl/ウェル)を含むPBSで3回洗浄し、0.5%のPBSおよび0.2%のトウイン20(200μl/ウェル)を含むPBSで1時間室温でブロッキングし、再びPBS-T(200μl/ウェル)で3回洗浄した。平行して、T6-17細胞可溶化液の連続希釈100μlを、プレートに加え、2時間室温でインキュベートした。

40

【0053】

このインキュベーション段階の後に、プレートを、PBS-T(6回、200μl/ウェル)で洗浄し、ヒト化抗p185Her2抗体4D5(150ng/ml、50μl/ウェル)と共に2時間、室温でインキュベートした。その後、プレートを、6回洗浄し、50μlの抗ヒトIgG-HRP(Zymed;最終的な希釈:1:10,000)でさらに2時間、室温でインキュベートした。酵素反応を、室温で、TMB(各々0.1Mのリン酸-クエン酸緩衝液中で2.5mM、pH5.0)(100μlの各々の試薬/ウェル)を加えることにより、実施した。反応を、15~60分後に、50μlの1MのH₂S

50

O₄ を加えることにより、停止した。発色を、ELISA 読みとり機を用いて、450 nm において測定した。

【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
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08757 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53, 33/48, C07K 13/00, C07H 21/02, 21/04, C12N 1/20
- (52) International Application Number: PCT/US01/22645
- (22) International Filing Date: 18 July 2001 (18.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/624,946 25 July 2000 (25.07.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA [US/US]; Center for Technology Transfer, Suite 300, 3700 Market Street, Philadelphia, PA 19107 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): GREENE, Mark, I [US/US]; 300 Righters Mill Road, Penn Valley, PA 19071 (US). EBERWINE, James, H. [US/US]; 3918 Henry Avenue, Philadelphia, PA 19129 (US). KACHARMINA, Janet, Estee [US/US]; 7312 Bryan Street, Philadelphia, PA 19119 (US). ZHANG, Hong, Tao [CN/US]; 377 Poplar Avenue #N488, Devon, PA 19333 (US).
- (74) Agents: LICATA, Jane, Massey et al.; Licata & Tyrrell P.C., 66 E. Main Street, Marlton, NJ 08053 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 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.



WO 02/08757 A1

(54) Title: METHOD FOR IMMUNO-DETECTION OF EPTIOPES

(57) Abstract: Methods, systems and kits are provided for detecting molecules expressing a selected epitope in a sample through use of an epitope detector containing a single chain Fv for the selected epitope or a constrained epitope specific CDR attached to an oligonucleotide.

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 1 -

METHOD FOR IMMUNO-DETECTION OF EPITOPES

Background of the Invention

One of the central problems in cell biology and medicine relates to the inability to monitor protein, lipids, sugars and metabolite levels and their modifications in the single living cell. A variety of technologies have been employed to improve the sensitivity of detecting these molecules.

For example, to increase the sensitivity of immunoassays able to detect proteins at very low amounts, the polymerase chain reaction (PCR) technology has been combined with conventional immuno-detection methods (U.S. Patent 5,665,539). This technology, termed immuno-PCR, provides an extremely sensitive method to detect proteins. In immuno-PCR, a linker molecule with bi-specific binding affinity for DNA and antibody is used to attach a marker DNA molecule specifically to an antigen-antibody complex, thus resulting in the formation of a specific antigen-antibody-DNA conjugate. The attached marker DNA can be amplified by PCR with the appropriate primers. As described in U.S. Patent 5,665,539, antigen is immobilized on the surface of microtiter plates and subsequently detected by immuno-PCR. Using this technique, an approximately 10^5 increase in sensitivity over an alkaline phosphatase conjugated ELISA was obtained. Sensitivity advantages of immuno-PCR have subsequently been confirmed in assays for mouse anti-lipoprotein IgG (Ruzicka et al. Science 1993 260:698-699); a human proto-oncogene protein (Zhou et al. Nucleic Acid Res. 1993 21:6038-6039); and tumor necrosis factor alpha (Sanna et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1995 92:272-275).

However, the original immuno-PCR protocol used a streptavidin-protein A chimera to detect the antigen-antibody complex. The variation in the affinity of

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 2 -

protein A against different classes of IgGs limits its direct application in the detection of a broad range of antigens. Certain improved protocols tried to solve this problem by introducing biotinylated secondary antibody or free streptavidins.

Joerger et al. (Clin. Chem. 1995 41(9): 1371-1377) demonstrated that double-stranded DNA labels can be directly attached to antibodies, thus allowing conjugate reagents to be prepared before the assay.

10 Suzuki et al. (Jpn. J. Cancer Res. 1995 86:885-889) describe a method called double determinant immuno-polymerase chain reaction (double-determinant immuno-PCR) which utilizes two monoclonal antibodies, in which the antigens are sandwiched, and a specific DNA
15 molecule is used as a marker. In this method, the first monoclonal antibody to bind the circulating antigen is immobilized instead of the antigen itself. A biotinylated second monoclonal antibody is bound to the antigen and free streptavidin is used to attach a biotinylated DNA to the
20 second monoclonal antibody. The biotinylated DNA complexed with antigen-antibody-streptavidin is amplified by PCR. The products are then analyzed by Southern blot analysis.

While these immuno-PCR techniques have provided advantages over traditional methods of protein detection
25 such as an increase in sensitivity, there still exist several notable limitations to their use. One of the major limitations of immuno-PCR lies in the non-linear amplification ability of PCR reaction. There is no direct correlation between the amount of signal and the amount of
30 protein present. Thus, this technique is limited as a quantitative detection method.

U.S. Patent 5,922,553 discloses a method for quantifying levels of a selected protein via a technique referred to as immuno-aRNA. In this method, a first
35 antibody targeted to a selected protein is immobilized to a

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 3 -

solid support. The support is then contacted with the selected protein so that the selected protein is immobilized to the first antibody. The solid support is then contacted with a RNA promoter-driven cDNA sequence covalently coupled to a second antibody targeted to the selected protein so that the second antibody binds to the bound selected protein. The amount of selected protein is determined by quantifying levels of the promoter driven cDNA sequence covalently coupled to the bound second antibody via an amplified RNA technique. In a preferred embodiment, a T7 promoter driven cDNA sequence is covalently coupled to the second antibody.

It has now been found that single chain fragments as well as exocyclic peptide based complementarity determining region (CDR) subunits can be used in this immuno-aRNA technique. Further, it has been found that PCR, as well as amplified RNA techniques, can be used to quantify the promoter driven cDNA sequence covalently coupled to the bound single chain fragment or CDR subunit. The use of smaller antibody binding units and fragments coupled with the already existing large single chain or cyclic peptide libraries and the use of robotic assistance renders this method widely useful for both medicinal and research purposes. Furthermore, a single third detector species can be coupled with double-stranded DNA and bound to either the single chain Fv or the CDRs, rendering detection uniform and simple. This is referred to herein as a universal detector.

Summary of the Invention

An object of the present invention is to provide a method for detecting molecules expressing a selected epitope in a sample. In this method, an epitope anchor specific for a selected epitope is immobilized to a selected surface. The epitope anchor may comprise a single chain Fv fragment, a CDR, an antibody, or other ligand

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 4 -

peptide or chemical or pharmaceutical that interacts with a selected epitope. The surface is then contacted with a sample suspected of containing molecules which express the selected epitope so that the molecules bind to the

5 immobilized epitope anchor. An epitope detector comprising a single chain Fv for the selected epitope or a constrained epitope specific CDR attached to an oligonucleotide is then used to detect any bound molecules. In one embodiment, the single chain Fv or the CDR has been modified to allow for

10 attachment of oligonucleotides to a single site.

Alternatively, the method of the present invention can be performed with an epitope anchor. In this embodiment, the epitope detector is employed to define molecules bound directly to a surface.

15 Another object of the present invention is to provide systems for the detection of molecules expressing a selected epitope. These systems of the present invention comprise an epitope anchor specific for a selected epitope, a selected surface on which the epitope is or can be

20 immobilized, and an epitope detector comprising a single chain Fv for the selected epitope or a constrained epitope specific CDR attached to an oligonucleotide. In one embodiment, the single chain Fv or the constrained epitope specific CDR is modified to allow for attachment of the

25 oligonucleotides.

Yet another object of the present invention is to provide kits for the detection of molecules expressing a selected epitope which comprise an epitope anchor specific for a selected epitope and an epitope detector comprising a

30 single chain Fv for the selected epitope or a constrained epitope specific CDR attached to an oligonucleotide. In one embodiment, the single chain Fv or the constrained epitope specific CDR is modified to allow for attachment of the oligonucleotides.

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 5 -

Detailed Description of the Invention

The present invention relates to improved methods for quantifying levels of a selected molecule and systems and kits for performing these improved methods. In one embodiment, the method comprises binding an epitope anchor specific for a selected epitope of the molecule to a selected surface. The epitope anchor may comprise a single chain Fv fragment, a CDR, an antibody, or other ligand peptide or chemical specific for a selected epitope. In a preferred embodiment, the epitope anchor is bound to a designated spot on the surface. For example, the surface may comprise a chip and the epitope anchor is bound to a defined spot on the chip. In one embodiment, the epitope anchor is deposited onto a surface or plate with the aid of a pipettor or similar device which permits application at a single site. The surface with the bound epitope anchor is then contacted with a sample suspected of containing molecules expressing the selected epitope so that the molecule binds to the epitope anchor. In another embodiment, the molecule is attached to a surface directly, without the use of an epitope anchor.

Examples of samples which can be assayed via the methods of the present invention include, but are not limited to, individual cells and solutions including biological fluids such as serum. An epitope detector which can bind to any bound molecule on the surface is then used to detect and quantify the amount of bound molecule. The epitope detector comprises a single chain Fv for the selected epitope or a constrained epitope specific CDR which have been modified to allow for attachment of oligonucleotides at a single site.

Fv fragments for selected epitopes can be produced in cells or on microorganisms by use of recombinant DNA technology. For example, Skerra and Pluckthun (Science 1988 240:1038-1041) describe an expression system for

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 6 -

production of functional Fv fragments in *E. coli*.

A method for producing Fv fragments in eukaryotic host cells with a eukaryotic expression vector which has an operon having a DNA sequence which encodes the variable domain only of an antibody light or heavy chain has also been described (J. Mol. Biol. 1988 203:825-828). Chains of the Fv fragment are secreted and correctly assembled by the host cell such that fully functional Fv fragments are produced in the culture supernatant. In addition, the DNA coding sequence may be altered toward its 5' end so that the amino terminal end expresses a residue or residues with a surface suitable for covalent coupling of an oligonucleotide. In addition, the 3' terminal end may be varied so that cysteine residues are produced towards the C-terminal end of each variable domain permitting the variable domains in the dimer to become linked together by disulphide bonding. This may also promote assembly of the Fv fragment. Alternatively, the Fv fragment may be stabilized by use of a vector having a first DNA sequence encoding a first variable domain and a second DNA sequence encoding a second variable domain, the first and second sequences being linked by a third DNA sequence which encodes a joining peptide sequence. In this case, the joining peptide sequence is sufficiently long and flexible to allow folding of the two polypeptides into a functional single chain Fv. Preferably, the host cell is a myeloma cell line which, prior to transformation, does not secrete whole antibody or light chains. Such cells lines are well known and widely available (Reichmann et al. J. Mol. Biol. 1988 203:825-828).

It is believed that random phage technology to any hapten or chemical compound can also be used to select Fvs. (Harrison et al. United States Biochemical Pharma Ltd. (Europe), Watford, United Kingdom)

The CDR technology is well known and has been

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 7 -

described in U.S. Patent 5,334,702, U.S. Patent 5,663,144, and U.S. Patent 5,919,764. In general, CDRs comprises a 6 to 15 mer peptide constrained to be cyclic and modified by aromatic residues. An important step in the design of conformationally constrained peptides for use in the present invention is the delineation of the residues that are important for activity. This is generally accomplished by first synthesizing a set of analogs from the bioactive domain of the original antibody or receptor or ligand of different lengths and establishing the minimal chain lengths for the complete and partial activities. Once the minimal chain length has been established, each side chain can be systematically varied to determine the importance of charge, steric bulk, hydrophobicity, aromaticity, and chirality at each position. After evaluation of the properties of a large set of analogs, it is possible to identify the functional groups and conformation features involved in binding. Different conformationally constrained analogs can then be developed. Various means for constraining peptides have been developed.

One means involves introducing a conformationally constrained amino acid. Hruby (Life Sci. 1982 31:189-199) describes the synthesis of a large number of amino acid and dipeptide derivatives with built-in conformational constraints, as well as their incorporation into biologically active peptides. Prasad et al. (Biopolymers 1995 35:11-20) also describes a method of constraining the conformation of an amino acid unit by replacing the hydrogen atom at the α -carbon with a methyl group to produce a dialkylamino acid. U.S. Patent 6,022,523 describes a method that restricts the conformational freedom of amino acids by introducing a double-bond at the C- α and C- β atoms.

Another means for constraining peptides involves introduction of covalent cross-links. Constraining the

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 8 -

peptide backbone by introduction of covalent cross-links provides more dramatic effects than incorporating unusual amino acids. Macrocyclization is often accomplished by forming an amide bond between the peptide N- and C-termini, between a side chain and the N or C terminus, or between two side chains. A head-to-tail cyclization of side protected peptides synthesized by Fmoc/t-butyl solid phase procedures on polystyrene resin derivatized with 4-hydroxymethyl-3-methoxyphenoxyacetic acid, the first generation dialkoxy-benzyl linkage agent, has been described by Sheppard, R.C. (Int. J. Peptide Res. 1982 20:451-454). In addition, the analogous linkage agent, 4-(4-hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)-butyric acid (HAMA), was recently employed in fragment condensation and solid phase synthesis of peptides with these highly acid sensitive linkers (In Peptides, E. Giralt and D. Andreu eds, ESCOM, Leiden, The Netherlands 1991, 131-133). The enkephalin analogs described by Schiller provide an example of side-chain to backbone covalent cyclization in which covalent attachment of the ϵ -amino group of the D-lys residue to the C terminal backbone carboxylate group of Leu produces a cyclic 16-membered ring analog with high potency and significant μ receptor selectivity (Schiller et al. Int. J. Pep. Prot. Res. 1985; 25:171-177). BOP-reagent and carbodiimide/1-hydroxy-benzotriazole combinations have also been reported to be useful in the formation of cyclic peptides (Felix, A.M. Int. J. Pep. Prot. Res. 1988 31:231-238). Degrado et al. have also developed a biologically active cyclized peptide analog of the GP IIb/IIIa complex using *m*-aminomethylbenzoic acid as the linker (U.S. Patent 6,022,523).

Disulphides can also be formed by oxidation via introduction of cysteine at certain positions. For example, Romani, S. (Int. J. Pep. Prot. Res. 1987 29:107-117) demonstrated that non-symmetrical disulphides can be

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 9 -

built with the help of the di-tertbutyl ester of azodicarboxylic acid. Ploux, O. (Int. J. Pep. Prot. Res. 1987 29:162-169) also describes a method for formation of non-symmetrical disulphides via thiol displacement of the
5 3S-3-nitro-2-pyridinesulfonyl group.

In a preferred embodiment, the oligonucleotide comprises a T7 promoter driven cDNA sequence so that it can be amplified using T7 RNA polymerase. In this embodiment, double stranded cDNA is synthesized for use as a template
10 for T7 RNA polymerase transcription. T7 RNA polymerase requires its promoter site to be double stranded.

In one embodiment, the site on the Fv or CDR to which the oligonucleotides are attached comprises a series of residues which allow the attachment of linkers consisting
15 of chemicals such as heterodimeric coupling reagents or other linkers. These residues provide a uniform binding site for the linker attachment. The linkers attach to this site and also links oligonucleotides to the Fv or CDR. Oligonucleotides may be unmodified or modified. For
20 example, the presence of the amplified oligonucleotide can be enhanced by incorporating a beacon or fluorescent labeled oligonucleotide into the mixture allowing for rapid semi quantitative assessment of the epitope expressing molecules (Tan et al., Chemistry Eur. J. 2000 6(7):1107-
25 1111; Leone et al., Nucleic Acids Res. 1998 26(9):2150-2155).

Bound epitope detectors may be quantified by methods such as amplification by conventional PCR or aRNA techniques. If the detection method used is immuno aRNA,
30 double-stranded oligonucleotides are used in the epitope detector. In this embodiment, aRNA is transcribed on the solid support using a polymerase which recognizes a specific promoter such as T7 RNA polymerase, T3 RNA polymerase or SP6 RNA polymerase, unlabeled
35 ribonucleotides, and fluorescently labeled ribonucleotides.

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 10 -

A variety of means are available for detection of amplified products of the epitope detector. In one embodiment, the aRNA is detectably labeled such as with a radioactive label or a fluorescent label. Alternatively, 5 the aRNA can be converted to cDNA and detected via methods such as gel electrophoresis, high performance liquid chromatography, hybridization assays, immunohistochemical assays and/or specific binding protein assays.

Use of Fvs and CDR peptides as the epitope detector 10 renders this method useful in identifying larger polypeptides than can be identified by the immuno-aRNA technique of U.S. Patent 5,922,553, as well as in identifying motifs in supernatants, fluids, extracts of cells or bacteria or any other eukaryotic organism. 15 Accordingly, the method of the present invention has widespread applicability in both medicinal and research purposes. Further, the method of the present invention is more sensitive than currently available methods and provides quantitative results.

20 The ability of Fvs and CDR peptides to serve as epitope detectors of selected molecules in the method of the present invention was demonstrated for the p185 receptor. Using this method, the released p185 receptor was detected at a 10^8 -fold increase in sensitivity over the 25 ELISA and about a 1000-fold increase over the Western-ECL method. For these experiments, a single chain Fv (ScFv) construct of 7.16.4 (designated as 7.16.4 ScFv) was produced in accordance with the procedure outlined by Peterson & Greene (DNA and Cell Biology 1998 17(12):1031- 30 1040) wherein the Fv region of the heavy chain and light chain region was joined by a (gly4-Ser)5 linker. Since ScFv7.16.4 contained a poly-histidine tag, it was purified over Ni-NTA resin. After purification, the binding of 7.16.4ScFv was confirmed by FACS analysis on B104-1-1 35 cells, in both direct binding and competitive binding

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 11 -

against the monoclonal antibody 7.16.4.

AHNP, a constrained exocyclic peptide designed from the CDR3.H region of the anti-human p185 antibody 4D5 was also used. AHNP binds to p185 and mimics the growth-inhibitory effects of 4D5 (Park et al. Nature Biotechnology 2000 18:194-198).

Both ScFv7.16.4 and AHNP were coupled to a double-stranded oligonucleotide (ds-oligo) to form epitope detectors. Both ds-oligo coupled 7.16.4ScFv and AHNP were able to detect their antigens, rat p185neu from B104-1-1 cells and human p185her2/neu from T6-17 cells, respectively. Further, conjugation with the ds-oligo to form the epitope detector did not change the binding affinity of the CDR detection molecules with their antigens as determined by plasmon resonance analysis. Since 7.16.4ScFv and mAb 7.16.4 have comparable binding affinity against the p185 receptor, they were used at comparable molar concentration in this assay. However, ANHP was used at a higher concentration since its affinity is lower against p185Her2/neu than 4D5.

Coupling of a ds-oligo directly to the CDR or single chain Fv can be a time-consuming procedure, particularly if the purpose is to detect hundreds or thousands of antigens in a mass screening proteomic assay. In addition, variation in the coupling efficiency can complicate the interpretation of the amplification results. Accordingly, in a preferred embodiment of the present invention, the Fv or CDR contains a general or universal epitope such as an hemagglutinin HA tag or polyhistidine tag. An example of a general or universal epitope is the poly-His-tag in the 7.16.4ScFv initially designed for the purification of the protein. A single monoclonal antibody or single chain Fv coupled with ds-DNA is then used to bind to the general epitope to create a universal epitope detector. The efficacy of a universal epitope detector in the method of

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 12 -

the present invention was demonstrated with the poly-His-tag in the 7.16.4ScFv. In these experiments, p185 receptors were captured by A11 coated on the plate, free 7.16.4ScFv was added, followed by extensive washing and 5 then incubating with ds-oligo conjugated anti-His antibody. After T7 polymerase amplification, specific bands from lysates of 10^{-6} dilution of the cells were detected. Accordingly, this sensitivity was even higher than that seen with the basic protocol without a universal epitope 10 detector.

The method of the present invention is also useful in the detection of post-translation modifications. PCR and aRNA techniques were originally developed to detect the activity of target genes at the DNA level. These methods 15 have been adopted exclusively in the application of genomics research, sometimes combined with hybridization. Regardless of sensitivity, these methods are not able to detect the post-translation modification at the protein level. Monitoring of such events, however, is very 20 critical since many modifications including, but not limited to, phosphorylation and glycosylation are related to the functional status of the protein. Thus, experiments were performed to demonstrate the ability of the method of the present invention to detect the phosphorylation of the 25 p185 receptor induced by EGF treatment. A signaling model was established in which, upon EGF stimulation, EGFR heterodimerizes with and trans-activates p185, resulting in the phosphorylation of tyrosine residues on the p185 receptor (Qian et al. Proc. Natl Acad. Sci. 1994 91:1500- 30 1504). The A431 cell line, which overexpresses EGFR as well as p185 erbB2, was used in these experiments. After EGF stimulation, the p185 receptor in the cell lysate was captured by 1E1, a monoclonal antibody developed against p185erbB2/neu. PY99, an IgG2b type of anti-phosphorylated 35 Tyr antibody, was used to detect phosphorylated receptors.

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 13 -

A second antibody, anti-IgG2b, coupled with ds-oligo, was used to probe the antigen-antibody sandwich complex. A431 cells stimulated with EGF produced a positive band, which was not observed in cells without EGF treatment. T6-17
5 cells, however, also showed a positive band, indicating constitutive phospho-tyrosine on the p185 receptor. These data indicate that this method is capable of detecting the functional status of a protein by analyzing its
10 modification. Epitope detectors comprising an Fv or CDR coupled to the ds-oligo can also be used to detect the functional status of the protein.

Thus, the present invention provides a sensitive detection method which eliminates concerns about the non-quantitative nature of immuno-PCR techniques and which
15 offers vast potential in the field of proteomics. By using a polymerase which recognizes a specific promoter such as T7 RNA polymerase, T3 RNA polymerase or SP6 RNA polymerase as well as the specific promoter in the amplification step, assays performed in accordance with this method possess
20 linear amplification and precise quantification which are relevant to biological and medical assays. The number of factors that affect the sensitivity of detection have also been reduced. The specific binding between antigens and their Fv or monovalent CDR is the only critical parameter
25 of this method.

The ability to provide universal epitope detectors provides the method of the present invention with multiple additional advantages. First, any cellular antigens can be detected without having been first coupled to a monoclonal
30 antibody with ds-oligo. Without the universal probe, the method would only be useful in looking at one or several particular antigens at a time. The universal probe, on the other hand, allows for the detection of any cellular or fluid residing antigen with available Fvs or CDRs. In
35 addition, with slight modification in the protocol,

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 14 -

different proteins can be detected simultaneously in a single electrophoresis lane when oligonucleotides of different sizes are attached to the Fv or CDR of the epitope detector. Thus, as demonstrated herein, the method of the present invention provides a versatile technique that is applicable in the identification of protein antigens as well as post-translational modification of polypeptides and other structures such as sugars or lipids at the single cell level of detection.

10 It is believed that this method will also be useful in the analysis of protein interactions and the detection of small molecules. For example, ligand peptides can be used as epitope detectors on tissue samples to identify the expression of specific receptors, or vice versa. With 15 available Fvs, CDRs, or binding proteins, small molecules such as toxins or drug metabolites, can be detected in any solution including, but not limited to, water, foods, and body fluids.

The original immuno-PCR used pure antigens in the 20 assay. Later iterations of Immuno-PCR examined mixed antigens (Hendrickson et al. Nucleic Acids Research 1995 23(3):522-529) but only showed sensitivity of two to three orders of magnitude higher than ELISA. In a real-world assay with the background comprising a huge variety of 25 non-specific antigens, sensitivity is always limited by the specificity of the assay. Epitopes bound by the Fvs or CDR fragments are expected to identify larger polypeptides and can be used to identify motifs in supernatants, fluids, extracts of cells or bacteria or any other eukaryotic 30 organism. Further, actual identity of the polypeptides, organic molecules or sugar structures can be determined by computer aided analysis of data bases using the binding of several epitopes by Fvs as a guide. For example, binding by Fv a, d, e, and f would identify a sugar molecule as 35 having side chains a, d, e, and f, and hence belonging to a

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 15 -

family of sugars having these same side chains. In this way the present invention allows definition and identification of many, if not all molecules in a cell at any one particular time. Moreover this approach can be used to identify alternative transcriptional forms translated in an active cell or cellular supernatant. This procedure is easily amenable to 1) use with nonradioactive detection methods, 2) microtized liquid handling procedures, 3) low sample volume detection such as "protein chip" analysis and 4) robotization.

The following nonlimiting examples are provided to further illustrate the present invention.

EXAMPLES**Example 1: Materials**

Antibodies used include mAbs 7.16.4 and A11, each of which is reactive with a different epitope in the extracellular domain of p185neu. The polyclonal antiserum, α -Bacneu, directed against the intracellular domain of p185neu, was used for Western Blotting. 1E1 is an IgG1 monoclonal antibody generated against the ectodomain of human p185her2/neu. rhuMab 4D5 (Herceptin) was obtained from Genentech. The anti-phosphotyrosine monoclonal antibody PY99 was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The cell line B104-1-1 was derived from NIH3T3 cell by expressing rat oncogenic p185neu. The expression level of p185neu in B104-1-1 cells was determined using an 125 I-labeled anti-neu mAb binding assay. NR6, negative for both EGFR and p185neu, was a subclone from NIH3T3. T6-17 was derived from NIH3T3 by over-expressing the human p185her2/neu receptor. These cell lines were all cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Example 2: Immunoblotting procedures

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 16 -

Subconfluent cells in 10-cm dishes cells were washed twice with cold PBS and solubilized with PI/RIPA (1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate-pH 7.4, 1% Aprotinin, 1 mM

5 phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mM EDTA, 10 mM sodium pyrophosphate, 400 mM sodium orthovanadate, and 10 mM iodoacetamide buffer. Proteins were separated by proper concentration of SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Nitrobind, MSI). Membranes were incubated

10 overnight with the blocking buffer (0.5% non-fat milk and 5% goat serum in PBS). For immunoblotting (Western blot) analysis, antibodies were diluted in PBS containing 0.1% non-fat milk and 1% goat serum. All polyclonal sera and secondary HRP-conjugated antibodies (Boehringer Mannheim)

15 were used at a 1:5000 dilution. Bands were visualized using the ECL assay (Amersham).

Example 3: Expression and Purification of His-tagged 7.16.4

LB media (150 ml) containing 50 µg/ml ampicillin was inoculated with a 15 ml overnight culture of *E. coli* DH5 α

20 and maintained at 30°C until an optical density of 0.5 (600 nm) was obtained. Isopropyl-β-(D-thiogalactopyranoside) (IPTG) was added at a final concentration of 1 mM to induce His-tagged 7.16.4ScFv. After 3 hours, cells were harvested and lysed by freezing and thawing and resuspended

25 in 10 ml of urea lysis buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.1 M Na₂PO₄, 1 M NaCl, 8 M urea) supplemented with 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µM pepstatin A, and 2 µM leupeptin. The insoluble cellular debris was removed by centrifugation (12,000 x g for 15 minutes, followed by

30 12,000 x g for 30 minutes). The clarified supernatant was mixed with 2 ml of Ni-NTA agarose followed by gentle shaking on ice for 1 hour. The mixture was loaded into an empty column and unbound protein was washed with urea lysis buffer (pH 6.3) at 4°C. His-tagged protein was eluted with

35 urea lysis buffer (pH 4.5), and eluate fractions were

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 17 -

examined by SDS-PAGE and FACS analysis as described in Example 4. Proteins in the peak fractions were pooled and dialyzed against TKC buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF).

5 **Example 4: Confirmation of 7.16.4ScFv binding by FACS**

Analysis

Cell-surface antigens were detected by Fluorescence-activated cell sorting (FACS). B104-1-1 cells (about 5x10⁵) were incubated (30 minutes at 4°C) in 200 µl of FACS buffer (PBS containing 0.5% bovine serum albumin and 0.02% sodium azide) containing the purified 7.16.4ScFv. Cells were then washed in FACS buffer and incubated (30 minutes, 4°C) with anti-His antibody (Invitrogen). After this second incubation, cells were washed again in FACS 15 buffer and further incubated with FITC-labeled IgG against mouse immunoglobulins (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). After washing with FACS buffer, the cell pellet was suspended in PBS buffer and processed for analysis by a FACS scan flow cytometer (Becton Dickinson). For each 20 sample, 10,000 viable cells were gated following size (forward scatter, FSC) and granularity (side scatter, SSC) parameters and analyzed with CellQuest Software (Becton Dickinson). For competitive binding, B104-1-1 cells were first incubated with the monoclonal antibody 7.16.4 in the 25 presence of different concentrations of 7.16.4ScFv. Cells were then washed in FACS buffer and further incubated with FITC-labeled IgG against mouse immunoglobulins (Sigma Chemical Co.) before analysis on the flow cytometer.

30 **Example 5: Attachment of ds-cDNA to Antibody or Fv or CDR**

A cDNA oligonucleotide of the following sequence (GAGAGAGGATCCAAGTACTAATAACGACTCACTATAGGGCCGAGAGCCGAGAAGAAAGA CGTTTTTTTTT (SEQ ID NO:1)) was designed with an activatable amine at the 5' end to allow for covalent

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 18 -

coupling to primary amines and a T7 promotor site (TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID NO:2)) used to direct the synthesis of RNA from the cDNA template through the enzymatic activity of T7 RNA polymerase. For attachment of 5 1 μ g of antibody to 30 μ g of ds cDNA, or 1 μ g CDR to 0.1 μ g ds cDNA or 1 μ g ScFv to 3 μ g ds cDNA, an equal volume of 0.1% glutaraldehyde was added in 10 μ l aliquots. The solution was mixed on a rotation device for 3 hours at room temperature. Ethanolamine (1 M; 1/20 volume; pH 7.5) was 10 then added. The solution was mixed for an additional 2 hours at room temperature. The protein-DNA complex was stored at 4°C.

Example 6: RNA amplification

RNA amplification was performed in 96-well plates 15 containing the first Ab-Antigen complex. The following reagents were added: 1X RNA amplification buffer (40 mM Tris-base, pH 7.5, 7 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 2 mM Spermidine; 5 mM DTT; 250 μ M ATP, UTP, GTP; 5 μ M CTP; 0.5 μ l RNasin; 1000 U T7 RNA Polymerase and 3 μ l P³²-CTP. The solution was 20 then incubated for 4 hours at 37°C. The RNA product was removed from the wells and 3 μ l was added to 3 μ l of reaction stop solution (95% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol) and electrophoresed on a 15% denaturing polyacrylamide gel. The gel was 25 apposed to a phosphoimager screen for 5-60 minutes and developed on a phosphoimager at 100 μ M resolution.

Example 7: Standard Sandwich ELISA as a Control Method

Ninety-six well microtiter plates (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp™) were coated with the 1E1 (a monoclonal antibody 30 directed against the extracellular domain of human p185) by incubating plates overnight at 4°C with 100 μ l of coating buffer (antibody concentration: 5 μ g/ml). Plates were then washed three times with PBS containing 0.2% TWEEN 20 (PBS-T; 200 μ l/well), blocked with PBS containing 0.5% FBS

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 19 -

and 0.2% TWEEN 20 (200 μ l/well) for 1 hour at room temperature, and washed again three times with PBS-T (200 μ l/well). In parallel, 100 μ l of a serial dilution of T6-17 cell lysates were added to the plate and incubated for 2 hours at room temperature. After this incubation step, plates were washed with PBS-T (six times, 200 μ l/well) and incubated with humanized anti-p185Her2 antibody 4D5 (150 ng/ml, 50 μ l/well) for 2 hours at room temperature. Subsequently, plates were washed six times and incubated with 50 μ l of anti-human IgG-HRP (Zymed; final dilution: 1:10,000) for another 2 hours at room temperature. Enzymatic reactions were carried out at room temperature by adding TMB (2.5 mM each in 0.1 M phosphate-citrate buffer, pH 5.0) (100 μ l of each reagent/well). Reactions were stopped after 15-60 minutes by the addition of 50 μ l of 1 M H_2SO_4 . Color development was measured at 450 nm using the ELISA reader.

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 20 -

What is Claimed is:

1. A method for detecting molecules expressing a selected epitope in a sample comprising:
 - (a) immobilizing a molecule expressing a selected epitope in a sample to a selected surface;
 - (b) contacting the surface with an epitope detector so that the epitope detector binds to immobilized molecules on the surface; and
 - (c) detecting any epitope detector bound to the surface, wherein bound epitope detector is indicative of molecules expressing the selected epitope in the sample.
2. The method of claim 1 wherein the molecule expressing a selected epitope is immobilized to the selected surface via binding to an epitope anchor on the surface which is specific for the selected epitope.
3. The method of claim 1 wherein the epitope detector comprises a universal epitope detector which detects a general epitope.
4. The method of claim 1 wherein the detected molecule is post-translationally modified.
5. A system for the detection of molecules expressing a selected epitope comprising:
 - (a) a selected surface on which a molecule expressing a selected epitope is or can be immobilized; and
 - (b) an epitope detector comprising a single chain Fv for the selected epitope or a constrained epitope specific CDR either of which have been modified to allow for attachment of oligonucleotides.
6. The system of claim 5 further comprising an epitope anchor for immobilizing the molecule to the

WO 02/08757

PCT/US01/22645

- 21 -

selected surface, said epitope anchor being specific for the selected epitope.

7. The system of claim 5 wherein the epitope detector comprises a universal epitope detector which
5 detects a general epitope.

8. A kit for the detection of molecules expressing a selected epitope comprising an epitope detector comprising a single chain Fv for the selected epitope or a constrained epitope specific CDR.

10 9. The kit of claim 8 further comprising an epitope anchor specific for the selected epitope.

15 11. The kit of claim 8 wherein the single chain Fv or the constrained epitope specific CDR have been modified for attachment of oligonucleotides.

11. The kit of claim 8 wherein the epitope detector comprises a universal epitope detector which detects a general epitope.

WO 02/08757

PCT/US01/22645

SEQUENCE LISTING

<110> Greene, Mark I.
Eberwine, James
Kacharina, Janet Estee
Zhang, Hong Tao
Trustees of the University of Pennsylvania

<120> Method for Immuno-Detection of Epitopes

<130> PENN-0779

<140>
<141>

<150> 09/624,946
<151> 2000-07-25

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 1
gagagaggat ccaagtacta atacgactca ctatagggcc gagagccgag aagaagacg 60
tttttttttt 70

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 2
taatacgact cactataggg 20

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US01/29645 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :G01N 88/53, 88/48; C07K 13/00; C07H 21/02, 21/04; C12N 1/20 US CL :436/6, 7.1, 252.5, 810; 530/350; 536/28.1, 28.1 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. : 436/6, 7.1, 252.5, 810; 530/350; 536/28.1, 28.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN searched, medline, biosis, caplus, uspat search terms: complementary determining region, polymerase chain reaction, universal epitope, Elisa, hemagglutinin, polyhistidine | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X --- | Suzuki et al. Double Determinant Immuno-Polymerase Chain Reaction: A Sensitive Method for Detecting Circulating Antigens in Human Sera. Jpn. J. Cancer Res. 1995, Vol. 86, pg. 885-889, especially page 885, the Abstract and first paragraph. | 1-6 --- |
| Y | Skerra et al. Assembly of a Functional Immunoglobulin Fv Fragment in Escherichia coli. Science, 1988. Vol. 240, pg. 1038-1041, especially, page 1038, the Abstract and first paragraph. | 5-6, 8-11 |
| Y | | 5-6 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance; "E" earlier document published on or after the international filing date; "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified); "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means; "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed; "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention; "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone; "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art; "Z" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 20 AUGUST 2001 | | Date of mailing of the international search report 18 OCT 2001 |
| Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 805-3930 | | Authorized officer JOYCE TUNG <i>Joyce Tung</i> Telephone No. (703) 808-0196 |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US01/22645 |
|---|--|---|
| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | US 4,965,205 A (QUENTIN-MILLET et al.) 23 October 1990, col. 4, lines 26-30. | 7 |

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,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,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,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 エバーワイン, ジェイムズ エイチ.

アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19129、フィラデルフィア、ヘンリー アベニュー
3918

(72)発明者 カチャルミナ, ジャネット エステイー

アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19119、フィラデルフィア、ブライアン ストリート
7312

(72)発明者 ツァン, ホン タオ

アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19333、デボン、ポプラー アベニュー #エヌ48
8 377

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 免疫检测表位的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2004506880A | 公开(公告)日 | 2004-03-04 |
| 申请号 | JP2002514400 | 申请日 | 2001-07-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 宾夕法尼亚大学的受托人 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 宾夕法尼亚大学的受托人 | | |
| [标]发明人 | グリーンマークアイ エバーワインジェイムズエイチ カチャルミナジャネットエステー ツアンホンタオ | | |
| 发明人 | グリーン,マーク アイ. エバーワイン,ジェイムズ エイチ. カチャルミナ,ジャネット エステー ツアン,ホン タオ | | |
| IPC分类号 | G01N33/543 C07K16/06 C07K16/32 G01N33/532 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | G01N33/6878 C07K16/06 C07K16/32 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N33/532 G01N33/6857 | | |
| FI分类号 | G01N33/543.525.G G01N33/532.Z | | |
| 优先权 | 09/624946 2000-07-25 US | | |
| 其他公开文献 | JP2004506880A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

一种通过使用表位检测器检测表达样品中所选表位的分子的方法，所述表位检测器包含与寡核苷酸连接的选定表位的单链Fv或结合表位特异性CDR，提供系统和套件。

| | | |
|--|---|---|
| | | (P2004-506880A) (43) 公表日 平成16年3月4日(2004.3.4) |
| (61) Int. Cl. ⁷ G01N 33/543 G01N 33/532 | FI G01N 33/543 525G G01N 33/532 Z | テーマコード(参考) |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁) | | |
| (21) 出願番号 特願2002-514400 (P2002-514400) | (71) 出願人 500536467 | |
| (86) (22) 出願日 平成13年7月18日(2001.7.18) | ザ トラスティーズ オブ サ ユニバー シティ オブ ペンシルヴァニア | |
| (85) 翻訳文提出日 平成15年1月24日(2003.1.24) | アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19 107、フィラデルフィア、マーケット ストリート 3700、スイート 300 、センター フォー テクノロジー トラ ンスファア | |
| (86) 国際出願番号 PCT/US2001/022645 | (74) 代理人 100102842 | |
| (87) 国際公開番号 W02002/008757 | 弁理士 葛和 清司 | |
| (87) 国際公開日 平成14年1月31日(2002.1.31) | (72) 発明者 グリーン, マーク アイ. | |
| (31) 優先権主張番号 09/624,946 | アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 1 9071、ペン バレー、ライタース ミ ル ロード 300 | |
| (32) 優先日 平成12年7月25日(2000.7.25) | | |
| (33) 優先権主張国 米国 (US) | | 最終頁に続く |
| (64) 【発明の名称】 エピトープの免疫検出のための方法 | | |