

(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2004-532393

(P2004-532393A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 A	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 H	4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 5
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15 Z	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 52 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-566655 (P2002-566655)	(71) 出願人	500429103 ザ・トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバー シティ・オブ・ペンシルバニア アメリカ合衆国ペンシルバニア州1910 4-6283, フィラデルフィア, チェス ナット・ストリート 3160, スウィー ト 200
(86) (22) 出願日	平成14年2月8日 (2002.2.8)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月15日 (2003.8.15)	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/003640	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02002/066980	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成14年8月29日 (2002.8.29)		
(31) 優先権主張番号	09/783, 896		
(32) 優先日	平成13年2月15日 (2001.2.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	09/977, 716		
(32) 優先日	平成13年10月15日 (2001.10.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光染料を通した分子のエピトープの免疫検出及び分子の相互作用の検出のための方法

## (57) 【要約】

選択されたエピトープに関する単鎖 F v 又は強制されたエピトープ特異的 C D R、C D R 模倣物又は工作された C D R 構造を、オリゴヌクレオチドに結合させて含むエピトープ検出器の使用を通してサンプル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及びキットを提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

選択されたエピトープを発現する分子をサンプルの中から検出する方法であって、

(a) サンプル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) 上記表面をエピトープ検出器に接触させることにより、表面上の固定化された分子にエピトープ検出器が結合するようにするが、但し、エピトープ検出器は、選択されたエピトープに関するモノクローナル抗体、上記エピトープに関する単鎖 F v 又は強制されたエピトープ特異的 C D R、C D R 模倣物又は工作された C D R 構造に結合させたオリゴヌクレオチドを含み；

10

(c) 上記エピトープ検出器のオリゴヌクレオチドを増幅し；

(d) 上記オリゴヌクレオチドを染色する蛍光染料に上記の増幅されたオリゴヌクレオチドを接触させ；そして

(e) 表面に結合したエピトープ検出器及びサンプル中の選択されたエピトープを発現する分子の指標である染色されたオリゴヌクレオチドから放射される蛍光を測定することを含む方法。

## 【請求項 2】

選択されたエピトープを発現する分子の蛍光による検出のための、

(a) 選択されたエピトープに関するモノクローナル抗体、上記エピトープに関する単鎖 F v 又は強制されたエピトープ特異的 C D R、C D R 模倣物又は工作された C D R 構造に結合させたオリゴヌクレオチドを含むエピトープ検出器；

20

(b) R N A ポリメラーゼ；

(c) 増幅反応バッファー；

(d) 蛍光染料

を含むキット。

## 【請求項 3】

エピトープ検出器のオリゴヌクレオチドがビオチンにカップリングされており、そしてモノクローナル抗体、単鎖 F v 又は強制されたエピトープ特異的 C D R、C D R 模倣物又は工作された C D R 構造がストレプトアビジンにカップリングされていることにより、オリゴヌクレオチドのモノクローナル抗体、単鎖 F v 又は強制されたエピトープ特異的 C D R、C D R 模倣物又は工作された C D R 構造に対する結合によるエピトープ検出器の形成がビオチン - ストレプトアビジン後の複合体による、請求項 2 記載のキット。

30

## 【請求項 4】

細胞溶解物中の蛋白質をプロファイリングする方法であって、

(a) 選択されたエピトープに関するモノクローナル抗体、選択されたエピトープに関する単鎖 F v 又は強制されたエピトープ特異的 C D R、C D R 模倣物又は工作された C D R 構造を異なる長さの c D N A s にコンジュゲートさせて含むエピトープ検出器の混合物を、細胞溶解物に添加し；

(b) R N A 増幅を実施し；

(c) R N A s を電気泳動により分離し；そして

40

(d) 溶解物中の蛋白質のプロファイルを決定できるように R N A 産物を蛍光により可視化すること

を含む方法。

## 【請求項 5】

蛋白質をプロファイルするための、

(a) 選択されたエピトープに関するモノクローナル抗体、上記エピトープに関する単鎖 F v 又は強制されたエピトープ特異的 C D R、C D R 模倣物又は工作された C D R 構造を、異なる長さの c D N A s にコンジュゲートさせて含む、エピトープ検出器の混合物；

(b) R N A ポリメラーゼ；

(c) 増幅反応バッファー；

50

(d) 蛍光染料  
を含むキット。

【請求項 6】

エピトープ検出器のオリゴヌクレオチドがビオチンにカップリングされており、そしてモノクローナル抗体、単鎖 Fv 又は強制されたエピトープ特異的 CDR、CDR 模倣物又は工作された CDR 構造がストレプトアビジンにカップリングされていることにより、オリゴヌクレオチドのモノクローナル抗体、単鎖 Fv 又は強制されたエピトープ特異的 CDR、CDR 模倣物又は工作された CDR 構造に対する結合によるエピトープ検出器の形成がビオチン-ストレプトアビジン後の複合体による、請求項 5 記載のキット。

【請求項 7】

インビトロにおいて分子の相互作用を監視するための 2 成分系を開発する (develop) 方法であって、

- (a) 第 1 の分子の固相支持体に固定化し；
  - (b) 第 1 の分子に相互作用する第 2 の分子を固相支持体に添加し；
  - (c) ポリメラーゼのプロモーターを含むオリゴヌクレオチドをコンジュゲートしたユニバーサルエピトープ検出器を上記固相支持体に添加し；
  - (d) RNA 増幅を実施し；
  - (e) 増幅されたオリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドを染色する蛍光染料に接触させ；そして
  - (f) 第 1 の分子の第 2 の分子に対する結合の指標である、染色されたオリゴヌクレオチドから放射された蛍光を測定すること
- を含む方法。

【請求項 8】

第 1 及び第 2 の分子が蛋白質、糖、糖質、DNA、RNA、又は構造上のコンフォメーションを伴うペプチドである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

インビトロにて分子の相互作用を監視する方法であって、

- (a) 請求項 7 記載の方法に従い 2 - 成分系を開発し (develop)；
  - (b) 第 3 の分子を 2 - 成分系に添加し；そして
  - (c) 蛍光の変化を測定することにより上記の 2 - 成分系の第 1 分子と第 2 分子の結合及び相互作用に対する第 3 の分子の作用を監視するが、但し、蛍光の正の変化が第 1 分子と第 2 分子の結合を促進する第 3 分子の指標であり、そして負の変化が第 1 分子と第 2 分子の結合を阻害する第 3 分子の指標であること
- を含む方法。

【請求項 10】

第 3 の分子がリガンド又は薬学上の薬剤を含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

受容体又は受容体と相互作用する蛋白質を標的とするエピトープ検出器又は治療剤における使用のための CDR、CDR 模倣物又は工作された CDR 構造の同定方法であって、エピトープ又は標的化受容体又は蛋白質により分子を結合させる CDR、CDR 模倣物又は工作された CDR 構造を規定するために CDR、CDR 模倣物又は工作された CDR 構造のライブラリーをスクリーニングすることを含む、上記方法。

【請求項 12】

ライブラリーが CDR - ストレプトアビジン構造を含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

請求項 11 記載の方法に従い同定された CDR 又は CDR 模倣物を含む治療剤。

【請求項 14】

CDR 又は CDR 模倣物をヒト化抗体に再挿入するか又は Fc に結合させた、請求項 12 記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【発明の開示】

【0001】

序論

この出願は、2000年7月25日に出願された米国特許出願連続番号09/624,946号の一部継続出願である、2001年2月15日に出願した米国特許09/783,896号の一部継続出願である。

発明の背景

蛋白質の検出及び定量のための慣用の方法論は、2-Dゲル電気泳動、質量分光測定及び抗体結合を含む。各方法論は相対的に大量の組織からの蛋白質レベルを定量するのに使用されてきたが、各々は感度の欠如をこうむる。

10

【0002】

蛋白質、脂質、糖及び代謝レベル及びそれらの修飾を監視する能力の改良が、細胞生物学及び医薬に必要とされる。様々な技術が用いられることにより、これらの分子を検出する感度が改良されてきた。検出法の最近の例は、免疫-RNA, RCA及び免疫-aRNAを含む。

【0003】

免疫-PCR(米国特許第5,665,539号)は、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)を、蛋白質を検出する感度を増大させるための慣用の検出法と組み合わせる。しかしながら、免疫-PCRの主な限界は、PCR反応の非直線性増幅能力に見いだされ、この技術を、定量性検出法として限定させる。即ち、この方法は、シグナルの量と存在する蛋白質の量の間の非直接の相関を提供する。

20

【0004】

相対的な恒温性回転循環DNA増幅技術(RCA; Schwieter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10113, 2000)は、この技術が免疫-PCRに付随する定量に関する問題の幾つかを克服するものとして、免疫-PCRを超える改良を提供する。

【0005】

米国特許第5,922,553号は、免疫-aRNAと呼ばれる技術を通して、選択された蛋白質のレベルを定量する方法を開示する。この方法においては、選択された蛋白質を標的とする一次抗体を固相支持体に固定化する。当該支持体を、次に、選択された蛋白質と接触させることにより、選択された蛋白質を、一次抗体に固定化する。固相支持体は、次に、上記選択された蛋白質を標的とする二次抗体に共有カップリングさせたRNAプロモーター推進性cDNA配列に接触させる。選択された蛋白質の量は、増幅RNA技術により、結合した二次抗体に共有カップリングした上記プロモーター推進性cDNA配列のレベルを定量することにより、測定される。好ましい態様においては、T7プロモーター推進性cDNA配列を二次抗体に共有カップリングさせる。

30

【0006】

単鎖断片並びに環外ペプチドに基づく相補決定領域(CDR)サブユニットがこの免疫-aRNA技術において使用可能であることを、今見いだした。さらに、PCR、並びに増幅されたRNA技術を用いて、結合した単鎖断片又はCDRサブユニットに共有カップリングさせたプロモーター推進性cDNA配列を定量することができることを発見した。既に存在する大きな単鎖又は環状ペプチドライブラリーにカップリングさせた小さな抗体結合のユニット又は断片の使用及びロボットの補助の使用は、この方法を、医療の目的及び研究の目的の両方のために広く有用なものとさせる。さらに、単独の第3の検出器(detector)の種は、二重鎖DNAにカップリングさせ且つ単鎖Fv又はCDRsのいずれかに結合させることができ、検出を均一且つ単純にさせる。

40

発明の概要

本発明の目的は、サンプル中の、選択されたエピトープを発現する分子を検出する方法を提供することである。この方法においては、選択されたエピトープに特異的なエピトープアンカー種を選択された表面に固定化させる。当該エピトープアンカーは、単鎖Fv断片

50

、CDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造、抗体、又は他のリガンドペプチド又は選択されたエピトープと相互作用する化学物質又は医薬を含んでよい。表面を、次に、選択されたエピトープを発現する分子を含む疑いのあるサンプルと接触させて、上記分子を固定化されたエピトープアンカーに結合させる。選択されたエピトープのための単鎖Fv又はオリゴヌクレオチド、好ましくはcDNAに結合させた、強制的(constrained)エピトープ特異的CDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造を含むエピトープ検出器を次に使用して、あらゆる結合分子を検出する。上記オリゴヌクレオチドは、単鎖Fv、CDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造に結合するピオチン-ストレプトアビジン又はピオチン-アビジンを通して、化学的にコンジュゲートするか又は結合させることができる。あるいは、本発明の方法をエピトープアンカーなしに実施することができる。この態様においては、エピトープ検出器を用いて、表面へ直接結合させた分子を規定する。

10

## 【0007】

この方法の好ましい態様において、検出は、蛍光に由来する数値の標準蛍光測定装置を用いて読み出しを通して実施する。より特定すれば、この態様においては、エピトープアンカーのオリゴヌクレオチドの増幅後に、蛍光染料を直線様式にて核酸に取り込む。選択された波長における励起に際して、染料は、負荷されたサンプルの質量に正比例して蛍光シグナルの量を生じる。

## 【0008】

異なる長さのcDNAにコンジュゲートされた、選択されたエピトープのためのモノクローナル抗体、選択されたエピトープのための単鎖Fv又は強制的エピトープ特異的CDRs、CDR模倣物又は工作されたCDR構造の何れかを含む混合物を用いて、本発明の方法を細胞溶解物中の蛋白質をプロファイルするのに用いることもできる。

20

## 【0009】

一つの態様において、エピトープ検出器における使用のためのCDRs、CDR模倣物又は工作されたCDR構造は、分子をエピトープと結合させるCDRs、CDR模倣物又は工作されたCDR構造を規定するための、CDRs、CDR模倣物又は工作されたCDR構造のライブラリーのスクリーニングを通して同定される。これらのライブラリーを通してスクリーニングすることにより同定されたCDRs又はCDR模倣物は、受容体を標的とする治療剤又は受容体と相互作用する蛋白質として使用することもできる。治療剤として使用された場合、CDRs又はCDR模倣物はヒト化抗体に再挿入されるか又はFcに結合させることが好ましい。

30

## 【0010】

本発明の別の目的は、選択されたエピトープのための単鎖Fv又はオリゴヌクレオチド、好ましくは二重鎖cDNAに結合させた、強制的エピトープ特異的CDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造を含むエピトープ検出器を含む、選択されたエピトープを発現する分子の検出のためのキットを提供することである。さらに、上記キットは、好ましくは、RNAポリメラーゼ、増幅バッファー及び増幅産物の染色のための蛍光染料を含む。本発明のキットは、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んでよい。一つの態様において、上記単鎖Fv又は強制的エピトープ特異的CDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造は、オリゴヌクレオチドへの結合を可能にさせるために修飾する。別の態様において、上記キットは、細胞溶解物の中の蛋白質のプロファイリングのためのエピトープ検出器の混合物を含む。

40

## 【0011】

本発明の方法及びキットは、サンプルの高処理量操作及びスクリーニングのための、便利な96-ウエル又は384-ウエルのプレートプラットフォームに処方する(formulated)ことができる。

## 【0012】

本発明の方法及びキットは、特に分子の相互作用、例えば蛋白質-蛋白質相互作用及び糖-蛋白質相互作用を分析する際、並びに化学物質薬学物質及び限定ではないが蛋白質、脂

50

質及び糖を含む他の分子種により誘導されるこれらの相互作用における変化を監視するのに有用である。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、選択された分子のレベルを定量するための改良された方法及びこれらの改良された方法を実施するための系及びキットに関する。一つの態様において、上記方法は、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、単鎖のFv断片、CDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造、抗体、又は他のリガンドペプチド又は選択されたエピトープに特異的な化学物質を含んでよい。好ましい態様において、エピトープアンカーは上記表面上の指定されたスポットに結合させる。例えば、上記表面はチップを含んでよく、そしてエピトープアンカーをチップ上の規定されたスポットに結合させる。一つの態様において、エピトープアンカーは、ピペッター又は単一の部位においての適用を可能にさせる類似の装置の支援により表面又はプレート上に被覆される。結合したエピトープアンカーを伴う表面を、次に、選択されたエピトープを発現する分子を含む疑いのあるサンプルに接触させ、それにより、分子はエピトープアンカーに結合する。他の態様においては、上記分子を直接表面に、エピトープアンカーを使用せずに結合させる。

10

#### 【0013】

本発明の方法によりアッセイできるサンプルの例は、限定ではないが、個体(individual)の細胞及び生物学上の液体、例えば血清を含む。

表面上に結合したあらゆる分子を結合できるエピトープ検出器を次に使用することにより、結合した分子の量を検出及び定量する。上記エピトープ検出器は、モノクローナル抗体、選択されたエピトープのための単鎖Fv又は強制的エピトープ特異的CDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造を含むか又はオリゴヌクレオチド、好ましくは二重鎖DNAの結合を単一部位にて可能にさせるように修飾されたものを含んでよい。あるいは、結合活性を有する抗体の断片、scFv又はCDRペプチドを用いることにより、この技術において抗体を置き換えることができる。

20

#### 【0014】

選択されたエピトープに関するFv断片は、組換えDNA技術の使用により細胞中又は微生物上にて生産することができる。例えば、Skerra and Pluckthun (Science 1988 240: 1038-1044)は、大腸菌内での機能性Fv断片のための発現系を記載する。

30

#### 【0015】

抗体の軽鎖又は重鎖の可変ドメインのみをコードする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内でFv断片を製造する方法も記載された(J. Mol. Biol. 1988 203: 825-828)。完全な機能性Fv断片が細胞上清中に生産されるように、Fv断片の鎖が宿主細胞により分泌されて正確に折り畳まれる。さらに、アミノ末端エンドがオリゴヌクレオチドの共有カップリングに適した表面を伴う一つ又は複数の残基を発現するために、上記DNAコーディング配列をその5'末端に向かって変更させてよい。さらに、システイン残基が各可変ドメインのC-末端エンドに向かって生産されて、ダイマー中の可変ドメインがジスルフィド結合により互いに結合することを可能にするため、3'末端エンドを変更させてよい。これは、Fv断片の集合を促進するかもしれない。あるいは、第1可変ドメインをコードする第1DNA配列と第2可変ドメインをコードする第2DNA配列を有し、且つ接合ペプチド配列をコードする第3のDNA配列により上記第1配列と第2DNA配列が結合しているベクターの使用により、Fv断片を安定化させてよい。この場合、接合ペプチド配列は、上記2つのポリペプチドが機能性単鎖Fvに折り畳まれるのを可能にさせるように、十分長くて柔軟である。好ましくは、宿主細胞は、形質転換前に全部の抗体又は軽鎖を分泌しない骨髓腫細胞系である。そのような細胞系はよく知られており、広く利用可能である(Reichmann et al., J. Mol. Biol. 1988 203: 825-828)。

40

#### 【0016】

50

任意のハプテン又は化学化合物に対してのランダムファージ技術もFvsを選択するのに使用可能であると信じられる。(Harisson et al. United States Biochemical Pharma Ltd. (欧州), Watford, 英国)

CDR技術はよく知られており、米国特許第5,334,702号、米国特許第5,663,144号及び米国特許第5,919,764号に記載されている。抗体分子は、相補性決定基(CDRs)と呼ばれる6つの可変ループを通してそれらの抗原に結合する。重鎖からのCDR3はしばしばその特異性を媒介する。強制的環状CDR模倣物のデザインのための一般的な方法論は、Williams et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989 86:5537-5541)、Sargoviet al (Science 1991 253:792-795)及びMurali et al (Immunol. Res. 1998 17:163-169)により記載される。通常、CDRsは、強制的に(constrained)環状にされて芳香性残基により修飾された6から15マーのペプチドを含む。CDR模倣物は、特異性、親和性及び生物活性に関してそれらの親抗体を模倣することができる小さな分子である(約1kDa)。CDR模倣物の環状形態は約5から13の強制的アミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0017】

本発明のためには、CDRを含むエピトープ検出器又はエピトープアンカーは、CDR又はCDR模倣物から本質的になってよい。あるいは、エピトープ検出器又はエピトープアンカーは、ヒト化抗体フレームワークに再挿入されるか又はFcに結合される結合として定義されるCDR又はCDR模倣物を含んでよい。ヒト化抗体フレームワークに再挿入されるか又はFcに結合されるCDRs又はCDR模倣物も、本明細書では、工作されたCDR構造と呼ぶ。しかしながら、この開示を読んだ当業者には理解されるとおり、用語「工作されたCDR構造」は、CDR又はCDR模倣物が挿入されるあらゆる蛋白質を含む。そのような蛋白質の例は、限定ではないが、イムノグロブリン遺伝子ファミリー、ミニボディ又は小抗体様の分子、あるいはCDRが抗原結合表面として機能することを可能にさせる他のあらゆるフレームワークを含む。

#### 【0018】

本発明における使用のための、CDR、CDRs模倣物及び工作されたCDR構造のデザインにおける重要な工程は、活性に重要な残基の描写である。これは、一般に、最初にオリジナル抗体又は受容体又はリガンドの生物活性ドメインから一連の違う長さの類似体を合成し、そして完全活性及び部分活性のための最小の鎖の長さを立証することにより達成される。最小の鎖の長さが立証されたなら、各側鎖を規則正しく変更することにより、各位置の電荷、立体の大きさ、疎水性、芳香性、キラル性(chirality)の重要性を決定することができる。類似体の大きなセットの特性を評価したあとには、結合に関与する官能基とコンフォメーションの特性を同定することができる。別々のコンフォメーション上の強制的類似体を次に開発することができる。ペプチドを強制する(constraining)様々な手段が開発されている。

#### 【0019】

一つの手段は、コンフォメーション上強制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、ビルトインのコンフォメーション上の強制物による多数のアミノ酸とジペプチド誘導体の合成、並びに生物学上活性なペプチドへのそれらの取り込みを記載する。Prasad et al. (Biopolymers 1995 35:11-20)も、 $\alpha$ -炭素の水素の位置をメチル基に交換することによりアミノ酸のコンフォメーションを強制して、ジアルキルアミノ酸を生産する方法を記載する。米国特許第6,022,523号は、C- とC- 原子において二重結合を導入することによるアミノ酸のコンフォメーション上の自由度を制限する方法を記載する。

#### 【0020】

ペプチドを強制するための別の手段は、共有架橋結合の導入を含む。共有架橋結合の導入

によるペプチドバックボーンの強制は、普通でないアミノ酸を取り込むよりも、より劇的な効果を提供する。大環状化は、ペプチドのN-末端とC-末端の間、側鎖とN又はC末端の間、又は2つの側鎖の間に、アミド結合を形成させることにより、しばしば達成される。第一世代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により誘導されたポリスチレン樹脂上のFmoc/t-ブチル固相手法により側鎖を保護されたペプチドのヘッドウーテイル環状化が、Sheppard, R. C. (Int. J. Peptide Res. 1982 20: 451-454)に記載された。さらに、類似のリンカー、4-(4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ)-ブチル酸(HAMA)が、最近、これらの高度に酸感受性のリンカーによる断片濃縮化及び固相合成において用いられた(In Peptides, E. Giralt and D. Andreu 編纂、ESCOM, Leiden, The Netherlands 1991, 131-133)。Schillerにより記載されたエンケファリン類似体は、バックボーンの共有環状化に対する側鎖の例を適用するが、LeuのC末端バックボーンカルボキシレート基への、D-lys残基のε-アミノ基の共有結合が有能性及び重要性の高いμ受容体選択性を有する環状の16-員環類似体を生成する(Schiller et al. Int. J. Pept. Prot. Res. 1985; 25: 171-177)。BOP-試薬及びカルボジイミド/1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾールの組み合わせも、環状ペプチドの形成に有用であることが報告された(Felix, A. M. Int. J. Pept. Prot. Res. 1988 31: 231-238)。Degradらも、リンカーとしてm-アミノメチル安息香酸を用いて、GP I Ib/I I A複合体の生物学上活性な環状化ペプチド類似体を開発した(米国特許第6,022,523号)。

10

20

30

40

50

#### 【0021】

ジスルフィドは、特定の位置におけるシステインの導入による酸化により形成することもできる。例えば、Romani, S. (Int. J. Pept. Prot. Res. 1987 29: 107-117)は、アゾジカルボキシル酸のジ-第三級ブチルアスター(aster)の支援により非対称性ジスルフィドが構築できることを証明した。Ploux, O. (Int. J. Pept. Prot. Res. 1987 29: 162-169)も、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性ジスルフィドの形成方法を記載する。

#### 【0022】

好ましい態様において、本発明において使用されるオリゴヌクレオチドは、二重鎖であって、且つT7プロモーター推進性cDNA配列を含むことにより、T7のRNAポリメラーゼを用いて増幅することができる。この態様においては、T7のRNAポリメラーゼのための鑄型としての使用のために、二重鎖cDNAを合成する。T7のRNAポリメラーゼはそのプロモーター部位が二重鎖であることを必要とする。

#### 【0023】

一つの態様において、オリゴヌクレオチドが結合する、Fv又はCDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造上の部位は、化学物質、例えばヘテロダイマーカップリング試薬又は他のリンカーからなるリンカーの結合を可能にさせる残基のシリーズを含む。これらの残基は、リンカー結合のための特異な結合部位を提供する。リンカーはこの部位に結合し、そしてオリゴヌクレオチドをFv又はCDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造に結合させる。オリゴヌクレオチドは、未修飾でも修飾されていてもよい。例えば、ビーコン(beacon)又は蛍光により標識したオリゴヌクレオチドを上記混合物に取り込むことにより、増幅されたオリゴヌクレオチドの存在を増強することができ、エピトープ発現分子の迅速な半定量的評価を可能にさせる(Tan et al. Chemistry 2000 6: 1107-1111; Leone et al. Nucleic Acids Res. 1998 26(9): 2150-2155)。

#### 【0024】

別の態様においては、エピトープ検出器のオリゴヌクレオチドをビオチンにカップリング

させ、そしてモノクローナル抗体、単鎖Fv又はCDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造に特異的な強制的エピトープをストレプトアビジンにカップリングさせ、そしてモノクローナル抗体、単鎖Fv又はCDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造に特異的な強制的エピトープへの上記オリゴヌクレオチドの結合が、ビオチンとストレプトアビジンの複合体形成により起こる。

【0025】

結合したエピトープ検出器は、慣用のPCR又はaRNA技術による増幅のような方法により定量してよい。用いられる検出方法が免疫aRNAならば、二重鎖cDNAをエピトープ検出器として用いるのが好ましい。この態様においては、aRNAを、ポリメラーゼ、未標識リボヌクレオチド及び蛍光標識リボヌクレオチドを用いて、固相支持体上で転写させる。本発明のための「ポリメラーゼ」は、特定のプロモーターを認識するポリメラーゼを意味する。本発明に有用なポリメラーゼの例は、限定ではないが、T7のRNAポリメラーゼ、T3のRNAポリメラーゼ、SP6のRNAポリメラーゼ、29のポリメラーゼ、及びTaqポリメラーゼを含む。別の態様においては、増幅された産物をリバーストランスクリプターゼ又はレプリカーゼによるさらなる増幅のための鋳型として作用させて、感度を増加させることができる。

【0026】

様々な手段がエピトープ検出器の増幅産物の検出に利用可能である。一つの態様においては、核酸配列は、放射線標識又は蛍光標識によるように検出可能に標識される。好ましい態様においては、核酸配列は標識されないが、蛍光染料により染色される。他の方法、例えば、ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー、ハイブリダイゼーションアッセイ、免疫組織化学アッセイ及び/又は特異的結合アッセイも、検出に用いることができる。

【0027】

Fvs及びCDRs、CDR模倣物又は工作されたCDR構造の、エピトープ検出器としての使用は、米国特許第5,922,553号の免疫aRNA技術により同定できたのよりも大きなポリペプチドを同定すること、及び細胞又は細菌又はあらゆる他の真核生物の上清、液体、抽出物内のモチーフを同定することにおいて、本発明の方法を有用にさせる。従って、本発明の方法は、医療の目的及び研究の目的の両方において広い応用性を有する。さらに、本発明の方法は、現在利用可能な方法よりも感度がよくて、定量性の結果を提供する。

【0028】

Fvs及びCDRs、CDR模倣物又は工作されたCDR構造が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器として機能する能力を、p185受容体に関して証明した。この実験に関しては、7.16.4の単鎖Fv(ScFv)構築物(7.16.4 ScFvと呼ぶ)をPeterson & Greene(DNA and Cell Biology 1998 17(12):1031-1040)により概説された手法に従い製造したが、重鎖のFv領域と軽鎖領域を(gly4-Ser)5リンカーにより連結した。ScFv7.16.4はポリヒスチジンのタグを含んだため、Ni-NTA樹脂上で精製した。精製後に、7.16.4 ScFvの結合をB104-1-1細胞上のFACS分析により、モノクローナル抗体に対する直接の結合及び競合結合の両方において確認した。

【0029】

抗-Hitp185抗体のCDR3、H領域からデザインされた強制的環外ペプチドであるAHNPも使用した。AHNPはp185に結合して、4D5の成長阻害効果を模倣する(Park et al. Nature Biotechnology 2000 18:194-198)。

【0030】

ScFv7.16.4及びAHNPの両者を、二重鎖オリゴヌクレオチド(ds-oligo)にカップリングさせることにより、エピトープ検出器を形成させた。ds-oligoをカップリングした7.16.4 ScFv及びAHNPは共に、それらの抗原である

10

20

30

40

50

、 B 1 0 4 - 1 - 1 細胞及び T 6 - 1 7 細胞由来のヒト p 1 8 5 h e r 2 / n e u をそれぞれ検出することができた。さらに、エピトープ検出器を形成させるための d s - o l i g o とのコンジュゲーションは、プラスモン共鳴分析により測定したところ、CDR 検出分子とそれらの抗原との結合親和性を変化させなかった。7 . 1 6 . 4 S c F v 及び m A b 7 . 1 6 . 4 は p 1 8 5 受容体に対して同等の結合親和性を有するので、それらをこのアッセイにおいて同等のモル濃度にて使用した。しかしながら、A H N P は、その親和性が 4 D 5 よりも p 1 8 5 H e r 2 / n e u に対して低いため、高濃度で使用した。

**【 0 0 3 1 】**

A H N P は、M 1 3 ファージシステムを用いてストレプトアビジン融合蛋白質としても発現させた。S t r e p t o m y c e s a v i d i n i i 由来のコアのストレプトアビジン配列の c D N A を、( G l y 4 S e r ) 2 リンカーの配列も含む 5 ' P C R プライマーを用いて P C R によりクローン化した。A H N P 及び追加の G l y 4 S e r リンカーをコードする相補なオリゴヌクレオチドを合成してアニールさせることにより、二重鎖 D N A を形成させた。ライゲーションの後に、融合物は、( G l y 4 S e r ) 3 リンカーの N - 末端の A H N P からなり、コアストレプトアビジン ( S A ) 配列へと続く。テトラマー A H N P 模倣物と、テトラマーに普通は似ている S A の間の柔軟性を生じるように、リンカー領域を導入する。3 又はそれより長い G l y 4 S e r リンカーを含む長いリンカー及び 2 又は 1 のリンカーを含む短いリンカーの両方をこれらの融合蛋白質において使用した。しかしながら、3 G l y 4 S e r リンカーの長いリンカーは大きな柔軟性を提供するため、好ましい。

10

20

**【 0 0 3 2 】**

融合構築物は、ファージ発現ベクターファージ 3 . 2 2 ( M a x i m B i o t e c h n o l o g y , C A ) 内で S a l I - A p a I 部位にクローン化された。当該融合物を最初に、T G 1 細菌株の p I I I ファージ蛋白質リーディングフレーム内で発現させた。A H N P - S A 融合物も、p I I I 成分を含まない別の細菌宿主株 ( H P 2 1 5 1 ) 内で発現させることができる。p 1 8 5 H e r 2 / n e u とイムノグロブリン F c 領域からあるキメラ蛋白質 ( H e r 2 - F c ) を使用することにより、発現された A H N P - S A 形態の結合親和性を試験した。H e r 2 - F c を 9 6 - ウェルの免疫アッセイプレート上にコートして、ファージ上清をプレート上に加えた。ビオチンをコンジュゲートしたパーオキシダーゼを次に使用して、A H N P - S A 分子の、精製された H e r 2 - F c に対する結合活性を検出した。

30

**【 0 0 3 3 】**

即ち、本明細書に示すとおり、A H N P - S A 種はビオチン化オリゴヌクレオチドに結合させた場合にポリマーゼに基づく増幅に影響を受けやすいので、A H N P - S A 種は迅速で多様なプロテオミクスのアプローチを開発するための手段を提供する。

**【 0 0 3 4 】**

抗 - E G F r 分子の C D R 模倣物、A E R P は、異なる数の強制的アミノ酸も明らかになって ( d e v e l o p e d ) 、E G F r に関して n M の親和性を有することも示された。

本発明における検出のための好ましい手段は、蛍光染料により染色することを含む。この態様においては、ポリマーゼ、例えば、T 7 の R N A ポリマーゼ、T 3 の R N A ポリマーゼ、S P 6 の R N A ポリマーゼ、2 9 のポリマーゼ又は T a q ポリマーゼによる R N A 増幅の後に、反応混合物の一部を蛍光染料、例えば、溶液中で R N A に直接結合してあとで蛍光シグナルを放出する非対称性シアニン染料である、R i b o G r e e n 試薬 ( M o l e c u l a r P r o b e s , I n c ) ( 米国特許第 5 , 4 3 6 , 1 3 4 号 ) と混合する。この方法において有用な類似の特性を有する他の蛍光染料の例は、限定ではないが、P i c o G r e e n , T O T O - 1 又は Y O Y O - 1 を含む。反応はマイクロプレート中で実施することが好ましく、蛍光は、蛍光計、例えば S p e c t r a F l u o r a を用いて、R N A 溶液を R i b o G r e e n 染料と混合後、5 から 1 5 分間読む。

40

**【 0 0 3 5 】**

50

本発明の方法において、選択されたエピトープに対するモノクローナル抗体、選択されたエピトープに関する単鎖Fvs, 又は強制的エピトープ特異的CDRs, CDR模倣物又は作成されたCDR構造の何れかを、異なる長さのcDNAにコンジュゲートされて含むエピトープ検出器の何れかを、単一の反応において使用することにより、細胞溶解物を厳密に調べて、自動化配列決定により細胞溶解物中の蛋白質のプロファイルを提供することができる。この方法においては、蛍光染料を用いた増幅産物の増幅及び染色後に、反応混合物を電気泳動により分離して、RNA産物のサイズを蛍光染料又はプローブにより可視化する。さらに、特異的プローブを反応混合物にハイブリダイズさせて、相当する抗原の存在及び豊富さを明らかにする。

#### 【0036】

本発明の蛍光検出方法の感度は、p185受容体に関して証明された。これらの実験においては、キメラp185-Fcポリペプチドを最初に直接96ウエルプレートにコートした。1kbのcDNAにコンジュゲートした4D5モノクローナル抗体を次にキメラp185-Fc受容体を検出するのに用いた。当該cDNAはT7プロモーターを含んだので、T7のRNAポリメラーゼにより増幅した。増幅後に、RNA産物を96ウエルプレート中でRiboGreen試薬と混合して、485nmにて5から10分後に励起した。蛍光の読みは535nmにおいて集めた。この方法を用いて、0.177pg/mlほどの低い濃度を検出した。

#### 【0037】

ds-oligoのCDR又は単鎖Fvへの直接のカップリングは、特に、目的が集団のスクリーニングプロテオミクスアッセイにおける数百又は数千の抗原の検出である場合に、時間を浪費する手法であり得る。さらに、カップリング効率の変化は増幅の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は、Fv又はCDRが一般的又はユニバーサルなエピトープ、例えばヘマグルチニンHAタグ又はポリヒスチジンタグを含む。一般的エピトープ又はユニバーサルエピトープの例は、蛋白質の精製のために最初にデザインされた7.16.4ScFv中のポリ-His-タグである。ds-DNAにカップリングさせた単一のモノクローナル抗体又は単鎖Fvを、次に、ユニバーサルエピトープ検出器の創製のために一般的エピトープに結合させるのに使用する。本発明の方法におけるユニバーサルエピトープ検出器の効率を、7.16.3ScFv中のポリ-His-タグを用いて証明した。これらの実験においては、p185受容体を、プレート上で全部コートし、遊離の7.16.4ScFvを添加し、続いて大規模な洗浄及びds-オリゴをコンジュゲートした抗His抗体とのインキュベーションにより捕捉した。T7ポリメラーゼの増幅後に、上記細胞の $10^6$ 希釈物の溶解物からの特異的バンドを検出した。従って、この感度はユニバーサルエピトープ検出器無しの基礎プロトコルを用いて観察されたのよりもいっそう高かった。

#### 【0038】

本発明の方法は、翻訳後修飾の検出にも有用である。PCR及びaRNA技術は、新規に、DNAレベルにて標的遺伝子の活性を検出するのに開発した。これらの方法は、ハイブリダイゼーションなしにときどき組み合わされたゲノミクスの研究の応用において広範囲に採用されてきた。感度に拘わらず、これらの方法は、蛋白質レベルにおいて翻訳後修飾を検出することができない。そのような事象を監視することは、しかしながら、極めて決定的なことであり、限定ではないがリン酸化及びグリコシル化を含む多くの修飾が蛋白質の機能状態に関係するからである。即ち、EGF処理により誘導されたp185受容体のリン酸化を検出する本発明の方法の能力を証明するために実験を実施した。EGF刺激に際してEGFRはp185とヘテロダイマーを形成してp185をトランス活性化することによりp185受容体上のチロシン残基のリン酸化をもたらす、シグナリングモデルを確立した(Qian et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1994 15: 1500-1504)。EGFR並びにp185 erbB2を過剰発現するA431細胞系をこれらの実験に用いた。EGF刺激後に、細胞溶解物中のp185受容体を、p185erbB2/neuに対して生成させたモノクローナル抗体である1E1により

10

20

30

40

50

捕捉した。抗 - リン酸化 T y r 抗体の I g G 2 b タイプである P Y 9 9 を用いてリン酸化された受容体を検出した。二次抗体、抗 - I g G 2 b を d s - o l i g o にカップリングさせて、抗原 - 抗体サンドイッチ複合体を厳密に調べるのに使用した。E G F により刺激された A 4 3 1 細胞は陽性のバンドを生じたが、E G F 処理なしでは細胞中に観察されなかった。T 6 - 1 7 細胞は、しかしながら、陽性のバンドを示したことから、p 1 8 5 上の構成的なホスホチロシンを示唆する。これらのデータは、この方法が、その修飾を分析することにより蛋白質の機能状態を検出可能なことを示す。d s - オリゴにカップリングさせた F v 又は C D R を含むエピトープ検出器も、蛋白質の機能状態を検出することができる。

**【 0 0 3 9 】**

即ち、本発明は、免疫 - P C R 技術の非定量性についての問題を排除し、且つプロテオミクスの分野において莫大な可能性を提供する、感度の良い検出法を提供する。特定のプロモーター、例えば T 7 の R N A プロモーター、T 3 の R N A ポリメラーゼ、S P 6 の R N A ポリメラーゼ、2 9 のポリメラーゼ、又は T a q ポリメラーゼを認識するポリメラーゼ並びに上記プロモーターを増幅工程において使用することにより、この方法に従い実行されるアッセイは、生物学上及び医学上のアッセイに関連する直線増幅性及び正確な定量性をもつ。検出の感度に影響する因子の数も減った。抗原とそれらの F v 又は単価 C D R、C D R 模倣物又は工作された C D R 構造の間の特異的結合が、この方法の唯一の決定的なパラメーターである。

**【 0 0 4 0 】**

ユニバーサルエピトープ検出器を提供する能力は、複数の追加の利点を本発明の方法に提供する。最初に、モノクローナル抗体を最初に d s - o l i g o にカップリングさせることなしに、あらゆる細胞抗原が検出できる。ユニバーサルプローブなしでは、当該方法は、一時に一つ又はいくつかの特定の抗原を調べる際に有用でしかないはずである。他方、ユニバーサルプローブは、利用可能な F v s 又は C D R s、C D R 模倣物又は工作された C D R 構造による、あらゆる細胞又は液体に存する抗原の検出を可能にさせる。さらに、プロトコルのわずかな修飾により、異なるサイズのオリゴヌクレオチドを、エピトープ検出器の F v 又は C D R、C D R 模倣物又は工作された C D R 構造に結合させた場合に、異なる蛋白質が一つの電気泳動レーン内で同時に検出できる。即ち、本明細書にて示されるとおり、本発明の方法は、検出の単一細胞レベルにおいて蛋白質抗原の同定並びにポリペ

**【 0 0 4 1 】**

本発明の方法は、分子の相互作用の分析及び小さな分子の検出にも有用である。例えば、リガンドペプチドは、特定の受容体の発現を同定するためにエピトープ検出器として使用可能であり、逆もあり得る。利用可能な F v s 又は C D R s、C D R 模倣物又は工作された C D R 構造、又は結合蛋白質により、小さな分子、例えば毒素又は薬剤代謝物が、限定ではないが、水、食物、及び体液を含むあらゆる液体中で検出できる。

**【 0 0 4 2 】**

分子の相互作用を研究するために、2つの成分(分子 A / 分子 B)の相互作用系が開発される(developed)。2つの成分、分子 A と分子 B は、蛋白質、糖又は限定ではないが糖、D N A 又は R N A、又は構造上のコンフォメーション、例えばアルファヘリックス又はベータシートを有するエピトープを含む他の種の化学実在物を含んでよい。この2つの成分系を開発する(develop)するためには、エピトープ検出器、例えば、以後本明細書では分子 A と呼ぶ、第 1 の分子に対する抗体を、分子 A を含むサンプルに近接して配置して、分子 A をエピトープ検出器に結合させる。各々の発現された蛋白質も H A タグ又は類似のタグを含むように構築された発現ライブラリーの産物を含む溶液を、次に、分子 A と相互作用する分子を同定するのに添加することができる。本発明のためには、これらの分子を分子 B 又は第 2 分子と呼ぶ。あるいは、正常な細胞抽出物又は溶解物あるいは可能性のある分子 B を含むあらゆる液体を使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【0043】

ライブラリー生成物又は細胞抽出物又は溶解物の中の第2分子である分子Bがエピトープ検出器により結合された第1分子Aに結合したなら、タグ又はマーカに結合するユニバーサル検出器によるか又は分子Bに特異的なCDRライブラリー又はScFvライブラリーの使用の何れかにより、新規な分子が検出され得る。好ましい態様において、分子Aと分子Bの間の相互作用を監視することは、ユニバーサル検出器にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドからの増幅された核酸配列を検出する蛍光に基づく定量可能なアッセイにより実施される。

## 【0044】

2成分(分子Aと分子B)の相互作用系の分子の一方がリガンド又は製薬学上の薬剤を結合する場合、2成分系を用いて、分子Aの分子Bに対する結合に対するリガンド又は薬剤の効果を調査することができる。従って、本発明は、分子の相互作用に対する薬剤の影響を監視するためのインビトロ系も提供する。リガンド又は薬剤は、リガンド又は薬剤が分子Aの分子Bに対する結合を如何にして変化させるかを決定するために、アッセイの如何なる段階においても添加できる。さらに、一つより多い薬剤を2成分系に添加することができる。例えば、第2薬剤、例えば第1薬剤のアンタゴニストを添加することができ、そしてAのBへの結合並びにAとBの複合体に関するレベルを決定することができる。さらに、公知のリガンド又は薬剤の代わりに、他のタグにより標識された(marked)分子Cの別のライブラリーの産物を含む第3溶液をAとBの複合体に添加することができ、そしてこの第3溶液の結語に対する効果を測定することができる。

## 【0045】

即ち、本発明は、生物学上の読み出し(readout)、即ち複雑な相互作用の形成を、迅速なインビトロスクリーニングアッセイに提供する。さらに、この種の系を用いると、その出力が各進行する添加(each progressive addition)により明らかとなった事象の数に依存する構造上類似なコンピューターのように作用する、スクリーニング系を構築することができる。これらの進行性の事象は、この集合体を干渉する製薬学上の薬剤又はリガンドのような第3の分子の添加により妨害される。第3分子の添加の前と後のシグナルの定量は、出力の変化を規定する。陽性の変化は、製薬学上の薬剤又はリガンドが分子Aの分子Bへの結合を促進することを意味し、陰性の変化は、製薬学上の薬剤又はリガンドが分子Aの分子Bへの結合を阻害することを意味する。

## 【0046】

活性なCDRs、CDR模倣物又は工作されたCDR構造は、本発明により、特定の疾患状態に付随する蛋白質のファミリー、即ちerbBファミリー及びそのオリジンとの関連及び悪性腫瘍の初期の検出を同定及び研究するために、一連の(spectrum)CDRs、CDR模倣物又は工作されたCDR構造を操縦するための出発鑄型分子としても使用できる。例えば、強制されたターン(constrained turns)に発展する単一のリングサイズのCDR模倣物の大きくて多様な集団( $> 10^6$ )を含むライブラリーが開発されて、芳香性に修飾された末端を有する。この特定のライブラリーは、M13ファージシステムを用いて生成されて、ランダム化を通して5員環のAHNPペプチドから多様化されたCDR-ストレプトアビジン結合モイエティの大きなレパートリーを含む。上記ランダム化の多様化のために、ランダム化されたCDR領域をコードするが固定化された強制的フレームワーク領域を伴わない合成オリゴヌクレオチドライブラリーを、高可変性CDRストレプトアビジン融合蛋白質の発現を導くファージ構築物に挿入する。

## 【0047】

CDR-SAライブラリーは本発明において、例えば、腫瘍表面マーカに関して形質転換細胞系と腫瘍細胞を選別するのに使用することができる。この態様においては、初期のスクリーニングは、細胞への結合に関して蛍光に基づく微蛍光測定法を用い、続いて細胞溶解物由来の捕捉された蛋白質に結合に関してELISAタイプのアッセイを用いる。例えば、モノクローナル抗体をPI3-キナーゼ又はrasに結合させることができ、あらゆる結合CDR-SA形態を検出することができる。腫瘍特異的に選択されたCDR-S

10

20

30

40

50

A分子のあらゆる未知の標的の配列を次に決定することができる。一つの態様において、精製されたCDR-S Aは、COS細胞のような細胞において及び悪性腫瘍の様々な段階からの新たに単離された腫瘍組織から調製した発現ライブラリーの中で構築されたcDNA発現ライブラリーを選別するために使用される。

**【0048】**

CDRs、CDR模倣物又は工作されたCDR構造のライブラリーは、受容体、受容体の活性化に際して関連する蛋白質及び受容体に関連する経路に關与する蛋白質を検出するために、一連のプローブを生成するのに使用することもできる。例えば、COS模倣物ライブラリーを用いて、erbB受容体、erbB受容体の活性化に際して関連する蛋白質及びerbB受容体に關連する経路、例えばPI-3キナーゼ経路に關与する蛋白質に対して一連のプローブを生成することができる。受容体、当該受容体の活性化に際して関連する蛋白質及び当該受容体に關連する経路に關与する蛋白質に結合するとして定義されたライブラリーのCDRs又はCDR模倣物も、受容体又は蛋白質を標的とするように治療に使用することができる。治療上の使用のための好ましい態様においては、CDR又はCDR模倣物を、ヒト化抗体フレームワークに再挿入するか又はFcに結合させる。この態様においては、工作されたCDR構造を、単独で投与してよいし、あるいは放射性標識又は細胞毒をそれに結合させて含んでよい。

10

**【0049】**

いくつかのランダムに変化させたCDRsによりscFvライブラリーを製造する方法は、Winterらにより、米国特許第6,291,650号、米国特許第6,225,447号、米国特許第6,172,197号及び米国特許第6,140,471号に記載される。しかしながら、CDR-S Aライブラリーの生産はWinterらにより記載されていない。

20

**【0050】**

本発明においては、本発明の方法を実施するためのキットも提供される。一つの態様において、選択されたエピトープを発現する分子の検出のためのキットが提供される。好ましい態様において、上記分子の検出は、核酸配列を染色する蛍光染料により実施される。即ち、このキットは、選択されたエピトープ、当該エピトープに関する単鎖Fv又は強制的エピトープ特異的CDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造に関するモノクローナル抗体を含むエピトープ検出器、並びにRNAポリメラーゼ、増幅反応バッファー、及び蛍光染料を含むのが好ましい。別の態様においては、混合物、例えば細胞溶解物の中の蛋白質をプロファイルするためのキットが提供される。この態様においては選択されたエピトープ、選択されたエピトープに関する単鎖Fv又は強制的エピトープ特異的CDRに関するモノクローナル抗体を含む、異なる長さのcDNAsにコンジュゲートされたエピトープ検出器、並びにRNAポリメラーゼ、増幅反応バッファー、及び蛍光染料を含むのが好ましい。

30

**【0051】**

オリジナルの免疫-PCRはアッセイにおいて純粋な抗原を用いた。免疫-PCRの後の反復は混合された抗原を試験した(Hendrickson et al. Nucleic Acids Research 1999 23(3): 522-529)が、ELISAよりも2桁から3桁高い感度しか示さなかった。莫大に多様な非特異的抗原を含むバックグラウンドを伴う実在のアッセイにおいては、アッセイの特異性により、いつも感度が制限される。Fvs又はCDR断片により結合されたエピトープは、より大きなポリペプチドを同定することが予測され、そして細胞又は細菌又はあらゆる他の真核生物の上清、液体又は抽出物においてモチーフを同定するために使用することができる。さらに、ポリペプチド、有機分子又は糖構造の実際の同定は、Fvsによるいくつかのエピトープの結合をガイドとして用いることにより、データベースのコンピューター支援分析により決定することができる。例えば、Fv a, d, e, 及びfによる結合は、側鎖a, d, e, 及びfを有するものとして、よってこれらの同じ側鎖を有する糖のファミリーに属するものとして、糖分子を同定するはずである。この様式において、本発明は、任意の一つ

40

50

の特定の時間における細胞中の全ての分子でなければ、多くの定義及び同定を可能にする。さらに、このアプローチは、活性な細胞及び細胞上清中で翻訳される別の転写形態を同定するのに使用することができる。この手法は、1) 非放射性検出方法、もっとも好ましくは蛍光染料、2) ミクロ化された (microtized) 液体取り扱い手法、3) 低サンプル容量検出法、例えば「プロテインチップ」分析及び4) ロボット化を使用するように容易に受容可能である。例えば、複数の結合要素又はユニット及び一つのユニバーサルエピトープ検出器を含むチップを開発することができる。モノクローナル抗体、単鎖Fv、又はCDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造上の共通の表面を認識する結合要素、例えばユニバーサル抗体を使用することができる。あるいは、アビジンを、各抗体、単鎖Fv又はCDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造内に用いて、ビオチンをオリゴヌクレオチドにカップリングさせることができる。これらのチップは、より迅速且つ高親和性の利点を提供し、それにより、シグナルを増加させる。

10

#### 【0052】

以下の非限定例を、本発明をさらに例示するために提供する。

#### 実施例

##### 実施例1：材料

使用した抗体はmAbs 7.16.4とA11であり、各々がp185neuの細胞外ドメイン内の異なるエピトープに反応する。1E1は、ヒトp185her2/neuの外部ドメインに対して生じさせたIgG1モノクローナル抗体である。rhumaB4D5 (Herceptin)は、Genentechから得た。抗-ホスホチロシンモノクローナル抗体PY99は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) から得た。細胞系B104-1-1はラットの発癌性p185neuを発現することによりNIH3T3細胞に由来する。B104-1-1内のp185neuの発現レベルは、<sup>125</sup>I-標識された抗-neu mAb結合アッセイを用いて測定した。EGFR及びp185neuの両者に対して陰性のNR6は、NIH3T3からのサブクローンであった。T6-17は、ヒトp185her2/neu受容体を過剰発現することによりNIH3T3から誘導した。これらの細胞系は、全部、10%ウシ胎児血清 (FBS, Hyclone) を含むダルベッコイーグル培地 (DMEM) 内で37°Cにおいて5%のCO<sub>2</sub> 雰囲気中で培養した。

20

##### 実施例2：Hisタグを付けた7.16.4の発現と精製

50 µg/mlのアンピシリンを含むLB培地 (150 ml) を大腸菌DH5αの15 mlの一晩培養液中に植え付けて、0.5の光学密度 (600 nm) が得られるまで、30°Cにおいて維持した。イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を1 mMの最終濃度にて添加して、Hisタグ付加7.16.4 ScFvを誘導した。3時間後に、細胞を回収して、凍結と融解により溶解して、0.5 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド、2 µM ペプスタチンA、及び2 µM ロイペプチンを付加した10 mlの尿素溶解バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, 8 M尿素) 中に懸濁した。不溶の細胞残渣は、遠心分離 (12,000 x gにて15分間、続いて12,000 x gにて30分間) により除去した。透明にされた上清を2 mlのNi-NTAアガロースと混合して、氷の上で1時間穏やかに攪拌した。混合物を空のカラムに負荷して、未結合の蛋白質を尿素溶解バッファー (pH 6.3) により4°Cにおいて溶出した。His-タグを付加した蛋白質を尿素溶解バッファー (pH 4.5) により溶出して、溶出した画分をSDS-PAGE及びFACS分析により、実施例3に記載されたとおりに試験した。ピーク画分中の蛋白質をプールして、TKCバッファー (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF) に対して透析した。

30

40

##### 実施例3：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 × 10<sup>5</sup>) を、精製された7.16.4 ScFvを含む200 µlのFACSバッ

50

ファー（0.5%ウシ血清アルブミン及び0.02%アジ化ナトリウム）中でインキュベートした（4 にて30分間）。次に、細胞をFACSバッファー中で洗浄して、抗-His抗体（Invitrogen）とインキュベートした（30分間、4 ）。この第2のインキュベーションの後に、細胞を再びFACSバッファー中で洗浄して、さらにマウスIgGに対するFITC-標識されたIgG（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）とインキュベートした。FACSバッファーで洗浄後に、細胞沈殿物をPBSバッファーに懸濁して、FACSスキャンフローサイトメーター（Becton Dickinson）による分析のために処理した。各サンプルに関して、10,000の生存細胞をサイズ（フォワードスキャター、FSC）及び粒状性（granularity）（サイドスキャター、SSC）のパラメーターに従いゲートを通して、Cell Quest Software（Becton Dickinson）を用いて分析した。競合結合に関しては、B104-1-1細胞を最初に異なる濃度の7.16.4 ScFvの存在下で、モノクローナル抗体7.16.4とインキュベートした。細胞を次にFACSバッファー中で洗浄して、フローサイトメーター上の分析前に、マウスIgGに対するFITC-標識IgG（Sigma Chemical Co.）とインキュベートした。

#### 実施例4：ビオチン化ds-DNAとストレプトアビジンコンジュゲートの合成

以下の配列（GGCTAAGAGAACCCACT（配列番号：1））のオリゴヌクレオチドを5'末端にビオチンを付加して合成することにより、ストレプトアビジン又はアビジンに対する結合を可能にした。別のオリゴプライマー（GCTGGGATCTGTCTCTACA（配列番号：2））はVCP cDNAからの内部配列に由来した。これらの2つのプライマーを用いて、約0.6kbのcDNA断片をプラスミドpcDNA-VCPから増幅した。この断片は、5'末端にビオチンを含み、そしてT7 RNAポリメラーゼの酵素活性を通してcDNA鋳型からRNAの合成を指示するように使用されるT7のプロモーター部位（TAATACGACTCACTATAAGGG（配列番号：3））を含む。2.5µgの抗体の10µgのストレプトアビジンへの結合のために、半分の容量の0.8%グルタルアルデヒドを4µlのアリコートに添加した。当該溶液を回転装置上で3時間室温にて混合した。エタノールアミン（1M；1/20溶；pH7.5）を次に添加した。当該溶液をさらに2時間室温にて混合した。抗体-ストレプトアビジン複合体を4 において保存した。

#### 実施例5：RNA増幅手法

96ウエルのマイクロタイタープレート（Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp™）を、100µlのコーティングバッファーと共にプレートを4 にてインキュベートすることにより（抗体濃度：5µg/ml）、異なる濃度のキメラp185細胞外ドメイン-Fcポリペプチドによりコートした。次に、プレートを3回、0.2% TWEEN 20を含むPBS（PBS-T；200µl/ウエル）で1時間室温にて洗浄して、再び3回PBS-Tにより洗浄した（200µl/ウエル）。このインキュベーション工程後に、プレートをPBS-Tで洗浄し（6回、200µl/ウエル）、そしてヒト化抗-p185Her2抗体4D5-ストレプトアビジンコンジュゲートと2時間室温にてインキュベートした（150ng/ml, 50µl/ウエル）。プレートをPBS-Tで洗浄室温（6回）、ビオチン化cDNA（800ng/ml, 0.05ml/ウエル）と1.5時間インキュベートした。次に、プレートを6回洗浄して、RNA増幅を実施した。以下の試薬を加えた：1X RNA増幅バッファー（50mM Tris（pH8.3）, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.5mM スペルミジン；10mM DTT；750µM ATP, UTP, GTP及びCTP；0.5µl RNA sin；200U T7 RNA）。当該溶液を次に4時間37 においてインキュベートした。RNA産物をウエルから取り出して、25µlを75µlのTEバッファーで希釈して、次に2000倍希釈されたRiboGreen試薬100µlと混合した。10分後に、96ウエルプレート中のサンプルを485nmにて励起して、蛍光放射を535nmにてSpectra Fluorリーダー（Tecan, オーストリア）を用いて

集めた。

## 【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  
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/066980 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53, 33/48, C07H 21/02, 21/04, C12N 1/20
- (74) Agents: LICATA, Jane, Massey et al.; Licata & Tyrrell P.C., 66 E. Main Street, Marlton, NJ 08053 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/03640
- (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, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 8 February 2002 (08.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
09/783,896 15 February 2001 (15.02.2001) US  
09/977,716 15 October 2001 (15.10.2001) US
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (71) Applicant: THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (US/US); Center For Technology Transfer, Suite 300, 3700 Market Street, Philadelphia, PA 19107 (US).
- (72) Inventors: GREENE, Mark, L.; 300 Righters Mill Road, Penn. Valley, PA 19071 (US); ZHANG, Hong, Tao; 377 Peplar Avenue #N488, Deven, PA 19333 (US); LI, Bin; 4218 Baltimore Avenue, Philadelphia, PA 19104 (US); LIU, Qindu; 250 Beverly Boulevard, F 109, Upper Darby, PA 19082 (US); MURALI, Ramchandran; 41-6 Revere Road, Drexel Hill, PA 19026 (US).
- Published:**  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- 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 02/066980 A1

(54) Title: METHODS FOR IMMUNO-DETECTION OF EPITOPES ON MOLECULES AND FOR DETECTION OF INTERACTIONS OF MOLECULES VIA FLUORESCENT DYES

(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, CDR mimetic or engineered CDR structure attached to an oligonucleotide.

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 1 -

METHODS FOR IMMUNO-DETECTION OF EPITOPES  
ON MOLECULES AND FOR DETECTION OF  
INTERACTIONS OF MOLECULES VIA FLUORESCENT DYES

Introduction

5 This application is a continuation-in-part of U.S. Patent 09/783,896, filed February 15, 2001, which is a continuation-in-part of U.S. Patent Application Serial No. 09/624,946, filed July 25, 2000.

Background of the Invention

10 Traditional methodologies for protein detection and quantification include 2-D gel electrophoresis, mass spectrometry and antibody binding. Each methodology has been used to quantify protein levels from relatively large amounts of tissue, yet each suffers from a lack of  
15 sensitivity.

Improvement of the ability to monitor proteins, lipids, sugars and metabolite levels and their modifications is needed for cell biology and medicine. A variety of technologies have been employed to improve the sensitivity  
20 of detecting these molecules. Recent examples of detection methods include immuno-PCR, RCA and immuno-arNA.

Immuno-PCR (U.S. Patent 5,665,539) combines the polymerase chain reaction (PCR) technology with conventional detection methods to increase the sensitivity to detect  
25 protein. However, a major limitation of immuno-PCR lies in the non-linear amplification ability of PCR reaction, which limits this technique as a quantitative detection method. Thus, this method provides no direct correlation between the amount of signal and the amount of protein present.

30 A relatively isothermal rolling circle DNA amplification technique (RCA; Schwietzer et al., Proc. Natl. Acad.Sci. USA 97, 10113, 2000) provides an improvement over

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 2 -

immuno-PCR as this technique overcomes some of the quantitation problems associated with immuno-PCR.

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 antibody targeted to a selected protein is immobilized to a 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.

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 3 -

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, CDR mimetic or engineered CDR structure, an antibody, or other ligand 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 immobilized epitope anchor. An epitope detector comprising a single chain Fv for the selected epitope or a constrained epitope specific CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure attached to an oligonucleotide, preferably a double-stranded cDNA, is then used to detect any bound molecules. The oligonucleotide can be chemically conjugated or linked through biotin-streptavidin or biotin-avidin binding to the single chain Fv, CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure. Alternatively, the method of the present invention can be performed without an epitope anchor. In this embodiment, the epitope detector is employed to define molecules bound directly to a surface.

In a preferred embodiment of this method, detection is performed via readout using a standard fluorimetric device of a fluorescence derived numerical value. More specifically, in this embodiment, following amplification of the oligonucleotide of the epitope detector, a fluorescent dye is incorporated into the nucleic acid sequence in a linear manner. Upon excitation at a selected wavelength, the dye yields a quanta of fluorescence signals directly proportional to the mass of sample loaded.

With a mixture of epitopes detectors comprising either monoclonal antibodies for selected epitopes, single chain Fvs for selected epitopes or constrained epitope

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 4 -

specific CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures, conjugated to cDNAs of different lengths, the method of the present invention can also be used to profile proteins in a cell lysate.

5 In one embodiment, CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures for use in the epitope detector are identified via screening of a library of CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures to define a CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure which binds a molecule with the  
10 epitope. CDRs or CDR mimetics identified via screening of these libraries can also be used as therapeutic agents targeted to a receptor or protein interacting with the receptor. When used as a therapeutic agent, it is preferred that the CDR or CDR mimetic be reinserted into a humanized  
15 antibody or attached to an Fc.

Another object of the present invention is to provide kits for the detection of molecules expressing a selected epitope which comprise an epitope detector comprising a single chain Fv for the selected epitope or a constrained  
20 epitope specific CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure attached to an oligonucleotide, preferably a double-stranded cDNA. In addition, the kits preferably comprise an RNA polymerase, an amplification buffer and a fluorescent dye for staining of amplified products. Kits  
25 of the present invention may further comprise an epitope anchor specific for a selected epitope. In one embodiment, the single chain Fv or the constrained epitope specific CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure is modified to allow for attachment of the oligonucleotide. In another  
30 embodiment, the kit comprises a mixture of epitope detectors for profiling of proteins in a cell lysate.

Methods and kits of the present invention can be formulated into a convenient 96- or 384-well plate platform for high-throughput handling and screening of samples.

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 5 -

Methods and kits of the present invention are particularly useful in analyzing the interactions of molecules, e.g. protein-protein interactions, ligand-induced protein-protein interactions and sugar-protein interactions, as well as for monitoring changes in these interactions which are induced by chemicals, pharmaceuticals and other molecular species including, but not limited to, proteins, lipids and sugars.

Detailed Description of the Invention

10 The present invention relates to improved methods for quantifying levels of selected molecules 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  
15 selected surface. The epitope anchor may comprise a single chain Fv fragment, a CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure, 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  
20 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  
25 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.

30 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  
35 molecule on the surface is then used to detect and quantify

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 6 -

the amount of bound molecule. The epitope detector comprises a monoclonal antibody, a single chain Fv for the selected epitope or a constrained epitope specific CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure or which have been modified to allow for attachment of oligonucleotides, preferably double-stranded DNA at a single site. Alternatively, fragments of antibodies with the binding activity, scFv or CDR peptides can be used to replace antibodies in this technology.

10 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 240:1038-1044) describe an expression system for production of functional Fv fragments in *E. coli*.

15 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 20 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 25 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 30 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 35 sequences being linked by a third DNA sequence which encodes

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 7 -

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 5 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 10 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 described in U.S. Patent 5,334,702, U.S. Patent 5,663,144, 15 and U.S. Patent 5,919,764. Antibody molecules bind to their antigens via six variable loops called Complementary Determining Regions (CDRs). The CDR3 from heavy chain often mediates that specificity. A general methodology for design of constrained cyclic CDR mimetics is described by Williams 20 et al. (Proc. Natl Acad. Sci. USA 1989 86:5537-5541), Sargovi et al. (Science 1991 253:792-795) and Murali et al. (Immunol. Res. 1998 17:163-169). In general, CDRs comprise a 6 to 15 mer peptide constrained to be cyclic and modified by aromatic residues. CDR mimetics are small molecules 25 (about 1 kDa) which are capable of mimicking their parent antibodies in terms of specificity, affinity and biological activity. Cyclic forms of CDR mimetics contain approximately 5 to 13 constrained amino acids.

For purposes of the present invention, an epitope 30 detector or epitope anchor comprising a CDR may consist essentially of the CDR or CDR mimetic. Alternatively, the epitope detector or epitope anchor may comprise a CDR or CDR mimetic defined as binding which is reinserted into a humanized antibody framework or attached to an Fc. CDRs or 35 CDR mimetics reinserted into a humanized antibody or

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 8 -

attached to an Fc are also referred to herein as engineered CDR structures. However, as will be understood by those of skill in the art upon reading this disclosure, the term "engineered CDR structure" is inclusive of any protein into which a CDR or CDR mimetic is inserted. Examples of such proteins include, but are not limited to, members of the immunoglobulin gene family, minibodies or small antibody-like molecules, or any other framework which allows the CDR to be functional as an antigen binding surface.

10 An important step in the design of CDRs, CDR mimetics and engineered CDR structures 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 bivalent 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  $\alpha$ -carbon with a methyl group to produce a

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 9 -

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- $\alpha$  and C- $\beta$  atoms.

Another means for constraining peptides involves  
5 introduction of covalent cross-links. Constraining the 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,  
10 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-  
15 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  
20 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  
25 of the  $\epsilon$ -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  $\mu$  receptor selectivity (Schiller et al. Int. J. Pep. Prot. Res. 1985; 25:171-177). BOP-reagent and carbodiimide/1-  
30 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-

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 10 -

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, 5 Romani, S. (Int. J. Pep. Prot. Res. 1987 29:107-117) demonstrated that non-symmetrical disulphides can be 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 10 disulphides via thiol displacement of the 3S-3-nitro-2-pyridinesulphenyl group.

In a preferred embodiment, the oligonucleotide used in the present invention is double-stranded and comprises a T7 promoter driven cDNA sequence so that it can be 15 amplified using T7 RNA polymerase. In this embodiment, double-stranded cDNA is synthesized for use as a template 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, CDR 20 mimetic or engineered CDR structure to which the oligonucleotides are attached comprises a series of residues which allow the attachment of linkers consisting of chemicals such as heterodimeric coupling reagents or other linkers. These residues provide a uniform binding site for 25 the linker attachment. The linkers attach to this site and also link oligonucleotides to the Fv or CDR, CDR mimetic or engineered CDR structures. Oligonucleotides may be unmodified or modified. For example, the presence of the amplified oligonucleotide can be enhanced by incorporating 30 a beacon or fluorescent labeled oligonucleotide into the mixture allowing for rapid semi quantitative assessment of the epitope expressing molecules (Tan et al. Chemistry 2000 6:1107-1111; Leone et al. Nucleic Acids Res. 1998 26(9):2150-2155).

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 11 -

In another embodiment, the oligonucleotide of the epitope detector is coupled to biotin and the monoclonal antibody, single chain Fv or constrained epitope specific CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure is coupled, 5 streptavidin and attachment of the oligonucleotide to the monoclonal antibody, single chain Fv or constrained epitope specific CDR, CDR mimetic or engineered CDR structures occurs via complexing of the biotin to the streptavidin.

Bound epitope detectors may be quantified by methods 10 such as amplification by conventional PCR or aRNA techniques. If the detection method used is immuno aRNA, double-stranded cDNA are preferably used in the epitope detector. In this embodiment, aRNA is transcribed on the solid support using a polymerase, unlabeled ribonucleotides, 15 and fluorescently labeled ribonucleotides. By "polymerase" for purposes of the present invention, it is meant a polymerase which recognizes a specific promoter. Examples of polymerases useful in the present invention include, but are not limited to, T7 RNA polymerase, T3 RNA polymerase, 20 SP6 RNA polymerase,  $\phi$ 29 polymerase, and Taq polymerase. In another embodiment, the amplified products can serve as templates for further amplification with reverse transcriptase or replicases to increase the sensitivity.

A variety of means are available for detection of 25 amplified products of the epitope detector. In one embodiment, the nucleic acid sequence is detectably labeled such as with a radioactive label or a fluorescent label. In a preferred embodiment, the nucleic acid sequence is not labeled but rather is stained by fluorescent dye. Other 30 methods such as gel electrophoresis, high performance liquid chromatography, hybridization assays, immunohistochemical assays and/or specific binding protein assays can also be used for detection.

Use of Fvs and CDRs, CDR mimetics or engineered CDR 35 structures as the epitope detector renders the methods of

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 12 -

the present invention 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  
5 cells or bacteria or any other eukaryotic organism. 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  
10 quantitative results.

The ability of Fvs and CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures to serve as epitope detectors of selected molecules in the method of the present invention was demonstrated for the p185 receptor. For these  
15 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):1031-1040) wherein the Fv region of the heavy chain and light chain region was joined by a  
20 (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 cells, in both direct binding and competitive binding against the monoclonal antibody  
25 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  
30 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  
35 cells and human p185her2/neu from T6-17 cells, respectively.

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 13 -

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, AHNP was used at a higher concentration since its affinity is lower against p185Her2/neu than 4D5.

AHNP was also expressed as a streptavidin fusion protein using the M13 phage system. The cDNA for the core streptavidin sequence from *Streptomyces avidinii* was cloned by PCR using a 5'PCR primer which also contains the sequence for a (Gly4Ser)2 linker. Complementary oligonucleotide encoding AHNP and an additional Gly4Ser linker were synthesized and annealed to form the double strand DNA. After ligation, the fusion consists of AHNP at the N-terminus of a (Gly4Ser)3 linker followed by the core streptavidin (SA) sequence. The linker region is introduced to produce flexibility between the tetrameric AHNP mimetic and SA which normally resembles a tetramer. Both long linkers comprising 3 or more Gly4Ser linkers and short linkers comprising 2 or 1 linkers be used in these fusion proteins. However, longer linkers of 3 Gly4Ser linkers are preferred as they provide for greater flexibility.

The fusion construct was cloned into the SalI-ApaI site in the phage expression vector phage3.22 (Maxim Biotechnology, CA). The fusion was expressed first in the pIII phage protein reading frame of the TG1 bacterial strain. AHNP-SA fusion can also be expressed in another bacterial host strain (HP2151) free of the pIII component. A chimeric protein consisting of the extracellular domain of p185Her2/neu and the immunoglobulin Fc region (Her2-Fc) was used to test the binding affinity of the expressed AHNP-SA forms. Her2-Fc was coated onto a 96-well immunoassay plate and the phage supernatant was added to the plate.

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 14 -

Biotin-conjugated peroxidase was then used to detect binding activity of AHNP-SA molecule to purified Her2-Fc.

Thus, since, as shown herein, the AHNP-SA species is amenable to polymerase-based amplification when attached to a biotinylated oligonucleotide, the AHNP-SA species provides a vehicle to develop a rapid and diverse proteomics approach.

A CDR mimetic of anti-EGFr molecules, AERP, which a different number of constrained amino acids has also been developed and shown to have nM affinity for EGFr.

A preferred means for detection in the present invention comprises staining with a fluorescent dye. In this embodiment, after RNA amplification with a polymerase such as T7 RNA polymerase, T3 RNA polymerase, SP6 RNA polymerase,  $\phi$ 29 polymerase or Taq polymerase, a portion of the reaction mixture can be mixed with a fluorescent dye such as RiboGreen reagent (Molecular Probes, Inc) (U.S. Patent 5,436,134), a unsymmetrical cyanine dye that binds to RNA directly in the solution and then releases fluorescence signals. Examples of other fluorescent dyes with similar properties useful in this method include, but are not limited to, PicoGreen, TOTO-1 or YOYO-1. The reactions are preferably performed in microplates and the fluorescence is read using a fluorimeter such as the Spectra Fluora 5 to 15 minutes after mixing RNA solutions with RiboGreen dye.

In the method of the present invention, a mixture of epitope detectors comprising either monoclonal antibodies to selected epitopes, single chain Fvs for selected epitopes, or constrained epitope specific CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures, conjugated with cDNAs of different lengths can be used in a single reaction to probe the cell lysate to provide a profile of proteins in the cell lysate via automatic sequencing. In this method, after amplification and staining of the amplified products with

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 15 -

a fluorescent dye, the reaction mixture is separated by electrophoresis and the size of the RNA products are visualized by fluorescent dyes or probes. Moreover, specific probes can hybridize with the reaction mixture and reveal the presence and abundance of the corresponding antigens.

The sensitivity of the fluorescence detection method of the present invention was demonstrated for the p185 receptor. In these experiments, a chimeric p185-Fc polypeptide was first coated directly to a 96-well plate. The 4D5 monoclonal antibody conjugated with a 1 kb cDNA was then used to detect the chimeric p185-Fc receptor. Since the cDNA contained a T7 promoter, it was amplified by the T7 RNA polymerase. After amplification, the RNA product was mixed with the RiboGreen reagent in a 96-well plate and excited at 485 nm after 5 to 10 minutes. The fluorescent reading was collected at 535 nm. Using this method, concentrations as low as 0.177 pg/ml were detected.

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 the present invention was demonstrated with the poly-His-tag in the 7.16.4ScFv. In these experiments, p185 receptors

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 16 -

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

The method of the present invention is also useful in the detection of post-translation modifications. PCR and 10 aRNA techniques were originally developed to detect the activity of target genes at the DNA level. These methods 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 15 post-translation modification at the protein level. Monitoring of such events, however, is very critical since many modifications including, but not limited to, phosphorylation and glycosylation are related to the functional status of the protein. Thus, experiments were 20 performed to demonstrate the ability of the method of the present invention to detect the phosphorylation of the 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 25 the phosphorylation of tyrosine residues on the p185 receptor (Qian et al. Proc. Natl Acad. Sci. 1994 15:1500-1504). 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 30 captured by 1E1, a monoclonal antibody developed against p185erbB2/neu. PY99, an IgG2b type of anti-phosphorylated Tyr antibody, was used to detect phosphorylated receptors. A second antibody, anti-IgG2b, coupled with ds-oligo, was used to probe the antigen-antibody sandwich complex. A431 35 cells stimulated with EGF produced a positive band, which

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 17 -

was not observed in cells without EGF treatment. T6-17 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 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 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, SP6 RNA polymerase,  $\phi$ 29 polymerase or Taq polymerase as well as the specific promoter in the amplification step, assays performed in accordance with this method possess 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, CDR mimetic or engineered CDR structure is the only critical parameter 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 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, CDR mimetics or engineered CDR structures. In addition, with slight modification in the protocol, different proteins can be detected simultaneously in a single electrophoresis lane

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 18 -

when oligonucleotides of different sizes are attached to the Fv or CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure 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.

The method of the present invention is also useful in the analysis of interactions of molecules 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 available Fvs, CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures, 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.

To study the interactions of molecules, a two-component (molecule A/molecule B) interaction system is developed. The two components, molecule A and molecule B may comprise proteins, sugars, or other types of chemical entities including, but not limited to, carbohydrates, DNA or RNA, or peptides with structural conformations such as alpha helices or beta-sheets. To develop this two-component system, an epitope detector such as an antibody for a first molecule, referred to hereafter as molecule A, is placed in proximity with a sample comprising molecule A so that molecule A binds to the epitope detector. A solution containing products of an expression library constructed so that each expressed protein also contains a HA tag or similar tag can then be added to identify molecules which interact with molecule A. For purposes of the present invention, these molecules are referred to herein as molecule B or a second molecule. Alternatively, normal

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 19 -

cellular extracts or lysates or any fluid containing potential molecule B can be used.

If the second molecule, molecule B, in the library product or cellular extract or lysate binds to the first molecule A bound by the epitope detector, the new molecules can be detected with either a universal detector that binds to the tag or marker or by the use of a CDR library or a scFv library specific against molecule B. In a preferred embodiment, monitoring of the interaction between molecule A and molecule B is performed by the fluorescence based quantifiable assay which detects the amplified nucleic acid sequence from the oligonucleotide conjugated to the universal detector.

When one of the molecules of the two-component (molecule A/molecule B) interaction system binds a ligand or pharmaceutical drug, the two-component system can be used to investigate the effects of the ligand or drug on the binding of molecule A to molecule B. Accordingly, the present invention also provides an *in vitro* system for monitoring drug affects on interactions of molecules. The ligand or drug can be added at any step in the assay to determine how the ligand or pharmaceutical drug alters the binding of molecule A to molecule B. In addition, more than one drug can be added to the two-component interaction system. For example, a second drug such as an antagonist of the first drug can be added and the level of binding of A to B as well as to the complex of A and B can be determined. Further, instead of known ligands or drugs, a third solution containing the products of another library of molecule C marked with other tags could be added to the complex of A and B and the effects of this third solution on binding can be determined.

Thus, the present invention provides a rapid *in vitro* screening assay with a biological readout, namely the formation of a complex interaction. Further, using this type

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 20 -

of system it is possible to build screening systems that act like organic analogue computers whose output is dependent on the number of events developed with each progressive addition. These progressive events are disturbed upon  
5 addition of a third molecule such as a pharmaceutical drug or ligand that interferes with this assembly. The quantification of signals before and after addition of the third molecule defines the change in output. A positive change means that the pharmaceutical drug or ligand  
10 facilitates the binding of molecule A to molecule B, while a negative change means that the pharmaceutical drug or ligand inhibits the binding of molecule A to molecule B.

Active CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures can also be used as starting template molecules to derive a  
15 spectrum of CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures to identify and study via the present invention families of proteins associated with a particular disease state, i.e the erbB family and its association with origin and early detection of malignancy. For example, a library has been  
20 developed containing a large and diverse population of CDR mimetics ( $>10^6$ ) of a single ring size that develop into constrained turns and also possess aromatically modified termini. This particular library was produced using the M13 phage system and contains a large repertoire of CDR-  
25 streptavidin binding moieties diversified from a 6 membered AHNP peptide through randomization. For diversification of the library, the synthesized oligonucleotide library encoding randomized CDR regions, but with a fixed constrained framework region, are inserted into the phage construct that  
30 leads to the expression of the highly varied CDR streptavidin fusion proteins.

CDR-SA libraries can be used in the present invention, for example, to screen transformed cell lines and tumor cells for tumor surface markers. In this embodiment, initial  
35 screening preferably employs fluorescence based

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 21 -

microfluorimetry for binding to cells followed by an ELISA type assay for binding to captured proteins derived from cell lysates. For example, a monoclonal antibody can be attached to PI3-kinase or ras and any bound CDR-SA forms can be detected. The sequence of any unknown targets of tumor specific selected CDR-SA molecules can then be determined. In one embodiment, purified CDR-SA is used to screen a cDNA expression library constructed in cells such as COS7 cells and in expression libraries prepared from freshly isolated tumor tissues from various stages of malignancy.

Libraries of CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures can also be used to generate a spectrum of probes to detect receptors, proteins associated upon activation of the receptors and proteins involved in pathways associated with the receptors. For example, a CDR mimetic library can be used to generate a spectrum of probes to erbB receptors, proteins associated upon activation of erbB receptors and proteins involved in pathways associated with erbB receptors such as the PI-3 kinase pathway.

CDRs or CDR mimetics of libraries defined as binding to a receptor, proteins associated upon activation of a receptor or proteins involved in pathways associated with the receptor are can also be used therapeutically to target the receptor or protein. In a preferred embodiment for therapeutic use, the CDR or CDR mimetic is reinserted into a humanized antibody framework or attached to an Fc. In this embodiment, the engineered CDR structure may be administered alone or may further comprise a radiolabel or cytotoxin attached thereto.

Methods for preparing scFv libraries with some randomly changed CDRs are described by Winter et al. in U.S. Patent 6,291,650, U.S. Patent 6,225,447, U.S. Patent 6,172,197 and U.S. Patent 6,140,471. However, production of CDR-SA libraries are not described by Winter et al.

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 22 -

Also provided in the present invention are kits for performing the methods of the present invention. In one embodiment, a kit is provided for the detection of molecules expressing a selected epitope. In a preferred embodiment, 5 detection of the molecule is performed via a fluorescent dye which stains nucleic acid sequences. Thus, this kit preferably comprises an epitope detector comprising an oligonucleotide attached to a monoclonal antibody for the selected epitope, a single chain Fv for the epitope or a 10 constrained epitope specific CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure, as well as an RNA polymerase, an amplification reaction buffer, and a fluorescent dye. In another embodiment, kits are provided for profiling proteins in a mixture such as a cell lysate. In this embodiment, the kit 15 preferably comprises a mixture of epitope detectors comprising monoclonal antibodies for selected epitopes, single chain Fvs for selected epitopes or constrained epitope specific CDRs conjugated with cDNAs of different lengths, as well as an RNA polymerase, an amplification reaction buffer, 20 and a fluorescent dye.

The original immuno-PCR used pure antigens in the assay. Later iterations of immuno-PCR examined mixed antigens (Hendrickson et al. Nucleic Acids Research 1999 23(3):522-529) but only showed sensitivity of two to three 25 orders of magnitude higher than ELISA. In a real-world assay with the background comprising a huge variety of 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 30 identify motifs in supernatants, fluids, extracts of cells or bacteria or any other eukaryotic 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 35 as a guide. For example, binding by Fv a, d, e, and f would

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 23 -

identify a sugar molecule as having side chains a, d, e, and f, and hence belonging to a 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, most preferably fluorescent dyes 2) microtized liquid handling procedures, 3) low sample volume detection such as "protein chip" analysis and 4) robotization. For example, a chip can be developed which contains multiple binding elements or units and a single universal epitope detector. A binding element that recognizes a common surface on the monoclonal antibody, the single chain Fv, or the CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure, such as a universal antibody can be used. Alternatively, avidin can be built into each antibody, single chain Fv or CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure and biotin can be coupled to the oligonucleotide. These chips provide the advantage of more rapid and higher affinity thereby multiplying the signal.

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

#### 25 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. 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

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 24 -

p185neu in B104-1-1 cells was determined using an <sup>125</sup>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. 5 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% CO<sub>2</sub> atmosphere.

**Example 2: Expression and Purification of His-tagged 7.16.4**

LB media (150 ml) containing 50 µg/ml ampicillin was 10 inoculated with a 15 ml overnight culture of *E. coli* DH5  $\alpha$  and maintained at 30°C until an optical density of 0.5 (600 nm) was obtained. Isopropyl- $\beta$ -(-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 15 and lysed by freezing and thawing and resuspended in 10 ml of urea lysis buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 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 20 centrifugation (12,000 x g for 15 minutes, followed by 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) 25 at 4°C. His-tagged protein was eluted with urea lysis buffer (pH 4.5), and eluate fractions were examined by SDS-PAGE and FACS analysis as described in Example 3. Proteins in the peak fractions were pooled and dialyzed against TKC buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 30 0.1 mM PMSF).

**Example 3: Confirmation of 7.16.4ScFv binding by FACS Analysis**

Cell-surface antigens were detected by 35 Fluorescence-activated cell sorting (FACS). B104-1-1 cells (about 5x10<sup>5</sup>) were incubated (30 minutes at 4°C) in 200 µl of

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 25 -

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 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 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 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.

**20 Example 4: Synthesis of biotinylated ds-cDNA to and streptavidin conjugates**

An oligonucleotide of the following sequence (GGCTAACTAGAGAACCCACT (SEQ ID NO:1)) was synthesized with a biotin at the 5' end to allow for binding to streptavidin or avidin. Another oligonucleotide primer (GCTGGGATCIGTCTCTACAA (SEQ ID NO:2)) was derived from an internal sequence from the VCP cDNA. Using these two primers, a cDNA fragment of ~ 0.6 kb was amplified from the plasmid pCDNA-VCP. This fragment contains a biotin at the 5' end and a T7 promoter site (TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID NO:3)) used to direct the synthesis of RNA from the cDNA template through the enzymatic activity of T7 RNA polymerase. For attachment of 2.5 µg of antibody to 10 µg of streptavidin, a half volume of 0.8% glutaraldehyde was added to 4 µl aliquots. The solution was mixed on a rotation device for 3 hours at room temperature.

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 26 -

Ethanolamine (1 M; 1/20 volume; pH 7.5) was then added. The solution was mixed for an additional 2 hours at room temperature. The antibody-streptavidin complex was stored at 4°C.

5 **Example 5: RNA Amplification Procedure**

Ninety-six well microtiter plates (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp™) were coated with different concentrations of chimeric p185 extra-cellular domain-Fc polypeptide by incubating plates overnight at 4°C with 100 µl of coating buffer (antibody concentration: 5 µg/ml). Plates were then washed three times with PBS containing 0.2% TWEEN 20 (PBS-T; 200 µl/well), blocked with PBS containing 0.5% BSA and 0.2% TWEEN 20 (200 µl/well) for 1 hour at room temperature, and washed again three times with PBS-T (200 µl/well). After this incubation step, plates were washed with PBS-T (six times, 200 µl/well) and incubated with humanized anti-p185Her2 antibody 4D5-streptavidin conjugate (150 ng/ml, 50 µl/well) for 2 hours at room temperature. Plates were washed with PBS-T (six times) and incubated with biotinylated cDNA (800 ng/ml, 0.05 ml/well) for 1.5 hours. Subsequently, plates were washed six times and RNA amplification was performed. The following reagents were added: 1X RNA amplification buffer (50 mM Tris (pH 8.3), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.5 mM Spermidine; 10 mM DTT; 750 µM ATP, UTP, GTP and CTP; 0.5 µl RNasin; 200 U T7 RNA. The solution was then incubated for 4 hours at 37°C. The RNA product was removed from the wells and 25 µl was diluted with 75 µl TE buffer and then mixed with 100 µl of 2000-fold diluted RiboGreen reagent. Ten minutes later, samples in the 96-well plate were excited at 485 nm, and the fluorescence emission was collected at 535 nm using a Spectra Fluora reader (Tecan, Austria).

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 27 -

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, said epitope detector comprising an oligonucleotide attached to a monoclonal antibody for the selected epitope, a single chain Fv for the epitope or a constrained epitope specific CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure;
  - (c) amplifying the oligonucleotide of said epitope detector;
  - (d) contacting the amplified oligonucleotide with a fluorescent dye which stains the oligonucleotide; and
  - (e) measuring fluorescence emitted from the stained oligonucleotide which is indicative of epitope detector bound to the surface and molecules expressing the selected epitope in the sample.
  
2. A kit for the detection of molecules expressing a selected epitope via fluorescence comprising:
  - (a) an epitope detector comprising an oligonucleotide attached to a monoclonal antibody for the selected epitope, a single chain Fv for the epitope or a constrained epitope specific CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure;
  - (b) an RNA polymerase;
  - (c) an amplification reaction buffer;and
  - (d) a fluorescent dye.
  
3. The kit of claim 2 wherein the oligonucleotide of the epitope detector is coupled to biotin and the monoclonal antibody, single chain Fv or constrained epitope specific

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 28 -

CDR, CDR mimetic or engineered CDR structures is coupled to streptavidin so that attachment of the oligonucleotide to the monoclonal antibody, single chain Fv or constrained epitope specific CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure to form the epitope detector is via the biotin-streptavidin complex.

4. A method for profiling proteins in a cell lysate comprising:

- (a) adding to the cell lysate a mixture of epitope detectors comprising monoclonal antibodies for selected epitopes, single chain Fvs for selected epitopes or constrained epitope specific CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures conjugated with cDNAs of different lengths;
- (b) performing RNA amplification;
- (c) separating the RNAs via electrophoresis; and
- (d) visualizing the RNA products via fluorescence so that the profile of proteins in the lysate can be determined.

5. A kit for profiling proteins comprising:

- (a) a mixture of epitope detectors comprising monoclonal antibodies for selected epitopes, single chain Fvs for selected epitopes or constrained epitope specific CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures conjugated with cDNAs of different lengths;
- (b) an RNA polymerase;
- (c) an amplification reaction buffer;
- (d) a fluorescent dye.

6. The kit of claim 5 wherein oligonucleotides of the epitope detectors are coupled to biotin and the monoclonal antibodies, single chain Fvs or constrained epitope specific CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures are coupled to streptavidin so that attachment of the oligonucleotides to the monoclonal antibodies, single

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 29 -

chain Fvs or constrained epitope specific CDRs, CDR mimetics or engineered CDR structures to form the epitope detectors is via the biotin-streptavidin complex.

7. A method for developing a two-component system  
5 for monitoring interaction of molecules *in vitro* comprising:  
    (a) immobilizing a first molecule to a solid support;  
    (b) adding a second molecule which interacts with the  
        first molecule to the solid support;  
    (c) adding a universal epitope detector conjugated  
10 with a polymerase promoter-containing oligonucleotide to the  
        solid support;  
    (d) performing RNA amplification;  
    (e) contacting the amplified oligonucleotide with a  
        fluorescent dye which stains the oligonucleotide; and  
15     (f) measuring fluorescence emitted from the stained  
        oligonucleotide which is indicative of binding of the first  
        molecule to the second molecule.

8. The method of claim 7 wherein said first and  
second molecules are proteins, sugars, carbohydrates, DNA,  
20 RNA, or peptides with structural conformations.

9. A method of monitoring interaction of molecules *in vitro* comprising:  
    (a) developing a two-component system in accordance  
        with the method of claim 7;  
25     (b) adding a third molecule to the two-component  
        interaction system; and  
    (c) monitoring effects of the third molecule on the  
        binding and interaction of said first and second molecules  
        of said two-component system via measuring changes in  
30 fluorescence wherein a positive change in fluorescence is  
        indicative of the third molecule facilitating binding of the  
        first and second molecule and a negative change in

WO 02/066980

PCT/US02/03640

- 30 -

fluorescence is indicative of the third molecule inhibiting binding of the first and second molecule.

10. The method of claim 9 wherein said third molecule comprises a ligand or a pharmaceutical drug.

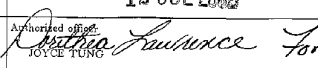
5 11. A method for identifying a CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure for use in an epitope detector or a therapeutic agent targeted to a receptor or protein interacting with the receptor, said method comprising screening a library of CDRs, CDR mimetics or engineered CDR  
10 structures to define a CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure which binds a molecule with the epitope or the targeted receptor or protein.

12. The method of claim 11 wherein the library comprises CDR-streptavidin structures.

15 13. A therapeutic agent comprising a CDR or CDR mimetic identified in accordance with the method of claim 11.

14. The therapeutic agent of claim 12 wherein the CDR or CDR mimetic is reinserted into a humanized antibody or attached to an Fc.

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/06640
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(Y) :G01N 53/59, 53/46; C07H 21/02, 21/04; C12N 1/50 US CL :422/B, 7.1, 252.5, 810; 520/350; 526/22.1, 25.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system, followed by classification symbols) U.S. : 422/B, 7.1, 252.5, 810; 520/350; 526/22.1, 25.1 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		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	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 -- 2-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"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	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"P" earlier document published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"L" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family	
"O" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 24 MAY 2002	Date of mailing of the international search report 12 JUL 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20241	Authorized officer:  JOYCE TUNG Telephone No. (703) 308-0195	
Facsimile No. (703) 805-3250		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/030950
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
Please See Extra Sheet.		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos. 1-3
<b>Remark on Protest</b>		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US02/08640

## BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-3, drawn to a method and kit for detecting molecules expressing a selected epitope in a sample.

Group II, claim(s) 4-6, drawn to a method and kit for profiling proteins in a cell lysate.

Group III, claim(s) 7-8, drawn to a method for developing a two-component system for monitoring interaction of molecules *in vitro*.

Group IV, claim(s) 9-10, drawn to a method for monitoring interaction of molecules *in vitro*.

Group V, claim(s) 11-12, drawn to a method for identifying a CDR, CDR mimetic or engineered CDR structure for use in an epitope detector or a therapeutic agent targeted to a receptor or protein interacting with the receptor.

Group VI, claims 13-14, drawn to a therapeutic agent comprising a CDR.

The inventions listed as Groups I-VI do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Since each group has different purpose, this is inherent that there are different method steps involved in the method. Thus, they lack corresponding special technical features.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	U
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 33/58	Z
	A 6 1 K 37/02	

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

(74) 代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(72) 発明者 グリーン, マーク・アイ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州 1 9 0 7 1 , ペン・ヴァリー, ライターズ・ミル・ロード 3 0 0

(72) 発明者 ザン, ホンタオ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州 1 9 3 3 3 , デヴォン, ポプラ・アヴェニュー 3 7 7 , ナンバー エヌ 4 8 8

(72) 発明者 リ, ピン

アメリカ合衆国ペンシルバニア州 1 9 1 0 4 , フィラデルフィア, バルティモア・アヴェニュー 4 2 1 8

(72) 発明者 リウ, クインドゥ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州 1 9 0 8 2 , アッパー・ダービー, ベヴァリー・ブルヴァード 2 5 0 , エフ 1 0 9

(72) 発明者 ムラリ, ラマチャンドラン

アメリカ合衆国ペンシルバニア州 1 9 0 2 6 , ドレクセル・ヒル, レヴェア・ロード 4 1 - 6

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB20 BB50 CB01 DA12 DA13 DA14 DA30 DA36

FA37 FB02 FB03 FB05 FB07 FB12 FB15 GC15 JA01

4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52 QQ79 QR08 QR32 QR35 QR48

QR54 QR55 QR66 QS12 QS25 QS33 QS34 QS36 QX02

4C084 AA01 DC50

4C085 AA13 AA14 BB11 BB42 BB44 EE01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004532393A5</a>	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002566655	申请日	2002-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	宾夕法尼亚大学		
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 ザンホンタオ リビン リウクインドウ ムラリラマチャンドラン		
发明人	グリーン,マーク・アイ ザン,ホンタオ リ,ビン リウ,クインドウ ムラリ,ラマチャンドラン		
IPC分类号	G01N33/543 A61K38/00 A61K39/395 C07K16/06 C07K16/32 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	C07K5/1013 C07K5/1019 C07K7/06 C07K16/32 C07K2319/32 G01N33/532 G01N33/58 G01N33/6857 G01N33/6878 G01N2500/04		
FI分类号	G01N33/543.541.Z A61K39/395.A A61K39/395.H C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53. U G01N33/58.Z A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA14 2G045/DA30 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GC15 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR54 4B063/QR55 4B063/QR66 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/DC50 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB42 4C085/BB44 4C085/EE01		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	09/783896 2001-02-15 US 09/977716 2001-10-15 US		
其他公开文献	JP4414138B2 JP2004532393A		

#### 摘要(译)

单链Fv或强制的表位特异性的CDR的所选表位的, CDR模拟物或工程化以CDR结构, 通过使用表位检测器, 包括由结合于寡核苷酸表达的样品中所选表位的提供了用于检测待检测分子的方法和试剂盒。

