

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4414138号  
(P4414138)

(45) 発行日 平成22年2月10日(2010.2.10)

(24) 登録日 平成21年11月27日(2009.11.27)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>GO 1 N 33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 4 1 Z
<b>A 6 1 K 38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	
<b>A 6 1 K 39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	A
<b>C 1 2 Q 1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	H
<b>GO 1 N 33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	A

請求項の数 17 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-566655 (P2002-566655)	(73) 特許権者	500429103
(86) (22) 出願日	平成14年2月8日(2002.2.8)		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
(65) 公表番号	特表2004-532393 (P2004-532393A)		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
(43) 公表日	平成16年10月21日(2004.10.21)	(74) 代理人	100089705
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/003640		弁理士 社本 一夫
(87) 国際公開番号	W02002/066980	(74) 代理人	100076691
(87) 国際公開日	平成14年8月29日(2002.8.29)		弁理士 増井 忠式
審査請求日	平成17年1月25日(2005.1.25)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	09/783, 896		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成13年2月15日(2001.2.15)	(74) 代理人	100080137
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 千葉 昭男
(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) 【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検出する方法であって、

(a) 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、

(i) RNAプロモーターを含むオリゴヌクレオチドであって、下記(ii)に結合したオリゴヌクレオチド；

(ii) 選択されたエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体、選択されたエピトープに特異的に結合する単鎖Fv、選択されたエピトープに特異的に結合する強制されたCDR、選択されたエピトープに特異的に結合するCDR模倣物、又は選択されたエピトープに特異的に結合する工作されたCDR構造

を含み；

(c) RNA増幅により上記オリゴヌクレオチドから増幅されたRNAを生成し；そして

(d) 増幅されたRNA産物の存在を検出するが、但し、

(i) RNA産物を染色する蛍光染料に上記の増幅されたRNA産物を溶液中で接触させ、そして染色されたRNAから放射される蛍光シグナルの量を測定するが、但し、染色されたRNAから放射される蛍光が、表面上に固定化された分子上の選択されたエピトープに結合したエピトープ検出器に正比例すること、

10

20

(ii) さらに、リバーstransクリプターゼを用いてRNA産物を増幅し、そしてさらなる増幅産物を溶液中で検出するが、但し、さらなる増幅産物の検出が、表面上に固定化された分子上の選択されたエピトープに結合したエピトープ検出器の指標であること、そして

(iii) さらに、レプリカーゼを用いてRNA産物を増幅し、そしてさらなる増幅産物を溶液中で検出するが、但し、さらなる増幅産物の検出が、表面上に固定化された分子上の選択されたエピトープに結合したエピトープ検出器の指標であることからなる群から選択される方法により増幅されたRNA産物の存在を検出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を検出する方法であって、

(a) 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、

(i) RNAプロモーターを含み、下記(ii)に結合したオリゴヌクレオチド；

(ii) 選択されたエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体、選択されたエピトープに特異的に結合する単鎖Fv、選択されたエピトープに特異的に結合する強制されたCDR、選択されたエピトープに特異的に結合するCDR模倣物、又は選択されたエピトープに特異的に結合する工作されたCDR構造を含む；

(c) RNA増幅により上記オリゴヌクレオチドから増幅されたRNAを生成し；

(d) RNA産物を染色する蛍光染料に上記の増幅されたRNA産物を溶液中で接触させ；そして

(e) 染色された増幅RNA産物から放射される蛍光シグナルの量を測定するが、放射される蛍光シグナルの量が、サンプル中に存在するエピトープを発現する分子の数に正比例することを含む方法。

【請求項3】

2 - 成分系を用いて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) 第1の分子を固相表面に固定化し；

(b) 第1の分子に相互作用する第2の分子を固相表面に添加するが、但し、第2の分子はユニバーサルエピトープを含み；

(c) RNA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表面に添加し；

(d) RNA増幅を実施し；

(e) 増幅されたRNA産物を、RNA産物を染色する蛍光染料に溶液中で接触させ；そして

(f) 染色されたRNAから放射された蛍光シグナルの量を測定するが、染色されたRNAから放射された蛍光が第1の分子の第2の分子に対する結合に正比例することを含む方法。

【請求項4】

第1の分子及び第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3記載の方法。

【請求項5】

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3又は4記載の方法に従い2 - 成分系を使用し；

(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

10

20

30

40

50

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6】

第3の分子がリガンド又は薬学上の薬剤を含む、請求項5記載の方法。

【請求項7】

特異的エピトープに特異的に結合するCDR構造、特異的エピトープに特異的に結合するCDR模倣物構造又は特異的エピトープに特異的に結合する工作されたCDR構造を同定する方法であって、

(a) 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CDRs, CDR模倣物又は工作されたCDR構造のライブラリーに接触させるが、但し、

(i) CDRs, CDR模倣物又は工作されたCDR構造のライブラリーは、各々、RNAプロモーターを含むオリゴヌクレオチドに結合しているか；又は

(ii) CDRs, CDR模倣物又は工作されたCDR構造のライブラリーはユニバーサルエピトープを含み、且つ、ユニバーサルエピトープに結合するエピトープ検出器をさらに添加するが、エピトープ検出器はRNAプロモーターを含むオリゴヌクレオチドを含み

(c) RNA増幅によりオリゴヌクレオチドから、増幅されたRNA産物を生成し；

(d) RNA産物を染色する蛍光染料に上記の増幅されたRNA産物を溶液中で接触させることにより増幅されたRNA産物の存在を検出し；そして

(e) 染色されたRNA産物から放射された蛍光シグナルの量を測定するが、但し、染料されたRNA産物をから放射される蛍光が、選択された表面上に固定化された分子上の特異的エピトープに特異的に結合するCDR構造、選択された表面上に固定化された分子上の特異的エピトープに特異的に結合するCDR模倣物構造又は選択された表面上に固定化された分子上の特異的エピトープに特異的に結合する工作されたCDR構造を同定する指標であること

を含む方法。

【請求項8】

選択された表面が、チップ、96-ウエルプレート及び384-ウエルプレートからなる群から選択される、請求項1乃至7の何れか1項記載の方法。

【請求項9】

オリゴヌクレオチドが、

(a) ビオチン-ストレプトアビジンリンカーによるか；又は

(b) オリゴヌクレオチドがモノクローナル抗体、単鎖Fv、強制されたCDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造上のエピトープに特異的に結合する分子にコンジュゲートされるかにより、

モノクローナル抗体、単鎖Fv、強制されたCDR、CDR模倣物又は工作されたCDR構造に結合している、請求項1乃至8の何れか1項記載の方法。

【請求項10】

オリゴヌクレオチドが二重鎖cDNA分子である、請求項1乃至9の何れか1項記載の方法。

【請求項11】

RNAプロモーターがT7のRNAプロモーター、T3のRNAプロモーター及びSP6のRNAプロモーターからなる群から選択される、請求項1乃至10の何れか1項記載の方法。

【請求項12】

蛍光染料が非対称性シアニン染料である、請求項1乃至11の何れか1項記載の方法。

【請求項13】

選択されたエピトープを発現する分子の蛍光を用いた検出又は定量的ための、

(a) (i) RNAプロモーターを含むオリゴヌクレオチドであって、下記(ii)に結

10

20

30

40

50

合したオリゴヌクレオチド；

(ii) 選択されたエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体、選択されたエピトープに特異的に結合する単鎖 Fv、選択されたエピトープに特異的に結合する強制された CDR、選択されたエピトープに特異的に結合する CDR 模倣物、又は選択されたエピトープに特異的に結合する工作された CDR 構造

を含むエピトープ検出器；

(b) RNA ポリメラーゼ；

(c) 増幅反応バッファー；

(d) 溶液中で RNA に結合する 蛍光非対称性シアニン染料

を含むキット。

10

【請求項 14】

(a) 細胞溶解物の中に存在する蛋白質上の選択されたエピトープに特異的に結合するエピトープ検出器の混合物であって、上記エピトープ検出器の各々は、

(i) RNA プロモーターを含み、下記 (ii) に結合した cDNA；

(ii) 選択されたエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体、選択されたエピトープに特異的に結合する単鎖 Fv、選択されたエピトープに特異的に結合する強制された CDR、選択されたエピトープに特異的に結合する CDR 模倣物、又は選択されたエピトープに特異的に結合する工作された CDR 構造を含むが、

但し、同じ特異的エピトープに特異的に結合するエピトープ検出器が同じ長さの RNA 増幅産物を生じる cDNA s にコンジュゲートされており、そして異なる特異的

20

のエピトープに特異的に結合するエピトープ検出器が異なる長さの RNA 増幅産物にコンジュゲートされているエピトープ検出器混合物；

(b) RNA ポリメラーゼ；

(c) 増幅反応バッファー；

(d) 溶液中で RNA に結合する 蛍光非対称性シアニン染料

を含むキット。

【請求項 15】

オリゴヌクレオチドが、

(a) ビオチン - ストレプトアビジンリンカーによるか；又は

(b) オリゴヌクレオチドがモノクローナル抗体、単鎖 Fv、強制された CDR、CDR 模倣物又は工作された CDR 構造上のエピトープに特異的に結合する分子にコンジュゲートされるかにより、

30

モノクローナル抗体、単鎖 Fv、強制された CDR、CDR 模倣物又は工作された CDR 構造に結合している、請求項 13 又は 14 項記載のキット。

【請求項 16】

オリゴヌクレオチドが二重鎖 cDNA 分子である、請求項 13 乃至 15 の何れか 1 項記載のキット。

【請求項 17】

RNA プロモーターが T7 の RNA プロモーターであり且つ RNA ポリメラーゼが T7 の RNA ポリメラーゼであるか、RNA プロモーターが T3 の RNA プロモーターであり且つ RNA ポリメラーゼが T3 の RNA ポリメラーゼであるか、又は RNA プロモーターが SP6 の RNA プロモーターであり且つ RNA ポリメラーゼが SP6 の RNA ポリメラーゼである、請求項 13 乃至 16 の何れか 1 項記載のキット。

40

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

序論

この出願は、2000年7月25日に提出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日に提出した米国特許09/783, 896号の一部継続出願である。

50

## 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。

### 【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。

### 【0004】

相対的な恒温性回転循環DNA増幅技術(RCA; Schwietzer 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。

### 【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。

## 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、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

10

20

30

40

50

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構造に結合するビオチン - ストレプトアビジン又はビオチン - 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。

#### 【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。

#### 【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。

#### 【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。

#### 【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 - ウェル又は384 - ウェ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

10

20

30

40

50

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。

**【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

30

40

**【0016】**

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5,6

50

63, 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 et 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

## 【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。

20

## 【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、結合に關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。

30

## 【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- $\alpha$ とC- $\beta$ 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。

40

## 【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

50

により側鎖を保護されたペプチドのヘッドトウテイル環状化が、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)。Degradó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 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)。

#### 【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鋳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有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。

10

20

30

40

50

## 【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。

10

## 【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。

20

## 【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。

30

## 【0029】

抗-ヒトp185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)。

40

## 【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、B104-1-1細胞及びT6-17細胞由来のヒトp185her2/neu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ds-oligoとのコンジュゲーションは、プラズ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。7.16.4 ScFv及びmAb 7.16.4はp185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

50

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、AHNPは、その親和性が4D5よりもp185Her2/neuに対して低いため、高濃度で使用した。

【0031】

AHNPは、M13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。Streptomyces avidinii由来のコアのストレプトアビジン配列のcDNAを、(Gly4Ser)2リンカーの配列も含む5'PCRプライマーを用いてPCRによりクローン化した。AHNP及び追加のGly4Ser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DNAを形成させた。ライゲーションの後に、融合物は、(Gly4Ser)3リンカーのN-末端のAHNPからなり、コアストレプトアビジン(SA)配列へと続く。テトラマーAHNP模倣物と、テトラマーに普通は似ているSA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Gly4Ser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、3Gly4Ser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

【0032】

融合構築物は、ファージ発現ベクターファージ3.22(Maxim Biotechnology, CA)内でSalI-ApaI部位にクローン化された。当該融合物を最初に、TG1細菌株のpIIIファージ蛋白質リーディングフレーム内で発現させた。AHNP-SA融合物も、pIII成分を含まない別の細菌宿主株(HP2151)内で発現させることができる。p185Her2/neuとイムノグロブリンFc領域からあるキメラ蛋白質(Her2-Fc)を使用することにより、発現されたAHNP-SA形態の結合親和性を試験した。Her2-Fcを96-ウエ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、AHNP-SA分子の、精製されたHer2-Fcに対する結合活性を検出した。

20

【0033】

即ち、本明細書に示すとおり、AHNP-SA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メラーゼに基づく増幅に影響を受けやすいので、AHNP-SA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。

30

【0034】

抗-EGFR分子のCDR模倣物、AERPは、異なる数の強制的アミノ酸も明らかになって(developed)、EGFRに関してnM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、ポリメラーゼ、例えば、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のポリメラーゼ又はTaqポリメラーゼによるRNA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RNA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、Ribogreen試薬(Molecular Probes, Inc)(米国特許第5,436,134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、PicoGreen, TOTO-1又はYOYO-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SpectraFluoraを用いて、RNA溶液をRibogreen染料と混合後、5から15分間読む。

40

【0035】

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模倣物又は工作された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

50

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-DNA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場合よりも高かった。

#### 【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せら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、p185 erbB2/neuに対して生成させたモノクローナル抗体である1E1により捕捉した。抗-リン酸化Tyr抗体のIgG2bタイプであるPY99を用いてリン酸化された受容体を検出した。二次抗体、抗-IgG2bをds-DNA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。EGFにより刺激されたA431細胞は陽性のバンドを生じたが、EGF処理なしでは細胞中に観察されなかった。T6-17細胞は、しかしながら、陽性のバンドを示したことから、p185

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。ds-オリゴにカップリングさせたFv又はCDR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のに使用することができる。

#### 【0039】

即ち、本発明は、免疫-PCR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T7のRNAプロモーター、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、又はTaq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Fv又は単価CDR、CDR模倣物又は工作されたCDR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。

#### 【0040】

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ds-oligoにカップリングさせることなしに、あらゆる細胞抗原を検出できる。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Fvs又はCDRs、CDR模倣物又は工作されたCDR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Fv又はCDR、CDR模倣物又は工作されたCDR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プチド及び糖又は脂質のような他の構造の翻訳後修飾に適用可能な、用途の広い技術を提供する。

#### 【0041】

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Fvs又はCDRs、CDR模倣物又は工作されたCDR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。

#### 【0042】

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、DNA又はRNA、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)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HA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。

#### 【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、タグ又はマーカー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

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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鋳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。

30

【0047】

CDR-SAライブラリーは本発明において、例えば、腫瘍表面マーカー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-SA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-SA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。

40

【0048】

50

C D R s、C D R 模倣物又は工作されたC D R 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、一連のプロープを生成するのに使用することもできる。例えば、C O S 模倣物ライブラリーを用いて、e r b B 受容体、e r b B 受容体の活性化に際して関連する蛋白質及びe r b B 受容体に關連する経路、例えばP I - 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プ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C D R s 又はC D R 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、C D R 又はC D R 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F c に結合させる。この態様においては、工作されたC D R 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C D R s によりs c F v ライブラリーを製造する方法は、W i n t e r 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、C D R - S A ライブラリーの生産はW i n t e r らにより記載されていない。

## 【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F v 又は強制的エピトープ特異的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R N A 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F v 又は強制的エピトープ特異的C D R に関するモノクローナル抗体を含む、異なる長さのc D N A s にコンジュゲートされたエピトープ検出器、並びにR N A 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。

20

30

## 【0051】

オリジナルの免疫 - P C R はアッセイにおいて純粋な抗原を用いた。免疫 - P C R の後の反復は混合された抗原を試験した (H e n d r i c k s o n e t a l . N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 1 9 9 9 2 3 ( 3 ) : 5 2 2 - 5 2 9 ) が、E L I S A 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。F v s 又はC D R 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、F v s 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、F v 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

40

50

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プ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。

#### 【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

10

#### 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プトープに反応する。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(150ml)を大腸菌DH5αの15mlの一晚培養液中に植え付けて、0.5の光学密度(600nm)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1mMの最終濃度にて添加して、Hisタグ付加7.16.4ScFv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、0.5mMフェニルメチルсуль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10mlの尿素溶解バッファー(10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1M NaH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1M NaCl, 8M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2ml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(pH6.3)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(pH4.5)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。ピーク画分の蛋白質をプールして、TKCバッファー(50mM Tris-HCl, pH8.0, 100mM KCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 0.1mM PMSF)に対して透析した。

30

40

#### 実施例3：FACS分析による7.16.4ScFv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7.16.4ScFvを含む200 µlのFACSバッファー(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°C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°C)。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IgG1に対するFITC-標識されたIgG(Sigma Chemical

50

al 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、CellQuest 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、マウスイムノグロブリンに対するFITC-標識IgG(Sigma Chemical Co.)とインキュベートした。

10

#### 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(GGCTAAGAGAAACCCACT(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(GCTGGGATCTGTCTCTACAA(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(TAATACGACTCACTATAGGG(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。

20

#### 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 RNAsin;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 Fluoraリーダー(Tecan,オーストリア)を用いて集めた。

30

40

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>G 0 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/15	Z
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/50	Z
<b>G 0 1 N 33/58</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	U
		G 0 1 N 33/58	Z

(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19071, ペン・ヴァリー, ライターズ・ミル・ロード 300

(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19333, デヴォン, ポプラ・アヴェニュー 377, ナンバー エヌ488

(72)発明者 リ, ビン

アメリカ合衆国ペンシルバニア州19104, フィラデルフィア, パルティモア・アヴェニュー 4218

(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19082, アッパー・ダービー, ベヴァリー・ブルヴァード 250, エフ109

(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19026, ドレクセル・ヒル, レヴェア・ロード 41-6

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特開平05-149949(JP,A)  
 特表平07-505765(JP,A)  
 特表2003-528298(JP,A)  
 特開平07-265076(JP,A)  
 特開平09-033527(JP,A)  
 特開平06-027109(JP,A)  
 特開平03-167474(JP,A)  
 国際公開第02/046464(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/543  
 A61K 38/00  
 A61K 39/395  
 C12Q 1/68  
 G01N 33/15  
 G01N 33/50  
 G01N 33/53  
 G01N 33/58

专利名称(译)	通过荧光染料免疫检测分子表位和检测分子相互作用的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4414138B2</a>	公开(公告)日	2010-02-10
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		
当前申请(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 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/58 C07K16/06 C07K16/32 G01N33/532 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 A61K37/02 A61K39/395.A A61K39/395.H C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.U G01N33/58.Z		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
审查员(译)	三木隆		
优先权	09/783896 2001-02-15 US 09/977716 2001-10-15 US		
其他公开文献	JP2004532393A5 JP2004532393A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

通过使用表位检测器表达样品中的选定表位，所述表位检测器包含与寡核苷酸结合的选定表位的单链Fv或强制表位特异性CDR，CDR模拟物或工程化CDR结构。提供了用于检测待检测分子的方法和试剂盒。

