

(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2005-532569

(P2005-532569A)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10.27)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|---------------------|-------------|
| GO 1 N 33/566 | GO 1 N 33/566 Z N A | 4 B O 6 3 |
| // CO 7 K 7/06 | CO 7 K 7/06 | 4 H O 4 5 |
| C 1 2 Q 1/42 | C 1 2 Q 1/42 | |
| C 1 2 Q 1/44 | C 1 2 Q 1/44 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2004-521476 (P2004-521476) | (71) 出願人 | 504382718 |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年6月20日 (2003. 6. 20) | | アメリカン ナショナル レッド クロス |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成17年2月22日 (2005. 2. 22) | | アメリカ合衆国 20855 メリーランド州, ロックヴィル, クラブス ブランチ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2003/019584 | | ウェイ 15601, オフィス オブ |
| (87) 国際公開番号 | W02004/007757 | | パテント アンド ライセンシング, ジェ |
| (87) 国際公開日 | 平成16年1月22日 (2004. 1. 22) | | ローム ホーランド ラボラトリー |
| (31) 優先権主張番号 | 60/395, 038 | (74) 代理人 | 100091096 |
| (32) 優先日 | 平成14年7月11日 (2002. 7. 11) | | 弁理士 平木 祐輔 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100096183 |
| | | | 弁理士 石井 貞次 |
| | | (74) 代理人 | 100118773 |
| | | | 弁理士 藤田 節 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複合混合物中の個々の活性成分を同定する方法

(57) 【要約】

活性成分について混合物をスクリーニングする方法であって、複数のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して、複数のリガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、少なくとも1つの成分が少なくとも1つのリガンド - 支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド - 支持体複合物と複数の成分を含む混合物とを接触させ、それにより少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物を未結合成分から分離するステップ、少なくとも1つの分離した成分 - リガンド - 支持体複合物の少なくとも1つの成分を活性についてアッセイするステップ、上記活性を検出するステップ、並びに検出された活性を示す成分を有する少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物を選択するステップ、を含み、それにより混合物を活性成分についてスクリーニングする方法、並びに関連方法。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

活性成分について混合物をスクリーニングする方法であって、

(i) 複数のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して、複数のリガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、

(i i) 少なくとも 1 つの成分が少なくとも 1 つのリガンド - 支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド - 支持体複合物と複数の成分を含む混合物とを接触させ、それにより少なくとも 1 つの成分 - リガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、

(i i i) 少なくとも 1 つの成分 - リガンド - 支持体複合物を未結合成分から分離するステップ、

(i v) 少なくとも 1 つの分離した成分 - リガンド - 支持体複合物の少なくとも 1 つの成分を活性についてアッセイするステップ、

(v) 上記活性を検出するステップ、並びに

(v i) 検出された活性を示す成分を有する少なくとも 1 つの成分 - リガンド - 支持体複合物を選択するステップ、

を含み、それにより混合物を活性成分についてスクリーニングするものである、上記方法。

10

【請求項 2】

リガンドが、細胞、細菌、ウイルス、酵母、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、炭水化物、脂質、薬物、合成無機化合物、合成有機化合物、これらのいずれかのイソ型、及びこれらのいずれかの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 3】

リガンドがペプチドであり、ペプチドがコンビナトリアル手法により生成されるものである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

支持体が、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、アガロース、ポリアクリルアミド、デキストラン、セルロース、多糖、ニトロセルロース、シリコン、スチレン、ポリエチレン被覆ポリスチレン、金属、ポリニフッ化ビニル、ナイロン、及びこれらのいずれかの組み合わせからなる群より選択される材料である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

混合物が生物学的液体、環境抽出物、又は化学化合物を含む組成物である、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 6】

生物学的液体が、血液、血漿、プールされた血漿、血漿分画からの中間体、血清、細胞ホモジネート、組織ホモジネート、ならし培地、醗酵ブロス、脳脊髄液、尿、唾液、乳汁、管液、涙、汗、リンパ液、精液、臍帯液、及び羊水からなる群より選択されるものである、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

生物学的液体が抗体及び抗イディオタイプ抗体を含む血漿由来画分である、請求項 5 記載の方法。

40

【請求項 8】

生物学的液体が疾患に罹患した宿主から得られたものである、請求項 5 記載の方法。

【請求項 9】

環境抽出物が、土壌抽出物、天然水源からの抽出物、氷、空気、灰、岩石若しくは永久凍土のサンプル、及び建造物の標本からなる群より選択されるものである、請求項 5 記載の方法。

【請求項 10】

化学化合物を含む組成物が天然又は合成化学化合物を含むものである、請求項 5 記載の方法。

【請求項 11】

50

成分が、タンパク質、ペプチド、薬物、抗体、細胞、合成分子、有機化合物、タンパク質複合体、細菌、ウイルス及び真菌からなる群より選択されるものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 2】

活性が、生物学的、物理学的、化学的又は生化学的活性である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

活性が酵素活性又は酵素活性の阻害である、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

活性が、細胞、細胞集団、組織又は生物個体に対する作用である、請求項 1 2 記載の方法。

10

【請求項 1 5】

活性が細胞若しくは細胞集団に対する作用であり、その作用が、細胞遊走、細胞増殖、細胞死、細胞分化、細胞周期の開始、細胞周期の停止、アポトーシス、細胞溶解、増殖停止、細胞生存、細胞内シグナル伝達経路の変化、抗原発現、遺伝子のアップレギュレーション、遺伝子のダウンレギュレーション、及び薬剤に応答した表現型の変化からなる群より選択されるものである、請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

細胞、細胞集団、組織又は生物個体が疾患に罹患しているものである、請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 7】

罹患した細胞、細胞集団、組織又は生物個体が、癌、糖尿病、自己免疫疾患、骨粗鬆症、若しくは肺疾患に罹患している、寄生虫、ウイルス若しくは細菌に感染している、負傷、火傷、瘢痕化している、又は治癒状態にあるものである、請求項 1 6 記載の方法。

20

【請求項 1 8】

複数の成分 - リガンド - 支持体複合物がステップ (i i) で形成される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 9】

ステップ (i i i) の後でステップ (i v) の前に、少なくとも 1 つの分離された成分 - リガンド - 支持体複合物及びリガンド - 支持体複合物を複数のプールに分離するサブプールステップをさらに含むものである、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 2 0】

(v i i) 検出された活性を示す少なくとも 1 つの成分が結合する少なくとも 1 つのリガンドの化学的性質を特定するステップをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 1】

(v i i i) ステップ (v i i) で特定した少なくとも 1 つのリガンドの複数のコピーを用意するステップ、

(i x) それぞれのコピーを支持体に結合し、それにより複数のリガンド - 支持体複合物を得るステップ、

(x) リガンド - 支持体複合物が検出される活性を示す少なくとも 1 つの成分の複数のコピーと結合しうる条件下で、リガンド - 支持体複合物と、検出される活性を示す少なくとも 1 つの成分の複数のコピーを含む組成物とを接触させ、それにより複数の成分 - リガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、

40

(x i) 成分 - リガンド - 支持体複合物から成分を解離させ、それにより組成物から成分を回収するステップ、

をさらに含む、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

ステップ (x) の組成物がステップ (i i) の混合物と同じものである、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

(x i i) 検出される活性を示す成分の化学的又は物理的性質を決定するステップ、

50

をさらに含む、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

サブプールステップの後でステップ (i v) の前に、複数の成分 - リガンド - 支持体複合物の成分を該複合物から解離し、続いてリガンド - 支持体複合物をプールから取り出す溶出ステップをさらに含む、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 5】

サブプールステップの後でステップ (i v) の前に、半固体又は粘性物質をそれぞれのプールに添加するステップをさらに含み、ここで少なくとも 1 つの成分 - リガンド - 支持体複合物の成分を該複合物から解離し、該物質に拡散し、それにより成分の濃度勾配が形成するものであり、また成分が解離したリガンド - 支持体複合物からの距離が増大するほど成分の濃度は段階的に低減するものである、請求項 1 9 記載の方法。

10

【請求項 2 6】

活性成分について混合物をスクリーニングする方法であって、

(i) 複数のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して、複数のリガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、

(i i) 少なくとも 1 つの成分が少なくとも 1 つのリガンド - 支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド - 支持体複合物と複数の成分を含む混合物とを接触させ、それにより少なくとも 1 つの成分 - リガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、

(i i i) 少なくとも 1 つの成分 - リガンド - 支持体複合物及びリガンド - 支持体複合物を未結合成分から分離するステップ、

20

(i v) 少なくとも 1 つの成分 - リガンド - 支持体複合物及びリガンド - 支持体複合物をプールに分離するステップ、

(v) 少なくとも 1 つの成分を少なくとも 1 つの分離した成分 - リガンド - 支持体複合物から解離するステップ、

(v i) リガンド - 支持体複合物又はステップ (v) の少なくとも 1 つの分離した成分をプールから取り出すステップ、

(v i i) ステップ (v) の少なくとも 1 つの分離した成分を活性についてアッセイするステップ、

(v i i i) 上記活性を検出するステップ、並びに

(i x) 検出された活性を示す少なくとも 1 つの成分を選択するステップ、

30

を含ま、それにより混合物を活性成分についてスクリーニングするものである、上記方法。

【請求項 2 7】

活性成分について混合物をスクリーニングする方法であって、

(i) 複数のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して、複数のリガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、

(i i) 少なくとも 1 つの成分が少なくとも 1 つのリガンド - 支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド - 支持体複合物と複数の成分を含む混合物とを接触させ、それにより少なくとも 1 つの成分 - リガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、

(i i i) 少なくとも 1 つの成分 - リガンド - 支持体複合物及びリガンド - 支持体複合物を未結合成分から分離するステップ、

40

(i v) 少なくとも 1 つの成分 - リガンド - 支持体複合物及びリガンド - 支持体複合物をプールに分離するステップ、

(v) 半固体又は粘性物質をそれぞれのプローブに添加するステップであって、ここで少なくとも 1 つの分離した成分 - リガンド - 支持体複合物の成分を該複合物から解離し、該物質に拡散し、それにより成分の濃度勾配が形成するものであり、また成分が解離したリガンド - 支持体複合物からの距離が増大するほど成分の濃度は段階的に低減するものである、上記ステップ、

(v i) ステップ (v) の少なくとも 1 つの分離した成分を活性についてアッセイするステップ、

50

(v i i) 上記活性を検出するステップ、並びに
(v i i i) 検出された活性を示す少なくとも1つの成分を選択するステップ、
を含み、それにより混合物を活性成分についてスクリーニングするものである、上記方法
。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2002年7月11日出願の米国仮特許出願第60/395,038号の優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、活性成分について混合物をスクリーニングする方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

従来のプロテオミクスは、生物の全体のプロテオームの包括的な同定プロフィールを作成し、この情報の解析によって診断及び治療用成分の候補を同定しようとするものである。現在、タンパク質混合物を解析するための主要な技術は、二次元ゲル電気泳動及び多次元液体クロマトグラフィーであり、これらは両者とも質量分析装置に接続されている。この手法の能力の例としては、酵母における1484種のタンパク質の解明と同定である (Washburn et al., Nat. Biotechnol. 19(3): 242-2471 (2001))。タンパク質の分離及び同定のための定量的な方法は、Aebersold及びその共同研究者により開発された放射性同位体を付加したアフィニティタグ (ICAT) である (Smolka et al., Anal. Biochem. 297(1): 25-312 (2001))。ICATは、タンパク質の発現レベルを定量するための同位体で標識した正常又は重試薬を用いたタンパク質の部位特異的な共有結合の標識を含む。タンパク質を分離し同定する方法の別の例は、Uetzら及びItoらにより開発された、サッカロミセス・セレビスエにおいて4000以上のタンパク質-タンパク質相互作用を同定した酵母ツーハイブリッドスクリーニングアッセイの大規模形式である (Uetz et al., Nature 403(6770): 623-627 (2000); Ito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(8): 4569-4574 (2001))。タンパク質を分離・同定するこれらの手法は強力であるが、これらは分画したタンパク質の細胞機能を同定するものではない。

【0004】

複雑なタンパク質混合物もまたビーズに固定化されたコンビナトリアル生成されたりガンドのライブラリーにおいて分離されている。当技術分野で周知のコンビナトリアル合成化学手法は、それぞれが分子と結合する能力を有する可能性のある、数百万のリガンドのライブラリーを作製することができる (Lam et al., Nature 354: 82-84 (1991) 及び国際 (PCT) 特許出願第WO92/00091号)。直鎖状六量体リガンドのライブラリーは、18の天然アミノ酸で作製されており、例えば 34×10^6 種の構造を含有する。アミノ酸類似体及びイソ型もまた含まれ、可能性ある構造の数が実質的に無制限である。各ビーズは本質的に、その表面上に単一構造の数百万のコピーを有し、異なるビーズは異なる配列を含む。さらに、ライブラリー中のビーズの合計数は膨大である。

【0005】

コンビナトリアルライブラリーへの成分分子の暴露の後、成分は、アフィニティ相互作用によりライブラリー内の特定のリガンドに結合しうる。平衡時には、支持体 (例えばアフィニティリガンドを有するビーズ) 上の成分の濃度は、アフィニティ定数、並びにリガンド及び成分の濃度により異なる。公開されているスクリーニング方法においては、結合した成分の検出、すなわちそのリガンドの検出は、精製され放射性標識された開始成分を用いる場合には簡便である (Mondorf et al., J. Peptide Research 52: 526-536 (1998))。他の方法には、成分に対する抗体による検出が含まれる (Buettner et al., Interna 50

tional Journal of Peptide & Protein Research 47: 70-83 (1996); Furka et al., International Journal Peptide Protein Research 37(6): 487-493 (1991); 及び Lam et al., (1991)前掲)。複数の成分に対するリガンドは、示差的スクリーニング法と組み合わせて粘着剤に固定したビーズを用いて検出する。これは Q u A S A R 法とも呼ばれており(国際(PCT)特許出願 W O 0 1 / 4 0 2 6 5 号)、これを用いてウイルス及びプリオンタンパク質と結合するリガンドが検出された。

【0006】

ビーズに基づくライブラリーを用いる、関連するが別の技術においては、正常の生理学的環境中の成分タンパク質をビーズに結合したペプチドリガンドライブラリーとインキュベートする。分画の後、ビーズを低融点アガロースの薄片ゲルに固定化し配列させて、リガンドの粗「アレイ」を作製する。タンパク質が結合する膜(ニトロセルロース又は P V D F)をゲル上に重ね、種々の条件下でタンパク質をビーズから溶出し、ゲルを介した溶媒拡散の一方向キャピラリー移動によって、膜上にゲル中の位置と同じ関連した位置で捕捉する(DNAのサザントランスファーと類似する)。ビーズ上に固定したリガンドと結合した元の混合物に存在するタンパク質は全て膜状に存在するため、膜そのものを剥離し、種々の既知タンパク質について再度検査することができる。

10

【0007】

上記の方法においては、ビーズ上に固定したコンビナトリアル手法により生成したリガンドのライブラリーを使用するが、成分タンパク質は、その生化学的又は生物学的機能ではなく、リガンドへの結合に基づいて単純に分離し同定される。従って、当技術分野では、単にライブラリー内のリガンドと結合する能力だけではなく、その化学的、物理学的、生物学的及び/又は生化学的機能に基づいて複合混合物からタンパク質を分離し同定する方法が望まれている。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明はそのような方法を提供するものである。本発明のこの目的及び他の目的、並びに利点、さらには本発明のさらなる特徴は、本明細書に提供される本発明の説明から明らかとなるだろう。

【課題を解決するための手段】

30

【0009】

発明の簡単な説明

本発明は、活性成分について混合物をスクリーニングする方法を提供する。第1の方法においては、本方法は、(i)複数のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して、複数のリガンド-支持体複合物を形成させるステップ、(ii)少なくとも1つの成分が少なくとも1つのリガンド-支持体複合物と結合する条件下でリガンド-支持体複合物と複数の成分を含む混合物とを接触させ、それにより少なくとも1つの成分-リガンド-支持体複合物を形成させるステップ、(iii)少なくとも1つの成分-リガンド-支持体複合物を未結合成分から分離するステップ、(iv)少なくとも1つの分離した成分-リガンド-支持体複合物の少なくとも1つの成分を活性についてアッセイするステップ、(v)上記活性を検出するステップ、並びに(vi)検出された活性を示す成分を有する少なくとも1つの成分-リガンド-支持体複合物を選択するステップ、を含む。

40

【0010】

第2の方法において、本方法は、(i)複数のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して、複数のリガンド-支持体複合物を形成させるステップ、(ii)少なくとも1つの成分が少なくとも1つのリガンド-支持体複合物と結合する条件下でリガンド-支持体複合物と複数の成分を含む混合物とを接触させ、それにより少なくとも1つの成分-リガンド-支持体複合物を形成させるステップ、(iii)少なくとも1つの成分-リガンド-支持体複合物を未結合成分から分離するステップ、(iv)少なくとも

50

1つの成分 - リガンド - 支持体複合物及びリガンド - 支持体複合物をプールに分離するステップ、(v)少なくとも1つの成分を少なくとも1つの分離した成分 - リガンド - 支持体複合物から解離するステップ、(vi)リガンド - 支持体複合物又はステップ(v)の少なくとも1つの解離した成分をプールから取り出すステップ、(vii)ステップ(v)の少なくとも1つの解離した成分を活性についてアッセイするステップ、(viii)上記活性を検出するステップ、並びに(ix)検出された活性を示す少なくとも1つの成分を選択するステップ、を含む。

【0011】

第3の方法において、本方法は、(i)複数のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して、複数のリガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、(ii)少なくとも1つの成分が少なくとも1つのリガンド - 支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド - 支持体複合物と複数の成分を含む混合物とを接触させ、それにより少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、(iii)少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物を未結合成分から分離するステップ、(iv)少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物及びリガンド - 支持体複合物をプールに分離するステップ、(v)半固体又は粘性物質をそれぞれのプローブに添加するステップであって、ここで少なくとも1つの分離した成分 - リガンド - 支持体複合物の成分を該複合物から解離し、該物質に拡散し、それにより成分の濃度勾配が形成するものであり、また成分が解離したリガンド - 支持体複合物からの距離が増大するほど成分の濃度は段階的に低減するものである、上記ステップ、(vi)ステップ(v)の少なくとも1つの解離した成分を活性についてアッセイするステップ、(vii)上記活性を検出するステップ、並びに(viii)検出された活性を示す少なくとも1つの成分を選択するステップ、を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

発明の詳細な説明

本発明は、活性成分について混合物をスクリーニングする方法を提供する。第1の方法において、本方法は、(i)複数のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して、複数のリガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、(ii)少なくとも1つの成分が少なくとも1つのリガンド - 支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド - 支持体複合物と複数の成分を含む混合物とを接触させ、それにより少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、(iii)少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物を未結合成分から分離するステップ、(iv)少なくとも1つの分離した成分 - リガンド - 支持体複合物の少なくとも1つの成分を活性についてアッセイするステップ、(v)上記活性を検出するステップ、並びに(vi)検出された活性を示す成分を有する少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物を選択するステップ、を含む。

【0013】

本明細書で使用される用語「混合物」は、1を超える成分を含む任意の集合物を意味する。ここで、本明細書で使用される用語「成分」は、任意の生物学的、化学的、又は生化学的成分又は標的、例えば化合物、分子、ウイルス又は細胞を意味する。好ましくは混合物は、それぞれが異なる化学的性質(例えば、分子式、化学構造、ヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列)を有するか、又はそれぞれが異なる物理学的性質(例えば、スペクトルシグナル若しくはコンホメーション)を有する、異なる成分の集合物である。より好ましくは、混合物は、複数の異なる成分を含む集合物である。当業者であれば、混合物が、異なる化学的又は物理学的性質を有する各成分の1以上のコピーを含みうることは理解しうる。

【0014】

混合物を含む成分は、天然から単離されてもよいし又は合成により作られたものでもよく、かつ性質が有機又は無機(例えば、合成無機化合物又は合成有機化合物)であってもよい。例えば、成分は薬物又は薬物候補(小分子薬物候補など)、肥料成分、殺虫剤成分、又はそれらの誘導體、類似体若しくはエナンチオマーであってもよい。さらに、成分は

任意の原核生物又は真核生物、例えば、細菌、真菌、酵母、植物、又は哺乳動物に対して内因性又は外因性のものであってもよい。本方法にとって好適な成分は、限定されるものでないが、細胞（例えば、幹細胞又は培養細胞）、タンパク質、ペプチド、薬物、抗体、合成分子、合成化合物、タンパク質複合体（例えば、血液凝固第ⅩⅠⅠⅠ因子及びフィブリノーゲン又は血液凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子及びフォン・ビルブラント因子）、細菌、ウイルス、真菌、酵母、プリオン、アミノ酸、核酸、炭水化物、脂質、これらのいずれかのイソ型、並びにこれらのいずれかの組み合わせを含む。好ましくは、成分はタンパク質である。好適なタンパク質成分は、例えば、受容体、抗体、免疫原、酵素（例えば、プロテアーゼ）、及び酵素基質を含む。さらに好ましくは、タンパク質は血漿由来タンパク質である。最も好ましくは、血漿由来タンパク質は、免疫グロブリン、例えば、IgG、IgM、IgA、IgEである。免疫グロブリンは、罹患状態にある生物に由来してもよいし（及び場合によっては健康な被験者の血漿中に見出されない）、又は試薬（例えば薬物）を投与した結果として生じうる。あるいは、成分は細胞であることが好ましい。より好ましくは細胞は幹細胞である。

10

【0015】

本方法の成分はいずれの供給源から得てもよい。すなわち、成分を含む混合物は、例えば土壌抽出液、空気、水、食品、環境汚染評価用標本、中間又は最終段階の化学反応混合物などの複合混合物でありうる。成分を含有する混合物は、化学又は合成混合物であってよく、そしてコンビナトリアルライブラリー中に及び/又は圧力、温度などの極限条件下の有機溶媒中に存在してもよい。好ましくは、混合物は、生物学的液体、環境抽出物、又は化学化合物を含む組成物である。

20

【0016】

「生物学的液体」とは、原核生物又は真核生物由来の任意の水溶液を意味する。生物学的液体は、血液、リンパ液、涙、唾液、汗、及び尿のように、原核生物又は真核生物から直接得ることができるものである。あるいは、生物学的液体は、醗酵ブロス及び細胞培養培地のように、生物の細胞を培養することにより得ることができるものである。本方法に使用する好適な生物学的液体は、限定されるものでないが、血液、血漿、プールされた血漿、血漿分画の中間体、血清、細胞ホモジネート、組織ホモジネート、ならし培地、醗酵ブロス、脳脊髄液、尿、唾液、乳汁、管液、涙、汗、リンパ液、精液、臍帯液及び羊水を含む。好ましくは、生物学的液体は、抗体及び抗イディオタイプ抗体を含む血漿由来画分である。本明細書において使用する「抗イディオタイプ」とは、別の抗体の抗原決定領域に特異的なエピトープを有する抗体を意味する。また、生物学的液体は疾患に罹患した宿主から採取されることが好ましい。本明細書において使用する用語「宿主」とは、任意の原核生物又は真核生物、例えば、細菌、ウイルス、酵母、真菌、鳥類、爬虫類及び哺乳動物である。宿主が罹患する疾患は、任意の症状、病気、感染症などを含むいずれの疾患でもありうる。例えば、疾患は、癌、糖尿病、自己免疫疾患、骨粗鬆症、創傷治癒、肝再生又は肺疾患などでありうる。あるいは、疾患は、寄生虫、ウイルス又は細菌による感染症でありうる。

30

【0017】

本明細書において使用する用語「環境抽出物」とは、環境から採取される任意のサンプルを意味する。環境とは、天然環境（例えば天然の水源）でありうる。あるいは、環境は、人工の環境（例えば建造物）でありうる。この点で、環境抽出物は、土壌、土壌抽出物、天然の水源からの抽出物、氷、灰、岩石若しくは永久凍土のサンプル、又は建造物からの標本などでありうる。天然の水源としては、例えば、海洋、湖、海岸、河川、沼、池、三角州又は湾が挙げられる。あるいは環境抽出物は、水処理センターからの抽出物であってもよい。建造物は任意の人工建造物でありうる。好ましくは、建造物は、1以上の毒性薬物（サリン、ソマン、神経毒、爆発性化合物、殺虫剤、病原体、VX及び発泡性試薬など）に汚染されている。

40

【0018】

化学化合物を含む組成物は、天然又は合成化学化合物を含みうる。例えば、組成物は、

50

反応生成物の化学又は合成混合物でありうる。あるいは、組成物は、コンビナトリアルライブラリー及び/又は圧力、温度などの極限条件下にある有機溶媒中に存在してもよい。

【0019】

本明細書で使用する用語「リガンド」は、成分と結合する任意の生物学的、化学的、又は生化学的物質、例えば化合物、分子、又は細胞を意味する。リガンドは天然から単離されてもよいし又は合成により生成された物質であってもよい。リガンドは原核生物又は真核生物、例えば、細菌、真菌、酵母、植物、又は哺乳動物に対して内因性又は外因性のものであってもよい。本方法にとって好適なリガンドは、限定されるものでないが、細胞、細菌、ウイルス、酵母、タンパク質、アミノ酸、核酸、炭水化物、脂質、薬物、合成無機化合物、合成有機化合物、抗体調製物（例えば、抗体フラグメント、化学修飾した抗体など）、糖類、これらのいずれかのイソ型、及びこれらのいずれかの組み合わせを含む。

10

【0020】

有機分子は、例えば、薬理治療剤として一般的に使用される合成有機化合物を含む。かかる分子は、場合によっては、コンビナトリアル合成法により、又はさらに具体的には、特定分子に到達するように工夫された戦略的合成により大量製造される。同様に、有機分子はまた、天然環境から抽出されるか又は戦略的に合成されたかに拘らず、天然物及び類似体を含む。本明細書で使用される用語「有機」とは、炭素と水素のみを含む分子に限定されることを意図するのではなく、むしろ生物学的起源の高分子を包含するそのさらに広い意味で使用される。

【0021】

好ましくは、リガンドはペプチドである。本明細書で使用される用語「ペプチド」は、少なくとも1つのペプチド結合を含む成分を意味し、そしてD及び/又はLアミノ酸のいずれかを含みうる。理想的にはリガンドは、本質的に約2～約10アミノ酸（例えば、約2、3、4、5、6、7、8、9、又は10アミノ酸）から成るペプチドである。所望であれば、ペプチドリガンドは、コンビナトリアル手法、すなわちコンビナトリアルライブラリーの作製に一般的に使用される技術、例えば、開裂、カップリング、組換え法又は当技術分野で公知の他の手法により作製することができる（例えば、Furka et al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 37, 487-493 (1991); Lam et al., *Nature*, 354, 82-84 (1991)）；国際特許出願WO 92/00091号；及び米国特許第5,010,175号、第5,133,866号、及び第5,498,538号を参照のこと）。ペプチドライブラリーの発現はまた、Devlin et al., *Science*, 249, 404-406 (1990)に記載されている。ペプチドライブラリーにおいては、異なる配列の別々のペプチドの数は、実施するカップリング反応数、ペプチドサイズ、及び利用する別個のアミノ酸数により著しく増加する。例えば、19アミノ酸のペプチドへのランダムな組込みは、最高2,476,099（ $= 19^5$ ）個の異なる配列の個々のペプチドを生じる（Lam et al., 前掲）。コンビナトリアル法は直接に支持体上でのリガンドのライブラリーの作製を可能にする。典型的には、リガンドは、単一リガンドの複数コピーが各粒子（例えばビーズ）上で合成されるように支持体媒体の粒子上で合成されるが、これは本発明との関係において必要なものではない。

20

30

【0022】

本方法において、リガンドの各々は支持体と結合し、それによりリガンド-支持体複合物を形成している。本明細書で使用される用語「支持体」は、例えば当技術分野で公知の固体支持体のような、リガンドを固定化する役割を果たす任意の支持体マトリックスを意味する。好適な支持体は、限定されるものでないが、リガンドが直接結合することができるか又はリガンドをその上に合成することができる、セルロース、アクリルポリマー、ポリアクリルアミド又はポリヒドロキシ化メタクリレートポリマー、ポリスチレン、デキストラン、アガロース、多糖類、親水性ビニルポリマー、これらの任意の重合誘導体、及びこれらの任意の組み合わせを含む膜、フィルター、メッシュ、又は粒子、並びに任意の多孔質又は非多孔質のマトリックスを含む。好ましくは、支持体は不活性であって、成分及び/又は固定化リガンドとの化学反応が最小限となるようにする。この点で、支持体は

40

50

、望ましくはポリメタクリレート、ポリアクリレート、アガロース、ポリアクリルアミド、デキストラン、セルロース、多糖類、ニトロセルロース、シリコン、スチレン、金属、ポリエチレン被覆ポリスチレン、ポリニフッ化ビニル、ナイロン、又はこれらの任意の組み合わせを含む。特に好ましい支持体材料は、ポリエチレン被覆ポリスチレン及びポリメタクリレートである。種々の樹脂が市販されており、好ましくは支持体はクロマトグラフィ樹脂ビーズなどの樹脂ビーズである。

【0023】

潜在的リガンドを提示する多数の固体支持体が市販されている。あるいは、本方法のリガンドを、標準の方法を用いて支持体上に間接的に結合するか又は直接固定することができる（例えば、Harlow and Lane, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988); Biancalà et al., *Letters in Peptide Science* 7(291): 297 (2000); MacBeath et al., *Science* 289: 1760-1763 (2000); Cass et al. 編, *Proceedings of the Thirteenth American Peptide Symposium*; Leiden, Escom, 975-979 (1994); 米国特許第 5, 576, 220 号; Cook et al., *Tetrahedron Letters* 35: 6777-6780 (1994); 及び Fodor et al., *Science* 251(4995): 767-773 (1991) を参照のこと)。一実施形態において、リガンドを支持体の表面上に合成するが、これはペプチドライブラリーを作製する上で有利である。リガンドを化学的に支持体に結合してもよいし、又はリンカー、例えば アラニン、グリシン、グリシン-セリンを含有するポリマー、式 - (CH₂)_n - の短鎖炭化水素、ポリエチレングリコール、アミノカプロン酸、及び O (CH₂)_n (ここで n は 1 ~ 30 である) を含むリンカーなどを介して結合してもよい。所望であれば、リガンドに 1 つ又は複数の異なる切断可能なリンカー、例えば、光易分解性若しくは酸易分解性部分を結合し、分析のためにリガンド集団の選択的脱着ができるようにしてもよい。リガンドは、例えば、タンパク質及びエナンチオマー分離用の（例えば、サンプル中の成分を濃縮し、単離し、検出し、特性決定し、定量し、又は同定するための）アフィニティ精製媒質として、診断治療ツールとして、化学反応の触媒及び促進剤として、並びにタンパク質の選択的安定剤として利用することができる。

10

20

【0024】

リガンド-支持体複合物が形成された後、それを複数の成分を含む混合物と、少なくとも 1 つの成分が少なくとも 1 つのリガンド-支持体複合物と結合する条件下にて接触させ、それにより少なくとも 1 つの成分-リガンド-支持体複合物を形成させる。そのような条件は、当業者には公知のように、混合物（成分）、リガンド自体、さらには他の要因（例えば pH、温度、接触時間、塩濃度など）に応じて異なる。少なくとも 1 つの成分が少なくとも 1 つのリガンド-支持体複合物と結合する好適な条件の決定は、通常の技術の範囲内である。本発明の好ましい実施形態において、複数の成分-リガンド支持体複合物を形成させる。

30

【0025】

少なくとも 1 つの成分-リガンド-支持体複合物が形成された後、少なくとも 1 つの成分-リガンド-支持体複合物及びリガンド-支持体複合物を、未結合の成分から分離する。本明細書で使用する用語「未結合成分」は、リガンド-支持体複合物のいずれかと結合していない又は弱く結合している混合物の成分を意味する。少なくとも 1 つの成分-リガンド-支持体複合物を未結合成分から分離する手段は当技術分野で公知であり、例えば、遠心分離、連続希釈、濾過、透析及びクロマトグラフィ形式の洗浄が含まれる。

40

【0026】

本方法は、場合により、少なくとも 1 つの成分-リガンド-支持体複合物及びリガンド-支持体複合物を複数のプール又はサブ集団に分離するサブプールステップを含んでもよい。好ましくは、サブプールステップは、プール当たり平均約 10 ~ 500 の成分-リガンド-支持体複合物及びリガンド-支持体複合物で達成される。より好ましくは、プール当たりの複合物の平均数は 20 ~ 100 である。最も望ましくは、複合物は、各プールに 50 の複合物が存在するようにサブプールされる。

【0027】

50

さらに、本方法は、場合により、サブプールステップの後に、複数の成分 - リガンド - 支持体複合物の成分を該複合物から解離し、続いてリガンド - 支持体複合物をプールから取り出す溶出ステップを含んでもよい。

【0028】

これに関し、本発明は、活性成分について混合物をスクリーニングする第2の方法を提供する。本方法は、(i)複数のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して、複数のリガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、(ii)少なくとも1つの成分が少なくとも1つのリガンド - 支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド - 支持体複合物と複数の成分を含む混合物とを接触させ、それにより少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、(iii)少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物及びリガンド - 支持体複合物を未結合成分から分離するステップ、(iv)少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物及びリガンド - 支持体複合物をプールに分離するステップ、(v)少なくとも1つの成分を少なくとも1つの分離した成分 - リガンド - 支持体複合物から解離するステップ、(vi)リガンド - 支持体複合物又はステップ(v)の少なくとも1つの解離した成分をプールから取り出すステップ、(vii)ステップ(v)の少なくとも1つの解離した成分を活性についてアッセイするステップ、(viii)上記活性を検出するステップ、並びに(ix)検出された活性を示す少なくとも1つの成分を選択するステップ、を含む。

10

【0029】

本方法の利点の1つは、活性について試験する成分がリガンド - 支持体複合物から解離し、それゆえ未結合状態であることである。従って、成分はリガンド及び/又は支持体により阻害されることなく、活性アッセイにおいて用いられる酵素基質又は細胞と遊離状態で相互作用し、それに対して作用する。当業者であれば、成分のリガンド - 支持体複合物からの解離の程度が100%又は完全な解離である必要はなく、リガンド - 支持体複合物からある程度の成分のみが解離していても成分の活性を検出することが可能であることを理解しうる。

20

【0030】

あるいは、本方法は、場合により、サブプールステップの後に、半固体又は粘性物質をそれぞれのプールに添加するステップをさらに含んでもよく、ここで少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物の成分を該複合物から解離し、該物質に拡散し、それにより成分の濃度勾配が形成され、また成分が解離したリガンド - 支持体複合物からの距離が増大するほど成分の濃度は段階的に低減するものである。本方法において使用する好適な半固体物質としては、例えば、アガロース、ゼラチン、グリセロール、ポリエチレングリコール、アクリルアミド及びフィブリンシーリング剤が挙げられる。好ましくは、半固体物質は0.5% w/vアガロースである。

30

【0031】

これに関し、本発明は、活性成分について混合物をスクリーニングする第3の方法を提供する。本方法は、(i)複数のリガンドを用意し、それぞれのリガンドを支持体と結合して、複数のリガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、(ii)少なくとも1つの成分が少なくとも1つのリガンド - 支持体複合物と結合しうる条件下でリガンド - 支持体複合物と複数の成分を含む混合物とを接触させ、それにより少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物を形成させるステップ、(iii)少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物及びリガンド - 支持体複合物を未結合成分から分離するステップ、(iv)少なくとも1つの成分 - リガンド - 支持体複合物及びリガンド - 支持体複合物をプールに分離するステップ、(v)半固体又は粘性物質をそれぞれのプローブに添加するステップであって、ここで少なくとも1つの分離した成分 - リガンド - 支持体複合物の成分を該複合物から解離し、該物質に拡散し、それにより成分の濃度勾配が形成するものであり、また成分が解離したリガンド - 支持体複合物からの距離が増大するほど成分の濃度は段階的に低減するものである、上記ステップ、(vi)ステップ(v)の少なくとも1つの解離した成分を活性についてアッセイするステップ、(vii)上記活性を検出するステッ

40

50

ブ、並びに(v i i i) 検出された活性を示す少なくとも1つの成分を選択するステップ、を含む。

【0032】

本方法によりもたらされる利点としては、成分が遊離状態で、未結合状態であり、リガンド-支持体複合物により阻害されず活性アッセイにおいて使用する酵素基質又は細胞と相互作用し又はそれに作用することが含まれる。さらに、本方法は、成分の活性を用量依存的に試験することができるという利点をもたらす。

【0033】

本方法において、活性について少なくとも1つの成分-リガンド-支持体複合物においてアッセイすることにより活性成分について混合物をスクリーニングする。本明細書で使用用語「活性成分」は、アッセイ対象の活性又は予期しない結果を示す混合物のいずれかの成分を意味する。これに関し、所定の混合物の成分の大部分は、本方法においてアッセイする特定の活性次第で、活性成分となる可能性がある。本明細書に記載する目的のため、活性成分はまた、この成分がリガンド-支持体複合物に結合するという意味で活性を有するものである。アッセイ対象の活性は、その活性が検出可能なシグナル(例えば基質の酵素による修飾など)を生じる限り、任意の生物学的、物理学的、化学的又は生物学的活性であってよい。化学的活性、例えば成分の化学組成物に直接関連する活性を用いることができる。言い換えれば、特定の化学的サブユニット若しくは部分又は化学的構造の存在により成分を同定することができる。検出法に有用な物理的特性としては、例えば、それぞれ蛍光又は質量分光法により決定しうる分光シグナルが含まれる。検出の方法は成分の活性を単独で検出する必要はなく、1を超える成分又は成分の複合体(例えば、補因子又は酵素などの他の生物学的成分と複合化した成分)を選択的に同定してもよい。

【0034】

好ましくは、活性は、酵素活性又は酵素活性の阻害でありうる。例えば、本方法は、生物学的活性に基づいて成分を特性決定する酵素活性アッセイの実施を含みうる。成分による基質の酵素的修飾を可能にする条件下で、酵素基質を少なくとも1つの成分-リガンド-支持体複合物に供して生成物を形成させる。次いでその生成物を検出し、それにより成分の存在を同定する。あるいは、生成物の形成の不在は、所定の酵素活性を阻害する活性成分を同定するために検出しうる。酵素活性アッセイは、例えば、Haugland(前掲)にさらに記載されている。

【0035】

あるいは、活性は、細胞、細胞集団、組織又は生物個体に対する作用でありうる。これらの方法のいずれにおいても、細胞に基づくアッセイを実施することができ、その場合、少なくとも1つの成分-リガンド-支持体複合物を、それに対し成分が観察可能な生物学的作用を及ぼす細胞と接触させる。純粋に説明の手段として挙げるが、好ましい成分は抗細菌薬でありうる。本方法のリガンドは、抗細菌薬の潜在的活性部位と結合し、それにより抗細菌薬成分を混合物(例えば、潜在的治療薬のライブラリー)から分離する。細菌叢を成分に供し、抗細菌性成分を殺細菌活性のゾーンにより検出する。活性が細胞又は細胞集団に対する作用の場合には、その作用は、例えば、細胞遊走、細胞増殖、細胞死、細胞分化、細胞周期の開始、細胞周期の停止、アポトーシス、細胞溶解、増殖停止、細胞生存、細胞内シグナル伝達経路の変化、抗原発現、遺伝子のアップレギュレーション、遺伝子のダウンレギュレーション、又は薬剤に応答した表現型の変化などでありうる。

【0036】

本発明の好ましい実施形態において、細胞、細胞集団、組織又は生物個体は、罹患しているか又は罹患供与源に由来するものである。罹患した細胞集団、組織又は生物個体は、任意の疾患、病気、感染症などに罹患したものでありうる。好ましくは、疾患は、癌、糖尿病、自己免疫疾患、骨粗鬆症又は肺疾患である。あるいは、罹患した細胞集団、組織又は生物個体は、寄生虫、ウイルス又は細菌に感染したものである。罹患した細胞集団、組織又は生物個体はまた、負傷、火傷、瘢痕化している又は治療状態にあるものでありうる。罹患した細胞はまた、原生動物、線虫、クルーズ・トリパノソーマ(*T. cruzi*)及びリ

ーシュマニアでありうる。

【0037】

アッセイ対象の活性を検出するための正確な技術は活性の性質により異なりうる。例えば、活性が細胞増殖の場合には、その活性の検出は、単に血球計算板、目視検査又は放射性同位体取り込みを用いた細胞の計数を含むものでありうる。活性が着色付加生成物の生成の場合には、検出は、紫外線可視光(UV-VIS)分光光度法による着色の検出を含みうる。アッセイ対象の活性を検出するための好適な技法の決定は当業者の技術範囲内である。

【0038】

活性を検出した後、検出された活性を示す成分を有する少なくとも1つの成分-リガンド-支持体複合物を選択する。本明細書で使用する用語「検出」及びこれに関連する用語は、成分-リガンド-支持体複合物又はそれが存在するプールの同定を意味する。後者の場合、単一の成分-リガンド-支持体複合物が選択されるまで、選択したプールの構成成分を用いてアッセイを反復実施しうる。

10

【0039】

本方法の利点は、活性成分を、その成分の分子情報の予備知識がなくても、生物学的、生化学的、又は化学的活性に基づいて同定し及び/又は特性決定する能力である。従って、成分は、生物学的活性を示し、本方法の実施前に処理(例えば熱不活性化)を行う必要がない。また、アルブミンなどの多量に存在するタンパク質又は免疫グロブリンのような活性成分を除去する必要がない。同様に、より特異的な細胞機能(例えば、特定のタンパク質又は他の細胞成分の産生)に影響を及ぼす成分の能力は、アッセイ培地において増強又は低減される可能性があり、それゆえ成分の価値ある特性がもたらされる。さらに、成分は、細胞傷害性薬物に対する耐性を示す細胞である可能性がある。従って、本発明は、特定の生物学的活性を有する新規な活性成分又は未知の活性成分(すなわち、本方法の実施前に未同定のタンパク質)の同定方法を提供する。また、本発明は、既知のタンパク質について新規又は未知の生物学的活性を同定することも提供する。

20

【0040】

本方法が活性成分の同定を達成しうるのは、アッセイされた活性を示す成分と結合するリガンド(1若しくは複数)の化学的性質を決定することを含むことでありうる。リガンドの化学的性質を決定する好適な方法は当技術分野で公知であり、例えば、質量分析法、エドマン分解配列決定法などがある。リガンドが特定の成分に対して特異性を有するものとして同定された後、これらのリガンドを再合成し、これを利用して、成分を、例えばクロマトグラフィ分離を用いて捕捉し、単離し、検出し、及び/又は特性決定することができる。この目的のために、本方法はさらに、同定したリガンドの複数のコピーを用意し、同定したリガンドの各コピーを支持体と結合し、それにより複数のリガンド-支持体複合物を得ることを含む。リガンド-支持体複合物が成分の複数コピーと結合しうる条件下で、複数のリガンド-支持体複合物を成分の複数のコピーを含有する組成物と接触させ、それにより複数の成分-リガンド-支持体複合物を形成させる。成分を成分-リガンド-支持体複合物から解離し、所望であれば、さらなるラウンドのスクリーニング及び/又は特性決定に供する。成分を同定及び精製するために使用する成分の複数コピーを含む組成物は、成分を活性成分として同定するために最初に使用した混合物を同じものとしうる。例えば、血漿がリガンド-支持体複合物と最初に接触させた混合物である場合には、続いて同じ血漿源を後続ステップで用いて成分を単離及び精製しうる。

30

40

【0041】

活性成分を単離及び精製した後、本方法はさらに、例えば成分の質量分析を実施することにより、成分の化学的若しくは物理的性質を決定するステップ、又は成分を少なくともさらに特性決定するステップを含んでもよい。本明細書で使用する用語「特性決定」及びこれに関係する用語は、成分のいずれかの特有の品質(quality)又は特質(trait)の同定を意味するのであって、精密な化学的性質、例えば成分の分子式、化学構造、コンホメーション、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を解明することを要求するものではない

50

。

【0042】

さらに、同定したリガンドはまた、診断アッセイにおいて、成分を固定化するか又は成分を選択的に導入するために、及び擬 (pseudo) 受容体又は合成受容体として利用することができる (例えば、Still, Acc. Chem. Res., 29, 155-163 (1996)を参照のこと)。さらに、リガンドそれ自身を治療薬、触媒などとして利用することができる。

実施例

【0043】

以下の実施例により本発明をさらに説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【0044】

簡便性のため、本明細書における実施例では以下の略語を使用する：

DEPFMU、6, 8 - ジフルオロ - 4 - メチルウンベリフェリル；ICAT、放射性同位体を使用したアフィニティタグ；UV-VIS、紫外線可視光；SAP、ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ；FITC、フルオレセインイソチオシアネート；ATCC、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション；IL-2、インターロイキン - 2；PNPP、p - ニトロフェニルホスフェート；PPV、プタパルボウイルス；PVDF、フッ化ポリビニリデン；AP、アルカリホスファターゼ；及びPI、ヨウ化プロピジウム。

【実施例1】

【0045】

本実施例は、細胞傷害性因子について混合物をスクリーニングする本方法の使用を示す。

【0046】

ビーズ上に分画化した後に細胞傷害性因子が細胞死を誘導する能力を判定した。このアッセイでは、抗マウスTNF - 抗体 (Pharmingen) を結合したビーズを、精製マウスTNF - (Pharmingen, San Diego, CA) と共にインキュベートした。対照のビーズはTNF - とインキュベートしなかった。さらに、洗浄が不十分なために生じる未結合のTNF - の存在をなくすために、培地に可溶性TNF - を添加し、抗体を有しないビーズをTNF - と共にインキュベートする対照も含めた。また、未処理ビーズの作用も測定した。24ウエルプレートの各ウエルに所定数の細胞を播き、約100個のビーズをWEHI 164細胞 (ATCC) の各ウエルに添加した。ビーズと共に48時間インキュベートした後、血球計算板による計数とトリパンブルー排除を観察することにより死滅細胞数を得、細胞死の割合 (%) を示した (表1)。

【表1】

表1: TNF- α ビーズの細胞傷害アッセイ

| | 出発細胞数 | 死滅 (%) |
|----------------------|---------|--------|
| 可溶性 TNF- α | 100,000 | 98 |
| 抗 TNF α ビーズ単独 | 100,000 | 0.5 |
| 偽インキュベーション | 100,000 | 0.3 |
| 未処理ビーズ | 100,000 | 4.1 |
| | 50,000 | 0.1 |
| | 25,000 | 7.7 |
| TNF- α 結合ビーズ | 100,000 | 9.1 |
| | 50,000 | 29.4 |
| | 25,000 | 12.5 |

【0047】

本実施例により、十分な量のタンパク質がこれらの高アフィニティリガンドから溶出され、感受性を有する細胞の培養物において検出可能な細胞死が生じたことが示された。これらのデータは、活性因子が所定の指標で生物学的機能についてのマルチプルアッセイにおいて検出されうるといふ説を支持するものである。

【実施例 2】

【0048】

本実施例は、細胞増殖を促進する因子についてサイトカインを混入した血漿をスクリーニングする本方法の使用を示す。

【0049】

本アッセイに使用する細胞は、NK-92細胞（入手先ATCC, Manassas, VA）とした。NK-92細胞系は、ヒト細胞傷害性T細胞系であり、増殖するために外因性インターロイキン-2（IL-2）を必要とする。血清又は健常なヒト血漿を含有する正常細胞培養培地は、NK-92の増殖を促進するためにIL-2を含まない。従って、NK-92細胞は、通常は5 ng/mlの組換えマウスIL-2を添加した培地における培養で維持する。

【0050】

IL-2特異的リガンドを有するビーズのモデルとして、300 µgのラット抗ヒトIL-2抗体（Pharmingen, San Diego, CA）を400 µlのプロテインGセファロースビーズ（Pierce, Rockford, IL）上に架橋した。ビーズは、天然の分泌サイトカイン混合物を混入した血漿の混合物と共に一晩インキュベートした。この混合物は、数種のサイトカインを含有し、フィトヘマグルタニン（phytohemagglutinin）及びシプロフロキサシンでサイトカインを分泌するように誘導したヒト単球及び白血球に由来するものとした。次にこれらの誘導細胞からの培地をプールした。混入血漿中のIL-2の濃度は約4 ng/mlであった。ビーズを約50カラム量のPBS+0.1% Tween-20（Sigma Aldrich, St. Louis, MO）で洗浄した。4 ng/mlの純粋組換えヒトIL-2と共にインキュベートしたビーズも含めた。対照は、陰性対照としてIL-2と共にインキュベートしていない抗体を有するビーズと、陽性対照として可溶性IL-2を添加した培養物を使用した。

【0051】

NK-92細胞を、24ウエルプレートの各ウエルに 1×10^5 細胞で播き、IL-2を添加しない培地中で24時間増殖させ、内因性のIL-2貯蔵物を枯渇させた。約100個のビーズを各ウエルに添加した。培養物を96時間増殖させた。細胞を各培養物から回収し、血球計算板で生存細胞を計数し、死滅細胞をトリパンブルー排除により除外することにより細胞数を測定した。組換えタンパク質の又は分泌混合物から精製されたりガンドからの細胞にIL-2を供したウエルは、陰性対照と比較して細胞数が8~12倍増大した。従って、これらのデータにより、タンパク質が高アフィニティリガンドでの高度に複雑な混合物から分画され、タンパク質が十分な速度及び濃度でリガンドから培地に拡散し、その存在が依存性細胞の増殖を促進する能力により検出されたことが示された。

【0052】

これらの結果は、十分なタンパク質が高アフィニティリガンドから拡散し、その活性が関連する細胞に基づくアッセイにおいて検出されたことを示す。これらの結果は、増殖を促進する未知のタンパク質が培養物中の細胞に対するその活性によって同定され、そのタンパク質と結合するリガンドが同定され、バルク中に生成され、そしてアフィニティクロマトグラフィにより精製された活性タンパク質が同定され特性決定されることを推定する根拠となりうる。

【実施例 3】

【0053】

本実施例は、増殖因子を同定するための本方法の使用を示す。

【0054】

複雑なサイトカイン混合物を、六量体ペプチドリガンドのライブラリーを用いて、NK

10

20

30

40

50

- 92細胞の生存を促進するタンパク質についてスクリーニングした。単離されたリンパ球及び単球 (ImmunoRx, Inc, Farmington, NY) に由来する、天然の分泌サイトカイン混合物を出発材料として使用した。この混合物は、正常血清又は培養培地中には存在しないが、生物学的誘導に応答して放出される多数のサイトカインを含有する。このアッセイの指標は、実施例2に記載の生物学的指標及び蛍光指標の両者である。Toyo Pearl 605-Mエポキシビーズ (合成元Peptides International, Louisville, KY) の骨格上のシステイン誘導体により合成した六量体ライブラリーからの11,000個のビーズをサイトカイン混合物と共にインキュベートした。未結合及び弱い結合のタンパク質はPBS (150 mM NaCl, pH 7.4) での洗浄により除去した。20~50個のビーズを、384ウエルマイクロタイタープレートのウエル中に 2.4×10^4 細胞/mlで導入した40 μ lのNK-92細胞と共にインキュベートした。プレートを37で48時間維持した。約30個の増殖細胞の凝集を20ウエルにおいて観察した。いくつかの場合には、ビーズに隣接して大きな凝集の細胞が増殖していた。その周辺に細胞が増殖していない近接した数個のビーズが存在し、顕著な死滅細胞の部分はヨウ化プロピジウム (PI) の取り込みにより示された。これらのビーズの1つ (及び増殖を促進する類似のウエルからのいくつかのほかのビーズ) を回収し、ビーズ上のIL-2の存在を「ビーズプロット」アッセイにおいて改変抗体検出法により確認した。簡単に説明すると、ビーズをアガロース中に配列し、溶出バッファー中のキャピラリー移動によりタンパク質をビーズからPVD膜に移し、抗IL-2抗体で膜を検査してIL-2を検出する。3つの可能性ある陽性を含む11個のビーズを回収し、洗浄し、同様の出発材料と共に再度インキュベートし、同じ細胞系と共に個々に培養した。3つの可能性ある陽性ビーズの2つは、詳細な解析アッセイ (deconvolution assay) においてその活性を再度確認した。さらなるビーズを配列決定し、その結合リガンドは配列GVASED (配列番号9) であることが同定された。このリガンドを有する樹脂を合成し、IL-2に結合することを見出した。完全な出発材料はその樹脂において分画し、結合したタンパク質は、樹脂上で精製され、活性に寄与すると考えられる別のタンパク質を同定するために分析される。

10

20

【0055】

このタイプの機能的スクリーニング実験のいくつかの態様は、生物学的活性についての他のスクリーニングを行うことの根拠となりうる。IL-2は出発材料中に存在することが知られているため、また多数のほかのサイトカインは種々のレベルでビーズ上に及びアッセイに存在し、細胞生存に寄与しうる。NK-92細胞は、IL-1及び数種の他の既知サイトカインに対する応答性の欠如について試験したが、これらは、出発材料中に存在する他の現在未同定のサイトカインに対して応答性でありうる。最も重要なことは、細胞傷害性物質及び毒液に対して防御性の因子についてのスクリーニングは、細胞増殖及びPIの排除が指標であるこのタイプのアッセイにおいて明らかに達成できることである。

30

【実施例4】

【0056】

本実施例は、アルカリホスファターゼ酵素活性について混入血漿をスクリーニングする本方法の使用を示す。

【0057】

ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ (500 ng) (SAP-Sigma-Aldrich) は、1mlのプールされたヒト血漿に混入した。混入血漿は、ストレプトアビジンと結合することが知られている配列であるリガンドHPQFLS (配列番号1) (合成元Peptides International, Louisville, KY) と共に又はそれなしで、Toyo Pearl AF-Amino-650Mビーズ (Tosoh BioSciences, Montgomeryville, PA) と共にインキュベートした。混入した又は未混入の血漿と共に、ビーズを室温で1時間インキュベートし、その後、それらを0.1% Tween-20, pH 7.2を含むHEPESバッファーで洗浄した。リガンド保持ビーズはまた、対照として生理食塩水単独と共にインキュベートした。ビーズは、250 mM NaCl及び0.05% Tween-20バッファーを含む120 μ lのHEPESバッファーと共に、384ウエルプレートのウエルに各ウエル

40

50

が6つのHPQFLSビーズを有するように分配した。ビーズを室温で30時間インキュベートした。

【0058】

ウエルから液体を除去し、着色ホスファターゼ基質であるp-ニトロフェニルホスフェート(PNPP)(Sigma-Aldrich)を用いてアルカリホスファターゼ活性の存在について試験した。AP混入血漿に曝露したリガンドビーズからのバッファーを含むウエルでのみ黄色が発色し、対照ウエルにおいては着色は観察されなかった。実際にタンパク質がビーズから溶出されたかを確認するため、FITC標識ストレプトアビジン(Pierce)もまた上述したようにHPQFLS(配列番号1)ビーズと共にインキュベートした。その後、ビーズを120 μ lの20mMクエン酸、140mM NaClバッファーと共に21時間インキュベートした。バッファーを回収し、蛍光を蛍光光度計で測定した。基線を超える増大は11.6%であった。さらに3日の溶出後、蛍光は基線より22.7%も増大した。

10

【0059】

これらの結果は、酵素活性を有するタンパク質が高アフィニティリガンド上に分画され、該リガンドから溶出されること、また溶液中のタンパク質の存在はその生化学活性に基づいて測定可能に検出しうることを示している。

【実施例5】

【0060】

本実施例は、メラノーマ特異的抗体について血漿をスクリーニングする本方法の使用を示す。

20

【0061】

このアッセイで使用した細胞系は、ヒト悪性メラノーマ細胞系SK-MEL28とした。コンビナトリアルライブラリーを、Toyopearl 650-Mエポキシ樹脂(Tosoh BioScience製)上で合成した。このライブラリーは、システイン誘導体のスフルヒドрил基を介して樹脂と結合したリガンドを有するように設計した。IgG、IgA及びIgM抗体の供与源として使用した出発材料は、フィブリノーゲンを除去するためにさらに分画を行った血漿画分I+II+IIIのペーストとした。ビーズは、そのペーストと共にインキュベートし、洗浄し、50~150個のビーズを、384ウエルプレートのウエルに1 \times 10⁴細胞/mlで播いた40 μ lのSK-MEL28細胞と共にインキュベートした。培地は、ヨウ化プロピジウム(PI)、死滅細胞にのみ取り込まれる赤色蛍光色素を含有した。各ウエルの画像は、単一細胞の解像度で1時間間隔で160時間にわたり撮影した。画像を、経時的なPIの取り込みについて分析し、集団の平均より標準偏差が2を超えるPIの取り込みの累積的増大を示すウエルを特に重要なものとして選択した。これらのウエル中のビーズを回収し、洗浄し、新鮮な最初の出発材料のアリコート再度添加し、同じ細胞濃度でウエル毎に1~2個のビーズと共にインキュベートし、元のアッセイと同様に画像化した。集団の平均より標準偏差が2を超える死滅の増大を示すウエルのビーズを回収し、結合しているリガンドを配列決定した。

30

【0062】

ビーズを有するウエル又は特定のビーズの周辺における死滅の増大は、細胞傷害性抗体がリガンドに結合したことを示した。陽性ウエルはいずれも、ウエル中のビーズがウエル当たり単一ビーズとなるよう希釈し、このアッセイを反復実施することにより詳細に解析(deconvolution)した。これにより、結果が確認され、配列決定したリガンドが結合したタンパク質に結合する特定のビーズが示された。単一のビーズが詳細な解析を行うことなくウエル中に同定された場合には、そのビーズを回収し、結合したリガンドを配列決定した。

40

【実施例6】

【0063】

本実施例は、免疫した哺乳動物の抗体について抗体の混合物をスクリーニングする本方法の使用を示す。

【0064】

50

ヒト血漿由来の静脈内免疫グロブリン (I g G) は、60,000程度のドナーのプールから製造され、多様なアフィニティを有する非常に多種多様な抗体を含み、それらの中には細胞表面受容体に結合するものもある。細胞表面受容体に対する抗体の集団はまた、マウスを膜調製物で免疫することにより惹起することができる。抗体は、「ビーズプロット」受容体 - 結合抗体が P O N 1 のアップレギュレーションに有用となりうるような方法において、それらの受容体エピトープを同定するための出発材料のスクリーニングとして使用することもできる。示差的スクリーニングにおける抗体の特異的エピトープは、正常及び免疫マウス由来の精製 I g G 調製物を用いて同定された。マウスの一集団をオボアルブミンで免疫し、免疫していないマウスは対照として使用した。各群からの I g G 調製物をプロテイン G セファロース (Pierce) でのアフィニティークロマトグラフィーを用いてプールした血清から精製し、2つの集団を A l e x a 4 8 8 (緑色) 又は A l e x a 5 6 8 (赤色) 色素 (Molecular Probes, Eugene OR) で示差的に標識した。続いて2つの I g G 集団を混合し、コンビナトリアル六量体リガンドのライブラリーと共にインキュベートした。ビーズを十分に洗浄し、蛍光顕微鏡下で観察した。蛍光を示すビーズの大部分は赤色及び緑色シグナルの両方を有し、このことは、これらが両方の集団に存在する抗体と結合したことを示している。赤色蛍光のみを示すビーズは、免疫集団にのみ存在する抗体を示している。これらを回収し、配列決定した。その中には、オボアルブミンと非常に高い配列類似性を示すものがあり、例えば ILRVIR (配列番号 2) は、オボアルブミンの配列 RTINKVVRV (配列番号 3) と、IFDKVQG (配列番号 4) は RFDKLPQFG (配列番号 5) と、そして PPFRIHG (配列番号 6) は MPFRVITE (配列番号 7) と相同性を示す。残りの配列決定した配列の中には、免疫過程で使用したフロイントアジュバントにより生じたと考えられる細菌配列と高い相同性を有するものがあつた。

【実施例 7】

【0065】

本実施例は、パラオキシナーゼ活性を測定することによりライブラリーに結合する酵素を同定する本方法の使用を示す。

【0066】

HDL と結合するリガンドは、血漿由来のパラオキシナーゼを精製する能力について、その酵素活性を測定することによりスクリーニングした。パラオキシナーゼは、アテローム斑の発生に対する防御、並びに数種の神経毒 (サリン) 及び防虫剤に対する防御に關与している。5 μ g のリガンド 2'-ナフチル - アラニン WLHAN (配列番号 8) を 100 μ l の 1 : 10 希釈ウサギ血清 (P B S 中) と共に 37 $^{\circ}$ にて 1 時間インキュベートした。ビーズは、遠心して上清を取り出し、上清をエッペンドルフチューブに保存した。樹脂ビーズペレットを等量のパラオキシナーゼアッセイバッファー中に再懸濁した。上清のパラオキシナーゼ活性は、感受性の特異的蛍光基質を用いて測定した。100 μ M D E P F M U (6, 8 - ジフルオロ - 4 - メチルウンベリフェリル) を、37 $^{\circ}$ にて 20 分かけて標準的なマイクロタイプレート中で 10 μ l の上清、10 μ l のビーズ懸濁液、又は 10 μ l の血清と混合した。D E P F M U の加水分解は、市販の蛍光光度計を用いて 355 nm での発光と 460 nm での励起で蛍光を測定することにより定量した。加水分解は、D E P F M U 活性の標準曲線を用いて比較して定量した。出発活性の 30% は樹脂を有するウエル中で検出し、元のパラオキシナーゼ活性の 4% 未満が血清中に残存した。これらのデータは、酵素と結合するリガンドが、ビーズと関連した酵素の活性により検出され、また酵素それ自体はその活性についてスクローニングするこのアッセイを用いて複雑な混合物から発見されうることを示す。

【実施例 8】

【0067】

本実施例は、ウイルス関連細胞傷害性についてのスクリーニングに基づいて、ウイルスに結合するリガンドについてライブラリーをスクリーニングする本方法の使用を示す。

【0068】

ブタバルボウイルス (P P V) と結合するリガンドは、本方法を用いて同定された。こ

のアッセイは、伝統的なブランクアッセイの改変であって、感染度を、培養中の感受性哺乳動物細胞の溶解により形成されるウイルスブランクにより測定するものである。ウイルスに結合するリガンドのモデルとして、2 μ l のポリクローナルブタ抗 P P V 抗体を、製造業者のプロトコル (Pierce) に従ってプロテイン A セファロースビーズに結合させた。ビーズは、連続遠心分離により P K 1 3 細胞から精製した 8 ログの P P V と共にインキュベートした。これらのビーズを低融点アガロースと混合し、70%コンフルエントの P K 1 3 細胞培養物の表面に広げた。37 / 5% C O₂ での 5 日間のインキュベーションにより、生存細胞がニュートラルレッド色素により染色された。ウイルスに結合したビーズの周囲に細胞死の領域が存在することが明らかであった。これらの結果は、ビーズからの活性成分 (ウイルス) の制御拡散が活性ビーズを示すことを確証している。

10

【0069】

刊行物、特許出願及び特許を含む本明細書に引用された全ての参考文献は、あたかもその各々が個々にかつ具体的に参考として取り込まれ、その全体が本明細書に記載されていたかのように、それと同じ程度に、参考として本明細書に取り込まれるものとする。

【0070】

本発明を説明する文脈において (特に、添付の特許請求の範囲において)、用語「a」、「an」及び「the」の使用及び類似の参照は、本明細書において特に断らない限り又は文脈との明らかな矛盾がない限り、単数及び複数の両方を包含すると解釈されるべきである。用語「含む (comprising)」、「有する (having)」、「含む (including)」及び「含有する (containing)」は、特に断らない限り、制限がない (open-ended) 用語 (すなわち、「含むが、しかしそれに限定されない」を意味する) と解釈されるべきである。本明細書における数値範囲の記載は、本明細書で特に断らない限り、その範囲内に入るそれぞれ別々の値を個々に参照する手間を省く方法として使用することを意図するだけであり、各個別の値は、あたかもその値が個別に本明細書に記載されていたかのように本明細書に組み入れられているものとする。本明細書に記載の全ての方法は、本明細書で特に断らない限り又は明らかに文脈との矛盾がない限り、任意の好適な順序で行うことができる。本明細書に記載される任意の及び全ての具体例又は例示の用語 (例えば「などの、のような (such as)」) の使用は、単に本発明をより明らかにすることを意図するのであり、別段の請求がない限り、本発明の範囲の限定を示したものではない。本明細書中の用語はいずれも、本発明の実施に必須であるクレーム中になく構成を示す用語であると解釈されるべきでない。

20

30

【0071】

本発明の好ましい実施形態を、本発明者らが知る本発明を実施するための最良の形態を含めて本明細書に記載した。これらの説明を読めば、当業者には、これらの好ましい実施形態の変形が明らかになるだろう。本発明者らは、当業者がかかる変形を適宜使用することを予想し、また本発明者らは、本明細書に具体的に記載したもの以外の発明が実施されることを意図する。従って、本発明は、本明細書に添付された特許請求の範囲に記載された発明対象の、適用法律により認められる全ての変更物及び均等物を包含する。さらに、その全ての可能な変形における上記構成のいずれの組み合わせも、本明細書で特に断らない限り又は文脈との別段の明らかな矛盾がない限り、本発明に包含される。

40

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The American National Red Cross
 <120> METHOD FOR IDENTIFYING INDIVIDUAL ACTIVE ENTITIES FROM COMPLEX MIXTURES
 <130> 222362
 <150> US 60/395,038
 <151> 2002-07-11
 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 1
 His Pro Gln Phe Leu Ser
 1 5
 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 2
 Ile Leu Arg Val Ile Arg
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 3
 Arg Thr Ile Asn Lys Val Val Arg Phe
 1 5
 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 4
 Ile Phe Asp Lys Val Gln Gly

10

20

30

40

1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 5

Arg Phe Asp Lys Leu Pro Gly Phe Gly
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 6

Pro Pro Phe Arg Ile His Gly
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 7

Met Pro Phe Arg Val Ile Thr Glu
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 8

Trp Leu His Ala Asn
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic

<400> 9

Gly Val Ala Ser Glu Asp
1 5

10

20

30

40

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US03/19584 | | | | | | | | | | |
|---|--|---|--|---|---|--|---|--|--|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | | | | | | | | | | | |
| IPC(7) : C12Q 1/00, 1/68, 1/70; G01N 33/53, 33/566, 33/567 US CL : 435/ 4-6, 7.1, 7.21; 436/ 501, 503, 504, 808 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | | | | | | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | | | | | | | | | | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/ 4-6, 7.1, 7.21; 436/ 501, 503, 504, 808 | | | | | | | | | | | | |
| 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) Please See Continuation Sheet | | | | | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | | | | | | | | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | | |
| X | WO 01/40265 A2 (V.I. TECHNOLOGIES, INC.) 07 June 2001, see entire document. | 1-24 & 26 | | | | | | | | | | |
| X | US 5,482,867 A (BARRETT et al.) 09 January 1996, see entire patent. | 1-18 & 20 | | | | | | | | | | |
| X | WO 92/00091 A1 (BIOLIGAND, INC.) 09 January 1992, see entire document. | 1-27 | | | | | | | | | | |
| <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: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" 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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table> | | | "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention | "E" earlier application or patent published on or after the international filing date | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone | "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" 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 | "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family | "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention | | | | | | | | | | | |
| "E" earlier application or patent published on or after the international filing date | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone | | | | | | | | | | | |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" 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 | | | | | | | | | | | |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family | | | | | | | | | | | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | | | | | | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search 21 August 2003 (21.08.2003) | | Date of mailing of the international search report 20 OCT 2003 | | | | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230 | | Authorized officer Bennett Cates Telephone No. 703-308-0196 | | | | | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/19584

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST: USPT, JPAB, EPAB, DWPI
STN: CAPLUS, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ハモンド, デイヴィッド, ジェイ.

アメリカ合衆国 20882 メリーランド州, レイトンズビル, リップルミード コート 4916

(72) 発明者 ラスロップ, ジュリア, テイト

アメリカ合衆国 22046 ヴァージニア州, フォールズ チャーチ, ポプラー ドライブ 100

(72) 発明者 サーカー, ジョリー

アメリカ合衆国 20832 メリーランド州, オルニー, リトル ヴィスタ テラス 2559

(72) 発明者 ゲオルギュー, リリアナ

アメリカ合衆国 20814 メリーランド州, ベセスダ, イースト ウェスト ハイウェイ 4400, アpartment 517

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ32 QQ33 QR58 QR83 QR90 QS36 QX01 QX02
4H045 BA13 BA14 BA15 EA50

| | | | |
|-------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 鉴定复杂混合物中各个活性成分的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2005532569A | 公开(公告)日 | 2005-10-27 |
| 申请号 | JP2004521476 | 申请日 | 2003-06-20 |
| 申请(专利权)人(译) | 美国国家红十字会 | | |
| [标]发明人 | ハモンドデイヴィッドジェイ ラスロップジュリアテイト サーカージョリー ゲオルギューリリアナ | | |
| 发明人 | ハモンド,デイヴィッド,ジェイ. ラスロップ,ジュリア,テイト サーカー,ジョリー ゲオルギュー,リリアナ | | |
| IPC分类号 | G01N33/566 C07K7/06 C12Q1/42 C12Q1/44 C12Q1/68 C12Q1/70 C40B30/04 G01N33/53 G01N33/554 G01N33/567 G01N33/569 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | C40B30/04 G01N33/569 G01N33/6803 | | |
| FI分类号 | G01N33/566.ZNA C07K7/06 C12Q1/42 C12Q1/44 | | |
| F-TERM分类号 | 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ32 4B063/QQ33 4B063/QR58 4B063/QR83 4B063/QR90 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/EA50 | | |
| 优先权 | 60/395038 2002-07-11 US | | |
| 其他公开文献 | JP4486497B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

筛选用于活性成分的混合物的方法，包括以下步骤：提供多个配体并将每个配体与载体结合以形成多个配体-载体复合物，至少一个组分为至少1配体支持条件下，可以绑定到一个配体支持复杂使含有所述轴承件复合材料和多个组件，将混合物其中至少一个组成部分-从支承复合未结合的组分-配体-形成支撑复合材料，至少一个部件的步骤-配体少分离至少一种分离的组分-配体-载体复合物测定至少一种组分的活性，检测所述活性，并选择具有指示检测到的活性的组分的至少一种组分-配体-载体复合物，由此筛选活性成分混合物的方法和相关方法。

表1:TNF- α ビーズの細胞傷害アッセイ

| | 出発細胞数 | 死滅(%) |
|----------------------|---------|-------|
| 可溶性 TNF- α | 100,000 | 98 |
| 抗 TNF α ビーズ単独 | 100,000 | 0.5 |
| 偽インキュベーション | 100,000 | 0.3 |
| 未処理ビーズ | 100,000 | 4.1 |
| | 50,000 | 0.1 |
| | 25,000 | 7.7 |
| TNF- α 結合ビーズ | 100,000 | 9.1 |
| | 50,000 | 29.4 |
| | 25,000 | 12.5 |