

(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2006-509183

(P2006-509183A)

(43) 公表日 平成18年3月16日(2006.3.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566	2 GO 5 4
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	4 BO 6 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 A	
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 3 1 K	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 68 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-574846 (P2003-574846)	(71) 出願人	501014795
(86) (22) 出願日	平成15年3月4日 (2003.3.4)		アクララ バイオサイエンス、 イン
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月25日 (2004.8.25)		コーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/006806		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(87) 国際公開番号	W02003/076649		43-1432, マウンテン ビュー,
(87) 国際公開日	平成15年9月18日 (2003.9.18)		ペアー アベニュー 1288
(31) 優先権主張番号	60/361, 975	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成14年3月5日 (2002.3.5)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/440, 838		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成15年1月17日 (2003.1.17)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 膜結合増感剤を用いる多重分析

(57) 【要約】

本発明は、サンプル中の1つ以上の膜結合分析物の存在、不在、および／または量を決定するための方法および組成物に関する。本発明によれば、放出可能な分子タグにより誘導体化された結合性化合物は、選択された膜結合分析物に特異的に結合し、その後、分子タグは、開裂部分、または膜結合分析物として同じ膜内に固定されている増感剤の活性化の際に放出される。次いで放出分子タグは、それらの明瞭な分離特性と検出特性により同定される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 つ以上の膜結合分析物の存在または不在を測定する方法であって、該方法は、以下の工程：

1 つ以上の膜結合分析物を含む増感剤処理膜を提供する工程；

該 1 つ以上の膜結合分析物の各々に特異的な少なくとも 1 つの結合性化合物が存在し、各々の結合性化合物が 1 つ以上の分子タグを有し、各々の分子タグが開裂可能な結合により結合され、各々の結合性化合物の分子タグが 1 つ以上の物理的特性および／または光学的特性により他の全ての結合性化合物の分子タグと区別ができるように 1 つ以上の結合性化合物を提供する工程；

10

膜結合分析物の存在下、複合体がこのような膜結合分析物と該膜結合分析物に特異的な結合性化合物との間で形成されるように、該増感剤処理膜と、該 1 つ以上の膜結合分析物に特異的な複数の結合性化合物とを組み合わせる工程；

このような複合体を形成する該結合性化合物の開裂可能な結合を開裂させる活性種が生成され、その結果、分子タグが放出されるように、増感剤処理膜を活性化させる工程；

該サンプル中の該 1 つ以上の膜結合分析物を測定するために該 1 つ以上の物理的特性により該放出された分子タグを分離および同定する工程、を包含する、方法。

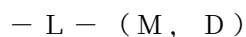
【請求項 2】

前記分離工程が、前記放出された分子タグを電気泳動的に分離する工程を包含し、前記分子タグの各々が 50 から 1500 ダルトンの範囲の分子量を有する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記増感剤処理膜が光増感剤処理膜であり、前記活性種が一重項酸素であり、前記結合性化合物に結合した前記分子タグの各々が、が式：



(式中、

L は、開裂可能な結合であり；

D は、検出部分であり；および

M は、結合または、水素を含まない、炭素、酸素、窒素、リン、ホウ素および硫黄からなる群より選択される 1 個から 100 個の原子からなる水溶性有機化合物である）により定義される基から選択される、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 4】

D が、蛍光標識、色原体標識、または電気化学的標識である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

M が、ポリエーテル、ポリエステル、ポリペプチド、オリゴ糖、ポリウレタン、ポリアミド、ポリスルホンアミド、ポリスルホキシド、ポリホスホネート、およびこれらの遮蔽コポリマーのいずれか 1 種から選択されるポリマーである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

D が、フルオレセインである請求項 5 に記載の方法。

40

【請求項 7】

前記フルオレセインが、5-および 6-カルボキシフルオレセイン、5-および 6-カルボキシ-4, 7-ジクロロフルオレセイン、2', 7'-ジメトキシ-5-および 6-カルボキシ-4, 7-ジクロロフルオレセイン、2', 7'-ジメトキシ-4', 5'-ジクロロ-5-および 6-カルボキシフルオレセイン、2', 7'-ジメトキシ-4', 5'-ジクロロ-5-および 6-カルボキシ-4, 7-ジクロロフルオレセイン、1', 2', 7', 8'-ジベンゾ-5-および 6-カルボキシ-4, 7-ジクロロフルオレセイン、1', 2', 7', 8'-ジベンゾ-4', 5'-ジクロロ-5-および 6-カルボキシ-4, 7-ジクロロフルオレセイン、および 2', 4', 5', 7'-テトラクロロ

50

－ 5 － および 6 － カルボキシ－ 4, 7 － ジクロロフルオレセインからなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

L が、オレフィン、チオエーテル、セレノエーテル、チアゾール、オキサゾールおよびイミダゾールからなる群より選択される請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 1 つ以上の結合性化合物が、2 つから 50 の範囲の複数の結合性化合物である請求項 1、2、3、4、5、6、7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記結合性化合物の各々が、抗体結合性組成物である請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記 1 つ以上の物理的特性が、電気泳動移動度である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記分離および同定工程が、前記放出された分子タグの各々が明瞭なピークを形成する電気泳動図を形成する工程を含む請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

1 つ以上の膜結合分析物の存在または不在を測定するための組成物であって、該組成物は、以下：

1 つ以上の膜結合分析物を含有する増感剤処理膜；および

該 1 つ以上の膜結合分析物の各々に特異的な少なくとも 1 つの結合性化合物が存在し、各々の結合性化合物が 1 つ以上の分子タグを有し、各々の分子タグが開裂可能な結合により結合され、各々の結合性化合物の分子タグが 1 つ以上の物理的特性および／または光学的特性により他の全ての結合性化合物の分子タグと区別ができるような、1 つ以上の結合性化合物、

20

を含み；

該複数のうち少なくとも 1 つの結合性化合物が、少なくとも 1 つの膜結合分析物に特異的に結合する、組成物。

【請求項 14】

前記増感剤処理膜が、結合された光増感剤を有する細胞表面膜を含み、前記光増感剤の各々が、該細胞表面膜内に該光増感剤を固定するための親油性部分を有する、請求項 13 に記載の組成物。

30

【請求項 15】

前記 1 つ以上の膜結合分析物が、GPCR からなる群より選択される請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 1 つ以上の結合性化合物の各々が、抗体結合組成物を含んでなる請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記抗体結合性組成物が、モノクローナル抗体組成物またはポリクローナル抗体組成物である請求項 16 に記載の組成物。

40

【請求項 18】

前記 1 つ以上の結合性化合物が、2 つから 50 の範囲で複数の前記結合性化合物であり、前記 1 つ以上の物理特性が、電気泳動移動度である請求項 13、14、15、16 または 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

異なる前記結合性化合物から放出された前記分子タグが、電気泳動図において明瞭なピークを形成する、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

1 つ以上の膜結合分析物の存在または欠如を測定するキットであって、該キットは、以下：

50

1つ以上の膜結合分析物を有する増感剤処理膜を生成する親油性光増感剤；および
該1つ以上の膜結合分析物の各々に特異的な少なくとも1つの結合性化合物が存在し、各々の結合性化合物が1つ以上の分子タグを有し、各々の分子タグが開裂可能な結合により結合され、各々の結合性化合物の分子タグが1つ以上の物理的特性および／または光学的特性により他の全ての結合性化合物の分子タグと区別ができるような、1つ以上の結合性化合物、
を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

（関連出願および特許に対するクロス・リファレンス）

本出願は、2002年3月5日出願の米国仮出願第60／361,975号および2003年1月17日出願の米国仮出願第60／440,838号から優先権を主張し、これらの出願は、それら全体が、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

（発明の分野）

本発明は、脂質膜に埋め込まれた、または脂質膜と結合する1つ以上の分析物を検出および／または測定する方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

20

（発明の背景）

レセプターオリゴマー化、エンドサイトーシス、リガンドレセプター結合、膜タンパク質のリン酸化および脱リン酸化、新規合成タンパク質の折りたたみおよび輸送、ウィルス侵襲、免疫反応などを含む多くの重要な生物学的過程は、細胞膜において、または細胞膜に隣接して生じる。このような過程における機能不全は、生物の健康と疾患に対し重大な影響を有し得る（例えば、Bunnら、*Semin. Oncol.*, 29（5補遺14）：38－44（2002）；Baker、*Oncogene*, 17：3261－3270（1998）など）。例えば、癌などの幾つかの疾患において、疾患状態と膜分子異常性との間の相関性が同定されている（例えば、Yarden、*Oncology*, 61：補遺2：1－13（2001）；Ouyangら、*Lancet*, 353：1591－1592（1999）など）。このような所見があるため、疾患状態に関連する膜境界面での細胞過程および分子過程に多くの関心が向けられ、研究がなされた（例えば、Georgeら、*Nature Reviews Drug Discovery*, 1：808－820（2002）；Howardら、*Trends in Pharmaceutical Sciences*, 22：132－140（2001）；Seymour、*Current Drug Targets*, 2：117－133（2001））。しかしながら、このような過程の研究は、多くの分子成分の非常に複雑な相互作用により特徴付けられることが多いことから、難解で努力を要するものであった（例えば、Gutkind、*Science STKE*: 1－13（2000）；Wengら、*Science*, 284：92－96（1999））。このような複雑な現象の完全な理解には系統的攪乱（*perurbation*）後に、「包括的な」測定がなされるシステムアプローチが必要であると示唆されてきた（例えば、Idekerら、*Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2：343－372（2001））。このアプローチは、発現遺伝子の全てまたは大きなセットの慣用的測定が、マイクロアレイ技術の使用により可能である単純生物における遺伝子発現のような幾つかの現象に対して実行可能になった（例えば、*Nature Genetics Supplement*, 32：465－552（2002年12月））。しかしながら、数個から数十個のタンパク質の相互作用を伴うシグナル伝達経路および他の膜媒介過程などの他の現象に関しては、包括的またはシステム全体にわたる測定をするために利用できる、匹敵する技術はない。

【0004】

50

上記の点に鑑みて、単独アッセイ反応における細胞表面レセプターなどの複数の膜結合分析物の存在または不在または量を測定するために、利便性がありコスト効率のよい技術が利用できれば、このような測定がますます重要になる、ライフサイエンス研究、医療研究と診断、薬剤発見、動植物科学などを含む多くの分野における技術が前進する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

(発明の概要)

本発明は、サンプル中に1つ以上の膜結合分析物の存在、不在、および／または量を決定するための方法および組成物に関する。本発明によれば、放出可能な分子タグにより誘導体化された結合性化合物は、選択された膜結合分析物に特異的に結合し、その後、分子タグは、開裂部分、または膜結合分析物と同じ膜内に固定される増感剤の活性の際に放出される。次いで放出された分子タグは、それらの明瞭な分離特性と検出特性により同定される。

【0006】

一局面において、本発明は、可溶性タンパク質、ペプチド、または薬剤候補分子などの他の有機分子などの分子のレセプター特異的結合を測定する方法を含む。一実施形態において、このようなレセプター特異的分子は、細胞表面レセプターに結合し、開裂部分または膜表面に固定化されている増感剤の活性化後に放出される放出可能分子タグにより誘導体化される。他の実施形態において、非誘導体化レセプター特異的分子は、細胞表面レセプターに結合後、細胞表面レセプターと複合体を形成する非誘導体化レセプター特異的分子に特異的に結合する1つ以上の結合性化合物が添加される。前記結合性化合物は、開裂部分、または膜表面に固定化されている増感剤の活性の際に放出される放出可能分子タグにより誘導体化される。

【0007】

他の局面において、本発明は、本発明の方法を実施するためのキットを含み、このようなキットは、増感剤処理膜を生成するための親油性増感剤と、各々に1つ以上の分子タグが結合した1つ以上の結合性化合物を含む。このようなキットは、分子タグと結合性化合物との間の開裂可能な結合を開裂させるために適切な緩衝液と洗浄溶液、ならびに分離した分子タグの定量測定を補助する分離標品をさらに含むことができる。

【0008】

本発明は、限定はしないが、(1)バックグラウンドの大きな減少と、感度の著しい増加を提供する、アッセイ混合物から分離される分子タグの検出および／または測定、(2)簡便な分離と検出のために特別に設計された分子タグの使用、それによる利便性のある多重特性の提供、を含む現在の技術を超えた幾つかの利点を有する膜結合分析物を検出または測定する方法を提供する。

【0009】

(定義)

「抗体」とは、別の分子の特定の空間的かつ極性的な機構に特異的に結合し、それによって、これらに対して相補的であると定義される免疫グロブリンを意味する。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得、宿主の免疫化および血清(ポリクローナル)の採取など当該分野で周知の技術により、または連続ハイブリッド細胞系を調製し、分泌タンパク質(モノクローナル)を採取することにより、またはヌクレオチド配列もしくは天然抗体の特異的結合に必要なアミノ酸配列を少なくともコードするその変異形をクローニングおよび発現することにより、調製できる。抗体は、完全免疫グロブリンまたはそのフラグメントを含み得、免疫グロブリンとしては、IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3、IgMなどの種々のクラスおよびアイソ型が挙げられる。それらのフラグメントとしては、Fab、FvおよびF(ab')₂、Fab'などが挙げられる。さらに、免疫グロブリンまたはそれらのフラグメントの凝集体、ポリマーおよび結合体が、特定のポリペプチドへの結合アフィニティが維持される限り適

切に使用できる。

【0010】

「抗体結合組成物」とは、1つ以上の抗体を含んでなり、抗体からその結合特異性を誘導する、分子または分子の複合体を意味する。抗体結合組成物としては、限定はしないが、第1の抗体が標的分子に特異的に結合し、第2の抗体が、第1の定常領域に特異的に結合する抗体ペア；分子タグまたは光増感剤などの部分を用いて誘導体化された標的分子およびストレプトアビジンに特異的に結合するビオチン化抗体；標的分子に特異的であり、そしてデキストランなどのポリマー（これが、次に分子タグまたは光増感剤などの部分を用いて誘導体化される）に結合体化した抗体；標的分子に特異的であり、そしてビーズ、またはマイクロビーズ、または他の固相支持体（これらが、次に分子タグまたは光増感剤、あるいは後者を含有するポリマーなどの部分により誘導体化される）に結合体化した抗体が挙げられる。

10

【0011】

「結合化合物」とは、膜会合分析物に特異的に結合できる分子タグが、直接的または間接的に結合できる任意の分子を意味する。結合化合物としては、限定はしないが、抗体、抗体結合組成物、ペプチド、タンパク質、特に分泌タンパク質およびオーファン分泌タンパク質、核酸、および1000ダルトンまでの分子量を有し、かつ水素、炭素、酸素、窒素、硫黄およびリンよりなる群から選択される原子よりなる有機分子が挙げられる。

【0012】

分離カラムに関して「キャピラリーサイズ」とは、分離カラムの直径または最も大きな寸法が、約25～500ミクロンの間であり、分離媒体の至る所で効率的な熱消散を可能にし、結果として媒体内に低熱対流を有する、プレートまたはマイクロ流体学装置中のキャピラリーチューブまたはチャンネルを意味する。

20

【0013】

本明細書中に用いられる「クロマトグラフィー」または「クロマトグラフィー分離」とは、化合物の混合物（例えば、分子タグ）を含有する移動相（通常は液体）の流動が、移動相と固定相（通常は固体）との間の差示的分配によって、1つ以上の物理的性質または化学的性質に基づいてこのような化合物の分離を促進する分析法を意味し、または称す。分子タグのような分析物のクロマトグラフィー分離の基礎を形成する1つ以上の物理的特性としては、限定はしないが、分子量、形状、溶解度、 pK_a 、疎水性、電荷、極性などが挙げられる。一局面において、本明細書中に用いられる「高圧（または性能）液体クロマトグラフィー」（「HPLC」）は、(i) 300mmまでの長さおよび5mmまでの内径を有する剛性円筒形分離カラムを使用し、(ii) 分離カラム内に詰められた5 μ mまでの同一直径を有する剛性球形粒子（例えば、シリカ、アルミナなど）を含んでなる固相を有し、(iii) 35℃～80℃までの範囲の温度、ならびに150バールまでのカラム圧で行われ、そして(iv) 1 μ L/分～4mL/分の範囲の流速を使用する、液相クロマトグラフィー分離をいう。好ましくは、HPLCに使用される固相粒子は、(i) 平均粒径について狭いサイズ分布を有し、実質的に全ての粒径が平均の10%以内であり、(ii) 70～300オングストロームの範囲の同じポアサイズ有すること、(iii) 50～250m²/gの範囲の表面積を有すること、そして(iv) 1nm²当たり1～5の範囲の結合相密度（すなわち、1単位面積あたりの保持リガンド数）を有すること、において、さらに特徴付けられる。分子タグを分離するための例示的逆相クロマトグラフィーの媒体としては、C₈～C₁₈を含む群から選択されるフェニル基、シアノ基または脂肪族基などのような、それらの表面保持リガンドに結合している、粒子（例えば、シリカまたはアルミナ）が挙げられる。本発明に関連して、クロマトグラフィーとは、「キャピラリー通電クロマトグラフィー」（「CEC」）および関連する技術を含む。CECは、流体が、例えば、30～100 μ mの範囲の内径を有するキャピラリーサイズカラムを通して電気浸透流動により駆動される、液相クロマトグラフィー技術である。CECは、Svec、Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 76:1-47 (2002)；Vanhoenackerら、Electrophoresis、22: 50

30

40

50

4064-4103(2001)などの引用文献に開示されている。C E Cカラムは、従来の逆相H P L Cに使用されるものと同じ固相材料を使用してもよく、またさらに、いわゆる「モノリシック」の非特定のパッキングを使用してもよい。C E Cの幾つかの形態において、圧力ならびに電気浸透は、カラムを通して分析物含有溶媒を駆動する。

【0014】

本明細書中に用いられる用語の「キット」とは、物質を送達する任意の送達システムをいう。反応アッセイの文脈において、このような送達システムは、貯蔵、輸送、または反応試薬（例えば、適切な容器内のプローブ、酵素など）、および／または支持材料（例えば、緩衝液、アッセイを実施するための取り扱い説明書など）の1つの位置から他の位置への送達を可能にするシステムを含む。例えば、キットは、関連する反応試薬および／または支持材料を含有する1つ以上の封入物（例えば、ボックス）を含む。このような内容物は、意図されたレシピエントと一緒にまたは別々に送達してもよい。例えば、第1の容器には、アッセイに使用の酵素を含むことができ、一方、第2の容器はプローブを含有する。

10

【0015】

用語の「リガンド」はまた、リガンドレセプター相互作用により所与のレセプターに結合する、分泌タンパク質またはそのタンパク質をいうために本明細書中に使用される。

【0016】

「膜会合分析物」とは、膜（特に哺乳動物細胞または組織の細胞表面膜のような生物学的膜）に直接的または間接的に結合している物質、化合物、分子または成分、あるいは前述のいずれかの部分を意味する。例えば、膜会合分析物が親油性部分を有する場合、または膜に固定できる親油性部分を有する別の分子に結合される場合、前記結合は直接的であり得る。例えば、膜会合分析物が細胞表面レセプターに結合し、そしてこれと安定な複合体を形成する溶解性リガンドである場合、前記結合はまた間接的であり得る。膜会合分析物は、限定はしないが、ペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、有機分子、ハプテン、エピトープ、生物学的細胞の部分、タンパク質の翻訳後修飾、レセプター、レセプターのような膜成分に結合した複合糖、ビタミン、ホルモン、サイトカインなどのような、膜と安定な複合体を形成する溶解性化合物などであり得る。単一の分子実体（例えば、同じタンパク質上の異なるリン酸化部位）と会合する1つより多い分析物が存在し得る。

20

30

【0017】

用語の「オーファン分泌タンパク質」とは、(i)タンパク質が結合する細胞型、(i i)タンパク質が結合するレセプター、および(i i i)そのレセプターに対するタンパク質の結合により生じた作用、のうちの1つ以上として特徴付けられていない、分泌タンパク質（またはリガンド）を意味する。例としては、脾細胞の産生および／または増殖を刺激できるものを含むサイトカインおよびリンホカイン、リンパ節細胞または胸腺細胞、免疫刺激活性または免疫抑制活性を示すタンパク質、造血、組織生長、細胞化学走性事象またはケモキネシス事象を調節するタンパク質（例えば、細胞接着分子）、細胞リクルートメントリガンド、抗炎症活性および抗腫瘍活性を有するタンパク質が挙げられる。

【0018】

40

「ポリペプチド」とは、1つのアミノ酸のカルボキシ基と他のアミノ酸のアミノ基との間の水の脱離によるアミド結合により一緒に化学結合されたアミノ酸残基からなる化合物のクラスをいう。ポリペプチドは、多数のこのような残基を含有し得る、アミノ酸残基のポリマーである。ペプチドは、一般にそれらがより少ないアミノ酸数からなることを除いて、ポリペプチドと類似している。ペプチドは、時にはオリゴペプチドと称される。ポリペプチドとペプチドとの間に明確な区別がない。本開示と特許請求の範囲とにおいては便宜上、用語の「ポリペプチド」は、一般にペプチドとポリペプチドとを称するために使用される。アミノ酸残基は、天然または合成であり得る。

【0019】

「タンパク質」とは、規定された三次元構造に折りたたまれた、生物学的細胞により通

50

常合成されるポリペプチドをいう。タンパク質は、一般に、約 5,000～約 5,000,000 以上の分子量、より一般的には約 5,000～約 1,000,000 の分子量であり、アセチル化、アシル化、ADP リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋形成、シスチン形成、ピログルタミン酸エステル形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPI アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリスチル化、酸化、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、およびユビキチン化などの翻訳後の修飾を挙げることができる（例えば、Wold, F., 「Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects」、10
「Post-translational Covalent Modification of Proteins」、B. C. Johnson 編、Academic Press, New York, 1983, pp. 1-12）。タンパク質としては、例証目的で限定しないが、サイトカインまたはインターロイキン、酵素（例えば、キナーゼ、プロテアーゼ、ガラクトシダーゼなど）、プロタミン、ヒストン、アルブミン、免疫グロブリン、硬タンパク質、リンタンパク質、ムコタンパク質、色素タンパク質、リポタンパク質、核タンパク質、糖タンパク質、T 細胞レセプター、プロテオグリカン、非分類タンパク質（例えば、ソマトトロピン、プロラクチン、インスリン、ペプシン、ヒト血漿中に見られるタンパク質、血液凝固因子、血液型因子、タンパク質ホルモン、癌抗原、組織特異的抗原、ペプチドホルモン、栄養マーカ、組織特異的抗原、および合成ペプチドが挙げられる。20

【0020】

本明細書および特許請求の範囲における用語の「サンプル」は、広い意味で用いられる。一方では、これは、標本または培養物（例えば、微生物学的培養物）を含むことを意味する。他方では、これは、生物学的サンプルおよび環境サンプルの双方を含むことを意味する。サンプルは、合成起源の標本を含んでよい。生物学的サンプルは、ヒトを含む動物の、流体、固体（例えば、大便）または組織、ならびに液体食品および固形食品、飼料製品、および成分（例えば、乳製品、野菜、肉および肉副産物）、および廃棄物であり得る。生物学的サンプルとしては、限定はしないが、培養物、血液、唾液、脳脊髄液、胸膜液、乳汁、リンパ液、痰、精液、針吸引液などを含む、患者から採取された材料を挙げ得る。生物学的サンプルは、種々の飼育動物科の全て、ならびに限定はしないが、有蹄動物、クマ、魚類、げっ歯類などを含む、野生または自然の動物から得ることができる。環境サンプルとしては、表面物質、土壌、水および産業サンプル、ならびに食品および乳製品加工用の器具、器械、装置、用具、使い捨て用品および非使い捨て用品から得られる環境材料が挙げられる。これらの例は、本発明に適用できるサンプル型を限定するものとして解釈すべきではない。30

【0021】

分子タグの分離に関する「分離プロフィール」とは、アッセイにおいて生じた各型の分子タグ数の読み出しまたは測定値を提供するシグナル強度データ対、保持時間、質量などのような分子タグに関連するパラメータのチャート、グラフ、曲線、棒グラフ、または他の表現を意味する。分離プロフィールは、電気泳動図、クロマトグラム、電気クロマトグラム、質量スペクトログラム、または使用される分離技術に依存するデータのグラフ表現であってもよい。分離プロフィールに関する「ピーク」または「バンド」または「ゾーン」とは、分離された化合物が集中される領域を意味する。例えば、異なる分子タグが、明確な発光スペクトルを有する異なる蛍光標識を有し、データが採取され、多重波長で記録される場合、単一アッセイに関して多重分離プロフィールが存在し得る。一局面において、放出分子タグは、電気泳動の移動差により分離され、異なる分子タグが電気泳動図上の明瞭なピークに相当する電気泳動図を形成する。電気泳動図における隣接したピークの明瞭さ、または重なりやすきの基準が、「電気泳動分解能」であり、これは、ピークの 2 つの標準偏 40 50

差のうちの大きいものの4倍で割られた隣接ピーク最大値間の距離としてとることができる。好ましくは、隣接ピークは、少なくとも1.0、より好ましくは、少なくとも1.5、最も好ましくは、少なくとも2.0の分解能を有している。所与の分離および検出システムにおいて、望ましい分解能は、複数の分子タグを選択することにより得ることができ、このメンバーは少なくともピーク分解量が異なる電気泳動移動性を有し、このような量は、シグナル検出システム、蛍光部分の性質、タグの拡散係数、篩い分けマトリックスの存在または不在、電気泳動装置の性質、例えば、チャンネルの存在または不在、分離チャンネルの長さなど、当業者に周知の幾つかの因子に依存する。

【0022】

標的分析物に関する化合物、またはプローブの結合のような1つの分子と他の分子との結合に関して「特異的」または「特異性」とは、プローブと標的間の認識、接触、および安定な複合体形成を意味し、プローブと他の分子との認識、接触または複合体形成が実質的により少ないことを伴う。一局面において、第1の分子と第2の分子との結合に関して「特異的」とは、反応またはサンプルにおいて第1の分子が別の分子を認識し、それと複合体を形成する程度に、第1の分子は第2の分子と最大数の複合体を形成することを意味する。一局面において、この最大数は、第1の分子によって形成されるこのような複合体全ての少なくとも50パーセントである。一般に、特異的結合事象に関与する分子は、互いに結合する分子間に特異的認識を引き起こす表面領域または空洞領域を有している。特異的結合の例としては、抗体-抗原相互作用、酵素-基質相互作用、ポリヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチド間の二重または三重複合体形成、レセプター-リガンド相互作用などが挙げられる。特異性または特異的結合に関して本明細書中に用いられる「接触」とは、ファンデルワールス力、水素結合、イオン性および疎水性相互作用などの弱い非共有的化学相互作用が分子相互作用を支配するほど、2つの分子が十分に近接することを意味する。2つ以上の分子に関して本明細書中に用いられる「安定な複合体」とは、このような分子が、例えば、アッセイ条件下で、非凝集状態よりも熱力学的に都合のよい特異的結合により非共役的に結合された凝集体を形成することを意味する。

【0023】

複数の蛍光標識に関して、本明細書中に用いられる用語の「スペクトル的に分解性」とは、標識の蛍光発光バンドが十分に明瞭、すなわち、十分に重なりがなく、それぞれの標識が結合される分子タグが、米国特許第4,230,558号；米国特許第4,811,218号など、またはWhelessら、「Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis」、21-76 (Academic Press, New York, 1985)に記載されているシステムにより例示されるように、例えば、バンド・パス・フィルタおよび光電子増倍管システムなどを使用する標準的光検出システムにより、それぞれの標識により生成された蛍光シグナルに基づいて区別できることを意味する。

【0024】

用語の「分泌タンパク質」または「可溶性タンパク質」とは、(i)細胞内発現し、(ii)細胞から、例えば、典型的に細胞膜を通して小胞体から発現タンパク質を指令するリーダー配列を必要とする細胞外媒体に分泌され、(iii)細胞増殖または細胞刺激、細胞表面事象、または細胞-細胞相互作用事象を含む細胞内事象であり得る何らかの細胞事象または活性をもたらす、または開始するために、レセプター、典型的には細胞表面レセプターに作用するタンパク質を言う。

【0025】

(発明の詳細な説明)

一局面において、本発明は、膜関連分析物と結合化合物との間の特異的結合反応の結果、結合性化合物から分子タグを放出させることによってサンプル中に1つ以上の膜関連分析物の存在、および/または量を決定するための方法および組成物に関する。膜結合増感剤、特に膜結合光増感剤の活性化により、放出分子タグを生成する。

【0026】

本発明の一実施形態を図 1 A および 1 B に例示している。細胞表面膜 (1101) およびレセプター (1102、「R1」、(1104、「R2」) および (1106、「R3」) を有する細胞 (1100) —膜関連分析物—を親油性光増感剤 (1108) とインキュベートし、インタクト細胞 (1110) の一部である光増感剤処理膜 (1109) を形成する (1107)。結合された分子タグ (「mT_k」) を有する結合性化合物 (1112) を、それぞれの標的膜関連分析物へ結合性化合物 (1112) の特異的結合を可能にする条件下で光増感剤処理膜 (1109) と結合させる。次いで反応混合物 (1116) を、ある光の波長と強度により照射し (1118)、一重項酸素を発生させるために膜結合光増感剤を励起し、次に図 1 B に示される結合性化合物から分子タグ (1122) を切断する。次に分子タグ (1122) を、反応混合物 (1120) から分離して (1124)、分離プロファイル (1126) で確認する。 10

【0027】

図 1 C および図 1 D に示される別の実施形態において、細胞 (1100) は、リン酸化細胞内部分 (1103)、レセプター (1132) ならびに細胞内タンパク質 (1130) および (1136) を有するレセプター (1102) を含む種々の細胞外分子および細胞内分子を含有する。細胞 (1100) を溶解後、溶解液 (1138) は、膜部分 (1137) に埋め込まれたレセプター (1102) および (1132) を含む種々の細胞フラグメントを含有して形成される。溶解液 (1138) は、親油性光増感剤 (1108) と組合わせて、膜フラグメント (1144) により例示されるとおり、光増感剤処理膜を形成する。光増感剤処理膜 (1141) を、結合性化合物 (1142) と組合わせて反応混合物 (1146) を形成し、これには、結合性化合物と細胞内膜関連分析物 (1145) との間の複合体ならびに細胞外細胞膜関連分析物 (1147) を含むことができる。反応混合物 (1146) を照射 (1150) 後、光増感剤は一重項酸素を発生し、これは、分子タグの切断性結合を切断し、分子タグ (mT₁、mT₂、・・・mT_N) が反応混合物 (1148) 中に放出される。次に分子タグを反応混合物 (1148) の他の成分から分離し (1152)、電気泳動図などの分離プロファイル (1154) にて確認する。 20

【0028】

図 1 E ~ 1 G に例示される別の実施形態において、ペプチドなどの候補分子の細胞表面レセプターへの結合を測定する方法が提供される。表面膜 (1101) ならびに表面レセプター (1102) および (1202) を有する細胞 (1100) の個体群を、親油性光増感剤 (1108) で処理し、増感剤処理膜 (1109) を有する細胞の個体群 (1210) を形成する。この個体群を合わせ、候補分子 (1212) とインキュベートして (1214)、このような分子が、レセプターに特異的に結合して (1213) および (1215) などの複合体を形成する (1216)。例えば、未結合候補分子を洗浄により除去 (1218) 後、候補分子—レセプター複合体を含有する個体群 (1222) を、分子タグ (図中の「mT₁」、「mT₂」、および「mT₃」として例示される) により誘導される候補分子に特異的な抗体 (1220) などの結合化合物と組合わせる。その結果、(i) 結合性化合物、(i i) 候補分子、および (i i i) レセプターを含む複合体を含有する細胞の個体群 (1226) が形成される (1224)。放出または未結合化合物、結合化合物の除去後、個体群を照射し (1250)、一重項酸素が発生して分子タグ (1230) を放出する (1228) ように細胞表面膜中の光増感剤を活性化する。次いで放出された分子タグを分離し、電気泳動図 (1234) にて確認する (1232)。 30 40

【0029】

図 1 H および 1 I は、標的細胞の外膜領域 20 の部分を示し、一对の膜貫通レセプター 22 を示し、各々は外側結合部分 24 を有する。選択された活性化条件、例えば、光照射下で一重項酸素のような短寿命活性化学種を発生できる表面結合増感剤基 26 を含有させるように、下記のように細胞を修飾する。

【0030】

この実施形態の方法を実施する上で、1 個の細胞または複数の細胞を、30 および「P₁」で示された目的の分泌タンパク質からなる蛋白プローブ 28 と、切断性リンカーを介 50

してタンパク質に結合される分子タグ 3 2（図中に「e T₁」として示される）とで混合する。プローブは、単一分子タグ、または各々が切断性リンカーを介してタンパク質に結合した複数分子タグを有することができる。

【0031】

図 1 I は、蛋白プローブのそのレセプターに対する結合を例示している。タンパク質に結合した比較的小さなサイズの分子タグは、示されるとおり、タンパク質とそのレセプターとの間の結合特性に対してほとんど影響を与えないか、または僅かな影響しか与えないという利点を有している。同時に、対応するタグの電気泳動分離に必要な移動性修飾因子のサイズの変化が比較的小さいことから、大多数の分離性タグ、例えば、50 のタグまでが可能となり、それら全てが、多重化アッセイにおいて標的レセプターに結合するタンパク質に略同じ摂動効果を有する。

10

【0032】

図 1 I から理解できるように、細胞表面レセプターに結合するプローブは、細胞表面の近くにプローブのリンカーを配置し、すなわち、このリンカーは、タンパク質を介して細胞表面に結合される。一旦、この結合が生じたら、細胞およびプローブを含有する反応混合物は、細胞表面に近いこれらプローブリンカーのみを選択的に切断するのに効果的な条件下で反応する。これは、示された実施形態において、反応混合物を照射して、細胞の表面領域に一重項酸素を発生させることによりなされる。一重項酸素は、表面結合プローブを切断できるが、未結合溶液相プローブとは反応しないほど十分に短い寿命を有する。従って、この反応は、結合プローブリンカーを選択的に切断し、分子タグ 3 4 のような分子

20

【0033】

ここには示さないが、このアッセイは典型的に、細胞、例えば、タンパク質への標的レセプターを含まないが、上記の短時間切断種を発生させる増感剤を含ませるように修飾されている非哺乳動物細胞を含有するコントロール反応を含む。コントロールに使用されるプローブは、試験混合物に用いられるものと同じでもよいが；好ましくは、コントロールプローブは、異なる移動性修飾因子または異なる検出可能な標識を含み、試験プローブおよびコントロールプローブの双方の単一分離媒体における検出、すなわち多重分離および検出を可能にする。さらに、「標準的な」分子タグの既知の量を試験アッセイに加えることができ、放出分子タグの移動性およびピーク特性の検定基準を提供する。

30

【0034】

従って、試験混合物およびコントロール混合物からの分子タグは、標的細胞レセプターに結合するプローブから放出された分子タグ 3 4、コントロールプローブのコントロール細胞への非特異的結合によるコントロールアッセイにおいて放出された任意の分子タグ、および分子タグ標品を含む。これら分子タグを含有する混合物を組合わせ、この実施形態において、分子タグは、電気泳動分離により分離される。分離ピークは、例えば、分子タグ中の蛍光標識（R）の蛍光発光検出により検出される。図 1 K は、組合わせタグの代表的な電気泳動図を示す。3 6 における分子タグの基準ピークは、移動性を校正するためのピークを提供する。これから、コントロール分子タグおよび試験分子タグの移動位置を決定または確認できる。同様に、添加された標準分子タグの既知量に関連して標準分子タグ

40

の測定されたピーク高または血中濃度曲線下面積（AUC）が、電気泳動図における測定されたピーク高または AUC から試験分子タグおよびコントロール分子タグの量を算出するために使用できる。あるいは、放出タグを、電気泳動分離なしで検出できる場合、例えば、1 つだけのタグがあり、または試験タグおよびコントロールタグが、異なる蛍光発光特性を有する場合、検出目的のためにはタグを未切断プローブから単に分離することで十分なこともある。

【0035】

図 1 K 中の試験ピークおよびコントロールピークとして確認されたピークから、試験プローブが、標的細胞表面上のレセプターに特異的に結合し、非特異的結合は、放出分子タグの全量のうち比較的少量であることが決定できる。記載されるように前記方法を拡張し

50

て、特異的結合の存在を確認でき、そしてレセプターに対するプローブの結合アフィニティを決定できる。

【0036】

図1Lから1Oは、1個以上の標的細胞または細胞群の表面に含まれているレセプターに、複数のオーファン分泌タンパク質 $P_1 \sim P_n$ の結合をアッセイするための多重化フォーマットで実施された同じアッセイを図示している。図1Lは、各々48、50、52の外側結合部分をそれぞれ有する、42、44、46の3種の異なる細胞表面レセプターを有する細胞部分を示す。この細胞は、実際に数百または数千の異なる表面レセプターを有することができ、また細胞上のレセプター型数は、1細胞当たり2、3百から数千の範囲であり得ることが認められる。

10

【0037】

細胞に、一組の $P_i - (L - E_i)_k$ 形態のプローブを加えるが、式中、 P_i は、アッセイされる複数の異なるオーファン分泌タンパク質のうちの1つを表し、 L は、切断性結合であり、 E_i は、分子タグであり、 k は、下記のとおり1に等しいかまたはそれ以上の整数である。図中、3種のこのようなプローブ54、56、58の各々が、それぞれ異なる分泌タンパク質60、64、68からなり、それぞれ独自の分子タグ62、66、70に結合されている切断性結合 L を介して結合している。

【0038】

図1Mは、3種のプローブ54、58、58の、標的細胞の上のそれぞれのレセプター42、44、46への結合を図示している。一旦、この結合が起こると、細胞およびプローブを含有する反応混合物は、例えば、図1Nに示された分子タグ62、66、70のような細胞結合プローブから分子タグを選択的に放出するのに有効な光照射による条件下で反応する。

20

【0039】

上記の分子タグの分離と検出により、これらのピークが、試験混合物（含まれている場合、分子タグ標品と一緒に）中に放出される全ての分子タグ、ならびに上記の別のコントロールアッセイからのコントロール分子タグのピークに相当する電気泳動図（図1O）が得られる。これらの結果から、標的細胞に結合するこれら分子タグの正体—この場合、プローブ54、56および58—および、次に細胞上に担持されている各種レセプターの相対数を反映するプローブ結合の相対量を容易に決定することができる。

30

【0040】

標的膜関連分析物を含有するサンプルは、細胞培養物、動植物組織、微生物などを含む広範な種々の供給源に由来し得る。サンプルは、サンプルがとられる起源に依存し得る従来の技術を用いて本発明のアッセイ用に調製される。サンプル調製技術のガイダンスは、Sambrookら、Molecular Cloning、第2版（Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York、1989）；Innisら編、PCR Protocols（Academic Press、New York、1990）；BergerおよびKimmel、「Guide to Molecular Cloning Techniques」、第152巻、Methods in Enzymology（Academic Press、New York、1987）；Ohlendieck、K.（1996）、Protein Purification Protocols；Methods in Molecular Biology、Humana Press、Inc.、Totowa, NJ、第59巻、293-304；方法小冊子5、「Signal Transduction」（Biosource International、Camarillo, CA、2002）；などの標準的学術論文に見ることができる。哺乳動物組織培養細胞などの起源に関して、標的膜関連分析物のサンプルは、従来の細胞溶解法（例えば、0.14M NaCl、1.5mM $MgCl_2$ 、10mM Tris-Cl（pH8.6）、0.5% Nonidet P-40、ならびにプロテアーゼおよび／または必要な場合にホスファターゼ

40

50

阻害剤)により調製できる。

【0041】

より十分に以下に記載されるとおり、標的膜関連分析物は、放出分子タグの分離および同定により決定される。限定はしないが、電気泳動移動性、分子量、形状、溶解度、pKa、疎水性、電荷、電荷／質量比、極性などを含む、分離される分子間の1つ以上の物理的、化学的または光学的相違に基づいて分子を区別できる広範な種々の分離方法が使用できる。一局面において、大多数の分子タグは、電気泳動移動性および光学的検出特性が異なっており、電気泳動により分離される。別の局面において、大多数の分子タグは、分子量、形状、溶解度、pKa、疎水性、電荷、極性が異なっており、順相または逆相HPLC、イオン交換HPLC、キャピラリー電気クロマトグラフィー、質量分析、ガス相クロマトグラフィーなどの技術により分離される。 10

【0042】

本発明の他の局面は、結合化合物から放出後に使用される分離技術により明瞭なバンドまたはピークに分離できる一連の分子タグを提供する。一組の内の分子タグは、化学的に多様性であり得；しかしながら、便宜上、一連の分子タグは、通常化学的に関連づけられる。例えば、これら全てがペプチドであるか、またはこれらは、同じ基本的ビルディング遮蔽またはモノマーの異なる組合わせからなり得るか、または以下により十分に記載されているように、異なる分離特性を付与する異なる置換基により同じ基本骨格を用いて合成され得る。大多数の分子タグ数は、使用される分離様式、検出用の分子タグに用いられる標識、結合部分の感度、切断性結合が切断される効率などを含む幾つかの因子によって変わり得る。一局面において、大多数の分子タグ数は、2から数十、例えば50の範囲である。他の局面において、大多数のサイズは、2から40、2から20、2から10、3から50、3から20、3から10、4から50、4から10、5から20、または5から10の範囲であり得る。 20

【0043】

(膜)

本発明により測定される分析物を含有する膜は、生物学的細胞から得ることができる。このような膜としては、細胞表面膜、核膜、ミトコンドリア膜、または他の細胞内膜が挙げられる。あるいは、分析物は、ミセルおよびリポソームにより例示されるとおり、人工創製膜と関連付けることができる。本明細書中に記載される方法に用いられる細胞は、原核細胞、真核細胞または原始細胞を含む任意の起源由来であり得るが、親油性である膜を含有することが好ましい。細胞は、生細胞であっても死細胞であってもよい。多細胞生物から得られる場合、細胞は任意の細胞型であり得る。このように、細胞は、培養細胞株または一次単離体であってもよく、細胞は、哺乳動物、両生類、爬虫類、植物、酵母、細菌、スピロヘータまたは原生動物であってもよい。細胞は、例えば、ヒト、ネズミ、ラット、ハムスター、ニワトリ、ウズラ、ヒツジまたはイヌであってもよい。前記細胞は、正常細胞、変異細胞、遺伝子操作細胞、腫瘍細胞、選択された抗体分泌が陽性であるハイブリドーマなどであってもよい。特に関心のある対象は、疾病原因遺伝子を差次的に発現(過剰発現または下方発現)する細胞型から得られる膜である。当業者に明らかなように、CHOなどの種々の細胞株は、例えば、公的または私的な貯蔵所から得ることができる。最大の保管所は、膨大な数の生物および組織サンプル由来の十分に特性化された細胞株の種々のコレクションを提供するAmerican Type Culture Collection (<http://www.atcc.org>)である。 30 40

【0044】

多細胞生物由来の代表的な細胞型としては、好酸性細胞、腺房細胞、松果体細胞、脂肪細胞、エナメル芽細胞、星状細胞、基底(幹)細胞、好塩基球、肝細胞、ニューロン、膨張表面細胞、C細胞、心筋細胞、中央腺房細胞、主細胞、軟骨細胞、クララ細胞、円柱上皮細胞、黄体細胞、脱落膜細胞、樹状突起細胞、内分泌細胞、内皮細胞、腸内分泌細胞、好酸球、赤血球、糸球体外糸球体間質細胞、胎児線維芽細胞、胎児赤血球細胞、線維芽細胞、小胞細胞、神経節細胞、巨大ベッツ(giant Betz)細胞、ゴブレット細胞 50

、毛髪細胞、毛髪内細胞、I型毛髪細胞、肝細胞、内皮細胞、レイディッヒ（L e y d i g）細胞、脂肪細胞、肝実質細胞、リンパ球、リゾチーム分泌細胞、マクロファージ、肥満細胞、巨核球、メラノサイト、糸球体間質細胞、単球、筋上皮細胞、筋様細胞、頸部粘液分泌細胞、神経細胞、好中球、稀突起神経膠細胞、卵母細胞、骨芽細胞、骨軟骨吸収細胞、破骨細胞、骨細胞、柱細胞、溝細胞、甲状腺傍細胞、壁細胞、ペプシノゲン分泌細胞、周皮細胞、松果体細胞、下垂体細胞、血漿細胞、血小板、有足突起、精母細胞、パーキンジ（P u r k i n j e）細胞、ピラミッド形細胞、赤血球細胞、網状赤血球、シュワン（S c h w a n n）細胞、セルトリ（S e r t o l i）細胞、円柱細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、ソマトスタチン細胞、腸内分泌細胞、精子細胞、精原細胞、精子、星状細胞、支持デitel（D e i t e r）細胞、支持ハンセン（H a n s e n）細胞、表面細胞、表面上皮細胞、表面粘液分泌細胞、汗腺細胞、Tリンパ球、被膜黄体細胞、胸腺細胞、胸腺上皮細胞、甲状腺細胞、遷移性上皮細胞、I型肺胞細胞、およびII型肺胞細胞が挙げられる。

10

【0045】

細胞膜はまた、特定の疾患または具体的な病期と関連する細胞型から得ることができる。特定の疾患または病期との関連性は、細胞周期制御、細胞分化、アポトーシス、化学走性、細胞運動性、および細胞骨格再配列のような1つ以上の生物学的プロセスにおける細胞の迷走性挙動により確認できる。疾患細胞はまた、疾患の懸念を引き起こす病原体（例えば、AIDSに関するHIVおよびB型肝炎に関するHBV）の存在により確認できる。特定型の細胞の異常な機能性を伴う疾患の型としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：自己免疫疾患、癌、肥満症、高血圧、糖尿病、神経変性疾患および／または筋肉変性疾患、心疾患、内分泌障害、およびそれらのいずれかの組み合わせ。腫瘍細胞の例示的な型としては、以下が挙げられる：腺腫、癌腫、腺癌、線維腺腫、エナメル上皮腫、星状細胞腫、中皮腫、胆管癌、胆管線維腫、胆管腫、軟骨腫、軟骨肉腫、脊索腫、絨毛癌、頭蓋咽頭腫、のう胞腺癌、のう胞腺腫、未分化胚細胞腫、脳室上皮腫、上皮腫、赤色白血病、線維腺腫、線維腫、線維肉腫、神経節膠腫、神経節細胞腫、神経節上皮腫、神経膠腫、顆粒球白血病、血管腫、血管周囲細胞腫、血管肉腫、冬眠腺腫、組織球腫、角化棘細胞腫、平滑筋腫、平滑筋肉腫、脂肪腫、脂肪肉腫、黄体腫、リンパ管腫、リンパ管肉腫、リンパ腫、髓芽細胞腫、黒色腫、髓膜腫、中皮腫、骨髓脂肪腫、腎芽細胞腫、神経芽細胞腫、神経筋芽腫、歯牙腫、希突起膠腫、骨軟骨腫、骨腫、骨肉腫、乳頭腫、傍神経節腫、褐色細胞腫、松果体腫、下垂体細胞腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、神経鞘腫、セミノーマ、奇形腫、莢膜細胞腫、および胸腺腫。

20

30

【0046】

（分子タグおよび切断性結合）

一実施形態において、分子タグは、例えば、Singhらの国際特許公開WO01/83502およびWO02/95356の切断誘導部分により発生する一重項酸素のような活性種と切断性結合の反応により結合化合物から切断させる。

【0047】

本発明の局面は、各異なる結合化合物が切断性結合を介して結合された1つ以上の分子タグを有する、複数の異なる結合化合物の混合物を提供する工程を包含する。結合化合物、切断性結合および分子タグの性質は、幅広く変わり得る。結合化合物は、抗体結合組成物、抗体、ペプチド、細胞表面レセプターに関するペプチドリガンドまたは非ペプチドリガンド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸のようなオリゴヌクレオチドアナログ、レクチン、または、関心の対象となる膜関連分析物との特異的結合または複合体形成し得る任意の他の分子本体を含み得る。1つの局面において、以下の式により表し得る結合化合物は、分析物特異的結合部分に結合された1つ以上の分子タグを含む。

40

$$B - (L - E)_k$$

式中、Bは、結合部分であり；Lは、切断性結合であり；およびEは分子タグである。非ポリヌクレオチド分析物に関する均一アッセイにおいて、好ましくは、切断性結合Lは、酸化不安定結合であり、より好ましくは、一重項酸素により切断され得る結合である。部

50

分「 $-(L-E)_k$ 」は、単結合化合物が切断性結合を介して結合された複数の分子タグを有し得ることを示している。1つの局面において、 k は、1に等しいかそれ以上の整数であるが、他の実施形態において、 k は、数百以上（例えば100～500）であり得、または、数百以上から数千（例えば、500～5000）であり得る。本発明の組成物内で、通常、複数の種々の型の結合化合物の各々は、異なる分子タグEを有している。切断性結合（例えば、酸化不安定結合および分子タグE）は、従来の化学的方法によりBに結合される。

【0048】

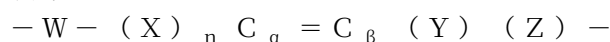
好ましくは、Bは、抗体結合組成物である。このような組成物は、広範な種々の市販の抗体、膜関連分析物に特異的なモノクローナルおよびポリクローナルの両方から容易に形成される。膜関連分析物に特異的な例示的なモノクローナル抗体としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：例えば、以下の引用文献：Epsteinら、米国特許第5,599,681号；Blaydesら、Methods in Molecular Biology、99:177-189（2000）；Nagataら、Genes Cells、6:653-664（2001）に記載されている、リン酸特異的モノクローナル抗体。

【0049】

Lが酸化に不安定である場合、Lは好ましくは、チオエーテルまたはそのセレンアナログであり；あるいは、炭素-炭素二重結合を含有するオレフィンであり、ここで二重結合のオキシ基への切断が分子タグEを放出する。チオエーテル結合の例は、Willnerら、米国特許第5,622,929号（これらは、参考として援用される）に開示されている。オレフィンの例としては、ビニルスルフィド、ビニルエーテル、エナミン、炭素原子が α -メチン（CH、少なくとも1個の水素原子を有する炭素原子）により置換されたイミンが挙げられ、ビニル基は環内にあり、ヘテロ原子は環内にあるか、または環状オレフィン炭素原子で置換されていてもよく、そして、オレフィン炭素原子に結合した少なくとも1個から4個までのヘテロ原子が存在する。生じたジオキセタンは、周囲温度を超えて、通常約75℃以下の温度で加熱することによってか、酸または塩基との反応によってか、または光増感剤の不在または存在下で光活性化によって自発的に分解され得る。このような反応は、以下の例示的な文献に記載される：AdamおよびLiu、J. Amer. Chem. Soc. 94、1206-1209、1972、Andoら、J. C. S. Chem. Comm. 1972、477-8、Andoら、Tetrahedron 29、1507-13、1973、Andoら、J. Amer. Chem. Soc. 96、6766-8、1974、AndoおよびMigita、同書、97、5028-9、1975、WassermanおよびTerao、Tetra. Lett. 21、1735-38、1975、AndoおよびWatanabe、同書、47、4127-30、1975、Zaklikaら、Photochemistry and Photobiology 30、35-44、1979、およびAdamら、Tetra. Lett. 36、7853-4、1995に記載されている。また、米国特許第5,756,726号を参照のこと。

【0050】

ジオキセタンの形成は、1個の炭素原子における分子タグおよびオレフィンの他の炭素原子における結合部分により置換された活性化オレフィンと一重項酸素の反応により得られる。例えば、米国特許第5,807,675号を参照のこと。これらの切断性結合は、以下の式：



によって表され得、

式中：

Wは、結合、ヘテロ原子（例えば、O、S、N、P、M（安定な共有結合を形成する金属を意味する））、またはカルボニル、イミノなどの官能基であってもよく、Xまたは C_{α} に結合でき；

10

20

30

40

50

少なくとも1つのXは、脂肪族、芳香族、脂環式または複素環式であり、ヘテロ原子（例えば、N、O、またはS）を介してC_αに結合でき、他のXは、同一であっても異なってもよく、さらに水素、脂肪族、芳香族、脂環式または複素環式であってもよいが、通常は芳香族または芳香族複素環式であり、一般に、水素以外に約1個から20個、通常は1個から12個、より通常では1個から8個の炭素原子で、1つのXが0個から6個、通常は0個から4個のヘテロ原子であり、他のXは少なくとも1個のヘテロ原子から6個のヘテロ原子、通常は1個から4個のヘテロ原子を有している場合、そのうち1つのXは、Yと一緒にあって、環、通常は結合している炭素原子と共に複素環式環を形成し；

Yは、Xの定義以内に入っており、通常はヘテロ原子を介してC_βに結合しており、示したようにXと一緒にあって複素環式環を形成しており；

10

Zは通常、上記のとおり、C_βに直接またはヘテロ原子を介して結合される、上記のとおり、約4個から12個、通常4個から10個の炭素原子および0個から4個のヘテロ原子の複素環式芳香族を含む。芳香族であり；

nは、分子タグがC_αまたはXに結合しているかどうかによって1または2であり；

YおよびZのうちの1つが、結合部分に結合するための官能基を有するか、または、例えば、結合部分Tに対する結合基として寄与するか、または結合基を含む。ことにより結合部分に結合されている。

【0051】

好ましくは、W、X、YおよびZは、切断の際に分子タグEが、以下に記載のサイズ制限内であるように選択される。

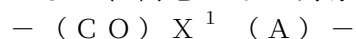
20

【0052】

切断結合の例としては、S（分子タグ）-3-チオールアクリル酸、N（分子タグ）、N-メチル4-アミノ-4-ブテン酸、3-ヒドロキシアクロレイン、N-（4-カルボキシフェニル）-2-（分子タグ）-イミダゾール、オキサゾールおよびチアゾールが挙げられる。

【0053】

また、関心のある対象は、式：



の二価基と9位で置換されたN-アルキルアクリジニル誘導体であり、式中：

30

X¹は、O、S、N、およびSeよりなる群、通常は最初の3つのうちの1つから選択されるヘテロ原子であり；そして

Aは、少なくとも2個の炭素原子、および分子タグで置換された6個以下の炭素原子の鎖であり、好ましくは、Aの他の原子価は水素によって満たされているが、前記鎖は、アルキル基、アリール基、複素環式基などの他の基で置換されていてもよく、Aは一般に10個以下の炭素原子である。

【0054】

また、関心のある対象は、置換イミダゾール、チアゾール、オキサゾールなどにより例示されるジヘテロシクロペンタジエンなどの複素環式化合物であり、前記環は、通常、少なくとも1つの芳香族基で置換されており、ある場合においては、分子タグを放出させるために加水分解が必要となる。

40

【0055】

また、関心のある対象は、テルル（Te）誘導体であり、Teは、Te原子のβ位に水素原子を有するエチレン基に結合されており、前記エチレン基は、好ましくは芳香族環に縮合したオキソ基を有し得る脂環式または複素環式環の一部であり、Teの他の原子価は分子タグに結合されている。前記環は、クマリン、ベンゾイキサジン、テトラリンなどであり得る。

【0056】

幾つかの好ましい切断性結合およびその切断生成物は、図7A～Fに図示されている。

チアゾール切断結合、すなわち図7Aに示される「-CH₂-チアゾール-（CH₂）_n

50

—C(=O)—NH—タンパク質 は、「 $\text{—CH}_2\text{—C(=O)—NH—CHO}$ 」部分と共に分子タグを生じる。好ましくは n は、1から12、より好ましくは1から6の範囲にある。オキサゾール切断結合、すなわち図7Bに示される「 $\text{—CH}_2\text{—オキサゾール—(CH}_2)_n\text{—C(=O)—NH—タンパク質}$ 」は、「 $\text{—CH}_2\text{—C(=O)—O—CHO}$ 」部分と共に分子タグを生じる。オレフィン切断性結合(図7C)は、上記の実施形態の結合化合物「 B—L—M—D 」と蛍光染料であるDとで連結して示されている。このオレフィン切断性結合はまた、他の実施形態に使用できる。図示されたオレフィン結合の切断により、「 R—C(=O)—M—D 」形態の分子タグを生じ、式中、「 R 」は、上記で提供される分子タグEの一般的な説明の中の任意の置換基であり得る。好ましくは、 R は、例えば、ウルマン(Ullman)らの米国特許第6,251,581号;SmithおよびMarch、March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure、第5版(Wiley-Interscience、New York、2001)などにある電子供与基である。より好ましくは、 R は、1～8個の炭素原子およびO、SおよびNよりなる群から選択される0から4個のヘテロ原子を有する電子供与基である。さらに好ましくは、 R は、 —N(Q)_2 、 —OQ 、 $p\text{—[C}_6\text{H}_4\text{N(Q)}_2\text{]}$ 、フラニル、 n -アルキルピロリル、2-インドリルなどであり、式中、 Q はアルキルまたはアリールである。さらに図7Cのオレフィン切断性結合に関して、置換基「 X 」と「 R 」は、切断性結合Lを記載する上記式の置換基「 X 」と「 Y 」に等しい。特に図7Cの X は、好ましくは、モルホリノ、 $\text{—OR}'$ または $\text{—SR}'$ であり、式中、 R' と R' は、1～8個の炭素原子およびO、SおよびNよりなる群から選択される0から4個のヘテロ原子を有する脂肪族、芳香族、脂環式または複素環式である。好ましいチオエーテル切断性結合は、「 $\text{—(CH}_2)_2\text{—S—CH(C}_6\text{H}_5\text{)C(=O)NH—(CH}_2)_n\text{—NH—}$ 」形態を有する図6Dに図示しており、式中、 n は、2から12の範囲、より好ましくは2から6の範囲である。図7Dに示される型のチオエーテル切断性結合は、図7Eおよび7Fに示される前駆体化合物により、結合部分Tおよび分子タグEに結合できる。結合部分Tのアミノ基に結合させるために、末端ヒドロキシルは、従来の化学反応によりNHSEステルに変換される。アミノ基と付加物との反応後、Fmoc保護基を除去して、次いで、最後の反応工程が、ホスホルアミダイト基の代わりにNHSEステルを付加することであること以外、図1、2および4のスキームにより生成された化合物のような分子タグのNHSEステルと反応させる放出アミンを生成する。

【0057】

複数の分子タグの分離がガスクロマトグラフィーまたは質量分析により実施される場合、以下の引用文献に記載されているように、本発明の分子タグEは、電気泳動用タグを含み得る: Zhangら、Bioconjugate Chem.、13:1002-1012(2002); Giese、Anal. Chem.、2:165-168(1983); および米国特許第4,650,750号;米国特許第5,360,819号;米国特許第5,516,931号;米国特許第5,602,273号;など。

【0058】

分子タグEは、好ましくは、活性種、特に一重項酸素に関して安定で、検出基またはレポーター基を含む水溶性有機化合物である。その他の点で、Eはサイズと構造において広く変えることができる。1つの局面において、Eは約50から約2500ダルトン、より好ましくは、約50から約1500ダルトンの範囲の分子量を有している。Eの好ましい構造は、以下により十分に記載される。Eは、電気化学、蛍光、または色素形成シグナルを発生する検出基を含み得る。質量検出を使用する実施形態において、Eは、検出目的のために別の部分を有してはならない。好ましくは、検出基は、蛍光シグナルを発生する。

【0059】

複数の分子タグは、各々が、同一複数の他のメンバーに関してユニークな分離特性および/またはユニークな光学特性を有するように選択される。1つの局面において、クロマトグラフィーまたは電気泳動分離特性は、当該分野において従来の標準的分離条件(例え

ば、電圧、カラム圧、カラム型、移動相、電気泳動分離媒体など)の設定下での保持時間である。他の局面において、光学特性は、発光スペクトル、蛍光寿命、供与波長または波長のバンドにおける蛍光強度などの蛍光特性である。好ましくは、蛍光特性は蛍光強度である。例えば、複数の分子タグの各々が、同一の蛍光発光特性を有し得るが、各々はユニークな保持時間の点で互いに異なる。一方、複数の分子タグのうち2つ以上は、同一の保持時間を有することができるが、複数の全てのメンバーが、分子分離および蛍光測定 of 組合わせにより区別できるように、ユニークな蛍光特性(例えば、スペクトル分解性発光スペクトル)を有している。

【0060】

好ましくは、放出分子タグは、電気泳動分離および検出基の蛍光により検出される。このような実施形態において、実質的に同一の蛍光特性を有する分子タグが異なる電気泳動移動性を有し、その結果、電気泳動図の明瞭なピークが、分離条件下で形成される。好ましくは、本発明の複数の分子タグは、従来のシーピングマトリックスの存在下または不在下のいずれかで、従来のキャピラリー電気泳動装置により分離される。例示的なキャピラリー電気泳動装置としては、Applied Biosystems (Foster City, CA) モデル310、3100および3700; Beckman (Fullerton, CA) モデルP/ACE MDQ; Amersham Biosciences (Sunnyvale, CA) MegaBACE 1000または4000; SpectruMedix 遺伝子分析システム; などが挙げられる。電気泳動移動性は、 $q/M^{2/3}$ に比例し、式中、 q は、分子上の電荷であり、 M は、分子の質量である。望ましくは、最も近接した電気泳動標識間の決定条件下での移動性差が、少なくとも約0.001、通常0.002、より通常では少なくとも約0.01であり、0.02以上であってもよい。好ましくは、このような従来の装置において、複数の分子タグの電気泳動移動性は、少なくとも1パーセント、より好ましくは、1から10パーセントの範囲で少なくとも1パーセンテージ異なる。

【0061】

1つの局面において、分子タグEは、(M, D)であり、Mは移動性修飾部分であり、Dは検出部分である。記号「(M, D)」は、MおよびD部分の順序が、いずれの部分も切断性結合Lに隣接できるようにあり得ることを示すために用いられる。すなわち、「B-L-(M, D)」は、2つの形態: 「B-L-M-D」または「B-L-D-M」のいずれかの結合化合物を示している。

【0062】

検出部分Dは、蛍光標識または染料、色素形成標識または染料、電気化学標識などであり得る。好ましくは、Dは蛍光染料である。本発明で使用するための例示的な蛍光染料としては、水溶性ローダミン染料、フルオレセイン、4,7-ジクロロフルオレセイン、ベンゾキサンテン染料、およびエネルギー移動染料が挙げられ、以下の引用文献に開示されている: Handbook of Molecular Probes and Research Reagents、第8版(Molecular Probes, Eugene, 2002); Leeらの米国特許第6,191,278号; Leeらの米国特許第6,372,907号; Mendenらの米国特許第6,096,723号; Leeらの米国特許第5,945,526号; Leeら、Nucleic Acids Research、25:2816-2822(1997); Hobb, Jr. の米国特許第4,997,928号; Khannaらの米国特許第4,318,846号; Reynoldsの米国特許第3,932,415号; Eckertらの米国特許第2,153,059号; Eckertらの米国特許第2,242,572号; Taingらの国際特許公開WO 02/30944; など。さらに特に例示的な蛍光染料の例としては、5-および6-カルボキシローダミン6G; 5-および6-カルボキシ-X-ローダミン、5-および6-カルボキシテトラメチルローダミン、5-および6-カルボキシフルオレセイン; 5-および6-カルボキシ-4,7-ジクロロフルオレセイン、2',7'-ジメトキシ-5-および6-カルボキシ-4,7-ジクロロフルオレセイン、2',7'-ジメトキシ-

4', 5'-ジクロロ-5-および6-カルボキシフルオレセイン、2', 7'-ジメトキシ-4', 5'-ジクロロ-5-および6-カルボキシ-4, 7-ジクロロフルオレセイン、1', 2', 7', 8'-ジベンゾ-5-および6-カルボキシ-4, 7-ジクロロフルオレセイン、1', 2', 7', 8'-ジベンゾ-4', 5'-ジクロロ-5-および6-カルボキシ-4, 7-ジクロロフルオレセイン、2', 7'-ジクロロ-5-および6-カルボキシ-4, 7-ジクロロフルオレセイン、および2', 4', 5', 7'-テトラクロロ-5-および6-カルボキシ-4, 7-ジクロロフルオレセインが挙げられる。最も好ましくは、Dは、フルオレセインまたはフルオレセイン誘導体である。

【0063】

移動性修飾部分Mのサイズおよび組成は、1本鎖に1つの結合から、約100個の原子、通常約60個以下の原子、より一般的には約30個以下の原子まで変わり得、ここでの原子は炭素、酸素、窒素、リン、ホウ素および硫黄である。一般に、結合以外に、移動性修飾部分は、約0個から約40個、より一般的には約0個から約30個のヘテロ原子を有し、上記に示されたヘテロ原子に加えて、ハロゲンまたは他のヘテロ原子を含み得る。水素以外の全原子数は、一般に約200原子以下、通常は約100原子以下である。移動性修飾部分が存在する媒体のpHに依存して酸基が存在するが、種々のカチオンは酸基と会合され得る。前記酸は、カルボキシル、チオノカルボキシル、チオカルボキシル、ヒドロキسام酸、リン酸、亜リン酸、ホスホン酸、ホスフィン酸、スルホン酸、スルフィン酸、ボロン酸、硝酸、亜硝酸などを含む、有機または無機であってもよい。陽電荷に関する置換基としては、アミノ（アンモニウムを含む）、ホスホニウム、スルホニウム、オキシニウムなどが挙げられ、置換基は、一般に約1～6個の炭素原子の脂肪族であるが、1ヘテロ原子当たりの総炭素数が、通常約12未満、通常約9未満である。側鎖としては、アミン、アンモニウム塩、フェノール性基を含む。ヒドロキシル基、カルボキシル基、エステル、アミド、リン酸、複素環が挙げられる。Mは、同じまたは異なる化学特性の異なるモノマー（例えば、ヌクレオチドおよびアミノ酸）を有するホモオリゴマーであってもまたはヘテロオリゴマーであってもよい。

【0064】

他の局面において、(M, D)部分は、組合わせライブラリの生成に用いられる化学的骨格から構築される。例えば、以下の引用文献は、多様な移動性修飾部分を生成するのに有用な骨格化合物を記載している：ペプチド（PCT公開番号WO91/19735、1991年12月26日）、コード化ペプチド（PCT公開WO93/20242、1993年10月14日）、ランダムバイオオリゴマー（random bio-oligomer）（PCT公開WO92/00091、1992年1月9日）、ベンゾジアゼピン（米国特許第5,288,514号）、ヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチドなどのジベルソマー（diversomere）（Hobbs DeWitt, S. ら、Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 90:6909-6913 (1993)）、ビニローガスポリペプチド（Hagihara ら、J. Amer. Chem. Soc. 114:p. 6568 (1992)）、β-D-グルコース骨格による非ペプチド様ペプチド模倣物（Hirschmann, R. ら、J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218 (1992)）、小化合物ライブラリの類似有機合成（Chen, C. ら、J. Amer. Chem. Soc. 116:2661 (1994)）、オリゴカルバメート（Cho, C. Y. ら、Science 261:1303 (1993)）、ペプチジルホスホネート（Campbell, D. A. ら、J. Org. Chem. 59:658 (1994)）；Cheng ら、米国特許第6,245,937号；Heizmann ら、「Xanthines as a scaffold for molecular diversity」、Mol. Divers. 2:171-174 (1997)；Pavia ら、Bioorg. Med. Chem. 4:659-666 (1996)；Ostresh らの米国特許第5,856,107号；Gordon, E. M. ら、J. Med. Chem. 37:1385 (1994)；など。好ましくは、この局面においてDは、骨格上の置換基であり、Mはその骨格の残りの部分である。

【0065】

さらに他の局面において、(M, D) 部分は、合成の全部または一部用に市販のDNAまたはペプチドシンセサイザーを特に用いて組立てを容易にする、1つ以上の同一または異なる、一般的であるか、または市販の結合剤、架橋剤および標識剤から構築される。この局面において、(M, D) 部分は、通常ホスホジエステルおよびアミド結合により連結されるサブユニットから作製される。代表的な前駆体としては、ジメトキシトリチル (DMT) - 保護ヘキサエチレングリコールホスホルアミダイト、6 - (4 - モノメトキシトリチルアミノ) ヘキシル - (2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル) - ホスホルアミダイト、12 - (4 - モノメトキシトリチルアミノ) ドデシル - (2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル) - ホスホルアミダイト、2 - [2 - (4 - モノメトキシトリチル) アミノエトキシ] エチル - (2 - シアノエチル), N, N - ジイソプロピル) - ホスホルアミダイト、(S - トリチル - 6 - メルカプトヘキシル) - (2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル) - ホスホルアミダイト、5' - フルオレセインホスホルアミダイト、5' - ヘキサクロロフルオレセインホスホルアミダイト、5' - テトラクロロフルオレセインホスホルアミダイト、9 - O - ジメトキシトリチル - トリエチレングリコール、1 - [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、3 (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) プロピル - 1 - [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、5' - O - ジメトキシトリチル - 1', 2' - ジデオキシリボース - 3' - [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、18 - O - ジメトキシトリチルヘキサエチレングリコール、1 - [(2 - シアノエチル), N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、12 - (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) ドデシル - 1 - [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、1, 3 - ビス - [5 - (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) ペンチルアミド] プロピル - 2 - [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、1 - [5 - (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) ペンチルアミド] - 3 - [5 - フルオレノメトキシカルボニルオキシペンチルアミド] - プロピル - 2 - [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、トリス - 2, 2, 2 - [3 - (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) プロピルオキシメチル] エチル - [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、トランス - 4 - (マレイミジルメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボン酸スクシンイミジル (SMCC)、3 - (2 - ピリジリジチオ) プロピオン酸スクシンイミジル (SPDP)、アセチルチオ酢酸スクシンイミジル、テキサスレッド - X - スクシンイミジルエステル、5 - および 6 - カルボキシテトラメチルローダミンスクシンイミジルエステル、ビス - (4 - カルボキシピペリジニル) スルホンローダミンジ (スクシンイミジルエステル)、5 - および 6 - ((N - (5 - アミノペンチル) アミノカルボニル) テトラメチルローダミン、4 - (p - マレイミドフェニル) 酪酸スクシンイミジル (SMPB)、N - γ - マレイミドブチリル - オキシスクシンイミドエステル (GMBSS) ; ヨード酢酸 p - ニトロフェニル (NPFA) ; 4 - (4 - N - マレイミドフェニル) 酪酸ヒドラジド (MPBH) ; などの試薬が挙げられるが、これらに限定されない。上記の試薬は、例えば、Glen Research (Sterling, VA)、Molecular Probes (Eugene, OR)、Pierce Chemical などの試薬製造業者から市販される。従来の合成スキームにおける上記試薬の利用は、当該分野において周知である (例えば、Hermanson, Bioconjugate Techniques (Academic Press, New York, 1996))。特にMは、以下の試薬から構築できる：ジメトキシトリチル (DMT) - 保護ヘキサエチレングリコールホスホルアミダイト、6 - (4 - モノメトキシトリチルアミノ) ヘキシル - (2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル) - ホスホルアミダイト、12 - (4 - モノメトキシトリチルアミノ) ドデシル - (2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル) - ホスホルアミダイト、2 - [2 - (4 - モノメトキシトリチル) アミノエトキシ] エチル - (2 - シアノエチル), N, N - ジイソプロ

ピル) - ホスホルアミダイト、(S - トリチル - 6 - メルカプトヘキシル) - (2 - シア
 ノエチル) - (N, N - ジイソプロピル) - ホスホルアミダイト、9 - O - ジメトキシト
 リチル - トリエチレングリコール、1 - [(2 - シアノエチル) - N, N - ジイソプロピ
 ル)] - ホスホルアミダイト、3 (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) プロピル - 1 -
 [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、5' -
 O - ジメトキシトリチル - 1', 2' - ジデオキシリボース - 3' - [(2 - シアノエチ
 ル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、18 - O - ジメトキシトリチ
 ルヘキサエチレングリコール、1 - [(2 - シアノエチル), N, N - ジイソプロピル)
] - ホスホルアミダイト、12 - (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) ドデシル - 1
 - [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、1, 10
 3 - ビス - [5 - (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) ペンチルアミド] プロピル -
 2 - [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、1
 - [5 - (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) ペンチルアミド] - 3 - [5 - フルオ
 レノメトキシカルボニルオキシペンチルアミド] - プロピル - 2 - [(2 - シアノエチ
 ル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、トリス - 2, 2, 2 - [3 -
 (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) プロピルオキシメチル] エチル - [(2 - シア
 ノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト、トランス - 4 - (マ
 レイミジルメチル) シクロヘキサ - 1 - カルボン酸スクシンイミジル (SMCC)、3
 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオン酸スクシンイミジル (SPDP)、アセチルチオ酢
 酸スクシンイミジル、4 - (p - マレイミドフェニル) 酪酸スクシンイミジル (SMPB 20
)、N - γ - マレイミドブチリル - オキシスクシンイミドエステル (GMB S) ; ヨード
 酢酸 p - ニトロフェニル (NP I A) ; 4 - (4 - N - マレイミドフェニル) 酪酸ヒドラ
 ジド (MPBH) 。

【0066】

M はまた、公知のポリマーサブユニット合成法により調製されたポリマー鎖を含み得る。
 選択された長さのポリエチレンオキシド含有鎖を形成する方法は、周知である (例えば
 、Grossman ら、米国特許第 5, 777, 096 号)。定められたサイズのマルチ
 ーサブユニットポリマー単位の互いの、直接的または結合基を介しての結合を含む。これ
 らの方法は、幅広い種類のポリマー (例えば、ポリエーテル (例えば、ポリエチレンオキ
 シドおよびポリプロピレンオキシド)、ポリエステル (例えば、ポリグリコール酸、ポリ 30
 乳酸)、ポリペプチド、オリゴ糖、ポリウレタン、ポリアミド、ポリスルホンアミド、ポ
 リスルホキシド、ポリホスホン酸エステル、電荷または非電荷結合基により結合された多
 重サブユニットの単位からなるポリマーを含む。、それらの遮蔽コポリマー) に適用可能
 であることが理解され得る。ホモポリマーに加えて、本発明に従って使用されるポリマー
 鎖は、選択された長さのコポリマー (例えば、ポリプロピレンユニットで変更されるポリ
 エチレンオキシドユニットのコポリマー) を含む。他の例としては、ホモポリマーまたは
 混合ポリマーとして、選択された長さのポリペプチドおよびアミノ酸組成物 (すなわち、
 天然由来または人工アミノ酸残基を含有する) 。

【0067】

別の局面において、放出後、分子タグ E は、以下の式： 40

$$A - M - D$$
 によって定義され、
 ここで、：

A は、 $-C(=O)R$ であり、ここで、R は、1 個から 8 個の炭素原子および O、S お
 よび N よりなる群から選択される 0 個から 4 個のヘテロ原子を有する脂肪族、芳香族、脂
 環式または複素環式であり； $-CH_2 - C(=O) - NH - CHO$ ； SO_2H ； $-CH_2$
 $- C(=O)O - CHO$ ； $-C(=O)NH - (CH_2)_n - NH - C(=O)C(=O)$
 $-(C_6H_5)$ であり、ここで、n が 2 から 12 の範囲である；

D は、検出基、好ましくは蛍光染料であり；および

M は、A - M - D の全分子量が約 100 から約 2500 ダルトンの範囲内であるという 50

条件で上記のとおりである。

【0068】

他の局面において、Dはフルオレセインであり、A-M-Dの全分子量が約100から約1500ダルトンの範囲内である。

【0069】

他の局面において、Mは、通常直鎖において互いに分子の結合を提供する官能基を有するより低分子から合成され得る。このような官能基としては、カルボン酸、アミン、およびヒドロキシ基またはチオール基が挙げられる。本発明に従って、電荷付与部分は、コア鎖から懸垂している1つ以上の側鎖基有し得る。前記側鎖基は、標識または電荷付与部分の他の分子への結合を提供する官能性を有している。使用される官能基の反応から生じる通常の官能基は、共役される分子間の共役結合を形成することにより例示される。このような官能基は、ジスルフィド、アミド、チオアミド、ジチオール、エーテル、尿素、チオ尿素、グアニジン、アゾ、チオエーテル、カルボン酸エステル、および例えば、スルホン酸エステル、リン酸エステル、スルホンアミド、チオエステルなどのような硫黄およびリンを含有するエステルおよびアミドである。

10

【0070】

(分子タグの結合部分への結合)

抗体のような結合性化合物への分子タグの共役結合に関して、広範囲にわたるガイダンスが文献において見出され得る(例えば、Hermanson、Bioconjugate Techniques、(Academic Press、New York、1996)など)。本発明の1つの局面において、1つ以上の分子タグが、結合化合物上の通常の反応性基に直接または間接的に結合している。通常の反応性基としては、アミン、チオール、カルボン酸エステル、ヒドロキシル、アルデヒド、ケトンなどが挙げられ、そして市販される架橋剤によって、分子タグと結合され得る(例えば、Hermanson(上記に引用)；Haugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Products、第9版(Molecular Probes、Eugene、OR、2002))。一実施形態において、分子タグのNHSエステルは、結合性化合物上の放出アミンと反応させる。

20

【0071】

図1Pに図示された好ましい実施形態において、結合性化合物は、結合部分としてビオチン化抗体(1400)を含む。分子タグ(1404)は、アビジンまたはストレプトアビジンブリッジ(1402)により結合部位(1400)に結合される。好ましくは、操作において、結合部分(1400)は、最初に膜結合分析物と反応し、その後、アビジンまたはストレプトアビジンが加えられ(1406)、複合体(1408)を形成する。複合体(1408)にビオチン化分子タグが加えられ(1410)、結合性化合物(1412)を形成する。

30

【0072】

一旦、結合性化合物の各々が、異なる分子タグにより別々に誘導されると、複数の結合性化合物を形成するために他の結合性化合物と共にプールされる。通常、各々の異なる種類の結合性化合物は、同じ割合で組成物中に存在する；しかしながら、1つまたはサブセットの個々の結合性化合物が、個々の実施形態またはアッセイへの望ましさ、または要件に依存して、より大きな割合またはより小さな割合で存在するように、割合は、1つの設計選択として変わり得る。このような設計選択に影響を与え得る因子としては、限定はしないが、個々の標的への抗体アフィニティと結合力、標的の相対的な普及率、分子タグなどの検出部分の蛍光特性が挙げられる。

40

【0073】

(活性種の生成用親油性増感剤)

増感剤は、好ましくは酸化により、切断可能結合を切断し得る活性種を生成させるために、誘導または活性化され得る化学物質である。好ましくは、その切断誘導効果が、その発生部位付近にのみ存在するように、前記活性種は短寿命活性を示す化学種である。活性

50

種が本質的に短寿命であって、その生成近くを超えるので、有意なバックグラウンドを引き起こさないか、または活性種を効率的に除去する捕捉剤を使用して、その発生部位からの短距離を超えて切断可能結合と反応できないようにするかのいずれかである。例示的な活性種としては、一重項酸素、過酸化水素、NADH、およびヒドロキシルラジカル、フェノキシラジカル、スーパーオキシドなどが挙げられる。酸化を生じる活性種の例示的なクエンチャーの例としては、ポリエン、カロテノイド、ビタミンE、ビタミンC、アミノ酸-ピロールN-共役体のチロシン、ヒスチジン、およびグルタチオンなどが挙げられる（例えば、Beutnerら、Meth. Enzymol.、319:226-241(2000)）。

【0074】

10

本発明によれば、サンプルの膜は、親油性増感剤と組合わされて、増感剤処理膜を形成する。親油性増感剤は、増感剤を生体膜に安定に固定させることが可能な親油性部分を用いて、直接的にかまたは間接的にのいずれかで、増感剤を誘導することにより形成される。反応性官能基を有する親油性化合物は、増感剤または架橋剤上の相補的官能基と反応され、膜内に固定させるための共役結合の親油性基を有する増感剤を生成し得る。

【0075】

親油性増感剤および切断可能な結合に関する、重要な考慮事項は、結合化合物が膜関連分析物に結合される場合、増感剤によって生成された活性種が拡散し、切断可能な結合と相互作用し得る前にその活性を喪失するほど、互いに離れないことである。従って、切断工程の間、増感剤は好ましくは、結合切断誘導部分の1000nm以内、好ましくは20

20

～100nm以内である。切断誘導部分のこの有効範囲は、本明細書中ではその「有効な近接」と称される。

【0076】

活性種を生成する増感剤としては、酵素（例えば、オキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、キサンテンオキシダーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ、NADH-FMNオキシドレダクターゼ、ガラクトースオキシダーゼ、リン酸グリセリルオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、過酸化水素を産生するコリンオキシダーゼおよびアルコールオキシダーゼ、ヒドロキシルラジカルを産生するワサビペルオキシダーゼ、NADHまたはNADPHを産生する種々のデヒドロゲナーゼ、高局所性pHを生じるアンモニアを産生するウレアーゼなどのオキシダーゼのような酵素））が挙げられる。

30

【0077】

本発明の使用に好ましい増感剤は、光励起に応答して分子状酸素から一重項酸素を生成する光増感剤である。本明細書中に用いられる場合、「光増感剤」とは、光により活性化されると、分子状酸素を一重項酸素に変換する光吸収分子を言う。親油性部分を有する適切な光増感剤は、以下の引用文献に開示されている：Youngら、米国特許第6,375,930号；およびYoungら、米国特許出願第2002/0006378号（これらは参考として援用される）。ビオチンのような親油性基または捕捉部分により誘導され、本発明で使用され得る、さらなる光増感剤は、以下の引用文献に開示されている：Sesslerら、米国特許第5,292,414号；Masuyaら、米国特許第5,344,928号；McCapra、米国特許第5,705,622号；Levyら、第4,883,790号；Meunierら、米国特許第5,141,911号；など（これらは参考として援用されている）。以下の引用文献は、アビジンまたはストレプトアビジンを経て膜を介して、ビオチン化分子を固定させるような、ビオチンと親油性部分との間の共役体の利用を開示している：Plantら、Anal. Biochem.、176:420-426(1989)；Bayerら、Biochim. Biophys. Acta、550:464-473(1979)；Ramirezら、J. Chromatogr. A、971:117-127(2002)；などでこれらは参考として援用されている。

40

【0078】

光増感剤は、色素と芳香族化合物とを含有しており、通常、多重共役二重結合または三

50

重結合を有する、通常、共役結合原子からなる化合物である。化合物は、典型的に約200～約1,100nm、通常は約300～約1,000nm、好ましくは約450～約950nmの波長範囲で、励起波長で約500M⁻¹cm⁻¹以上、好ましくは約5,000M⁻¹cm⁻¹以上、より好ましくは約50,000M⁻¹cm⁻¹以上の最大吸光度での吸光係数の光を吸収する。酸素不在での光吸収後に生成された励起状態の寿命は、通常、少なくとも約100ナノ秒、好ましくは、少なくとも約1ミリ秒である。一般に、この寿命は、本発明に従って、試薬において、結合の切断を可能にするほど十分に長くなければならない。このような試薬は、通常、以下に考察されるような濃度で存在する。通常、光増感剤の励起状態は、基底状態よりも異なるスピン量子数(S)を有しており、基底状態が、通常の場合一重項(S=0)であると、通常は三重項(S=1)である。好ましくは、前記光増感剤は、高項間交差収率を有する。すなわち、光増感剤の光励起は、通常、少なくとも約10%、望ましくは少なくとも約40%、好ましくは少なくとも約80%以上の効率で三重項状態を生じる。

10

【0079】

選択された光増感剤は、比較的光安定性であり、一重項酸素と効率的に反応しないことが好ましい。幾つかの構造的特徴は、大部分の有用な光増感剤に存在する。たいていの光増感剤は、堅固な、しばしば芳香族構造に保持される、少なくとも1つの、しばしば3つ以上の共役二重結合または三重結合を有している。これらは、カルボニル基またはイミン基、または周期律表の3～6列から選択された重原子、特にヨウ素または臭素のような項間交差を促進する少なくとも1つの基を含有していることが多く、または拡大された芳香族構造を有してもよい。

20

【0080】

多様な光源は、一重項酸素を生成する光増感剤を活性化するために利用可能である。多色光源および単色光源の双方は、実施時間中、光源が十分な一重項酸素を生成するのに十分な強度である限り使用され得る。照射の長さは、光増感剤の性質、切断可能な結合の性質、照射源の力、サンプルからのその距離などに依存する。一般に、照射時間は、約1マイクロ秒未満から約10分間もの間、通常は、約1ミリ秒から約60秒の範囲であり得る。照射強度と時間は、光増感剤分子の少なくとも約0.1%、通常は光増感剤分子の少なくとも約30%、好ましくは、光増感剤分子の実質的に全てを励起するのに十分であり得る。例示的な光源としては、例示により限定はしないが、レーザー（例えば、ヘリウムネオンレーザー、アルゴンレーザー、YAGレーザー、He/Cdレーザーおよびルビーレーザーなどのレーザー）；フォトダイオード；水銀、ナトリウムおよびキセノン蒸気ランプ；白熱ランプ（例えば、タングステンおよびタングステン/ハロゲンなど）；フラッシュランプ；などが挙げられる。

30

【0081】

本発明において利用され得る光増感剤の例は、上記の特徴を有し、以下の引用文献に列挙されている：Turro, *Modern Molecular Photochemistry*（上記に引用）；SinghおよびUllman、米国特許第5,536,834号；Liら、米国特許第5,763,602号；Ullmanら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5426-5430（1994）；Strongら、*Ann. New York Acad. Sci.*、745:297-320（1994）；Martinら、*Methods Enzymol.*、186:635-645（1990）；Yarmushら、*Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst.*、10:197-252（1993）；Peaseら、米国特許第5,709,994号；Ullmanら、米国特許第5,340,716号；Ullmanら、米国特許第6,251,581号；McCapra、米国特許第5,516,636号；Wohrle、*Chimia*、45:307-310（1991）；Thetford、欧州特許公報第0484027号；Sesslerら、*SPIE*、1426:318-329（1991）；Madisonら、*Brain Research*、522:90-98（1990）；Poloら、*Inorganica Chimica*

40

50

Acta、192:1-3 (1992); Demasら、J. Macromol. Sci.、A25:1189-1214 (1988); など。一実施形態において、本発明において使用される光増感剤は、ポルフィリンである（例えば、Roelantら、米国特許第6,001,573号（参考として援用される）に記載されているような）。本発明の使用に適切な多くのポルフィリンは、例えば、Frontier Scientific, Inc. (Logan, Utah); Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon); などから市販されている。例示的な光増感剤は、表1bに列挙されている。

（表1b：例示的な光増感剤）

ヒポクレリンA	テトラフェニルポルフィリン	10
ヒポクレリンB	ローダミン色素のハロゲン化誘導体	
ヒペリシン	メタローポルフィリン	
フルオレセイン染料のハロゲン化誘導体	フタロシアニン	
ローズベンガル	ナフタロシアニン	
メロシアニン540	テキサフィリン型マクロ環	
メチレンブルー	ヘマトホルフィリン	
9-チオキサントン	9,10-ジブロモアントラセン	
クロロフィル	ベンゾフェノン	
フェナレオン	クロリン e6	
プロトポルフィリン	ペリレン	20
ベンゾポルフィリンAモナシド	ベンゾポルフィリンBモナシド	

（親油性増感剤による膜処理）

親油性増感剤は、炭化水素鎖からなる疎水部分を内部に方向づけ得、より親水性部分を外部に方向づけ得る場合、リン脂質と同様の方向および様式で脂質膜に組み込まれ得る。従って、通常の細胞膜におけるように、親油性増感剤の炭化水素部分は、脂質環境に組み込まれ得るが、一方、親水性増感剤部分は、膜表面の水性界面で、曝露され得る。

【0082】

インタクトな細胞構造が必要となる場合、親油性増感剤を細胞に取り込むために用いられる方法は、好ましくは、細胞の破壊および膜の統合性を最小限にする。さらに、細胞が、常用の組織化学的手順または細胞化学的手順により、固定および処理され得、ここでこの方法は、好ましくは取り込みに影響を及ぼさない。

【0083】

膜は、BarakおよびWebb (1981) J. Cell Biol. 90: p. 595-604に記載された方法に従って親油性増感剤により標識できる。代表的には、インタクトな細胞などの膜は、好ましくは水性媒体中、本発明の化合物と接触させる。水性媒体は、水、水とDMSO、DMF、DMAなどの有機溶媒またはそれらの混液であってもよく、リン酸、酢酸、トリスなどの緩衝液を含有できる。膜と親油性増感剤とを、1分から約1週間、好ましくは、約1時間から76時間、より好ましくは、約2時間から約48時間、または任意の整数時間の間で接触させる。この製剤をさらに、界面活性剤（例えば、Tween 80）の添加、振とう、攪拌、エレクトロポレーションなどの化学的または機械的処理に供することができる。あるいは、この製剤を、標識が達成されるまで、約30℃から50℃まで、好ましくは約35℃から約40℃まで加熱することができる。標識後、未結合成分を、洗浄、または遠心分離により除去でき、例えば、増感剤標識細胞または膜を単離できる。

【0084】

あるいは、親油性基を有するビオチンなどの捕捉部分は、膜内に固定でき、次いでアビジンまたはストレプトアビジンに結合体化させ、最終的には、図1Qに示されるとおり、アビジンまたはストレプトアビジンを介してビオチン化増感剤を結合させ得る。細胞（1301）を、親油性部分（1304）を有するビオチン（以下、ビオチン-Gと称される）と組合わせて、放出ビオチンを含有する膜を有する細胞集団（1306）を形成する。

この集団にアビジンまたはストレプトアビジン（１３１０）を添加して、細胞表面上にビオチン-アビジンまたはビオチン-ストレプトアビジン複合体（１３１２）を形成する。次にこれらの細胞を、ビオチン化増感剤と結合させて（１３１３）、増感剤処理膜を含んでなる細胞表面上に複合体（１３１２）を形成する。

【００８５】

（放出分子タグの分離）

上記のとおり、分子タグは、１つ以上の物理的、化学的、および／または光学的特性に基づいて、分子タグを識別できる分離法による分離のために設計される。また、上記のとおり、本発明の種々の実施形態で用いることができる分離方法としては、順相または逆相 HPLC、イオン交換 HPLC、キャピラリー電気クロマトグラフィー、質量分析、ガス相クロマトグラフィーなどが挙げられる。好ましくは、選択された分離法は、分子タグの存在または欠如（したがって、対応する分析物）について定性情報ならびに定量情報を提供できる。一実施形態において、分子タグの混合物を含有する溶液（例えば、緩衝液、反応溶媒など）は、特定の種類の分子タグの分離をもたらすように処理される液相分離法が使用される。通常、このような分離は、それぞれの分子タグの濃度増加領域に相当するピーク形成またはバンド形成が識別できるまで、経路に沿ってこのような出発混合物から分子タグが区別できる移動を伴う。このような経路は、流体流、電場、磁場などのよって定めることができる。特定の分離法の選択は、その方法を使用する費用と利便性、その方法の分解能、分子タグの化学的性質、分離される分子タグ数、使用される検出様式型などを含む幾つかの因子に依存する。好ましくは、分子タグは電気泳動により分離され、分離された分子タグは明瞭なピークにより表される電気泳動図を形成する。

【００８６】

（Ａ．電気泳動分離）

電気泳動法は周知であり、特定の複数の分子タグを形成し、分離するための設計を選択する上で当業者にとって豊富なガイダンスがある。以下は、電気泳動に関する代表的な引用文献である：Krylovら、Anal. Chem.、72：p. 111R-128R（2000）；P. D. GrossmanおよびJ. C. Colburn著、Capillary Electrophoresis：Theory and Practice、Academic Press, Inc.、NY（1992）；米国特許第5, 374, 527号；米国特許第5, 624, 800号；米国特許第5, 552, 028号；ABI PRISM 377 DNA Sequencer User's manual、Rev. A、1995年1月、2章（Applied Biosystems、Foster City、CA）；など。一局面において、分子タグは、キャピラリー電気泳動により分離される。当業者の範囲内の設計選択としては、限定はしないが、幾つかの市販のモデルからの器具の選択、分離媒体型と濃度、pH、所望の分離時間、温度、電圧、キャピラリー型および寸法、検出様式、分離される分子タグ数などを含む操作条件の選択が挙げられる。

【００８７】

本発明の一局面において、電気泳動分離中またはその後、分子タグを、分離化合物の蛍光シグナルと移動時間（または移動距離）を記録することにより、または相対的蛍光チャートおよび分子タグの移動順序を構築する（例えば、電気泳動図として）ことにより検出または同定される。このような検出を実施するために、分子タグは、標準的な手段（例えば、高強度水銀蒸気ランプ、レーザなど）により発光できる。代表的には、分子タグは、He-Neガスレーザまたは固体状態ダイオードレーザにより発生されるレーザ光により発光する。次に蛍光シグナルは、感光検出器（例えば、光電子増倍管、電荷結合デバイスなど）により検出できる。例示的な電気泳動検出システムは、例えば、米国特許第5, 543, 026号；米国特許第5, 274, 240号；米国特許第4, 879, 012号；米国特許第5, 091, 652号；米国特許第6, 142, 162号などに記載されている。他の局面において、分子タグは、例えば、米国特許第6, 045, 676号に記載されているように電気化学的に検出できる。

【0088】

電気泳動分離は、移動性の相違に基づく電場における分子の移動性と分離性に関する。電気泳動分離の種々の形態としては、例を目的として限定はしないが、フリーゾーン電気泳動、ゲル電気泳動、等電点電気泳動、等速電気泳動、キャピラリー電気クロマトグラフィー、およびミセル電気運動キャピラリークロマトグラフィーが挙げられる。キャピラリー電気泳動は、

約1から約200マイクロメートル、通常は約10から約100マイクロメートルの断面寸法の管またはチャンネル内で実施される、好ましくは、電気運動流動（電気泳動、二電気泳動および／または電気浸透流動を含む）による電気分離に関する。キャピラリーは、シリコン、石英、ガラスまたはプラスチックからなるウェーハまたはフィルム内の長く独立したキャピラリー管またはチャンネルであってもよい。

10

【0089】

キャピラリー電気分離において、分子タグを含有する反応混合物のアリコートは、増幅および他の反応が実施されるキャピラリー装置の一部であっても、または連結されていてもよい電気分離チャンネル内に前記アリコートを導入することにより電気分離に供される。次に電位を、チャンネル内に含まれた導電性媒体に適用して、組合わせ範囲内の成分移動を実施する。一般に、適用された電位は、当該分野に周知の実践に従う所望の成分の電気分離を達成するのに十分である。当業者は、本発明に使用される試薬の所定のセットに好適な電位および／または切断された標識の性質、反応媒体の性質などを測定できる。媒体および電位に関するものを含む電気分離のためのパラメータは、通常、所望の成分の最大分離を達成するように最適化される。これは、経験的に達成され得、当業者の範囲内に十分に

20

【0090】

検出は、米国特許第5,560,811号（11欄19～30行）；米国特許第4,675,300号；米国特許第4,274,240号；米国特許第5,324,401号（これらの関連開示が参照として本明細書中に援用される）に示された方法を含む、キャピラリー電気泳動カラムの分析に関連したいずれの公知の方法であってもよい。電気泳動の技術の当業者らは、広範囲の電位または電場強度範囲が使用できることを認識しており、例えば、10から1000V/cm、より代表的には、約200から約600V/cmが使用される。市販システムの電圧上限は、約40から約60cmのキャピラリー長さで、約30kVであり、約600V/cmの最大電場を与える。代表的に、キャピラリーはコーティングされて、電気浸透流を低減し、キャピラリーの注入端部は、負の電位に維持される。

30

【0091】

検出を容易にするために、全体の装置は、透過ロスを低くするために、一般に約180から約1500nm、通常は約220から約800nm、より通常には約450から約700nmの範囲の波長光を可能にする光学的に透明であるプラスチック材料から組立て製造できる。好適な材料としては、溶融シリカ、プラスチック、石英、ガラスなどが挙げられる。

【0092】

本発明の一局面において、分子タグは、図16A～16Cに図式的に示されるとおり、マイクロ流体工学デバイス内の電気泳動により分離される。マイクロ流体工学デバイスは、多くの国内および外国の特許証および特許出願公報に記載されている。例えば、米国特許第5,750,015号；米国特許第5,900,130号；米国特許第6,007,690号；およびWO第98/45693号；WO第99/19717号およびWO第99/15876号を参照されたい。便宜上、一般に約5μl以下のアリコートを、電気泳動注入または空気注入により直接統合システム内に、またはシリンジ、キャピラリーなどによりマイクロ流体工学デバイスのサンプル貯蔵器に移す。分離が実施される条件は従来どおりであり、生成物の性質により変わり得る。

40

【0093】

50

図示を目的として、図16A～16Cは、上記の適用、例えば、上記アッセイにおいて生じたプローブとタグのサンプルの充填および電気泳動分離において詳述された型のマイクロ流体工学デバイス内のマイクロチャンネルネットワーク100を示している。手短に言えば、前記ネットワークは、それぞれ上流および下流の貯蔵器104、106の境をなす主要分離チャンネル102を含んでいる。主要チャンネルは、貯蔵器110で境をなすサイドチャンネル108、および貯蔵器114で境をなすサイドチャンネル112によってオフセット軸位で交わっている。2つのサイドチャンネル間のオフセットは、主要チャンネル内のサンプル充填ゾーンを形成している。

【0094】

操作において、アッセイ混合物を、図16Aに示されたサンプル貯蔵器110に入れる。言及されたように、アッセイ混合物には、表面結合切断試剤と共に1個以上の標的細胞、1つ以上の蛋白プローブ、および場合によっては分子タグ標品を含んでいる。標的細胞（複数細胞）に結合する最初のプローブを伴い、次いでプローブ結合細胞におけるプローブリンカーを切断するこのアッセイ反応は、サンプル貯蔵器110で実施されるか、あるいはアッセイ反応は、別の反応容器内でサンプル貯蔵器に添加されたサンプル成分と反応することにより実施できる。

10

【0095】

放出分子タグをサンプル充填ゾーンに充填するために、電場は、図16Bに示された方向で貯蔵器110、114にわたって適用され、負電荷の放出分子タグは、貯蔵器110から充填ゾーン116に引き寄せられ、一方、非荷電または正に荷電したサンプル成分はサンプル貯蔵器内に残る。ここで充填ゾーン内の放出タグは、図16Cに示された方向で貯蔵器104、106を横切って電場を適用して、従来のキャピラリー電気泳動により分離できる。

20

【0096】

生じた電気泳動パターンから、分子タグおよび対応する分析物が確認できる。代表的にこれは、分離チャンネルの下流端付近に蛍光検出器を置くことにより、ならびに分離分子タグの電気泳動図を作成することによりなされ、最初に上記の分離特性（この場合、電気泳動の移動性）、次に、シグナル強度（例えば、ピーク高、またはピーク面積）を各プローブと関連するタグの相対量の測定として測定する。検出可能プローブのレベルを検出し、定量する方法は周知である。1つの好ましい方法において、分子タグは蛍光標識される。標準的蛍光発光源は、分離媒体の下流部分の検出ゾーンに向けられ、ゾーンの蛍光発光が標準的光検出器により測定される。記録されたシグナル高または領域は、サンプル中の生成物および基質濃度の測定を提供する。

30

【0097】

ここで上記検出情報により、プローブセット中の特定のプローブに対して検出された各々の分子タグを帰属し、その相対的基質変換またはリガンド結合の測定値として各検出可能プローブの相対的レベルを比較することは可能である。

【0098】

（B. クロマトグラフィー分離）

本発明の一局面において、複数の分子タグは、限定はしないが、分子量、形状、溶解度、 pK_a 、疎水性、電荷、極性などを含む1つ以上の物理的特性に基づいてクロマトグラフィーによる分離のために設計される。クロマトグラフィー分離法は、カラム型、固相、移動相などのパラメータに基づいて選択され、次いで、分離し得る複数の分子タグを選択して単一操作における明瞭なピークまたはバンドを形成する。検出される分子タグ数（すなわち、複数のサイズ）、アッセイにおいて生成される各分子タグの推定量、多重アッセイに使用されるセットの候補物である分子タグの合成の利用可能性および容易さ、使用される検出様式、およびHPLC器具、カラムおよび溶媒の利用可能性、堅固さ、コストおよび操作の容易さなどを含む幾つかの因子は、いずれのHPLC法が、本発明の使用目的のために選択されるかを決定する。一般に、限定量のサンプルを分析するために好適で、最高の分解能分離を提供するカラムおよび方法が好ましい。このような選択をするための

40

50

ガイドンスは以下の文献に見出すことができる：例えば、Snyderら著、Practical HPLC Method Development、(John Wiley & Sons、New York、1988)；Millner著、「High Resolution chromatography: A Practical Approach」、Oxford University Press、New York (1999)、Chi-San Wu著、「Column Handbook for Size Exclusion Chromatography」、Academic Press、San Diego (1999)、およびOliver著、「HPLC of Macromolecules: A Practical Approach」、Oxford University Press、Oxford, England (1989)。特に、カラム型、固相などの条件が与えられたクロマトグラフィー分離の系統的開発と最適化への方法が利用できる：例えば、Haberら、J. Chromatogr. Sci.、38：p. 386-392 (2000)；Outinenら、Eur. J. Pharm. Sci.、6：p. 197-205 (1998)；Lewisら、J. Chromatogr.、592：p. 183-195およびp. 197-208 (1992)；など。

10

20

30

【0099】

一局面において、分子タグ候補物の最初の選択は、選択されたカラムと固定相とにより代表的に分離される分子の物理化学的性質により左右される。次に、最初の選択は、上記参考文献に記載されている、以下の従来の最適化法、ならびに特定の実施形態の分離目的のためにより好適な候補分子タグに代えることにより経験的に改善される。一局面において、本発明の分離目的としては、(i)複数の分子タグが、60分未満、より好ましくは、40分未満、さらにより好ましくは、10分から40分の間の範囲の分離時間での、識別できるピークまたはバンドへの分離、(ii)任意のペアが、少なくとも1.0、より好ましくは、少なくとも1.25、さらにより好ましくは、少なくとも1.50の分解能を有するようなピークまたはバンドの形成、(iii)分離中150バール未満のカラム圧、(iv)25℃から90℃の範囲、好ましくは、35℃から80℃の範囲の分離温度、および(v)複数の識別可能なピークが5本から30本の範囲内にあり、全てのピークが同じクロマトグラム内にあること、が挙げられる。2本のピークまたはバンドに関して、本明細書に用いられる「分解能」は、2本のピークまたはバンド間の距離を、平均的ベースのピーク幅で割られる（例えば、Snyder（上記参考文献））。

【0100】

クロマトグラフィー法は、クロマトグラフィーの特性に基づいて分子タグを分離するために用いられる。クロマトグラフィーの特性は、例えば、定められた条件下で特定のクロマトグラフィー媒体上の分子タグの保持時間、または分子タグが特定のクロマトグラフィー媒体から溶出される特定の条件であり得る。分子タグのクロマトグラフィーの特性はまた、溶出順序、または溶出パターン、定められた条件下で特定のクロマトグラフィー媒体を用いてクロマトグラフィーにより分離される一群のまたは一セットの分子タグに含まれている分子タグのパターンであり得る。分子タグのクロマトグラフィー特性は、分子タグの物理的特性およびクロマトグラフィーの媒体および移動相との相互作用によって決定される。クロマトグラフィーについての定められた条件としては、特定の移動相溶液、カラム直径および長さを含むカラムの構造、pH、流速、カラム操作の圧と温度、および分子タグの望ましい分離を得るために変えることができる他のパラメータが挙げられる。分子タグ、または分子タグのクロマトグラフィーの特性は、種々のクロマトグラフィー法を用いて検出できる。

40

【0101】

単一実験で検出された一セットの分子タグは一般に、発蛍光団または同位元素、または他のユニークな特性を異にするような質量、質量-電荷比、検出可能タグが異なる化学的関連分子の一群である。したがって、分子タグの化学的性質および一群の分子タグにおける分子タグ間の特定の相違の双方は、サンプル中の分子タグを分離するために好適なクロ

50

マトグラフィー媒体を選択する際に考慮される。

【0102】

液体クロマトグラフィーによる分子タグの分離は、分子タグの電荷、サイズおよび疎水性などの物理的特性、または色素、レクチン、薬物、ペプチドおよびアフィニティマトリックス上の他のリガンドなどの分子に分子タグが結合する能力などの機能特性に基づくことができる。広範な種類のクロマトグラフィーの媒体は、電荷、サイズ、疎水性および分子タグの他のクロマトグラフィーの特性に基づいて分子タグの分離に好適である。特定のクロマトグラフィー媒体の選択は、使用される分子タグの特性に依存する。

【0103】

分離された分子タグは、吸光度、蛍光または電気化学的特性ならびに分子タグに結合された検出基または部分の検出などの分子タグの固有の特性を含む、種々の分析を用いて検出できる。必要としないが、種々の検出基または部分は、クロマトグラフィー分離後、検出を促進するために分子タグに結合できる。

10

【0104】

液体クロマトグラフィーの使用についての検出方法は、周知であり、市販されており、自動化高処理量サンプリングに適応できる。分子タグの分析用に選択された検出可能方法は、分子タグが、検出可能基または部分、使用される検出可能基の型、および使用される場合の分子タグおよび検出可能基の物理化学的特性を含有しているかどうかに依存する。蛍光、導電率、屈折率、蒸発性光散乱に基づく検出方法は、種々の型の分子タグ検出するのに用いることができる。

20

【0105】

種々の光学検出器は、液体クロマトグラフィーにより分離された分子タグを検出するために使用できる。紫外(UV)/可視分光検出器を用いて、核酸、ポリペプチド、ペプチドおよび他の高分子および低分子を検出する方法は周知であり、UV/可視検出が、HPLC分析の検出方法に最も広く用いられている。赤外分光分析器もまた、透明な極性液体である移動相に用いられる場合、高分子および低分子を検出するために用いることができる。

【0106】

可変波長でダイオードアレイの検出器は、2つの市販の型のUV/可視分光検出器に相当する。幾つかの可変性波長UV検出器の有用な特徴は、分光学的走査を実施する能力と、ピークがフローセルを通過する間、種々の波長で読み取る正確な吸光度である。ダイオードアレイ法は、このような吸光度測定比の計算を可能にする2つ以上の波長で吸光度測定を可能にするさらなる利点を提供する。多重波長でのこのような吸光度の比率は、ピークが1つ以上の分子タグに相当するかどうかを決定するのに特に役立つ。

30

【0107】

蛍光検出器はまた、蛍光検出基を含有するもの、固有に蛍光があるものなどの蛍光性分子タグを検出するのに使用できる。典型的に、蛍光感度は比較的高く、分子タグが発蛍光団を含有する場合、他の分光学的検出方法よりも利点を提供する。分子タグは検出性の固有の蛍光を有することができるが、分子タグが適切な蛍光検出基を含有する場合、サンプル中の単独の分子タグを検出することが可能となり得る。

40

【0108】

電気化学的検出方法はまた、HPLCにより分離された分子タグを検出するのに有用である。電気化学的検出は、適切な電極において分子タグの酸化または還元反応から生じる電流の測定に基づいている。電流レベルは、分子タグ濃度に正比例することから、所望の場合、電気化学的検出は、定量的に用いることができる。

【0109】

蒸発性光散乱検出は、多色ビーム光の進路を横切る際に、光子散乱を引き起こす粒子の能力に基づいている。HPLCからの液体流出液を最初に霧状にし、分子タグを含有する生じたエアゾールミストを光ビームにより検出する。サンプル中に存在する分子タグの量に比例するシグナルが生成し、発色団、発蛍光団または電気活性基などの検出性基の存在

50

または欠如から独立している。したがって、分子タグ上の検出基または検出部分の存在は、蒸発性光散乱検出にとって必要ではない。

【0110】

質量分析法はまた、HPLCにより分離された分子タグを検出するのに使用できる。質量分析計は、小さな質量相違のイオンを分離でき、高度の精確さと感度で質量イオンを測定し得る。質量分析法は当該分野において周知であり（Burlingameら、Anal. Chem. 70:647R-716R（1998）；KinterおよびSherman、Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry、Wiley-Interscience、New York（2000）を参照のこと）。

10

【0111】

スペクトルデコンボリューションおよび定量分析などの任意の検出法を用いて得られたデータ解析は、手動またはコンピュータアシストであり得、自動化方法を用いて実施できる。種々のコンピュータプログラムは、ピーク積算、ピーク面積、高さ、および保持時間を決定するために使用できる。このようなコンピュータプログラムは、分子タグの存在を定性的または定量的に決定する利便性のために使用できる。HPLCでの使用のためのコンピュータプログラムおよび対応する検出器は、当業者に周知であり、一般に市販のHPLCおよび検出システムに取り付けられている。

【0112】

種々の市販のシステムは、分子タグの高処理量分析に十分に適している。当業者らは、分子タグの自動化HPLC分析に有用な自動化サンプル調製システムおよび自動注入システムなど適切な装置を決定できる。自動化法は、例えば、大多数のサンプルを処理する場合、または標的分析物を検出するための本発明方法の多重化適用のために、分子タグの高処理量分析に使用できる。本発明の使用に適切な代表的HPLC装置システムは、Agilent 1100シリーズHPLCシステム（Agilent Technologies、Palo Alto, CA）である。

20

【0113】

当業者らは、特に分析が高処理量フォーマットで実施される場合に、分子タグの信頼すべき分析を得るために有用な品質管理の測定を認識している。このような品質管理の測定としては、例えば、直線性の範囲、サンプル回収、サンプルの溶液安定性、および測定精度を決定することにより、外部および内部の参照標品の使用、クロマトグラフィーのピーク形状の分析、装置性能の評価、実験法の検定が挙げられる。

30

【0114】

（C. 質量分析法による分離）

質量分析法は、当該分野において周知である（Burlingameら、Anal. Chem. 70:647R-716R（1998）；KinterおよびSherman、Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry、Wiley-Interscience、New York（2000））。質量分析法に関連する基本的過程は、サンプルから誘導されるガス相イオンの発生とそれらの質量の測定である。

40

【0115】

ガス相イオンの運動は、質量分析計内で発生させた電磁場を用いて精密に制御できる。これら電磁場におけるイオンの運動は、イオンの m/z に比例し、これは、 m/z 、したがってサンプルの質量を測定する基礎を形成する。これら電磁場におけるイオンの運動は、質量分析の高感度の原因となるイオンを含有させ集中させる。 m/z 測定の過程で、イオンは、これらイオンの到達を記録する粒子検出器に高効率で伝送される。各 m/z におけるイオン量は、 x 軸が m/z で、 y 軸が相対量であるグラフ上のピークにより表示される。異なる質量分析計は、異なるレベルの分解能、すなわち、質量が近接した関係にあるイオン間のピークを分解する能力を有する。分解能は、 $R = m/\Delta m$ として定義され、式中、 m は、イオン質量であり、 Δm は、質量スペクトル中の2本のピーク間の質

50

量差である。例えば、1000の分解能を有する質量分析計は、イオンからの100.0の m/z を有するイオンを100.1の m/z で分解できる。

【0116】

質量分析器の幾つかの型が入手できるか、または種々の形状で製造できる。一般に、質量分析計は、以下の主要な構成部分を有している：サンプル注入口、イオン源、質量分析器、検出器、真空システム、および装置制御システムおよびデータシステム。サンプル注入口、イオン源および質量分析器の相違は、一般に装置の型とその能力を定める。例えば、注入口は、キャピラリーカラム液体クロマトグラフィー源であっても、またはマトリックスアシストレーザ脱離に用いられるような直接プローブまたは段階であってもよい。通常のイオン源は、例えば、ナノスプレーおよびミクロスプレーを含む。エレクトロスプレーまたはマトリックスアシストレーザ脱離である。代表的質量分析器としては、四重極質量フィルタ、イオントラップ質量分析器および飛行時間型質量分析器が挙げられる。

10

【0117】

イオン形成過程は、質量スペクトル分析に関する出発点である。幾つかのイオン化法が利用でき、イオン化法の選択は、分析されるサンプルに依る。例えば、ポリペプチドの分析に関して、エレクトロスプレーイオン化（ESI）などの比較的温和なイオン化法が望ましくあり得る。ESIに関して、サンプル含有溶液は、強い電場を創る高電位で細針を通過し、質量分析計に向けられる高電荷小滴の細かいスプレーを生じる。他のイオン化法としては、例えば、高速原子衝撃（FAB）が挙げられ、これは、脱離とイオン化を引き起こす固体サンプルに衝突させるために中性原子の高エネルギービームを用いる。マトリックスアシストレーザ脱離イオン化（MALDI）は、UV吸収化合物マトリックス中で結晶化されたサンプルに衝突させるためにレーザパルスが用いられる方法である。当該分野に公知の他のイオン化法としては、例えば、プラズマおよびグロー放電、プラズマ脱離イオン化、共鳴イオン化、および二次的イオン化が挙げられる。タグレポートは、タグ化プローブの切断前、切断中または切断後にイオンになり得る。

20

【0118】

エレクトロスプレーイオン化（ESI）は、本明細書中に記載された本発明に有用である幾つかの特性を有している。例えば、ESIは、イオン化または気化しにくいポリペプチドのような生体分子に使用できる。さらに、高感度測定の基礎を提供するESIの効率は、非常に高くできる。さらに、ESIは、溶液中のタグレポートを分析するのに都合のよい溶液からの電荷分子を生じる。対照的に、MALDIのようなイオン化法は、イオン化前にサンプルの結晶化を必要とする。

30

【0119】

ESIは、溶液から直接電荷分子を生成できることから、液体クロマトグラフィーシステムからのサンプルに適合する。例えば、質量分析計は、HPLCのような液体クロマトグラフィーシステムに注入口を有することができ、その結果、フラクションは、クロマトグラフィーカラムから質量分析計内に流れる。液体クロマトグラフィーシステムと質量分析計のこのインライン配列は、時にはLC-MSと称される。LC-MSシステムは、例えば、質量分析計分析前に切断タグレポートから未切断または部分的切断タグレポートを分離するために使用できる。さらに、クロマトグラフィーは、質量分析計分析前にタグレポートサンプルから塩類または他の緩衝液成分を除去するために使用できる。例えば、インラインまたはオフラインの逆相HPLCカラムを用いるサンプルの脱塩化は、イオン化過程の効率を増加させるために使用でき、したがって質量分析計による検出感度を改善できる。

40

【0120】

異なるイオン源と一対にできる種々の質量分析器を利用できる。種々の質量分析器は、当業者に公知で、本明細書に記載されているとおり、種々の利点を有している。質量分析計と検出のために選択された方法は、個々のアッセイに依存し、例えば、より鋭敏な質量分析器は、少量のイオンを検出のために発生する場合に使用できる。幾つかの型の質量分

50

析器と質量分析計の方法を以下に記載する。

【0121】

四重極質量分析計は、四重極質量フィルタまたは分析器を利用する。この型の質量分析器は、2本の電気接続ロッドの2セットとして配列された4本のロッドから構成される。rfおよびdc電圧の組合わせが、質量フィルタの開始から終わりまで動くイオンの振動運動を引き起こす場を生じる各ペアのロッドに印加される。これらの場の結果、1対のロッドにおいて高パス質量フィルタおよび他のペアのロッドにおいて低パス質量フィルタの生成がある。高パスおよび低パスフィルタ間の重なりは、双方のフィルタを通過でき、四重極の長さを横切ることのできる定められた m/z を残す。この m/z は選択され、四重極質量フィルタ内で安定に存在するが、他の全ての m/z は、不安定な軌跡を有し、質量フィルタ内に残らない。質量スペクトルは、増加する m/z が、質量フィルタを通過し、検出器に到達するために選択されるように印加場をランピングすることにより生じる。さらに、四重極はまた、rf場のみを印加することにより全ての m/z のイオンを含有し、伝送するように設定できる。これは、イオン伝送が質量フィルタリングなしで必要とされる質量分析計の領域内で、四重極をレンズまたは焦点システムとして機能させる。これは、以下にさらに記載されとおり、タンデム質量分析計において利用される。

【0122】

四重極質量分析器ならびに本明細書中に記載される他の質量分析器は、定められた m/z または質量範囲を分析するためにプログラム化できる。質量分析計のこの特性は、本明細書中に記載される発明に有用である。切断されたタグレポートの質量範囲は、アッセイ前に知られていることから、質量分析計は、より高いまたはより低い質量範囲のイオンを排除しながら、予想される正確な質量範囲のイオンを伝送するようにプログラム化できる。質量範囲を選択する能力は、アッセイにおけるバックグラウンドノイズを減少でき、したがって、シグナル対ノイズ比を増加できる。さらに、定められた質量範囲は、完全切断タグ化プローブ（タグレポート）の質量よりも高い質量と考えられる未切断または部分切断タグ化プローブのいずれの分析をも除外するために使用できる。したがって、上記質量分析計は、固有の分離ステップならびに標的レポートの検出および同定を達成できる。

【0123】

イオントラップ質量分析計は、イオントラップ質量分析器を利用できる。これらの質量分析器において、全 m/z のイオンが最初にトラップされ、質量分析器内で振動するように場が適用される。イオンは、オクタポールレンズシステムのような焦点装置によりイオン源からイオントラップに入る。イオントラッピングは、励起および電極から検出器への放出前にトラッピング領域において行われる。質量分析は、増加 m/z のイオンをトラップから検出器内に放出する様式で振動増幅を増加させる電圧を連続的に印加することにより達成される。四重極質量分析計とは対照的に、全イオンは、選択された m/z でのものを除いて質量分析器の場に保持される。イオントラップに対する利点の1つは、一度にトラップされるイオン数を限定することに注意する限り、非常に高い感度を有することである。イオン数の制御は、イオンがトラップ内に注入される時間を変えることにより達成できる。イオントラップの質量分解能は、イオントラップが低い m/z の限界を有するが、四重極質量フィルタのものに類似している。

【0124】

飛行時間型質量分析は、飛行時間型質量分析器を利用する。 m/z 分析のこの方法に関して、最初にイオンは、電場（高圧により発生する）における加速により運動エネルギーの固定量が得られる。加速後、イオンが、その m/z に逆比例の速度で進む零電界（field-free）領域または「ドリフト」領域に入る。したがって、低い m/z を有するイオンは、高い m/z を有するイオンよりも迅速に進む。零電界領域の長さを進むイオンに必要な時間を測定し、イオンの m/z を算出するために用いる。

【0125】

この型の質量分析における1つの考慮すべきことは、調べられるイオンのセットが、同時に分析器に導入されることである。例えば、この型の質量分析は、十分に定められた短

いパルスでイオンを生じるMALDIのようなイオン化法に十分に適合する。他の考慮すべきことは、運動エネルギー量に変化のあるイオンにより生じる速度幅を制御することである。より長い飛行管、イオン反射器、またはより高い加速電圧の使用は、速度幅の影響を最少にさせ得る。飛行時間型質量分析器は、高レベルの感度および四重極またはイオントラップ質量分析器よりも広範囲の m/z を有する。また、質量分析器の走査が必要でないことから、データは、この型の質量分析器により迅速に獲得できる。

【0126】

(分子タグおよび結合化合物の合成)

ペプチド鎖として電荷供与部分または移動度改変子を形成するためのこの型の合成を実施する化学は、当該分野において周知である。例えば、Marglinら、Ann. Rev. Biochem. (1970) 39: 841-866を参照されたい。一般に、このような合成には、適切な保護基による保護、反応に関与しない官能基のものの遮蔽を含む。次に放出官能基を反応させて所望の結合を形成する。上記ペプチドは、Merrifield合成(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. (1980) 85: 2149-2154およびHoughtenら、Int. J. Pep. Prot. Res. (1980) 16: 311-320にあるように樹脂上に生成できる。次に上記ペプチドは、公知の方法に従って樹脂から外される。

【0127】

ペプチドの合成に利用できる多くの方法の概要は、J. M. Stewartら、「固相ペプチド合成、W. H. Freeman Co, San Francisco (1969) ; および固相ペプチド合成に関して、J. Meienhofer、「Hormonal Proteins and Peptides」(1973)、第2巻、46、Academic Press (New York) ; および溶液合成に関して、E. Schröderら、「The Peptides」、第1巻、Academic Press (New York)、1965に見ることができる。

【0128】

一般に、これらの方法は、1つ以上のアミノ酸、または適切な保護アミノ酸の成長ペプチド鎖への連続付加を含む。通常、適切な保護基は、第1のアミノ酸のアミノ基またはカルボキシル基のいずれかを保護する。保護または誘導されたアミノ酸は、次に不活性な固形支持体に結合、またはアミド結合の形成に適切な条件下で、適切に保護された補足基(アミノまたはカルボキシル)を有する配列に次のアミノ酸を添加することにより、溶液中で利用できる。次に保護基は、新たに添加されたアミノ酸残基から除去され、次いで次のアミノ酸(適切に保護された)が添加などされる。所望のアミノ酸の全てが、適切な配列で結合された後、いずれの残っている保護基(およびいずれの固形支持体)も、連続的または同時に除去されて最終ペプチドを得る。保護基は、利用される個々の保護基に依って公知の方法に従って望みどおり除去される。例えば、保護基は、水素とパラジウム-炭素、液体アンモニア中のナトリウムなどの還元; トリフルオロ酢酸、フッ化水素酸などの加水分解により除去できる。

【0129】

ホスホラミダイトまたは関連化学を使用する結合化合物の合成に関して、多くのガイドが文献から入手できる: Handbook of Molecular Probes and Research Products、第8版(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, 2002) ; BeaucageおよびIyer、Tetrahedron、48: 2223-2311 (1992) ; Molkoらの米国特許第4, 980, 460号; Kosterらの米国特許第4, 725, 677号; Caruthersらの米国特許第4, 415, 732号; 米国特許第4, 458, 066号; および米国特許第4, 973, 679号など。これらの多くの化学により、結合化合物の成分が、自動化DNAシンセサイザー、例えば、Applied Biosystems, Inc. (Foster City, California) のモデル392または394 DNA/RNA Synthesizerなどで簡便に合成できる。

【0130】

移動度改変部分の一部としてヌクレオチドを含む。分子タグ試薬の合成は、標準的ホスホラミダイト化学を用いて固相支持体上の組立てにより簡便かつ効率的に達成できる。生じた移動度改変部分は、上記で考察のとおり、標識および／またはポリペプチド結合部分に結合できる。

【0131】

(分子タグ用の代表的合成アプローチ)

代表的な1つの合成アプローチは、図2に略述されている。市販の6-カルボキシフルオレセインで出発して、フェノール性ヒドロキシル基は、無水物を用いて保護される。ピリジン中無水イソ酪酸が使用されるが、他の変形も等しく適切である。保護基としてエステル官能基を選択する意義を特筆することも重要である。この種は、ホスホラミダイトモノマー合成を通してならびにオリゴヌクレオチドの構築中インタクトであり続ける。これらの基は、合成オリゴヌクレオチドがアンモニアを用いて脱保護されるまで除去されない。保護後、次いで粗製物をカップリング剤としてDCCを用いてN-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS-エステル)の形成によりインサイチュで活性化する。生成物によるDCUをろ取し、アミノアルコールを加える。アミノアルコールの多くは市販されており、その幾つかは、アミノ酸の還元から誘導される。上記アミノアルコールは、「 $H_2N-(CH_2)_n-OH$ 」の形体である場合、 n は2~12、より好ましくは2~6の範囲である。上記アミンだけは、N-ヒドロキシスクシンイミドを置換するほど十分に反応性がある。標準的な抽出処理すると、95%収率の生成物が得られる。この物質は、ホスホラミダイトモノマーを生成するためにホスフィチル化できる。さらなる分子タグの合成に関して、対称的ビス-アミノアルコールリンカーは、アミノアルコールとして使用される(図3)。このように、第2のアミンは、次に多数のカルボン酸誘導体(図4に示された幾つかの可能性のある安息香酸誘導体により例示される)と結合される。

【0132】

あるいは、分子タグは、出発物質として5-アミノフルオレセインを使用する替わりの方法により作製できる(図5)。大容量の溶媒中、5-アミノフルオレセインの大過剰の二酸二塩化物への添加は、ダイマー形成よりもモノアシル化生成物の優勢な形成を可能にする。フェノール性基は、これらの条件下で反応しない。水性処理により、末端酸クロリドをカルボン酸に変換する。この生成物は、6-カルボキシフルオレセインと類似しており、同じシリーズのステップを用いて、保護されたホスホラミダイトモノマーに変換される。多くの市販の二酸二塩化物、および二酸(これらは、 $SOCl_2$ または塩化アセチルを用いて二酸二塩化物に変換できる)がある。多くの市販の二酸二塩化物およびアミノアルコールがある(図6)。これらの合成アプローチは、理想的には組合わせ化学に適合している。

【0133】

分子タグは、ポリペプチド結合部分に結合するために1端に適切な官能基を有して組立てられ得る。種々の官能基が使用できる。このように、カルボキシ、アミノ、ヒドロキシおよびチオールのようなペプチドに、通常存在する官能基は、共有結合を形成するために反応性の官能基の標的となり得る。この分子タグは、結合基の化学およびポリペプチド結合部分の官能基の利用性に従って結合される。例えば、抗体およびポリペプチドに特異的なFab'フラグメントのようなフラグメントに関して、上記に考察されたように、チオール基は、活性オレフィン、例えば、チオエーテル形成のためのマレイミドを用いるために利用できる。リジンを利用する場合、ニトロフェニルエステルまたはペンタフルオロフェニルエステル、またはカルボジイミドおよび半エステルカルボン酸との混合無水物のような水中で反応できる活性エステルを使用できる。結合に関して文献上膨大な化学が存在するので、各々具体的な状況では、結合に関して文献上膨大な先例がある。

【0134】

例示的な合成において、ジオールが使用される。このようなジオールの例としては、2個から3個の炭素原子のアルキレンを有するアルキレンジオール、ポリアルキレンジオー

10

20

30

40

50

ル、アルキレンが2個から3個の炭素原子であり、窒素が、例えば、遮蔽基または1～6個の炭素原子のアルキル基で置換されているアルキレンアミンまたはポリ（アルキレンアミン）ジオールが挙げられ、1つのジオールがジメチルトリチル基のような従来の保護基で遮蔽されている。この基は、質量改変領域として作用し得、アミノ基が電荷改変領域として作用し得る。所望ならば、質量改変子は、ホスホロアミダイト化学により結合されるビルディング遮蔽を用いることにより組立てることができる。このように、電荷改変子は、質量改変子の間で点在させることができる。例えば、1、2、3、nユニットを有する一連のポリエチレンオキシド分子を調製し得る。多くの負電荷を導入するために、小さなポリエチレンオキシド単位を用い得る。質量改変および電荷改変領域は、リン酸単位により結合された複数のポリエチレンオキシド単位を有することにより構築し得る。あるいは、大きなスペーサを使用することにより、より少ないリン酸エステル基が存在し得るので、大きな質量差なしで、質量対電荷比の大きな差を実現し得る。 10

【0135】

使用される化学は、オリゴヌクレオチド合成に用いられた従来の化学であり、そこでは、ヌクレオチド以外のビルディング遮蔽が使用されるが、反応は従来のホスホロアミダイト化学であり、保護基は、従来のジメトキシトリチル基である。もちろん、自動化合成機に適合する他の化学もまた使用できる。しかしながら、工程の複雑性を最少にすることが望ましい。

【0136】

上記のとおり、一実施形態において、中心核は、親水性ポリマーであり、一般に複数部分の結合を可能にする複数官能基との付加ポリマーまたは縮合ポリマーである。本発明の試薬に有用な一クラスのポリマーは、デキストラン、セファロース、ポリリボース、ポリキシロースなどのような多糖ポリマーを含む。例えば、この中心は、複数の分子タグが、本発明と一致する切断様式で結合できるデキストランであってもよい。デキストランのアルデヒド部分のうちの2～3個が残っており、還元的アミノ化によりオリゴヌクレオチド上のアミン基にデキストラン分子を結合させるために用い得る。中心核としてデキストランを用いる他の例において、デキストランは、無水コハク酸によりキャップされ得、生じた物質は、アミド形成によりアミン含有オリゴヌクレオチドに結合され得る。 20

【0137】

すでに示したようにリンカーおよび移動度改変部分の性質に加え、蛍光剤の化学的特性および光学的特性、エネルギー移動複合体の使用、折りたたみなどの移動性に影響を与えるリンカーの化学的性質の変化、溶媒とその溶媒中のイオンとの相互作用などにより、多様性が達成できる。すでに示唆したように、一実施形態において、リンカーはオリゴマーであり、上記リンカーは、支持体上で合成され得るか、あるいは適切な宿主中のクローニングまたは発現により産生できる。好都合なことに、末端基以外に1つのシステイン、またはセリン／トレオニン／チロシン、アスパラギン酸／グルタミン酸、またはリジン／アルギニン／ヒスチジンのみがあるペプチドが製造でき、その結果、差次的に官能化された独特な官能基がある。保護基を使用することによって、末端アミノ酸官能基と側鎖官能基とを区別できる。また、適切な設計により、結合基上の異なる部位に存在する同じ官能基間で優先的な反応を提供し得る。オリゴペプチドの調製のために合成またはクローニング 30 40

【0138】

（本発明の組成物を用いる方法）

一局面において、本発明は、生体源から1つ以上の標的分析物を検出するかまたは測定する方法を提供する。従来の方法論は、解析用のサンプルを調製するために使用される。例えば、タンパク質分析物に関して、サンプル調製のためのガイダンスは、一定範囲の手順を、種々の起源からタンパク質抽出物を調製するために開示している、Scopes, Protein Purification, 2章（Springer-Verlag, New York）に見ることができる。調製方法は、細胞膜の浸透崩壊による緩和な細胞溶解、結合組織の酵素消化に次いで、浸透に基づく溶解、機械的均質化、超音波処理を 50

含む。

【0139】

幾つかの実施形態において、目的の膜結合分析物を含有するサンプルは、上記のとおり、親油性増感剤で処理され、増感剤処理膜を形成する。このような調製後、複数の結合化合物を含有する試薬を加える。結合化合物量は、通常経験的に決められる。このような成分は、通常、水性媒体中、一般に約5から約10の範囲のpHで、約10から約200mMの範囲の濃度の緩衝液と、結合条件で合わされる。これらの条件は、従来どおりであり、リン酸、炭酸、HEPES、MOPS、トリス、ホウ酸などの従来の緩衝液、ならびに塩類、安定化剤、有機溶媒などのような他の従来の添加物を用いることができる。水性媒体は、水単独であっても、または0.01から80容量パーセントまたはそれ以上の共溶媒を含んでもよい。

10

【0140】

試薬は、多くの結合事象を引き起こさせる時間と温度でインキュベートさせる。試薬の組合わせ後のインキュベーション時間は、(i)検出される分析物の性質と予想される濃度、(ii)結合化合物が分析物と複合化する機構、(iii)使用される特定の試薬のアフィニティ、に依存して変わる。普通は、温和な温度、および通常一定の温度が、インキュベーションに使用される。温置温度は普通、約5°から99℃、通常約15°から85℃、より通常では35°から75℃の範囲である。

【0141】

一般に、本発明のアッセイに含まれる種々の試薬の濃度は、分析されるサンプル中の個々の分析物の濃度範囲で変わり、一般に約10nMから約10mMの範囲である。緩衝液は、約10から約100mMの範囲の濃度で通常使用される。各分析物の濃度は、一般に約1pMから約100μMの範囲で、より通常では約100pMから約10μMの範囲である。特定の状態において、濃度は、分析物の性質、結合化合物アフィニティ、分子タグの放出効率、分子タグが検出される感度、およびアッセイで測定される分析物数、ならびに他の考慮事項に依って、より高かったりまたはより低かったりしてもよい。

20

【0142】

いくつかの実施形態において、アッセイ混合物の成分が、クロマトグラフィー分析を妨害する場合、分子タグは、クロマトグラフィー分析前にアッセイ混合物、またはアッセイ混合物のある一定の成分から分離する必要がある場合があり、例えば、非放出分子タグとの結合部分は、クロマトグラフィー分析から除外する必要があると得る。分子タグの性質およびアッセイ混合物の成分に依存して、ガードカラムなどを用いることによりこのような結合部位を隔離または吸着または排除し得る。あるいは、混合物中のこのような妨害成分を除去する目的で、結合化合物に結合した捕捉リガンドを有してもよい。

30

【0143】

さらなる適応程度は、分子タグが標識される段階でアッセイに与えることができる。分子タグは、サンプルとの反応が完了後、標識に結合可能な官能基を含有し得る。この実施形態において、検出性標識に結合するための官能基を含む分子タグは、サンプルと組合される。結合反応が行われ、分子タグが放出した後、追加の試薬が、最初の反応生成物と共にサンプル容器中で合わされ、これは、その放出分子タグと反応して検出性標識を付加する。

40

【0144】

定量のため、存在するかまたは導入される標的量に関連するシグナルを提供するコントロールを使用するために選択できる。相対的蛍光シグナルからの絶対量への変換を可能にするコントロールは、分子タグの分離前の各サンプルに既知量の発蛍光団を添加することにより達成される。分子タグシグナル検出を妨害しない任意の発蛍光団を、蛍光シグナルを正規化するために使用できる。このような標品は、好ましくは、サンプル中のいずれの分子タグとも異なる分離特性を有し、同一かまたは異なる発光波長を有し得る。標品用の代表的蛍光分子としては、ROX、FAMならびにフルオレセインおよびそれらの誘導体が挙げられる。

50

【0145】

(オーファン分泌タンパク質の同定)

オーファン分泌タンパク質候補物は、以下の評価基準に基づいて公的ドメインまたは私的セクターの遺伝子配列データベースにおいて同定できる：

(1) 分泌タンパク質の予測に適合する、正電荷 n - 領域を含有するアミノ末端において平均 22 個のアミノ酸の推定シグナルペプチド配列、次いで、疎水性 h - 領域および中性だが極性の c - 領域、および 20 ~ 30 個の疎水性アミノ酸の推定 α - ヘリックス膜貫通ドメイン配列の欠如、次いで近接して、遺伝子のオープン・リーディング・フレームのどこか他に 2、3 個の電荷アミノ酸。

【0146】

10

(2) 生理的条件下で細胞表面から可溶性レセプターの放出を潜在的に導くことができる推定膜貫通ドメインに近い上流領域における保存タンパク質分解性切断部位の存在；

(3) 上記評価基準を有する mRNA のスプライス改変体を生じる遺伝子配列における推定スプライス接合部位の存在。

【0147】

mRNA、cDNA、または遺伝子挿入物を含有するクローニングベクターの形態である推定のオーファン可溶性リガンドの遺伝物質は、インビトロ共役転写および翻訳により、または原核細胞（例えば細菌）細胞系宿主細胞、または真核細胞（例えば酵母、哺乳動物）細胞系宿主細胞において、遺伝子挿入物が、適切なプロモータの制御下で置かれた場合に、インビボ組み換え発現によりポリペプチドに変換できる。分泌タンパク質のインビ

20

【0148】

本発明は、ミクロソームまたは他の小胞体（ER）調製物から RNA 分子を単離することにより、シグナルペプチドを有するタンパク質をコードする遺伝子を単離する方法および試薬を利用し得る。好ましい実施形態において、シグナルペプチドを有するタンパク質は、分泌タンパク質である。このタンパク質はまた、内在性の ER、ゴルジ、形質膜タンパク質、糖タンパク質またはリソソームタンパク質であり得る。他の実施形態において、RNA 分子の集団は、ミクロソームから単離され、シグナルペプチドを有するタンパク質をコードする核酸ライブラリを調製するために用いられる。好ましい方法において、上記

30

【0149】

他の方法において、ミクロソームから単離された RNA 分子または RNA 分子集団およびミクロソームは、異種の、すなわち異なる起源由来物である。例えば、翻訳される RNA 分子集団は、最初に異種のミクロソームと接触でき、ミクロソームと会合する 1 つ以上の RNA 分子を単離できる。一実施形態において、RNA は最初に、インビトロ転写系と共にインキュベートし、次にミクロソームをインビトロ転写反応に添加する。あるいは、RNA を、インビトロ翻訳系とミクロソームとを含有する混合物に添加する。

【0150】

40

RNA は、特定の細胞区画（例えば、核または細胞質）からも抽出できる。このような方法において、核は、それから RNA を精製するために単離されるか、または核は、細胞質 RNA の精製のために処分される。これらおよび他の RNA 抽出プロトコルのさらなる詳細は、例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual、第 2 版、Sambrook、Fritsch および Maniatis 編（Cold Spring Harbor Laboratory Press：1989）に示されている。

【0151】

本発明のこの局面におけるタンパク質プローブは、切断性リンカーを介して特有の分子タグに分泌タンパク質 P_i を結合することにより形成される。

50

【0152】

発現系からの発現タンパク質の抽出または精製を促進するために、規定のアフィニティペプチドタグ（例えば、6xHis、HA、mycなど）をコードする遺伝子配列はまた、オーファンタンパク質遺伝子配列のアミノ末端またはカルボキシ末端に挿入できる。固定化アフィニティ試薬（例えば、固定化ニッケルイオン、抗体）上で捕捉されるが、発現ポリペプチドの分子タグに対する化学結合体は、適切な緩衝液条件下でのNH₂-分子タグ結合体の添加後、一級アミノ基を経て（例えば、リジン上で）生じることができる。上記化学結合体化は、発現タンパク質のレセプター結合活性が保存されるように、低NH₂-分子タグ対タンパク質比に有利である非還元条件下で実施できる。アフィニティ結合と化学結合体化後、ポリペプチド-分子タグ結合体は、固定化アフィニティ結合剤から溶出 10

【0153】

好ましいアプローチにおいて、発現ポリペプチドと分子タグとの部位特異的結合体化が可能であり、反応性側鎖（例えば、リジン上のアミノ基、システイン上のチオール基）を有するアミノ酸に関する遺伝子コドン、アフィニティペプチドタグをコードする遺伝子配列末端に挿入できる。次にアフィニティタグに挿入されたこれらのアミノ酸は、発現ポリペプチドのアフィニティ試薬への結合後、近接効果による発現ポリペプチドの他の部分における反応性基に相対して、分子タグの化学結合体化に好ましい反応性基を提供する。あるいは、部位特異的結合体化は、シグナルペプチドのn-領域内リジンに起こすことができる。分子タグの反応性誘導体（例えば、NH₂、マレイミド）は、近接した並置を達成するためにアフィニティ試薬と共に共固定化できる。または好ましくは、分子タグの反応性アミノ酸に対する結合が固相上の共固定化なしで溶液中で起こすことができるように、分子タグの反応性誘導体を、アフィニティ試薬に直接結合できる。ある一定のオーファン分泌リガンドまたは可溶性リガンドは、短いペプチドである。これらは通常、それ自体により、または生理的相互作用後に他の酵素により、プロポリペプチドのタンパク質分解性切断の際に生成される。このような切断部位の多くは、保存され、特に同じ遺伝子ファミリーのメンバーの公知の切断パターンに基づいて、遺伝子配列から予測できる。非哺乳類動物源から、特異的な細胞表面レセプターに結合後、ヒト細胞に対して生物活性または細胞毒性を示すオーファン分泌リガンド（例えば、海生円錐形巻貝のコノペプチド）は、レセプタースクリーニングの標的物を表し、それらのアミノ酸配列が生物化学的に決定 30

されている。短いオーファンペプチドリガンドは合成的に調製でき、また、単一分子（ペプチド-リンカー切断可能リンカー-分子タグ）として、またはポリマー骨格上の化学的クラスター状態のいずれかで、独特な分子タグが、リンカー（例えば、ポリエチレングリコール）を介してペプチドに結合できる。次に、合成ペプチド-分子タグ結合体は、リガンドレセプター相互作用アッセイに直接使用できる。

【0154】

図11A~11Cは、分子タグ前駆体74（「e-Tag」として示された部分）を、システインアミノ酸で終結したN末端伸長を有するように合成された分泌タンパク質72にカップリングする1つの方法を図示している。タンパク質を、タンパク質中の硫黄基による求核置換の標的である末端Br基を含有して示されたリンカーを有する分子タグ前駆体74と反応させる。上記タンパク質と分子タグ前駆体とを、求核置換反応のための標準的条件下で反応させて、分子タグをタンパク質のN末端システインとカップリングし、図11Bに示されたタンパク質プローブ76を生成する。この反応は、例えば、細胞上清または細胞溶解液の粗製タンパク質調製液中で実施できる。プローブ切断反応において、一重項酸素存在下での硫黄含有リンカーの切断により、放出分子タグ80と、N末端基にSO₂Hを有する改変タンパク質78とを生じる。 40

【0155】

図12A~12Cは、通常の骨格構造82により示されている分子タグを、N末端スルフィドリル基を有する分泌タンパク質84にカップリングする第2の代表的方法を図示している。この反応は、図12Bの86に示されたタンパク質プローブを生成する求核付加 50

反応を含んでいる。この方法で企図される3種の分子タグーリンカー構造は、図12Cの(1)～(3)に示されており、式中、Rは、各構造におけるプローブのタンパク質部分である。この反応は、例えば、細胞上清または細胞溶解液の粗製タンパク質調製液中で実施できる。図12Cに示されるように、プローブ切断反応において、一重項酸素存在下での硫黄含有リンカーの切断により、放出分子タグ88と、N末端基にSO₂Hを有する改変タンパク質90とを生じる。

【0156】

図12A～12Cは、通常の骨格構造82により示されている分子タグを、N末端スルフヒドリル基を有する分泌タンパク質84にカップリングする第2の代表的方法を図示している。この反応は、求核付加反応のために周知の反応条件下で実施される、図12Bの86に示されたタンパク質プローブを生成する求核付加反応を含んでいる。この方法で企図される3種の分子タグーリンカー構造は、図12Cの(1)～(3)に示されており、式中、Rは、各構造におけるプローブのタンパク質部分である。この反応は、例えば、細胞上清または細胞溶解液の粗製タンパク質調製液中で実施できる。図12Dに示されるように、プローブ切断反応において、一重項酸素存在下での硫黄含有リンカーの切断により、放出分子タグ88と、N末端基にSO₂Hを有する改変タンパク質90とを生じる。

10

【0157】

図13A～13Cは、分子タグ92を、N末端スルフヒドリル基のペア（すなわち、1～2個のアミノ酸により分離されるシステインアミノ酸）を有する分泌タンパク質94に結合する第3の例示的方法を図示している。この反応は、図13Bに示される環状結合タンパク質プローブ96を形成する二置換反応を含み、二置換反応に周知の反応条件下で実施される。この反応は、例えば、細胞上清または細胞溶解物の粗製タンパク質調製物中で実施できる。図13Cに見られるように、プローブ切断反応において、一重項酸素存在下で硫黄含有リンカーの切断により、放出分子タグ100およびN末端基にSO₂Hを有する修飾タンパク質102を生じる。

20

【0158】

図14Aおよび14Bは、分子タグ104を、末端Hisタグおよび末端Hisタグ付近（1～2個のアミノ酸残基以内）のLysアミノ酸残基を有する分泌タンパク質106に結合する第4の例示的方法を図示している。分子タグは、図14Aに示される様式でタンパク質と反応するNi配位化合物の一部であり、Nヒドロキシスクシンイミド（NHSS）基（図14Bの化合物（1）および（2））または分子タグ中のアルデヒド基（図14Bの化合物（3）および（4））に隣接したタンパク質の末端近くに中間体のLysアミノ基を配置する。図14Bの化合物（1）および（2）に関して、結合は、配置されたLysアミノ基とのNHSS反応により起こる。化合物（3）および（4）に関して、反応は、再度標準的条件下で還元的アミノ化により起こる。これらの反応は、例えば、細胞上清または細胞溶解物の粗製タンパク質調製物中で実施できる。

30

【0159】

これらの方法は、個々のプローブ、または上記のプローブセットを構築するために使用できる。各々のレセプター特異的結合をアッセイするキット、および1個または複数の細胞または細胞型の表面に担持されたレセプターに複数の細胞分泌タンパク質を含む1セットのプローブは、P_N-(L-E_N)体を有し、式中、P_Nは、目的のN細胞分泌タンパク質の1つであり、Lは、選択的反応条件下で切断可能なリンカーであり、E_Nは、P_Nと会合する分子タグである。

40

【0160】

上記のタンパク質プローブと共に使用される細胞は、単一細胞型（例えば、培養細胞系）、または異なる型の細胞群（例えば、所定の組織または器官から得られた細胞）であり得る。細胞は代表的には、分泌タンパク質と同じ哺乳動物起源（例えば、ヒト分泌タンパク質のアッセイについてのヒト細胞）を有する。細胞（複数細胞）はまた、オーファンタンパク質の疑わしい性質に従って選択できる。特に、リガンドーレセプター結合に対し検出可能な応答を示す細胞を使用することが、オーファン酵素の性質を調査し、または確認

50

するために有用であり得る。

【0161】

例えば、サイトカインとしての活性、他の免疫刺激または阻害タンパク質に関してオーファン分泌タンパク質をアッセイするために、使用される細胞としては、脾細胞、リンパ節細胞または胸腺細胞であり、限定はしないが、以下に記載されたものを含む：Polyclonal T cell stimulation、Kruisbeek, A. M. および Shevach, E. M. In Current Protocols in Immunology J. E. e. a. Coligan 編、第1巻、p. 3. 12. 1-3. 12. 14、John Wiley and Sons、Tronto、1994年；および Measurement of mouse and human Interferon gamma、Schreiber, R. D.、In Current Protocols in Immunology J. E. e. a. Coligan 編、第1巻、p. 681-688、John Wiley and Sons、Tronto、1994年。胸腺細胞または脾細胞の細胞毒性に適切なアッセイとしては、限定はしないが、以下に記載されたものが挙げられる：Current Protocols in Immunology、J. E. Coligan、A. M. Kruisbeek、D. H. Margulies、E. M. Shevach、W. Strober 編、Pub. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience (第3章、In vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3. 1-3. 19；第7章、Immunologic study in Humans)；Herrmannら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78：p. 2488-2492、1981年；Herrmannら、J. Immunol. 128：p. 1968-1974、1982年；Handaら、J. Immunol. 135：p. 1564-1572、1985年；Takaiら、J. Immunol. 137：p. 3494-3500、1986年；Takaiら、J. Immunol. 140：p. 508-512、1988年；Herrmannら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78：p. 2488-2492、1981年；Herrmannら、J. Immunol. 128：p. 1968-1974、1982年；Handaら、J. Immunol. 135：p. 1564-1572、1985年；Takaiら、J. Immunol. 137：p. 3494-3500、1986年；Bowmanら、J. Virology 61：p. 1992-1998；Takaiら、J. Immunol. 140：p. 508-512、1988年；Bertagnoliら、Cellular Immunology 133：p. 327-341、1991年；Brownら、J. Immunol. 153：p. 3079-3092、1994年。

【0162】

レセプターリガンド活性に関する他のアッセイとしては、限定はしないが、以下に記載されたものが挙げられる：Current Protocols in Immunology J. E. Coligan、A. M. Kruisbeek、D. H. Margulies、E. M. Shevach、W. Strober 編、Pub. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience (第7. 28章、Measurement of Cellular Adhesion under static conditions 7. 28. 1-7. 28. 22)；Takaiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84：p. 6864-6868、1987年；Biererら、J. Exp. Med. 168：p. 1145-1156、1988年；Rosensteinら、J. Exp. Med. 169：p. 149-160、1989年；Stoltenborgら、J. Immunol. Methods 175：p. 59-64、1994年；Stittら、Cell 80：p. 661-670、1995年。

【0163】

上記の技術から明らかなように、多くの異なる機能的アッセイが、オーファン分泌タンパク質の機能を決定するために、多くの異なる細胞型で実施されている。細胞表面レセプターを確認するために異なる種々の細胞型に対する単一アッセイを実施することが極めてより好ましい。一旦、細胞型または細胞群が、アッセイで確認されたら、好ましくは、細胞は、表面結合切断可能剤（例えば、上記の型の増感剤）を有するように改変される。

【0164】

1つの一般的実施形態において、増感剤は、脂質二層膜構造に適合し、このような構造の大きな分配係数を有する長鎖アルキル構造、脂肪酸、モノー、ジーまたはトリグリセリド、リン脂質またはステロールなどの脂質固定部分に結合される。図15は、1つ以上の長鎖脂肪族アルキル基をフタロシアニン増感剤基に結合させる簡便な化学結合法を図示している。各増感剤に結合したアルキル鎖数は、反応物の化学量論比により調整できる。化合物の、リン脂質ヘッド基またはアミノ基、またはステロール中の反応性基および他の脂質への結合法は周知である。

10

【0165】

一旦形成されたら、誘導体化増感剤は、細胞（例えば、ミセル形態またはリポソーム形態）に加えられ、従来の条件下（例えば、生理的な塩およびpH、37℃で30分から数時間の時間）で細胞膜に拡散または平衡にさせる。別の一般法において、ビオチン標識リン脂質（分子プローブ）が、細胞膜に組み込まれ、次いでストレプトアビジン増感剤分子が添加される。この増感剤分子は、ストレプトアビジンに共有結合ができるか、あるいはビオチン標識増感剤分子をまずストレプトアビジン（1：1比）に加え、次いで細胞膜を標識する。

20

【0166】

（GPCR経路のアッセイ）

Gタンパク質結合レセプター（GPCR）は、薬物標的の最も重要なファミリーの一つに相当する。Gタンパク質媒介シグナル伝達系は、哺乳動物および酵母などの多種類の生物で確認されている。GPCRは、他の細胞外シグナルの中で、神経伝達物質、ホルモン、臭気物質および光に相当する。GPCRは、7つの別個の疎水性領域を特徴とするタンパク質の大きなスーパーファミリーに相当すると考えられ、各々が、約20～30個のアミノ酸長であり、膜貫通ドメインを形成する。アミノ酸配列は、スーパーファミリー全体にわたって保存されないが、系統発生的に関連する各サブファミリーは、新規メンバーを同定し、分類するのに使用できる多くの高保存性アミノ酸モチーフを含有する。個々のGPCRは、特にシグナル伝達経路を活性化するが、少なくとも10の異なるシグナル伝達経路がGPCRを経て活性化されることが知られている。例えば、 β 2アドレナリン作用レセプター（ β AR）は、プロト型の哺乳動物GPCRである。アゴニスト結合に応じて、 β ARレセプターは、Gタンパク質（ G_s ）を活性化し、次いで細胞内でのアデニラートシクラーゼおよび環状アデノシンモノリン酸エステルの産生を刺激する。

30

【0167】

GPCRスーパーファミリーのメンバーが、Gタンパク質結合レセプターキナーゼ（GRK）リン酸化に続く、アレスチン結合を含む共通の機構により脱感作すると仮定されてきた。タンパク質 β -アレスチンは、Gタンパク質レセプターキナーゼによりリン酸化されたアゴニスト活性化レセプターの結合によりGPCRシグナル伝達を調節する。 β -アレスチンタンパク質は、レセプターの内在化の間、GPCRに結合したままである。GPCRと α -アレスチンとの間の相互作用は、幾つかの方法を用いて測定できる。一例では、 β -アレスチンタンパク質は、緑色蛍光タンパク質に融合し、タンパク質融合体が生じる（Barakら、（1997）J. Biol. Chem. 272（44）：p. 27497-500）。GPCRに対する β -アレスチンのアゴニスト依存性結合は、蛍光顕微鏡によって視覚化され得る。それに続くGPCR- β -アレスチン複合体のクラスリン被覆ピットへの輸送を見るためにも顕微鏡が使用できる。生存細胞中、GPCRに対する β -アレスチンの結合を測定する他の方法としては、FRET（蛍光共鳴エネルギー移送

40

50

）、BRET（生物発光エネルギー移送）または酵素補足（Rossiら、（1997）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94（16）：p. 8405-10）などの方法が挙げられる。

【0168】

現在、天然リガンドと機能が知られているGPCRは400個近くある。これら公知のGPCRは、それらの内因性リガンドによって名付けられ、大きく5つのカテゴリーに分類されている。すなわち、クラスAのロドプシン様；クラスBのセクレチン様；クラスCの代謝回転性グルタミン酸塩／フェロモン；クラスDの真菌フェロモン；クラスEのcAMP（ジクチオステリウム）である。クラスAの代表的メンバーは、アミンレセプター（例えば、ムスカリン性、ニコチン性、アドレナリン性、アデノシン、ドパミン、ヒスタミン、およびセロトニン）、ペプチドレセプター（例えば、アンジオテンシン、ブラジキニン、ケノカイン、エンドセリンおよびオピオイド）、ホルモンレセプター（例えば、濾胞刺激、ルトロピンおよびチロトピン）およびロドプシン（光）レセプター、嗅覚（臭い）レセプター、および味覚（味）レセプターを含む感覚レセプターである。クラスBの代表的なものとしては、セレクトインレセプター、カルシトニンレセプター、ガストリンレセプターおよびグルカゴンレセプターが挙げられる。

10

【0169】

GPCRは、血管拡張、心拍、気管支拡張、内分泌、および消化管蠕動を含む重要な生理学的応答を媒介しているので、現在使用されている入手可能な治療薬の多くはGPCRを標的にしている（WhilsonおよびBergsma（2000）、Pharm. News 7：p. 105-114）。例えば、 β -アドレナリン性レセプターに対するリガンドは、アナフィラキシー、ショック、高血圧、低血圧、喘息、および他の状態の処置に用いられている。また、GPCRの自発的活性化の発生によって疾患が生じることもあり、ここでのGPCR細胞応答は、リガンドの非存在下で生じる。この自発的活性化を低下させる（逆アゴニズムとして知られている過程）GPCRのアンタゴニストである薬物は重要な治療薬である。

20

【0170】

GPCRが治療上重要であるため、GPCRリガンド活性のための化合物を迅速にスクリーニングする方法が望ましい。本発明は、GPCR経路を調節する（活性化または阻害、増強または抑制）能力に関して試験化合物および試験条件をスクリーニングする方法を提供し、そして細胞一般におけるオーファンGPCRの機能などのGPCR経路機能の評価する方法を提供する。本発明の方法の他の局面において、親油性光増感剤を細胞膜に結合する。リガンド候補物またはリガンド候補物のライブラリを分子タグに結合でき、その後、そのリガンドをレセプターに結合させる。光源によって光増感剤を励起させた後、切断可能なリンカーが切断して分子タグを放出する。放出した分子タグは、上記のような細胞外流体中で検出でき、それによってGPCRに対するリガンド構造の情報が提供される。

30

【0171】

一局面において、本発明は、以下を含むGPCR活性のモジュレーターをスクリーニングする方法を提供する：a) 公知の、または未知のGPCRを発現する細胞を提供すること（この細胞は親油性光増感剤で標識されている）、b) 分子タグに対する切断可能な結合によって結合体化した試験化合物に、細胞を曝露させること、c) 光増感剤を照射して、分子タグを切断させる一重項酵素を生成させること、d) 放出した分子タグからのシグナルを検出すること、および（d）試験化合物の存在下で生じたシグナルと不在下で生じたシグナルとを比較すること（シグナルの変化は、前記化合物がGPCRのモジュレーターであることを示す）。

40

【0172】

このように本発明は、オーファンGPCRに関するモジュレーターと同定する便利な方法を提供する。オーファンGPCRは、代表的に配列比較に基づく方法によって同定される新規のレセプターであるが、その同起源リガンドは知られていない。400から5000

50

ものオーファンGPCRがヒトゲノムにおいてコードし得ると予想されており、新規薬剤開発に対する大きな可能性を示している。

【0173】

(GPCRを発現する細胞の調製)

GPCRを発現する細胞を調製する方法が記載されている。例えば、米国特許第6,051,386号明細書、米国特許第6,069,296号明細書、米国特許第6,111,076号明細書、および米国特許第6,280,934号明細書を参照されたい。一般にGPCRをコードする相補DNAを得ることができ、当該分野に周知の方法を用いて、適切な細胞宿主内で発現させることができる。代表的には、一旦、全長GPCR cDNAが得られれば、哺乳動物細胞系、酵母細胞、両生類細胞または昆虫細胞の中で機能分析のためにそれを発現させることができる。好ましくは、細胞系は、GPCR発現に関して特徴付けされており、必要に応じて、下流のエフェクターへの機能的結合を可能にする広いGタンパク質レパートリーを場合によっては含有している哺乳動物の細胞系である。このような細胞系の例としては、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)またはヒト胎芽腎臓293(HEK293)系が挙げられる。cDNAが発現する細胞は、本明細書に開示された方法を用いてコードでき、したがって、リガンドの多重スクリーニングが可能となる。次に上記に開示された活性リガンドを同定するために、発現レセプターを様々な機能的アッセイにおいてスクリーンすることができる。

10

【実施例】

【0174】

20

本発明を、以下の合成および実例となる実施例によりさらに説明される。部およびパーセンテージは、他に指定されない限り、重量による。温度は、他に特記しない限り摂氏度(°C)である。以下の調製および実施例は、本発明を説明するが、その範囲を限定する意図はない。他に指定されない限り、以下の実施例に使用されるペプチドは、自動化合成機を用いる合成により調製し、ゲル電気泳動またはHPLCにより精製した。

【0175】

以下の略語は、以下に記載された意味を有する：

トリスHCl-Bio Whittaker (Walkersville, MD) からの
トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-HCl (10×溶液)

TLC-薄層クロマトグラフィー

30

BSA-ウシ血清アルブミン(例えば、Sigma Chemical Company
(St. Louis, MO) または同様の試薬供給元から入手できる)

EDTA-Sigma Chemical Companyからのエチレンジアミン四酢酸

FAM-カルボキシフルオレセイン

EMCS-N-ε-マレイミドカプロイロキシースクシンイミドエステル

EDC-1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド

NHS-N-ヒドロキシスクシンイミド

DCC-1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド

DMF-ジメチルホルムアミド

40

Fmoc-N-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)-

(実施例1：分子タグの結合体化および放出)

図7A-Bは、分子タグ前駆体と抗体または放出アミノ基を有する他の結合化合物との結合体化、ならびに放出分子タグとしてスルフィオン酸部分を生成するための、生じた結合体化と一重項酸素との反応に関する方法論を要約している。図8A-Jは、幾つかの分子タグ試薬を示し、これらのほとんどは、出発物質として5-または6-カルボキシフルオレセイン(FAM)を利用する。

【0176】

(実施例2：Pro2、Pro4、およびPro6からPro13の調製)

図9Aに図示されたスキームは、カルボキシフルオレセイン誘導化分子タグ前駆体(す

50

なわち、Pro 2、Pro 4、Pro 6、Pro 7、Pro 8、Pro 9、Pro 10、Pro 11、Pro 12、およびPro 13)の調製のための5ステップ法を示している。第1のステップは、DMF中、5-FAMまたは6-FAMと、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)と1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)とを反応させ、対応するエステルを得る反応を含み、次にこれを種々のジアミンで処理して所望のアミド化合物1を得た。化合物1のヨード酢酸N-スクシンイミジルによる処理により、予想されたヨードアセトアミド誘導体を得たが、これを単離せずに、トリエチルアミンの存在下、さらに3-メルカプトプロピオン酸と反応させた。最後に、上記のとおり、生じたβ-チオ酸(化合物2)を、そのNHSエステルに変換した。種々のe-タグ部分を、5-FAMまたは6-FAMから出発して、種々のジアミンの1つにより合成した。ジアミンは、図9Aの最初の反応で $H_2N \wedge X \wedge NH_2$ となる。FAMの位置異性体とジアミン内の「X」の化学的実体は、合成された各々の分子タグ前駆体に関して下表に示している。移動性修飾因子部分の考察における上記のとおり、明らかに、ジアミンのXは、広範囲のさらなる形体を有することができる。

前駆体	FAM	X	
Pro 2	5-FAM	$C(CH_3)_2$	
Pro 4	5-FAM	炭素なし	
Pro 6	5-FAM	$(CH_2)_8$	
Pro 7	5-FAM	$CH_2OCH_2CH_2OCH_2$	
Pro 8	5-FAM	$CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2$	20
Pro 9	5-FAM	1, 4-フェニル	
Pro 10	6-FAM	$C(CH_3)_2$	
Pro 11	6-FAM	炭素なし	
Pro 12	6-FAM	$CH_2OCH_2CH_2OCH_2$	
Pro 13	6-FAM	$CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2$	
CH ₂			

(化合物1の合成)

乾燥DMF(5 mL)中の5-カルボキシフルオレセインまたは6-カルボキシフルオレセイン(0.5 mmol)の攪拌溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミド(1.1当量)と1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(1.1当量)とを加えた。約10分後、白色固体(ジシクロヘキシル尿素)の形成が開始された。反応混合物を、窒素下、室温で一晩攪拌した。TLC(9:1の CH_2Cl_2 -MeOH)は、出発物質の完全な消失を示した。

【0177】

上記混合物からの上清を、DMF(10 mL)中のジアミン(2~5当量)攪拌溶液に滴下した。TLC(40:9:1の CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O)から明らかにように、反応は直ちに完了した。溶媒を減圧下で除去した。生じた残渣の、Iatrobeadsシリカでのフラッシュクロマトグラフィーにより、58%~89%の収率で所望のアミン(化合物1)を得た。化合物1の ^1H NMR(300 MHz、DMSO- d_6)は、帰属された構造に一致した。

【0178】

(化合物2の合成)

アミン(化合物1)(0.3 mmol)に、乾燥DMF(10 mL)とヨード酢酸N-スクシンイミジル(1.1当量)とを連続的に加えた。生じた混合物を、透明な溶液が得られるまで室温で攪拌した。TLC(40:9:1の CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O)は、反応完了を示した。

【0179】

次に、上記反応溶液を、トリエチルアミン(1.2当量)と3-メルカプトプロピオン酸(3.2当量)とで処理した。この混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒の減圧下での除

去に次いでフラッシュクロマトグラフィーにより、 β -チオ酸（化合物 2）を 62%～91%の収率で得た。化合物 2 の構造を、その ^1NMR （300 MHz、 $\text{DMSO}-d_6$ ）に基づいて帰属させた。

【0180】

（Pro 2、Pro 4、および Pro 6～Pro 13 の合成）

乾燥 DMF（2 mL）中の β -チオ酸（化合物 2）（0.05 mmol）の攪拌溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミド（1.5 当量）と 1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド（1.5 当量）とを加えた。この混合物を、窒素下、室温で 24 時間～48 時間（全

ての出発物質が反応し終わるまで）攪拌した。この反応混合物を減圧下にて濃縮してから、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して、標的分子を 41%～92%の収率で得

10

【0181】

（Pro 1 の調製）

この反応の化合物を図 9 B に示している。乾燥 DMF（2 mL）中、5-ヨードアセトアミドフルオレセイン（化合物 4）（24 mg、0.047 mmol）の攪拌溶液に、トリエチルアミン（8 μL 、0.057 mmol）と 3-メルカプトプロピオン酸（5 μL 、0.057 mmol）とを加えた。生じた溶液を室温で 1.5 時間攪拌した。TLC（40：9：1 の CH_2Cl_2 - MeOH - H_2O ）は、反応完了を示した。引き続き、N-ヒドロキシスクシンイミド（9 mg、0.078 mmol）と 1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド（18 mg、0.087 mmol）とを加えた。反応混合物を、窒素下、室温で 19 時間攪拌し、その時点で、TLC は、出発物質の完全消失を示した。溶媒の減圧除去に続いて、溶離液として CH_2Cl_2 - MeOH の 25：1 および 15：1 を用いるフラッシュクロマトグラフィーにより、Pro 1（23 mg、83%）を得た。

20

【0182】

（Pro 3 の調製）

この反応の化合物を図 9 C に示している。乾燥 DMF（2 mL）中の 6-ヨードアセトアミドフルオレセイン（化合物 5）（26 mg、0.050 mmol）の攪拌溶液に、トリエチルアミン（8 μL 、0.057 mmol）と 3-メルカプトプロピオン酸（5 μL 、0.057 mmol）とを加えた。生じた溶液を室温で 1.5 時間攪拌した。TLC（40：9：1 の CH_2Cl_2 - MeOH - H_2O ）は、反応完了を示した。引き続き、N-ヒドロキシスクシンイミド（11 mg、0.096 mmol）と 1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド（18 mg、0.087 mmol）とを加えた。反応混合物を、窒素下、室温で 19 時間攪拌し、その時点で、TLC は、出発物質の完全消失を示した。溶媒の減圧除去に続いて、溶離液として 30：1 および 20：1 の CH_2Cl_2 - MeOH を用いるフラッシュクロマトグラフィーにより、Pro 3（18 mg、61%）を得た。

30

【0183】

（Pro 5 の調製）

この反応の化合物を図 9 D に示している。

【0184】

（化合物 7 の合成）

40

乾燥 DMF（5 mL）中の 5-（ブロモメチル）フルオレセイン（化合物 6）（40 mg、0.095 mmol）の攪拌溶液に、トリエチルアミン（15 μL 、0.108 mmol）と 3-メルカプトプロピオン酸（10 μL 、0.115 mmol）とを加えた。生じた溶液を室温で 2 日間攪拌した。TLC（40：9：1 の CH_2Cl_2 - MeOH - H_2O ）は、反応完了を示した。反応溶液を、減圧下でエバポレートした。最後に、溶離液として 30：1 および 25：1 の CH_2Cl_2 - MeOH を使用するフラッシュクロマトグラフィーにより、 β -チオ酸（化合物 7）（28 mg、66%）を得た。

【0185】

（Pro 5 の合成）

乾燥 DMF（2 mL）中の酸（化合物 7）（27 mg、0.060 mmol）の溶液に

50

、N-ヒドロキシスクシンイミド（11 mg、0.096 mmol）と1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド（20 mg、0.097 mmol）とを加えた。反応混合物を、窒素下、室温で2日間攪拌し、その時点で、TLC（9：1のCH₂Cl₂-MeOH）は、出発物質の完全消失を示した。溶媒の減圧下での除去に続いて、30：1のCH₂Cl₂-MeOHによるフラッシュクロマトグラフィーにより、Pro 5（24 mg、73%）を得た。

【0186】

（Pro 14の調製）

この反応の化合物を図9Eに示している。

【0187】

（化合物9の合成）

5-アミノアセトアミドフルオレセイン（化合物8）（49 mg、0.121 mmol）に、乾燥DMF（4 mL）とヨード酢酸N-スクシンイミジル（52 mg、0.184）を連続して加えた。透明な溶液が生じ、TLC（40：9：1のCH₂Cl₂-MeOH-H₂O）は、出発物質の完全消失を示した。

【0188】

次に、上記反応溶液を、トリエチルアミン（30 μL、0.215 mmol）と3-メルカプトプロピオン酸（30 μL、0.344 mmol）とで処理した。生じた混合物を2時間攪拌した。溶媒の減圧下での除去に続いて、溶離液として20：1および15：1のCH₂Cl₂-MeOHを用いるフラッシュクロマトグラフィーにより、β-チオ酸（化合物9）（41 mg、62%）を得た。構造の帰属は、¹NMR（300 MHz、DMF-SO-d₆）に基づいて成された。

【0189】

（Pro 14の合成）

乾燥DMF（2 mL）中の化合物9（22 mg、0.04 mmol）の攪拌溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミド（9 mg、0.078 mmol）と1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド（16 mg、0.078 mmol）とを加えた。生じた溶液を、窒素下、室温で約24時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣を、溶離液として30：1および20：1のCH₂Cl₂-MeOHを用いるフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、Pro 14（18 mg、70%）を得た。

【0190】

（Pro 15、Pro 20、Pro 22およびPro 28の合成）

分子タグPro 15、Pro 20、Pro 22およびPro 28のNHSエステルを生成するための合成スキームは、それぞれ図16F～Iに示されている。全ての試薬および反応条件は、当該分野で慣用されており、上記の反応と同様に進行する。

【0191】

（実施例3：タンパク質-分子タグ結合体を用いる細胞表面レセプター結合の特徴付け）

放出プローブタグの量が細胞サンプル中の全レセプター数に関連することを証明するために、上記のセクションIIに記載されたのと同様のリガンド-レセプターアッセイを、TNFに応答する漸増数の標的細胞（U937細胞）を含有するサンプルに加えられた一定量（約55 nM）のタンパク質プローブ（TNF-タグ）を加えることにより実施した。各サンプルにおいて、プローブを細胞と共に60分間インキュベートし、次いでサンプルを640～700 nmで照射して、結合したeタグ（etag）を放出させる。サンプルを、キャピラリー電気泳動により分離し、各サンプルからの放出プローブ量を、曲線下面積として定量した。このアッセイおよび以下に記載されたアッセイにおいて、細胞を最初に、細胞表面増感剤を含有するように改変した。

【0192】

この結果を、図17にプロットする。図17は、サンプル細胞数の関数としてプロットされ、発現される分子タグの検出レベルをRFU（相対的蛍光単位）として示す。見られ

10

20

30

40

50

るように、レセプター飽和未満の放出したタグによる証拠として、細胞数（したがって、細胞レセプター数）と全結合プローブ数との間に直線関係がある。添加プローブ濃度およびサンプル中の細胞数を知ることによって細胞1個あたりのおよそのレセプターの数決定できる。本発明の重要な利点により、本方法は、わずか200～300のレセプター／細胞に対しても高感度である。

【0193】

レセプター密度の決定は、タンパク質プローブが標的細胞との結合に関してネイティブタンパク質と競合する競合結合研究によっても、本発明に従って行うことができる。この方法を例示するために、一定数の標的U937細胞、50倍過剰のネイティブTNF、および漸増濃度のTNF-分子タグ結合体を混合することにより、多サンプルアッセイを行った。図18Aのプロットは、レセプター-結合曲線の間接点から決定した計算Kdが約4nMであることを示している。内部標準に対して標準化した結合曲線の最大値から決定したBmaxは約 1×10^3 レセプター／細胞であり、図17で見られた結果と一致している。

10

【0194】

THP-1細胞のCD40Lタンパク質プローブの放出を測定するために同様のアッセイを実施した。図18Bに示した結果は、計算したレセプター数／細胞がU937細胞上のTNFレセプターから計算した受容対数／細胞の約半分であり、KdはU937細胞に対するTNF結合のKdの約2倍であることを示している。

【0195】

上記のように、前記アッセイはまた、試験化合物の調節能力、例えば、レセプターに対するタンパク質プローブの結合を阻害する能力を調べるためにも使用できる。このアッセイは、一定数（ 5×10^4 ）のU937細胞を、一定濃度のTNF-分子タグ結合体（277nM）および漸増量の各々のネイティブTNF（競合的阻害剤として）を混合した研究によって例示されている。図19に示したプロットおよび特に拡大挿入図のプロットは、未標識TNFが、約870nMの添加濃度で、結合したTNFプローブの半分と取って代わっていることを示している。

20

【0196】

種々の細胞系における種々のプローブを用いて多重反応を行う能力を証明するために、図20に示すように、複数の異なったT細胞、B細胞、単球、上皮細胞および癌細胞の各々に、TNFおよびCD40L分泌タンパク質に対するタンパク質プローブを添加した。各々の細胞型に関して、双方のプローブに対する放出分子タグを、単独分離形式で分析し、ピーク面積を比較し、その結果を図20に示した。見られるように、CD40Lプローブは、Raji細胞、A431細胞およびSKBR3細胞において、高い相対結合レベルを示し、TNFプローブは、他の多くの細胞で優れた相対結合を示し、少数の細胞は、低レベルの双方のレセプターを示した。

30

【0197】

上記の型のアッセイは、単独形態において実施され得、ここで、各サンプルは、異なった濃度の試薬を含有し、各プローブ（全サンプルで同一であり得る）は、個々に分離、検出、定量されることが理解される。あるいは、異なったサンプルの各々が異なったeタグを有するタンパク質プローブを含み得、全サンプルから放出したタグを単一の電気泳動媒体形式において分離し定量することができる。後者のアプローチは、タグ回収効率およびタグ検出効率における変動についての内部コントロールを提供する。

40

【0198】

前記方法は、数百のレセプター／細胞の検出に高感度であり、100,000以上のレセプターまで直線的応答を示す。また、前記方法は、タグの存在によるシフトが相対的にほとんどない状態で、結合アフィニティの簡便な決定を提供する。

【0199】

上記に示したように、本方法は、複数の試験化合物をそれらの調節能力、例えば、分泌タンパク質リガンドの、そのレセプター、例えば、細胞表面レセプターに対する結合を増

50

強または阻害する能力についてのスクリーニングに容易に適合される。本方法は図 2 1 A および 2 1 B に例示してあり、これらは、タンパク質ガンド 1 2 4 に結合し得る表面レセプター 1 2 2 を有する標的細胞 1 2 0 を示している。前記アッセイの目的は、例えば、リガンドーレセプター結合に介入できる化合物を見出す薬剤発見計画の一部として、複数の化合物を、レセプターに対するリガンド結合の程度を変化させる能力に関して試験することである。

【0 2 0 0】

図 2 1 A は、試験化合物不在下でのアッセイを例示しており、ここでは、タンパク質プローブ 1 2 6 のそのレセプターへの結合および結合プローブの量に比例したタグ 1 2 8 などのそれに続く表面特異的切断により放出したプローブタグを示している。

10

【0 2 0 1】

図 2 1 B では、示されるように、標的細胞（単数または複数）を最初に、レセプター 1 2 2 に結合し得る試験化合物 1 3 0 と混合する。ここでタンパク質プローブを添加すると、レセプターに対するプローブ結合は、プローブと試験化合物との相対濃度およびレセプターに対するこれら 2 つの相対アフィニティに依存して、部分的または完全に阻害され得る。

【0 2 0 2】

好ましい実施形態において、例えばマイクロタイタープレート形式における複数の細胞サンプルを、各々異なった試験化合物、または異なった濃度の同じ試験化合物と混合し、そして各サンプルに添加したプローブは、異なった e タグ部分を有する。結合反応および切断反応後、反応混合物を合わせ、次に合わせた放出 e タグを分離し、単独分離形式において検出する。各サンプルが異なった試験化合物を含有する場合、このような複数の化合物の各々のリガンドーレセプター結合に及ぼす相対的効果が単一の電気泳動図から決定できる。各サンプルが異なった濃度の同じ試験化合物を含有する場合、相対的結合アフィニティおよび有効化合物濃度の範囲が単一の電気泳動図から決定できる。

20

【0 2 0 3】

上記アッセイ法は、標的レセプターに結合するオーファン分泌タンパク質、標的レセプターを含有する細胞の性質、レセプターに対するタンパク質の結合アフィニティ、およびリガンドーレセプター結合を調節し得る化合物の同定に有用である。

【0 2 0 4】

最後に、オーファン分泌タンパク質を解くために、オーファンタンパク質が結合するレセプター（単数または複数）を同定することは重要である。これは本発明の一局面に従い、主要なアミノ酸配列の分析および最終的にレセプターの同定に必要な工程として、細胞結合レセプターの単離に前記アッセイおよび試薬を適合させることによって行うことができる。

30

【0 2 0 5】

図 2 2 A ～ 2 2 C を参照し、本方法は、目的のオーファンタンパク質に特異的に結合する、レセプター 1 3 3 などの表面レセプターを有する、上記のとおり同定された細胞を利用する。好ましくは、かなり高表面密度の（例えば、1, 0 0 0 / 細胞を超える）レセプターを有する細胞を同定できるが、これは重要ではない。1 3 2 に示された同定細胞を、必ずしも切断可能な結合でなくてもタンパク質に結合した選択された e タグ部分 1 3 6 を有するタンパク質プローブ 1 3 4 と、上記のとおり混合する。結合後、公知の溶解手順により、穏やかな溶解条件下、例えば非イオン性界面活性剤の添加により前記細胞を処理し、細胞膜中のレセプターを可溶化させる。この処理によって、細胞溶解産物の一部として、プローブーレセプター複合体 1 3 8（図 2 2 B）が放出する。

40

【0 2 0 6】

ここで、この溶解産物を固相媒体 1 4 0、例えば、プローブ e タグに対して特異的な抗体 1 4 2 などの表面結合抗体を有する粒子床の上に通す。図 2 2 B に示したように、可溶化したレセプターープローブ複合体を捕捉するために、アフィニティークロマトグラフィーが効果的である。非結合物質を除去するために粒子床を洗浄後、公知の方法に従い、リ

50

ンカーの切断により、または好ましくは、複合体を複合体の分解に効果的な塩条件または pH 条件に曝露することによって、レセプターを固体支持体から放出できる。

【0207】

ここで、単離されたレセプターを従来法により同定できるが、従来法としては以下のものが挙げられ得る：(i) アミノ酸分析、(ii) プロテアーゼ消化（例えば、トリプシン消化）および消化粒子の同定（例えば、質量分析による）をによる一次配列の決定、ならびに (iii) SDS ゲル電気泳動による、サブユニット組成およびサイズの決定。この情報によって、レセプターの役割またはクラスを、したがって、分泌タンパク質の役割またはクラスを推測することが可能であり得る。

【図面の簡単な説明】

10

【0208】

【図1-1】図1Aは、膜会合分析物を検出するためにインタクトな細胞または組織を用いる方法を図示している。

【図1-2】図1Bは、膜会合分析物を検出するためにインタクトな細胞または組織を用いる方法を図示している。

【図1-3】図1Cは、膜会合分析物の細胞内部位および細胞外部位の双方を検出するために細胞溶解物を用いる方法を図示している。

【図1-4】図1Dは、膜会合分析物の細胞内部位および細胞外部位の双方を検出するために細胞溶解物を用いる方法を図示している。

【図1-5】図1Eは、細胞または組織サンプル中のレセプターに対するレセプター特異的分子の結合を決定するためにインタクトな細胞または組織を用いる方法を図示している。

20

【図1-6】図1Fは、細胞または組織サンプル中のレセプターに対するレセプター特異的分子の結合を決定するためにインタクトな細胞または組織を用いる方法を図示している。

【図1-7】図1Gは、細胞または組織サンプル中のレセプターに対するレセプター特異的分子の結合を決定するためにインタクトな細胞または組織を用いる方法を図示している。

【図1-8】図1H～1Kは、本発明による、細胞表面レセプターに対する分泌タンパク質の結合を決定するための本発明の実施形態を図示している。

30

【図1-9】図1L～1Oは、本発明による、細胞表面レセプターに対する複数の分泌タンパク質の各々の結合に関する多重測定をするための本発明の実施形態を図示している。

【図1-10】図1Pは、ビオチン化親油性部分とビオチン化増感剤との間のアビジン架橋またはストレプトアビジン架橋を使用する本発明による使用のために、増感剤処理膜を生成する方法を図示している。

【図1-11】図1Qは、ビオチン化部分とビオチン化分子タグ前駆体化合物との間のアビジン架橋またはストレプトアビジン架橋を介して放出可能な分子タグにより誘導された結合化合物を生成する方法を図示している。

【図2】図2は、市販の6-カルボキシフルオレセインから出発する1つの例示的合成アプローチを図示しており、ここで、フェノール性ヒドロキシ基は、無水物を用いて保護される。標準的な抽出の後処理の際に、95%収率の生成物が得られる。本物質をリン酸化してホスホルアミダイトモノマーを生成する。

40

【図3】図3は、第2のアミンを有するアミノアルコールとしての、次いで多数のカルボン酸誘導体と結合される、対称なビスアミノアルコールリンカーの使用を図示している。

【図4】図4は、移動度修飾因子として寄与できる幾つかの安息香酸誘導体の構造を示している。

【図5】図5は、出発物質として5-アミノフルオレセインを用い、これを保護ホスホルアミダイトモノマーに変換する同一連のステップを用いる代替方法の使用を図示している。

【図6】図6は、分子タグの合成において移動度修飾因子に組み立てることができる幾つ

50

かのアミノアルコールおよび二酸二塩化物を図示している。

【図 7 A】図 7 A は、酸化不安定結合および一重項酸素により媒介されたそれぞれの切断反応を図示している。

【図 7 B】図 7 B は、酸化不安定結合および一重項酸素により媒介されたそれぞれの切断反応を図示している。

【図 7 C】図 7 C は、酸化不安定結合および一重項酸素により媒介されたそれぞれの切断反応を図示している。

【図 7 D】図 7 D は、酸化不安定結合および一重項酸素により媒介されたそれぞれの切断反応を図示している。

【図 7 E】図 7 E は、酸化不安定結合および一重項酸素により媒介されたそれぞれの切断反応を図示している。 10

【図 7 F】図 7 F は、酸化不安定結合および一重項酸素により媒介されたそれぞれの切断反応を図示している。

【図 8 A】図 8 A は、抗体に対して e タグ部分を結合体化させ e タグプローブを形成するための一般的方法論、および放出された分子タグとしてスルフィン酸部分を生成するための、生じたプローブと一重項酸素との反応をを図示している。

【図 8 B】図 8 B は、抗体に対して e タグ部分を結合体化させ e タグプローブを形成するための一般的方法論、および放出された分子タグとしてスルフィン酸部分を生成するための、生じたプローブと一重項酸素との反応をを図示している。

【図 9 A】図 9 A は、設計されて合成された e タグ部分の構造を示している (P r o 1 は 20
、 M o l e c u l a r P r o b e , I n c . から市販される)。

【図 9 B】図 9 B は、設計されて合成された e タグ部分の構造を示している (P r o 1 は
、 M o l e c u l a r P r o b e , I n c . から市販される)。

【図 9 C】図 9 C は、設計されて合成された e タグ部分の構造を示している (P r o 1 は
、 M o l e c u l a r P r o b e , I n c . から市販される)。

【図 9 D】図 9 D は、設計されて合成された e タグ部分の構造を示している (P r o 1 は
、 M o l e c u l a r P r o b e , I n c . から市販される)。

【図 9 E】図 9 E は、設計されて合成された e タグ部分の構造を示している (P r o 1 は
、 M o l e c u l a r P r o b e , I n c . から市販される)。

【図 9 F】図 9 F は、設計されて合成された e タグ部分の構造を示している (P r o 1 は 30
、 M o l e c u l a r P r o b e , I n c . から市販される)。

【図 9 G】図 9 G は、設計されて合成された e タグ部分の構造を示している (P r o 1 は
、 M o l e c u l a r P r o b e , I n c . から市販される)。

【図 9 H】図 9 H は、設計されて合成された e タグ部分の構造を示している (P r o 1 は
、 M o l e c u l a r P r o b e , I n c . から市販される)。

【図 9 I】図 9 I は、設計されて合成された e タグ部分の構造を示している (P r o 1 は
、 M o l e c u l a r P r o b e , I n c . から市販される)。

【図 9 J】図 9 J は、設計されて合成された e タグ部分の構造を示している (P r o 1 は
、 M o l e c u l a r P r o b e , I n c . から市販される)。

【図 10 A】図 10 A は、図 9 に図示された e タグ部分の合成化学を図示している。 40

【図 10 B】図 10 B は、図 9 に図示された e タグ部分の合成化学を図示している。

【図 10 C】図 10 C は、図 9 に図示された e タグ部分の合成化学を図示している。

【図 10 D】図 10 D は、図 9 に図示された e タグ部分の合成化学を図示している。

【図 10 E】図 10 E は、図 9 に図示された e タグ部分の合成化学を図示している。

【図 10 F】図 10 F は、図 9 に図示された e タグ部分の合成化学を図示している。

【図 10 G】図 10 G は、図 9 に図示された e タグ部分の合成化学を図示している。

【図 10 H】図 10 H は、図 9 に図示された e タグ部分の合成化学を図示している。

【図 10 I】図 10 I は、図 9 に図示された e タグ部分の合成化学を図示している。

【図 11】図 11 A ~ 11 C は、本発明のアッセイに使用するためにタンパク質プローブを形成する 1 つの方法、ならびに一重項酸素存在下でのプローブ切断反応を図示している 50

。

【図 1 2】図 1 2 A～1 2 C は、本発明のアッセイに使用するためにタンパク質プローブを形成する第 2 の方法、ならびに一重項酸素存在下でのプローブ切断反応を図示している

。

【図 1 3】図 1 3 A～1 3 C は、本発明のアッセイに使用するためにタンパク質プローブを形成する第 3 の方法、ならびに一重項酸素存在下でのプローブ切断反応を図示している

。

【図 1 4】図 1 4 A および 1 4 B は、本発明のアッセイに使用するためにタンパク質プローブ（1 4 A）を形成する第 4 の方法、ならびにこの反応での使用に好適な種々の分子タグ構造（1 4 B）を図示している。

10

【図 1 5】図 1 5 は、増感剤を細胞表面膜に固定化するのに有用な増感剤－脂肪族アシル鎖結合体の合成を図示している。

【図 1 6】図 1 6 A～1 6 C は、マイクロ流体学／C E 装置を用いて本発明の方法を実行するステップを図示している。

【図 1 7】図 1 7 は、アッセイにおける細胞数の関数として、U 9 3 7 細胞への結合に対する T N F－分子タグプローブから放出された分子タグのピーク面積のプロットである。

【図 1 8】図 1 8 A および 1 8 B は、プローブ濃度の関数として、U 9 3 7 細胞（1 8 A）、および T H P－1 細胞由来の C D 4 0 L 分子タグプローブ（1 8 B）への結合に対する、T N F－分子タグプローブから放出された分子タグのピーク面積のプロットである。

【図 1 9】図 1 9 は、細胞に添加された天然 T N F 量の関数として、U 9 3 7 細胞への結合に対する、T N F－分子タグプローブから放出された分子タグのピーク面積のプロットである。

20

【図 2 0】図 2 0 は、示されているように、種々の型の T 細胞、B 細胞、単球、上皮細胞、および癌細胞に対する T N F 分泌タンパク質プローブ（明色バー）および C D 4 0 L 分泌タンパク質プローブ（暗色バー）の検出された結合のレベルを図示している。

【図 2 1】図 2 1 A および 2 1 B は、分泌タンパク質とそのレセプターとの間の結合を阻害する能力について試験化合物をスクリーニングするための本発明の適用を図示している

。

【図 2 2】図 2 2 A～2 2 C は、本発明のさらなる実施形態に従って、分泌タンパク質が結合する細胞表面レセプターを単離し、同定するステップを図示している。

30

【図 1 - 1】

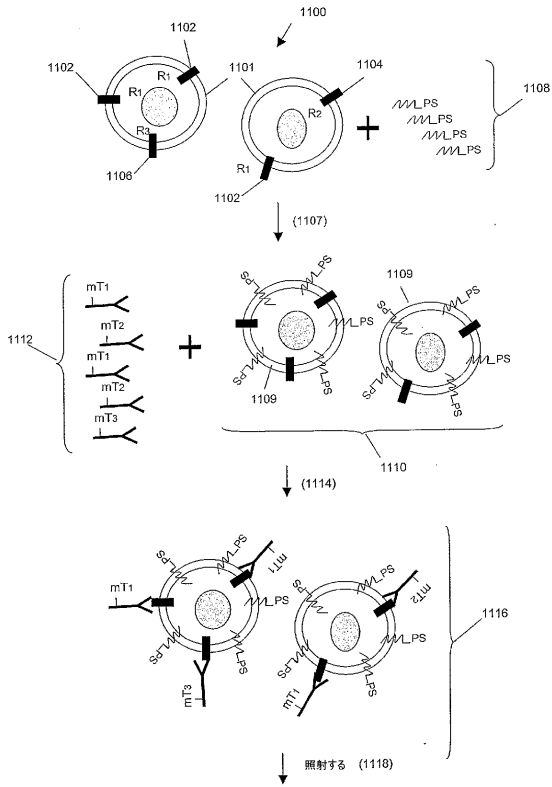


Fig. 1A

【図 1 - 2】

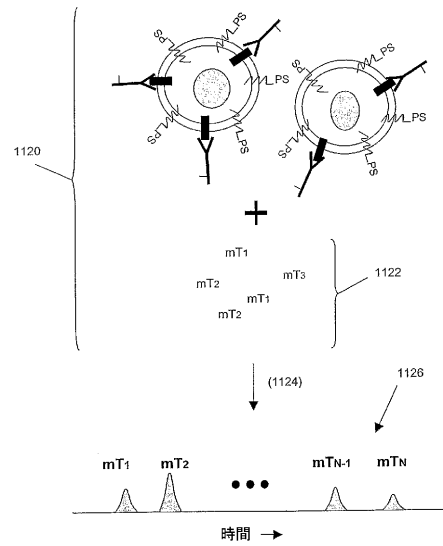


Fig. 1B

【図 1 - 3】

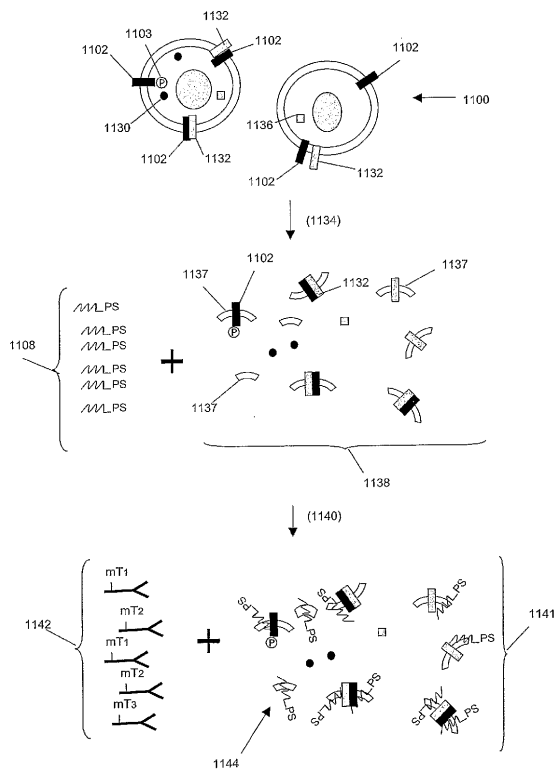


Fig. 1C

【図 1 - 4】

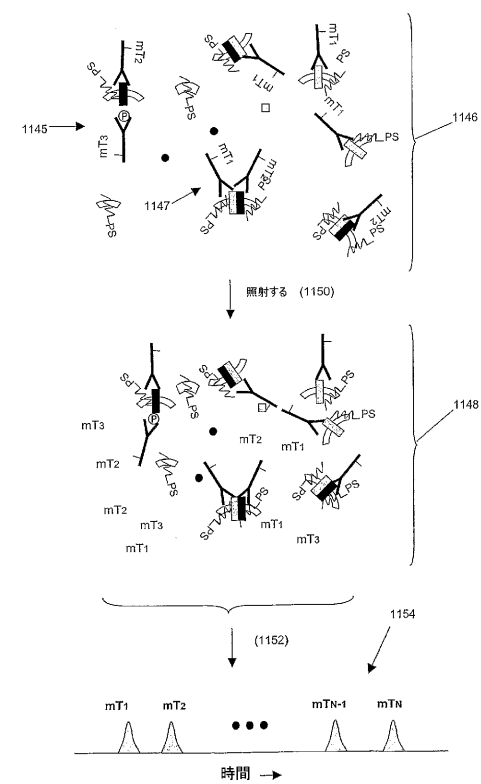


Fig. 1D

【図 1 - 5】

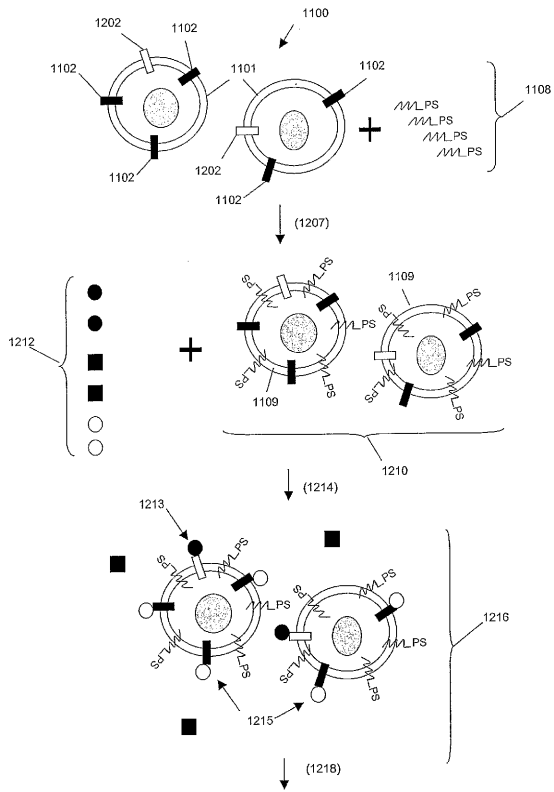


Fig. 1E

【図 1 - 7】

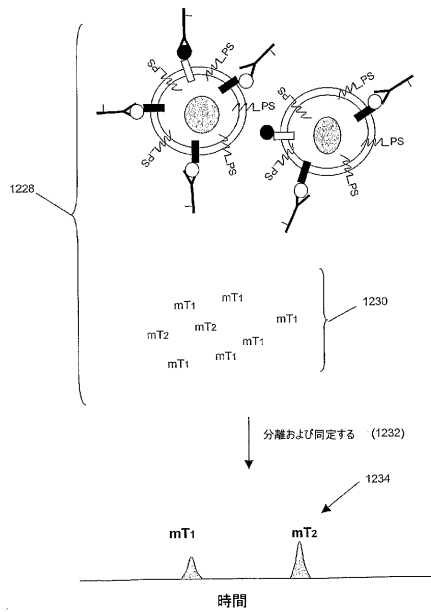


Fig. 1G

【図 1 - 6】

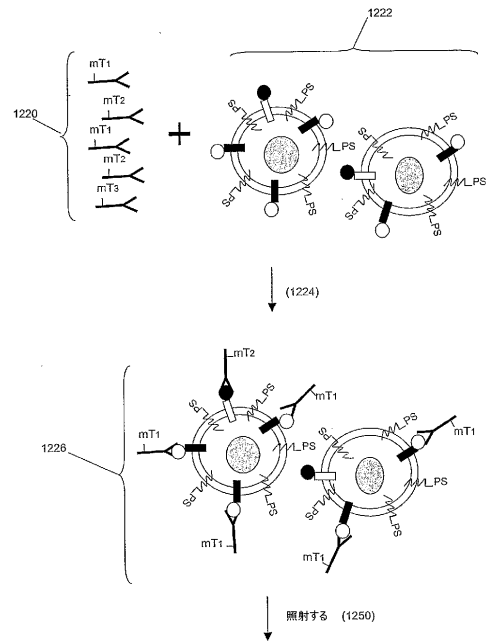


Fig. 1F

【図 1 - 8】

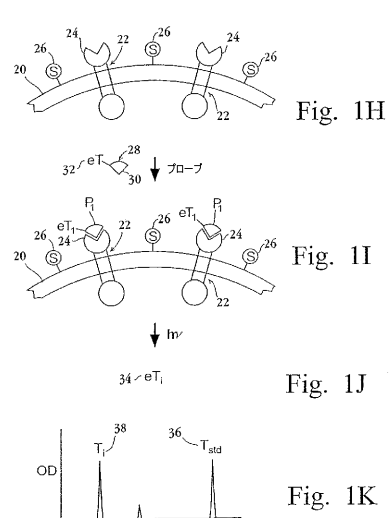


Fig. 1K

【図 1 - 9】

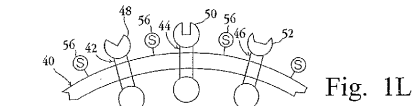


Fig. 1L

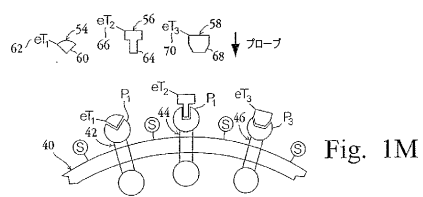


Fig. 1M

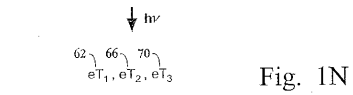


Fig. 1N

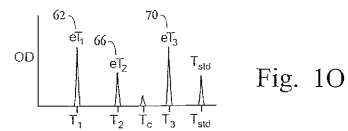


Fig. 1O

【図 1 - 10】

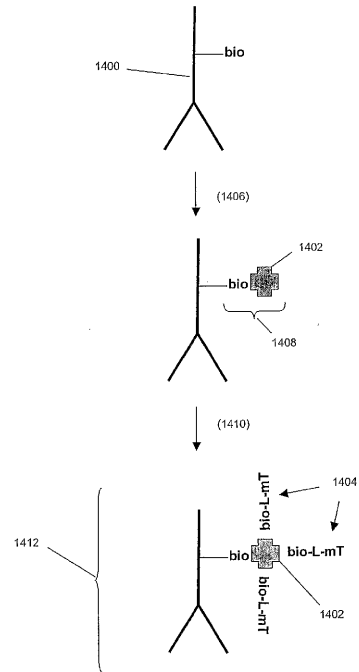


Fig. 1P

【図 1 - 11】

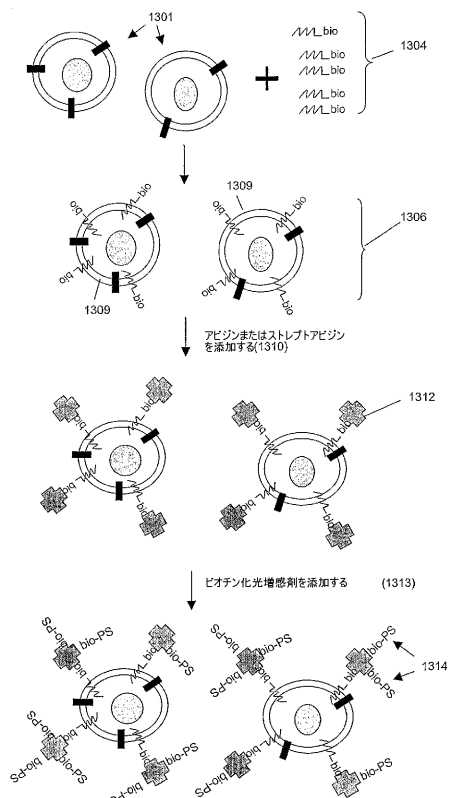


Fig. 1Q

【図 2】

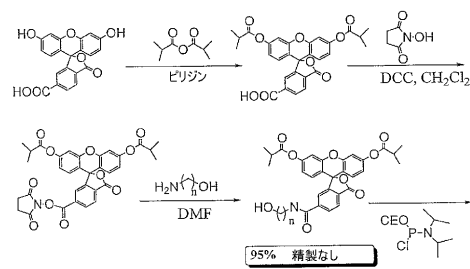


Fig. 2

【図 3】

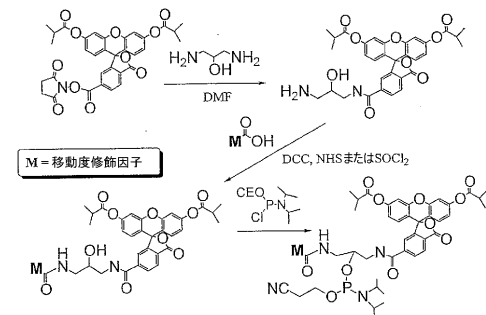


Fig. 3

【図 4】

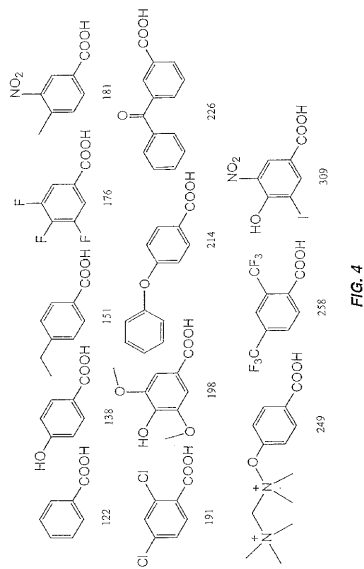


FIG. 4

【図 6】

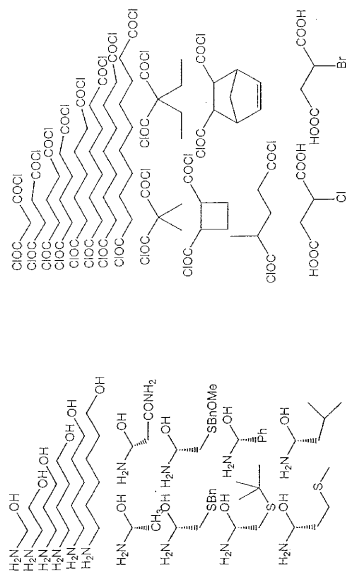


FIG. 6

【図 5】

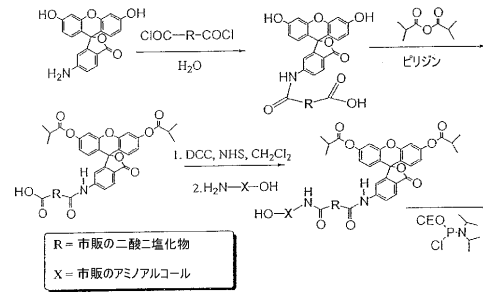


FIG. 5

【図 7 A】

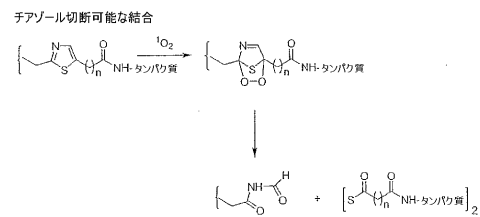


FIG. 7A

【図 7 B】

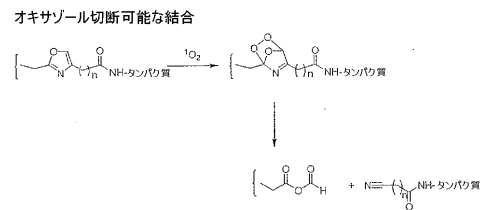


FIG. 7B

【図 7 C】

オレフィン切断可能な結合

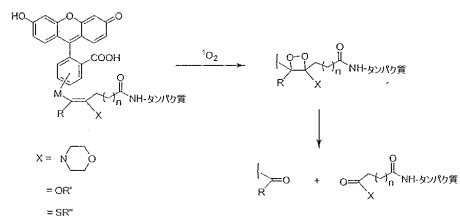


FIG. 7C

【図 7 D】

チオエーテル切断可能な結合

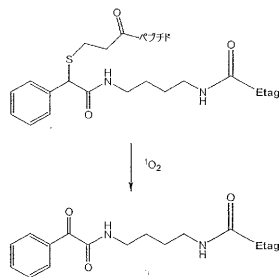


FIG. 7D

【図 7 E】

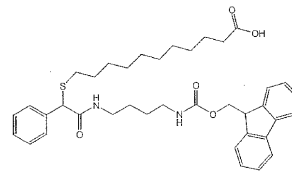


FIG. 7E

【図 7 F】

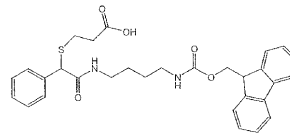


FIG. 7F

【図 8 A】

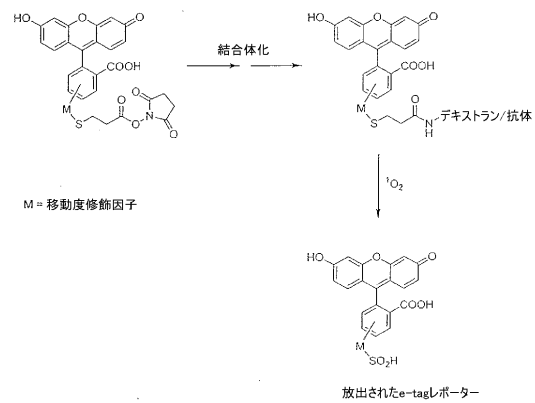


FIG. 8A

【図 8 B】

FAM由来のeTagの合成

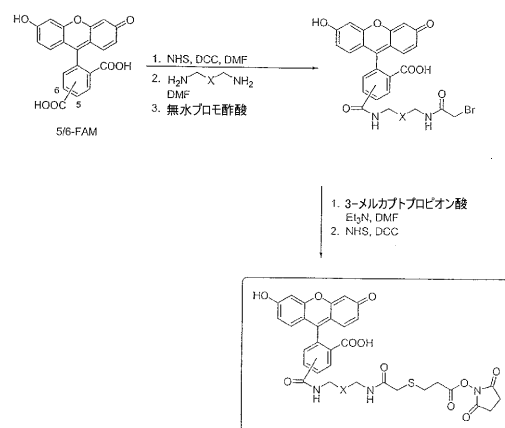


FIG. 8B

【図 9 A】

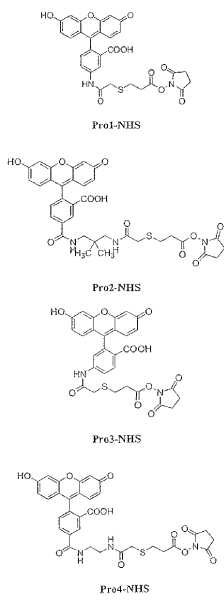


FIG. 9A

【図 9 B】

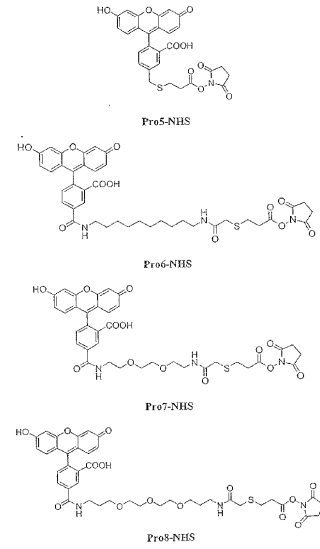


FIG. 9B

【図 9 C】

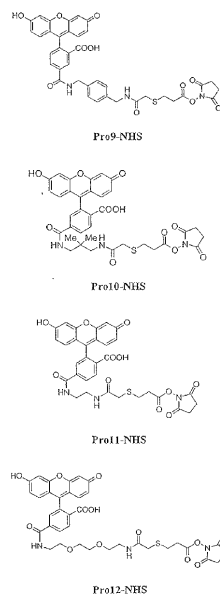


FIG. 9C

【図 9 D】

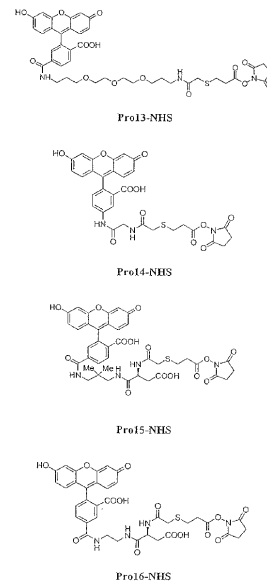


FIG. 9D

【図 9 E】

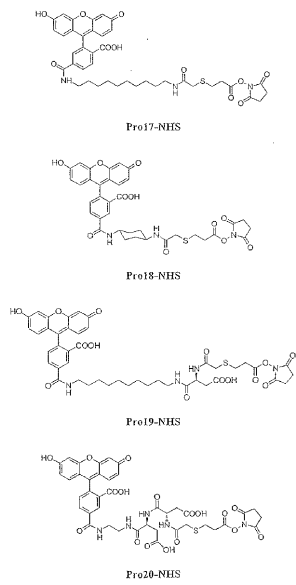


FIG. 9E

【図 9 F】

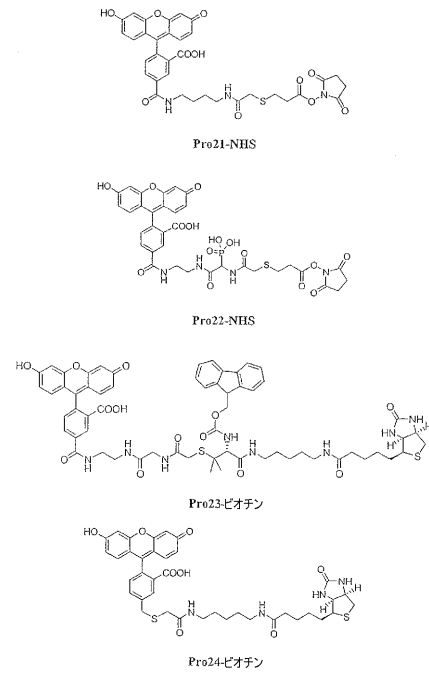


FIG. 9F

【図 9 G】

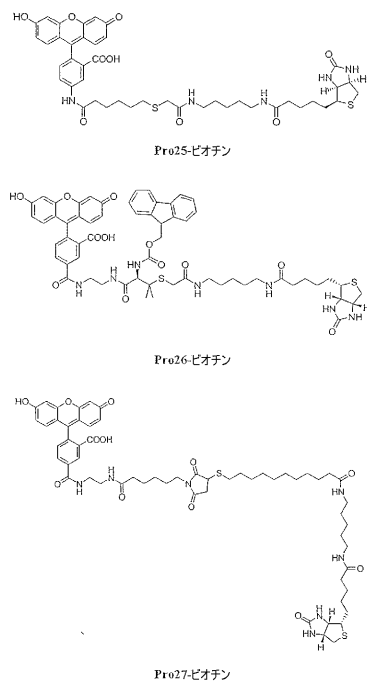


FIG. 9G

【図 9 H】

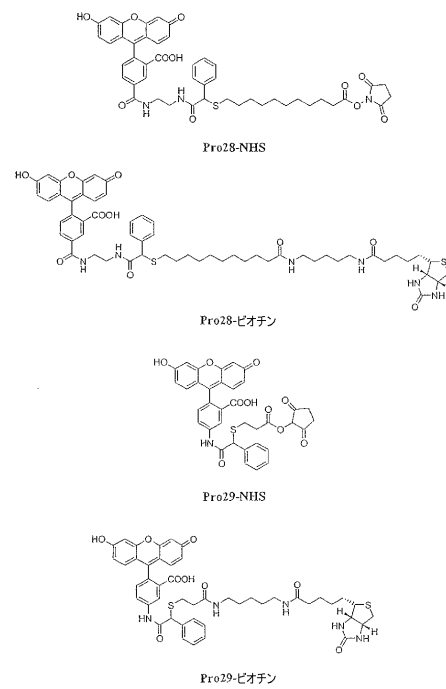


FIG. 9H

【図 9 I】

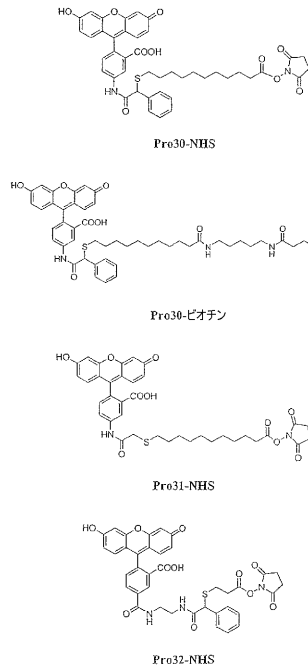


FIG. 9i

【図 9 J】

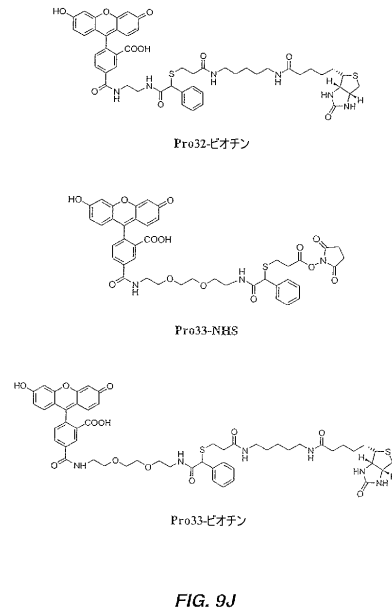


FIG. 9J

【図 10 A】

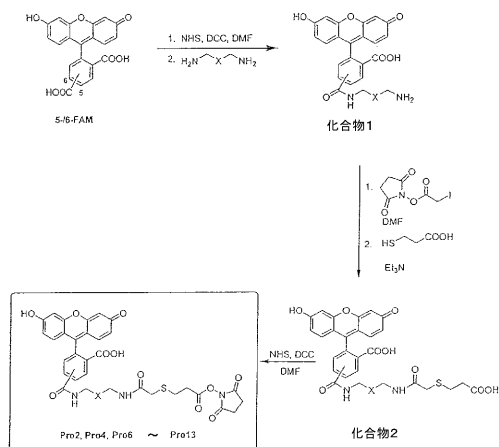


FIG. 10A

【図 10 C】

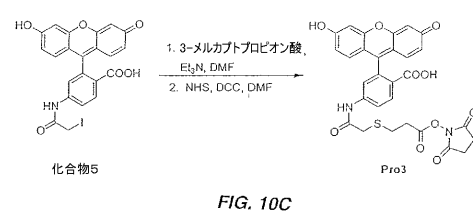


FIG. 10C

【図 10 D】

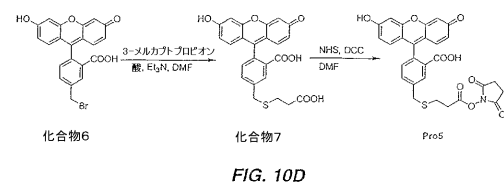


FIG. 10D

【図 10 B】

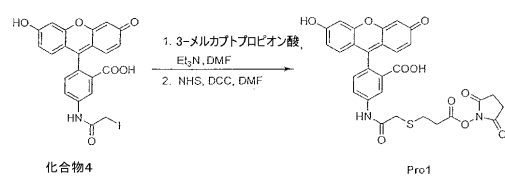


FIG. 10B

【図10E】

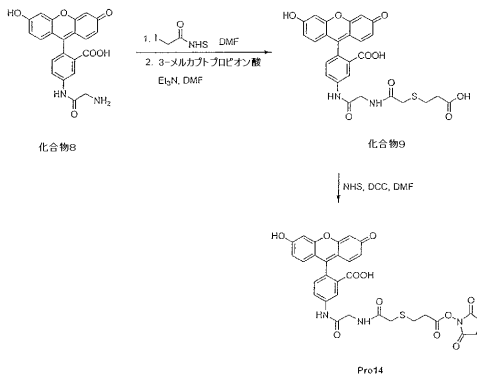


FIG. 10E

【図10F】

Pro15の合成

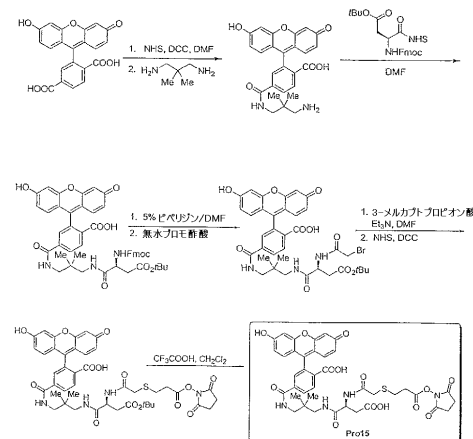


FIG. 10F

【図10G】

Pro20の合成

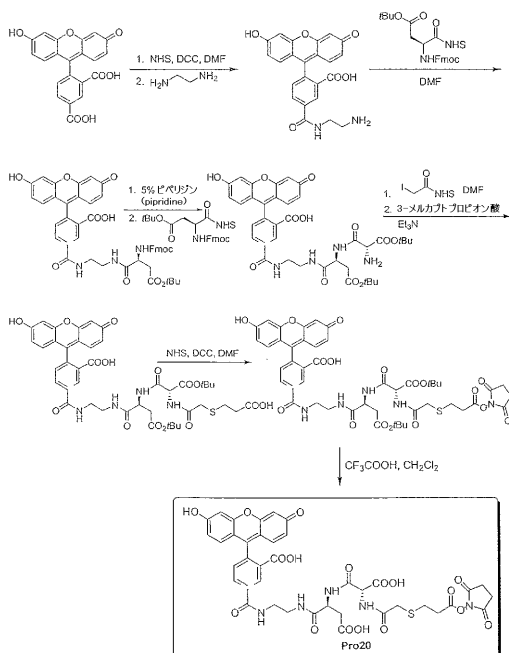


FIG. 10G

【図10H】

Pro22の合成

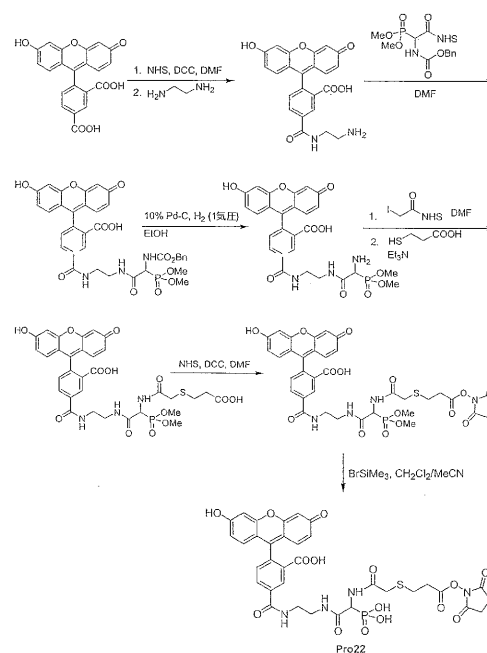


FIG. 10H

【図 10 I】

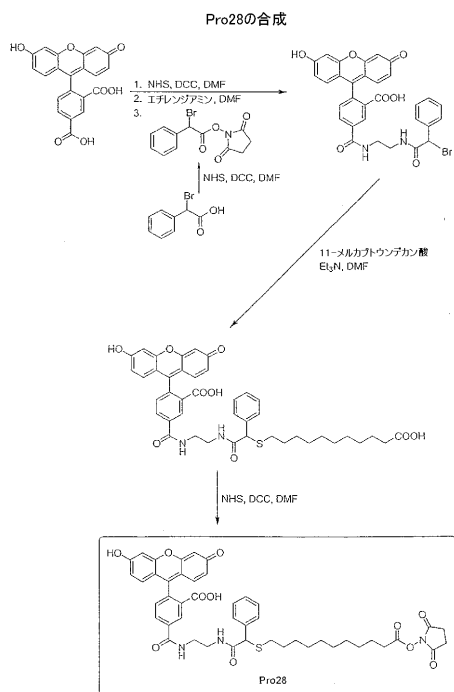
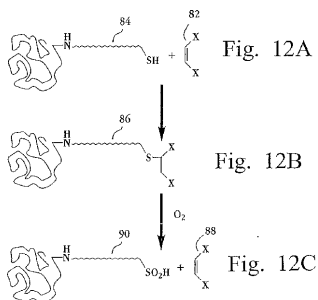
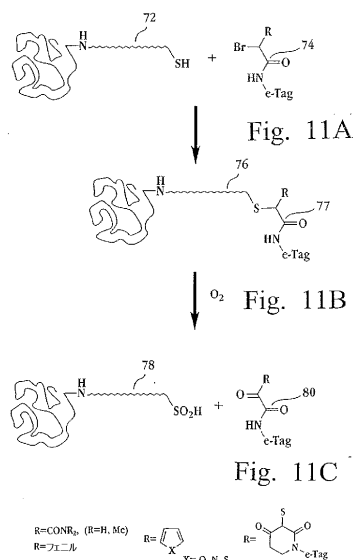
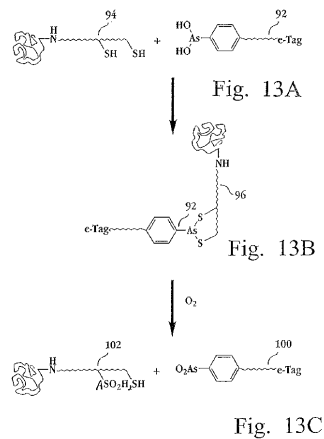
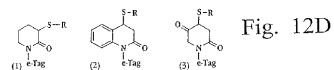


FIG. 10i

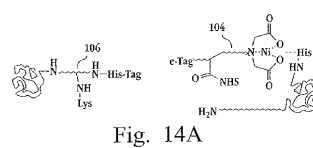
【図 11】



【図 12 D】



【図 14 A】



【図 14 B】

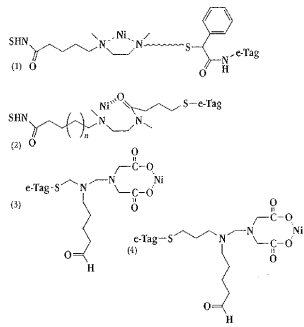


Fig. 14B

【図 15】

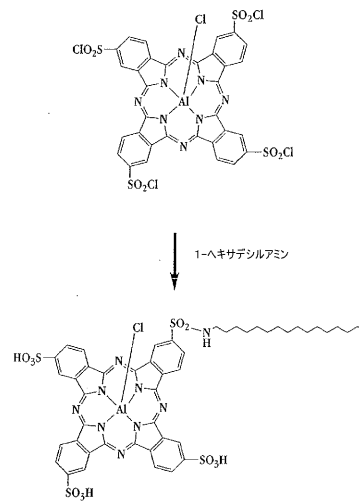


Fig. 15

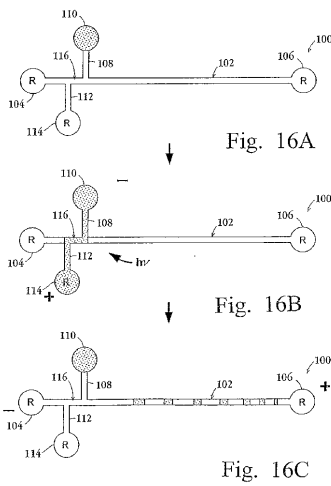


Fig. 16A

Fig. 16B

Fig. 16C

【図 17】

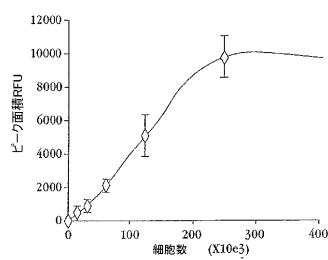


Fig. 17

【図 18】

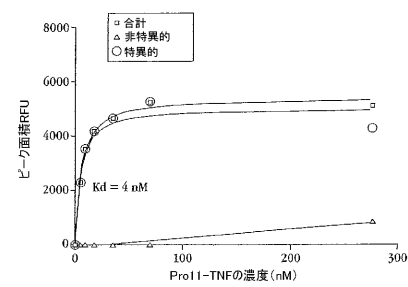


Fig. 18A

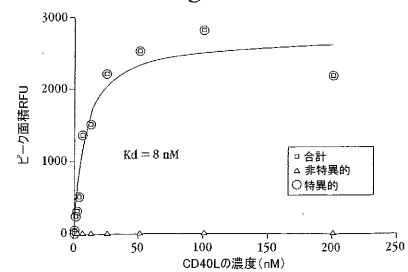


Fig. 18B

【図 19】

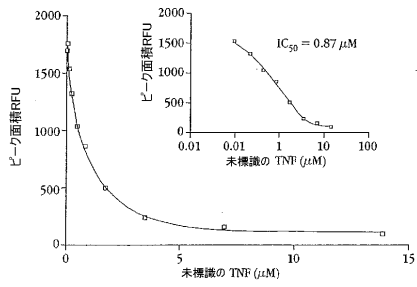


Fig. 19

【図 20】

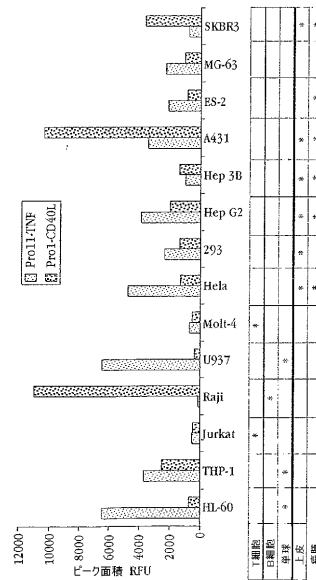


Fig. 20

【図 21 A】

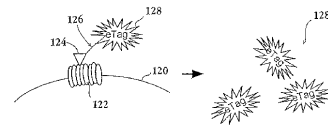


Fig. 21A

【図 21 B】

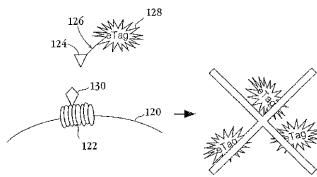


Fig. 21B

【図 22】

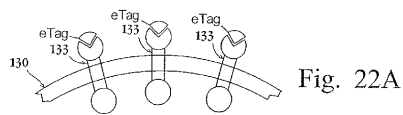


Fig. 22A

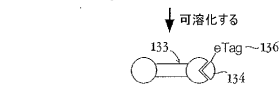


Fig. 22B

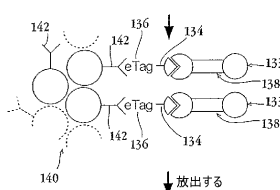


Fig. 22C

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/06806		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/00; G01N 27/00; C12M 1/00 US CL : 435/4, 6, 7.1, 7.21, 287, 287.1, 288.4; 436/518, 527; 422/82.01, 82.02, 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, 287, 287.1, 288.4; 436/518, 527; 422/82.01, 82.02,				
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.		
Y	US 5,763,263 A (DEHLINGER) 9 June 1998(09.06.1998), see entire document.	1-20		
Y	US 6,235,520 B1 (MALIN et al.) 22 May 2001(22.05.2001), see entire document.	1-20		
Y	BALDWIN et al., Synthesis of a Small Molecule Combinatorial Library Encoded with Molecular Tags. Journal of the American Chemical Society. 1995, Vol. 117, pages 5588-5589, see entire document.	1-20		
Y	Database CAPLUS on ACS, AN: 1997:591186, SPICHTER et al., Potentiometric microelectrodes as sensors and detectors. Electrochimica Acta, 1997, Vol. 42, No. 20-22, pages 3137-3145, see abstract.	11,12, 14, 18, and 19		
Y	GEYSEN et al. Isotope or mass encoding of combinatorial libraries. Chemistry & Biology, August 1996, Vol. 3, No. 8, pages 679-688, see entire document.	1-20		
Y	TAGA et al., Capillary electrophoretic determination of the association constant of a protein and a neutral carbohydrate by introducing mercaptoanesulfonate tags to the carbohydrate. Journal of Chromatography A, April 16 1999, Vol. 839, No. 1-2, pages 157-166, see entire document.	1-20		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 10 June 2003 (10.06.2003)		Date of mailing of the international search report 26 JUN 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 <i>Telicia D. Roberts for</i> Lisa V. Daniels-Cook Telephone No. (703) 308-0196		

PCT/US03/06806

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y ✓	US 4,444,879 A (FOSTER et al.) 24 April 1984(24.04.1986), column 15 lines 11-51. ✓	20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/06806

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST and WEST Patent Database
STN-biosis, caplus, embase, medline, cancerlit

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	G 0 1 N 27/26 3 1 5 K	
	G 0 1 N 27/26 3 2 5 A	
	C 1 2 Q 1/02	

(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,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,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 シン, シャラット
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 1 3 5, サン ノゼ, ロイヤル ミドー レーン 3
4 2 0

(72)発明者 チャンーファイ, ポーイン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 1 9, オークランド, パークハースト ドライブ
1 3 0 5 6

Fターム(参考) 2G054 AB04 BB03 CE02 EA03
4B063 QA01 QA18 QQ79 QR48 QR56 QR77 QS36 QX02